

Российская академия сельскохозяйственных наук

***Всероссийский научно-исследовательский
институт физиологии, биохимии и питания
сельскохозяйственных животных***

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

(справочное пособие)

*Под общей редакцией академика РАСХН, профессора
Б.Д. Кальницкого*

ВНИИФБиП с.-х. животных



Боровск, 1997

ББК 28.9
М54
УДК 57.08+612.08:577.1

В справочнике описаны методы биохимического анализа различных метаболитов, биологически активных веществ, минеральных веществ, гормонов и активности пищеварительных и тканевых ферментов.

Большинство приведенных методов отработаны или усовершенствованы научными сотрудниками Всероссийского НИИ физиологии, биохимии и питания в процессе изучения обмена веществ у сельскохозяйственных животных применительно к тем или иным задачам.

Авторы: Агафонов В.И. (канд. биол. наук), Аитова М.Д. (канд. биол. наук), Аитов С.Н. (канд. биол. наук), Бояршинова О.Ф. (канд. биол. наук), Газдаров В.М. (канд. биол. наук), Галочкин В.А. (доктор биол. наук), Галочкина В.П. (канд. биол. наук), Горбачев В.И. (канд. биол. наук), Двинская Л.М. (доктор биол. наук), Кузнецов С.Г. (доктор биол. наук), Лысов А.В. (канд. биол. наук), Материкин А.М. (доктор биол. наук), Матвеев В.А. (канд. биол. наук), Мартюшов В.М. (канд. биол. наук), Мартынова А.С. (канд. биол. наук), Пьянков Н.Р., Решетов В.Б. (канд. биол. наук), Радченков В.П. (доктор биол. наук), Семина Н.Н. (канд. биол. наук), Шевченко В.Г. (канд. биол. наук).

Пособие предназначено для научных сотрудников и аспирантов НИИ и ВУЗов сельскохозяйственного профиля.

Замечания и предложения по дальнейшему усовершенствованию методов просим присылать по адресу: Россия, 249010 г.Боровск, Калужской обл., ВНИИФБиП с.-х. животных.

Рецензенты: д.б.н., проф. В.П.Радченков
д.б.н. Г.Г.Черепанов
д.б.н. Л.В.Харитонов

Введение

Справочное пособие. Издатель – ВНИИ физиологии, биохимии и питания сельскохозяйственных животных

В справочнике описаны современные методы биохимического анализа, большинство из которых отработаны, модифицированы и широко апробированы научными сотрудниками ВНИИ физиологии, биохимии и питания сельскохозяйственных животных в процессе изучения и решения той или иной научной проблемы.

В основном все методы опубликованы в различных методических указаниях, издаваемых ВНИИФБиП, но небольшим тиражом, который быстро разошелся среди специалистов многих институтов. К нам неоднократно обращаются сотрудники научно-исследовательских учреждений и ВУЗов с просьбой об оказании методической помощи и поэтому мы сочли целесообразным издать данный сборник.

Представленные в справочнике методы предусматривают целостное изучение различных видов обмена (азотистого, энергетического, липидного, углеводного), а также методы анализа активности пищеварительных ферментов, витаминов, минеральных веществ и гормонов.

В разделе, посвященном методам анализа пищеварительных ферментов представлены как оригинальные методы, разработанные сотрудниками института, так и методики анализа, заимствованные из других источников, но проверенные и апробированные в институте. Представленная подборка методов позволяет полно и объективно отразить активность всех главных пищеварительных ферментов. Методы современные, точны, чувствительны, специфичны и воспроизводимы. Использование их в работе позволит унифицировать анализ и получать сопоставимые результаты. Особый интерес представляет группа методов, позволяющая количественно охарактеризовать непосредственно процесс биосинтеза ферментов в ткани поджелудочной железы, и в комплексе получить информацию о каталитической активности изучаемых ферментов и функциональной активности ткани поджелудочной железы, ответственной за эндокринную регуляцию.

Раздел по углеводам включает методы определения углеводного состава корма, определение метаболитов и определение активности ферментов углеводного обмена. Для определения состава углеводов корма выбраны и отработаны современные методы, позволяющие в одной навеске корма последовательно установить содержание различных классов углеводов, характеризующих его качество и энергетическую ценность. Показатели содержания резервных углеводов (сахара, крахмала, пектинов) и структурных полисахаридов (целлюлозы, гемицеллюлозы, лигнина) необходимы для оценки качества, переваримости и прогноза потребления корма. Методы, предложенные для определения метаболитов углеводного обмена в органах и тканях животных (глюкоза, гликоген, лактоза, молочная кислота) являются специфичными и соответствуют современному мировому аналитическому уровню. Определение вместе с метаболитами активности ферментов позволит судить об интенсивности и направленности углеводного обмена.

Для изучения жирнокислотного состава липидов описан точный и надежный метод газожидкостной хроматографии, а для изучения классовых соединений липидов – метод тонкослойной хроматографии.

Представленный набор методов для определения метаболитов и активности ферментов энергетического обмена позволяет изучать как механизмы образования и использования энергии (свободное и сопряженное с образованием АТФ окисление), так и показателей, связанных с определением потребности животных в энергии.

Представленный в сборнике набор методов анализа минеральных элементов позволяет изучать различные аспекты минерального обмена у животных на молекулярном, клеточном и органном уровнях. Большое внимание уделено методам изучения биохимии костной ткани, ее физических и механических характеристик. Отобранные методы дают возможность изучать формирование как органической, так и минеральной матрицы костной ткани.

Предлагаемый перечень анализа гормонов предполагает целостное изучение функционального состояния эндокринной системы у сельскохозяйственных животных. Одним из основных способов оценки функции эндокринных желез у животных и человека продолжает оставаться радиоиммунологический метод. Широкой популярности метод обязан своей высокой чувствительности, воспроизводимости и наличием коммерческих наборов. При определении содержания видонеспецифичных гормонов (стероидных, тиреоидных, инсулина и т.д.) в крови сельскохозяйственных животных возможно использовать эти наборы. Однако, в ряде случаев необходимы изменения в подготовке образцов и технике проведения анализа. Для анализа видоспецифичных гормонов у животных (соматотропин, пролактин и др.) коммерческие наборы использовать невозможно, поэтому создавали собственные системы для радиоиммунологического анализа гормонов у животных. Описаны современные методы анализа жирорастворимых витаминов.

Пособие предназначается для специалистов по биохимии, физиологам и клиницистам сельскохозяйственного профиля.

Перечень сокращений

ТХУ	–трихлоруксусная кислота	СИ	–связанный инсулин
БАНА	–пара-нитроанилин-бензоил-аргинин	СИГ	–соматотропный гормон
ЭДТА	–этилен-диамин-тетраацетат	T ₄	–тироксин
ВЭЖХ	–высокоэффективная жидкостная хроматография	T ₃	–трийодтиронин
БОТ	–бутилокситолуол	ФСГ	–фолликулостимулирующий гормон
СБЙ	–белоксвязанный йод	ЧСА	–человеческий сывороточный альбумин
АПДК	–аммонийпирролидин-ди-тиокарбонат	НДК	–нейтрально-детергентная клетчатка
НКБ	–неколлагеновые белки	КДК	–кислотодетергентная клетчатка
ГАГ	–гликозоамингликаны	ЛДГ	–лактатдегидрогеназа
ДФДХ	–диметил-п-фенилен-диаминдигидрохлорид	ПК	–пируваткарбоксилаза
ТТХ	–трифенилтетразолий хлорид	ПААГ	–полиакриламидный гель
НАД*	–никотинамидаденидинуклеотид окисленный	ЛПНП	–липопротеины низкой плотности
НАДН	–никотинамидаденидинуклеотид восстановленный	ЛПОНП	–липопротеины очень низкой плотности
НАДФН	–никотинамидаденидинуклеотидфосфат восстановленный	ХМ	–хиломикроны
АМФ	–аденозинмонофосфат	ЛПВП	–липопротеины высокой плотности
АТФ	–аденозинтрифосфат	АДП	–ацетат дегидропрегненолона
АДФ	–аденозиндифосфат	ЛПЛ	–липопротеидлипаза
А	–адреналин	цГМФ	–циклический гуанозинмонофосфат
НА	–норадреналин	ПЦР	–полимеразная цепная реакция
АКТГ	–адренкортикотропный гормон	КФ	–кислоторастворимые фосфаты
БСА	–бычий сывороточный альбумин	ФЛ	–фосфолипиды
ДОФА	–диоксифенилаланин	КЩС	–кислотно-щелочное состояние
ИРИ	–иммунореактивный инсулин	РНК	–рибонуклеиновая кислота
ЛГ	–лютеинизирующий гормон	ДНК	–дезоксирибонуклеиновая кислота
МАО	–моноаминоксидаза	ТСХ	–тонкослойная хроматография
II–ОКС	–II-оксикортикостероиды	ОП	–оптическая плотность
ПРЛ	–пролактин (ЛТГ– лютеотропный гормон)	ПГ	–прогестерон
РИА	–радиоиммунологический анализ		

I. Методы анализа активности пищеварительных ферментов

1. Определение активности пепсина

Пепсины представляют собой группу "кислых" протеиназ, во многом структурно аналогичных, но различающихся по субстратной специфичности и рН-оптимуму их действия (от 1,5 до 4,0). В соответствии с этими их свойствами в соке желудка свиней дифференцируют пепсин А (КФ 3.4.23.1), пепсин В (КФ 3.4.23.2), пепсин С (КФ 3.4.23.3), пепсин Д (кодировый номер не присвоен), а также химозин (КФ 3.4.23.4). Все они образуются из пропепсина (пепсиногена) посредством аутокаталитического отщепления от него при рН 5,0 полипептидного фрагмента, считающегося специфическим ингибитором пепсинов.

Описано около десятка принципиально различающихся по подходам методов анализа активности пепсина. Одни характеризуют ее чисто условными критериями и количественными единицами (вискозиметрия, молокоствораживающее действие и т.д.), другие – объективными количественными показателями степени протеолиза белков-субстратов под действием пепсинов, например, количественное титрование аминокрупп, освобождающихся при гидролизе пептидных связей.

1.1. Определение активности пепсина с использованием гемоглобина в качестве субстрата

Колориметрический метод Ансона

Принцип метода (1). При инкубации раствора фермента с гемоглобином последний расщепляется на фрагменты, растворимые в трихлоруксусной кислоте (ТХУ) определенной концентрации. В ТХУ-растворимых пептидных фрагментах гемоглобина колориметрически определяют содержание ароматических аминокислот (тирозина и триптофана) с помощью фенольного реактива Фолина-Чиокалтеу.

Реактивы. 1. 10н соляная кислота (концентрированная); 2. 0,2н раствор соляной кислоты; 3. 0,06н раствор соляной кислоты; 4. 0,01н соляная кислота; 5. 0,5н щелочь натриевая; 6. 5 % ТХУ; 7. Вольфрамвокислый натрий. 8. Молибденовокислый натрий; 9. Сернокислый литий; 10. 85 % ортофосфорная кислота; 11. Бычий гемоглобин; 12. Тирозин; 13. Раствор субстрата: растворить 2 г гемоглобина в 98 мл 0,06н соляной кислоты (рН полученного субстратного раствора должен быть в пределах 1,8). При необходимости раствор может быть отцентрифугирован. Хранят в холодильнике при 4°C; 14. Фенольный реагент Фолина-Чиокалтеу: растворить 10 г вольфрамата натрия ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 2,5 г молибдата натрия ($\text{Na}_2\text{Mo}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 15 г сернокислого лития (Li_2SO_4), 10 мл концентрированной соляной кислоты (10н), 5 мл концентрированной ортофосфорной кислоты (85 %) и довести дистиллированной водой до 100 мл. Перед использованием 1 часть раствора разводят в 2 частях дистиллированной воды и хранят при комнатной температуре в темной склянке неограниченное время; 15. Стандартный раствор тирозина (1 мМ): растворить 181,19 мг L-тирозина (пригодна и DL-форма) в 0,2н HCl и довести до 1000 мл. Хранят в холодильнике при 4°C; 16. Трихлоруксусная кислота (5 %-ный раствор (вес/объем): растворить 5 г трихлоруксусной кислоты и довести до 100 мл.

Для предотвращения бактериального заражения растворы 13 и 15 могут быть защищены антисептиками: раствор субстрата добавлением 2,5 мг мертиолат на 100 мл гемоглобина и раствор тирозина – формальдегидом в 0,5 % конечной концентрации.

Оптимум рН для проявления протеолитической активности фермента находится в пределах 1,5–2,0.

Оборудование. Колориметр, центрифуга, водяная баня.

Ход определения. Образцы слизистой желудка могут храниться в замороженном состоянии (-7°C) в течение месяцев без снижения ферментативной активности. Образцы желудочного сока и содержимого желудка на длительное время замораживать нельзя. При таком способе консервирования из образцов улетучивается соляная кислота, pH значительно повышается и пепсин необратимо денатурирует. Коммерческие растворы пепсина, гомогенаты слизистой желудка в 10 мМ HCl, желудочный сок и кислое содержимое желудка хорошо сохраняют ферментативную активность в течение 1 недели при $+4^{\circ}\text{C}$ (обычные условия бытового холодильника). В одних и тех же образцах можно раздельно определить количество неактивного предшественника пепсина – пепсиногена и количество активного фермента. В нейтральной и слабощелочной среде пепсин необратимо инактивируется. Пепсиноген в этих условиях не денатурирует. Следовательно, доведя pH с помощью натриевой щелочи до 8, а затем подкислив соляной кислотой до pH 2,0 и определив протеолитическую ферментативную активность, получим сведения о наличии пепсиногена в смеси.

Для определения активности пепсина в 20 мл центрифужные пробирки наливают по 5 мл раствора субстрата. Пробирки помещают в водяную баню 30°C . Добавляют по 1 мл разведенного раствора фермента. Содержимое пробирок перемешивают и фиксируют время. Продолжительность инкубации фермента с субстратом составляет точно 10 минут. Ферментативную реакцию останавливают добавлением 10 мл 5 % ТХУ. Раствор фильтруют или центрифугируют в течение 20 минут при 4000 g. Отбирают 5 мл фильтрата или надосадочной жидкости, куда добавляют 10 мл 0,5н NaOH. После перемешивания к этой нейтрализованной смеси приливают 3 мл разведенного реактива Фолина. Вновь перемешивают и через 10 минут образцы готовы для колориметрирования. Нельзя откладывать колориметрирование, так как интенсивность окраски через 1–2 часа усиливается. Контрольный образец готовят с теми же реактивами в описанной пропорции. Только для предотвращения ферментативной реакции к раствору субстрата сразу добавляют ТХУ, а затем уже источник фермента.

Расчет. Одна пепсиновая единица по Ансону представляет собой количество фермента, способное в описанных условиях гидролизовать гемоглобин с такой скоростью в минуту, которая эквивалентна по оптической плотности ТХУ-растворимым продуктам (в фильтрате или центрифугате), окрашенным реактивом Фолина, окраске, даваемой одним молем тирозина.

Поскольку строгая линейная зависимость между активностью пепсина и интенсивностью окраски отсутствует, рекомендуется вместо экстраполяции к нулевой скорости реакции в практических целях всегда пользоваться калибровочной кривой, которую желательнее строить в несколько более широком диапазоне концентраций тирозина.

Для построения калибровочного графика из исходного маточного раствора тирозина готовят серию разведений. Для этой цели отбирают по 0,2–1 мл стандартного раствора. В соответствии со взятым объемом в реакционную смесь вносят от 0,2 до 1 мкмоль тирозина. Во всех пробирках объем доводят до 5 мл 0,2н соляной кислотой, для чего ее вносят соответственно от 4,8 до 4,0 мл. Везде добавляют по 10 мл 0,5н NaOH и перемешивают. Это необходимо в целях доведения pH среды до оптимальной для развития окраски тирозина с фенольным реагентом. После этого добавляют по 3,0 мл разведенного реактива Фолина. Вновь тщательно перемешивают и не ранее чем через 10 минут образцы готовы для колориметрирования. Колориметрировать рекомендуется в кювете 1 см при одной из трех длин волн – 580, 690 или 750 нм. Полученные величины оптической плотности наносят на график против количества мкМ тирозина.

Спектрофотометрический метод

Принцип метода (2). О величине ферментативной активности пепсина можно судить по приросту в кислоторастворимых продуктах гидролиза тех же самых аминокислот с ароматическими кольцами в боковой цепи. Анализ количества ароматических колец ведется при этом не по степени окрашивания их реактивом Фолина, а непосредственно определением по величине поглощения света в ультрафиолетовой области при длине волны 280 нм. Точность и специфичность колориметрического и спектрофотометрического методов приблизительно одинакова, но по количеству реактивов, процедур и затраченного времени на анализ спектрофотометрия значительно выигрывает.

Реактивы. Те же, что и для метода Ансона, за исключением компонентов для реактива Фолина. Все растворы готовят в той же концентрации, как описано выше.

Оборудование. Спектрофотометр, центрифуга, водяная баня.

Ход определения. Рекомендуется следующая модифицированная техника анализа. К 1 мл субстрата добавляют 1 мл соответствующим образом разведенного раствора фермента. Степень разведения источника фермента и время инкубации всегда подбирают эмпирически в зависимости от ферментативной активности в каждом исследуемом образце. Ориентировочное время инкубации фермента с субстратом при выявленном разведении колеблется в пределах от 15 до 60 минут только в том случае, если получаемые величины оптической плотности укладываются в рамки линейного участка на построенном калибровочном графике. Ферментативную реакцию через строго фиксированный отрезок времени останавливают добавлением 3 мл 5 % ТХУ. Реакцию проводят в центрифужных пробирках. Объем инкубируемой смеси – 2 мл. После добавления кислоты смесь центрифугируют в течение 15 минут при 3000 об/мин для отделения осадка. В спектрофотометрические кюветы надосадочную жидкость наливают непосредственно из центрифужных пробирок. Контроль готовят обычным способом.

Расчет. Калибровочный график желателен строить с более широким диапазоном – от 0,1 до 5 мкМ тирозина в реакционной смеси. Для этой цели готовят его 5 М раствор (905,95 мг/л) и из него делают серию нисходящих разведений. Активность пепсина выражают в международных единицах (Е), то есть в мкмольях тирозина, образовавшегося после реакции и перешедшего в кислоторастворимую надосадочную фракцию за 1 минуту инкубации.

1.2. Определение активности пепсина по синтетическому субстрату N-ацетил- I-фенилаланин-I-3,5-дийодтироzinу

Принцип метода (3). Под действием пепсина N-ацетил-I-фенилаланин-I-3,5-дийодтирозин распадается на ацетилфенилаланин и дийодтирозин. Количество образовавшегося дийодтирозина служит мерой активности фермента. Определяют дийодтирозин колориметрически по цветной реакции с нингидрином. Среди множества специфических низкомолекулярных субстратов для пепсина этот субстрат рассматривается как один из наиболее предпочтительных. Оптимальное значение pH среды для гидролиза данного субстрата находится в пределах 2,0. При этом pH константа Михаэлиса равна 0,075 мМ. Максимальная растворимость субстрата при pH 2,0 соответствует 0,16 ммоль/л. Такая концентрация субстрата и рекомендуется для проведения анализа.

Реактивы. 1. N-ацетил-I-фенилаланин-I-3,5-дийодтирозин; 2. 0,1н натриевая щелочь; 3. 0,1н, 0,01н соляная кислота; 4. Нингидрин; 5. Гидриндантин; 6. Монометилловый эфир этиленгликоля (метилцелозольв); 7. Ацетат натрия; 8. 96 % уксусная кислота; 9. 50 % этиловый спирт; 10. I-3,5-дийодтирозин; 11. Раствор субстрата (0,16 мМ): растворить 9,94 мг

N-ацетил-L-фенилаланин-L-3,5-дйодтирозина в 1 мл 0,1н NaOH, добавить 80 мл дистиллированной воды, довести рН до 2,0 с помощью 0,1н HCl и довести объем до 100 мл добавлением 0,01н HCl; 12. Ацетатный буфер (4н, рН 5,5): растворить 272 г ацетата натрия при подогревании и помешивании приблизительно в 200 мл бидистиллированной воды. Охлаждать, добавить 50 мл уксусной кислоты и довести до 500 мл водой, рН полученного раствора должен быть 5,5. Хранить при 4°C; 13. Нингидриновый реактив: растворить 20 г нингидрина и 3 г гидриндантина в 750 мл метилцеллозольва, добавить 250 мл ацетатного буфера. Устойчив в течение месяца при комнатной температуре в темной склянке в атмосфере азота; 14. Стандартный раствор L-3,5-дйодтирозина (61мМ): растворить 43,39 мг L-3,5-дйодтирозина в бидистилляте и довести объем до 1 л.

Оборудование. Колориметр, водяная баня, пробирки со шлифами.

Ход определения. В 12 мл пробирки с пришлифованными стеклянными пробками, помещенные в водяную баню с температурой 30°C, наливают по 1 мл раствора субстрата. Вносят 0,1 мл разведенного раствора фермента и фиксируют время. Продолжительность инкубации фермента с субстратом обычно находится в пределах 10–60 минут. Инкубацию останавливают добавлением 0,5 мл нингидринового реагента. Содержимое пробирок перемешивают, закрывают пробкой и ставят в кипящую водяную баню на 15 минут. Затем пробирки охлаждают и добавляют по 1 мл этанола. Оптическую плотность окрашенного раствора определяют при 570–578 нм. Развившаяся окраска после кипячения устойчива в течение 1 часа. В контрольную пробу раствор фермента доливают после нингидринового реагента, непосредственно перед кипячением.

Расчет. Активность пепсина выражают в международных единицах (Е), то есть в микромолях образовавшегося дйодтирозина за 1 минуту при стандартных условиях инкубации. Калибровочный график строят по стандартному раствору дйодтирозина. Для этой цели достаточно взять от 0,1 до 1 мл исходного 0,1 мМ раствора и провести цветную реакцию с нингидриновым реагентом, как это описано. При необходимости увеличения диапазона серия разведений может быть расширена. Кривую получают нанесением на график количества микромолей продукта реакции, катализируемой пепсином (дйодтирозина), против соответствующих им величин оптической плотности (экстинкции).

1.3. Определение молокоствораживающей активности пепсина

Принцип метода (4). Метод основан на способности пепсина или химозина коагулировать казеин молока.

Реактивы. 1. Ацетатный буфер: смешивают 115 мл 80 %-ной или 92 мл ледяной уксусной кислоты с 42 г едкого натра, растворенными в 0,5 л воды, объем доводят водой до 1 л (рН буфера 5,0); 2. Молочно-ацетатная смесь: смешивают равные объемы свежего, желательно обезжиренного коровьего молока и ацетатного буфера. Значение рН смеси должно быть равно 5,0. Смесь может храниться в холодильнике (4°C) в закупоренной посуде в течение 2–3 недель.

Оборудование. Пробирки, секундомер.

Ход определения. В пробирку вносят 5 мл молочно-ацетатной смеси и добавляют 0,1 мл испытуемого раствора фермента. Затем содержимое пробирок перемешивают и постоянно энергично встряхивают, наблюдая за стекающим по стенкам молоком. Время от момента добавления источника фермента до появления на стенках пробирок мелких хлопьев казеина точно фиксируют по секундомеру. Температура смеси 30°C.

Расчет. За единицу молокоствораживающей активности (химазной) принимают нестандартную условную единицу Пятницкого. Она выражает количество фермента, свертывающее 5 мл молочно-ацетатной смеси

за 60 секунд. Для определения содержания пепсина в 1 мл сока делят 60 на измеренное время створаживания в секундах. Полученное частное умножают на 10 (в данном примере фактор разведения изучаемого раствора фермента) и получают искомые условные единицы.

2. Определение активности трипсина

2.1. Определение активности трипсина с использованием казеина в качестве природного субстрата

Принцип метода (5). Многими исследователями общая протеолитическая активность пищеварительных соков, содержимого кишечника, гомогенатов железистых тканей трактуется еще как триптическая активность. На самом деле общая протеолитическая активность является суммарным эффектом протеолиза того набора ферментов, который содержится в изучаемых объектах.

Предлагаемый метод определения протеолитической активности трипсина основывается на уникальной термостабильности этого белка. По современным сведениям ни один из известных протеолитических ферментов подобной устойчивостью к тепловой денатурации не обладает. Подобранный режим тепловой обработки, при которой необратимо денатурируют все протеиназы, кроме трипсина, и создав среду, в которой трипсин восстанавливает свою каталитическую способность, возможно измерять активность ренатурировавшего образца фермента по любому субстрату. Не вдаваясь в механизм денатурации и ренатурации молекулы трипсина, следует подчеркнуть, что температурная обработка нативного поджелудочного сока при 95°C и pH от 8,2 до 3,5 ведет к необратимой денатурации всех протеолитических ферментов, включая трипсин. Сок, pH которого перед тепловой обработкой доведен до 3 и ниже, сохраняет после нее протеолитическую активность, практически не изменяющуюся при дальнейшем повышении концентрации водородных ионов. Сок, предварительно выдержанный перед анализом при 95°C в течение 2 минут, сохраняет около 35 % протеиназной активности от исходного уровня, причем установившаяся активность не меняется при продлении времени термообработки до 20 минут.

Предположив, что сохранившаяся после обработки при 95°C протеиназная активность есть не что иное, как активность триптическая, обосновывается результатами ингибирования ее соевым ингибитором трипсина. Сохранившаяся протеиназная активность сока поджелудочной железы после температурной обработки (соответствующая 140 мкг кристаллического трипсина) полностью подавляется 80 мкг специфического соевого ингибитора трипсина.

Реактивы. 1. Фосфатный буфер 0,2 М, pH 7,6: растворить 3,140 г однозамещенного фосфата калия и 31,5 г двузамещенного фосфата натрия в 900 мл воды, довести до 1 л. Возможно применение и трибуфера; 2. Раствор субстрата: 1 г казеина по Хаммерстону суспендируют в 100 мл фосфатного буфера и при постоянном помешивании нагревают на кипящей водяной бане до растворения казеина, после чего доводят водой до 100 мл; 3. 5 %-ная трихлоруксусная кислота; 4. 0,1н соляная кислота; 5. 0,1н щелочь натриевая.

Оборудование. Спектрофотометр или колориметр, водяная баня.

Ход определения. Образец панкреатического сока, предназначенный для определения в нем активности трипсина, немедленно после взятия доводят 0,1н соляной кислотой под контролем pH-метра до pH 2,0±0,2. Погружают в водяную баню с температурой 95°C на 5 минут, после чего охлаждают под струей водопроводной воды и оттитровывают 0,1н натриевой щелочью до значения pH нативного сока. Выполнять эту процедуру надо строго, не ограничиваясь прибавлением части эквивалентного раствора щелочи, аликвотной ранее добавленной кислоты.

Обработанный таким образом поджелудочный сок, в котором из всех протеиназ сохранился только трипсин, пригоден для определения его активности.

При проведении серийных анализов активности трипсина достаточно один раз оттитровать сок, а затем можно работать с этими растворами кислоты и щелочи с различными образцами сока.

После нагревания исследуемый образец сока разводят в 20–120 раз, в зависимости от концентрации (активности) трипсина. Для инкубации берут 1 мл полученного образца, к которому добавляют 1 мл 1 %-ного раствора казеина в буфере. Смесь фермента с субстратом инкубируют 20 минут при 30°C, затем добавляют 3 мл 5 %-ного раствора ТХУ для остановки реакции и осаждения нерасщепленного субстрата и фермента.

Расчет. Активность трипсина определяют по накоплению в безбелковом фильтрате ароматических аминокислот, входящих в комплексы, растворимые 3 %-ной ТХУ. Оптическую плотность определяют на спектрофотометре при 280 нм, после чего по калибровочному графику рассчитывают активность фермента по данным активности кристаллического трипсина.

Калибровочный график для исчисления активности трипсина строят по показаниям оптических плотностей ТХУ-фильтратов инкубируемых смесей, полученных после инкубации ряда образцов с постоянным количеством субстрата, но с возрастающими количествами кристаллического препарата трипсина. Оптимальными являются увеличивающиеся количества трипсина от 1 до 15 мкг фермента в инкубируемой смеси (объем 2 мл), так как в этом диапазоне наблюдается прямая зависимость между концентрацией (активностью) фермента и оптической плотностью продуктов трипсинолиза.

При отсутствии спектрофотометра с диапазоном работы в ультрафиолетовой области спектра продукты трипсинового гидролиза можно улавливать другими методами. Наиболее целесообразно применение колориметрических методов, основанных на восстановлении продуктами протеолиза фосфомолибденового, фосфовольфрамового реактива Фолина-Чиокалтеу. Основными продуктами ферментативной реакции, по которым оценивается триптическая активность колориметрическим или спектрофотометрическим способами, являются пептидные продукты гидролиза, содержащие тирозин, поэтому калибровочный график следует строить по этой аминокислоте. Рекомендуемая серия разведений тирозина – от 0,1 до 2 микромолей. Активность трипсина выражают в этом случае в микромолях прироста тирозина за одну минуту инкубации фермента с субстратом.

2.2. Определение активности трипсина с использованием в качестве синтетического субстрата пара-нитроанилин-бензоил-аргинина

Принцип метода (6). В результате действия трипсина на пара-нитроанилин-бензоил-dl-аргинин (БАНА) от субстрата отщепляется пара-нитроанилин, количество которого можно определить колориметрически по интенсивности желтого окрашивания при 410 нм. Чувствительность метода может быть повышена, если освободившийся пара-нитроанилин перевести в одно из окрашенных азосоединений, используя его способность быстро вступать в реакции диазотирования.

Реактивы. 1. Вероналовый буфер 0,1 М, pH 8,2, содержащий 0,02 моля CaCl₂. Пригоден для анализа и трис-буфер с этим же значением pH и ионной силы; 2. Раствор субстрата: 43,5 мг БАНА растворяют в 1 мл диметилсульфоксида или диметилформамида при нагревании до 45–50°C. Затем доводят объем до 100 мл буфером, подогретым до 30°C и помещают в водяную баню при температуре 30°C. Раствор субстрата

готовят непосредственно перед анализом; 3. 2н соляная кислота; 4. 0,25 %-ный раствор азотистокислого натрия; 5. 4 %-ный раствор сульфаминовой кислоты; 6. 0,01 %-ный раствор АШ-кислоты: 10 мг мононатриевой соли АШ-кислоты растворяют в 100 мл 2н раствора Na_2CO_3 , раствор готовят непосредственно перед использованием, хранить его можно не более 3–5 минут, в дальнейшем АШ-кислота окисляется и раствор приобретает заметную окраску.

Оборудование. Колориметр, водяная баня, пробирки.

Ход определения. В опытные пробирки, находящиеся в водяной бане при 30°C, наливают по 1 мл разведенного (как указано выше) источника фермента. Добавляют по 4 мл субстрата и инкубируют 10–60 минут. Реакцию останавливают добавлением 1 мл 2н HCl . В контрольные пробирки к ферменту доливают соляную кислоту, а затем субстрат. После этого во все пробирки добавляют по 1 капле раствора азотистокислого натрия, тщательно перемешивают и через 5 минут добавляют по 1 капле раствора сульфаминовой кислоты. Вновь перемешивают и через 2–3 минуты доливают по 2 мл свежеприготовленного раствора АШ-кислоты. После перемешивания образцы готовы для колориметрирования при 540 нм. Окраска устойчива в течение одного часа.

Расчет. Активность фермента выражают в стандартных международных единицах. Количество отщепившегося пара-нитроанилина, служащего мерой активности трипсина, определяют по калибровочному графику. Линейная зависимость окраски отмечается при внесении в реакционную смесь от 2 до 80 нмоль пара-нитроанилина.

3. Определение активности химотрипсина

Химотрипсин (КФ 3.4.21.1), точнее семейство химотрипсинов, является основной протеиназой, синтезируемой экзокринными клетками поджелудочной железы. В соке железы всех млекопитающих его значительно больше, чем трипсина, а вместе с трипсином на их долю приходится более половины всех экспортируемых белков. Молекулярная масса фермента около 23000. Активация неактивного профермента происходит в кишечнике, где в молекуле химотрипсиногена трипсин разрывает пептидную связь между 14 и 15 аминокислотами. Оптимальные значения pH для работы фермента находятся в области от 7 до 9. Добавление в реакционную смесь ионов кальция (20 мМ) стабилизирует и несколько повышает активность фермента. Химотрипсин предпочтительно гидролизует пептидные связи, образованные карбоксильной группой аминокислот, содержащих ароматическое кольцо (фенилаланин, тирозин, триптофан). Помимо пептидных связей он способен катализировать гидролиз амидов и эфиров названных аминокислот.

3.1. Определение активности химотрипсина с использованием казеина в качестве природного субстрата

Принцип метода (7). При определении протеолитической активности химотрипсина по белковым субстратам в качестве основного препятствующего фактора в поджелудочном соке выступает трипсин. От него можно избавиться путем ингибирования его каталитического центра специфическим ингибитором, оставляя при этом молекулы химотрипсина полностью активными. Для этой цели предлагается использовать ингибитор трипсина соевых бобов. Он достаточно специфичен, устойчив, полностью и быстро реагирует с трипсином и менее дефицитен, чем остальные трипсиновые ингибиторы. Протеолитическая активность сока после его прединкубации с соевым ингибитором представлена химотрипсином, карбоксипептидазой А, карбоксипептидазой В и панкреатопептидазой Е. Поэтому необходимо, наряду с трипсином, выключить из смеси протеаз и карбоксипептидазы. Известно, что карбоксипептидазы являются металлоэнзимами, содержащими на каждую граммо-

лекулу один грамм-атом цинка. Причем, с потерей металла ферменты полностью теряют свою активность. От металла можно избавиться введением металлосвязывающего агента непосредственно в инкубационную смесь. Наиболее приемлем для этих целей хелатон. Если принять общую протеазную активность сока за 100 %, то активность образца с соевым ингибитором, то есть с выключением трипсина, составляет около 26 %; сока с соевым ингибитором и ЭДТА – приблизительно 20 % первоначальной активности, что и относится к истинно химотриптической активности. Эти цифры являются средними, выведенными на основании результатов анализа более 150 образцов поджелудочного сока, взятых при различном функциональном состоянии железы (на различных рационах).

Из известных в настоящее время протеаз панкреаса не была учтена при разработке настоящей методики только панкреатопептидаза Е, так как удельный вес этого фермента в общем количестве секреторируемых поджелудочной железой протеаз незначителен и считается, что его влиянием на протеолиз можно пренебречь.

Реактивы. 1. Фосфатный буфер 0,2 М, рН 7,6; 2. 1 %-ный раствор казеина по Хаммерстену в фосфатном буфере; 3. 5 %-ная ТХУ; 4. 0,1 %-ный раствор соевого ингибитора трипсина; 5. 0,1 М раствор ЭДТА.

Оборудование. Спектрофотометр или колориметр, водяная баня.

Ход определения. К 1 мл поджелудочного сока, разведенного в 40–100 раз (в зависимости от концентрации в нем химотрипсина или другого источника протеаз) добавляют по 0,1 мл 0,1 %-ного раствора соевого ингибитора трипсина и 0,1 М раствора ЭДТА. Содержимое осторожно и вместе с тем тщательно, избегая вспенивания, перемешивают. Через 2–3 минуты сюда же приливают 1 мл 1 %-ного раствора казеина в 0,2 М фосфатном буфере. Одинаково успешно могут быть применены буферы фосфатно-цитратный, боратный и трис с указанными значениями ионной силы и рН. Пробирки погружают в водяной термостат и инкубируют при 30°С. Через 20 минут реакцию останавливают, прибавляя 3 мл 5 %-ной ТХУ. Остаточный субстрат и фермент отделяют фильтрованием. После этого определяют оптическую плотность растворенных в ТХУ продуктов гидролиза при 280 нм в односантиметровой кварцевой кювете.

Расчет. Калибровочный график строят по кристаллическому α -химотрипсину. Приемлемые количества химотрипсина находятся в пределах от 1 до 10 мкг в инкубируемой смеси. Калибровочный график можно также строить по тирозину. Чувствительность спектрофотометрического метода позволяет улавливать 0,1 микромоляр тирозина в реакционной смеси. В этом случае активность химотрипсина выражают в мкмоль тирозина, перешедшего в ТХУ-растворимую фракцию за 1 минуту инкубации фермента с субстратом.

Продукты химотрипсинового гидролиза можно улавливать и колориметрически с применением реактива Фолина-Чиокалтеу.

3.2. Определение активности химотрипсина с использованием этилового эфира l-тирозина в качестве субстрата

Принцип метода (8). Этиловый эфир l-тирозина – специфический эстеразный субстрат для химотрипсина, который не гидролизует трипсином. Если карбоксильные группы тирозина не диссоциированы, то оптическая плотность его при 230–240 нм будет значительно выше, чем если они находятся в ионизированном состоянии. Этиловый эфир тирозина поглощает свет подобно недиссоциированному тирозину, следовательно, гидролиз эфира сопровождается изменением (снижением) величины абсорбции.

Реактивы. 1. Трис-оксиметил-аминометан 0,05 М, рН 7,0; 2. l-тирозин 0,001 М; 3. Этиловый эфир l-тирозина 0,02 М в трис-буфере с 0,02 М CaCl₂.

Оборудование. Спектрофотометр, водяная баня.

Ход определения. Для приготовления контрольной пробы непосредственно в спектрофотометрическую кювету (желательно термостабируемую при температуре 30°C) наливают 3 мл раствора тирозина и 0,1 мл раствора фермента. После перемешивания и измерения оптической плотности при длине волны 234 нм показание прибора настраивают на нулевую отметку. В опытную пробу наливают 3 мл раствора субстрата и 0,1 мл разведенного раствора фермента (ориентировочное количество вносимого фермента в расчете на кристаллический химотрипсин должно быть в пределах 20–60 мкг). Содержимое кюветы перемешивают и, если спектрофотометр не снабжен самописцем, то через каждые 15–20 секунд в течение 2–3 минут измеряют оптическую плотность против контроля. При внесении в реакционную смесь оптимального количества фермента отмечается линейное изменение оптической плотности (ΔE) в течение 1–2 минут.

Расчет. Активность химотрипсина может быть выражена условными единицами, то есть изменением оптической плотности за единицу времени в расчете на единицу веса или объема испытуемого образца фермента ($\Delta E/\text{сек}/\text{мл}$). Если имеется чистый препарат фермента, то, внося его в количестве от 10 до 100 мкг, определяют ΔE для измеренного количества и активность испытуемой пробы выражают в весовых единицах кристаллического химотрипсина. Возможно также выражать активность и в молярных единицах расщепленного субстрата (моль/сек). Стандартная разница в оптической плотности при 234 нм (кювета 1 см) между 10^{-3} М раствора тирозина и 10^{-3} М этилового эфира тирозина составляет 0,672 оптические единицы.

4. Определение активности карбоксипептидаз

Поджелудочная железа всех животных вырабатывает два фермента, активно действующих на белки и полипептиды со стороны свободной карбоксильной группы, причем наличие свободной амино-группы не обязательно. Оба фермента представляют собой металлоэнзимы с молекулярной массой 34000, на 1 грамм-молекулу которых приходится 1 грамм-атом цинка. С потерей металла теряется ферментативная активность, которая может быть восстановлена добавлением 10 мкмоль как цинка, так и кобальта. Выяснено, что ферменты обладают комплементарной друг к другу субстратной специфичностью. Карбоксипептидаза А (КФ 3.4.12.2) отщепляет концевые аминокислоты в полипептидной цепи, заканчивающиеся карбоксильной группой ароматических аминокислот. Связи, образованные пролином и основными аминокислотами, фермент не разрушает. Карбоксипептидаза В (КФ 3.4.12.3) активно освобождает карбокситерминальные аминокислоты с положительно заряженной боковой цепью. Оба фермента гидролизуют не только природные, но и синтетические субстраты и оба вырабатываются поджелудочной железой в неактивном состоянии. Активируются карбоксипептидазы в кишечнике трипсином. Оптимальные значения pH 7–8.

4.1. Определение активности карбоксипептидазы А с карбобензооксиглицил- I-фенилаланином в качестве субстрата (колориметрический и спектрофотометрический методы)

Принцип метода (9). Под действием карбоксипептидазы А в субстрате гидролизуются вторая амидная связь, в результате чего в качестве продуктов реакции появляются карбобензоокси-глицин и свободный фенилаланин. Количество свободной аминокислоты легко определяется многочисленными способами, в основном колориметрическими. Колориметрические методы в данном случае чувствительнее спектрофотометрических, требуют менее дорогостоящего оборудования и особенно незаменимы при анализе слабой карбоксипептидазной активности в

сложных, неочищенных белковых комплексах с высокими значениями оптической плотности для контроля.

Реактивы. Во всех случаях рекомендуется применять бидистиллированную воду. 1. Трис-буфер 0,15 М, рН 7,6: растворить 0,91 г триоксиметиламинометана приблизительно в 25 мл воды, добавить около 5,5 мл 1н НСl и довести рН до 7,6; 2. Кобальт хлористый (40 ммоль в 600 мл NaCl): растворить 0,24 г $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ и 0,88 г NaCl в 25 мл воды; 3. Субстрат (30 мМ): суспендировать 0,225 г α -карбобензоксиглицил-*l*-фенилаланина в 15–20 мл воды, довести рН с помощью 1н NaOH (приблизительно 0,5 мл) до $7,5 \pm 0,5$ и довести водой до 25 мл. Используется в свежеприготовленном виде; 4. Ацетатно-цианидный реактив: растворить 0,36 г ацетата натрия, 0,01 г NaCN в 67 мл уксусной кислоты и довести водой до 1 л. Готовится за неделю до использования; 5. Нингидриновый реактив: растворить 0,75 г нингидрина в 25 мл монометилового эфира этиленгликоля; 6. Этанол, 50 %-ный раствор по объему.

Оборудование. Спектрофотометр или колориметр, пробирки с притертыми пробками, водяная баня.

Спектрофотометрический метод

Ход определения. Непосредственно в кварцевую кювету наливают 0,5 мл трис-буфера, 0,5 мл кобальта хлористого и 1 мл разведенного источника фермента. Рекомендуемая продолжительность инкубации 10–15 минут. После этого добавляют 1 мл раствора субстрата, быстро перемешивают, измеряют оптическую плотность через 1–2-минутные интервалы при 232 нм против контрольной пробы, куда входят все компоненты за исключением изучаемого образца фермента, вместо которого добавляют 1 мл воды. Необходимо также учитывать спонтанный гидролиз субстрата, измеряя его оптическую плотность против воды.

Расчет. При описанных условиях оптическая плотность возрастает. 100 %-ная величина гидролиза субстрата соответствует изменению оптической плотности на 0,85 ($\Delta E = 0,85$). В формулу расчета входит фактор F – разведение испытуемого образца: $x = 35200 F \Delta E$ (/мин)

Колориметрический метод

Ход определения. В пробирки наливают по 0,5 мл трис-буфера и кобальта хлористого. Сюда же добавляют 1 мл источника фермента. После перемешивания проводят прединкубацию в течение 10–15 минут, добавляют субстрат и фиксируют время реакции. После инкубации фермента с субстратом (например, в течение 30 минут) из инкубационной смеси отбирают по 0,1 мл в пробирки с притертыми пробками и помещенными в ледяную баню. Туда же быстро добавляют по 0,9 мл воды и по 0,5 мл ацетатно-цианидного реагента. Помещают на 2 минуты в кипящую водяную баню и добавляют по 0,5 мл нингидринового реактива. Точно через 15 минут пробирки извлекают из кипящей бани, охлаждают под струей водопроводной воды. Затем их помещают в холодную баню и доливают по 3,0 мл раствора этанола. После перемешивания образцы готовы для колориметрирования при 570 нм.

Расчет. Калибровочный график строят по фенилаланину. Растворяют 10,33 мг фенилаланина (62,5 мкмоль) в 50 мл трис-буфера. Концентрация полученного стандартного раствора равна 1,25 мМ. Берут 0,05–0,5 мл этого раствора, что соответствует 0,063–0,625 мкмольей, доводят водой до 1 мл. Добавляют 0,5 мл ацетатно-цианидного реактива и выполняют вышеописанные процедуры. За контроль принимают образцы без фенилаланина. График строят общепринятым порядком, нанося разницу в оптической плотности по оси ординат против мкмольей фенилаланина по оси абсцисс. В разницу оптической плотности за время инкубации желательнее внести корректировку на величину спонтанного гидролиза субстрата, которую определяют экспериментально против воды.

4.2. Определение активности карбоксипептидазы В с протамином в качестве природного субстрата

Принцип метода (10). Предлагаемый метод базируется на первичной субстратной специфичности фермента с использованием в качестве субстрата протамин. Так как карбоксипептидаза В катализирует гидролиз тех белков или их полипептидных фрагментов, концевая аминокислота которых содержит положительно заряженную боковую цепь, то природный белок протамин можно рассматривать как ее специфический субстрат. Тот факт, что карбоксипептидаза А не проявляет активности на связи, образованные α -аминой группой концевого аргинина, позволяет методом определения активности карбоксипептидазы В с применением протамин считать специфичным, а данный субстрат приемлемым для ее определения.

Реактивы. 1. Цитратный буфер 1 М, рН 5,5; 2. Нингидрин, 1 %-ный раствор в цитратном буфере; 3. Глицерин; 4. Серная кислота 0,66н; 5. 10 %-ный раствор натрия вольфраматовокислого; 6. Фосфатный буфер 0,1 М, рН 7,6, содержащий 0,1 М хлористого натрия на 1 л; 7. Протамин-сульфат, 1 %-ный раствор в фосфатно-солевом буфере.

Оборудование. Колориметр, водяная баня.

Ход определения. К 1 мл раствора протамин добавляют 1 мл разведенного раствора фермента (исследуемого материала). Смесь фермента и субстрата инкубируют в водяном термостате при 30°C. Через 20 минут ферментативную реакцию прерывают, добавляя 0,5 мл вольфрамата натрия и 0,5 мл серной кислоты. Об активности фермента судят по количеству аминокислот в вольфраматовокислом фильтрате. Свободные аминокислоты в фильтрате определяют по методу Я-Пин-Ли и Тунеказу Такагаши, для чего к 0,1 мл вольфраматовокислого фильтрата приливают 1,9 мл смеси, состоящей из 0,5 мл нингидрина, 1,2 мл глицерина и 0,2 мл цитратного буфера. Смесь готовят перед анализом в больших количествах. Пробирки тщательно встряхивают и помещают в кипящую водяную баню на 12 минут, после чего содержимое вновь смешивают, охлаждают и колориметрируют при длине волны 570 нм. В течение 1 часа теряется приблизительно 1 % окраски.

Расчет. Калибровочный график строят по аргинину. Активность фермента выражают в микромолях аргинина, отщепленного за 1 минуту при стандартных условиях инкубации фермента с субстратом. Чувствительность метода – 0,1 мкмоль аргинина.

4.3. Определение активности карбоксипептидазы В с синтетическим субстратом гиппурил-І-аргинином

Принцип метода (11). Метод основан на различии поглощения света в ультрафиолетовой области между гиппуриновой кислотой и гиппурил-І-аргинином.

Реактивы. 1. Трис-буфер 0,025 М, рН 7,65 с 0,1 М NaCl; 2. Гиппуриновая кислота, 0,001 М раствор в буфере; 3. Гиппурил-І-аргинин, 0,001 М раствор в этом же буфере.

Оборудование. Спектрофотометр, водяная баня.

Ход определения. В спектрофотометрическую кювету наливают 3 мл свежеприготовленного раствора субстрата при 30°C. Показания прибора приводят к нулю. К субстрату быстро добавляют с перемешиванием 100 мкл разведенного раствора фермента. Показания прибора вновь приводят к нулю и через 30-секундные интервалы записывают величины прироста светопоглощения в течение 5–10 минут при длине волны 254 нм.

Расчет. Реакция гидролиза 0,001 М раствора субстрата в солевом буфере подчиняется кинетике нулевого порядка до расходования приблизительно 40 % субстрата. Концентрация фермента подбирается таким образом, чтобы в течение 10 минут гидролизовалось не более 30 % субстрата. Скорость реакции возрастает линейно при внесении в

инкубационную среду от 5 до $30 \cdot 10^{-5}$ мг коммерческого препарата фермента. Разница в абсорбции между используемыми растворами субстрата и продукта реакции составляет 0,36 оптических единиц, то есть величина поглощения света 0,36 при длине волны 254 нм в 1-сантиметровой кювете соответствует 100 % гидролиза субстрата. Расчет активности и способы выражения активности карбоксипептидаз аналогичны таковым для химотрипсина при анализе его активности по этиловому эфиру тирозина.

5. Определение активности аминопептидаз

Аминопептидазы – большая группа слабо изученных и недостаточно идентифицированных ферментов кишечника, гидролизующих ди- и полипептиды со стороны свободной аминогруппы. Гидролиз ряда дипептидов гомогенатами слизистой кишечника активируется различными ионами металлов. Отмечены также случаи ингибирования металлами дипептидазной активности. Металлосвязывающие агенты типа β -оксихинолина, орто-фенантролина, ЭДТА, как правило, подавляют активность дипептидаз. pH-оптимум работы ферментов – 7–9.

5.1. Определение активности дипептидаз спектрофотометрическим методом

Принцип метода (12). Метод основан на разнице оптической плотности дипептидов и свободных аминокислот в ультрафиолетовой области спектра. При разрыве пептидной связи оптическая плотность продуктов гидролиза снижается. Существенные помехи определению данным методом оказывают все вещества с высокой абсорбцией в ультрафиолете, к которым относятся белки, нуклеиновые кислоты, карбоновые кислоты и ряд буферных ионов. Этим методом невозможно определить скорость гидролиза дипептидов, в которых хотя бы одна из аминокислот содержит в боковой цепи ароматическое кольцо.

Реактивы. 1. Трис-буфер 0,2 М, pH 7,5; 2. Растворы дипептидов в концентрации 100 мМ; 3. Этанол.

Оборудование. Спектрофотометр, центрифуга, водяная баня.

Ход определения. В центрифужные пробирки, помещенные в водяную баню при 30°C, наливают по 100 мкл раствора субстрата (одного из дипептидов), 100 мкл буфера и реакцию начинают добавлением также 100 мкл разведенного источника фермента. После инкубации в течение 20–60 минут ферментативную реакцию останавливают добавлением 3 мл этанола. Затем образцы следует отцентрифугировать при 3000 об/мин в течение 15 минут и они готовы для спектрофотометрирования при 220 нм. В контрольную пробу, как обычно, для предотвращения действия фермента после внесения субстрата и буфера добавляют осадитель (этанол), а уже после этого – испытуемый на дипептидазную активность источник фермента.

Расчет. Обнаружено, что скорость ферментативной реакции сохраняет линейность до 40 % гидролиза глицил-глицина и глицил-лейцина и до 70 % гидролиза аланил-глутамина и глицил-валина. В связи с этим можно использовать наиболее простой способ выражения активности в условных спектрофотометрических единицах по убыли значений оптической плотности в единицу времени. Можно также строить калибровочный график по конкретным дипептидам. Ориентировочные концентрации дипептидов для построения калибровочного графика находятся в пределах 300 мкМ дипептида. Из этого раствора, дающего величину оптической плотности, близкую к единице, готовят серию нисходящих разведений и, таким образом, судят об активности фермента по убыли субстрата. Однако более правильным будет построение калибровочного графика по появлению продуктов реакции, то есть по одной из аминокислот.

5.2. Определение активности глицил-глицин-дипептидазы методом формольного титрования

Принцип метода (13). Глицил-глицин дипептидаза (КФ 3.4.13.1) гидролитически разрушает дипептид с образованием двух молекул свободного глицина. Освободившиеся аминокислоты количественно определяются формольным титрованием по методу Серенсена.

Реактивы. 1. Трис-буфер 0,2 М, рН 8,0; 2. Глицил-глицин 125 мМ; 3. Кобальт сернокислый 10 мМ; 4. Индикаторная смесь – 5 мг фенолфталеина и 5 мг тимолового синего в 50 мл 18 %-ного раствора формалина; 5. Соляная кислота 1н; 6. Натриевая щелочь 0,1н.

Ход определения. В опытную пробу наливают 0,5 мл трис-буфера, 0,5 мл раствора кобальта и 0,5 мл разведенного испытуемого образца фермента. Прединкубацию проводят при 30°C в течение 5–10 минут, по истечении которой прибавляют 1 мл раствора субстрата. Фиксируют время пуска ферментативной реакции. Рекомендуемая продолжительность инкубации 60–120 минут, после чего из инкубируемой смеси отбирают 0,5 мл и переносят в сосуд для титрования, куда предварительно наливают 1 мл индикаторной смеси. Титрование осуществляют 0,1н NaOH до выраженной перемены цвета индикатора. В контрольную пробу вливают все компоненты, только вместо раствора фермента добавляют 0,5 мл физраствора и титрованием определяют величину спонтанного гидролиза субстрата.

Расчет. 1 мл 0,1н NaOH, пошедший на титрование, соответствует гидролизу 0,1 моля субстрата. Из значений опытной пробы вычитают контроль, приводят ко всему объему инкубационной смеси и с учетом разведения фермента и времени инкубации получают искомую величину дипептидазной активности в стандартных единицах.

5.3. Определение активности γ -глутамилтранспептидазы

Принцип метода (14). Гамма-глутамилтранспептидаза переносит γ -глутамильный остаток с γ -l-глутамил-p-нитроанилида на дипептидный акцептор. В качестве акцептора используется глицил-глицин, который одновременно же используется и как буфер. Фермент активируется хлористым натрием. В процессе реакции от субстрата отщепляется p-нитроанилин, количество которого определяют колориметрически. Фирма "Лахема" предоставляет удобные наборы для анализа активности γ -глутамил-транспептидазы, которыми мы рекомендуем пользоваться.

Реактивы. 1. Буфер 0,55 М глицил-глицин, рН 8,3; 2. Приблизительно 10 % раствор уксусной кислоты (ледяную уксусную кислоту разводят в 10 раз); 3. Раствор субстрата – 28 мг γ -l-глутамил-паранитроанилида и 82 мг NaCl растворяют в 10 мл воды в кипящей водяной бане. После полного растворения субстрата его температуру доводят до 30°C и добавляют 2,5 мл глицил-глицинового буфера. Вследствие плохой растворимости субстрата он может кристаллизоваться из раствора при комнатной температуре, повторное подогревание и растворение субстрата допускается не более чем 2 раза; 4. Стандартный раствор пара- нитроанилина – 82,9 мг на 100 мл.

Оборудование. Колориметр, водяная баня.

Ход определения. В опытные пробирки, помещенные в водяную баню при 30°C, наливают по 0,25 мл раствора субстрата. Реакцию начинают добавлением 0,1 мл разведенного раствора фермента. Время инкубации от 10 до 30 минут. Реакция легко контролируется визуально по появлению светло-желтой окраски. Ферментативную реакцию останавливают добавлением 1,5 мл раствора уксусной кислоты. После этого растворы колориметрируют при 410 нм. Окраска устойчива в течение нескольких часов. В контрольные пробы после добавления субстрата приливают уксусную кислоту, а затем уже раствор фермента.

Расчет. Калибровочный график строят по стандартному раствору р-нитроанилина, в соответствии с прилагаемыми к наборам прописями. При отсутствии набора рекомендуется строить калибровочный график приготовлением серии нисходящих разведений р-нитроанилина из расчета его внесения от 25 до 0,5 мкмоль. Активность фермента выражают в международных единицах.

6. Определение активности нуклеаз

Панкреатическая РНК-аза (КФ 3.1.4.22) расщепляет нуклеотидные связи в молекуле рибонуклеиновых кислот. Оптимум рН для проявления активности лежит между 7 и 8. Фермент термостабилен и при рН 2–3 выдерживает нагревание в течение 5 минут при 100°C. При анализе активности оптимальная ионная сила среды – 0,10, концентрация субстрата – около 0,5 мг/мл. Ионы кальция, марганца и особенно меди ингибируют фермент.

Панкреатическая ДНК-аза (КФ 3.1.4.5) катализирует гидролитическое расщепление межнуклеотидных связей в молекуле ДНК. Оптимум рН для работы фермента около 8. Ионы магния и особенно марганца активируют фермент. Динуклеотиды строения пурин-пиримидин панкреатической ДНК-азой совершенно не гидролизуются, но дезоксирибонуклеопротеиды она способна расщеплять даже в чистом виде без их предварительного протеолиза.

Принцип метода. Общий принцип, лежащий в основе большинства методов определения активности рибо- и дезоксирибонуклеаз сводится к осаждению из реакционной смеси неразрушенной ДНК или РНК. После инкубации субстрата с ферментом, остановки реакции и осаждения непрореагировавшего субстрата в надосадочной жидкости определяют количество появившихся кислоторастворимых продуктов реакции, представляющих собой олигонуклеотиды. Предложены разнообразные осадители: хлорная кислота, этанол, подкисленный соляной кислотой, уранилацетат в трихлоруксусной кислоте или хлорной кислоте, ледяная уксусная кислота с бутанолом и др. Количество растворимых нуклеотидов определяют спектрофотометрически по поглощению при 260 нм.

6.1. Определение активности РНК-азы

Реактивы. 1. Субстрат для определения активности РНК-азы: коммерческие препараты дрожжевой РНК перед употреблением в качестве субстрата необходимо подвергнуть первичной очистке. Для этих целей в дистиллированной воде растворяют РНК, добавляя несколько капель 2N NH₄OH с доведением рН до нейтральных значений. Исходная концентрация РНК – 50 мг/мл. В этот раствор необходимо добавить антисептик (например, несколько капель хлороформа). Затем раствор субстрата подвергают многократному диализу. Вначале против 0,01 М ЭДТА для избавления от ионов металлов, потом против 0,15 М раствора NaCl и после этого против дистиллированной воды. Диализ проводят при температуре 2°C. Степень очистки раствора РНК при диализе контролируют по поглощению в ультрафиолете при 260 нм. Светопоглощение 1 мг РНК соответствует приблизительно 25 единиц оптической плотности. Очищенный диализом раствор РНК можно разлить по порциям, заморозить и размораживать непосредственно перед анализом, готовя рабочий раствор, содержащий 6 мг РНК/мл; 2. Трис-HCl буфер, 0,2 М, рН 7,5; 3. ЭДТА 0,2 М с доведением рН натриевой щелочью до 7,5; 4. 0,01 М хлористый магний; 5. 0,75 %-ный раствор уранилацетата в 25 %-ной хлорной кислоте; 6. Хлороформ.

Оборудование. Спектрофотометр, центрифуга, водяная баня.

Ход определения. Реакционная смесь состоит из 0,5 мл раствора субстрата, 0,4 мл буфера, 0,1 мл раствора ЭДТА и 0,2 мл раствора хлористого магния. В нее добавляют от 0,1 до 0,8 мл раствора анализируе-

мого источника фермента, разведенного в зависимости от активности. Объем инкубируемой смеси доводят водой до 2 мл. Время инкубации раствора фермента с субстратом при 30°C фиксируют по секундомеру. Ферментативную реакцию останавливают через 30–60 минут добавлением 0,4 мл раствора уранилацетата и быстрым охлаждением. Затем пробы центрифугируют в течение 10 минут при 2500 об/мин. Из надосадочной жидкости отбирают по 0,4 мл, доводят объем до 4 мл и спектрофотометрируют при 260 нм. Измеряют также оптическую плотность контрольной пробы, в которую входят все перечисленные компоненты, но без инкубации фермента с субстратом, то есть ураниловый реагент вносят в смесь до прибавления туда раствора фермента.

Расчет. Активность рибонуклеазы рассчитывают по формуле:

$$x = \frac{\Delta E \times \text{разведение пробы при измерении} \times \text{объем пробы}}{\text{мл сока или г ткани, взятой для анализа}}$$

где x – активность фермента в оптических единицах в расчете на единицу веса или объема испытуемого образца; ΔE – разница оптической плотности между опытной и контрольной пробами.

Необходимо помнить, что данные единицы активности фермента являются условными. Панкреатическая рибонуклеаза представляет собой типичную эндонуклеазу. Она не отщепляет от нуклеиновой кислоты концевые нуклеотиды. Продукты катализа представлены олигонуклеотидами различной длины. Поэтому установить количество связей, разрушенных ферментом, и выразить активность фермента как того требуют унифицированные международные рекомендации, очень сложно.

6.2. Определение активности ДНК-азы

Принцип метода анализа активности ДНК-азы, очистка субстрата, реактивы, ход определения и способ расчета аналогичны описанным для РНК-азы. Разница заключается в том, что в качестве субстрата используют ДНК. Поскольку ДНК-аза активируется ионами металлов, из реакционной среды исключают ЭДТА.

7. Определение активности липазы

Липаза (КФ 3.1.1.3) – фермент панкреатического происхождения, гидролизует триацилглицеролы длинноцепочечных жирных кислот. В этих соединениях липаза предпочтительно действует на обе внешние эфирные связи. После их гидролиза фермент способен разрушить и среднюю связь с освобождением всех трех жирных кислот и глицерола. Из всех ферментов, вырабатываемых поджелудочной железой, липаза обладает наименьшей устойчивостью к автолизу. Хранение при комнатной температуре влечет потерю активности в течение нескольких часов, в замороженном состоянии – в течение нескольких суток. Липаза секретруется в активной форме. Оптимум каталитической активности лежит в пределах значений рН от 7 до 9.

Все многочисленные методы анализа активности липазы основаны на определении продуктов ферментализации – глицерола или чаще – свободных жирных кислот. В качестве субстратов чаще используют оливковое масло, трибутирин, твины, липофундины. Три последних субстрата не вполне специфичны, так как их может гидролизовать целый ряд эстераз. В последнее время предложены способы анализа активности липазы с применением синтетических хромогенных субстратов на базе соединений нафтола или фенола с одной из жирных кислот. Однако по ряду соображений они пока не нашли широкого применения в лабораторной практике. Чаще всего в наше время продолжают применяться титрометрические и колориметрические методы определения жирных кислот, освобождающихся в процессе ферментативной реакции.

Принцип метода. Описываемый метод анализа липолитической активности основывается на использовании в качестве субстрата жировой эмульсии липофундина С-20. В процессе ферментативного гидролиза липофундина освобождаются жирные кислоты, которые определяют колориметрически в виде их комплексов с медью и диэтилдитиокарбоматом. Данный субстрат имеет ряд преимуществ перед другими субстратами липазы, а колориметрический метод определения свободных жирных кислот чувствительнее титриметрического.

Реактивы. 1. Жировая эмульсия липофундина С-20, состоящая из фракционированного соевого масла – 200 г, соевофосфатидной фракции – 15 г, глицерола – 25 г и воды – 1000 мл; 2. Фосфатный буфер 1/15 М, рН 8; 3. Хлористый кальций, 0,1 М раствор; 4. Азотнокислая медь, 5,5 %-ный раствор; 5. Триэтаноламин, 1 М раствор; 6. 1 М уксусная кислота; 7. Диэтилдитиокарбомат натрия, 0,1 %-ный раствор в н-бутаноле; 8. Хлороформ.

Оборудование. Центрифуга, водяная баня, колориметр, термостат, механический встряхиватель.

Ход определения. Активность липазы определяют в свежевзятых образцах содержимого кишечника, поджелудочного сока или ткани поджелудочной железы. Гомогенат ткани и разведение анализируемых источников фермента готовят на фосфатном буфере. В центрифужные пробирки объемом 10 мл с притертыми пробками, помещенные в термостат при 30°C, вносят по 0,3 мл субстрата (предварительно разведенного буфером в 40 раз). Затем добавляют 0,3 мл раствора хлористого кальция. Ферментативную реакцию начинают прибавлением 1 мл разведенного источника фермента. Продолжительность инкубации в водяной бане при 30°C и непрерывном встряхивании составляет 20 минут. Реакцию останавливают добавлением в инкубационную среду 6 мл хлороформа и 2 мл медного реагента (состоит из 10 объемов раствора азотнокислой меди, 9 объемов триэтанолamina и 1 объема уксусной кислоты). Образовавшиеся жирные кислоты экстрагируют при интенсивном встряхивании на механическом встряхивателе в течение 30 минут. После этого проводят центрифугирование в течение 30 минут при 1000 g. Верхнюю фазу, окрашенную в синий цвет, отсасывают пипеткой с помощью водоструйного насоса или шприца. Отбирают 4 мл нижней фазы, содержащей свободные жирные кислоты, переносят в обычные пробирки и добавляют 0,5 мл раствора диэтилдитиокарбомата. Перемешивают и колориметрируют при длине волны 440 нм против контрольной пробы. Контроль, как обычно, содержит все компоненты реакционной среды. Работа фермента прекращается предварительным добавлением в нее хлороформа и медного реагента.

Расчет. Количество жирных кислот, образовавшихся за время инкубации фермента с субстратом, определяют по калибровочному графику. Калибровочный график строят по пальмитиновой кислоте. Рекомендуемые пределы концентрации пальмитиновой кислоты находятся от 0,1 до 1,0 мкМ. С серией разведений пальмитиновой кислоты проводят все процедуры, начиная с добавления хлороформа и медного реагента и кончая колориметрированием. Активность липазы выражают в унифицированных международных единицах, то есть в микромолях жирных кислот, образовавшихся за минуту инкубации фермента с субстратом в расчете на единицу веса или объема источника фермента.

8. Определение активности амилазы с 3,5-динитросалициловой кислотой

Амилаза (КФ 3.2.1.1) – 1,4- α -D-глюкан-гликаногидролаза, гидролизует 1,4- α -гликозидные связи в полисахаридах типа крахмала, амилопектина, гликогена. В этих же субстратах на 1,6- α -гликозидные связи, находящиеся в местах разветвления амилопектиновой цепи, α -амилаза

не действует. Фермент высокоактивен и широко распространен. Больше всего его находится в поджелудочной железе, однако он может быть обнаружен во всех органах, тканях и биологических жидкостях организма. Фермент обладает выраженной видовой и органной специфичностью. Во всех случаях это металлоэнзим с молекулярной массой около 50000, включающий 1 грамм-атом кальция на 1 грамм-молекулу фермента. Для проявления максимальной активности необходимо присутствие ионов хлора (около 0,01н). Альфа-амилаза – типичный эндофермент, гидролизующий связи внутри полисахаридной молекулы. Обычными продуктами гидролиза считаются фрагменты с количеством глюкозных остатков не менее трех. При длительном и интенсивном гидролизе продуктами реакции может быть и мальтоза.

Принцип метода. Метод основывается на применении динитросалицилового реактива, главным компонентом которого является 3,5-динитросалициловая кислота, и заключается в том, что при нагревании 3,5-динитросалициловой кислоты в щелочной среде в присутствии редуцирующих сахаров она превращается в 3-амино-5-нитросалициловую кислоту, имеющую яркий желто-оранжевый цвет. Окрашенные продукты восстановления определяют колориметрически при длине волны 530 нм. Метод позволяет выражать активность фермента через количество гидролизованных α -гликозидных связей, что соответствует международным рекомендациям. Проведение анализа возможно без предварительного избавления от белков.

Реактивы. 1. 0,9 %-ный раствор хлористого натрия; 2. Фосфатный буфер 1/15 М, рН 6,9 (может быть использован и другой буфер с данным значением рН и близкой ионной силой); 3. Раствор субстрата: 1 г растворимого крахмала суспендируют приблизительно в 20 мл холодной дистиллированной воды. В зависимости от условий возможна и меньшая концентрация субстрата. В другую колбу наливают 30 мл буфера и 10 мл раствора хлористого натрия, доводят до кипения и медленно при постоянном помешивании выливают в нее суспензию крахмала, доводят до 100 мл и подогревают на водяной бане при 90°C до полного растворения крахмала; 4. Динитросалициловый реактив: состоит из 3,5-динитросалициловой кислоты, сегнетовой соли (калий-натрий виннокислый) и натриевой щелочи. Реактив следует готовить с соблюдением определенных условий, иначе при смешивании трех названных компонентов невозможно будет достигнуть их растворения. 10 г динитросалициловой кислоты растворяют до гомогенного пастообразного состояния с 200 мл 2н натриевой щелочи. К образовавшейся суспензии добавляют при постоянном помешивании 300 г сегнетовой соли, растворенной приблизительно в 0,5 л воды. После этого колбу с содержимым покрывают светонепроницаемой бумагой и ставят на магнитную мешалку с подогревом до 50°C. Полное растворение обычно достигается через 1 час и более. Затем раствор переносят в мерную колбу и доводят объем до литра. Готовый реактив фильтруют в плотно закупоренной посуде из темного стекла. Реактив устойчив при комнатной температуре в темном месте в течение многих месяцев.

Оборудование. Колориметр, водяная баня.

Ход определения. В пробирки наливают по 1 мл раствора субстрата. Помещают в водяную баню при 30°C. Затем вносят по 1 мл разведенного соответствующим образом раствора источника фермента и фиксируют время. Продолжительность инкубации фермента с субстратом составляет 10–20 минут. Реакцию останавливают добавлением 2 мл динитросалицилового реактива. Для развития окраски пробирку помещают в кипящую водяную баню на 10 минут, затем охлаждают в струе водопроводной воды и образцы готовы для колориметрирования при длине волны 530 нм. Окраска устойчива в течение многих часов. В контроль к раствору субстрата добавляют динитросалициловый реактив, а

уже после него приливают фермент. Последующие процедуры аналогичны таковым для опытных образцов.

Расчет. Калибровочный график строят по мальтозе. Поскольку описанный метод позволяет активность амилазы выражать в рекомендуемых стандартных единицах, то калибровочную кривую удобнее строить в микромолях. Для приготовления исходного маточного раствора берут 1026 мг мальтозы и растворяют в 1 л воды. В каждом миллилитре этого раствора будет содержаться по 1026 мкг или по 3 микромоля мальтозы. Из данного раствора готовят серию нисходящих разведений и проводят анализ. Чувствительность метода – около 0,03 мкМ мальтозы. График строят как общепринято.

9. Определение активности дисахаридаз

Дисахаридазы – большая группа ферментов, катализирующих завершающие этапы гидролиза углеводов. Локализуются в слизистой оболочке тонкого отдела кишечника. В группу входят мальтаза, лактаза, сахараза. Мальтаза или глюкоинвертаза (КФ 3.2.1.20) гидролизует 1,4-связи концевого нередуцирующего остатка α -D-глюкозы с освобождением α -глюкозы. Относят к мальтазе также группу ферментов, действие которых направлено на экзогидролиз названных глюкозидных связей и которые быстро гидролизуют различные ди- и олигосахариды и медленнее или вовсе не гидролизуют полисахариды. Лактаза (КФ 3.2.1.23) разрушает в основном молочный сахар, гидролитически отщепляя концевые нередуцирующие остатки β -D-галактозы. Сахараза (КФ 3.2.1.48) гидролизует сахарозу и мальтозу по типу мальтазы. Фермент из слизистой тонкого кишечника свиней выделен в виде комплекса, обладающего также активностью по отношению к изомальтозе. pH-оптимум активности дисахаридаз находится между 5,5 и 7.

Принцип метода (17). Почти все встречающиеся в природе дисахариды в своем составе имеют глюкозу, которая освобождается в процессе гидролиза этих субстратов. Следовательно, методы анализа активности дисахаридаз основаны на количественном определении продукта реакции, то есть глюкозы. Наиболее удовлетворительным по чувствительности и специфичности следует признать метод определения глюкозы с использованием глюкозооксидазы. Серьезные помехи при анализе данным методом может внести использование препаратов глюкозооксидазы с наличием высокой гликозидгидролазной активности, расщепляющей испытуемые субстраты. Избавление глюкозооксидазы от сопутствующих дисахаридазных активностей сложно и малоэффективно. Для подавления дисахаридазной активности рекомендуется в глюкозооксидазный реагент вводить ионы триса в высокой концентрации. Кроме того, необходимо тестировать каждую новую партию глюкозооксидазы проведением двойного контроля по субстрату и по чистой глюкозе. В результате вносимая доза этого фермента может быть снижена от рекомендуемой даже до 100 раз, но это снижение концентрации глюкозооксидазы, а следовательно и сопутствующих ей дисахаридаз, не должно отразиться на полноте катализируемой реакции, то есть окислении глюкозы в глюконовую кислоту.

Реактивы. 1. Малеатный буфер 0,1 М, pH 6,0: для приготовления 100 мл буфера 1,16 г малеиновой кислоты растворяют в небольшом объеме воды и доводят до требуемого значения pH приблизительно 15 мл 1 М натриевой щелочи, после чего объем доводят водой; 2. Трис-буфер 0,5 М, pH 7,0: 61 г триса растворяют в небольшом количестве воды, pH доводят соляной кислотой до 7,0 и затем добавляют воду до 1 литра; 3. Раствор орто-дианизидина: растворяют 10 мг в 1 мл 95 %-ного этанола; 4. Раствор детергента: 10 мл тритона X-100 разводят в 40 мл этанола; 5. Глюкозооксидаза; 6. Пероксидаза; 7. Глюкоза; 8. Субстраты: мальтоза, лактоза, сахароза, 0,056 М растворы: 192 мг каждого из суб-

стратов растворяют в 10 мл малеатного буфера. Субстраты с наличием высокого содержания свободной глюкозы для анализа непригодны; 9. Серная кислота 50 %: к 50 мл воды добавляют 28 мл концентрированной кислоты; 10. Глюкозооксидазный реактив: на 100 мл реактива необходимо 125 мг глюкозооксидазы и 0,5 мг пероксидазы растворить в минимальном объеме воды (1–2 мл) и перенести в колбу с 94 мл трис-буфера, добавить в колбу 1 мл раствора детергента и 1 мл раствора орто-дианизидина. Растворить на магнитной мешалке. При хранении в холодильнике в темной склянке при 4°C реактив сохраняет годность в течение нескольких суток.

Оборудование. Колориметр, водяная баня, магнитная мешалка.

Ход определения. В водяной бане при температуре 30°C к 100 мкл раствора субстрата добавляют 100 мкл разведенного раствора источника фермента. Время инкубации субстрата с ферментом – 30–60 минут. Останавливают реакцию помещением пробирок в кипящую водяную баню на 2–3 минуты. Затем пробирки охлаждают струей водопроводной воды и вновь помещают в баню при 30°C. В них добавляют по 1 мл воды, пробирки встряхивают и в них вносят по 3 мл глюкозооксидазного реактива. Снова проводят инкубацию – 40 минут, в течение которых проявляется коричневое окрашивание. Реакцию останавливают добавлением 2 мл раствора серной кислоты. Одновременно появляется устойчивая красная окраска. Пробы готовы для колориметрирования при длине волны 540 нм. В контрольные образцы субстрат добавляют уже к предварительно прокипяченному (инактивированному) ферменту, а все последующие процессы аналогичны.

Расчет. Калибровочный график строят по глюкозе приготовлением серии нисходящих разведений из маточного раствора, содержащего в каждом миллилитре 2 мкмоль глюкозы. Минимальная чувствительность метода – 0,01 мкМ глюкозы. Активность фермента выражают в рекомендуемых международных единицах. При расчете необходимо помнить, что при гидролизе одной молекулы мальтозы образуется две молекулы глюкозы, а при гидролизе лактозы и сахарозы образуется по 1 молекуле глюкозы.

Литература

1. Bergmeyer H.U. (Ed). Methods of Enzymatic Analysis, AP,1974: 1946.
2. Bergmeyer H.U. (Ed). Ibid :1050.
3. Bergmeyer H.U.(Ed), Ibid: 1052.
4. Пятницкий Н.П. Клиническая медицина, 1955, 33, 4: 74.
5. Галочкин В.А., Газдаров В.М. Новые методы и модификации биохимических исследований в животноводстве. М.:Колос, 1970:158.
6. Фомина Л.С., Басаргин Н.А., Кондрашова В.П. Лабораторное дело, 1970,6.
7. Галочкин В.А. Новые методы и модификации биохимических исследований в животноводстве, М.:Колос,1970:164.
8. Bergmeyer H.U. (Ed). Methods of Enzymatic Analysis,AP,1974:989.
9. Bergmeyer H.U. (Ed). Ibid: 989.
10. Галочкин В.А. Новые методы и модификации биохимических исследований в животноводстве. М.:Колос,1970:169.
11. Bergmeyer H.U. (Ed). Methods of Enzymatic Analysis,AP,1974:996.
12. Josefsson L.,Lindberg T. Bioch.Biophys.Acta,1965,105,1:149.
13. Bergmeyer H.U. (ed). Methods of Enzymatic Analysis, AP,1974:982.
14. Dimov D.M., Kulhanek V. Clin.Chim.Acta,1967,271:16.
15. Шайхаев Г.О., Аитов С.Н. Бюллетень ВНИИФБиП с.-х. животных, 1985,3:81.
16. Газдаров В.М., Нечипуренко Л.И., Галочкин В.А. Новые методы и модификации биохимических исследований в животноводстве. Боровск, 1970: 41.
17. Dahlgvist A. Anal.Biochem,1964,7,1.

II. Количественный анализ пищеварительных ферментов и их биосинтеза

1. Определение скорости биосинтеза ферментов

1.1. Метод анализа относительной скорости биосинтеза ферментов в ткани поджелудочной железы

Принцип метода (1). Метод основан на использовании радиоактивной аминокислоты и последующем сравнении радиоактивности, включившейся в суммарные белки поджелудочной железы, с радиоактивностью, включившейся в исследуемый фермент. В основу расчета положено уравнение 1:

$$V_a/V_p = C_a/C_p \quad (1)$$

где V_a – скорость биосинтеза фермента (например, амилазы); V_p – скорость биосинтеза всей совокупности панкреатических белков; C_a и C_p – радиоактивность амилазы и суммы белков соответственно.

Ход определения. Животным внутрибрюшинно инъецируют солевой раствор из расчета 100 мкКи dI-¹⁴C-валина на кг живой массы (удельная радиоактивность вводимого препарата 5 мкКи/мкмоль). Точно через 15 минут животных убивают. Извлекают поджелудочную железу, тщательно ополаскивают, избавляясь от адсорбированного меченого предшественника, и гомогенизируют. Одну часть гомогената используют для фракционирования по методу Шнайдера (2). Из второй части гомогената выделяют амилазу алкогольной преципитацией гликоген-амилазного комплекса (3). Измеряют радиоактивность, включившуюся за равный промежуток времени в суммарную фракцию панкреатических белков и в очищенную амилазу. Результаты по активности амилазы, а также величины включившейся радиоактивности рассчитывают на 1 г сырой ткани и на 1 мг фосфора ДНК. В основу расчета относительной скорости биосинтеза как уже упоминалось, положено уравнение 1:

$$C_a/C_p = k_1/K_1 = n \kappa_s/m K_s \quad (2)$$

где K_1 и k_1 – средняя относительная скорость синтеза панкреатических белков и амилазы соответственно. Обе эти величины связаны с соответствующими величинами относительной скорости синтеза, выраженными по меченой аминокислоте (валину): $k_1 = n\kappa_s$; $K_1 = mK_s$, m и n – количество аминокислотных остатков (валина) в белках поджелудочной железы и в амилазе.

Применение метода оценки относительной скорости биосинтеза отдельных панкреатических ферментов может быть признано оправданным в зависимости от целей и задач каждого эксперимента, но не следует упускать из внимания, что, несмотря на кажущуюся простоту и привлекательность метода, с теоретической точки зрения он встречает ряд возражений. В частности, в величину радиоактивности комплекса панкреатических белков входит и радиоактивность фермента, скорость биосинтеза которого определяют. Следовательно, величина радиоактивности, включившейся в индивидуальный белок, входит как в числитель, так и в знаменатель уравнения 2.

1.2. Метод анализа абсолютной скорости биосинтеза панкреатических ферментов

Принцип метода. В практические процедуры (4) внесена существенная деталь. Измеряется количество радиоактивной аминокислоты-предшественника, непосредственно включившейся в синтезируемую молекулу фермента. От количества радиоактивности включившейся в фермент аминокислоты к количеству микромолей синтезированного фермента можно перейти, зная 4 характеристики: 1) удельную радиоак-

тивность используемого препарата аминокислоты-предшественника; 2) количество аминокислотных остатков предшественника в молекуле фермента; 3) молекулярную массу фермента; 4) соотношение радиоактивного предшественника и аналогичной немеченой аминокислоты в ткани поджелудочной железы, то есть удельную активность предшественника во внутриклеточном фонде свободных аминокислот.

Скорость биосинтеза фермента рассчитывают по формуле:

$$K_S = E^*/(n \int_{t_1}^{t_2} A(t) dt) \quad (3)$$

где E^* – радиоактивность фермента, n – число аминокислотных остатков меченого предшественника в молекуле фермента, $A(t)dt$ – удельная активность внутриклеточного свободного предшественника как функция от времени экспозиции.

На исходе нескольких отрезков времени после инъекции меченого предшественника (*in vivo*) или после начала инкубации (*in vitro*) определяют удельную активность свободного внутриклеточного предшественника. Она представляет собой типичную нисходящую кривую. Среднее значение площади под кривой в интервале между моментами времени t_1 и t_2 (значение интеграла в знаменателе расчетной формулы) находят графически.

В качестве аминокислоты-предшественника при изучении скорости биосинтеза трипсина, химотрипсина, амилазы и суммы панкреатических белков у поросят можно использовать ^{14}C -лизин, меченый по углероду карбоксильной группы (5, 6). Проводить опыты по изучению биосинтеза панкреатических ферментов на крупных сельскохозяйственных животных с введением метки непосредственно в организм животного вряд ли может быть оправдано не только с экономической, но и с организационно-методической точки зрения. Поэтому, имея информацию об идентичности результатов, полученных на лабораторных животных как при работе *in vivo*, так и в опытах с белоксинтезирующей системой переживающих тканей в условиях *in vitro*, предпочтение было отдано второму способу.

Ход определения. За основу рецепта инкубационной среды взят солевой раствор Хэнкса без красителя и смесь аминокислот, соответствующая прописи среды Игла, но без лизина. Меченый лизин вводят в среду непосредственно перед инкубацией ткани.

После убоя у животных максимально быстро и полностью извлекают поджелудочную железу. Весь орган быстро взвешивают, часть его, предназначенную для работы, ополаскивают в среде инкубации, не содержащей меченого лизина, при 37°C .

Ткань измельчают ножницами, чтобы масса кусочков не превышала 50 мг. Быстро приготовленные срезы в количестве 3 г вновь ополаскивают в среде без радиоактивного лизина и помещают в инкубационную среду. Радиоактивный лизин вводят из расчета 1 мкКи на 1 мл среды инкубации.

Используют три отрезка времени экспозиции срезов поджелудочной железы – 10, 20 и 30 минут при температуре инкубации 37°C . Остановку биосинтетических процессов в переживающих срезах железы, а следовательно, и включения аминокислот в белки, достигают резким охлаждением реакционной среды. Для этой цели в инкубационные сосуды добавляют кусочки льда (лед предварительно готовят из раствора Хэнкса для предотвращения сдвигов в осмомолярности среды), а сами сосуды помещают в охлажденную смесь. Затем срезы ткани гомогенизируют. Часть гомогената, предназначенную для анализа радиоактивности общего белка и свободного лизина, подвергают первичному фракционированию (2). Свободный лизин определяют общепринятым хроматографическим или другим способом.

Для определения радиоактивности общего белка берут аликвоту гомогената, соответствующую 0,01 г железа, и добавляют 10 %-ную ТХУ. Через 15 минут смесь фильтруют через миллипоровый фильтр (диаметр пор 0,17–0,35 мкм). На фильтре осадок промывают 10 %-ной ТХУ и этиловым спиртом, пробы высушивают и помещают в сцинтилляционные флаконы. Радиоактивность свободного лизина определяют жидкостно-сцинтилляционным методом.

1.3. Метод препаративного выделения трипсина, химотрипсина и амилазы

Для разделения трипсина и химотрипсина из ткани поджелудочной железы используют две колонки (6). Первую колонку наполняют активированной сефарозой с ковалентно присоединенным к ней куриным (яичным) овомукоидом. Вторую колонку наполняют поливалентным ингибитором трипсина из соевых бобов.

Иммобилизацию обоих ингибиторов на CNBr-активированной сефарозе (реагент фирмы "Фармация") проводят стандартными методами, рекомендуемыми в проспектах фирмы.

Процесс ковалентного связывания ингибитора с активированной сефарозой состоит из ряда последовательных этапов:

Набухание геля. Сухой порошок цианбром-активированной сефарозы 4В оставляют для набухания в слабом растворе соляной кислоты (1 мМ) на протяжении 2–3 часов. Затем набухшую сефарозу обильно промывают на стеклянном фильтре этим же раствором кислоты.

Иммобилизация ингибитора. Белок, предназначенный для связывания с сефарозой, растворяют в 0,1М боратном буфере (рН 8–10). Буфер содержит 0,5М хлористого натрия. На каждый миллилитр набухшего геля сефарозы рекомендуется вносить 10 мг белка, который подлежит связыванию. Гель сефарозы с ингибитором в боратном буфере перемешивают при комнатной температуре в течение 2 часов на роторной мешалке. Фирма не рекомендует применять магнитные мешалки.

Блокирование свободных карбоимидных групп. После присоединения ингибитора на сефарозе остается определенная часть свободных карбоимидных групп. Для предотвращения неспецифического связывания их необходимо соединить с каким-либо нейтральным низкомолекулярным веществом со свободной аминогруппой. С этой целью берут трис-буфер (рН 8,0), содержащий 1,5 г глицина на 100 мл, смешивают с гелем сефарозы и вновь инкубируют 2 часа при комнатной температуре с медленным вращением на роторной мешалке.

Десорбция нековалентно связанного материала. Для освобождения от химически несвязавшегося ингибитора гель вносят в колонку (15x70 мм) и поочередно промывают кислым и щелочным буфером (0,1М ацетатный, рН 4,0 и 0,1М боратный, рН 8,0). Оба буфера содержат 1М NaCl. Скорость промывки около 100 мл в час. Объем каждого промывного буфера равняется примерно 10 объемам столбика геля в колонке (15x50 мм). Двух-трех промывных циклов обычно достаточно для исчезновения из элюата белка, что контролируют по оптической плотности при 280 нм.

Две приготовленные таким образом колонки многократно используют в работе в течение нескольких месяцев. Хранят колонки при +4°C в 0,01М ацетатном буфере (рН 4,0), содержащем 0,1М NaCl. В качестве антисептика добавляют 0,01 % мертиолата.

В расчете на единицу массы сухого препарата активированной сефарозы в описанных условиях удается связать около 10 мг каждого из ингибиторов. Зная количество ковалентно присоединенного ингибитора, его молекулярную массу, молекулярную массу очищенных ферментов, стехиометрию фермент-ингибиторного комплекса и примерное содержание в ткани железы интересующих нас ферментов, можно рассчитать

рабочую емкость колонок и количество гомогената ткани поджелудочной железы, которое следует наносить на колонку.

Рекомендуемая рабочая схема выделения трипсина и химотрипсина при анализе скорости биосинтеза этих белков включает приготовление гомогенатов срезов поджелудочной железы после инкубации с радиоактивным предшественником, тщательное его фильтрование и нанесение на две последовательно соединенные колонки. В первую колонку упакована сефароза с ковалентно присоединенным к ней куриным овомукоидом. Назначение ее – задерживать трипсин. Все, что транзитом проходит через первую колонку, попадает во вторую уже с соевым ингибитором. На ней адсорбируется прошедший первую колонку химотрипсин. Группа белков, не имеющая сродства ни к овомукоиду, ни к соевому ингибитору и включающая как остальные панкреатические гидролазы, так и все тканевые белки, проходит обе колонки без задержки, единым мощным пиком. После того, как нанесение образца завершено, колонки разъединяют и оба фермента элюируют отдельно.

Перед нанесением на колонки гомогенат ткани поджелудочной железы активируют в течение часа добавлением 1 %-ного гомогената слизистой тонкого отдела кишечника.

Нанесение активированного гомогената проводят при комнатной температуре со скоростью 30 мл в час в 0,1М боратном буфере (pH 7,8), содержащем 0,5М NaCl. После того, как нанесение закончено, колонки промывают небольшим количеством исходного буфера до исчезновения в элюате оптической плотности при 280 нм. Затем колонки разъединяют и каждую из них элюируют 0,1М ацетатным буфером (pH 3,0) с содержанием 1М NaCl. Скорость элюции – 50 мл в час, объем собираемых фракций – 5 мл.

Степень очистки и чистоту получаемых препаратов трипсина и химотрипсина постоянно контролируют в процессе работы. В каждой фракции, получаемой после хроматографического разделения, помимо амидазных активностей трипсина и химотрипсина по их специфическим субстратам определяют также и активность третьего, самого представительного фермента – амилазы (3). Результаты анализа подтверждают достаточно высокую чистоту получаемых фракций трипсина и химотрипсина. Дополнительный фактор контроля, применяемый нами, состоит в иммунохимическом изучении выделяемых фракций трипсина и химотрипсина с поливалентной антисывороткой против всех панкреатических гидролаз (10). Фракции, соответствующие трипсину и химотрипсину, дают по одной линии преципитации.

При нанесении исходного вещества с учетом рабочей емкости колонок количество выделяемых трипсина и химотрипсина находится в исключительно высоких пределах (90–95 %), если судить на основе нанесенной и элюированной активности. Такой высокий процент выхода изучаемых ферментов в сочетании с чистотой получаемых препаратов и относительной простотой аналитических и препаративных процедур позволяет оценивать разбираемый метод как вполне приемлемый для работ, связанных с количественной оценкой скорости биосинтеза панкреатических протеиназ.

После завершения элюции к объединенным фракциям с наивысшими величинами активности трипсина и химотрипсина добавляют ТХУ до конечной концентрации 10 %. Пробы оставляют на ночь в холодильнике (4°C) для формирования осадка. Затем осадок отфильтровывают на миллипоровом фильтре и определяют радиоактивность.

Расчет скорости биосинтеза изучаемых ферментов проводят по приведенной в разделе 1.2. формуле. Значение интеграла в знаменателе находят, как об этом упоминалось выше, графическим определением площади.

2. Иммунохимический анализ ферментов

Принцип метода. За основу взят метод Манчини для определения количества белка сыворотки крови с помощью простой радиальной иммунодиффузии в геле (7). Принцип этого метода заключается в диффузии антигена из лунки в гель, в котором равномерно распределены антитела. По мере диффузии вокруг лунки образуется кольцо преципитации, по размеру которого судят о количестве антигена. Количество антигена прямо пропорционально квадрату пройденного им расстояния и обратно пропорционально концентрации антител в геле. Этот метод с многочисленными модификациями был предложен для определения многих белков, в том числе и ферментов.

Используя этот принцип, нами отработан метод определения количества молекул ферментного белка панкреатических α -амилазы и трипсина в пищеварительном тракте поросят с учетом замены моноспецифической антисыворотки полиспецифической (8). Работа с полиспецифическими антисыворотками имеет свои ограничения и сложности, но имеются и преимущества: отпадает необходимость выделять фермент в чистом виде для иммунизации, исключается возможность изменения иммунохимических свойств фермента в процессе очистки, сокращается число иммунизированных животных, появляется возможность вести анализ одновременно нескольких ферментов при условии налаженной их идентификации. Среди множества других иммунохимических методов он выгодно отличается своей относительной простотой и достаточной точностью для отнесения его к количественным методам.

Получение антисыворотки. Иммунизацию кроликов нативным поджелудочным соком поросят осуществляют по следующей схеме: эмульсию поджелудочного сока с полным адьювантом Фрейнда (1:1) вводят внутрикожно в подушечки лап и многочисленные участки спины животного. Спустя 30 дней проводят повторный цикл иммунизации той же эмульсией трехкратно с интервалом между инъекциями 7 дней. В процессе иммунизации у кроликов берут кровь из краевой вены уха и контролируют титр антител, который обычно бывает максимальным через неделю после последней серии инъекций. Полученную в этот срок антисыворотку хранят при температуре -7°C .

Постановка реакции простой радиальной иммунодиффузии. Смесь агара с антисывороткой получают добавлением к 3 %-ному раствору агара при температуре 50°C равного по объему количества антисыворотки экспериментально найденного разведения. Степень разведения зависит от титра антител в антисыворотке и при единой схеме иммунизации у различных животных может колебаться в широких пределах.

Тонкий слой агара с антисывороткой формируют на стеклянной пластинке размером 9x12 см. Для получения равномерного слоя агара (1 мм) его заливают в щель между двумя стеклами с П-образной прокладкой. В слое агара пробивают лунки и в них вносят точное количество антигена с помощью микрошприца. Готовую пластинку помещают во влажную камеру (экзикатор) и оставляют в строго горизонтальном положении на двое суток для прохождения диффузии и образования преципитата. После этого проводят измерение диаметра колец с помощью микроскопа МБС-2.

Для того, чтобы сохранить пластинку на длительный срок, ее следует отмыть в физрастворе (белки антисыворотки вымываются из агара, а преципитат остается вследствие его нерастворимости), окрасить амидо-черным и высушить. Размер колец после этой процедуры не изменяется, а пластинка в таком состоянии может храниться длительное время.

Идентификация колец преципитации. В предлагаемом варианте метода простой радиальной иммунодиффузии антисыворотка

выработана против всех белков поджелудочного сока свиньи. Следовательно, при наличии в любом изучаемом образце нескольких панкреатических ферментов каждый из них, внесенный в агар для диффузии, будет давать свое кольцо преципитации. Последующая задача заключается в налаживании методов идентификации каждого отдельно взятого белка-антигена в преципитате.

Гистохимический метод идентификации. Как и лизосомальные ферменты, ферменты поджелудочной железы можно идентифицировать реакцией специфического субстрата в геле. Для этого необходимо, чтобы каталитическая способность фермента сохранялась после завершения реакции преципитации. В этом отношении панкреатические ферменты представляют собой очень удобную модель. Участки их молекул, квалифицируемые как антигенные детерминанты, не совпадают с участками, ответственными за каталитическую активность. Именно поэтому нерастворимый комплекс антиген-антитело продолжает обладать ферментативной активностью.

Альфа-амилаза идентифицируется с помощью йод-крахмальной реакции, трипсин – реакцией со специфическим субстратом бензоил-аргинин- паранитроанилидом (5).

Идентификация с помощью перекрестной реакции. Более надежный способ идентификации указанных ферментов дает перекрестная реакция испытуемого образца с чистым ферментом или с контрольным образцом, в котором ферменты уже идентифицированы. Для этого рядом с лункой пробивают еще одну лунку для внесения контрольного образца или чистого фермента. По мере формирования преципитата кольца одинаковых ферментов скрещиваются, а кольца разных ферментов пересекаются.

Для построения калибровочного графика необходимо выделить фермент в чистом виде. Точно измеренное количество чистого фермента наносят на пластинку и после измерения кольца устанавливают зависимость между количеством нанесенного фермента и площадью круга, которую занимает кольцо преципитации.

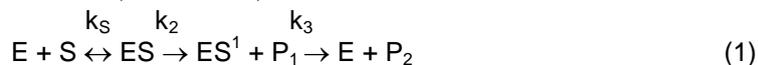
Выделение трипсина производят с помощью хроматографии по сорбенту на CNBr-активированной сефарозе (6). Чистую α -амилазу получают осаждением с помощью гликогена (3).

Указанные методы могут быть использованы при анализе всех других пищеварительных ферментов.

3. Титрование активных центров ферментов

Принцип метода. Теоретические аспекты определения абсолютной концентрации интактных активных центров гидролитических ферментов, способных вступать в стехиометрические взаимодействия со специфическими субстратами, применительно к кристаллическим препаратам трипсина и хомотрипсина, изложены в работе М.Бендер с сотр. (9).

Стехиометрическая основа определения концентрации гидролитических ферментов представлена в уравнении 1, которое можно рассматривать как унифицированный подход для характеристики реакций, катализируемых α -трипсином, трипсином, панкреатопептидазой E, плазмином и, возможно, липазой.



Превращение фермента в ацил-ферментный комплекс ES^1 и отделение на этой стадии реакции первого продукта P_1 классифицируется как стехиометрическая реакция относительно одного активного центра фермента. Если процесс образования ацил-ферментного комплекса и первого продукта можно зафиксировать и измерить прежде, чем произойдет последующая диссоциация ацилированного фермента, то тем самым представляется возможность измерить концентрацию фермента.

Для успешного титрования активных центров фермента необходимо соблюдение трех условий: 1) концентрация титранта должна значительно превышать концентрацию фермента ($[S]_0 \gg [E]_0$); 2) скорость ацилирования фермента должна значительно превышать скорость распада ацилферментного комплекса (деацилирования): $k_2 \gg k_3$; 3) реакция титрования должна происходить только с активным центром фермента.

Для титрования ферментов в биологических жидкостях необходимо использование титрантов, позволяющих вести анализ при низких концентрациях фермента. Необходимо применение титрантов, отвечающих первичной субстратной специфичности ферментов, то есть титранты должны быть специфическими субстратами данного фермента. Кроме того, для избежания эффектов денатурации титрование должно происходить в течение короткого промежутка времени (несколько минут). Для биологических объектов помимо примесей активных ферментов со сходной субстратной специфичностью необходимо принимать во внимание и наличие примесей ингибиторной природы. Ингибиторы, действующие по типу обратимых конкурентных, не могут исказить результаты титрования. Вещества, необратимо взаимодействующие с активными центрами ферментов, разумеется, препятствуют как анализу активности, так и титрованию числа активных центров фермента.

3.1. Титрование трипсина.

Титрование трипсина проводят в односантиметровой термостатируемой кварцевой кювете на регистрирующем спектрофотометре.

Для титрования используют солянокислый р-нитрофенил-N-бензилоксикарбонил-1-лизинат. При анализе в 0,05M цитратном буфере рН 3,0 изменение коэффициента молярной экстинкции при 340 нм при гидролизе этого субстрата $E_{340} = 6,15 \times 10^3$. К 3 мл буфера, находящимся в кювете, добавляют аликвоту субстрата (20–100 мкл $[S] = 1,05 \times 10^{-3} M$), растворенного в ацетонитриле или в другом органическом растворителе, 1–2 минуты следят за спонтанным гидролизом субстрата и вносят в кювету аликвоту раствора фермента (20–100 мкл, $[E] = 3 \times 10^{-3} M$) (концентрация фермента и субстрата даны по их содержанию в реакционной среде). Выброс пара-нитрофенола в предстационарную фазу ферментативной реакции, а по нему – концентрацию активных центров рассчитывают по уравнению 2.

$$П = \{A_0 - A_S + (V_1/V_2)A_S - A_e\} / \Delta E \quad (2)$$

Фактор $A_0 - A_S$ представляет собой спектрофотометрически измеренную величину выброса нитрофенола, так как A_0 – величина абсорбции в стационарной фазе реакции, а величина A_S характеризует спонтанный гидролиз субстрата; обе величины экстраполированы к нулевому времени реакции. В целях точного расчета выброса пара-нитрофенола, то есть для выявления истинного цифрового значения величины $П$, следует внести два корректирующих фактора. Первый необходим для учета разведения субстрата $(V_1/V_2)A$, где V_1/V_2 представляет собой отношение аликвоты фермента к конечному объему реакционной среды. Второй фактор A_e представляет собой оптическую плотность раствора фермента, которую определяют отдельно, поскольку ее невозможно определить в реакционной смеси.

3.2. Титрование химотрипсина

Спектрофотометрическое титрование α -химотрипсина с использованием в качестве ацилирующего агента N-трансциннамоил-имидазола основано на образовании относительно стабильного ацил-ферментного комплекса N-транс-циннамоил- α -химотрипсина. Реакция стехиометрич-

на – одна молекула реагента вступает во взаимодействие с одним активным центром фермента.

В молекуле химотрипсина имеется один активный центр, следовательно, имеет место взаимодействие 1 моля титранта на 1 моль фермента. N-транс-циннамоилимидазол по своей сферической конфигурации близок к натуральным субстратам химотрипсина и отвечает первичной субстратной специфичности фермента, так как он аналогичен производным фенилпропионовой кислоты. Ацилирование химотрипсина идет исключительно быстро даже при pH 5 и ниже. Обычно реакция завершается за 30–90 секунд. Оптимальное для анализа изменение оптической плотности – 0,3–0,4. Рекомендуемая концентрация титранта – около 1×10^{-4} М. При гидролизе оптическая плотность снижается. Коэффициент молярной экстинкции N-транс-циннамоилимидазола в 0,1 М ацетатном буфере, содержащем 3,2 % ацетонитрила, при pH 5,05 составляет при 335 нм $9,37 \times 10^3$, а при 310 нм $E = 23,8 \times 10^3$. Разница экстинкции транс-циннамоил- α -химотрипсина и свободного фермента $E_{310} = 10,9 \times 10^3$, а $E_{335} = 0,42 \times 10^3$. Присутствие примесей неактивного белка не мешает титрованию. Реакция позволяет вести точное титрование химотрипсина в присутствии приблизительно эквивалентной концентрации активного трипсина.

Недостатком метода является его слабая чувствительность. Для количественного титрования необходима концентрация химотрипсина приблизительно 50 мг на 1 мл раствора.

3.3. Титрование химотрипсина специфическими субстратами

Изучение кинетики катализируемого химотрипсином гидролиза этилового, метилового и нитрофенилового эфиров ацетил-триптофана показывает соответствие реакции трехстадийному механизму, описываемому уравнением 1. При гидролизе этих трех соединений, которые можно отнести к числу специфических субстратов, образуется общий промежуточный продукт N-ацетил-1-триптофанил- α -химотрипсин. В качестве титранта апробирован также паранитрофениловый эфир N-бензилоксикарбонил-1-тирозина. Схема процедуры титрования и методика расчета аналогичны ранее описанным. Реакцию проводят в 0,05 М цитратном буфере с конечной концентрацией ацетонитрила около 1,6 объемных процентов. В диапазоне pH от 2 до 4 получены тождественные результаты. Количественное титрование активных центров химотрипсина при низких и высоких значениях pH почти идентично. Кинетические константы гидролиза этилового и нитрофенилового эфиров ацетил-триптофана в интервале pH от 2 до 7 имеют сходные значения. Обычно используемая в анализах концентрация фермента колеблется в пределах от 10^{-5} до 10^{-7} М. При работе с высокими концентрациями фермента растворы перед анализом центрифугируют для осветления в течение 45 минут при 30 тыс. оборотов в минуту. Концентрацию субстрата используют от 10^{-3} до 10^{-4} М.

3.4. Титрование липазы

Принцип метода. Обнаружено (10), что ингибированная диэтил-паранитрофенилфосфатом липаза содержит один фосфатный радикал на 1 моль фермента. Следующий примечательный факт состоит в сохранности в полном функциональном состоянии каталитического активного центра липазы и его способности к взаимодействию с диэтил-паранитрофенилфосфатом после ингибирования фермента двумя различными карбодиимидами в присутствии нуклеофильных агентов. В случаях взаимодействия липазы с диэтил-пара-нитрофенилфосфатом в присутствии солей желчных кислот количество освобождающегося паранитрофенола близко к 1 молю на моль ингибированного фермента. Полагают (10), что приведенная информация достаточна для количествен-

ного титрования фермента с использованием в качестве титрантов ингибиторов фосфорорганической природы.

Техника титрования. Стехиометрия ингибирования оценивается определением освобождающегося пара-нитрофенола и числа фосфатных радикалов, связавшихся с ферментом. Раствор липазы (приблизительно 3 мг/мл) в 0,1М ацетатном буфере (рН 6,0), содержащем 0,1М NaCl и 0,3 % солей желчных кислот (крупного рогатого скота), ингибируют при комнатной температуре с диэтил-пара-нитрофенилфосфатом (конечная концентрация в реакционной среде 4,6 мМ). Через 3 часа ингибирование достигает 93–99 %. Освобождающийся пара-нитрофенол измеряют при 400 нм после разведения 0,2 мл образца в 1 мл 0,5М трис-буфера с рН 9,0. Оптическую плотность считывают против контроля без фермента с целью фиксирования спонтанного гидролиза диэтил-пара-нитрофенилфосфата. К концу инкубации липазная активность по агрегированному субстрату почти полностью исчезает и улавливается появление 1 моля пара-нитрофенола на 1 моль фермента.

Литература

1. Marchis-Mouren G., Pasero L., Desnuelle P. Biophys. Res. Com., 1963, 13: 262.
2. Schneider W.C. Methods in Enzymology, AP, 1957, 3, 4: 680.
3. Loyter A., Schramm M. Bioch. Biophys. Acta, 1962, 65: 200.
4. Rebut I.C., Marchis-Mouren G., Pasero I. et al. Bioch. Biophys. Acta, 1966, 117: 351.
5. Майстров В.И. Бюллетень ВНИИФБиП с.-х. животных, 1978, 4(51):74.
6. Майстров В.И. Бюллетень ВНИИФБиП с.-х. животных, 1978, 2(49):54.
7. Mancini G. et al. Immunochemistry, 1965, 2: 235.
8. Галочкин В.А., Крюков О.А. Бюллетень ВНИИФБиП с.-х. животных, 1981, 1(61):72.
9. Bender M.F., Charles M., Dernuelle F. Bioch. Biophys. Acta, 1972, 276: 162.
10. Maylie M.F., Charles M., Dernuelle F. Bioch. Biophys. Acta, 1972, 276: 162.



Методы анализа витаминов

Жирорастворимые витамины

1. Общий принцип определения жирорастворимых витаминов, очистка растворителей, оборудование

Введение.

Известно, что витамины представляют собой группу низкомолекулярных органических соединений, которые разделяются на две основные группы – витамины, растворимые в воде (V_1 , V_2 , V_3 , V_4 , V_5 , V_6 , С и др.) и витамины, растворимые в жирах и органических растворителях (А, Д, Е, К и каротин). Хорошими растворителями для последних являются хлороформ, ацетон, гексан, петролейный и этиловый эфир и др.

В основе определения жирорастворимых витаминов заложены методы извлечения витаминов из субстратов путем омыления щелочными растворами и экстракции органическими растворителями. За последние годы широкое распространение получил метод определения жирорастворимых витаминов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), что связано с ее универсальными аналитическими возможностями: высокая эффективность разделения, благоприятные условия анализа (низкая температура, инертный растворитель, отсутствие контакта с кислородом).

Анализы витаминов А, Д, Е и каротина могут быть выполнены на отечественном микроколоночном хроматографе Милихром, выпускаемом ОПО "Научприбор" (г. Орел). Хроматограф снабжен спектрофотометрическим сканирующим детектором на УФ область (190–360 нм). Кроме УФ детектора (по отдельному заказу) хроматограф Милихром комплектуется спектрофотометрическим детектором на видимую область (380–720 нм).

Исходя из общих свойств жирорастворимых витаминов, в процессе их анализа необходимо выполнять общие и обязательные при их определении процедуры, такие как очистка реактивов, омыление, экстракция и другие, независимо от биологического субстрата и определяемого в нем витамина. Процедура очистки будет приведена ниже, а омыления и экстракции – на примере определения витамина А.

Очистка органических растворителей от примесей. Все жирорастворимые витамины и каротиноиды находятся в жировых включениях структурных компонентов печеночной или других тканей, поэтому одной из основных операций при химическом определении витаминов является извлечение их из субстрата органическими растворителями – петролейным или этиловым эфиром, бензолом, ацетоном, гексаном и т.д. Однако выпускаемые химической промышленностью вышеперечисленные препараты содержат примеси (перекиси, тиофен и др.), которые либо мешают определению витаминов, либо разрушают их в процессе анализа. В связи с этим перед употреблением органических растворителей в анализах из них необходимо удалить примеси.

Промышленность выпускает различные фракции петролейного эфира с температурой кипения (т.к.) 30–50°C, 40–70°C и 70–100°C. Для определения жирорастворимых витаминов используют петролейный эфир фракции 40–70°C, не содержащий ненасыщенных и ароматических углеводородов. Присутствие ненасыщенных углеводородов в петролейном эфире можно обнаружить по обесцвечиванию разбавленного 2 % водного перманганата калия ($KMnO_4$). Для этого в пробирку вносят одну каплю раствора $KMnO_4$ и разбавляют водой до слабо-розового, легко просматриваемого раствора. 2 мл этого раствора переносят в другую пробирку, прибавляют одну каплю петролейного эфира и встря-

хивают в течение 10–20 сек. Обесцвечивание раствора в течение 1 мин указывает на наличие ненасыщенных углеводородов. Удаление ненасыщенных углеводородов из петролейного эфира производят следующим образом. К 8–10 объемам эфира в делительную воронку приливают один объем концентрированной серной кислоты (хч) и взбалтывают 10–15 мин. Побуревшую кислоту сливают, приливают новую порцию и очистку продолжают. Обработку эфиров серной кислотой повторяют до тех пор, пока не прекратится побурение кислоты. Далее эфир промывают 1–2 раза дистиллированной водой, затем 15–16 %-ным раствором едкого натрия (в таком же объеме, как и серная кислота) и вновь водой 4–5 раз до исчезновения реакции на щелочь в промывных водах (по фенолфталеину). Эфир сушат сернокислым натрием и перегоняют при температуре 40–70°C. Перегонку петролейного эфира производят на водяной бане со скрытым электронагревателем. Первые и последние порции петролейного эфира отбрасывают. Хранят эфир над безводным сернокислым натрием в темной посуде или в темном месте без доступа влаги.

Для бензина с температурой кипения 70–90°C (при определении каротиноидов и β -каротина) и гексана (при тонкослойной хроматографии) способы очистки от ненасыщенных углеводородов и хранения являются такими же, как и для петролейного эфира.

Диэтиловый эфир (эфир для наркоза, серный) может содержать перекиси, которые способствуют разрушению витаминов в процессе определения. Поэтому прежде чем приступить к работе с эфиром, необходимо убедиться в отсутствии перекисей. Наличие перекисей обнаруживают следующим образом: пробу эфира (2–3 мл) встряхивают в пробирке с таким же объемом 2 %-ного раствора йодистого калия, предварительно подкисленного несколькими каплями разбавленной соляной кислоты. Появление бурого окрашивания эфирного слоя указывает на присутствие перекисей. Или же к 20 мл эфира приливают 5 мл смеси, состоящей из равных объемов 50 %-ного раствора КJ и 1 %-ного спиртового раствора фенолфталеина. Появление красной окраски указывает на присутствие перекисей. При наличии в эфире перекисей их удаляют следующим образом: 1 л эфира встряхивают в течение 5–10 минут в 2-литровой делительной воронке или колбе со смесью 10 мл 40 %-ного раствора КОН (или NaOH) и 100 мл 4 %-ного раствора перманганата калия. После отстаивания раствор перманганата сливают и вновь добавляют такое же количество нового раствора перманганата и очистку вновь повторяют. Обработку эфира повторяют до тех пор, пока окраска вновь добавленного раствора перманганата не перестанет изменяться. Однако и после этого необходимо проверить эфир на отсутствие перекисей одним из вышеуказанных способов. Если обнаружится присутствие перекисей, очистку эфира перманганатом необходимо продолжить. При отсутствии перекисей эфир промывают несколько раз дистиллированной водой до нейтральной реакции промывных вод на фенолфталеин. Очищенный эфир сушат безводным сернокислым натрием и перегоняют при 40°C на водяной бане с закрытым электрообогревом. Приготовленный таким образом диэтиловый эфир годен для употребления. Хранят эфир над сернокислым натрием в темной посуде с притертой пробкой или в защищенном от света месте.

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

Бензол может содержать незначительное количество тиофена (иногда около 0,05 %), для удаления которого используют серную кислоту. Присутствие тиофена обнаруживают следующим образом: берут 10 мг изатина и растворяют в 10 мл серной кислоты, затем 3 мл бензола встряхивают с этим раствором и оставляют стоять 15–20 минут. Окрашивание кислотного слоя в сине-зеленый цвет указывает на наличие тиофена. Процедура очистки бензола от тиофена сводится к следующему: бензол (2 л) наливают в колбу или делительную воронку, туда же добавляют концентрированную серную кислоту в количестве 10 % от объема бензола (200 мл), весь состав тщательно встряхивают (лучше на механической качалке) в течение 20–30 мин. Затем дают смеси отстояться и нижний кислотный слой сливают. Обработку серной кислотой продолжают до тех пор, пока смесь не будет оставаться бесцветной или слабо желтой, а проба на тиофен – отрицательной. Очищенный от тиофена бензол 2–3 раза промывают дистиллированной водой для удаления остатков кислоты, затем обрабатывают 10 %-ным раствором щелочи (KOH или NaOH), снова водой до нейтральной реакции промывных вод с фенолфталеином и сушат безводным сернокислым натрием. После фильтрования бензол помещают в круглодонную колбу и перегоняют при температуре 80°C. Перегонку производят на электрической водяной бане или плитке с закрытым электрическим обогревом. При перегонке бензола возможна его кристаллизация в трубке холодильника, если последняя оmyвается очень холодной водой (4–5°C), что может привести к разрыву колбы вследствие скопления паров. Поэтому при перегонке бензола, а также других органических растворителей не следует оставлять перегонный аппарат без присмотра. Хранят бензол в темной посуде (или темном месте) с притертой пробкой над безводным сернокислым натрием.

Для обезвоживания спирта применяют безводную сернокислую медь из расчета 100 г на 500 мл спирта. После добавления к спирту сернокислой меди колбу несколько раз встряхивают, затем нагревают на водяной бане с обратным холодильником до тех пор, пока соль не примет светло-голубой цвет. После этого, отделив соль фильтрованием, спирт отгоняют на водяной бане.

Изопропиловый спирт перегоняют над едким натрием или калием (10 г щелочи на 1 л спирта). По отношению к дистиллированной воде перегонанный изопропиловый спирт должен иметь оптическую плотность не более 0,1 при измерении с диапазоном волн 320–350 нм.

Приготовленные вышеперечисленными способами органические растворители могут быть использованы для определения жирорастворимых витаминов и каротина в биологических материалах.

Оборудование. Вытяжной шкаф, лучше с металлическим каркасом, с внутренней облицовкой керамическими плитками; бытовой холодильник или холодильная камера с оптимальным температурным режимом минус 20–25°C при условии серийности анализов и длительного хранения образцов (30 дней не более); аналитические весы; роторный испаритель типа ИР или ИР-ИМ; баллоны для инертных газов (азота, углекислого газа и др.); дьюар для жидкого азота; шаровая мельница; бани песочные и водяные многогнездовые с терморегулятором; вакуумные насосы (электрические или при их отсутствии – насос Комовского); фотоэлектроколориметр (ФЭК-56, ФЭК-М, спектрофотометр "Спекол" и др.); спектрофотометр (СФ-14, СФ-16 и др.); гомогенизаторы (размягчители ткани); штативы для пробирок; колбы разных размеров (на 1000, 500, 250, 200, 150 мл); делительные воронки (на 250, 500, 1000, 2000, 3000 мл), цилиндры (на 25, 50, 100, 250, 500 мл); воронки (диаметр 5, 7, 10 см); хроматографические колонки (диаметр 1, 2, 3 см); стеклянные пластинки с гладкой или неровной поверхностью для тонкослойной хро-

матографии; камеры (кристаллизаторы) для восходящей хроматографии; пипетки.

2. Определение витамина А

Принцип метода. Цели и задачи исследований определяют методы, которые используют при анализе витамина А в биологическом материале. В зоотехнических исследованиях для характеристики А-витаминной обеспеченности животных чаще всего необходимо контролировать общее содержание в организме веществ, обладающих А-витаминной активностью, поэтому здесь могут быть использованы различные методы. Однако использование метода прямой спектрофотометрии (довольно простого, быстрого и достаточно специфичного) возможно только для тех субстратов, которые не содержат примесей, обладающих поглощением в той же области спектра. При наличии мешающих определению веществ необходимо предварительно проводить хроматографию с целью их удаления. Прямой спектрофотометрический метод более всего применяют при контроле за содержанием витамина А в чистых препаратах. Наиболее часто при определении витамина А используют его способность к образованию окрашенных соединений при взаимодействии с некоторыми химическими веществами и в первую очередь с треххлористой сурьмой (реакция Карр-Прайса). Недостатком этого метода является то, что синяя окраска, появляющаяся при взаимодействии хлорида сурьмы с витамином А, очень быстро исчезает, что требует больших навыков экспериментатора.

Реактивы. 1. Диэтиловый эфир серный (очищенный от примесей); 2. Хлороформ (сухой, очищенный); 3. 10%-ный спиртовой раствор химически чистого едкого калия; 4. 96% этиловый спирт; 5. Обезвоженный сернистый натрий; 6. Уксусный ангидрид; 7. 23%-ный раствор треххлористой сурьмы в хлороформе; 8. Пирогаллол А (чда).

Раствор треххлористой сурьмы в хлороформе готовят следующим образом: 30 г хч или чда сурьмы помещают в колбу с притертой пробкой, заливают 100 мл хлороформа, подогревают до 35–40°C, тщательно размешивают и ставят в темное место на 15–18 часов. Затем прозрачный раствор осторожно сливают в склянку темного цвета, добавляют в нее 2 % уксусного ангидрида (от объема), плотно закрывают притертой пробкой. Раствор готов для анализа и может быть использован в течение 3–4 недель. Если сурьма долго хранилась и имеет темную или бурю окраску, то ее предварительно перед употреблением промывают небольшими количествами очищенного хлороформа до тех пор, пока хлороформ не будет изменять своего цвета, затем сурьму помещают в эксикатор над серной кислотой и высушивают в течение 2–3 суток в темном месте. После этого она готова к употреблению. При приготовлении раствора треххлористой сурьмы в хлороформе, а также при его использовании в анализах и хранении следует избегать попадания в него воды, так как вода вызывает гидролиз $SbCl_3$, раствор мутнеет и становится не пригодным для анализов.

Подготовка проб для определения витамина А в печени. При определении содержания витамина А в биологических субстратах (печень, яйцо, комбикорм и т.д.) среднюю пробу берут из одной и той же доли печени или полностью желток яйца. Тщательно измельчают или растирают в фарфоровой ступке, затем взвешивают определенное количество гомогенной массы (1–5 г). Величина навески зависит от предполагаемого содержания витамина А. Затем навеску помещают в круглодонную колбу со шлифом на 150–250 мл, добавляют пирогаллол или гидрохинон (100–150 мг), 3 мл 60 %-ного водного раствора КОН и 20 мл этилового спирта. Ставят колбу на водяную баню (омыление) при температуре 80°C на 30 минут. После омыления колбу охлаждают (можно под струей водопроводной воды для ускорения процесса). Содержание кол-

бы переносят в делительную воронку и вносят 10 мл дистиллированной воды. Колбу смывают дистиллированной водой (10 мл) и переносят в делительную воронку, затем проводят экстракцию. Эта процедура одинакова и для подготовки проб при определении витаминов Е и Д.

Экстракция витаминов. В конические колбы наливают 50 мл гексана и содержимое из делительных воронок переносят в колбу. Содержимое колбы с гексаном перемешивают круговыми движениями в течение 1 минуты, а затем все переливают (переносят) в делительные воронки и после расслоения жидкости нижнюю часть содержимого из делительной воронки сливают в коническую колбу для повторной экстракции, которую проводят гексаном трижды по 30 мл каждый раз. Объединенные экстракты гексана промывают дистиллированной водой до нейтральной реакции по фенолфталеину и сушат над безводным сернокислым натрием в течение 20 минут. После высушивания экстракт переносят на фильтр воронки и осадок промывают трижды по 15 мл гексаном, затем экстракт выпаривают досуха на роторном испарителе. Полученный осадок в зависимости от метода определения (ВЭЖХ, тонкослойная хроматография, по реакции Карр-Прайса, Эмери-Энгеля и т.д.) растворяют в определенном, свойственном для данного метода растворителе и объеме, которые при описании конкретного метода будут указаны.

Ход определения. Сухой остаток растворяют в 1 мл хлороформа. Объем разведения сухого остатка зависит от предполагаемого содержания витамина А. Если концентрация витамина А высокая, то сухой остаток растворяют в большем количестве хлороформа, или же полученный раствор разбавляют хлороформом в 2–3 раза при строгом учете окончательного объема. Для колориметрирования берут кювету с рабочим расстоянием 10 мм, переносят туда пипеткой 0,1 мл полученного хлороформного раствора витамина А, этой же пипеткой (для смыва оставшихся количеств витамина А) добавляют 0,4 мл хлороформа и 2 капли уксусного ангидрида и кювету ставят в фотоэлектроколориметр, затем добавляют 2,5 мл раствора треххлористой сурьмы и быстро колориметрируют (не позднее чем через 5–10 сек после добавления сурьмы) при длине волны 620 нм (9 светофильтр, красный)

Расчет. Из полученной экстинкции по калибровочному графику рассчитывают содержание витамина А в анализируемом образце по формуле:

$$A = (a \cdot V \cdot b) / m,$$

где А – количество витамина А, мкг/г; а – количество витамина А, найденное по калибровочному графику, соответствующее полученной экстинкции, мкг/мл; V – объем раствора в кювете, мл; b – степень разведения; m – навеска, г.

При серийных анализах загрязненные кюветы, в которых идет колориметрирование промывают водным раствором соляной кислоты (1:1), а затем дистиллированной водой и спиртом (96%) и ставят сушить или насухо вытирают ватой или марлей. Если внутренние стенки кювет влажные, то при взаимодействии воды с хлоридом сурьмы раствор в кювете мутнеет, что мешает определению витамина А.

Для построения калибровочного графика используют кристаллический витамин А-ацетат или же высокоактивные стандартные масляные препараты с точно установленным содержанием витамина А-ацетата. Берут навеску кристаллического ацетата витамина А, в которой рассчитывают содержание чистого вещества. Например, 3,44 мг ретинил-ацетата или 0,1 мл масляного раствора, содержащего 100000 ИЕ или 4340 мкг ретинил-ацетата, которые растворяют в 100 мл хлороформа в мерной колбе. Это основной раствор, из которого готовят серию стандартных рабочих растворов. Для этого берут пробирки или цилиндры с притертыми пробками, в которые вносят 0,5, 1, 2, 3, 4 мл и т.д. основно-

го раствора и доводят хлороформом до объема 10 мл. 1 мл этих растворов будет содержать ретинил-ацетата соответственно: 3,44; 6,88; 10,32; 13,76 мкг. Затем из каждой колбы наливают в кювету последовательно от 0,1 до 0,5 мл раствора, добавляют соответствующее количество хлороформа (от 0,4 до 0), 2 капли уксусного ангидрида и 2,5 мл раствора хлорида сурьмы и колориметрируют, как описано выше. Полученные величины используют для построения калибровочного графика, где на оси ординат откладывают полученную экстинкцию, а на оси абсцисс – содержание витамина А в растворе.

Определение витамина А в других биологических объектах проводят также, как было описано на примере печени. Различия могут быть только в величине навески в времени омыления. Для определения витамина А в различных тканях берут: печени – 1–3 г, висцерального жира – 5 г, кишечника – 1–2 г, яйца – 5–10 г. При определении витамина А в молоке берут среднюю пробу по общепринятому способу от всех доек или от одной дойки в количестве 20–50 мл в летний и 50–100 мл в зимний период. Омыление проводят при тех же условиях, что и для печени, только срок омыления увеличивается до 2 часов. После омыления все дальнейшие операции и расчет витамина А проводят в той же последовательности, как было описано для печени.

2.1. Определение витамина А – спирта и витамина А – эфира в плазме крови

Принцип метода. При изучении особенностей метаболизма витамина А в организме сельскохозяйственных животных нельзя ограничиться определением только тотального содержания ретинола в тканях, необходимо контролировать количество и содержание различных форм витамина А, так как их биологическая активность в организме неодинакова. Наиболее доступным методом определения витамина А-эфира в плазме крови является метод, предложенный Дмитриевским А.А. и др. (1). Метод основан на экстракции форм витамина А смесью гександиэтилового эфира в присутствии 40° этанола и выделении этих фракций методом тонкослойной хроматографии на окиси алюминия.

Реактивы. В основном используют те же реактивы, что и при описанном методе определения витамина А. Ретинол для свидетеля готовят следующим образом: берут 2 мл стандартного масляного раствора ретинил-ацетата (медицинский препарат), помещают в круглодонную колбу, в которую добавляют 3 объема (6 мл) 10 %-ного спиртового раствора щелочи (КОН) и 20 мг пирогаллола на 1 г навески. Взбалтывают и омыляют на водяной бане с воздушным холодильником в течение 30 мин при температуре 85–90°С. Далее все процедуры повторяют в той же последовательности, как было описано в методике определения витамина А в печени. Однако полученный сухой остаток после выпаривания диэтилового эфира на роторно-вакуумном испарителе растворяют в 1–5 мл гексана. Полученный раствор ретинола в гексане очищают методом тонкослойной хроматографии на незакрепленном слое окиси алюминия.

Для хроматографии используют нейтральную окись алюминия, которую предварительно прокаливают в муфельной печи в течение трех часов при температуре 600°С, затем охлаждают в эксикаторе и добавляют 8 % дистиллированной воды, тщательно все перемешивают в колбе резкими круговыми движениями. Можно использовать окись алюминия, активированную по Брокману, различной степени активности (I, II и III степени, что соответствует 0, 3 и 6 % влаги), но доводить уровень влаги до 8 %. Приготовленную таким образом окись алюминия просеивают через сито с размером частиц 0,25 мм. Полученный однородный порошок готов к употреблению. Хранят окись алюминия в темной склянке с притертой пробкой. Однородный порошок окиси алюминия наносят

ровным слоем на край пластин, затем стеклянной палочкой диаметром 0,4–0,5 см и длиной 30–35 см, на которую надеты 2 резиновых кольца шириной 1–1,5 см, в горизонтальном положении проводят 3–4 раза в одном направлении (от себя) по адсорбенту, равномерно распределяя его по пластине. Толщину слоя адсорбента на пластине определяют толщиной колец на стеклянной палочке, которая не должна превышать 0,75–0,80 мм. Удобнее работать с хроматографической пластиной, если слой адсорбента с правой и левой сторон не доходит до края на 1 см. Приготовленная таким образом пластина готова для использования.

Ход определения. В делительную воронку на 250 мл помещают 10 мл плазмы крови, добавляют 1 объем (10 мл) дистиллированной воды, 2 объема (20 мл) этилового спирта и 6 объемов (60 мл) смеси гександиэтилового эфира в соотношении 4:1. Закрывают делительную воронку пробкой и круговыми движениями смесь тщательно перемешивают. При перемешивании пробку, которой закрыта делительная воронка, следует придерживать, чтобы ее не вытолкнуло, а затем приоткрыть для удаления образовавшихся паров. После расслоения жидкостей нижний слой сливают в другую делительную воронку и экстракцию повторяют еще 3 раза. Затем полученные экстракты объединяют, промывают охлажденной дистиллированной водой, высушивают над безводным сульфатом натрия в течение 30 минут в темном месте, фильтруют через бумажный складчатый фильтр, трижды промывая (по 10, 15 и 15 мл) сернокислый натрий на фильтре смесью гексана с диэтиловым эфиром (4:1). Полученный гександиэтиловоэфирный раствор упаривают на роторно-вакуумном испарителе при температуре 30–40°C. Сухой остаток растворяют в 0,4 мл гексана и наносят на пластинку с незакрепленным тонким слоем окиси алюминия. Для этого на пластине на расстоянии 2,5–3,0 см от нижнего края намечают линию старта, которую предварительно пропитывают гексаном. Затем с левой стороны на линии старта наносят растворы "свидетелей". Отступя 2,0–2,5 см от места нанесения "свидетелей", по всей длине старта равномерно пастеровской пипеткой наносят гексановый раствор анализируемого образца (0,4 мл). Колбу, из которой берут анализируемый раствор, ополаскивают дважды по 0,5–0,7 мл гексана, который также наносят равномерно на линию старта. Предварительно, перед нанесением на линию старта образцов, хроматографическую камеру (кристаллизатор) заполняют раствором гександиэтилового эфира-этанол в соотношении 70:20:4, закрывают плотно крышкой (притертым стеклом), чтобы камера насыщалась парами растворителя. Затем, когда пластина с нанесенными анализируемыми растворами готова, осторожно, не нарушая слоя адсорбента, помещают ее в камеру для восходящей хроматографии под углом (18–20°C) так, чтобы линия старта была выше уровня растворителя и камеру плотно закрывают крышкой. Хроматографическая камера должна стоять в вытяжном шкафу в защищенном от света месте. (Можно камеру прикрыть темной тканью или бумагой). Когда растворитель не дойдет до верхней части пластины на 1,0–2,5 см, хроматографию можно считать оконченной. Пластины вынимают из камеры, левую часть, где нанесены свидетели, помещают под лампу УФ-света (ультрахимископ Брумберга) и по желто-зеленоватой люминесценции точно отмечают локализацию полосы ретинола и ретинилацетата. Затем обводят зоны, соответствующие метчикам на хроматограмме анализируемого образца. Отмеченные участки адсорбента быстро снимают и переносят с пластины в колбочки (разные) для элюции, заливают 15 мл смеси гексан-диэтилового эфира в соотношении 2:1, взбалтывают, дают отстояться и фильтруют через бумажный складчатый фильтр. Элюцию проводят 4–5 раз, используя по 10 мл раствора при каждой операции. Все порции экстракта объединяют в круглодонную колбу и выпаривают на роторно-вакуумном испарителе

до объема 6–8 мл. Затем на спектрофотометре снимают поглощение света (экстинкцию) при 300, 325, 328 и 334 нм.

Расчет. Концентрацию ретинола и ретинилпальмитата в исследуемых образцах рассчитывают по формулам:

$$A \text{ ретинол (витамин А-спирт)} = (E \cdot V \cdot 5,47) / M$$
$$A \text{ пальмитат (витамин А-эфир)} = (E \cdot V \cdot 10,256) / M,$$

где А – концентрация витамина А-ретинола или витамина А-пальмитата, мкг/мл; Е – экстинкция при 325 нм (ретинол) или 328 нм (пальмитат); V – объем экстракта перед измерением экстинкции, мл; 5,47 – коэффициент, полученный от деления количества ретинола в 1%-ном растворе (мкг/мл) на экстинкцию 1%-ного раствора (10000:1830=5,47); 10,256 – коэффициент, полученный от деления количества ретинил-пальмитата в 1 %-ном растворе (мкг/мл) на экстинкцию 1 %-ного раствора (10000:975=10,256); М – количество (объем) образца, взятого для анализа.

2.2. Определение ретинола и ретинилпальмитата в печени

Принцип метода. При разработке метода определения ретинола и ретинилпальмитата в печени за основу взят метод определения этих форм витамина в плазме крови, но в него внесли некоторые дополнения. Реактивы и оборудование те же.

Ход определения. 2–5 г печени быстро растирают с трехкратным объемом безводного сернокислого натрия пестиком в фарфоровой ступке. Полученную однородную массу переносят в эрленмейеровскую колбу и заливают 35 мл раствора гексан- диэтилового эфира в отношении 2:1. Содержимое колбы взбалтывают и надосадочный слой сливают в другую колбу. Экстракцию повторяют 6–7 раз. К объединенному экстракту добавляют 2 % от объема 5 %-ного раствора дигитонина в 72° этаноле. Колбу герметично закрывают и ставят в холодильник на 2 часа для осаждения стеролов. Образующийся при этом осадок отфильтровывают через бумажный фильтр, предварительно смоченный 72° раствором этанола. Осадок на фильтре промывают диэтиловым эфиром. Полученный фильтрат (экстракт) помещают в делительную воронку и промывают несколько раз охлажденной дистиллированной водой. Экстракт переносят в колбу с безводным сернокислым натрием и сушат в темном месте в течение 30 минут, затем экстракт фильтруют через бумажный фильтр, выпаривают на роторно-вакуумном испарителе и сухой остаток растворяют в 0,4 мл гексана. Далее хроматографию на незакрепленном тонком слое проводят в такой же последовательности, как было описано при определении форм витамина А в плазме крови. Хроматограмму проявляют в УФ или же по реакции с раствором треххлористой сурьмы в хлороформе (реакции Карр-Прайса). Для этого с левой стороны пластины, там где нанесены "свидетели", узкой полоской от старта наносят по каплям раствор треххлористой сурьмы. По появлению синего окрашивания судят о локализации ретинола и ретинилпальмитата. Ретинол расположен всегда ближе к старту, чем ретинилпальмитат.

Расчет. Концентрацию ретинола и ретинилпальмитата рассчитывают по вышеуказанным формулам.

2.3. Определение каротиноидов и каротина

Принцип метода. Основной операцией при определении каротина в биологическом материале является извлечение каротиноидов из используемого материала органическими растворителями (петролейным эфиром и др.) с последующим хроматографическим разделением β-каротина от каротиноидов и измерением их концентрации в полученном растворе (2). При определении каротина в травяной муке используют

этот же принцип с той лишь разницей, что извлекают каротин из травяной муки бензином при температуре 70–90°C.

2.3.1. Определение каротина в травяной муке

Реактивы. 1. Бензин (фракция 70–90°); 2. Окись алюминия – адсорбент, который готовят следующим образом: выдерживают в муфеле при температуре 500–600°C в течение 3 часов, затем охлаждают в эксикаторе, высыпают в заранее взвешенную химически чистую колбу и добавляют дистиллированную воду из расчета 9–10 % от массы окиси алюминия. Тщательно перемешивают и выдерживают 1–2 часа при температуре 70°C. Адсорбент приобретает слабо розовую окраску и готов к употреблению; 3. Безводный сернокислый натрий (Na_2SO_4); 4. Кристаллический β -каротин для построения калибровочного графика. Этот реактив очень редко бывает в лабораториях, поэтому часто для приготовления стандартных растворов используют азобензол или бихромат калия ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). Для этого 72,5 мг азобензола помещают в мерную колбу на 500 мл и постепенно при периодическом взбалтывании доводят спиртом (96°) до метки. Интенсивность окраски раствора соответствует содержанию в 1 мл 0,00235 мг (2,35 мкг) каротина. При использовании бихромата калия 360 мг хч реактива вносят осторожно без потерь в мерную колбу на 500 мл, растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, а затем доводят водой до метки. 1 мл приготовленного раствора соответствует 0,00416 мг (4,16 мкг) каротина. Из основного раствора готовят различные разведения и строят калибровочный график.

Ход определения. 2–10 г муки (навеску берут в зависимости от предполагаемого уровня каротина), предварительно измельченной на пируэте (если размер частиц ее больше 2 мм) переносят без потерь в круглодонную мерную колбу емкостью 50–70 мл. При отсутствии колб подобного типа можно использовать колбы Къельдаля, предварительно откалиброванные так, чтобы отметка емкости приходилась на узкую часть колбы. Затем в колбу добавляют 50 мл бензина. Плотнo закрывают резиновой пробкой, через которую пропущена трубка обратного холодильника. При отсутствии обратных холодильников можно использовать стеклянные трубки длиной 1 м и диаметром 1 см. Экстракцию каротиноидов проводят на водяной бане в течение 2 часов при температуре 80°C. Температуру воды в бане устанавливают в соответствии с температурой кипения фракции бензина. Следует иметь в виду, что при серийности анализов уровень бензина в колбах после экстракции должен быть одинаков и соответствовать первоначальному. Это достигается путем выдержки колбы с раствором в течение 30–40 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте или же (для ускорения процесса) охлаждения колбы погружением в воду комнатной температуры (20°C). Однако если после охлаждения в некоторых колбах уровень бензина будет ниже первоначального (ниже метки), то необходимо недостающее количество бензина добавить (довести до метки). Все тщательно взбалтывают и оставляют на 5–10 минут для отстаивания. В это время или заранее готовят абсорбционную колонку. Узкую часть стеклянной трубки, длиной 15–20 см и диаметром 1,0–1,5 см, плотно заполняют ватой, насыпают адсорбент (высота окиси алюминия 8 см), затем безводный сернокислый натрий (высота 0,5 см). Колонку вставляют в приемник экстрактора, который соединяют с водоструйным насосом через колбу Бунзена. Включают водоструйный насос, при этом слой адсорбента уплотняется. На подготовленной таким образом колонке каротин отделяется от сопутствующих веществ и равномерно распределяется в нижней части ее. Перед нанесением экстракта на колонку адсорбент смачивают бензином (5–7 мл). По мере прохождения бензина в колонку вносят пипеткой 10 мл экстракта (1/5 часть объема). Когда

уровень экстракта над поверхностью окиси алюминия останется 0,5 см, осторожно, чтобы не попал воздух в адсорбент, по краю колонки вносят 5 мл бензина. Эту операцию повторяют до тех пор, пока алюминий ниже адсорбированного окрашенного вещества не станет белым, а элюат – бесцветным. Раствор каротина собирают в мерный цилиндр, измеряют объем и колориметрируют на спектрофотометре при длине волны 452 нм (если калибровочный график построен по кристаллическому β-каротину), или на ФЭК-56 при светофильтре 4 (синий) и длине волны 450 нм.

Расчет. Содержание каротина рассчитывают общепринятым способом по формуле:

$$K = (A \cdot V \cdot C) / M$$

где K – содержание каротина, мкг в 1 г травяной муки; A – количество каротина, определенное по калибровочной кривой в 1 мл раствора, соответствующее показателям экстинкции на ФЭК, мкг; V – объем элюата после хроматографии на колонке, мл; C – поправка на объем раствора после экстракции (в нашем примере 5, так как общий объем экстракта 50 мл, а брали для анализа 10 мл); M – навеска травяной муки, г.

Например: навеска травяной муки 2 г, количество экстракта 50 мл, взяли для хроматографии 10 мл (1/5 часть), после хроматографии на колонке получили 25 мл элюата, экстинкция которого равна 0,388, что соответствует по калибровочной кривой 2,89 мкг каротина в 1 мл раствора. Общее содержание каротина будет равно:

$$K = (2,89 \times 25 \times 5) / 2 = 180,62 \text{ мкг.}$$

Этим же методом можно определить содержание каротина в сене. При этом следует иметь в виду, что если сено сырое (свыше 20 % влаги), то его перед анализом необходимо подсушить в эксикаторе в течение 6–10 часов и измельчить.

2.3.2. Определение каротина в содержимом рубца и зеленых кормах

При определении каротина в кормах и субстратах с высоким содержанием влаги используют те же свойства каротина – его способность растворяться в органических растворителях, однако предварительно их обезвоживают с помощью безводного сернокислого натрия.

Ход определения. 10–20 г содержимого рубца тщательно растирают в фарфоровой ступке с безводным сернокислым натрием до однородной сухой массы (на каждый грамм содержимого рубца требуется около 5–6 г сернокислого натрия). Хорошо растертую обезвоженную массу переносят в делительную воронку на 250 мл, узкая часть которой заполнена гигроскопической ватой. Ступку обмывают бензином, который выливают в воронку. Необходимо, чтобы слой бензина (петролейного эфира, гексана) в воронке находился над смесью (1–2 см). Постепенно, по мере экстракции каротина, растворитель доливают. Экстракт собирают в колбу Бунзена. Об окончании извлечения каротина судят по цвету стекающих капель растворителя, которые собирают в отдельную чистую пробирку. Отсутствие желтой окраски бензина указывает на конец экстракции. При медленной экстракции можно присоединить водоструйный насос к колбе Бунзена и создать небольшой вакуум. После окончания извлечения каротина из субстрата объем экстракта измеряют и определенную часть (10 мл), как было указано ранее, пропускают через хроматографическую колонку и колориметрируют. Однако при большом объеме экстракта и слабом его окрашивании необходимо экстракт упарить до нужного объема (8–10 мл) в роторном испарителе или под током азота. Полученный концентрированный экстракт переносят полностью на хроматографическую колонку. Колбу дважды обмывают бензином (петролейным эфиром или другим растворителем), который также пере-

носят на колонку. Процедура хроматографического разделения каротина от других каротиноидов (ксантофиллов, ликопина и др.) такая же, как было описано ранее. Элюат измеряют и колориметрируют на ФЭКе при длине волны 450 нм (синий светофильтр №4).

Расчет. Содержание каротина определяют по формуле:

$$K = A \cdot V/M$$

(Обозначения см. в разделе 2.3.1).

2.3.3. Определение каротина в зеленых растениях и в силосе

Особенностью определения каротина в зеленых растениях и силосе является то, что перед обезвоживанием сернокислым натрием навеску (5–10 г) травы или силоса тщательно растирают в ступке с битым стеклом до однородной массы. При большом количестве анализов и для лучшего обезвоживания образцы травы или силоса можно поместить в холодильную камеру при температуре -20°C . В замороженном состоянии они лучше измельчаются, чем в нативном. Извлечение каротина из анализируемого материала можно проводить петролевым эфиром (фракция $40-70^{\circ}$) или другими растворителями, но только предварительно очищенными. Следует всегда иметь в виду, что все органические растворители, которые используются в анализах при определении каротина и жирорастворимых витаминов, должны быть очищены, как указывалось ранее. Однако не рекомендуется менять растворитель в процессе серийных анализов, так как при экстракции разными растворителями не всегда получаются тождественные результаты.

В связи с тем, что в содержимом рубца, силосе и других зеленых кормах количество влаги может быть различно, для получения сравнительных данных лучше пересчет каротина вести на сухое вещество, для чего необходимо определить в образцах содержание влаги общепринятыми методами.

2.3.4. Определение каротиноидов и каротина в яйце

Берут желток (можно круто сваренного яйца), взвешивают и растирают пестиком в фарфоровой ступке с безводным сернокислым натрием до однородной сухой (рассыпчатой) массы, которую аккуратно переносят в колбу с притертой пробкой. В эту же колбу наливают петролевым эфиром (или другим растворителем), предварительно обмыв им ступку. Растворитель добавляют в таком количестве, чтобы он покрывал массу желтка на 2–3 см. Колбу плотно закрывают, круговыми движениями содержимое колбы тщательно перемешивают и ставят в защищенное от света место на 3 часа. В этот период желательно содержимое колбы взболтать 2–3 раза для лучшей экстракции. Затем полученный экстракт фильтруют через обычный фильтр в мерный цилиндр, а в колбу с образцом добавляют очередную порцию растворителя (30 мл), тщательно взбалтывают и после отстаивания фильтруют в тот же цилиндр. Эту процедуру повторяют до тех пор, пока растворитель не будет бесцветным. Чаще всего достаточно 3-кратной экстракции (30, 25 и 20 мл). Объем экстракта измеряют, колориметрируют на ФЭКе при 450 нм, как было указано ранее. Величину содержания каротиноидов рассчитывают по формуле:

$$K = A \cdot V/M$$

Для определения каротина берут 10 мл экстракта и пропускают через адсорбционную колонку. В дальнейшем все процедуры повторяют в той же последовательности, как и при определении каротина в травяной муке. При большом объеме экстракта и малом содержании каротина в яйце (большое разведение) необходимо концентрацию каротина в растворе увеличить путем упаривания всего объема экстракта на роторном

испарителе или в колбе на водяной бане под током азота до нужных количеств (8–10 мл). Затем полученный концентрированный экстракт переносят на колонку и ведут определение так же, как при анализе рубцового содержимого. Расчет каротина ведут по указанной выше формуле.

2.4. Определение витамина А и каротина в биологических объектах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)

Принцип метода. Как указывалось ранее, за последние годы широкое распространение при анализе жирорастворимых витаминов получил метод высокоэффективной жидкостной хроматографии. Хроматография – метод разделения компонентов смесей, основанный на различии и равновесном распределении их между двумя несмешивающимися фазами, одна из которых неподвижна, а другая подвижна. За счет различия в сродстве компонентов смеси к неподвижной и подвижной фазам достигается основная цель хроматографического анализа – разделение смеси на отдельные полосы (пики) компонентов по мере их продвижения по колонке с подвижной фазой. Жидкостная хроматография является хорошо разработанным аналитическим методом, не уступающим по точности количественной газовой хроматографии и значительно превышающим точность тонкослойной хроматографии и электрофореза. Преимущество разделения жирорастворимых витаминов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии состоит в том, что исключается возможность их окисления и изомеризации, так как анализ проходит при комнатной температуре без доступа кислорода и света. Элюентами для нормальной фазной хроматографии служат гексан или петролейный эфир с добавлением небольшого количества более полярного растворителя. Количественный анализ состоит из следующих этапов: хроматографическое разделение; измерение площадей или высот пиков; расчет количественного состава смеси на основании хроматографических данных.

Подготовка растворителя для ВЭЖХ. Способ подготовки растворителя для ВЭЖХ зависит от того, какого качества растворитель имеется в наличии. Если используют растворители высокой чистоты, например, перегнанные в стеклянной аппаратуре, очищенные для ВЭЖХ и профильтрованные через фильтр с порами диаметром 0,5 мкм, их подготовка проста: готовят смесь растворителей нужного состава, как правило, смешивают по объему и дегазируют ее тем или иным способом. Если используют растворитель более низкого качества, в особенности технический, его подвергают нескольким дополнительным стадиям очистки: перегонке или ректификации в стеклянной аппаратуре, часто с предварительной химической обработкой, сушкой и с обязательным фильтрованием перед дегазацией через фильтр с порами 0,2–0,5 мкм. Методы очистки некоторых растворителей приведены в разделе 1.

Дегазация растворителя. Выделившиеся из недегазированной подвижной фазы пузырьки воздуха приводят к нестабильности нулевой линии детектора и могут вызвать окисление лабильных соединений и некоторых привитых фаз. Дегазацию проводят одним из следующих способов: продувкой гелием, воздействием вакуумом или ультразвуком. Продувка гелием (можно азотом особой чистоты) основана на низкой растворимости этого газа в жидкостях. При барботаже (5–7 минут) через слой растворителя он захватывает и уносит из системы растворенный воздух. Для дегазации ультразвуком достаточно поместить сосуд с растворителем на 5–10 минут в ультразвуковую ванну, заполненную водой. Процесс протекает эффективнее, если сосуд подключить к источнику умеренного вакуума. Распространенным методом является дегазация растворителей под вакуумом. Сосуд с растворителем помещают на маг-

нитную мешалку, закрывают его пробкой с отводом, который подсоединяют к источнику умеренного вакуума и дегазируют в течение 5–10 минут. Если для создания вакуума используют водоструйный насос, то между ним и сосудом с растворителем ставят предохранительную склянку и трубку с осушителем.

Хранение и регенерация колонок для ВЭЖХ. Колонка для высокоэффективной жидкостной хроматографии является сердцем прибора и требует бережного отношения. Ошибка оператора прежде всего сказывается на колонке: она может полностью или частично потерять свои качества в результате превышения давления, ввода образца с примесями, удара и т.д. Колонка должна храниться в коробке, имеющей мягкие вкладки, и быть защищена от ударов, вибрации и нагрева. Концы колонки герметично закрывают заглушками различного типа, предотвращающими высыхание сорбента. Колонка маркируется с указанием ее размеров, сорбента и его размеров, направления потока растворителя. К ней должна быть приложена тест-хроматограмма с результатами испытания на эффективность. Перед началом эксплуатации новой колонки следует промыть ее элюентом в течение 1–2 часов, при этом всегда использовать полностью смешивающиеся растворители, например, изопропанол. При длительном хранении колонку заполняют растворителем для хранения (для обращенно-фазных сорбентов – метанолом, для силикагеля – гексаном, для ионообменников – метанолом). Промытую колонку герметично закрывают заглушками и помещают в коробку для хранения, сделав запись в паспорте о сроке работы и растворителе для хранения.

Под регенерацией колонок понимают восстановление первоначальных разделительных и эксплуатационных характеристик колонки, потерянных в процессе проведения анализов. На необходимость регенерации колонки ВЭЖХ указывает возникновение следующих признаков: заметное увеличение рабочего давления при том же потоке, ухудшение разделения близко расположенных пиков, появление хвостов пиков, увеличение времени удерживания, изменения и порядка выхода компонентов. Данные признаки могут проявляться и при загрязнении входного фильтра колонки.

Для регенерации силикагелевых колонок рекомендуется использовать ряд растворителей: тетрагидрофуран, метанол, метилхлорид, гексан. Ряд растворителей для обращенно-фазных колонок и нитрильных фаз – вода, диметилсульфоксид, метанол, хлороформ. Для аминофаз и сильных аминообменников: вода, метанол, хлороформ (если амино-фазу используют в водных системах растворителей). Ряд для аминофаз (неполярные растворители): хлороформ, метанол, вода.

После проведения 50–60 анализов биологических субстратов или при возникновении указанных выше отклонений колонки длиной 64–120 мм и внутренним диаметром 2 мм регенерируют в следующей последовательности:

А. Колонки, заполненные силикагелем. Промыть колонку 6 мл метанола при скорости его подачи 50–200 мкл/мин; затем промыть 3 мл смеси изопропанола с гексаном (1+1) при скорости его подачи 50–100 мкл/мин; промыть гексаном в течение 1 часа при скорости подачи 100 мкл/мин; уравновесить колонку элюентом (гексан:изопропанол, 98:2) в течение 2 часов при скорости его подачи 100–200 мкл/мин.

Б. Колонки с обращенно-фазным сорбентом. Промыть колонку 10 мл смеси метанол:хлороформ (2:1) при скорости его подачи 50–100 мкл/мин; затем промыть в течение 2 часов метанолом 100 % при скорости подачи 50–100 мкл/мин; уравновесить колонку элюентом (метанол: вода, 98:2) в течение часа при скорости его подачи 50–100 мкл/мин.

В обоих случаях проводят контроль давления на датчике насоса.

2.5. Определение витамина А в премиксах, комбикормах и биологических объектах (ткани, плазма крови, яйца, молоко и др.)

Диапазон концентраций:

- премиксы – витамин А 20–15000 МЕ/г

- комбикорма – витамин А более 2,0 МЕ/г

- биологические объекты – витамин А 0,1–600 мкг/г.

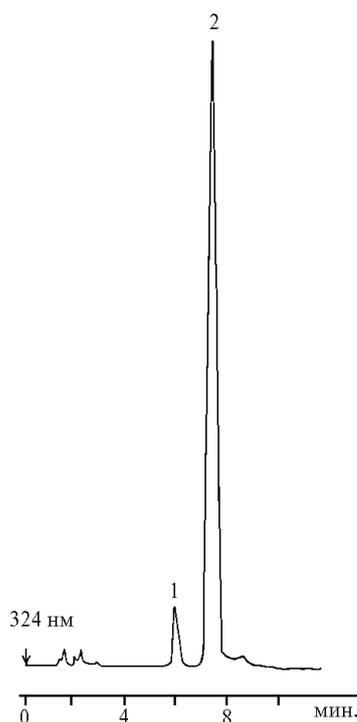
Принцип метода. Принцип состоит в омылении образцов щелочью, экстракции витамина А серным эфиром или гексаном, проведении микроколоночной ВЭЖХ (путем разделения на колонке с прямой фазой) и определения с помощью УФ детектора при длине волны 324 нм. Расчет содержания витамина А проводят с учетом двух форм (цис и транс) ретинола.

Реактивы. 1. Гидроокись калия (КОН), водный 50 %-ный раствор: растворить 500 г в дистиллированной воде и довести объем до 1 литра; 2. Пирогаллол А (или гидрохинон); 3. Натрий сернокислый безводный; 4. Гексан; 5. Серный эфир, свободный от перекисей; 6. Пропанол-2 (изопропиловый спирт); 7. Этанол; 8. Бутилокситолуол; 9. Раствор фенолфталеина: растворить 2 г фенолфталеина в 100 мл этилового спирта; 10. Элюент для микроколоночной ВЭЖХ: гексан: пропанол-2 (98:2), добавить 2 мл пропанола-2 в гексан и довести гексаном до 100 мл; 11. Стандарт витамина А. Готовят следующим образом: в колбу со шлифом объемом 250 мл помещают около 4000 МЕ ретинилацетата в масле (фармакопейный препарат), добавляют 200 мг пирогаллола или гидрохинона, 30 мл этилового спирта и 5 мл 50 % водного раствора КОН. Затем омыляют с обратным холодильником в водяной бане при температуре 85°C в течение 30 минут, охлаждают до комнатной температуры, добавляют 15 мл дистиллированной воды. Переносят содержимое колбы в делительную воронку объемом 250 мл, промывают колбу 20 мл этилового спирта, который тоже переносят в делительную воронку. Экстрагируют ретинол 3 раза по 30 мл смесью серного эфира и гексана в соотношении 1:1. Промывают объединенный экстракт дистиллированной водой до нейтральной реакции вод по фенолфталеину. Затем переносят экстракт в колбу на 150–250 мл, на дно которой помещено 5 г безводного сернокислого натрия. Закрывают колбу пробкой и ставят на 40 минут в холодильник. После этого переносят содержимое колбы в мерную колбу на 250 мл через бумажный фильтр, во избежание потерь промывают осушитель и фильтр 20 мл гексана и доводят до метки гексаном, добавляют 50 мг бутилокситолуола. Концентрация ретинола в данном растворе равна 160 МЕ/мл, что необходимо проверить на спектрофотометре.

В условиях холодильника стандартный раствор стабилен в течение 1 месяца.

Типичная хроматограмма стандартного раствора ретинола представлена на рис. 1.

Оборудование. Комплект для микроколоночной ВЭЖХ "Милихром" со сканирующим УФ детектором; колонка длиной 64, 80 или 120 мм с внутренним диаметром 2 мм, заполненная Силасорбом-600, 5 мкм; во-



дяная баня; роторно-вакуумный испаритель; лабораторный измельчитель; колбы круглодонные со шлифом на 250 мл; делительные воронки на 250 и 500 мл; обратные холодильники; мерная посуда.

Рис. 1. ТИПИЧНАЯ ХРОМАТОГРАММА СТАНДАРТНОГО РАСТВОРА РЕТИНОЛА, ПОЛУЧЕННОГО ГИДРОЛИЗОМ РЕТИНИЛ-АЦЕТАТА ЩЕЛОЧЬЮ.
1 – 13-ЦИС-РЕТИНОЛ;
2 – ПОЛНЫЙ ТРАНС-РЕТИНОЛ.

Подготовка образцов и их омыление для определения витамина А и других жирорастворимых витаминов представлены в разделе 2.

После выпаривания досуха органического растворителя, остаток растворяют в 10 мл гексана и вводят в колонку (20–50 мкл) хроматографа, соблюдая следующие условия хроматографии: при плохом расщеплении и образовании эмульсии при экстракции добавить 10–15 мл этилового спирта; количество стандартного раствора, вводимого на колонку, должно быть равно (в мкл) объему введенной пробы.

Условия микроколоночной ВЭЖХ. Колонка: длиной 64, 80, 120 мм и внутренним диаметром 2 мм, заполненная Силасорбом-600, 5 мкм; элюент: гексан:пропанол-2 (98:2); поток: 100 и 150 мкл/мин для колонок длиной 64 и 80 мм, 200 мкл/мин для колонок в 200 мм; детекция: УФ, длина волны 324 нм; скорость движения ленты самописца 300 мм/ч; чувствительность: 0,2–10 е.с.п.; температура: комнатная; время анализа: 10 – 10–12 минут.

Типичная хроматограмма при анализе витамина А из экстракта премикса (А) комбикорма (В) и печени цыплят (В) представлена на рис. 2.

Расчет. При проведении расчетов в стандартном растворе и образцах учитывается сумма высот или площадей двух пиков: полностью транс-ретинола и 13-цис-ретинола. Концентрацию витамина А в образцах рассчитывают по формуле:

$$A_{ME} = H_{П} \cdot C \cdot E / H_{С} \cdot M,$$

где A_{ME} – содержание витамина А в образце, МЕ/г; $H_{П}$ – высота (площадь) пика ретинола (транс+цис) в пробе, мм; $H_{С}$ – высота (площадь) пика ретинола (транс+цис) в стандартном растворе, мм; E – фактор разведения (равен 10); C – концентрация ретинола в стандартном растворе, МЕ/мл; M – масса образца, г.

2.6. Серийное определение витамина А (ретинилацетата) в премиксах

Принцип метода. Принцип состоит в экстракции ретинилацетата, добавленного в премикс в форме препарата Микровита А, полярным растворителем изопропанол-2:вода с последующим анализом экстракта с помощью микроколоночной обращенно-фазной ВЭЖХ с УФ детекцией при 324 нм. Диапазон концентраций витамина А – 20–15000 МЕ/г.

Реактивы. 1. Пропанол-2 (изопропиловый спирт); 2. Спирт метиловый (метанол); 3. Ретинил-ацетат в масле, 3,44 %-ный раствор с активностью 100000 МЕ/мл по фармакопее; 4. Элюент для микроколоночной ВЭЖХ: метанол:вода (98:2) (добавить 2 мл дистиллированной воды в метанол и довести в мерной колбе до 100 мл метиловым спиртом); 5. Растворитель для экстракции: пропанол-2:вода (95:5) (добавить 50 мл дистиллированной воды в мерную колбу на 1 литр и довести до метки пропанолом-2); 6. Стандартный раствор ретинил-ацетата: 1000 МЕ/мл, фармакопейный препарат (3,44 %-ный раствор) в изопропиловом спирте; 7. Рабочий стандартный раствор: 5–600 МЕ/мл в изопропиловом

спирте (концентрация проверяется спектрофотометрически). Стабилен в течение 1 месяца в условиях холодильника (4°C).

Оборудование. Комплект для микроколоночной хроматографии "Милихром" со сканирующим УФ детектором (190–360 нм); колонка размером 2x64 мм или 2x80 мм, заполненная Силасорбом С18 или Сепароном С18 размером частиц 5–6 мкм; весы лабораторные (например, ВРЛ-200); спектрофотометр, например, СФ-46; ультразвуковая баня ИМ-1, NITRA (Польша); водяная баня, обеспечивающая регулирование температуры 40–90°C; насос водоструйный; колбы конические со шлифом объемом 25–50 мл; колбы и цилиндры мерные; воронки ВФО-40 – пор 16 ХС; пипетки.

Ход определения. На аналитических весах взвешивают навеску и помещают в коническую колбу со шлифом емкостью 25–50 мл, куда добавляют растворитель для экстракции в соответствии с данными таблицы:

Таблица

Объем растворителя для экстракции витамина А из премикса

Содержание витамина А, МЕ/г	Навеска образца, г	Объем растворителя для экстракции, мл
20–100	10	20
100–2000	3	15
2000–15000	2	10
более 15000	0,2–0,5	10

Присоединяют колбу к обратному холодильнику и нагревают в течение 15 минут на водяной бане при температуре 65°C, периодически смешивая содержимое. Затем помещают на 5 минут в ультразвуковую баню и охлаждают до комнатной температуры. Смесь фильтруют через бумажный фильтр ПОР-16 с использованием водоструйного насоса. Фильтрат собирают в мерную колбу на 25 мл, колбу и фильтр промывают дважды растворителем для экстракции (во избежание потерь) и доводят им до метки. Вводят 3–5 мкл в колонку ВЭЖХ и проводят анализ на хроматографе "Милихром" или его последующих модификациях. Режим хроматографии: колонка 64x2 мм или 80x2 мм, заполненная Силасорбом С18 или Сепароном С18, 5–6 мкм; элюент метанол:вода (98:2); скорость потока элюента 100–150 мкл/мин; скорость движения ленты самописца 300–600 мм/ч; чувствительность 0,4–10,0 е.о.п.; температура комнатная; время анализа 5 минут. После проведения 50–60 анализов колонку регенерируют, промывая ее метанолом 100 % при скорости его подачи 100 мкл/мин в течение 1 часа.

Расчет. Содержание витамина А (ретинил-ацетата) в премиксе определяют по формуле:

$$X \text{ (МЕ/г)} = (H_p \cdot C \cdot E) / H_c \cdot M,$$

где H_p – высота (площадь) пика ретинил-ацетата в пробе, мм; H_c – высота (площадь) пика ретинил-ацетата в стандартном растворе, мм, C – концентрация ретинил-ацетата в стандартном растворе, МЕ/мл; E – разведение (25); M – навеска премикса, г.

2.7. Определение витамина А в молоке и молозиве

Принцип метода. Метод основан на осаждении белков спиртом, экстракции липидов гексаном с последующим определением в них витамина А с помощью адсорбционной микроколоночной ВЭЖХ.

Диапазон концентраций 0,1–20 мкг/мл.

Реактивы. 1. Серный эфир (очистка, сушка); 2. Водный гексан, готовится смешиванием дистиллированной воды (200 мл) с 4,5 л гексана

с настаиванием в течение суток; 3. 1 %-ный раствор бутилокситолуола в этиловом спирте; 4. Гексан; 5. Элюент для ВЭЖХ: 49 частей водного гексана, 49 частей гексана и 2 части серного эфира (смесь); 6. Стандартные растворы ретинил-пальмитата в гексане с концентрацией от 0,1 до 20 мкг/мл.

Оборудование. Микроколоночный жидкостной хроматограф "Мили-хром" со сканирующим УФ детектором; колонка (120x2 мм), заполненная Силасорбом 600, 5 мкм; центрифуга, встряхиватель лабораторный; пробирки или флаконы с пробками (объем 20 мл).

Ход определения. Молоко или молозиво тщательно перемешивают и доводят до комнатной температуры. Берут 2 мл молока или молозива и помещают во флакон или пробирку с плотно закрывающейся крышкой, смешивают с 5 мл 1 %-ного раствора бутилокситолуола в этиловом спирте и оставляют на 5 минут. Затем приливают 5 мл гексана и проводят экстракцию на встряхивателе в течение 30 сек. Ставят отстаиваться на 2 мин. Повторяют эту процедуру еще два раза. Добавляют во флакон или пробирку 3 мл дистиллированной воды и переворачивают несколько раз. Проводят центрифугирование образцов при 2000 об/мин в течение 5 минут.

Для анализа на хроматографе необходимо использовать верхний гексановый слой в количестве 50 мкл, полученный после центрифугирования при следующих условиях хроматографии: колонка (120x2 мм), Силасорб 600, 5 мкм; элюент: водный гексан:гексан:серный эфир (49:49:2); скорость потока 200 мкл/мин; детекция УФ, 326 нм; скорость движения ленты самописца 300–700 мм/ч; температура комнатная; время анализа 4 мин. После проведения 20 анализов необходимо регенерировать колонку элюентом очистки следующего состава: гексан:серный эфир (75:25) в течение 20–30 минут при скорости его подачи 200 мкл/мин.

На рис. 3 показана типичная хроматограмма при анализе ретинил-пальмитата из молока (А) и молозива (Б). Перед ретинил-пальмитатом элюируется еще один маленький пик, вероятно, 13-цис-ретинол. Чистоту веществ в хроматографических пиках можно подтвердить сравнением времени удерживания стандарта (ретинил-пальмитата), а также путем получения ультрафиолетовых спектров поглощения разделившихся веществ, что позволяет конструкция прибора.

Расчет. Для количественного расчета проводят хроматографический анализ калибровочных растворов ретинил-пальмитата. После анализа данных строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс высоту или площадь пиков, а по оси ординат соответствующую концентрацию. Затем вычисляют калибровочный коэффициент, получаемый в виде отношения высоты (площади) пика к его концентрации, что является тангенсом угла наклона калибровочного графика.

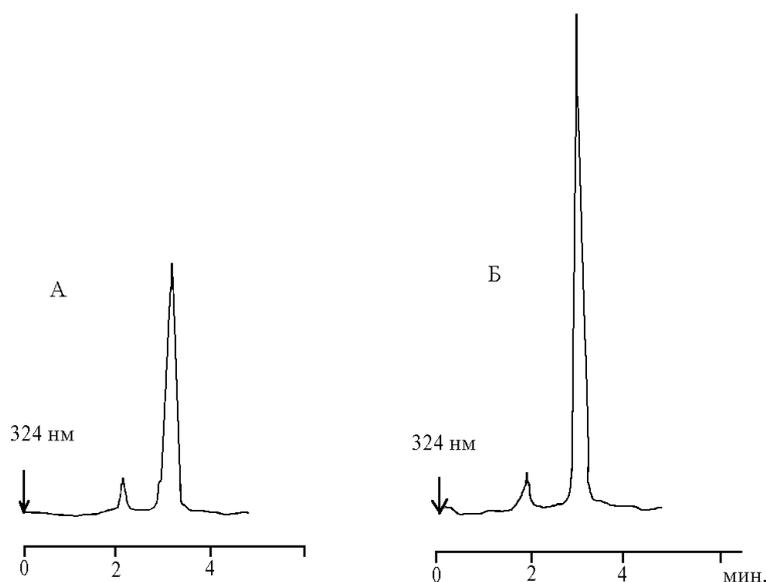


РИС. 3. ХРОМАТОГРАММА РЕТИНИЛ-ПАЛЬМИТАТА ИЗ ЭКСТРАКТА МОЛОКА (А) И МОЛОЗИВА (Б) КОРОВ

Концентрацию витамина А в молоке или молозиве можно определить по калибровочной кривой или по формуле:

$$X \text{ (мкг/мл)} = H \cdot K,$$

где H – высота или площадь пика искомого компонента, мм;
K – калибровочный коэффициент.

Полученные результаты по калибровочной кривой или по формуле необходимо умножить на 2,5 (учет объема гексана для экстракции и величины пробы).

2.8. Определение каротиноидов и их структурных изомеров в биологических объектах.

Принцип метода. Принцип состоит в выделении фракции липидов, содержащих каротиноиды, путем проведения щелочного гидролиза или прямой экстракции из плазмы крови после осаждения белков. Количественное определение и разделение α - и β -каротина проводят методом аналитической ВЭЖХ с детектированием в видовой области УФ спектра.

Диапазон концентрация 0,02–50,0 мкг/мл.

Реактивы. 1. Серный эфир (очистка, сушка); 2. Гексан; 3. Метанол; 4. Ацетонитрил; 5. Этиловый спирт; 6. Хлороформ (очистка); 7. 10 %-ный раствор КОН в этиловом спирте; 8. Аскорбиновая кислота; 9. Альбумин сыворотки крови крупного рогатого скота; 10. Кристаллический α - и β -каротин (производство фирмы Hoffmann – La Roche, Швейцария); 11. Стандартные растворы: а) растворы α - и β - каротина для их раздельного определения, готовят в хлороформе с концентрацией от 0,1 до 50 мкг/мл; б) β -каротин для определения общего каротина, растворенный в изопропиловом спирте; рабочие стандартные растворы β -каротина (от 0,1 до 50 мкг/мл) готовят на основе использования гексана. Концентрацию всех стандартных растворов определяют спектрофотометрически (E 1 %/см), β -каротин – 2396 при 465 нм в хлороформе, а α -каротин – 2800 при 448 нм в гексане; 12. Элюенты для ВЭЖХ: а) элюент для нормально- фазной ВЭЖХ – 5 частей гексана + 1 часть серного эфира; б) элюент для обращенно-фазной ВЭЖХ – 47 частей метанола + 47 частей ацетонитрила + 6 частей хлороформа.

Оборудование. Комплект для жидкостной хроматографии "Ликвохром 2010" (Венгрия) с УФ детектором на видимую область; колонка А: размер 250x4 мм, заполненная Силасорбом 600, 5 мкм (для определения каротиноидов); колонка Б: размер 250x3 мм, Силасорб С18, 6 мкм (для определения α - и β -каротина); водяная баня; встряхиватель; центрифуга; роторно-вакуумный испаритель; баллон азота с редуктором; спектрофотометр СФ-46; круглодонные колбы со шлифом на 250 мл; делительная воронка объемом 500 мл; мерная посуда.

Ход определения суммы каротиноидов в плазме крови. В полиэтиленовую пробирку с пробкой объемом 4–5 мл вносят 0,5 мл плазмы (сыворотки) крови, добавляют 0,5 мл этилового спирта с аскорбиновой кислотой (1 г/л), тщательно перемешивают, что обеспечивает эффективное выпадение белков, затем приливают 1 мл элюента (гексан:серный эфир – 5:1), встряхивают в течение 5 минут (на вихревом встряхивателе – 30 с). Впоследствии центрифугируют 5 минут при 3000 об/мин и температуре 4°C. Верхний слой, состоящий из смеси гексана с серным эфиром (20–50 мкл), используют для анализа на жидкостном хроматографе, колонка А, Силасорб 600 (прямая фаза).

Ход определения α - и β -каротина в плазме крови. В полиэтиленовую пробирку (объем 2–3 мл) с пробкой помещают 0,25 мл плазмы (сыворотки) крови, добавляют 0,25 мл метанола и смешивают на вихревом встряхивателе в течение 15 с. Каротиноиды экстрагируют 0,5 мл хлороформа (путем смешивания на вихревом встряхивателе 60 с) и центрифугируют в течение 10 минут при 5000 об/мин и температуре 4°C. Нижний слой, состоящий из хлороформа (20–50 мкл), инжектируют в колонку Б, Силасорб С18.

Ход определения каротиноидов в тканях. Взвешивают 3–5 г тщательно измельченной ткани или биологического субстрата (яйцо, молоко и др.) и помещают эту навеску в круглодонную колбу (объем 250 мл), добавляют 3 объема (по отношению к навеске) 10 %-ного спиртового раствора КОН, пирогаллол (20 мг/г навески), перемешивают и омыляют (как описано ранее) на водяной бане с обратным холодильником при температуре 80°C в течение 30 минут, периодически перемешивая содержимое колбы и подавая через холодильник небольшую струю азота. После омыления колбу охлаждают до комнатной температуры, добавляют 15 мл дистиллированной воды и количественно переносят в делительную воронку объемом 250 мл, затем колбу ополаскивают 10 мл этанола, который сливают в ту же делительную воронку. Омыленный раствор трижды (50, 40 и 40) экстрагируют серным эфиром. Объединенный эфирный экстракт промывают от щелочи дистиллированной водой до нейтральной реакции промывных вод по фенолфталеину. Затем переносят эфирный экстракт в колбу с притертой пробкой, на дно которой помещен безводный сернокислый натрий и ставят на 30 минут в защищенное от света место (в холодильник). Высушенный эфирный экстракт отфильтровывают, колбу и оставшийся на фильтре сернокислый натрий промывают серным эфиром 2 раза по 15 мл. Полученный экстракт выпаривают полностью на роторно-вакуумном испарителе при слабом токе азота и температуре не менее 40°C. Сухой остаток растворяют для определения α - и β -каротина в 5 мл хлороформа, а для анализа общих каротиноидов в 5 мл смеси гексан:серный эфир (5:1) и 50 мкл используют для хроматографического анализа.

Условия аналитической ВЭЖХ для определения каротина. Для проведения этого анализа необходимо использовать экстракт плазмы (сыворотки) крови или неомыляемую часть липидов тканей, растворенную в смеси гексана и серного эфира (5:1).

Условия хроматографии: колонка: размер 250x4 мм, заполненная Силасорбом 600, 5 мкм; элюент: гексан:серный эфир (5:1); скорость потока: 1,5 мл/мин; детекция: УФ, длина волны 436 нм; скорость движе-

ния ленты самописца: 300–600 мм/ч; чувствительность: 0,02–2,0 е.о.п.; температура: комнатная; время анализа: 5 минут.

На рис. 4 показан пример хроматограммы при определении каротина в плазме крови коров.

Условия аналитической ВЭЖХ для определения α - и β -каротина. В анализе необходимо использовать экстракт плазмы (сыворотки) крови, неомыляемую часть липидов тканей или других субстратов, растворенную в хлороформе.

Условия хроматографии. Колонка: размер 250x3 мм, заполненная Силасорбом С18, 6 мкм; элюент: метанол: ацетонитрил: хлороформ (47:47:6); скорость потока: 1,2 мл/мин; детекция: УФ, 436 нм; скорость движения ленты самописца: 300–600 мм/ч; чувствительность: 0,02–2,0 е.о.п.; температура: комнатная; время анализа: 15 минут.

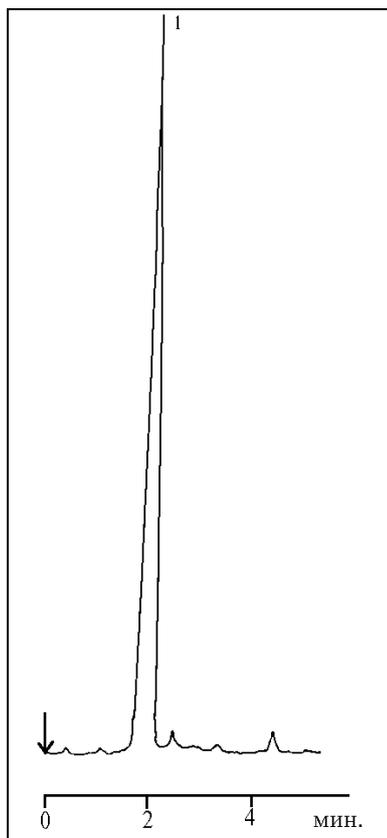


Рис. 4. ХРОМАТОГРАММА ОБЩЕГО
КАРОТИНА В ЛИПИДНОМ ЭКСТРАКТЕ ПЛАЗМЫ
КРОВИ КОРОВ. 1 – ОБЩИЙ КАРОТИН.

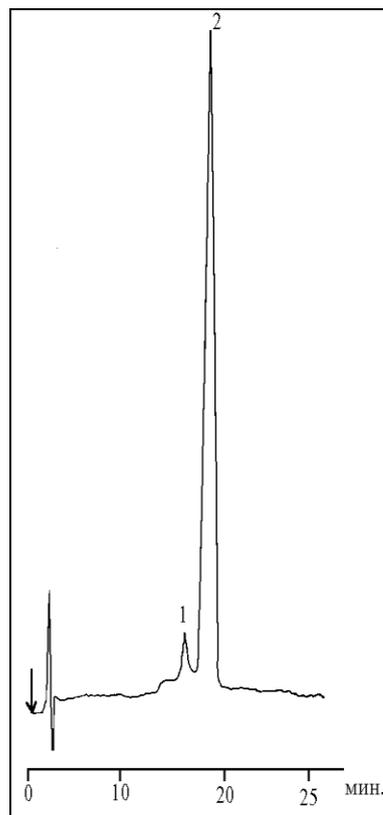


Рис. 5 ХРОМАТОГРАММА КАРОТИНОИДОВ В
ЭКСТРАКТЕ ПЛАЗМЫ КРОВИ
1 – α -КАРОТИН; 2 – β -КАРОТИН.

На рис. 5 показан пример хроматограммы при определении α - и β -каротина в плазме крови коров.

Расчет. Количественное определение общего каротина, α - и β -каротина в плазме крови проводят методом абсолютной калибровки с использованием стандартных растворов α - и β -каротина. Для этого пробы готовят аналогично для образцов плазмы крови. Отличие заключается в том, что плазму крови заменяют альбумином сыворотки крови крупного рогатого скота (7 г/100 мл физиологического раствора), а экстракцию проводят стандартными растворами 1 или 2, приготовленными на основе различных растворителей. После хроматографического анализа строят калибровочную кривую, откладывая по оси абсцисс концентрацию каротиноидов, а по оси ординат – высоту пиков. Затем рассчитывают калибровочный коэффициент по отношению высоты пика к его

концентрации, что является тангенсом угла наклона калибровочного графика. Содержание каротиноидов в плазме крови определяют по калибровочной кривой или по формуле:

$$X \text{ (мкг/мл)} = H \cdot K,$$

где H – высота (площадь) пика каротиноидов, мм; K – калибровочный коэффициент.

Полученные по калибровочной кривой и по формуле значения необходимо умножить на 2 (учет объема образца плазмы крови).

Расчет концентрации каротиноидов в биологических объектах проводят по формуле:

$$X \text{ (мкг/г)} = (H_{\text{п}} \cdot C \cdot E) / H_{\text{с}} \cdot M$$

где $H_{\text{п}}$ – высота (площадь) пика каротиноида в пробе, мм; $H_{\text{с}}$ – высота (площадь) пика каротиноида в стандартном растворе, мм; C – концентрация каротиноида в стандартном растворе, мкг/мл; E – количество (мл) растворителя, пошедшего на растворение пробы после выпаривания; M – навеска, г.

2.9. Совместное определение ретинола и α -токоферола в плазме (сыворотке) крови

Принцип метода. В основу метода положено осаждение белков плазмы (сыворотки) крови этиловым спиртом, экстракции липидов гексаном и последующим количественным одновременным определением витаминов А и Е методом микроколоночной нормально-фазной ВЭЖХ с УФ детекцией. Диапазон концентраций: ретинол – 0,03–2,0 мкг/мл; α -токоферол – 0,5–20 мкг/мл.

Реактивы. 1. 0,025 %-ный раствор бутилокситолуола в этиловом спирте; 2. 0,0125 %-ный раствор бутилокситолуола (БОТ) в гексане; 3. Элюент для жидкостной хроматографии – гексан:пропанол-2 (99:1); 4. Стандартный раствор ретинола (полный транс-ретинол) в гексане с концентрацией от 0,1 до 1,0 мкг/мл; 5. Стандартный раствор dl- α -токоферола в гексане с концентрацией от 0,5 до 20 мкг/мл.

Оборудование. Микроколоночный жидкостной хроматограф "Милихром" со сканирующим УФ детектором; колонка (64x2 мм или 120x2 мм), Силасорб 600, 5 мкм; встряхиватель, центрифуга с охлаждением ротора.

Ход определения. В полиэтиленовую пробирку с пробкой (50x10 мм) вносят 0,5 мл гепаринизированной плазмы крови, добавляют 0,5 мл 0,025 %-ного спиртового раствора бутилокситолуола, тщательно перемешивают, что обеспечивает эффективное выпадение белков, приливают 1 мл 0,0125 %-ного раствора БОТ в гексане и встряхивают в течение 5 минут (на вортексе – вихревом встряхивателе – 30 сек). Затем центрифугируют 5 мин при 3000 об/мин и температуре 4°C (при отсутствии центрифуги с охлаждением можно охладить отдельно ротор в морозильнике и затем провести в нем центрифугирование). В результате центрифугирования образуются два слоя: нижний, состоящий из спирта, водорастворимых веществ и белка, и верхний – из гексана и липофильных компонентов. После центрифугирования ставят пробирки на 30 минут в холодильник. Верхний, гексановый слой (100 мкл) используют при анализе на микроколоночном хроматографе.

Условия микроколоночной ВЭЖХ. Микроколоночный жидкостный хроматограф "Милихром" (или последующие его модификации) со сканирующим УФ детектором; колонка: 64x2 мм (или 120x2 мм), Силасорб 600, 5 мкм; элюент: гексан:пропанол-2 (99:1); скорость потока для колонки длиной 64 мм–100 мкл/мин и для колонки размером 120x2 мм – 200 мкл/мин; детекция: УФ, для α -токоферола длина волны 294 нм, для ретинола – 324 нм. (При сканировании в одноволновом режиме можно

установить длину волны 294 нм); температура комнатная; время удерживания α -токоферола 190 с, ретинола – 780 с; скорость движения ленты самописца 300–700 мм/ч; чувствительность 0,2–0,4 е.о.п.

Идентификацию пиков проводят по стандартным веществам, а также получением ультрафиолетовых спектров разделяемых веществ, что позволяет конструкция прибора.

Расчет. Для количественного определения витаминов готовят стандартные растворы. Затем подготавливают пробы аналогично описанному для образца плазмы крови, лишь с тем отличием, что 0,5 мл плазмы крови заменяют водой, а экстракцию проводят стандартным раствором витамина в гексане, но с известной концентрацией.

После хроматографического анализа строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс концентрацию витаминов, а по оси ординат высоту (площадь) пиков. затем высчитывают калибровочный коэффициент по отношению высоты (площади) пика к его концентрации, что является тангенсом угла наклона калибровочного графика. Содержание витаминов в плазме (сыворотке) крови определяют по калибровочной кривой или по формуле:

$$X \text{ (мкг/мл)} = H \cdot K,$$

где H – высота (площадь) пика интересующего компонента, мм; K – калибровочный коэффициент.

Полученные по калибровочной кривой или по формуле данные необходимо умножить на 2 (учет объема образца и гексана). При приведении концентрации витаминов А и Е к международной системе СИ (мкмоль/л) необходимо значение (мкг/100 мл) умножить на коэффициенты 0,024 и 0,039 соответственно. Среднее аналитическое выделение витаминов А и Е из образцов плазмы крови составляет 97–98 %.

2.10. Одновременное определение ретинола и α -токоферола в премиксах, кормах и биологических объектах

Принцип метода. Состоит в омылении проб щелочью, экстракции и отделении неомыляемой части липидов. Количественное определение и разделение витаминов А и Е проводят с использованием обращенно-фазной или нормально-фазной микроколоночной ВЭЖХ с УФ детекцией. Диапазон концентраций: ретинол – более 0,1 мкг/г, α -токоферол – более 2 мкг/г.

Реактивы. 1. Водный 50 %-ный раствор гидроксида калия (КОН); 2. Пирогаллол или гидрохинон; 3. Бутилокситолуол; 4. Сульфид натрия (водный) 12 %-ный раствор; 5. Этиловый спирт ректификат технический; 6. Метиловый спирт; 7. Изопропиловый спирт (пропанол-2); 8. Гексан; 9. Диэтиловый эфир, свободный от перекисей; 10. 2 %-ный раствор фенолфталеина в спирте; 11. Аскорбиновая кислота. Используемые органические растворители должны быть очищены и перегнаны; 12. Стандартные растворы витаминов для обращенно-фазной ВЭЖХ готовятся с использованием в качестве растворителя метанола, для нормально-фазной – гексана. Концентрация dl- α -токоферола для анализа в биологических объектах и кормах равна 10–25 мкг/мл, для премиксов – 100–150 мкг/мл; полного транс-ретинола – 2–20 мкг/мл соответственно; 13. Элюент. Для обращенно-фазной ВЭЖХ – метанол:вода (98:2); для нормально-фазной ВЭЖХ – гексан:пропанол-2 (98:2).

Оборудование. Жидкостный хроматограф "Милихром" со сканирующим УФ-детектором; колонка для обращенно-фазной ВЭЖХ (64x2 мм), Силасорб С18 или Сепарон С18,5 мкм; водяная баня с регулированием (40–100°C); лабораторная центрифуга; роторно-вакуумный испаритель; баллон азота с редуктором; весы аналитические; колбы круглодонные со шлифом на 250 мл; делительные воронки на 250–500 мл; мерные колбы, цилиндры и пипетки.

Ход определения. Подготовку проб, омыление, экстракцию проводят обычным способом (как описано ранее).

Если образец содержит значительное количество минеральных элементов (например, витаминно-минеральный премикс), необходимо в него внести 2 мл сульфида натрия и тщательно смешать. Соединить колбу с обратным холодильником и провести омыление под током азота при температуре воды в бане 85°C в течение 30 минут. Далее омыление и экстракцию проводят как обычно. Если в дальнейшем при количественном анализе будет использована обращенно-фазная ВЭЖХ, то экстракт нужно растворить в 10 мл метанола, а при анализе методом нормально-фазной ВЭЖХ – растворить в 10 мл гексана.

Микроколоночная ВЭЖХ. При анализе методом обращенно-фазной ВЭЖХ образец необходимо центрифугировать при 3000 об/мин, 5 мин. Образец, растворенный в гексане, вводят без дополнительного центрифугирования. Объем пробы для введения обычно составляет 10–50 мкл.

Условия жидкостной хроматографии: колонка – размер 64x2 мм, Силасорб С18, 5 мкм; элюент – метанол:вода (98:2); скорость потока – 100 мкл/мин. Колонка длиной 64, 80 или 120 мм, Силасорб 600, 5 мкм; элюент – гексан: пропанол-2 (98:2), скорость потока – 100–200 мкл/мин; детекция – УФ, α-токоферол – 294 нм, ретинол – 324 нм; температура – комнатная; скорость движения ленты самописца – 300–700 мм/ч; чувствительность – 0,2–10,0 е.о.п.

Для получения dl-α-токоферола путем гидролиза щелочью dl-α-токоферил-ацетата берут 112 мг dl-α-токоферил-ацетата, в расчете на чистое вещество, и подвергают омылению (согласно указанному выше для препаратов витаминов), экстракции, обезвоживанию и выпариванию. Сухой остаток растворяют в 100 мл гексана. В 1 мл такого раствора содержится 1000 мкг dl-α-токоферола. Этот основной раствор можно использовать для дальнейшего разведения, контролируя концентрацию на спектрофотометре.

Расчет. Концентрацию витаминов в образцах рассчитывают по формуле:

$$\text{мкг ретинола (токоферола)/г} = (H_p \cdot C \cdot E) / H_c \cdot M$$

где H_p – высота (площадь) пика ретинола или токоферола в образце, мм; H_c – высота (площадь) пика ретинола или токоферола в стандартном растворе, мм; (При анализе нормально-фазной ВЭЖХ витамин А в пробе и стандарте рассчитывают как сумму высот (площадей) цис- и транс-формы ретинола); C – концентрация используемых стандартных растворов, мкг/мл; E – фактор разведения (равен 10); M – навеска образца, г.

3. Определение витамина Е

3.1. Определение витамина Е в тканях по реакции Эмери-Энгеля с использованием колоночной хроматографии

Принцип метода. Метод основан на способности токоферола восстанавливать окисное железо в закисное, которое дает цветную реакцию с дипиридиллом или ортофенантролином (реакция Эмери-Энгеля).

Реактивы. При определении токоферолов используют в основном те же реактивы, что и при анализе других жирорастворимых витаминов. 1. Органические растворители (диэтиловый эфир, бензол, гексан, петролейный эфир и т.д.), которые используют для анализа только после предварительной их очистки, как было описано ранее; 2. Безводный серноокислый натрий; 3. 10 %-ный спиртовой раствор едкого калия; 4.

Пирогаллол; 5. 0,5 %-ный раствор хлорного железа в 96° спирте; 6. 0,5 %-ный раствор α - α' -дипиридила в 96° спирте; 7. Адсорбент силикагель марки Л-100/160 мкм (Чехия); При отсутствии указанной марки можно использовать силикагель марки КСК, производства Воскресенского или Башкирского химкомбинатов, хранить силикагель необходимо в герметично закрытой посуде; 8. Препарат витамина Е с известным содержанием α -токоферил-ацетата для построения калибровочного графика; 9. Азот или углекислый газ.

Оборудование. Спектрофотометр или ФЭК, роторно-вакуумный испаритель, водяная баня с терморегулятором.

Ход определения. 1–2 г гомогенизированной или тщательно измельченной печени, 5 г жира или 10 г яйца (желток круто сваренного яйца, предварительно тщательно измельченный) помещают в колбу на 150–200 мл, добавляют туда же трехкратный объем (по отношению к навеске) 10 %-ного раствора КОН, 20 мг на 1 г навески пирогаллола и перемешивают. Затем колбу подсоединяют к обратному холодильнику и проводят омыление в течение 30 мин в водяной бане при температуре 85–90°С, периодически колбу покачивают круговыми движениями, перемешивая содержимое. После омыления колбу охлаждают до комнатной температуры. Для быстрого охлаждения ее помещают на непродолжительное время под струю холодной (водопроводной) воды. Затем добавляют 15 мл дистиллированной воды и содержимое колбы переносят в делительную воронку на 250 мл, в которой производят извлечение неомыляемой фракции липидов гексаном (можно диэтиловым эфиром). Колбу ополаскивают 10 мл дистиллированной воды которую сливают в ту же воронку. Далее добавляют 30 мл гексана, содержимое воронки колебательными движениями тщательно перемешивают и воронку ставят в штатив. После расслоения жидкостей нижнюю водную часть сливают в колбу, в которую добавляют 30 мл гексана, тщательно взбалтывают и содержимое переносят во вторую делительную воронку. После отделения слоев нижнюю (водную) часть сливают в колбу, а гексановый экстракт переносят в первую делительную воронку. Экстракцию проводят еще дважды (по 30 мл гексана). при плохом или медленном разделении слоев (водной и гексановой части) следует в делительную воронку добавить 10–15 мл этилового спирта. По окончании экстракции объединенные в одной делительной воронке гексановые вытяжки промывают от щелочи несколько раз дистиллированной водой до нейтральной реакции промывных вод на фенолфталеин. Затем из делительной воронки, после того как удалят воду, осторожно сливают гексан в колбу с притертой пробкой, на дно которой помещен безводный сернокислый натрий (10–15 г). Делительную воронку смывают гексаном, который также выливают в колбу. Колбу закрывают пробкой и ставят в темное место на 30 минут. Высушенный прозрачный гексановый экстракт фильтруют через бумажный складчатый фильтр, а сернокислый натрий на фильтре и в колбе трижды промывают гексаном в количестве 20, 15 и 10 мл.

При одновременном определении в одном образце витаминов А и Е полученный экстракт делят на две части. Одна часть идет для анализа витамина А, дальнейший ход определения которого описан ранее, а вторая часть – для анализа витамина Е. полученный гексановый экстракт (полностью или частично) выпаривают на роторно-вакуумном испарителе под током азота или углекислого газа на водяной бане при температуре 50°С. Полученный сухой остаток растворяют в 5 мл бензола (гексана) и пропускают через колонку. Предварительно колонку готовят следующим образом: узкую часть стеклянной трубки длиной 15–20 см и диаметром 1,0–1,2 см плотно заполняют ватой, затем адсорбентом (высота силикагеля 8 см) и безводным сернокислым натрием (высота заполнения 0,5 см). Затем узкую часть колонки вставляют в приемник

экстрактора, который соединяют через колбу Бунзена с водоструйным насосом. Включают насос, адсорбент при этом уплотняется. Перед нанесением на колонку бензольного экстракта адсорбент смачивают чистым бензолом (3–5 мл). По мере прохождения бензола через адсорбент в колонку вносят раствор сухого остатка в бензоле. Колбы дважды (5 и 3 мл) ополаскивают бензолом, который также переносят на колонку. Полученный элюат выпаривают на роторно-вакуумном испарителе в токе азота на водяной бане при температуре 60–65°C. Сухой остаток растворяют в 4 мл 96° этилового спирта (при анализе яйца в 8–10 мл) в зависимости от содержания витамина в субстрате, к которому добавляют 0,5 мл 0,5 %-ного раствора α - α' -дипиридила, хорошо перемешивают и приливают 0,5 мл (по каплям) 0,5 %-ного раствора хлорного железа при одновременном разбалтывании содержимого колбы. Полученный раствор ставят в темное место на 10 минут. Параллельно образцу ставят контроль на реактивы ("слепая" проба), для чего в колбу наливают 4 мл 96° этилового спирта и растворы α - α' -дипиридила и хлорного железа в таких же количествах и ставят на 10 минут в те же условия, что и опытные образцы. Затем измеряют оптическую плотность опытных и "слепых" проб на фотоэлектроколориметре (ФЭК-56, ФЭК-М) при зеленом светофильтре N 5 (длина волны 490 нм), устанавливая нулевое показание прибора по чистому этиловому спирту 96°.

Расчет. По величине экстинкции (экстинкция опытной - экстинкция "слепой" пробы) и заранее составленному калибровочному графику рассчитывают концентрацию витамина Е в опытных образцах по формуле:

$$E = (a \cdot V \cdot b) / M,$$

где E – концентрация витамина Е, мкг/г; a – количество витамина Е по калибровочному графику, соответствующее полученной экстинкции, мкг/мл; V – объем раствора в кювете; b – поправка на разведение; M – навеска образца, г.

Пример расчета. Экстинкция опытного образца 0,340, "слепой" пробы – 0,190; $0,340 - 0,190 = 0,150$, что соответствует по калибровочному графику 6 мкг токоферола. Содержание витамина Е в опытном образце печени равно $(6 \times 5) / 1 = 30$ мкг/г. В данном случае поправку на разведение не используют, так как на анализ был взят весь раствор.

При определении витаминов следует учесть, что гексан хорошо извлекает из неомыляемой фракции липидов витамин Е, затем витамин А, но плохо – каротиноиды. Поэтому при одновременном определении каротиноидов, витамина А и витамина Е лучше использовать диэтиловый эфир.

3.2. Определение витамина Е в плазме или сыворотке крови

Определять витамин Е так же, как и витамин А, в плазме (сыворотке) крови можно двумя методами: с применением щелочного гидролиза при температуре 85–90°C и без него. При использовании щелочного гидролиза в колбу вносят 3–5 мл плазмы крови (при одновременном определении витаминов А и Е берут 9–10 мл плазмы), добавляют пирогаллол из расчета 20 мг на 1 мл плазмы и тройной объем по отношению к плазме 10 %-ного спиртового раствора щелочи. Омыляют в течение 30 минут при температуре 85–90°C на водяной бане с обратным (или воздушным) холодильником. Дальнейший ход анализа как и при определении витамина Е в печени.

При использовании второго метода 2–3 мл плазмы крови вносят в пробирку с притертой пробкой, в которую добавляют равный объем (от взятой плазмы) 96°-ного этилового спирта, пробирку закрывают и резкими движениями смешивают содержимое в пробирке. Затем добавляют тройной объем от взятой плазмы гексана, снова закрывают пробирку

пробкой и встряхивают в течение 10 мин, переводя пробирку то в горизонтальное, то в вертикальное положение. Можно использовать для этой цели механические (электрические) качалки (смесители) для пробирок. Далее содержимое пробирок центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 минут. Верхний гексановый слой с помощью пипетки с грушей осторожно отсасывают в чистую пробирку, на дно которой насыпают безводный сернокислый натрий, и ставят на 30 минут в темное место. Затем полученный экстракт фильтруют через бумажный фильтр, трижды смывая гексаном (по 5 мл) сернокислый натрий с колбочки и фильтра. Полученный гексановый фильтрат упаривают на роторно-вакуумном испарителе или токе азота на водяной бане при температуре 50°C. Сухой остаток растворяют в 5 мл бензола, далее анализ идет так же, как и при определении витамина Е.

При работе с плазмой крови или печенью крупного рогатого скота, в которых содержится значительное количество каротиноидов, мешающих определению витамина Е, хроматографическое отделение лучше вести многоступенчато, как описано Строжа и др. (3). Неомыляемый сухой остаток растворяют в 5 мл петролейного эфира и наносят на колонку, предварительно смоченную петролейным эфиром, затем дважды (по 5 мл) смывают колбочку и колонку этим же растворителем. Эфирные элюаты собирают отдельно, затем элюируют витамин Е бензолом 6 раз по 1 мл, бензольный элюат выпаривают на роторно-вакуумном испарителе или в токе азота при температуре 60–65°C, сухой остаток растворяют в 96°-ном этиловом спирте. Далее определение идет так же, как и при других методах.

Построение калибровочного графика. Для построения калибровочного графика можно использовать свежий (не хранившийся) ГОСТированный медицинский препарат α -токоферилацетата. В мерную колбу для омыления помещают 65 мг токоферилацетата в расчете на содержание чистого вещества. Если используют масляный 5 %-ный раствор, содержащий в 1 мл 50 мг α -токоферилацетата, то следует взять 1,1 мл этого раствора. Затем добавляют тройной объем 10 %-ного спиртового раствора щелочи, пирогаллола и проводят омыление при температуре 85–90°C в течение 30 минут. Далее все операции (экстракция, высушивание, хроматография и т.д.) проводят в той же последовательности, как и при определении витамина Е в тканях. Затем полученный сухой остаток растворяют в 50 мл 96°-ного этилового спирта. 1 мл полученного раствора будет содержать 1000 мкг α -токоферола. Это основной раствор, из которого готовят рабочие растворы с содержанием токоферола в 1 мл – 10, 20, 30, 40 и т.д. мкг. Затем в кювету помещают различные количества рабочих растворов (0,1; 0,2 мл и т.д.), доводя этиловым спиртом объем до 4 мл, добавляют по 0,5 мл 0,5 % раствора α - α' -дипиридила и хлорного железа и измеряют экстинкцию против кюветы с чистым спиртом. Параллельно ставят "слепую" пробу на реактивы. Исходя из полученных величин, строят график, где на оси ординат откладывают экстинкцию, а на оси абсцисс – содержание витамина в растворе и рассчитывают количество витамина как описано при определении витамина Е в тканях.

3.3. Определение витамина Е в комбикормах и премиксах

При определении витамина Е в комбикормах (премиксах) проводят все те же операции, что и при определении витамина Е в животных тканях. Взвешивают 10 г полнорационного комбикорма (2–3 г премикса), предварительно хорошо измельченного и помещают в колбу для омыления. Добавляют 100 мг пирогаллола, 1,5–2 объема от навески горячей воды и выдерживают 10 минут при температуре 55–60°C. Затем добавляют 60 мл (6-кратный объем от навески) 10 %-ного спиртового раствора щелочи. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и проводят

омыление смеси на водяной бане при температуре 85–98°C в течение 30 мин, периодически покачивая колбу для перемешивания содержимого. После омыления колбу охлаждают, добавляют 60 мл дистиллированной воды (20 мл для премикса) и содержимое переносят в делительную воронку. Колбу, в которой проводили омыление, обмывают 5–10 мл дистиллированной воды, которую также сливают в делительную воронку. Дальнейший анализ идет в той же последовательности, как было описано для определения витамина Е в печени.

При одновременном определении витаминов А и Е в полнорационных комбикормах и премиксах подготовку образцов и омыление проводят так же, как и при определении витамина Е, однако экстракцию неомыляемой фракции липидов лучше вести диэтиловым эфиром, так как витамин А и каротиноиды полнее экстрагируются из субстрата диэтиловым эфиром, чем гексаном. Кратность экстракции и последовательность дальнейших операций такая же, как и при определении витамина А в печени.

При одновременном определении витаминов А и Е в премиксах, где отсутствуют каротиноиды, экстракцию следует проводить диэтиловым эфиром, который не уступает гексану по экстрагирующей способности в отношении витамина Е.

Расчет ведут по формуле:

$$E = a \cdot V \cdot b / M,$$

где Е (или А) – концентрация витамина Е (или А) в мкг/г; а – количество витамина Е (или А) по калибровочному графику, соответствующее полученной экстинкции, мкг/мл; V – объем раствора в кювете; b – поправка на разведение; М – навеска, г.

4. Определение витамина D

Принцип метода. Разработанные в последние годы за рубежом и у нас в стране методы анализа витамина D в тканях животных основаны на омылении и экстракции его из неомыляемой части и хроматографическом отделении витамина D от других жирорастворимых витаминов и сопутствующих веществ.

При усовершенствовании метода определения витамина D нами за основу взят метод De Vrie S. (4), в котором адсорбент флорекс XX_S заменен на отечественный адсорбент гумбрин. Необходимость замены адсорбента была вызвана отсутствием флорекса. Для выяснения адсорбирующих свойств гумбрина были проведены дополнительные исследования. Гумбрин после предварительной обработки обладает высокой адсорбционной способностью для витамина А, в то же время как витамин D проходит через него почти полностью.

В окончательном варианте метод включает следующие операции: гидролиз исследуемого образца спиртовым раствором щелочи и отделение неомыляющейся фракции бензолом; удаление стеринах преципитацией с дигитонином; адсорбцию токоферолов и каротиноидов на колонке с окисью алюминия; хроматографию на колонке с гумбрином с целью удаления витамина А; спектрофотометрическое определение витамина D по реакции с треххлористой сурьмой.

Реактивы. 1. Бензол (свободный от тиофена и толуола); 2. 1,2-дихлорэтан; 3. 96°-ный этанол (свободный от альдегидов); 4. 72°-ный этанол (75 мл 96° этанола + 25 мл воды); 5. Эфир серный (свободный от перекисей и кислот); 6. Эфир петролейный (фракция 40–70 о), свободный от воды, ненасыщенных и ароматических углеводородов; 7. 2 %-ный раствор дигитонина в 72°-ном этаноле; 8. Гумбрин 60–100 меш., содержащий 11 % воды. Для хроматографии гумбрин предварительно измельчают на шаровой мельнице, просеивают через сито 110 меш. К 200 г просеянного гумбрина добавляют 500 мл 96°-ного этанола, хорошо

размешивают и кипятят полученную смесь в течение 2–3 минут при постоянном помешивании. После отстаивания верхний слой сливают. К осадку добавляют 250 мл 96°-ного этанола и еще раз кипятят в течение 2–3 минут при постоянном помешивании. Затем дают смеси отстояться, надосадочную часть сливают, а осадок дважды промывают диэтиловым эфиром. Промытый гумбрин переносят на стеклянный фильтр (нутч-фильтр) №1 и с помощью вакуумного насоса отсасывают излишнюю влагу. Далее его помещают в сушильный шкаф при температуре 60°C на 3 часа, а затем хранят в темной посуде с притертой пробкой. Перед употреблением гумбрин снова помещают в сушильный шкаф при температуре 105°C, охлаждают в эксикаторе над хлористым кальцием 1–2 часа, взвешивают, вносят в него воду из расчета 11 % от массы гумбрина; 9. Окись алюминия (щелочная). В колбе на 200 мл смешивают 75 г смеси алюминия для хроматографии (100–325 меш) с 75 мл 2н спиртового раствора КОН, подогревают на водяной бане 15 минут при температуре 80°C и охлаждают. Затем фильтруют отсасыванием, сушат при 130° в вакууме и хранят в герметично закрытой колбе; 10. Реактив Нилда. Берут 22 г треххлористой сурьмы и заливают 100 мл хлороформа. Из полученного раствора готовят 2 %-ный раствор ацетилхлорида. Спустя 3 суток реактив готов к употреблению; 11. Основной стандартный раствор витамина D. Растворяют 10 мг кристаллического витамина D в 200 мл бензола и хранят в холодильнике в темной герметично закрытой посуде. Раствор стоек в течение 14 суток; 12. Рабочий стандартный раствор витамина D. В мерную колбу емкостью 100 мл наливают 5 мл основного стандартного раствора и доводят бензолом до метки. 1 мл этого раствора содержит 2,5 мкг витамина D.

Оборудование. Спектрофотометр СФ-16, роторно-вакуумный испаритель, баллон с азотом, водяная баня, секундомер, хроматографические колонки (диаметр 0,8 и 1,0 см).

Ход определения. В колбу на 300 мл берут 10 г тщательно измельченной печени (или 20 мл плазмы), 10 г кости и т.д., заливают 200 мл 7,5 %-ного спиртового раствора едкого калия (КОН), добавляют 0,5 г аскорбиновой кислоты, все тщательно перемешивают круговыми движениями, чтобы частицы взятого образца не оставались на стенках колбы, после чего проводят гидролиз в течение 30 минут на водяной бане с обратным или воздушным холодильником при температуре кипения смеси 80°, не допуская бурного ее кипения. По окончании омыления, о чем судят по осветлению раствора, колбу охлаждают под струей холодной воды, добавляют 50 мл 96° этанола, содержимое тщательно перемешивают и переносят в колбу с притертой пробкой (шлиф 29) на 100 мл, добавляют 200 мл бензола, колбу закрывают и встряхивают до получения однородного раствора, затем приливают 400 мл дистиллированной воды и снова энергично встряхивают. Затем содержимое колбы переносят в делительную воронку на 1000 мл, которую прочно закрепляют в штативе. После разделения слоев нижний водный слой отбрасывают (если разделение слоев нечеткое или идет медленно, необходимо добавить 10–20 мл 96°-ного этанола). Бензольный экстракт промывают 80 мл 0,5 н водного раствора едкого калия, отмывают дистиллированной водой от щелочи порциями по 80 мл до нейтральной реакции по фенолфталеину, после чего бензольный экстракт сливают в колбу с сернокислым натрием и ставят в темное место на 30–60 минут. Высушенный бензольный экстракт фильтруют через складчатый фильтр, при этом трижды промывают сернокислый натрий и фильтр бензолом. Отфильтрованный бензольный экстракт выпаривают вод вакуумом в токе азота на роторно-вакуумном испарителе на водяной бане при температуре 80°. Затем колбу разъединяют с вакуумом и азотом и к сухому остатку быстро добавляют 20 мл 96°-ного этилового спирта. Если сухой остаток не полностью растворился, то колбу следует

немного подогреть. Далее добавляют 8,6 мл дистиллированной воды. Раствор должен быть прозрачным, если этого явления не наблюдается, колбу необходимо подогреть до просветления раствора. Затем приливают 10 мл 2 % спиртового раствора дигитонина и через 30 минут образующийся в растворе осадок комплекса стерин-дигитонина отфильтровывают через бумажный фильтр складчатый, смоченный 72°-ным этанолом. Фильтр и колбу промывают 15 мл 72°-ного этанола. К полученному фильтрату еще раз добавляют 10 мл 2 % спиртового раствора дигитонина и ставят в холодильник до следующего дня (на 18–20 часов), предварительно плотно закрыв колбу притертой пробкой. При определении витамина D в плазме крови, кости и других объектах, обработку дигитонином можно проводить однократно, с выдерживанием образцов в холодильнике (лучше в морозильной камере) в течение 18–20 часов. Образующийся осадок снова фильтруют, как было указано выше, полученный фильтрат дважды экстрагируют в делительной воронке по 25 мл петролейным эфиром и промывают 20 мл 72°-ного этилового спирта. Нижний спиртово-водный слой отбрасывают, а экстракт сливают в колбу, в которую вставлена обычная стеклянная воронка с бумажным фильтром, на дно которого помещают сернокислый натрий. Фильтр с сернокислым натрием промывают петролейным эфиром. Затем фильтрат выпаривают под током азота в роторно-вакуумном испарителе на водяной бане при температуре 60°. Полученный сухой остаток растворяют в 10 мл петролейного эфира. В итоге выполненных операций получается раствор А.

С целью удаления каротиноидов и токоферолов, которые мешают определению витамина D, проводят колоночную хроматографию на окиси алюминия. Для этого в 50 мл колбу Эрленмейера к 5 г щелочной окиси алюминия добавляют 0,55 мл дистиллированной воды, закрывают резиновой пробкой, нагревают 5 минут на водяной бане при 80° и встряхивают до образования рыхлого порошка. Колбу охлаждают и окись алюминия переносят в хроматографическую колонку (диаметр 0,7 см), в узкой части которой помещена вата. Затем пропускают через приготовленную колонку с окисью алюминия 10 мл петролейного эфира и переносят раствор А. Далее сразу же после прохождения раствора А через окись алюминия проводят элюцию вначале дважды по 5 мл и один раз 40 мл 1 %-ного раствора диэтилового эфира в петролейном эфире, а затем 50 мл 10 %-ного раствора диэтилового эфира в петролейном эфире. собранный элюат выпаривают досуха в роторно-вакуумном испарителе в токе азота на водяной бане при 60°. Сухой остаток быстро растворяют в 10 мл петролейного эфира. Полученный раствор условно называют раствором Б. Для отделения витамина А от витамина D, который также дает цветную реакцию с треххлористой сурьмой и мешает определению витамина D, используют хроматографию на гумбрине. Для этого берут хроматографическую колонку (диаметр 1 см), узкую часть которой заполняют ватой, затем помещают 27 г подготовленного для хроматографии гумбрина (при определении витамина D в плазме крови или кости количество гумбрина можно уменьшить до 9–18 г соответственно), пропускают через гумбрин 10 мл петролейного эфира и переносят раствор Б. После прохождения раствора Б колонку промывают (элюируют) бензолом дважды по 5 мл и один раз 50 мл (при исследовании плазмы крови или кости – 40 мл). По окончании элюции раствор выпаривают досуха в роторно-вакуумном испарителе под током азота на водяной бане при температуре 80°. Сухой остаток в колбе растворяют в 1 мл 1,2-дихлорэтана. Это раствор С. К раствору С добавляют 2 мл реактива Ниелда и взбалтывают, затем переливают раствор в кювету и через 45 и 90 секунд после добавления реактива Ниелда измеряют на спектрофотометре оптическую плотность пробы против пустой кюветы при длине волны соответственно 500 и 550 нм.

Для приготовления стандартного раствора берут 2 мл рабочего стандартного раствора витамина D и переносят в колбу. Затем раствор выпаривают на водяной бане при температуре 80° под вакуумом в токе азота. Колбу быстро охлаждают и осадок растворяют в 1 мл 1,2-дихлорэтана, повторяют манипуляции, описанные выше и содержание витамина D выражают в ИЕ на 1 г или мл образца.

Расчет ведут по формуле:

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

где A_1 – оптическая плотность опытной пробы при 500 нм; A_2 – оптическая плотность опытной пробы при 550 нм; A_3 – оптическая плотность стандартной пробы при 500 нм; A_4 – оптическая плотность стандартной пробы при 550 нм; M_1 – навеска образца (печени, кости и т.д.), взятая для анализа, г; M_2 – количество витамина D в стандартной пробе.

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

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

4.1. Определение витамина D2 или D3 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)

Принцип метода. Метод основан на омылении сухих форм препаратов витамина D, экстракции неомыляемой части и растворении масляных препаратов в растворителе малой полярности. Витамин D и его изомеры разделяют микроколоночной ВЭЖХ. Концентрацию витамина D рассчитывают как сумму витамина D и провитамина D. Диапазон концентраций – 10000 – 50000 МЕ/г.

Реактивы. 1. Гексан; 6. Изопропанол-2; 3. Этиловый спирт ректификат; 4. Водный 50 %-ный раствор гидроксида калия (КОН); 5. Пирогаллол или гидрохинон; 6. Бутилокситолуол; 7. Безводный сернокислый натрий; 8. Стандартные растворы: а) Рабочий стандартный раствор кристаллического витамина D2 или D3 в гексане – 0,1 мг/мл, стабилизированный БОТ (0,001 %); б) Рабочий стандартный раствор ацетата эргостерина – 0,1 мг/мл. Оба раствора хранят при температуре –20°С в течение месяца.

Оборудование. Жидкостный хроматограф "Милихром" со сканирующим УФ детектором; колонка 120x2 мм, заполненная Силасорбом 600, 5 мкм; роторно-вакуумный испаритель; баллон азота с редуктором; водяная баня; аналитические весы; химическая посуда.

Ход определения. В колбе с притертой пробкой объемом 100 мл на аналитических весах взвешивают около 1 г масляного раствора витамина D или смеси витаминов А, D, Е, разбавляют гексаном с БОТ (1 мг/мл) в соотношении 1:10. Проводят анализ полученного раствора в количестве 5 мкл на жидкостном хроматографе при следующих условиях хроматографии:

колонка 120x2 мм, заполненная Силасорбом 600, 5 мкм; элюент – гексан: пропанол-2 (98,5:1,5); скорость потока – 200 мкл/мин; детекция – УФ, длина волны – 264 нм; скорость движения ленты самописца – 300–600 мм/ч; температура комнатная; время удерживания витамина D – 7 минут.

Выбранные условия хроматографии позволяют не только отделить витамины А и Е от D, но и разделить изомеры витамина D. На рис. 6

показана хроматограмма витамина D₃ из масляного раствора витаминов А, D₃ и Е.

Так как в препаратах витамина D, полученных путем фотосинтеза, присутствует и превитамин D (потенциальный витамин D), то при расчете D-витаминной активности препарата необходимо учитывать калибровочный фактор.

Получить превитамин для определения времени его удерживания и расчета калибровочного фактора можно путем нагревания витамина D. Для этого берут 5 мл стандартного раствора витамина D, добавляют 5 мл раствора эргостерина, стабилизируют эту смесь несколькими кристаллами БОТ и нагревают в темноте при 80°C в течение 2 часов. Затем оставшийся растворитель выпаривают под током азота и растворяют в 5 мл гексана. Проводят хроматографирование (4–5 раз) 5 мкл данного раствора, соблюдая изложенные выше условия жидкостной хроматографии. Между пиком ацетата эргостерина (взят как стандарт отсчета) и витамином D появляется пик превитамина D, который отсутствует в стандартном растворе витамина D. Проводят анализ (4–5 раз) 5 мкл стандартного раствора витамина D, соблюдая идентичные условия хроматографии. Калибровочный фактор рассчитывают по формуле:

$$КФ = (А - Б)/В$$

где А – средняя величина высоты пика стандарта витамина D, мм; Б – средняя величина пика стандарта витамина D после нагревания, мм; В – средняя величина высоты пика превитамина, мм.

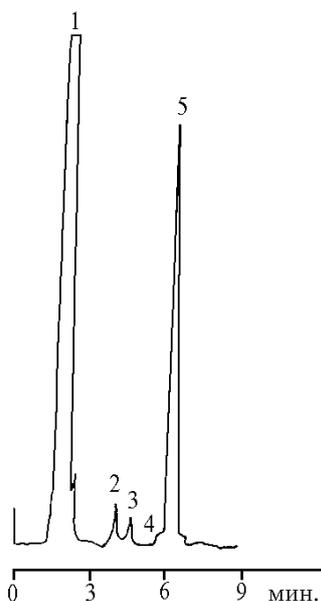


Рис. 6. ХРОМАТОГРАММА МАСЛЯНОГО РАСТВОРА ТРИВИТАМИНА (СМЕСЬ ВИТАМИНОВ А, D, E): 1 – ВИТАМИНЫ А + Е (ЭФИРНЫЕ ФОРМЫ); 2 – ПРЕВИТАМИН D₃; 3 – ЛЮМИСТЕРОЛ; 4 – ТАХИСТЕРОЛ; 5 – ВИТАМИН D₃.

Расчет. Содержание витамина D в масляном препарате рассчитывают как сумму витамина D и превитамина D по формуле:

$$X \text{ (МЕ/мл)} = \{(N_1 + (N_{II} \cdot КФ)) \cdot C \cdot K \cdot P\} / N_2 \cdot M \} \times 40000,$$

где N₁ – высота пика витамина D в пробе, мм; N₂ – высота пика витамина D в стандартном растворе, мм; N_{II} – высота пика превитамина D в пробе, мм; КФ – калибровочный фактор (КФ ≥ 1); C – концентрация витамина D в стандартном растворе, мг/мл; K – фактор разведения (10); P – плотность масла; M – навеска образца, г; 40000 = МЕ витамина D/мг.

Ход определения содержания витамина D₂ или D₃ в сухих формах препаратов. В колбу со шлифом емкостью 150–250 мл помещают навеску препарата с таким расчетом, чтобы в ней содержалось около 0,5 мг витамина D. Для препаратов с содержанием витамина D 20000 МЕ/г достаточно взять навеску 0,200–0,300 г. Затем к этой навеске добавляют 20 мл этилового спирта, 100–150 мг пирогаллола или гидрохинона и 3 мл водного 50 %-ного раствора КОН. Присоединяют колбу к обратному холодильнику и проводят омыление на водяной бане при температуре 70°C в течение 30 минут. Охлаждают колбу с содержимым до комнатной температуры (для быстрого охлаждения ее можно поместить под струю холодной воды). Добавляют 15 мл дистиллированной воды и переносят все содержимое колбы в делительную воронку объемом 250 мл. Дважды промывают колбу 15 мл этилового спирта и переносят также в делительную воронку. Проводят экстракцию витамина D гексаном четыре раза по 25 мл, добавляют в объединенный гексановый экстракт 200 мкл раствора гексана с БОТ (1 мг/мл). Затем этот экстракт отмывают от щелочи дистиллированной водой до нейтральной реакции промывных вод по фенолфталеину. Полученный экстракт переносят в колбу, на дно которой помещен безводный сернокислый натрий (10 г) и ставят в холодильник на 40 минут. Переносят экстракт в колбу со шлифом через бумажный фильтр, промывают (дважды по 10 мл) фильтр и осушитель гексаном во избежание потерь витамина D. Выпаривают гексан досуха на роторно-вакуумном испарителе при слабом токе азота и немедленно растворяют сухой остаток в 10 мл гексана.

Проводят анализ 10 мкл этого раствора на жидкостном хроматографе при условиях хроматографии, изложенных выше.

Расчет. Содержание витамина D в сухих препаратах рассчитывают по формуле:

$$X \text{ (МЕ/г)} = \{(N_1 \cdot (N_p \cdot K_f) \cdot C \cdot K) / (N_2 \cdot M)\} \times 40000,$$

где N₁ – высота пика витамина D в пробе, мм; N₂ – высота пика витамина D в стандартном растворе, мм; N_p – высота пика превитамина D в пробе, мм; K_ф – калибровочный фактор (K_ф ≥ 1); C – концентрация витамина D в стандартном растворе, мг/мл; K – фактор разведения (10); M – навеска образца, г; 40000 = ме витамина D/мг.

4.2. Определение витамина D в молоке

Принцип метода. состоит в щелочном гидролизе образца молока, экстракции неомыляемой части липидов, выпаривании этой фракции на роторно-вакуумном испарителе досуха, очистке на колонке с окисью алюминия. Разделение и количественный анализ проведен методом нормально-фазной микроколоночной ВЭЖХ с УФ детекцией при 264 нм. Диапазон концентраций – содержание витамина D более 20 МЕ/л.

Реактивы. 1. 1 %-ный раствор пирогаллола в спирте; 2. Гидроокись калия в гранулах; 3. 2 %-ный раствор фенолфталеина в спирте; 4. Гексан; 5. Изопропанол; 6. Окись алюминия нейтральная для колоночной хроматографии, предварительно прокаленная с 5 % воды; 7. Элюент для микроколоночной ВЭЖХ – гексан:изопропанол 998,5:1,5; 8. Элюент для очистки – гексан:изопропанол (99:1); 9. Стандартный раствор витамина D₂ или D₃ в гексане с концентрацией 1 мкг/мл = 40 МЕ/мл. После приготовления добавить несколько капель БОТ, стабилен в течение 1 месяца в условиях холодильника.

Оборудование. Хроматограф микроколоночный "Милихром" со сканирующим УФ детектором; самописец; колонка стальная 120x2 мм, заполненная Силасорбом 600, 5 мкм; роторно-вакуумный испаритель – ИР-ИМ; водяная баня; баллон азота с редуктором; стеклянная колонка очистки длиной 15 см и внутренним диаметром 3,5 мм; коническая кол-

ба со шлифом и пробкой объемом 250 мл; делительная воронка объемом 500 мл; мерные колбы, цилиндры, пипетки.

Ход определения. Для проведения щелочного гидролиза и экстракции смешивают 25 мл гомогенизированного молока с эквивалентным количеством 1 %-ного пирогаллота в этиловом спирте в 250 мл конической колбе с притертой пробкой. Добавляют в колбу 8,7 г КОН в гранулах и смешивают смесь до полного растворения щелочи. Ставят смесь в делительную воронку на 500 мл, добавляют 15–20 мл воды, 10 мл этанола и экстрагируют трижды гексаном порциями по 40 мл. Объединенный гексановый экстракт промывают дистиллированной водой до нейтральной реакции промывных вод по фенолфталеину. Выпаривают растворитель досуха (при температуре воды 60°C) на роторно-вакуумном испарителе и немедленно растворяют в 2 мл гексана. Если при растворении образовалась муть, добавить к экстракту 10 мл этанола и выпарить досуха еще раз.

Для очистки заполняют стеклянную колонку (150x3,5 мм), в конец которой помещена стекловата, нейтральной окисью алюминия с 5 % воды на высоту 5 см. Промывают предварительно колонку 7 мл элюента гексан:изопропанол (99:1). Наносят на колонку 2 мл гексана с растворенной в них неомыляемой частью липидов. Отбрасывают первые 3 мл, затем промывают колонку 12 мл элюента гексан:изопропанол (99:1), собирают эту фракцию, как содержащую витамин Д. Выпаривают растворитель досуха под током азота и растворяют в 1 мл гексана.

Инжектируют на колонку 50–60 мкл полученного раствора липидов в гексане и проводят хроматографический анализ при следующих условиях: колонка 120x2 мм, Силасорб 600, 5 мкм; элюент – гексан: изопропанол (98,5:1,5); скорость потока – 200 мкл/мин; детекция – 264 нм; чувствительность – 0,1–0,2 е.о.п.; скорость движения ленты самописца – 600–700 мм/ч; время удерживания для витамина Д – около 7 мин; время анализа – 15 минут.

Расчет. Концентрацию витамина Д в молоке рассчитывают по формуле:

$$X \text{ (МЕ/л)} = \{H_{\text{п}} \cdot C / H_{\text{с}} \cdot M\} \times 1000,$$

где $H_{\text{п}}$ – высота пика витамина Д в пробе, мм; $H_{\text{с}}$ – высота пика витамина Д в стандартном растворе, мм; C – концентрация витамина Ж в стандартном растворе, МЕ/мл; M – навеска образца молока, г.

5. Определение витамина К и его производных

5.1. Физико-химический метод определения витамина К в растительном материале (5)

Принцип метода. Для определения витамина К используют физико-химические и биологические методы. При использовании физико-химических методов для количественного определения витаминов К требуется предварительная очистка и изолирование витамина К от сопутствующих соединений (бензохинонов, токоферолов, ретинола, липидов и др.). Преимуществом этих методов является возможность раздельного определения различных по структуре витаминов К. Биологические методы не позволяют выявить структурные различия между аналогами витаминов К и довольно трудоемки. методические приемы выделения витамина К различаются в зависимости от исследуемого материала. Для экстракции витамина К из биологического материала используют петролейный эфир (фракция, кипящая при температуре 60–80°C), изооктан, гептан, пропионовую смесь и т.д. Дальнейшая очистка и разделение производных витаминов К с целью идентификации отдельных представителей проводится методом хроматографии.

С целью определения 2-метил-1,4-нафтохинонов предложено значительное количество колориметрических методов, основанных на его цветных реакциях с разными реагентами: 2,4-динитрофенилгидразином и аммиаком (зеленое окрашивание), ксантингидридом (оранжевое окрашивание), щелочным раствором цистеина (желтое окрашивание); диэтилмалоновым эфиром (фиолетово-красное окрашивание), аммиаком (красное окрашивание) и др. Однако, независимо от того, какие реагенты будут использованы для количественного выявления витамина в биологическом материале, основной принцип и этапы любого метода сводятся к следующему: извлечение (экстракция) витамина К из исследуемого субстрата органическими растворителями, дальнейшая очистка экстракта и разделение производных витамина К с помощью методов хроматографии и непосредственное его определение в элюате. Все операции при определении витамина К₁ необходимо проводить в затемненной комнате.

Реактивы. 1. Этиловый спирт 96 %; 2. Нормальный бутанол; 3. Силикагель марки ЛЛ (фракция 5/40 мкм); 4. Хлороформ; 5. Гексан; 6. Пластины "Силуфол" (15x15 см); 7. Боргидрид натрия; 8. Сульфат натрия безводный; 9. Стандартный раствор витамина К₁ – 100 мкг/мл.

Оборудование. Спектрофотометр, флуориметр, роторный испаритель, вакуумный насос, камера для хроматографии, УФ лампа со светофильтром 366 нм, секундомер, пробирки с притертой пробкой, колонки стеклянные (диаметр 1 см); колба Бунзена, колбочки круглодонные для выпаривания на 150–200 мл и на 10–15 мл, пипетки на 0,1; 5 и 10 мл, колба мерная на 50 мл, колба коническая на 250–300 мл.

Ход определения. Независимо от вида растительного субстрата экстракцию витамина К₁ из анализируемого образца проводят бензолом с добавлением 2 % нормального бутилового спирта в течение 3 часов. Для очистки филлохинона от сопутствующих веществ (каротиноидов, ретинола, липидов и др.) используют колоночную хроматографию. Стеклянную колонку диаметром 8–10 мм заполняют 2-см слоем силикагеля, плотно утрамбовывают с помощью вакуума и поверх силикагеля насыпают 1 см безводного сульфата натрия. По окончании экстракции содержимое пробирки переносят на колонку, а пробирку несколько раз ополаскивают бензолом. Скорость прохождения экстракта – 20–30 капель в минуту. Элюат собирают и досуха выпаривают на роторном испарителе при температуре 80–85°C, после чего сухой остаток растворяют в 0,2–0,3 мл бензола и наносят с помощью микропипетки узкой полоской на стартовую линию пластинки, по обе стороны которой наносят по капле гексанового раствора филлохинона (свидетель). После испарения в испарителе пластинку вносят в камеру для хроматографии, насыщенную парами растворителя – смеси гексан:хлороформ (1:1). Когда фронт растворителя дойдет до верхнего края, пластинку вынимают и высушивают. На одной пластинке можно разделить от 0,5 до 35 мкг филлохинона с хорошей воспроизводимостью. Хроматографическое разделение витаминов на тонком слое производится в течение 15–20 минут.

Величины R_fx100 для витаминов К в зависимости от подвижной фазы приведены в таблице.

Таблица

Величины R_fx100 для витаминов К

Подвижная фаза	Соотношение реагентов	К ₁	К ₃	Викасол
Диэтиловый эфир		95	82	81
Ацетон		91	82	82
Бутанол		95	85	83
Этанол		86	79	77

Метанол		86	78	75
Хлороформ		94	62	70
Бензол		56	20	20
Толуол		59	15	3
Ксилол		57	15	11
Гексан-эфир	4:1	79	41	43
Гексан-эфир	3:1	82	45	45
Гексан-эфир	2:1	86	51	51
Гексан-эфир	1:1	95	66	66
Гексан-эфир	1:2	95	75	74
Гексан-эфир	1:3	96	78	79
Гексан-эфир	1:4	95	67	88
Гексан-хлороформ	4:1	18	13	14
Гексан-хлороформ	2:1	31	19	21
Гексан-хлороформ	1:1	41	23	23
Гексан-хлороформ	1:2	70	33	35
Гексан-хлороформ	1:4	77	35	37

Для обнаружения филохинона на пластинке ее следует осветить УФ светом (366 нм) и быстро очертить темную полосу витамина.

В дальнейшем определение витамина K_1 осуществляется тремя различными способами в зависимости от наличия приборов. Результаты, полученные всеми способами, сопоставимы.

1. Силикагель с адсорбированным на нем витамином K_1 снимают с пластинки и переносят в пробирку с притертой пробкой. Добавляют 3 мл 96 %-ного этанола и оставляют для элюирования в темноте на 30 минут при периодическом встряхивании. Затем содержимое пробирки фильтруют через бумажный фильтр и промывают дополнительно 1 мл этанола. Полученный фильтрат ставят в центрифужной пробирке на 7 часов под лампу дневного света на расстоянии 5 см, предварительно определив величину поглощения при 281 нм. После этого повторно спектрофотометрируют элюат и по разнице показаний между первым и вторым измерениями находят величину увеличения светопоглощения фильтрата. Концентрацию витамина определяют по калибровочному графику.

2. К полученному фильтрату добавляют 0,1 мл 0,1 %-ного свежеприготовленного раствора боргидрида натрия в этаноле, быстро перемешивают и переносят в кювету спектрофотометра. Первое измерение делают через 20 сек после добавления восстановителя при длине волны 243 нм. Последующие измерения проводят через каждые 30 сек. Максимальная величина экстинкции отмечается через 2–3 минуты. По разнице показаний между конечным и первоначальным измерениями определяют величину прироста и рассчитывают количество витамина K_1 по предварительно построенному калибровочному графику.

После проведения тонкослойной хроматографии пластинку кладут под лампу ультрафиолетового света (366 нм) на расстоянии 15 см от источника облучения на 8 минут. Витамин K_1 начинает флуоресцировать желто-зеленым светом. После облучения участок силикагеля с витамином соскабливают в пробирку, заливают 8 мл хлороформа и ставят для элюирования на 20 мин. Затем содержимое пробирки отфильтровывают через бумажный фильтр, а пробирку споласкивают 2 мл хлороформа. Измерение флуоресценции производят на флуориметре ЭФ-ЭМА, используя для возбуждения флуоресценции светофильтр ФК-1.

При использовании спектрографических методов, которые основаны на исследовании спектров поглощения в ультрафиолетовом свете, максимум (в гексане) находится для витамина K_1 при 243, 249, 261, 270 и 325 нм, для K_2 – при 243, 249, 260, 270 и 325 нм и для K_3 – при 244, 253, 263 и 325 нм.

6.2. Определение витамина К₃ в кормах, премиксах и витаминных концентратах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (6)

Принцип метода. Состоит в экстракции соединений витамина К₃, превращении их в свободный менадион в хлороформном растворе и последующим разделением методом ВЭЖХ на силикагелевой колонке с ультрафиолетовым определением в элюате при длине волны 251 нм.

Реактивы. 1. Хлороформ; 2. п-гексан; 3. Диоксан; 4. 25 % гидрохлорид аммония; 5. Целит; 6. Сульфат натрия обезвоженный и тонко измельченный; 7. Менадион чистый для калибровки; 8. Карбазол (внутренний стандарт).

Оборудование. Спектрофотометр, центрифуга, роторный испаритель, водяная баня, хроматографические колонки.

Приготовление проб для ВЭЖХ. Взвешивают 0,1–10 г тонкоизмельченного (в мельнице) образца с содержанием 0,01–1 мг менадиона и помещают в 100 мл центрифужный стакан. Затем добавляют реактивы в следующей последовательности: 75 мл хлороформа (встряхивать в течение 2 минут), 6 мл 25 % гидрохлорида алюминия (встряхивать 3 мин), 10 г смеси целита с сульфатом натрия 3:20 (встряхивать 30 мин), затем центрифугируют в течение 10 минут при 2000 об/мин.

В соответствии с концентрацией менадиона в хлороформном экстракте (вычисленной исходя из приблизительного содержания и величины навески) берут аликвоту экстракта, осторожно выпаривают на роторном испарителе при частичном вакууме на водяной бане при температуре не выше 40°C до небольшого объема (0,5–1 мл). Затем остаток растворяют в п-гексане или в растворе, используемом для ВЭЖХ, до конечной концентрации менадиона около 0,5–5 мкг менадиона на 1 мл или до абсолютного количества приблизительно 5 пг менадиона.

Условия хроматографии: колонка из нержавеющей стали длиной 25 см, внутренним диаметром 4 мм, неподвижная фаза – силикагель, подвижная фаза – 4 % диоксан в п-гексане, поток 1 мл/мин, давление 80 бар, температура окружающей среды, инъекция образца в объеме 20 мкл, детекция в УФ при 251 нм (или 254 нм для детектора с фиксированной длиной волны), время ретенции 8–9 мин, время прохождения – 16 мин. Неподвижная фаза – силикагель 60,5 мкм.

Стандартные растворы. Стандартный раствор менадиона (5 мкг/мл – 50 мг чистого менадиона растворяют в 100 мл эфирного элюента (внешний стандарт) или разводят 1:1000 (внутренний стандарт). Внутренний стандарт 20 мг карбазоля на 1000 мл элюента (4 % диоксана в п-гексане).

Таблица

Руководство для процесса ВЭЖХ при определении менадиона

Содержание менадиона в кормах и премиксах	Навеска, г	Добавка хлороформа, мл	Концентрация менадиона в экстракте хлороформа, мкг/мл	Разведение экстракта	Конечное содержание менадиона, мкг/мл	Объем пробы для ВЭЖХ	нг менадиона
20 г/кг	0,1	75	26,7	10:50	5,3	20	106
2 г/кг	1,0	75	26,7	10:50	5,3	20	106
200 мг/кг	10	75	26,7	10:50	5,3	20	106
20 мг/кг	10	75	2,67		2,67	20	53
2 мг/кг	10	75	0,27		0,27	20–100	5,3–2,7

Вместо описанного в таблице варианта, внутренний стандарт можно получить, если выпарить или растворить экстракт до конечной концентрации 1–10 мкг/мл, а затем развести 1:1 раствором карбазола.

При расчете площадь или высоту пика сравнивают с площадью или высотой пика стандарта.

Водорастворимые витамины

1. Определение витамина В₁ (общего тиамина)

Принцип метода. основан на окислении тиамин в тиохром, экстракции последнего органическими растворителями и измерении интенсивности флуоресценции. Все формы тиамин в биологическом материале встречаются в виде соединений с белком, поэтому для полного экстрагирования тиамин необходим гидролиз.

Реактивы. 1. Стандартный раствор тиамин: 10 мг (точная навеска) тиаминхлорида, предварительно высушенного в течение 2 часов при температуре 150° и охлажденного в эксикаторе, растворяют в 100 мл 0,1 н НСl в мерной колбе (в 1 мл основного стандартного раствора содержится 100 мкг тиаминхлорида). Раствор устойчив в течение 2 месяцев при хранении на холоде в темной склянке с притертой пробкой. Основной стандартный раствор в количестве 1 мл помещают в мерную колбу емкостью 100 мл, доводят водой до метки и перемешивают. В 1 мл этого раствора содержится 1 мкг тиаминхлорида (рабочий стандартный раствор). Раствор годен к употреблению в течение 2 суток. 2. Калий железосинеродистый, перекристаллизованный – готовят 1 %-ный раствор в воде (хранят в темном месте не более 2 суток); 3. Натрий едкий – 30 %-ный раствор; 4. Натрий сернокислый безводный; 5. Спирт изобутиловый. Должен быть проверен на отсутствие флуоресценции. Спирты могут быть использованы без дополнительной очистки, если при измерении их флуоресценции в электрофлуориметре показания прибора не будут превышать шесть делений шкалы гальванометра. При наличии более высокой флуоресценции спирты подвергают очистке следующим образом: к 1 л спирта прибавляют 20 г активированного угля, содержимое встряхивают в течение 15 мин, сутки отстаивают, повторяя несколько раз встряхивание. Затем раствор фильтруют и перегоняют на песочной или глицериновой бане, собирая фракцию, кипящую при 107–108° в случае изобутилового спирта, или при 117° – в случае нормально-бутилового спирта. Спирты вновь проверяют на отсутствие флуоресценции (при перегонке спирта не следует применять резиновые пробки и трубки); 6. 0,1 н раствор НСl; 7. 2,5М раствор СН₃СООNa; 8. Ацетатный буфер: 0,1 М раствор уксуснокислого натра и 0,1 М раствор уксусной кислоты, рН 3,8–4,2; 9. Пепсин, оризин; 10. 20 % ТХУ; 11. Толуол.

Оборудование. Флуориметр, делительные воронки, термостат, водяная баня.

Ход определения тиамин в кормах. Для определения витамина В₁ в кормах навеску 5–10 г тщательно растирают в ступке с 10–20 мл 0,1 н НСl, переносят в колбу на 100 мл, доводят объем тем же раствором приблизительно до 60–70 мл, колбу помещают в кипящую водяную баню на 30 мин, время от времени помешивая. Затем охлаждают до 30–35°, добавляют пепсин из расчета 30 мг фермента на 1 г сухого вещества навески (пепсин готовят на 0,1 н растворе НСl). В колбы добавляют 1–2 капли толуола и ставят в термостат на 12–15 часов (колбы закрывают ватными тампонами). По истечении времени инкубации реакцию среды пепсиновых гидролизатов доводят 2,5М раствором СН₃СООNa до рН 5,2, добавляют второй фермент – оризин, приготовленный на ацетатном буфере с рН 5,0–5,2 (фосфатидный фермент) и оставляют в термостате до утра. Затем к гидролизатам добавляют 20 мл 20 % ТХУ и выдерживают на кипящей водяной бане 10 минут. После охлаждения объем до-

водят до 100 мл и фильтруют. Из фильтрата отбирают 20 мл в делительную воронку, приливают 20 мл изобутилового или бутилового спирта и энергично перемешивают содержимое воронки в течение 2 минут (для удаления флуоресцирующих примесей). После разделения нижний водный слой сливают для анализа, а верхний удаляют.

Для превращения тиамин в тиохром в делительную воронку наливают 5 мл H₂O), 1,5 мл 30 % NaOH, 0,5 мл 1 % раствора феррицианида калия и 3 мл экстракта, отмытого от флуоресцирующих примесей. В другую делительную воронку – все то же самое, кроме феррицианида. После добавления каждой составной части содержимое воронок тщательно перемешивают. Затем добавляют 10 мл изобутилового спирта и энергично встряхивают в течение 2 минут. После расслоения нижний водный слой отбрасывают, а верхний фильтруют через фильтр с безводным серноокислым натрием. Фильтрат должен быть совершенно прозрачным. Параллельно проводят окисление стандартного раствора тиамин, для чего в две делительные воронки берут по 1 мл рабочего стандартного раствора тиамин, содержащего 1 мкг этого витамина, добавляют по 7 мл H₂O и остальная последовательность операций, как описано ранее.

Для количественного определения тиохрома используют флуориметр с максимумом поглощения около 390 нм и с одинаковыми пробирками из нефлуоресцирующего стекла. В каждую из взятых пробирок помещают испытуемые и стандартные окисленные и неокисленные изобутиловые растворы тиамин и определяют интенсивность флуоресценции.

Расчет ведут по формуле:

$$X = (A - A_1) \cdot C \cdot V_1 / (B - B_1) \cdot a \cdot V_2,$$

где X – количество тиамин в образце, мкг/г; A – показания флуориметра для испытуемого образца с окислителями; A₁ – показания флуориметра для испытуемого образца без окислителя; B – показания флуориметра для стандартного раствора с окислителями; B₁ – показания флуориметра для стандартного раствора без окислителя; C – количество тиамин в 1 мл стандартного рабочего раствора в мкг; a – навеска вещества, г; V₁ – объем (мл), до которого был доведен раствор опытной смеси после кислотного или ферментного гидролиза; V₂ – объем (мл) раствора, взятого для окисления.

Если при определении витамина B₁ в кормах не улавливается разница между окисленной и неокисленной пробами, то для стандарта можно взять 0,5 мл стандартного раствора, что следует учесть при пересчете.

При работе на флуориметре можно пользоваться фильтром ФК-1 и ФК-2.

Ход определения витамина B₁ в содержимом рубца. Освобожденное от кормовых остатков содержимое рубца в количестве 25–30 мл помещают в колбочку, добавляют 25–30 мл 0,1 н HCl. Содержимое колбы подвергают сначала кислотному гидролизу, затем ферментативному и далее определяют как описано выше для кормов.

Ход определения витамина B₁ в тканях. Навеску ткани 1 г гомогенизируют в 20-кратном объеме 0,1 н HCl (вначале 10 минут, затем смывают 2 раза по 5 мл). Помещают на кипящую баню на 30 минут. Затем добавляют 20 мл 20 % ТХУ, ставят на кипящую водяную баню на 10 мин. Когда пробы остынут, объем доводят до 40 мл и фильтруют.

Берут 15 мл фильтрата в делительную воронку, добавляют 15 мл изобутилового или бутилового спирта и энергично встряхивают в течение 2 минут. После расслоения жидкости верхний слой отбрасывают, нижний сливают в пробирку. в делительную воронку наливают 5 мл воды, 1,5 мл NaOH, 0,5 мл 1 % феррицианида калия, 3 мл экстракта. В

другую делительную воронку наливают все то же самое, кроме феррицианида калия. После добавления каждой составной части пробы тщательно перемешивают, затем наливают 10 мл изобутилового или бутилового спирта, энергично встряхивают в течение 2 минут. После расслоения нижний слой отбрасывают, верхний профильтровывают через фильтр с безводным сернокислым натрием (в зеленые пробирки). Флуориметрируют против стандартного рабочего раствора, который отбрасывают как фильтрат с феррицианидом калия.

Ход определения витамина В₁ в крови, молоке, молозиве. К 10–15 мл исследуемого материала приливают 0,1 н НСl в соотношении 1:1 и далее проводят все операции и расчет, как описано в ходе определения В₁ в тканях.

2. Определение витамина В₂ (общего рибофлавина)

Принцип метода (7). Метод основан на экстракции витамина из пробы с помощью ферментативного и кислотного гидролиза и последующем определении свободного рибофлавина по интенсивности флуоресценции при рН 5–6.

Реактивы. 1. Стандартный раствор рибофлавина: 10 г рибофлавина растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе на 250 мл (в 1 мл содержится 40 мкг рибофлавина). Раствор устойчив при хранении в темноте в течение месяца. Рабочий раствор готовят непосредственно перед определением: в мерную колбу на 100 мл вносят 1 мл стандартного раствора и доводят водой до метки; 2. Фосфатный буфер М/15 рН 7,8–8,0 (берут 15-ю часть от молекулярной массы двузамещенного фосфорнокислого натрия); 3. 4 %-ный раствор КМnO₄; 4. 3 %-ный раствор Н₂O₂; 5. 20 % раствор ТХУ; 6. 4М К₂НРО₄; 7. Гидросульфит натрия; 8. Трипсин, приготовленный на воде из расчета 30 мг на 1 г сухого вещества субстрата (корма); 9. Толуол.

Ход определения витамина В₂ в кормах. Навеску корма тщательно растирают в ступке с небольшим количеством фосфатного буфера и переносят в колбу, куда добавляют тот же буферный раствор в отношении 1:15. Смесь выдерживают в кипящей водяной бане в течение 30 минут. Охлаждают до 30°, добавляют трипсин. Смесь помещают в термостат на 12–16 часов при 37°С. При этом происходит отщепление рибофлавина от белка. Затем объем доводят до 100 мл водой и фильтруют. К 10 мл фильтрата добавляют 10 мл ТХУ и помещают на 10 минут в кипящую водяную баню. Охладив, добавляют по каплям, перемешивая, 4 % КМnO₄ до тех пор, пока красноватая окраска не перестанет исчезать. Через 10 мин добавляют по каплям 3 % раствор перекиси водорода до исчезновения окраски перманганата калия. Объем доводят до 25 мл и фильтруют. В пробирку наливают 4 мл фильтрата в 1 мл 4М К₂НРО₄. При определении витамина в траве нужно обязательно гасить флуоресценцию, добавляя на кончике скальпеля гидросульфит натрия.

Расчет ведут по формуле:

$$\text{рибофлавин (мкг) в 1 г вещества} = \{(A - B) \cdot 0,4 \cdot V \cdot V_2\} / B \cdot P \cdot V_1$$

где X – количество рибофлавина в 1 г вещества, мкг/г; А – показания флуориметра для испытуемого раствора (1 отсчет); В – показания флуориметра для испытуемого раствора после гашения (2 отсчет); В – показания флуориметра для стандартного раствора, содержащего 0,4 мкг в 1 мл; 0,4 – содержание рибофлавина в мкг/мл стандартного раствора; Р – навеска, г; V – общее разведение, мл; V₁ – фильтрат, мл, взятый на окисление; V₂ – фильтрат, мл, после окисления.

Ход определения витамина В₂ в тканях. Навеску ткани 1 г гомогенизируют в 10-кратном объеме воды, затем дважды промывают 5 мл воды. Добавляют 20 мл 20 % ТХУ и ставят в кипящую водяную баню на 30 минут. Охлаждают, объем доводят до 40 мл водой и фильтруют. В

зеленую пробирку наливают 4 мл гидролизата и, добавляя по 0,2 мл 4М K_2HPO_4 , доводят флуоресценцию до максимума. Колориметрируют против стандартного рабочего раствора, как описано при определении B_2 в кормах. При отсутствии K_2HPO_4 можно доводить флуоресценцию до максимума добавлением на кончике скальпеля соды, постоянно перемешивая.

Ход определения витамина B_2 в крови, молоке, молозиве. Берут 10–15 мл материала, добавляют 1:1 20 % ТХУ. Гидролиз проводят в кипящей водяной бане в течение 30 минут. Охлаждают, объем соответственно доводят водой до 20–30 мл. Фильтруют. Далее все процедуры как при определении витамина B_2 в тканях.

Ход определения витамина B_2 в яйце. Яйцо разбивают и отделяют белок от желтка в 2 стаканчика со стеклянными палочками, которые заранее взвешивают. Белок взвешивают и хорошо перемешивают, не допуская образования пены. В мерный цилиндр на 100–200 мл выливают примерно 23 мл белка, находят его вес, минусуя вес стаканчика. Приливают 75 мл 96 % спирта для осаждения белка и оставляют стоять несколько минут, отмечая сокращение объема раствора. Бросают бусинки и взбалтывают в течение 2 часов. Фильтруют и в полученном фильтрате определяют содержание витамина B_2 . При этом необходимо учитывать объем экстракта фильтрата. Например: вес белка 37,79 г, вес пробы 26,25 г, содержание влаги в пробе 22,7 % (влажность белка 87 %). После добавления 75 мл спирта объем должен составить 97,7 мл, в действительности же оказывается 95,2 мл. Таким образом, объем сократился в 2,5 раза, что и необходимо учитывать при расчете.

Желток экстрагируют 55 % C_2H_5OH . Его взвешивают в стаканчике и отливают примерно 9 мл в цилиндр на 100–200 мл, в который предварительно наливают 50 мл 55 % C_2H_5OH . Желток выливают медленно, затем добавляют еще 50 мл 55 % спирта. Закрыв цилиндр, встряхивают 2 минуты вручную, затем 2 часа фильтруют через бумажный фильтр. В фильтрате определяют содержание витамина B_2 . Например, вес желтка 17,79 г, вес пробы 8,51 г (влажность 50 %) = 4,25. Объем экстракта = 100 мл + 4,25 = 104,25. Сокращение объема не учитывают.

Для определения витамина B_2 экстракт и стандартный раствор помещают в пробирку флуориметра, сравнивают интенсивность флуоресценции. Затем в обе пробирки добавляют по 0,1 мл $NaHCO_3$ и гидросульфита натрия ($Na_2SO_4 \cdot 2H_2O$) и вновь флуориметрируют. Флуоресценция стандартного раствора равна 0. Гасить флуоресценцию рекомендуется 2–3 раза.

Расчет ведут по формуле:

$$X = (A - B) \cdot 0,4 / C \cdot a$$

где X – содержание рибофлавина, мкг/г; A – показатель флуориметра (1 отсчет); B – показатель флуориметра (2 отсчет); C – показатель флуориметра для стандартного раствора; 0,4 – содержание витамина в 61 мл стандартного раствора (0,4 мкг B_2) в объеме экстракта; a – вес пробы.

Основной стандартный раствор содержит 40 мкг B_2 в 1 л. Рабочий стандартный раствор (1 мл основного стандартного раствора в 100 мл) содержит 0,4 мкг рибофлавина в 1 мл.

3. Определение витамина B_3 (общей пантотеновой кислоты) микробиологическим методом

Принцип метода. Для роста некоторых микроорганизмов, не способных к синтезу витамина B_3 , необходимо добавлять его в питательную среду. Принцип метода и основан на сопоставлении ростового эффекта. Определение пантотеновой кислоты в тканях микробиологическими методами зависит от способа экстракции витамина из анализи-

руемого образца и применяемой тест-культуры микроорганизмов (*Saccharomyces Ludwigi* K.M., *Lactobacillus arabinosus* и др.).

Реактивы. 1. Пантотенат кальция; 2. 0,02 М раствор двууглекислого калия; 3. 0,2 н раствор уксусной кислоты; 4. Щелочная фосфатаза; 5. Пептидаза печени; 6. Питательные среды для дрожжевой культуры.

Оборудование. Автоклав; термостат; бокс с бактерицидными лампами; бытовой холодильник; аналитические весы; гомогенизаторы; фотоэлектроколориметр; лабораторная центрифуга; штативы для пробирок; колбы различных размеров (100, 150, 250, 500, 1000 мл); цилиндры (на 25, 50, 100, 200, 500 мл); воронки диаметром 5, 7, 10 см; пробирки, пипетки, спиртовки, платиновые петли, бумажные фильтры, ватно-марлевые пробки. Особого внимания требует подготовка посуды. Любая пробирка, используемая для приготовления стандартного витаминного раствора или для роста микроорганизмов, все склянки и колбы обязательно должны быть промыты хромовокислой смесью или концентрированной серной кислотой. После тщательной обработки хромовокислой смесью не меньшая тщательность должна быть проявлена и при отмывании посуды от кислоты: малейшие следы серной кислоты сказываются на росте микроорганизмов, угнетая их размножение.

Экстрагирование из природных материалов. Витамин В₃ встречается в природе в связанном виде, в котором дрожжи его не усваивают. Во время автолиза тканей из них выделяется дополнительное количество пантотеновой кислоты. Витамин В₃ быстро разлагается под действием кислоты или щелочи, поэтому для его выделения из природных материалов применяют ферментативный гидролиз, основанный на обработке исследуемого материала щелочной фосфатазой и пептидазой печени. Последний представляет собой экстракт ацетонового порошка печени, что позволяет стандартизировать весь процесс гидролиза связанного витамина при одновременном использовании высокоочищенных препаратов щелочной фосфатазы из кишечника цыплят.

Получение препарата пептидазы печени. Печень только что убитых голубей или цыплят тщательно отмывают от крови, очищают от соединительнотканых прослоек и жировой ткани и помещают в жидкий азот. Измельченные кусочки печени гомогенизируют в 20-кратном объеме хорошо охлажденного ацетона в течение 3 минут, гомогенат фильтруют через воронку Бюхнера, промывают холодным ацетоном и эфиром, высушивают. 10 % гомогенную взвесь полученного ацетонового порошка в 0,02 М растворе двууглекислого калия после центрифугирования при 3000 об/мин (10–15 мин) используют в виде надосадочной жидкости как источник пептидазной активности (обязательно в день приготовления).

Подготовка проб к анализу. Стандартизованный способ обработки биологического материала для полного гидролиза связанных форм витамина В₃ сводится к следующему: кипятят анализируемый материал 7–10 минут, центрифугируют при 3000 об/мин. Навеску тонкоизмельченного или гомогенизированного образца, содержащего от 3 до 10 мкг В₃ и суспендированную в 50 мл воды можно автоклавировать 15 минут под давлением в 1 атм, а затем процентрифугировать или профильтровать, разводят центрифугат прокипяченного экстракта (или фильтрата) из расчета 0,005 мкг В₃ (0,002–0,006 мкг). Для гидролиза связанных форм витамина к 5 мл разведенного центрифугата (или фильтрата) добавляют 0,5 мл 0,02М раствора двууглекислого калия, 0,5 мл раствора препарата щелочной фосфатазы (10 мг/мл) и 0,1 мл препарата пептидазы (экстракт ацетонового порошка печени). Препарат щелочной фосфатазы производится фирмой "Ренал" (Венгрия). Для исследования пригоден лиофилизированный фермент, хорошо растворимый в воде, с максимальной активностью 0,4 фосфоролитических единиц/мг. При соблюдении рекомендуемых условий хранения (–10°С) препарат сохраняет

достаточный уровень активности в течение 1,5 – 2 лет. Тщательно перемешанную инкубационную смесь выдерживают 4 часа в водяной бане (37°C), после чего pH доводят до 4,8 с помощью 0,2 н раствора уксусной кислоты и затем фильтруют. В связи с тем, что препарат пептидазы содержит собственную пантотеновую кислоту, необходим контроль, в котором вместо 5 мл разведенного анализируемого раствора (центрифугата) берется 5 мл воды.

Полученные фильтраты инкубационной смеси используют как материал для непосредственного анализа свободной пантотеновой кислоты.

Ход определения витамина В₃ с тест-культурой *Saccharomyces Ludwigii* KM. Наиболее высокой специфичностью к витамину В₃ обладает тест-культура *Saccharomyces Ludwigii* KM. Для посева обычно берут 2–3-суточную культуру *S. Ludwigii* KM (Hansen В.К.М.-4-1167), выращенную на сусло-агаре (27°C), приготовленном следующим образом: 2 % раствор агара на сусле (7°) кипятят в течение 1 мин, разливают по 5 мл в пробирки и автоклавируют в течение 1 часа при 0,5 атм. Горячие пробирки помещают на наклонную плоскость и хранят после затвердения при 4°C.

Питательная среда (среда Ридер) для дрожжевой культуры включает на 1000 мл объема: аммоний сернокислый – 3 г, кальций азотнокислый – 0,4 г, магний сернокислый – 0,7 г, натрий хлористый – 0,5 г, калий фосфорнокислый однозамещенный – 1,0 г, калий фосфорнокислый двухзамещенный – 0,1 г, глюкоза – 20 г, инозит – 3 мг, бионит – 0,002 мг, тиамин – 1 мг, пиридоксин – 0,5 мг, никотиновая кислота – 1 мг. Среду готовят на дистиллированной воде или прокипяченной и профильтрованной воде.

Построение калибровочного графика необходимо в каждой серии исследований. в качестве стандарта используют раствор пантотената кальция на бидистиллированной воде (20 нг/мл), из которого готовят стандартные разведения в диапазоне концентраций от 2 до 12 нг/мл. В этом диапазоне должна находиться и концентрация витамина В₃ в анализируемом материале. Общее правило для опытных и стандартных исследований – постановка их в 3–4 параллельных пробах.

К 2 мл среды добавляют 1 мл раствора, содержащего пантотеновую кислоту в количестве 0–12 нг/мл (опыт, контроль и стандарт). Пробирки закупоривают ватно-марлевыми пробками и автоклавируют в течение 30 мин при 0,5 атм и после их охлаждения до комнатной температуры засевают 2–3 суточной культурой *S. Ludwigii* KM (1 петлю культуры размещивают в 20 мл воды, в каждую пробирку добавляют 1 каплю взвеси). Закрытые пробирки инкубируют в термостате при 27°C в течение 48–72 часов, после чего пробы встряхивают и нефелометрируют в 5–миллиметровых кюветах. Экстинкции стандартных растворов ориентировочно должны составлять 0,02–0,4 ед (светофильтр 440±10 нм).

Расчет. При расчете количества связанной пантотеновой кислоты отдельно по калибровочной кривой определяют содержание ее в препарате пептидазы печени (контроль без добавления исследуемого материала) и в опытной пробе, в которой есть как исследуемый материал, так и гидролизующие ферменты. Разница в уровнях пантотеновой кислоты составляет количество витамина В₃ в исследуемом образце. Чрезвычайно важен при анализе полученных результатов выбор прямолинейного участка калибровочного графика (то есть участка, в котором проявляется прямая пропорциональная зависимость между увеличением массы дрожжевой культуры и концентрацией пантотеновой кислоты в инкубационной среде). С учетом этого обстоятельства берутся разные количества анализируемого раствора пантотеновой кислоты (0,2; 0,4; 0,5 мл). Недостающий до 1 мл объем доводят бидистиллированной водой.

Ход определения пантотеновой кислоты с тест-культурой *Lactobacillus arabinosis*. Тест-культуру выращивают на среде, состоящей (на 100 мл H₂O) из 1 г дрожжевого экстракта, 1 г глюкозы, 1,5 г агара. Для посева берут суточную культуру лактобактерий, инкубированных при 33°C в среде, содержащей 1 % экстракта дрожжей и 1 % глюкозы. Центрифугат среды суспендируют в стерильном физрастворе до получения слабомутной суспензии, 1 капля которой используется для засева исследуемых проб.

Среда для роста микробной культуры включает (на 1000 мл): кислотный гидролизат казеина – 10 г, глюкозу – 40, натрий уксуснокислый – 12, цистин – 0,2, триптофан – 0,2, урацил – 0,01, аденин – 0,01, гуанин – 0,01, ксантин – 0,01 г, ПАБК – 0,2 мг, никотиновая кислота – 2,0; пиридоксин – 4,0, рибофлавин, тиамин по 2,0; биотин – 0,005 мг, раствор неорганических солей – 20 мл (состоит из равных частей двух растворов: 1) 1 %-ные K₂HPO₄ и KH₂PO₄; 2) 4 % MnSO₄ · 7H₂O; 0,2 %-ные NaCl, FeSO₄ · 7H₂O и MnSO₄ · 4H₂O). Указанные концентрации среды вдвое превышают необходимые для оптимального роста *L.arabinosis* и рассчитаны на соответствующее разведение в процессе анализа.

К стандартному раствору пантотеновой кислоты (0–20 нг/мл) и исследуемым разведенным экстрактам тканей (ориентировочное разведение витамина до 1–8 нг/мл) добавляют строго равный объем среды (см. выше, как в случае с дрожжевой культурой *B.Ludwigii*). Количество исследуемого раствора берут с таким расчетом, чтобы обеспечить разную степень интенсивности роста молочнокислых бактерий. Контрольные и опытные пробирки закупоривают ватными пробками, автоклавировать в течение 15 мин при 1 атм, охлаждают и засевают суспензией клеток тест-организма, полученных из активно растущей культуры.

Количественный анализ роста тест-культуры может быть как ацидиметрическим (титрование 0,1 н NaCl), так и нефелометрическим. В первом случае длительность инкубации при 37°C составляет 48–72 часа, во втором – 18–24 часа. Тест-микроорганизм абсолютно специфичен к D-форме витамина, в связи с чем широко используется для определения способности различных аналогов витамина B₃ оказывать антивитаминное действие. Помимо *L.arabinosus* ряд других бактерий также нуждаются для своего роста в витамине B₃ и поэтому они могут применяться для количественного анализа этого витамина. Чаще других используются *L. plantarum*, *L. Casei*, *Proteus morgani* и пр.).

4. Определение витамина B₄ (холина) по Циеленсу Э.А. (13)

Принцип метода. Метод основан на способности холина взаимодействовать с реинекатом аммония, с последующим колориметрическим определением интенсивности розовой окраски, которую дает реинекат холина в ацетоне.

Реактивы. 1. Метанол; 2. Насыщенный водный раствор гидроксида бария; 3. Фенолфталеин; 4. 10 %-ная уксусная кислота; 5. Соль Рейнека – комплексное соединение красного цвета Cr(SCN)₄(NH₃)₂NH₄; 10. Хлороформ; 11. 10 %-ный раствор ТХУ; 12. Эфир; 13. 10 %-ный раствор едкого натрия; 14. Перекись водорода; 15. 20 %-ный раствор серной кислоты; 16. 0,2 %-ный раствор (спиртовый) дифенилкарбозида; 17. 6 н соляная кислота; 18. 1 н КОН.

Оборудование. Колориметр, центрифуга, термостат, аппарат Сохслета, водяная баня.

Ход определения общего холина. Для количественного экстрагирования общего холина из биологического материала последний необходимо просушить до постоянного веса. Сушат холин при температуре 105°C или в вакууме при более низкой температуре. Затем образец тщательно растирают. Если после этого остаются крупные зерна, то весь холин экстрагировать не удастся. При определении холина в горо-

хой муке в таком случае остаток неэкстрагированного холина составляет около 15 %.

Жидкими продуктами (молоко, кровь), предварительно замеряя их количество, пропитывают фильтровальную бумагу, которую затем просушивают (также при 100°C или в вакууме) и после этого в сложенном виде помещают в экстрактор.

Слишком жирные продукты (сыр, масло) омыляют 1 н КОН, растворенным в этиленгликоле. Гидролизат разбавляют дистиллированной водой и подкисляют соляной кислотой до слабокислой реакции. Раствор трижды встряхивают с эфиром, в котором жирные кислоты растворяются. При этом холин остается в воде. Затем водный раствор нейтрализуют слабым раствором щелочного натрия и осаждают холин реинекатом аммония.

Свободный холин растворяется в воде, алкоголе, ацетоне, метаноле, но не растворим в эфире, петролейном эфире, сероуглероде, бензоле. Лецитин и сфингомиелин имеют свойство растворяться в метаноле, эфире, бензоле, петролейном эфире, но не растворяются в ацетоне.

Наилучшим растворителем при количественном экстрагировании общего холина из биологического материала является горячий метанол. Однако метанол – смертельный яд. Поэтому экстрагирование и дистилляцию можно проводить лишь в вытяжном шкафу с исправной тягой. Запасы метанола должны храниться в отдельном вытяжном шкафу или в сейф-бутылках с предупредительной надписью "ЯД". Расход метанола должен учитываться в специальном журнале.

На различия в растворимости основан принцип выделения свободного и связанного холина. При определении содержания свободного холина в биологическом материале в качестве растворителя пригоден ацетон.

Экстракция общего холина. Тщательно размельченный материал (0,5–5 г) на аналитических весах развешивают в целлюлозные экстракционные патроны. Такой патрон можно изготовить из обычной фильтровальной бумаги. Полоску ее (например, 5x8 см) скатывают в виде цилиндрической трубки. На обоих концах ее делают четыре надреза около 1 см глубиной с тем, чтобы закрыть концы цилиндра. Предварительно в него закладывают немного ваты для предотвращения потерь материала. Патрон с ватой взвешивают, чтобы впоследствии определить вес анализируемого материала по разнице весовых величин.

Экстракционный патрон помещают в аппарат Сокслета или (при малой навеске) подвешивают на нитке в обычном экстракторе с обратным холодильником. Продолжительность экстракции (5–24 часа) зависит от анализируемого материала. Для экстрагирования яичного желтка достаточно 5 часов, печени – 8 часов, а дрожжей – сутки.

Гидролиз фосфатидов. После экстракции материал переливают из экстрактора в дистилляционную колбу и на водяной бане проводят перегонку. Если в образце много фосфатидов, то жидкость при дистилляции сильно пенится, что следует предотвращать. Отдистиллировав почти весь материал, в ту же дистилляционную колбу наливают 30–50 мл насыщенной гидроксидом бария воды и гидролизуют ее на водяной бане в течение 4 часов, присоединив к колбе воздушный холодильник.

Можно гидролиз проводить совместно с экстракцией, добавив гидроксид бария (0,2–0,3 г) к метанолу, что сокращает процесс анализа. Потом отфильтровывают и дистиллируют метанол. К сухому остатку доливают 10–20 мл дистиллированной воды, добавляют несколько капель фенолфталеина и нейтрализуют раствор 10 %-ной уксусной кислотой. Раствор фильтруют через нутч- или фарфоровый фильтр на слой асбестовой ваты с помощью водоструйного насоса. Осадок на фильтре 4 раза промывают несколькими миллилитрами дистиллированной воды. Общий холин в фильтрате можно осадить солью Рейнека или йодом.

Осаждение холина солью Рейнека (по принципу Энгеля). Соль Рейнека – комплексное соединение $\text{Cr}(\text{SeN})_4(\text{NH}_3)_2\text{NH}_4$ красного цвета. Хорошо растворяется в метаноле. Для осаждения холина применяется 5 %-ный раствор. Его добавляют для получения стабильного красноватого оттенка. Уже через короткое время выпадают характерные мелкие крупички осадка рейнеката холина (имеющие перламутровый оттенок, который особенно заметен при взбалтывании содержимого колбы). Осадок лучше оставить на ночь в холодильнике. затем его отсасывают на охлажденный мелкопористый фильтр №3 или 4, трижды промывают, расходуя по 2 мл охлажденного этанола и высушивают. Осадок, находящийся на фильтре, растворяют в ацетоне. Полученный раствор красного цвета отфильтровывают в пробирке, а затем переливают в мерную колбу соответствующей емкости (от 10 до 100 мл). Интенсивность окраски раствора можно определить на ФЭКе с фильтром, пропускающим свет с длиной волны 530 нм (для этого в контрольные кюветы наливают чистый ацетон).

Показания фотометра (E_{530}) сравнивают со стандартной кривой и путем обычных стехиометрических расчетов определяют количество общего холина в весовой единице (как правило, в мг % холинхлорида). Погрешность при этом составляет ± 5 %. Описанный способ является лучшим и наиболее распространенным для определения общего холина.

Осаждение холина йодом. Холин осаждают йодом, для чего 3 г чистого йода растворяют в 100 мл 1 н КJ, используя центрифужную пробирку с зауженным концом, в нейтральную или слабокислую среду добавляют реагент с таким расчетом, чтобы на 1 мл анализируемого материала (в котором не может содержаться более 5 мг холина) приходилось 0,3 мл реагента. В осадок выпадают мельчайшие черно-зеленые кристаллы, которые центрифугируют в течение 10 минут при 3000 об/мин. Поверхностный раствор осторожно сливают и добавляют к осадку 5 мл дистиллированной воды (0°C) для последующего их смешивания. Затем вновь центрифугируют. Промывку осадка повторяют 3–4 раза до полного обесцвечивания промывных вод. После этого в центрифужную пробирку наливают 1–2 мл хлороформа, взбалтывают его и титруют 0,01 н или 0,001 н $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ при сильном встряхивании. 1 мл 0,01 н $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ соответствует 1 мл 0,01 н J (1,269 мг), а это в свою очередь соответствует 0,1335 мг холина.

Пользуясь описанным способом, следует особое внимание обращать на промывку осадка. Если при центрифугировании осадок оказывается недостаточно плотным, кристаллы перийодидов холина легко смываются промывными водами. Тогда ошибка может превысить ± 5 %.

Ход количественного определения свободного холина в крови. Описанным микрометодом определяют свободный холин в сыворотке крови, плазме и эритроцитах. Поскольку содержание свободного холина в крови невелико, а брать более 10 мл крови для проведения одного определения не представляется возможным, то выпадающие в осадок кристаллы рейнеката холина получаются очень мелкими и при промывании, если используются обычные центрифужные пробирки, могут оказаться полностью смытыми. Для центрифугирования такого осадка применяют центрифужные пробирки с очень узким концом. При тщательном выполнении анализа можно получить достаточно точное совпадение результатов.

Для определения свободного холина пригодна только свежевзятая кровь. К определенному объему сыворотки или плазмы крови, например, к 2–5 мл, добавляют в том же объеме 10 %-ную ТХУ, осаждающую белки. Фильтрацию проводят на фильтровальной бумаге. Фильтрат улавливают в маленькую экстракционную колбу или пробирку с притертой пробкой (стеклянной) и трижды экстрагируют равным количеством

эфира. После последнего отделения эфира колбу с анализируемым материалом ненадолго погружают в горячую воду, чтобы удалить остатки эфира. Подождя пока раствор остынет до комнатной температуры, отмеренное пипеткой количество раствора переносят по каплям в пробирку с узким концом. Добавляют несколько миллилитров 5 %-ного раствора соли Рейнека. Раствор помешивают тонкой стеклянной палочкой. На ночь пробирку оставляют в холодильнике. Осадок обычно весьма незначительный, едва различим. Его подвергают центрифугированию в охлажденных гильзах центрифуги в течение 5 мин при 2500–3000 об/мин. Раствор отсасывают пипеткой Пастера с большими предосторожностями, чтобы осадок не замутнел. После добавки охлажденного спирта центрифугирование повторяют. Всю процедуру проводят трижды.

Ничтожно малое количество осадка, скопившегося в узком конце пробирки, растворяют в нескольких миллилитрах ацетона, разбавленного водой. Раствор наливают в пробирку, градуированную по 10 мл. Добавляют 3 мл воды и погружают пробирку в водяную баню, чтобы удалить ацетон. Пипеткой в пробирку закапывают 0,2 мл 10 %-ного раствора едкого натра и 1 мл 10 %-ной перекиси водорода. Пробирки на 30 мин оставляют на кипящей водяной бане. Для удаления остатков перекиси водорода рекомендуется в течение 0,5 мин нагревать на открытом пламени.

После охлаждения добавляют к раствору 2 мл 20 %-ной серной кислоты и 1 мл 0,2 %-ного спиртового раствора дифенилкарбазида. Появляется ярко-фиолетовое окрашивание. Пробирки заполняют дистиллированной водой до 10 мл отметки и фиксируют показания фотометра, применяя для установления экстинкции фильтр, пропускающий свет с длиной волны 530 мкм.

Расчет. Подставив значение экстинкции E_{530} в формулу Маренци-Кардини, определяют искомое количество холина (X , мкг/мл):

$$X = 90,9 E_{530} \cdot Y / 25$$

Количество свободного холина в эритроцитах вычисляют по разнице между содержанием его в цельной крови и в плазме крови, учитывая объемный индекс крови. Объем эритроцитов определяют с помощью градуированной центрифужной пробирки. Расчет количества холина в эритроцитах ведут по формуле:

$$X = (XК \cdot 100) - (XП - об \% \text{ плазмы крови}) / об \% \text{ эритроцитов},$$

где $XК$ – холин цельной крови; $XП$ – холин плазмы крови; об % – объемный процент.

5. Определение витамина B_5 (никотиновой кислоты)

Принцип метода (9). Метод основан на свойстве никотиновой кислоты при взаимодействии с бромистым роданом образовывать соединение, которое в присутствии ароматических аминов (анилин, метол) в нейтральной или слабокислой среде дает производное, окрашенное в желтый цвет. Интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству никотиновой кислоты.

Реактивы. 1. 4 н раствор серной кислоты – 112 мл доводят до 1000 мл водой; 2. 60 % раствор NaOH или KOH – 300 г KOH растворяют в 500–400 мл H_2O , затем доводят до 500 мл; 3. 80 % раствор сернокислого цинка – 80 г сернокислого цинка растворяют в 100 мл H_2O ; 4. Изобутиловый или этиловый спирт (в капельнице); 5. 1 % спиртовой раствор фенолфталеина – 1 г фенолфталеина + 74 мл этанола и доводят водой до 100 мл; 6. $CaCO_3$ кристаллический; 7. 0,5 н раствор HCl – 42 мл HCl доводят до 1000 мл; 8. 10 % и 1 % растворы роданистого KCNS или NH_4CNS . Роданбромистый раствор готовят перед употреблением: к

охлажденной на льду бромной воде, взятой в количестве, требуемом для анализа, под тягой приливают по каплям 10 % раствор роданистого калия или аммония до светло-желтого окрашивания, а затем 1 % раствор до полного обесцвечивания; к обесцвеченной бромной воде добавляют постепенно небольшими порциями по 20–30 мг CaCO_3 до полного прекращения выделения H_2CO_3 и образования осадка CaCO_3 ; раствор фильтруют через плотный фильтр в склянку из темного стекла и хранят на холоду; 8. 8 % раствор метола (хч), готовят перед употреблением в 0,5 н соляной кислоте: 9. Стандартный раствор никотиновой кислоты (основной) – 500 г никотиновой кислоты помещают в колбу на 500 мл, добавляют 5 мл 10 н серной кислоты и когда кристаллы растворятся, объем доводят до метки. Раствор пригоден к использованию в течение года при хранении на холоде; 10. Рабочий стандартный раствор – 1 мл основного стандартного раствора никотиновой кислоты доводят до 1000 мл дистиллированной водой в мерной колбе и тщательно перемешивают. Каждый миллилитр этого раствора содержит 10 мкг ниацина. Раствор готовят перед употреблением.

Оборудование. Спектрофотометр, водяная баня.

Ход определения витамина B_5 в тканях. 1 г ткани гомогенизируют в 10 мл воды, содержимое переносят в колбу, гомогенизатор промывают водой 2 раза по 5 мл. Добавляют 20 мл 4 н раствора серной кислоты и гидролизуют на кипящей водяной бане в течение 90 мин, время от времени перемешивая содержимое. Затем колбу вынимают и охлаждают до комнатной температуры, доводят водой до 45–50 мл, тщательно перемешивают и фильтруют через складчатый фильтр или центрифугируют. В колбу или цилиндр помещают 25 мл фильтрата, приливают 1–2 капли фенолфталеина, затем добавляют по каплям 60 % раствор КОН до слабо розового окрашивания, избыток щелочи нейтрализуют 1–2 каплями 4 н раствора серной кислоты (до исчезновения розового окрашивания). Раствор охлаждают, добавляют 2 мл 80 % раствора сернокислого цинка. Из пипетки по каплям добавляют 60 % КОН, одновременно энергично помешивая палочкой до образования осадка и появления бледно-розового окрашивания. Оставляют стоять в течение 10 мин, перемешивая несколько раз, Палочку вынимают, обмывая над колбой и доводят объем до 50 мл, перемешивают и фильтруют. Анализ можно прервать на этой стадии на 7–10 дней.

Для цветной реакции используют 8 пробирок или колб с притертыми пробками. Помещают в большой штатив три пробирки, в которые добавляют : 1) 5 мл воды; 2) 0,5 мл рабочего стандартного раствора + 4,5 мл воды; 3) 1,0 мл рабочего стандартного раствора + 4,0 мл воды. Далее все операции проводят как с гидролизатом. В этот же большой штатив помещают по 2 пробирки с 5 мл гидролизата, в маленький – по 1 пробирке с 5 мл гидролизата. Большой штатив помещают в баню на 5 мин при $50 \pm 2^\circ\text{C}$, а затем в пробирки большого штатива доливают по 2 мл роданбромистого реактива; в пробирки маленького – по 2 мл дистиллированной воды. Оба штатива помещают в баню на 10 мин при 50о, затем пробирки вынимают, быстро охлаждают водой до комнатной температуры и оставляют на 10 мин в темноте. Далее во все пробирки наливают по 3 мл метода (9 % раствор в 0,5 н HCl), перемешивают содержимое и ставят в темное место на 60 мин. По истечении часа все растворы фильтруют и спектрофотометрируют при длине волны 405 нм.

Ход определения витамина B_5 в крови, молоке, молозиве. Кровь, молоко или молозиво по 10–15 мл разводят водой (1:1), к полученному объему добавляют равный объем 4 н H_2SO_4 и на 60 мин ставят на кипящую водяную баню. Затем доводят объем до 45 мл и фильтруют. Далее процедуры выполняют согласно методике для тканей.

Ход определения витамина B_5 в кормах. 5 г хорошо измельченного растительного материала заливают 40–50–70 мл 4 н H_2SO_4 . Проводят

гидролиз на кипящей водяной бане в течение 90 мин. Фильтруют, далее весь процесс повторяют как описано в методике для тканей.

Расчет результатов анализа проводят по формуле:

$$B_5 = (A - A_1) \cdot V \cdot V_2 \cdot a / (B - B_1) \cdot V_1 \cdot V_3 \text{ г}$$

где B_5 – содержание никотиновой кислоты в мкг на 1 г навески; A – величина оптической плотности испытуемого раствора; A_1 – величина оптической плотности для поправок на аминореагирующие вещества; B – величина оптической плотности стандартного раствора; B_1 – величина оптической плотности для поправки на реактив; V – объем гидролизата; V_1 – количество гидролизата, взятого для очистки сернокислым цинком; V_2 – конечный объем раствора после очистки сернокислым цинком; V_3 – количество испытуемого раствора, взятого для цветной реакции; $г$ – навеска (г); a – содержание никотиновой кислоты в 5 мл стандартного раствора.

6. Определение витамина B_6 (общего пиридоксина) микробиологическим методом (10)

Термином "пиридоксин" обозначают три природные формы витамина B_6 – пиридоксин, пиридоксаль и пиридоксамин, а также фосфорные эфиры этих соединений. В обычных физиологических условиях в тканях животных подавляющая часть витамина B_6 и его производных присутствует в форме коферментов, в основном в виде пиридоксальфосфата. Наиболее точно, просто и быстро пиридоксин количественно определяется микробиологическим методом ибо химические методы достоверны только при исследовании чистых растворов витамина.

Принцип метода. Метод основан на способности некоторых микроорганизмов для своего роста использовать только свободные, не связанные с белками, формы витамина B_6 . Поэтому для определения пиридоксина исследуемый образец необходимо подвергать автоклавированию. Наиболее часто для количественного определения витамина B_6 используют индикаторную тест-культуру *Saccharomyces Ludwigii* KM.

Реактивы. 1. Основная среда, на которой поддерживается рост дрожжевой культуры *S.Ludwigii* KM – сусло-агар, приготовленный из суслы (7°) с прибавлением 2 % агар-агара. 2. Сахаро-минеральная среда Ридер, в которую засевают индикаторную культуру при определении пиридоксина. Состав среды Ридер в %: сахароза – 2, $(NH_4)_2SO_4$ – 0,3; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,07, NaCl – 0,05, $Ca(NO_3)_2$ – 0,04, KH_2PO_4 – 0,1; K_2HPO_4 – 0,01. Среду готовят на кипяченой водопроводной воде и стерилизуют в автоклаве при 0,5 атм в течение 30 мин. Сахарозу предварительно очищают, для чего 20 % раствор сахарозы перемешивают в течение 45 мин с 5 % активированного угля, затем фильтруют и добавляют в среду; 3. 10 %-ный дрожжевой автолизат, освобожденный от витамина B_6 , нейтрализуют раствором NaOH до pH 7,0 и наливают тонким слоем в чашку Петри (10 мл автолизата в чашку диаметром 10 см) и облучают кварцевой ультрафиолетовой лампой (ПРК-2) на расстоянии 25 см от горелки. Облучение продолжают в течение 4–6 часов. Этого времени достаточно, чтобы разрушить имеющийся в дрожжевом автолизате пиридоксин. В автолизат, испаряющийся при нагревании, время от времени следует добавлять дистиллированную воду для восстановления общего объема жидкости. Облученный автолизат можно заменить смесью 4 витаминов – тиамин, никотиновой кислоты, пантотеновой кислоты и биотин. Исходный раствор первых трех витаминов готовят в концентрации 1000 мкг/мл, а биотин – 0,25 мкг/мл; Растворы витамина B_6 с концентрацией 1000, 100, 10, 1, 0,1, 0,01 и 0,001 мкг/мл. Растворы витаминов стерилизуют нагреванием в кипящей водяной бане в течение 20 минут.

Оборудование. Термостат.

Ход определения витамина В₆. Для построения стандартной кривой проводят следующие процедуры: 1. Индикаторную культуру *S.Ludwigii* КМ пересевают за 2 суток до опыта на сусло-агар и выдерживают в термостате при 27°C. Перед постановкой опыта готовят сильно разведенную суспензию дрожжей с концентрацией около 0,01 % на стерильной водопроводной воде. 2. К среде Ридер добавляют 2 % облученного автолизата или необходимые для индикаторной культуры витамины (кроме пиридоксина) в количестве 1 мл исходного раствора на 200 мл среды. Среду разливают стерильно в конические колбочки (на 50 мл) по 10 мл в каждую. 3. В колбочки добавляют возрастающие количества пиридоксина: 0,0001, 0,0005, 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1 мкг/мл среды. 4. Содержание колб засевают каплей разведенной ранее суспензии дрожжей и выдерживают в термостате при 27° в течение 40–48 часов и затем фильтруют через предварительно взвешенные мембранные фильтры №3, смонтированные на приборе Зейтца. Фильтры сушат и взвешивают. 5. Вычерчивают стандартную кривую нарастания веса культуры (в мг сухого вещества) в 10 мл среды за 40–48 час, в зависимости от содержания пиридоксина в среде (в мкг/мл).

Для определения витамина В₆ готовят индикаторную культуру и среду так же, как указано выше. Исследуемые на содержание пиридоксина растворы (биологические жидкости, гидролизаты, вытяжки) разводят и добавляют в среду с таким расчетом, чтобы концентрация определяемого витамина в конечном счете находилась между концентрациями, соответствующими 0,0001 и 0,01 мкг/мл среды. Колбочки засевают таким же количеством индикаторной культуры, как и для построения стандартной кривой, и ставят на 40–48 часов в термостат при 27°C.

Расчет. По сухому весу культуры устанавливают, пользуясь стандартной кривой, содержание пиридоксина в мл индикаторной среды. Зная степень разведения, вычисляют содержание пиридоксина в образце. При определении пиридоксина в новом, еще не исследованном субстрате, целесообразно подвергнуть часть пробы облучению ртутно кварцевой лампой и установить, не содержит ли этот субстрат, после разрушения пиридоксина, каких-либо активирующих или угнетающих развитие индикаторной культуры веществ. В случае обнаружения таковых это должно быть принято во внимание при окончательных расчетах.

6.1. Определение витамина В₆ в комбикормах и премиксах (11)

Принцип метода. Метод основан на микробиологическом определении витамина В₆ с помощью индикаторного организма *Sacchromyces carlsbergensis* (АТСС 9080). Экстракцию витамина В₆ проводят из образца, обработанного кислотой в автоклаве. После инкубации с микроорганизмом определяют содержание витамина по увеличению роста *S.carlsbergensis*, определяя степень мутности при 580 нм.

Реактивы. Насколько возможно, все реактивы должны быть аналитического качества. 1. HCl – 0,44 моль/л; 2. HCl – 0,1 моль/л; 3. NaOH – 0,1 моль/л; 4. NaOH – 1 моль/л; 5. АРТ-агар, приготовленный согласно инструкции изготовителя; 6. АРТ-бульон, приготовленный согласно инструкции фирмы-изготовителя (стерилизуется 30 мин при 120° или 1 атм); 7. Среда пиридоксина (с контрольным питательным раствором Дифко); 8. Стандартный раствор. Растворяют 10 мг пиридоксина солянокислого (сухой порошок) в 100 мл дистиллированной воды. Этот раствор сохраняется 4 недели при 4°C. Рабочий стандартный раствор готовят, внося аликвоту не менее 5 мл основного раствора с рН 5,0 и растворяя дистиллированной водой 1:1000. Предостережение: витамин В₆ чувствителен к свету!

Для поддержки чистоты культуры *S.Carlsbergensis* (АТСС 9080) делают посев на скошенный агар-АРТ. Субкультура: месячная. Пересевают еженедельно со скошенного агара в инокулюм. Инкубация 24 часа

при 30°C. Хранить при 4°C. Альтернатива связана с глубиной замораживания (охлаждения) пробирок. Способ культивирования – клетки суспендируют в питательный бульон (АРТ-бульон). Концентрация клеток 5×10^8 /мл. Замораживать в жидком азоте в количестве 1,5 мл. хранить под жидким азотом.

Оборудование. Измельчитель кормов, автоклав, центрифуга, рН-метр со стеклянными электродами, маленький испаритель для автоклава, встряхиватель, баня водяная, термостат, магнитная мешалка для смешивания реактивов, разбавитель, фотометр, калькулятор (персональный компьютер).

Подготовка инокулята. Питательный раствор: АРТ-бульон. Инокуляция: петлей снимают культуру со скошенного агара и переносят в 10 мл питательного раствора. Инкубируют 16–18 часов при 30°C. Питательный бульон АРТ растворяют 1:10. Инкубируют 6 часов при 30°C, встряхивая.

Альтернатива. Инокуляция: оттаять пробирку и растворить в 10 мл АРТ-бульона. Инкубируют 6 часов при 30°, встряхивая. Отмывают клетки 3 раза в физиологическом растворе, центрифугируют 5 мин при 3500 об/мин. Фотометрия инокулята: от 0,4 до 0,7 при 580 нм.

Ход определения витамина В₆. Испытуемый цельный материал измельчают до тонкого порошка в ступке или на мельнице. Точно взвешивают 10 г образца. Гомогенизируют и суспендируют в 50 мл HCl (0,44 моль/л). Автоклавируют при 120° в течение 60 мин. Затем охлаждают до комнатной температуры, регулируют объем и фильтруют через складчатый фильтр или центрифугируют. Регулируют аликвоту минимум 5 мл фильтрата и доводят рН до 5,0 с NaOH. Разбавляют водой до конечной концентрации 100 пг/мл В₆. Берут 3 образца с разной исследуемой концентрацией и 3 со стандартной концентрацией. Вначале заливают 10 мл питательного бульона (специальная среда с пиридоксином; см. раздел "Реактивы") и добавляют 0,025, 0,05 и 0,10 мл экстракта или стандартного раствора. 6 пустых пробирок добавку не содержат. Содержимое пробирок подогревают 10 мин при 100°C. Затем охлаждают до комнатной температуры. Все опытные пробирки, кроме двух холостых, инокулируют 1 каплей инокулята (см. "Приготовление инокулята"). Далее все пробирки инкубируют 16–18 часов при 30°C в водяной бане (термостате).

Степень помутнения клеточной суспензии определяют при 580 нм.

Определение будет недействительным, если имеется большая разница в контроле (холостых инокулятах). Условия опыта (среда, вода и т.п.) должны тщательно проверяться.

Расчеты. Оценку содержания витамина В₆ 6-точечным методом ведут по Cavalli Sperza с программным калькулятором и персональным компьютером. Определение недействительно, если в параллелях опытных проб и контроля имеются значительные различия. В таком случае должны быть испытаны различные методы экстракции. Исследования образцов проводят в двух независимых повторностях. Соответственно повторяют определения до достижения различий в ± 10 %. В противном случае опыт необходимо повторить.

Если отклонения в образцах по кривой обнаруживаются в верхней и нижней части, тогда анализы повторяют четырехточечным методом (Cavali Sperza) или повторяют еще раз.

Примечание: необходимо тщательно контролировать каждую партию питательного бульона, степень прогревания и охлаждения клеток (замораживания) и результаты сверять с калибровочным графиком. Концентрация витамина В₆ в пробе (1 нг/мл) должна находиться в линейной зависимости на логарифмической кривой. Вариации результатов не должны превышать ± 10 %.

7. Определение общего витамина С в органах и тканях (12)

Принцип метода. Метод основан на извлечении витамина С из мелкоизмельченной ткани смесью (в равных объемах) 8 %-ной метафосфорной и 16 %-ной трихлоруксусной кислот, последующем добавочном извлечении 5 %-ной уксусной кислотой (общее число экстракций равно трем) и титровании экстракта 2,6-дихлорфенолиндофенолом.

Реактивы. 1. 0,001 н разведенный вдвое раствор дихлорфенолиндофенола (реактив Тильманса): берут 0,2 г краски, растворяют в 1 л воды, энергично взбалтывая (оставить раствор на ночь), затем раствор фильтруют и доливают водой до 1 л. Раствор хранят в темном месте в склянке из темного стекла не более 7 дней; 2. 8 %-ный раствор метафосфорной кислоты (метафосфорная кислота при температуре 5° имеет срок годности 2 недели, при температуре 25° уже через 3 дня хранения около 20 % ее может перейти в ортофосфорную); 3. 16 %-ный раствор ТХУ; 4. 5 %-ный раствор уксусной кислоты (на 1 л воды берут 58,1 мл 90 %-ной уксусной кислоты); 5. Насыщенный раствор щавелевокислого аммония или натрия: на аналитических весах отвешивают 0,67 г щавелевокислого натрия. Эта соль очень гигроскопична, поэтому перед взятием навески ее ставят на несколько часов в открытом боксе над серной кислотой в эксикаторе; затем навеску растворяют в 100 мл дважды перегнанной воды, то есть готовят точный 0,1 н раствор щавелевокислого натра. Этот раствор употребляют свежим и не хранят. Для приготовления 0,01 н раствора навеска щавелевокислого аммония равна 0,062 г.

Титрование марганцевокислым калием идет при прибавлении к 10 мл раствора щавелевокислого натра 2,5 мл серной кислоты (уд.в. 1,84; разведение 1:2), причем колбочку с раствором щавелевокислого натра нагревают на водяной бане до температуры, близкой к кипению (не следует допускать кипения).

На окончание реакции указывает слабозеленая окраска. Титр марганцевокислого калия устанавливают не менее чем на двух навесках щавелевокислого натра и аммония и проверяют также через 3–4 недели. Поправку на титр краски (индикатора) вычисляют по формуле:

$$X = a \cdot v/c,$$

где a – количество соли Мора, пошедшее на титрование 10 мл данного раствора индикатора, мл; v – количество раствора марганцевокислого калия, израсходованное на титрование 10 мл соли Мора, мл; c – количество марганцевокислого калия, пошедшее на титрование 10 мл точного 0,01 н раствора щавелевокислого натрия, мл; 6. Приблизительно 0,01 н раствор соли Мора: навеску в 3,92 г соли растворяют в 1 л 0,01 %-ной серной кислоты. Титр соли Мора устанавливают по 0,01 н раствору марганцевокислого калия; на 10 мл соли Мора, наливаемой в колбочку Эрленмейера, приливают 1,5 мл серной кислоты (уд.в. 1,84, разводят водой в соотношении 1:2). Титрование заканчивают при появлении стойкого слабо-розового окрашивания раствора. Раствор соли Мора хранят в склянке из темного стекла. Титр его проверяют через 3–4 недели. Раствор дихлорфенолиндофенола ежедневно титруют по соли Мора известного титра: в колбочку Эрленмейера наливают 10 мл реактива Тильмана, а в бюретку – раствор соли Мора (приблизительно 0,01 н), титр которого известен; к краске прибавляют 5 мл насыщенного раствора щавелевокислого аммония (в его присутствии реакция идет до конца, но сам он не вступает в реакцию). Титрование считается законченным, когда голубой цвет индикатора сменится на соломенно-желтый; 7. Приблизительно 0,01 н раствор перманганата: титр 0,01 н марганцевокислого калия получают разведением приблизительно децинормального раствора перманганата, хранящегося в лаборатории и установли-

вают по точной навеске щавелевокислого натра или аммония. Для получения децинормального раствора перманганата в 1 л воды растворяют 3,16 г KMnO_4 ; вначале раствор меняет свой титр, поэтому его следует выдержать до употребления в склянке из темного стекла 10–14 дней; 8. Щавелевокислый натрия или аммоний (хч); 9. Серная кислота (уд.в. 1,84, разведенная водой в соотношении 1:2); 10. 0,01 %-ный раствор серной кислоты (0,56 мл серной кислоты с уд.в. 1,84 на 1 л воды); 11. Бидистиллят; 12. Стеклопудра (из чистого лабораторного стекла).

Оборудование. Центрифуга, весы аналитические, ступка с пестиком, бюксы, центрифужные стаканчики, пипетки, фильтры.

Ход определения. Отмеривают пипеткой и наливают в бюкс метафосфорную и трихлоруксусную кислоту в равных объемах. Взвешивают на аналитических весах бюкс с налитой смесью. Туда же кладут навеску (2–3 г) исследуемого органа и так же взвешивают. Содержимое бюкса переливают в ступку, в нее вносят 3–5 г стеклопудры и все тщательно растирают до получения совершенно однородной размельченной массы. При растирании необходимо следить за тем, чтобы навеска была покрыта жидкостью. Полученную взвесь переливают по стеклянной палочке в центрифужный стаканчик; бюкс ополаскивают уксусной кислотой и сливают в ступку, ополаскивая ее налитой кислотой; жидкость сливают в центрифужный стаканчик; попутно ополаскивается и палочка. Затем центрифугируют экстракт до тех пор, пока получится прозрачный центрифугат. Его осторожно сливают в мерную колбочку через маленькую воронку. Всю дальнейшую экстракцию витамина ведут уже 5 %-ной уксусной кислотой.

Так как общий объем экстракта должен быть равен 25 или 50 мл, то для дальнейших двух экстракций отмеривают цилиндром соответствующее количество уксусной кислоты, которое делят на две части. Уксусной кислотой, предназначенной для второй экстракции, ополаскивают последовательно в несколько приемов бюкс, палочку и ступку. Всю жидкость каждый раз сливают в центрифужный стаканчик, на дне которого находятся навеска органа (измельченная) и стеклопудра. Полученную взвесь взбалтывают несколько раз с помощью стеклянной палочки и вновь центрифугируют до получения немутного центрифугата, который сливают в мерную колбу и проводят третью по счету экстракцию витамина С. Жидкость в мерной колбочке доливают из капельницы уксусной кислотой до метки и хорошо смешивают.

В микробюретку наливают 0,001 н раствор дихлорфенолиндофенола, разведенный вдвое, а в маленькие пробирки для титрования отмеривают 1–2 мл полученного экстракта. Дихлорфенолиндофенол прибавляют к экстракту по капле, одновременно взбалтывая содержимое пробирки. Об окончании реакции свидетельствует появление розового окрашивания. Титрование повторяют трижды с новыми порциями экстракта. Расхождение в показаниях между отдельными титрованиями не должно превышать 0,02–0,03 мл. Например, печень морской свинки весит 6,1 г, смесь центрифугатов доведена в мерной колбе до 50 мл, взято для титрования 2 мл. При первом титровании пошло 0,63 мл, при втором – 0,64 и третьем – 0,62 мл индикатора, то есть в среднем 0,63 мл.

Расчет. Количество аскорбиновой кислоты с учетом того, что поправка (К) на титр краски для перевода ее точно на 0,001 н раствор дихлорфенолиндофенола равна 0,5 и 1 мл 0,001 н раствора реактива Тильмана соответствует 0,088 мг аскорбиновой кислоты, что вычисляется по формуле:

$$X = 0,63 \cdot 0,5 \cdot 50 \cdot 0,088 \cdot 100 / 2 \cdot 6,1 = 11,4 \text{ мг \%}$$

7.1. Определение I-аскорбиновой и I-дегидроаскорбиновой кислот в крови и тканях экспресс-методом

Принцип метода. Метод определения общей аскорбиновой кислоты (то есть суммы I-аскорбиновой и I-дегидроаскорбиновой кислот) заключается в способности I-аскорбиновой кислоты окисляться до I-дегидроаскорбиновой кислоты в присутствии активированного угля. Кетогруппы обеих форм аскорбиновой кислоты в присутствии тиомочевины реагируют с 2,4-динитрофенилгидразинем и дают 2,4-динитрофенилозазоны, окрашенные в желто-оранжевый цвет. Полученный осадок 2,4-динитрофенилозазонов растворяют в 85 % серной кислоте и колориметрируют при зеленом светофильтре при длине волны 520 нм.

Реактивы. 1. 2 % раствор 2,4-динитрофенилгидразина в 9 н серной кислоте. Реактив оставляют на ночь, затем фильтруют через фильтр Гуча с помощью водоструйного насоса, а перед употреблением – через обеззоленный фильтр. Реактив следует держать на холоду, появление мути указывает на его непригодность. Для дозировки реактивов используют капельные пипетки, титрованные на определенное количество реактивов; 2. Тиомочевина: 10 г растворяют в 50 мл абсолютного этилового спирта и доводят до объема 100 мл дистиллированной водой. Для проверки восстанавливающей способности тиомочевины к 1 капле ее раствора добавляют 1 каплю 1 н раствора марганцевокислого калия. При этом в кислой среде произойдет обесцвечивание перманганата; 3. Активированный уголь должен обладать способностью переводить восстановленную форму аскорбиновой кислоты в окисленную в условиях опыта. При предварительной обработке активированного угля к 200 г его добавляют 1 л 10 % раствора соляной кислоты, смесь кипятят и фильтруют через воронку Бюхнера. Осадок угля перемешивают с 1 л дистиллированной воды и воду сливают. Эту процедуру повторяют несколько раз до получения отрицательной реакции к KCNS. Обработанный активированный уголь высушивают при 120°C и растирают в ступке. Возможно применение активированного угля (карболена) без предварительной его отмывки. При этом необходимо водный экстракт угля проверить реакцией на железо с KCNS. 4. Серная кислота, 85 % раствор; 5. Трихлоруксусная кислота (ТХУ), 4 % и 24 % растворы; 6. Стандартные растворы аскорбиновой кислоты (см. ниже).

Оборудование. Центрифуга, колориметр, водяная баня. Ход определения. Определение I-аскорбиновой кислоты проводят в безбелковом фильтрате без добавления угля. В параллельной пробе можно определить общую аскорбиновую кислоту (I-аскорбиновую и I-дегидроаскорбиновую кислоту) с добавлением угля. Разность между количеством общей аскорбиновой и I-аскорбиновой кислотой (восстановленная форма) показывает количество I-дегидроаскорбиновой кислоты, то есть ее окисленной формы.

Берут 0,6 мл крови, прибавляют по каплям к 0,2 мл 24 % раствора ТХУ (перемешивают стеклянной палочкой) и оставляют на 5 минут на холоду. Белки осаждают центрифугированием в течение 10 минут при 2500–3000 об/мин. Белковый фильтрат сливают в маленькую центрифужную пробирку и прибавляют 1 чайную ложку (0,04 г) активированного угля (предварительно обработанного). Затем встряхивают с углем в течение 1 минуты и центрифугируют в течение 10 мин при 2500–3000 об/мин. Надосадочную жидкость насасывают в микрокювету. При наличии мути от угля в расширение кюветы предварительно вставляют маленький кусочек обеззоленного фильтра и затем насасывают жидкость. Если для анализа берут ткань, то навеску ее (надпочечники 5–10 мг, печень и мозговая ткань 100–150 мг) взвешивают на торсионных весах и растирают в центрифужной пробирке с кварцевым песком или в гомогенизаторе с 2 или 1 мл 4 % раствора ТХУ. Гомогенат фильтруют или цен-

трифугируют при 2500–3000 об/мин в течение 10 мин, К безбелковому фильтрату добавляют 0,04 г активированного угля. Смесь взбалтывают в течение 1 мин и центрифугируют в течение 10 мин. Затем в маленькие пробирки вносят 4 капли (0,08 мл) фильтрата, добавляют 1 каплю тиомочевины и 1 каплю профильтрованного 2,4-динитрофенилгидразина. Пробирки помещают в металлический штатив с гнездами, закрывают стеклянной или металлической крышкой и погружают на 5 мин в кипящую водяную баню. Одновременно ставят 2 контрольные пробы: к 4 каплям фильтрата (как для крови, так и для исследуемой ткани) добавляют 1 каплю тиомочевины и пробирки также погружают в штативе в кипящую баню. Штатив с пробирками охлаждают в ледяной воде в течение 20 минут. При этом происходит выпадение кристаллов озозонов. Для их растворения в каждую пробирку медленно приливают 6 капель серной кислоты. После каждой капли содержимое пробирок перемешивают стеклянной палочкой (штатив с пробирками должен стоять на льду). В случае перегрева образуется муть, мешающая колориметрированию. Колориметрируют на ФЭК-Н-57 (чувствительность 4) в микрокюветах, вставленных в специальные вкладыши против соответствующего контроля. Предварительно устанавливается обязательно нулевая точка сначала по воде справа и слева, а затем контроль справа и слева.

Проведенные на СФ-10 исследования зависимости пропускания света через анализируемые растворы от длины волны показали, что лучше всего фотометрию проводить при зеленом фильтре (длина волны 520 нм). При использовании же синего светофильтра получаются завышенные значения за счет ацетоуксусной кислоты, углеводов и других веществ.

Расчет. Для расчета содержания I-аскорбиновой кислоты (восстановленной формы) и I-дегидроаскорбиновой (окисленной формы) необходимо строить два калибровочных графика со стандартными растворами аскорбиновой кислоты: а) аскорбиновая кислота + ТХУ без угля (данный график используется для определения I-аскорбиновой кислоты) и б) аскорбиновая кислота + ТХУ + активированный уголь (этот график используется для определения общей аскорбиновой кислоты (восстановленная форма I-аскорбиновой и I-дегидроаскорбиновой кислот).

Полученные показатели экстинкции исследуемого безбелкового фильтрата с углем и без угля откладывают на каждой кривой и находят количество аскорбиновой кислоты, соответствующее общей и восстановленной формам аскорбиновой кислоты. Расчет для тканей производят по формуле:

$$X = A \cdot B \cdot 100 / 0,08 \cdot \text{навеска}$$

где X – содержание аскорбиновой кислоты, мкг %, A – количество аскорбиновой кислоты (мкг), содержащееся в 4 каплях (0,08 мл) стандартного раствора; B – разведение; 0,08 – количество безбелкового фильтрата (без учета угля и с углем, реагирующего с 2,4-динитрофенилгидразином). Полученную величину выражают в мкг %.

Для построения калибровочного графика используют кристаллическую аскорбиновую кислоту, растворенную в 4 % растворе ТХУ. Основной раствор содержит 50 мг кислоты в 100 мл 4 % раствора ТХУ. Рабочие растворы быстро готовят из основного, где при построении первого графика уголь не добавляют к стандартным растворам аскорбиновой кислоты, а при построении второго графика к 25 мл основного раствора добавляют 0,2 г активированного угля (обработанного) и встряхивают в течение минуты. Смесь фильтруют через обеззоленный фильтр. Фильтрат используют для получения стандартных растворов различной концентрации путем разбавления его 4 % раствором ТХУ. ТХУ также предварительно обрабатывают активированным углем из расчета на 25 мл

раствора ТХУ 1/2 чайной ложки (0,2 г) угля, встряхивают в течение минуты и фильтруют через обеззоленный фильтр.

Калибровочные графики без добавления угля и с его добавлением строят с помощью растворов, содержащих от 0,5 до 5 мкг аскорбиновой кислоты в 0,08 мл (4 каплях) раствора.

Стандартные растворы обрабатывают так же, как и опытные, только в кипящей бане их следует держать 10 мин. Колориметрируют против контролей, которые получают из рабочих растворов аскорбиновой кислоты аналогично тому, как это описано для контролей при определении содержания аскорбиновой кислоты в крови и тканях.

Описанный метод является специфическим – такие вещества, как пируват и адреналин не реагируют а данных условиях с 2,4-динитрофенилгидразином. Окраска растворов, подлежащих фотометрии, устойчива, она сохраняется в течение нескольких часов. Нагревание стандартных растворов в продолжении 10 мин при 100° дает такие же результаты, как и нагревание при 56° в продолжение часа.

7.2. Определение общего витамина С в плазме крови

Принцип метода. Метод основан на реакции восстановления йодноватокислого калия аскорбиновой кислотой.

Реактивы. 1. 10 %-ный раствор трихлоруксусной кислоты; 2. 2 % раствор йодистого калия; 3. 1 % раствор крахмала; 4. 0,001 н раствор йодноватокислого калия (KJO₃), приготовленный из 0,1 н раствора; 5. 1,34 % раствор щавелевокислого натрия.

Оборудование. Центрифуга.

Ход определения. В химическую пробирку наливают 0,5 мл 1,34 % раствора щавелевокислого натрия и до 8 мл крови из вены. Стеклопалочкой перемешивают и центрифугируют при 2500–3000 об/мин для получения плазмы. В пробирку с плазмой, лучше! градуированную, прибавляют равное количество 10 % раствора ТХУ, смешивают стеклопалочкой, фильтруют через предварительно смоченный ТХУ фильтр или центрифугируют. В градуированную или отмеренную на 10 мл пробирку наливают 2 мл фильтрата (центрифугата), 0,5 мл 2 % раствора йодистого калия и 1 каплю крахмала, титруют 0,001 н раствором йодноватокислого калия до появления бледносинего окрашивания.

Параллельно ставят контрольный опыт: в пробирку наливают 1 мл ТХУ, 1 мл дистиллированной воды, 0,5 мл 2 % раствора йодистого калия, 1 каплю крахмала и титруют так же, как и опытную пробу. При титровании приливают раствор KJO₃, но не каплями, а по стенке пробирки по 0,1 мл из микробюретки или пипетки на 1 мл. Из количества KJO₃, израсходованного на титрование пробы крови, вычитают количество KJO₃, пошедшее на титрование контрольной пробы. Обычно на контрольную пробу берут 0,01–0,02 мл. Миллилитр 0,001 н раствора KJO₃ соответствует 0,088 мг аскорбиновой кислоты.

Расчет. Содержание витамина С определяют по формуле:

$$X = a \cdot 0,088 \cdot 100 \text{ (мг \%)},$$

где *a* — количество KJO₃, пошедшее на титрование пробы крови минус количество KJO₃, пошедшее на титрование контрольной пробы, мл; 100 – коэффициент перевода.

Литература

1. Дмитровский А.А., Колмыкова В.И., Соловьева Н.В., Ермилова Л.К. Новое в методах исследования, диагностики, лечения и профилактике заболеваний. М., 1972:119-121.
2. Папендик К. Сельское хозяйство за рубежом. 1961,4:38-39.
3. Строжа И.К., Вевере Л.К. Биохимия и физиология питания животных. Рига:Зинатне, 1972:159-162.

4. De Vries E.I. et al. *J.Vitaminology*, 1969, 15:189-197.
5. Ионов И.А., Стефанович А.А., Сурай П.Ф., Жедек М.С. Методические рекомендации по определению витамина К в растительном материале. Харьков, 1986.
6. Manz U., Maurer K. Analytical method for the determination of vitamin K₃ in pre-mixes and animal feedstuffs with the aid of high performance liquid chromatography. *Intern.J.for Vitamin and Nutr.Res.*, 1982, 52:248-252.
7. Поволоцкая К.Л., Зайцева Н.И., Скоробогатова Е.П. Витаминные ресурсы и их использование. М.: Изд. АН СССР, 1953: 108.
8. Островский Ю.М. Экспериментальная витаминология. Минск:Наука и техника, 1979:288-291.
9. Степанова Е.Н. Определение витамина В₅. Вопросы питания, 1963, 4: 66.
10. Помошникова Н.А. Микробиологический метод определения пиридоксина (витамина В₆). В кн: Витаминные ресурсы и их использование. М.: Изд. АН СССР, 1955:146-151.
11. Poliansky M. In: *Methods in vitamin B₆. Nutrition, analysis and status* (J.F.Leklem J.F., Leklem K.D., eds). New-York-London, 1961:21-44.
12. Лебедева Т.Т., Усович А.Г. Методы исследования кормов, органов и тканей животных. М.:Россельхозиздат, 1976.
13. Циеленс Э.А. Определение холина в биологическом материале. В кн: Биохимия и физиология питания с.-х. животных, Рига: Зинатне, 1972, 175-183.

IV. Методы анализа минеральных элементов и их соединений

1. Общий принцип определения минеральных веществ

1.1. Подготовка проб к анализу

Для повышения точности анализа минерального состава биологических объектов большое внимание следует уделять качеству воды и реактивов, чистоте посуды, а также технике отбора, хранения и подготовке проб к анализу. При определении минеральных веществ и особенно микроэлементов обычно применяют бидистиллированную воду. Последнюю получают в деионизаторах (например, типа ЛД-502, Венгрия). Не рекомендуется использовать резиновые пробки и шланги, которые загрязняют пробы цинком, селеном и некоторыми другими элементами. Для полярографии, спектрального анализа и определения активности металлоэнзимов применяют реактивы высокой чистоты (марки "осч" или "хч"). При необходимости реактивы очищают перекристаллизацией, перегонкой или другими методами.

Стеклопосуду моют с применением соды или синтетических моющих средств, затем подогретой хромовой смесью, споласкивают дистиллированной водой, 10 %-ной HCl и 2–3 раза деионизированной водой. Тигли (фарфоровые, кварцевые, витреосилевые или платиновые) вымачивают в течение ночи в 6M HCl, после чего ополаскивают дистиллированной и деионизированной водой. Полиэтиленовую посуду вымачивают несколько часов в разведенной HNO₃ (1:1), ополаскивают теплой дистиллированной водой, а затем деионизированной. При работе с ферментами не следует использовать синтетические моющие средства.

Образцы кормов и тканей высушивают при 65°C до постоянной массы, измельчают и при необходимости хранят в полиэтиленовой или стеклянной посуде. Следует иметь в виду, что при высушивании, особенно при температуре выше 65°C, и длительном хранении проб могут иметь место потери йода, селена и некоторых других элементов.

Сжигание биологического материала производят сухим или мокрым способом, а также специальными методами, приведенными ниже.

Сухое озоление. В тигель помещают 1–5 г хорошо измельченного воздушно-сухого вещества корма или тканей организма и нагревают на электрической плитке до обугливания. Далее сжигают в муфельной печи при 500–550°C в течение 4–5 часов. Если в течение этого времени образец полностью не озолился, тигель охлаждают, добавляют около 1 мл разбавленной HNO₃ (1:1), высушивают пробу на плитке и помещают в муфельную печь на 1–2 часа. При необходимости эту операцию повторяют. Зола растворяют в 2 мл концентрированной HCl и выпаривают до суха. Далее приливают 8–10 мл 20 %-ной HCl, осторожно нагревают до кипения и переносят количественно в мерную колбу на 50 мл посредством беззольного фильтра. Тигель и фильтр тщательно споласкивают 1 %-ной HCl, доводят объем раствора золы до метки и перемешивают.

Сжигание при помощи смеси кислот. При использовании макрометода 2–5 г анализируемого вещества помещают в колбу Къельдаля на 100 мл, содержащую несколько стеклянных шариков, добавляют 3–7 мл смеси H₂SO₄ и HClO₄ (7:1) и 10–25 мл концентрированной HNO₃. При необходимости в процессе сжигания добавляют HNO₃. Когда жидкость станет прозрачной, пробы нагревают при большей температуре для удаления паров HClO₄ и HNO₃. Колбы охлаждают, приливают 5 мл воды^{x)} и переносят содержимое в мерные колбы на 50 мл, используя беззоль-

^{x)} Здесь и далее имеется в виду бидистиллированная или деионизированная вода.

ные фильтры. Колбы Кьельдаля и фильтры тщательно споласкивают водой и доводят объем до метки.

При сжигании микрометодом 0,1–0,5 г воздушно-сухого (0,25–1,0 г натурального) вещества корма, органов, тканей или 0,5–2 мл биологической жидкости (при взятии большего количества жидкость нужно предварительно выпаривать) помещают в сухую пробирку из термостойкого стекла с меткой на 10 мл или 20 мл, приливают 1–5 мл смеси $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$ (1:3:1) или $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$ (3:1), если образец содержит много кальция. Дают постоять несколько часов. Одновременно ставят контрольную пробу – смесь кислот. Чтобы сжигание шло равномерно, в пробирку следует опустить 2–3 узких, коротких стеклянных капилляра. Затем пробирки ставят на электроплитку с закрытой спиралью и регулятором напряжения, на которой установлена металлическая сетка, и сжигают, постепенно увеличивая температуру до тех пор, пока раствор не станет бесцветным (объем его 0,5–1 мл). Если во время сжигания содержимое пробирок стало желтым или почернело, нужно добавить 0,5–1 мл смеси кислот. При выпадении белого осадка в охлажденную пробирку добавляют 1–2 мл воды, нагревают в течение 30–40 мин при 120–150°C и вносят в горячий раствор 3–4 мл воды. После охлаждения пробирок объем доводят до метки водой и перемешивают.

Озоление с применением аппарата Ринькиса. В тигель помещают 5 г воздушно-сухого вещества анализируемого материала, добавляют 5–10 мл 50 %-ной HNO_3 и высушивают на электроплитке. Далее помещают в муфель при 500°C на 30–40 мин и заканчивают озоление в аппарате Ринькиса (1).

1.2. Расчет концентрации минеральных веществ

Для построения калибровочного графика готовят 5–6 стандартных растворов, охватывающих диапазон содержания определяемого элемента в исследуемых растворах. Определение оптической плотности стандартных и исследуемых растворов проводят в одинаковых условиях.

Расчет ведут по формуле:

$$X_1 = a \cdot b \cdot 1000 / n \cdot v \cdot 1000; X_2 = a \cdot b \cdot 100 / n \cdot v \cdot 1000000,$$

где X_1 и X_2 – концентрация минеральных веществ в мг на 1000 г (мл) или в г на 100 г (мл) анализируемого материала; a – отметка калибровочной кривой, мкг; b – объем раствора золы, мл; n – навеска, г или мл; v – объем раствора золы, взятого на анализ, мл; 100, 1000 или 1000000 – коэффициенты для пересчета на 100 (1000) г или мл (в числителе) и в мг или г (в знаменателе).

2. Определение кальция, магния и их соединений

2.1. Определение ионизированной формы кальция и магния

Принцип метода. Метод основан на определении ионизированной формы кальция и магния в биологических жидкостях с помощью катионообменной смолы Дауэкс-50 или специальных ионоселективных электродов.

Реактивы. 1. 4M HCl и 1M NaOH; 2. Спирт этиловый 96°.

Оборудование. Анализаторы типа SS-20 фирмы Orion Biomedical (США), колонки.

Ход определения. Перед работой смолу освобождают от мелких частиц и переводят в H-форму. Для этого ее суспендируют в 20-кратном количестве воды, переливают в цилиндр и оставляют отстаиваться. Через 20–30 мин мутную жидкость сливают, а к осадку снова добавляют такой же объем воды и повторяют описанную процедуру до полного просветления надосадочной жидкости. Осадок смолы переносят в хи-

мический стакан, заливают 20 объемами 4М HCl и перемешивают стеклянной палочкой в течение 1 часа. Далее переливают в цилиндр и промывают водой, как указано выше, до pH около 6. Затем смолу заливают 10 объемами 1М NaOH и перемешивают в течение 1 часа. Промывают водой пока pH не будет около 7. Затем снова обрабатывают HCl, как указано выше. Смолу переносят в склянку и заливают водой. Фракционирование элементов осуществляют в колонках (стеклянные трубки диаметром 1,5–2 см с оттянутым концом, в которые помещают стекловату, предварительно промытую 4М HCl и водой). Плазму крови пропускают через смолу (первую порцию плазмы отбрасывают), которая связывает ионизированные формы элементов. Белково-связанные формы можно, в свою очередь, разделить на связанные с альбуминами и глобулинами, обработав плазму, пропущенную через смолу, методом спиртового фракционирования.

Для определения ионизированного кальция в цельной крови и других биологических жидкостях имеются специальные анализаторы типа SS-20 фирмы Orion Biomedical (США), фирмы Nova Biomedical (США), фирмы КОНЕ (Финляндия), Отечественные фирмы (например, "Сенсор") также наладили производство ионоселективных электродов нового поколения для определения ионов кальция, магния, калия, хлора и других элементов.

2.2. Определение общего кальция методом фотометрического титрования (2).

Принцип метода. Определение сводится к прямому трилонометрическому титрованию плазмы (сыворотки) крови или раствора золы, куда предварительно добавляют мурексид. Кальциево-мурексидный комплекс красно-оранжевого цвета разрушается при добавлении трилона с освобождением мурексида, имеющего фиолетовый цвет. Переход окраски регистрируют с помощью спектрофотометра при длине волны 580 нм.

Реактивы. 1. 0,01 н раствор трилона Б ($\text{Na}_2 \cdot \text{ЭДТА}$) : 1,90 г реактива растворяют в 1 л воды. Из этого раствора готовят 0,001 н раствор трилона Б, который можно хранить до 2-х месяцев; 2. Смесь из 1 части мурексида и 25 частей NaCl, тонко растертая и перемешанная. 100 мг смеси растворяют в 100 мл воды. Используют через 3–4 часа. Раствор устойчив не более недели; 3. 10%- и 15%-ные растворы NaOH; 4. Стандартный раствор кальция (100 мкг/мл). 125 мг высушенного при 105°C углекислого кальция растворяют в 30 мл 0,1М HCl при подогревании и затем доводят водой до 500 мл.

Оборудование. Спектрофотометр.

Ход определения. В кювету спектрофотометра объемом 4 мл вносят 3 мл раствора мурексида, 0,1 мл 10 %-ного раствора NaOH и очень точно 0,1 мл стандартного раствора кальция (0,01 мг Ca). Содержимое перемешивают пластмассовой или стеклянной палочкой. Кювету помещают в кюветодержатель, устанавливают длину волны 580 нм и темновой ток. Открывают шторку и изменением ширины щели приводят стрелку мА к нулю. Затем добавляют из микробюретки на 1 мл 0,1 мл раствора трилона, перемешивают и определяют оптическую плотность (ОП), записывают результаты (количество добавленного трилона и величину ОП), снова прибавляют трилон и делают как указано выше. В конце титрования следует добавлять по 0,05 мл трилона. Титрование заканчивают после того, как ОП начинает снижаться. Количество пошедшего на титрование раствора находят по наибольшей величине ОП. Таким же способом определяют общий кальций (мг %) в 0,1 мл плазмы крови. Если на титрование идет более 1 мл трилона, то можно вносить по 2,5 мл раствора мурексида. Если определяют кальций в растворе золы, то материал озоляют сухим методом, а золу растворяют при подогревании в 1 н HCl. Титрование проводят так же, только применяют

15 %-ный раствор NaOH в количестве 0,2 мл. Для объектов, содержащих высокую концентрацию кальция, применяют 0,01 н раствор трилона и соответственно стандартный раствор Ca (1 мг/мл). Условия титрования опытной и стандартной пробы должны быть одинаковыми.

Расчет. Расчет ведут по формуле:

$$Ca = a/v \times 10,$$

где а и в – количество раствора трилона в мл, пошедшего на титрование пробы (а) и стандартного раствора кальция (в).

2.3. Трилонометрическое определение кальция и магния (2)

Принцип метода. Сумму кальция и магния определяют в присутствии индикатора хромогена черного ЕТ-00, а содержание кальция – с применением кальцеина или мурексида. Количество магния рассчитывают по разности объемов ЭДТА, затраченных на титрование. При определении суммы кальция и магния требуется соблюдение ряда условий: 1) наличие щелочной реакции среды (рН 10) при титровании кальция и магния с индикатором хромогеном черным и рН 12 при титровании кальция с мурексидом или кальцеином; 2) медленное проведение титрования для образования комплексных соединений кальция и магния с трилоном Б; и 3) чистота посуды и реактивов.

Реактивы. 1. 0,01 и 0,002 н растворы ЭДТА (приготовление описано в разделе 2.2). Титр раствора ЭДТА устанавливают по раствору магния, приготовленному из фиксанала; 2. Аммиачный буфер: 100 мл 20 %-ного раствора аммония хлорида смешивают со 100 мл 25 %-ного раствора аммиака. Смесь доводят водой до 1 л; 3. Раствор хромогена черного ЕТ-00: 0,2 г индикатора растворяют в 4 мл аммиачного буфера и доводят этанолом до 40 мл; 4. Рабочий раствор натрия сульфида: 4 мл насыщенного раствора Na₂S (26 г в 100 мл воды) доводят водой до 100 мл; 5. 10 %-ный раствор КОН со сроком хранения не больше недели; 6. Кальцеин: смешивают индикатор с K₂CO₃ в соотношении 1:100; 7. Раствор эриохрома черного Т: 0,15 г реактива смешивают с 0,5 г натрия тетрабората (бура) и растворяют в 25 мл метанола; 8. Смесь из 1 части мурексида и 25 частей NaCl, тонко растертая и размешанная.

Ход определения суммы кальция и магния. В коническую колбу на 100–150 мл приливают 20 мл воды, 1 мл рабочего раствора Na₂S, 5 мл аммиачного буфера, 3 капли хромогена черного и перемешивают. Жидкость приобретает сине-голубой или зеленовато-голубой (если реактивы хранились более 2-х недель) цвет (сиреневая или фиолетовая окраска свидетельствует о непригодности воды). В колбу приливают 1 мл плазмы крови (появляется винно-красная окраска), перемешивают и дают постоять 1–2 мин. Содержимое колбы титруют из микробюретки 0,002 н раствором ЭДТА, прибавляя последний медленно, по каплям, до окрашивания жидкости в сине-голубой или зеленовато-голубой цвет. Для сравнения рядом ставят колбу, в которую наливают воду, раствор Na₂S, аммиачный буфер и индикатор в тех же количествах. Вместо хромогена черного ЕТ-00 можно использовать эриохром черный Т (7–8 капель).

Ход определения кальция. В колбочку вносят 20 мл воды, 5 мл 10 % КОН, 1 мл плазмы, около 0,02 г индикатора кальцеина или мурексида и перемешивают. Через 5 мин содержимое титруют 0,002 н раствором ЭДТА до исчезновения зеленой флуоресцирующей окраски и появления оранжевой или до сиреневого цвета.

Содержание кальция и магния в тканях и кормах определяют аналогичным образом. Берут навеску 0,5–2 г в соответствии с количеством элементов и сжигают сухим способом. Для анализа берут 0,5–2 мл раствора золы. При необходимости титруют раствором ЭДТА другой нормальности.

Расчет. Расчет ведут по формулам:

$$X_{Ca} = 1 \cdot n \cdot 100 \cdot 20,04 / a; X_{Mg} = (2-l) \cdot n \cdot 100 \cdot 12,16/a,$$

где X_{Ca} и X_{Mg} – соответственно концентрации Ca и Mg в мг %; 1 – объем раствора ЭДТА, пошедшего на титрование кальция с использованием кальцеина, мл; 2 – объем раствора ЭДТА, пошедшего на титрование суммы Ca и Mg, мл; n – нормальность раствора ЭДТА; а – объем плазмы или других жидкостей или фактор разведения образца тканей и кормов. Если концентрация выражается в мг %, то полученные цифры умножают на эквиваленты Ca и Mg, равные соответственно 20,04 и 12,16.

2.4. Определение общего магния с титановым желтым (2)

Принцип метода. В присутствии щелочи титановый желтый образует с ионами магния соединение красного цвета, которое стабилизируется поливиниловым спиртом. Титановый желтый является наиболее чувствительным и специфичным реагентом на магний.

Подготовка материала. Плазму крови и мочу можно анализировать без озоления. Корма, органы и ткани (200–250 мг воздушно-сухого вещества) озоляют сухим способом. Зола растворяют при кипячении в 10 мл 1М HCl. 50 мг скорлупы, высушенной при 105°C и мелко размолотой, вносят в пробирку, добавляют до 10 мл 1М HCl и оставляют на ночь. Далее раствор фильтруют.

Реактивы. 1. 0,005 %-ный раствор титанового желтого на 0,01 %-ном растворе поливинилового спирта. Сначала готовят 0,01 %-ный водный раствор поливинилового спирта (при слабом подогревании). К 100 мл этого раствора добавляют 0,005 г титанового желтого. Раствор устойчив, хранят в темной склянке; 2. 7,5 %-ный раствор NaOH; 3. 1М раствор HCl; 4. Стандартный раствор магния (1 мг/мл): 5,0655 г магния сульфата ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) растворяют в 500 мл воды. В 6 мерных колб на 100 мл вносят 0,5; 1; 2; 5; 7,5 и 10 мл основного раствора магния, доводят водой до метки и для построения калибровочного графика берут по 0,2 мл этих растворов. Затем добавляют все реактивы, необходимые для определения магния. Пробы содержат соответственно 1, 2, 4, 10 и 20 мкг магния.

Оборудование. Спектрофотометр.

Ход определения. В пробирку вносят 0,2 мл анализируемого материала, 2 мл раствора титанового желтого и 2,5 мл раствора NaOH. Перемешивают и оставляют стоять в течение 5 мин. Затем измеряют оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при 560 нм против контроля (вместо пробы вносят 0,2 мл воды) или против воды, но тогда из ОП опытной пробы вычитают ОП контроля. Можно ОП измерять и на колориметре с зеленым светофильтром. Цвет устойчив около 3 часов. Если для анализа нужно взять другое количество раствора золы (например, от 0,1 до 0,5 мл), то используют откалиброванные на 5 мл пробирки и доводят объем водой до метки.

Расчеты здесь и далее, если не указано специально, ведут по одной из формул, приведенных в разделе 1.2.

3. Определение соединений фосфора

3.1. Определение общего фосфора с аммонием молибдатом (3)

Принцип метода. Метод основан на реакции фосфата и аммония молибдата в кислой среде с образованием фосфорномолибденовой гетерополикислоты. При добавлении к раствору восстановителя (эйконоген, аскорбиновая кислота, олово и др.) молибден, входящий в состав этого комплекса, восстанавливается до пятивалентного с образованием комплексного соединения синего цвета. По интенсивности молибденовой сини судят о содержании фосфора.

Подготовка материала к анализу. В пробирку вносят анализируемый материал (50–100 мг воздушно-сухого или 100–150 мг натурального вещества, 0,5 мл плазмы крови, молока) и сжигают смесью трех или двух кислот. Объем раствора золы доводят до 10 мл. Для анализа берут от 0,2 до 2 мл в зависимости от содержания фосфора. Озолнение можно вести и сухим способом.

Реактивы. 1. 2,5 %-ный раствор аммония молибдата и 5 %-ный раствор H_2SO_4 смешивают в равных пропорциях; 2. Основной раствор эйконогена (1-амино-2-нафтол-4-сульфо кислота): 0,25 г эйконогена, 15 г натрия метабисульфита ($Na_2S_2O_5 \cdot 5H_2O$) и 0,5 г безводного натрия сульфита (Na_2SO_3) растворяют в 100 мл теплой воды. Затем фильтруют и хранят в темной склянке около месяца; 3. Рабочий раствор эйконогена. Перед употреблением основной раствор разбавляют в 5 раз водой (1:4); 4. Стандартный раствор фосфора (40 мкг/мл): 0,176 г высушенного при $105^\circ C$ однозамещенного фосфата калия (KH_2PO_4 , хч) растворяют в мерной колбе на 1 л, добавляют 10 мл 1 н H_2SO_4 и доводят водой до метки. Для построения калибровочного графика берут 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0 мл стандартного раствора, которые содержат соответственно 10, 20, 30, 40, 60, 80 мкг фосфора.

Оборудование. Колориметр.

Ход определения. В пробирку с меткой на 10 мл вносят раствор золы, 1 мл раствора аммония молибдата, 0,5 мл рабочего раствора эйконогена, доводят водой до метки и перемешивают. В контрольную пробирку вместо раствора золы вносят воду. Через 10 мин измеряют оптическую плотность на ФЭК с красным светофильтром (640 нм) в кювете с расстоянием между рабочими гранями 10 мм против контроля. Цвет устойчив около 1 часа.

3.2. Определение общего фосфора с аммонием метаванадатом (4)

Принцип метода. Метод основан на реакции фосфата с молибдатом и ванадатом аммония в кислой среде с образованием комплекса желтого цвета, интенсивность которого измеряют на фотоэлектроколориметре или на спектрофотометре при длине волны 470 нм.

Подготовка материала к анализу как в разделе 3.1.

Реактивы. 1. Раствор аммония молибдата: 100 г реактива растворяют в 500 мл горячей воды, приливают 100 мл концентрированной H_2SO_4 и после охлаждения доводят объем водой до 1 л; 2. Раствор аммония ванадата: в 500 мл кипящей воды растворяют 2,5 г реактива. После охлаждения подкисляют 20 мл концентрированной HNO_3 и доводят объем водой до 1 л; 3. Рабочий раствор. Смешивают реактивы 1 и 2 в равных количествах. Устойчив в течение месяца; 4. 10 %-ный раствор H_2SO_4 .

Ход определения. В пробирку вносят 0,2–1 мл раствора золы, доводят водой до 6 мл, затем добавляют 2 мл 10 %-ного раствора H_2SO_4 и 2 мл реактива №3. Перемешивают и через 15–20 мин измеряют оптическую плотность при длине волны 470 нм против контроля. Расчет ведут по калибровочному графику, который строят с тем же раствором фосфора (40 мкг/мл).

3.3. Определение неорганического фосфора в плазме крови (2)

Принцип метода. Неорганический фосфор определяют либо после осаждения белков плазмы крови (метод А), либо без предварительного их осаждения, используя специальные детергенты (методы Б, В).

Реактивы. 1. 0,1М ацетатный буфер, рН 4,0, содержащий 10 % натриевой соли додецилсульфокислоты. Реактив устойчив несколько месяцев при хранении в холодильнике. При низкой температуре детергент выпадает в осадок, но снова растворяется при комнатной температуре; 2. 1 %-ный раствор аммония молибдата. Устойчив несколько недель; 3. 1 %-ный раствор аскорбиновой кислоты. Устойчив не более недели при

хранении в темной склянке в холодильнике; 4. Основной стандартный раствор фосфора (1 мг/мл): 0,4388 г высушенного при 105°C $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ растворяют в 1 л воды. В 6 мерных колб на 100 мл вносят 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 и 10 мл основного раствора, доводят водой до метки и для построения калибровочного графика берут по 0,2 мл рабочего раствора. Пробы содержат соответственно 1, 2, 5, 10, 15 и 20 мкг фосфора; 5. Поливиниловый спирт 0,5 %-ный: 5 г реактива растворяют при интенсивном помешивании в 900 мл теплой воды и после охлаждения доводят водой до 1000 мл; 6. Малахитгрюн 5 мМ: 1,82 г реактива растворяют в 1000 мл 0,5 %-ного раствора поливинилового спирта; 7. Молибдат аммония 10 мМ: 12,35 г $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 500 мл воды, добавляют 500 мл концентрированной HCl . Устойчив 1 месяц; 8. Цветной раствор: к 100 мл раствора малахитгрюна прибавляют 80 мл раствора молибдата аммония. Доводят водой до 1000 мл. Перед употреблением дают постоять 30 мин. Устойчив не менее 6 недель; 9. Стандартный раствор фосфора (40 мкг/мл). Приготовление описано выше.

Оборудование. Спектрофотометр, центрифуга, водяная баня.

Ход определения.

Метод А. К 1 мл плазмы крови добавляют 1 мл 20 %-ной трихлоруксусной кислоты, тщательно перемешивают и затем центрифугируют при 3500 об/мин в течение 15 мин. Для анализа берут 0,2 мл надосадочной жидкости, в которой определяют фосфор по Фиске-Суббароу или Пулсу.

Метод Б. В пробирку вносят 2,5 мл реактива №1, 0,2 мл плазмы и тщательно перемешивают. Затем добавляют 0,3 мл раствора аммония молибдата, 0,3 мл раствора аскорбиновой кислоты и снова перемешивают. Оптическую плотность измеряют через 15 мин на спектрофотометре при 870 нм против контроля.

Метод В. К 0,01 мл плазмы (сыворотки) крови добавляют 2 мл цветного раствора, смешивают и помещают в водяную баню при 60°C на 15 мин, далее охлаждают при комнатной температуре. Фотометрируют при 560 нм против холостой пробы (вместо плазмы берут 0,01 мл воды).

Расчет ведут по калибровочному графику.

3.4. Определение фитата в кормах (5)

Принцип метода. В семенах растений от 30 до 85 % фосфора находится в форме фитата – соли миоинозитолгексафосфорной или фитиновой кислоты. В естественном состоянии фитиновая кислота растений соединена с металлами, от чего зависит ее растворимость и доступность фосфора, магния, цинка, меди, железа и других элементов для моногастрических животных. Принцип метода определения фитата основан на том, что при добавлении в реакционную среду Fe^{+3} часть этих ионов связывается с фитиновой кислотой при pH 1–2, а оставшиеся ионы образуют с тиоцианатом комплекс вишневого цвета. Интенсивность окраски амилowego слоя обратно пропорциональна концентрации фитата.

Подготовка проб к анализу. 0,2–1 г высушенного и тонко измолотого образца зерновых злаков, бобовых, жмыхов или шротов экстрагируют в 20 мл 0,5М HNO_3 в течение 3–4 ч при постоянном встряхивании. Содержимое фильтруют через бумажный фильтр.

Реактивы. 1. 0,5М азотная кислота; 2. Спирт амиловый (пентанол-1); 3. Раствор железомонийных квасцов $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 50 мкг Fe^{+3} /мл воды; 4. Раствор тиоцианата аммония (NH_4SCN) – 100 г/л воды; 5. Стандартный раствор фитата натрия или фитиновой кислоты – 0,2 мкмоль фитата в 1 мл 0,5М HNO_3 .

Оборудование. Спектрофотометр, центрифуга, водяная баня.

Ход определения. В пробирку вносят от 0,2 до 1 мл фильтрата, разбавляют водой до объема 1,4 и добавляют 1 мл раствора железомонийных квасцов. После перемешивания пробирку закрывают пробкой и ставят в кипящую водяную баню на 20 мин. Затем пробирку охлаждают

до комнатной температуры, приливают 5 мл амилового спирта, 0,1 мл раствора тиоцианата аммония, содержимое тотчас перемешивают энергичным встряхиванием. Далее центрифугируют при 1000 об/мин в течение 5 мин. Интенсивность окраски амилового слоя измеряют при 465 нм против амилового спирта (точно через 15 мин после добавления тиоцианата аммония).

Для построения калибровочного графика берут 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 и 1 мл стандартного раствора фитата натрия, разбавляют водой до объема 1,4 мл, добавляют по 1 мл раствора квасцов и далее как по ходу анализа. Пробы содержат 0,04; 0,08; 0,12; 0,16 и 0,2 мкмоль фитата.

3.5. Определение фосфорных соединений в тканях (6)

Подготовка материала к анализу. Животных перед убоем выдерживают на 12-часовой голодной диете и делают наркоз тиопенталом натрия в дозе 0,03 г/кг живой массы внутривенно. Извлекают исследуемые органы и тотчас замораживают их в жидком азоте. Обработку материала ведут в рефрижераторной комнате (2°C). Ткань мелко растирают в фарфоровой ступке, постоянно подливая жидкий азот, берут навеску (1 г) и переносят в стеклянную ступку гомогенизатора, помещенную в лед с поваренной солью. Ткань растирают в 10 мл 10 %-ного раствора охлажденной до 2°C ТХУ, содержимое переносят в центрифужную пробирку, помещенную в смесь льда и соли. Пестик и ступку споласкивают 2 мл воды, которую приливают к экстракту ТХУ. Из одной навески ткани последовательно фракционируют фосфорные соединения (неорганический фосфор, креатинфосфат, АТФ+АДФ, фосфолипиды, фосфопротеиды, РНК, ДНК). По концентрации фосфора в экстрактах или гидролизатах судят о содержании соответствующих соединений этого элемента. Пробы центрифугируют в рефрижераторной центрифуге при 0–2°C и 3000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость сливают в охлажденные колбочки с меткой на 40 мл, помещенные в кювету со льдом и солью, и ставят в холодильник. Осадок суспендируют при помощи стеклянной палочки в 8 мл раствора ТХУ, центрифугируют и надосадочную жидкость сливают в колбочки. Затем осадок дважды промывают в 6 мл воды, центрифугируют при тех же условиях. Промывные воды объединяют с экстрактами ТХУ. Значение рН надосадочной жидкости доводят до 6–7 по 1 %-ному фенолфталеину, добавляя из бюретки охлажденный раствор 10 н NaOH. Затем вносят 1–2 капли 1 н H₂SO₄ (до исчезновения окраски), объем доводят водой до 40 мл и содержимое перемешивают. В этом экстракте определяют кислоторастворимые фосфаты: неорганический фосфор (НФ), фосфор креатинфосфата (КФ) и АТФ+АДФ. Осадок в центрифужных пробирках ставят в холодильник.

Реактивы. 1. 10 %-ный раствор ТХУ. Хранят в холодильнике; 2. 1 н и 10 н раствор NaOH; 3. 1 %-ный и 0,1 %-ный спиртовой раствор фенолфталеина; 4. 6 н и 2 н раствор HCl; 5. Смесь хлороформа и метанола (2:1); 6. Смесь этанола и диэтилового эфира (3:1); 7. Смесь H₂SO₄:HClO₄:HNO₃ (1:1:3); 8. 5 %-ный раствор аммония молибдата на 4 н H₂SO₄: в колбу на 500 мл вносят 300–400 мл воды, 56 мл концентрированной H₂SO₄ и после охлаждения до 40–50°C добавляют 25 г аммония молибдата, растворяют и доводят объем до метки. Хранят в темной склянке; 9. Изобутанол, можно бутанол; 10. Подкисленный этанол. На 1 л спирта добавляют 10 мл концентрированной H₂SO₄; 11. 1 н раствор H₂SO₄. 12. Запасной раствор SnCl₂. 10 г реактива в 25 мл концентрированной HCl. Хранят в темной склянке. Перед употреблением готовят рабочий раствор: 0,5 мл запасного на 20 мл 1 н H₂SO₄; 13. Стандартный раствор фосфора (100 мкг/мл). На основе этого раствора готовят серию рабочих растворов, содержащих фосфор в количестве 1, 2,4,8,12,16 и 20 мкг/мл. Для построения калибровочной кривой берут 0,4 мл раствора

аммония молибдата, 1 мл изобутанола, 2 мл рабочего раствора фосфора, встряхивают 30 с, затем отбирают 0,2 мл бутанолового экстракта и далее как при определении фосфора. Пробы содержат соответственно 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 4,8; 6,4 и 8,0 мкг фосфора; 14. Все реактивы для определения фосфора по Фиске-Суббароу; 15. Жидкий азот и тиопентал натрия.

Оборудование. Колориметр, термостат, центрифуга, водяная баня.

Ход определения кислоторастворимых фосфатов.

Определение НФ. В пробирку с притертой пробкой (берут по 2–3 параллельных) вносят 0,4 мл раствора аммония молибдата, 1 мл изобутанола и пробу охлаждают. Далее добавляют 2 мл экстракта кислоторастворимых фосфатов и встряхивают в течение 30 с. Для определения фосфора берут 0,2 мл бутанолового экстракта.

Гидролиз КФ. В пробирку с притертой пробкой вносят 0,4 мл аммония молибдата, 2 мл экстракта кислоторастворимых фосфатов и инкубируют 30 мин в водяной бане при 37°C. После гидролиза пробу охлаждают, далее добавляют 1 мл изобутанола и встряхивают 30 с. Берут 0,2 мл бутанолового экстракта, в котором определяют сумму НФ и фосфора КФ.

Гидролиз АТФ+АДФ. В пробирку с притертой пробкой вносят 2 мл экстракта, 2 мл 2 н НСl и кипятят в течение 10 мин. Затем пробы охлаждают, нейтрализуют по 0,1 %-ному раствору фенолфталеина 10 н NaOH. Для исчезновения окраски добавляют 1 н H₂SO₄. Далее вносят 0,4 мл раствора аммония молибдата, 1 мл изобутанола и встряхивают 30 с. После расслаивания фаз отбирают 0,2 мл бутанолового экстракта, в котором определяют сумму кислоторастворимых фосфатов.

Определение фосфора. В пробирку вносят 4,5 мл подкисленного этанола, 0,2 мл бутанолового экстракта (пипетку следует промывать в этом же спирте), 0,2 мл рабочего раствора олова хлорида, встряхивают и сразу же измеряют оптическую плотность на ФЭК с красным фильтром (640 нм) против подкисленного этанола в кювете на 10 мм между рабочими гранями.

Расчет ведут по формуле:

$$X = 40 \cdot 1 \cdot a \cdot 100/2 \cdot 0,2 \cdot 1 \cdot 1000 = a \cdot 10,$$

где X – содержание фосфора, мг %; а – содержание Р по калибровочной кривой, мкг; 40 и 2 – объем и аликвота экстракта кислоторастворимых фосфатов в мл; 1 и 0,2 – объем и аликвота бутанолового экстракта в мл; 1 – навеска в г; 100 и 1000 – коэффициенты для расчета в % и мг. Фосфор КФ и АТФ+АДФ находят вычитанием из суммы соответствующих слагаемых. Далее определяют фосфолипиды.

Экстракция фосфолипидов (ФЛ). К осадку в центрифужных пробирках приливают 10 мл смеси спирта-эфира, перемешивают палочкой и кипятят в стакане с водой в течение 15 мин при слабом нагреве, далее центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость сливают в пробирки для сжигания (объемом около 30 мл, с меткой на 10 мл), а к осадку снова приливают 10 мл смеси спирта-эфира, перемешивают и ставят в термостат на 1 ч при 50°C. Затем центрифугируют, надосадочную жидкость сливают в пробирки для сжигания, а к осадку приливают 10 мл смеси хлороформа-метанола и термостатируют в течение 1 ч при 60°C. Далее центрифугируют, жидкость сливают в те же пробирки, а осадок высушивают досуха при 60°C (для ускорения высушивания осадок можно перемешать тонкой палочкой). Жидкость в пробирках выпаривают в вакуум-сушильном шкафу при температуре 55–60°C и давлении 0,6–0,7 атм. К высушенному материалу добавляют 1 мл смеси трех кислот и сжигают, как указано в разделе 1.1. Объем раствора золы доводят до 10 мл. Для анализа берут 0,5–1 мл раствора золы, в котором определяют фосфор по Фиске-Суббароу (можно и по Пулсу).

Расчет ведут по формуле:

$$X = 10 \cdot 100 \cdot a / 1 \cdot 1000 \cdot 1 = a \cdot 1,$$

где X – содержание P ФЛ, мг %; 10 – объем раствора золы в мл; 1 – количество раствора золы, взятое для анализа, мл; 1 – навеска, г..

В осадке после экстракции фосфолипидов определяют фосфопротеиды и нуклеиновые кислоты (этапы а, б, в, г). Сначала проводят щелочной гидролиз, для чего к высушенному осадку добавляют 9 мл 1 н NaOH и ставят в термостат при 38°C на 18 ч (через 8–9 ч содержимое следует перемешать). Далее содержимое переносят в градуированные пробирки, смывая остаток 2–3 мл 2 н HCl. Добавляют 1 каплю 1%-ного раствора фенолфталеина и нейтрализуют 2 н HCl до исчезновения окраски. Если после этого стали выпадать белые хлопья, то нужно прибавить несколько капель 1 н NaOH. Объем доводят до 15 мл и перемешивают.

а). 2 мл щелочного гидролизата (по 2 параллельных пробы) переносят в пробирку для сжигания, выпаривают при 105°C. Далее добавляют 0,5 мл смеси трех кислот и сжигают. Для анализа берут 2–5 мл раствора золы и определяют фосфор по Фиске-Суббароу. Расчет ведут по формуле:

$$X_a = 15 \cdot 10 \cdot a \cdot 100 / 2 \cdot 5 \cdot 1 \cdot 1000 = a \cdot 1,5,$$

где X_a – содержание P фосфопротеидов (ФП), РНК и ДНК, мг %; 15 и 2 – объем и аликвота щелочного гидролизата в мл; 10 и 5 – объем и аликвота раствора золы в мл; 1 – навеска, г.

б). В центрифужную пробирку вносят 5 мл щелочного гидролизата, 1 мл 6 н HCl и 4 мл 10%-ного раствора ТХУ, перемешивают палочкой и через 15 мин центрифугируют при 3500 об/мин в течение 10 мин. Осадок, содержащий ДНК, не исследуют.

в) 2 мл надосадочной жидкости переносят в пробирку с притертой пробкой, добавляют 0,4 мл раствора аммония молибдата, 1 мл изобутанола, встряхивают 30 с. Затем отбирают 0,2 мл бутанолового экстракта, вносят его в этанол. Определяют фосфор ФП. Расчет ведут по формуле:

$$X_b = 15 \cdot 10 \cdot 1 \cdot a \cdot 100 / 5 \cdot 2 \cdot 0,2 \cdot 1 \cdot 1000 = a \cdot 7,5$$

где X_b – содержание P ФП, мг %; 15 и 5 – объем и аликвота щелочного гидролизата, мл; 10 и 2 – объем и аликвота надосадочной жидкости, мл; 1 и 0,2 – объем и аликвота бутанолового экстракта, мл.

г) 2 мл надосадочной жидкости переносят в пробирки для сжигания, выпаривают при 105 °С. Далее добавляют 0,5 мл смеси трех кислот, сжигают, объем доводят водой до 6–7 мл, определяют фосфор по Фиске-Суббароу в этих же пробирках. Расчет ведут по формуле:

$$X_r = 15 \cdot 10 \cdot a \cdot 100 / 5 \cdot 2 \cdot 1 \cdot 1000 = a \cdot 1,5,$$

где X_r = содержание P (ФП+РНК), мг %. Фосфор РНК и ДНК находят вычитанием из суммы соответствующих слагаемых (фосфор ДНК = а – г, фосфор РНК = г – в).

Кроме того, в отдельной навеске (100–200 мг) определяют содержание общего фосфора по Фиске-Суббароу. Сумма фосфора всех фракций получается несколько ниже, чем определенного в отдельной навеске, поскольку в данной методике определяются не все формы фосфора. Зная содержание фосфора в отдельных фракциях, можно рассчитать его количество в мг % (ФЛ = P x 25, РНК = P x 10,5, ДНК = P x 10,1, КФ = P x 6,3).

4. Определение натрия и калия (2)

Принцип метода. Пламенный фотометр позволяет определять в ацетилено-воздушном пламени калий и натрий в концентрации от 1 до 100 мг/л.

Реактивы. 1. Основной стандартный раствор калия: 1,907 г перекристаллизованного KCl на 1 л воды. 2. Основной стандартный раствор натрия: 2,542 г перекристаллизованного NaCl на 1 л воды. Растворы содержат соответственно 1000 мг/л калия или натрия. Путем разбавления основных растворов готовят серии рабочих растворов с содержанием в них калия и натрия 0; 1; 5; 10; 25; 50; 75 и 100 мг/л. Для этого в мерные колбы на 1 л наливают соответственно 0, 1, 5, 10, 25, 50, 75 и 100 мл основных растворов калия и натрия, добавляют такое же количество кислот, какое содержится в испытываемых растворах, доводят до метки водой, перемешивают. 3. H₂SO₄; HCl; HClO₄.

Оборудование. Пламенный фотометр, муфельная печь, водяная баня.

Ход определения. Вещество озоляют сухим или мокрым способом. При сухом озолении температура муфеля не должна превышать 500 °С. Зола после сухого озоления кипятят с 5 мл HCl и 30–40 мл воды, смывают в мерную колбу на 100 или 250 мл, доводят водой до метки, перемешивают и оставляют для отстаивания. При сжигании смесью кислот объем раствора золы доводят до 25 мл. Плазму крови не озоляют: для калия ее разводят водой в соотношении 1:20, а для натрия 1:150. Наилучшим интервалом концентраций является интервал 10–40 мг/л.

Подготовленный зольный раствор наливают в пенициллиновые флакончики. Включают прибор согласно инструкции. Устанавливают светофильтр на определяемый элемент и 20 мин сжигают самый концентрированный стандартный раствор этого элемента. Затем всю систему прибора промывают водой. Устанавливают компенсатор по раствору, содержащему 500 мг/л калия. К распылителю по очереди подносят стандартные растворы и снимают для каждого показания гальванометра. Периодически проверяют стабильность работы прибора, внося в пламя стандартные растворы.

Если концентрации элементов в анализируемых растворах сильно различаются, то после анализа раствора с высоким содержанием элемента прибор промывают водой до установки стрелки гальванометра на нуль. Точность анализа зависит от режима работы прибора, то есть от стабильности давления воздуха и газа, а также от степени близости химических и физических свойств испытываемых и стандартных растворов. Физические свойства растворов (вязкость, температура и др.) влияют на результаты анализа, так как изменяется количество вещества, поступающего в пламя горелки в единицу времени. Для уравнивания химических свойств стандартных и испытываемых растворов первые готовят с добавкой тех кислот и в том же количестве, в котором они присутствуют в испытываемых растворах.

Расчет. Сравнивают интенсивность излучения испытываемых и стандартных растворов. Строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс концентрации элемента в мг/л, а по оси ординат – соответствующие им показания гальванометра.

5. Определение хлора объемным методом (2)

Принцип метода. Сущность метода заключается в том, что органическое хлорсодержащее вещество сжигают с HNO₃ и калием перманганатом в присутствии точно известного количества AgNO₃. AgCl выпадает в нерастворимый осадок. Избыток AgNO₃ оттитровывают аммонием роданистым в присутствии железоаммонийных квасцов.

Реактивы. 1. 0,1 н раствор AgNO₃. Готовят из фиксанала или растворением 17,0 г AgNO₃ в 1 л воды. Хранят в темной склянке в темном месте. Перед работой из основного раствора готовят 0,01 н раствор и проверяют его титр, для чего в колбу вносят 5 мл концентрированной HNO₃, 5 мл воды, 4–5 капель квасцов и титруют 0,01 н раствором аммония роданистого; 2. 0,1 н раствор аммония роданистого. Готовят из фик-

санала. Хранят в темной склянке. Перед работой готовят 0,01 н раствор; 3. Насыщенный водный раствор железоаммонийных квасцов. Около 150 г на 100 мл воды; 4. Насыщенный раствор KMnO_4 ; 5. Концентрированная HNO_3 , не содержащая хлора; и 6. Глюкоза, хч.

Ход определения. В колбу на 100 мл (с узким горлом) вносят 0,25–0,50 мл крови, плазмы, молока, мочи или 0,2–0,4 г воздушно-сухого вещества кормов, органов и тканей, приливают 2,5–10 мл концентрированной HNO_3 и оставляют стоять несколько часов. Затем приливают 4–6 мл 0,01 н раствора AgNO_3 и нагревают на плитке до слабого кипения при постоянном помешивании содержимого. Далее прибавляют по каплям насыщенный раствор KMnO_4 до тех пор, пока не исчезнет фиолетовое окрашивание. Если фиолетовое окрашивание не исчезает в течение нескольких минут, то в горячую жидкость следует добавить немного глюкозы (на кончике скальпеля). Сжигание считается законченным, когда жидкость становится бесцветной и на дно колбы выпадают белые хлопья. После охлаждения содержимого в колбу вносят 4–5 капель раствора квасцов, 5–10 мл воды и титруют 0,01 н раствором аммония роданистого до проявления устойчивого розового окрашивания, не исчезающего в течение 1–2 мин.

Расчет ведут по формуле:

$$X = (aK_1 - bK_2) \cdot 0,3546 \cdot 100 / 1,$$

где X – содержание хлора, мг %; a – количество 0,01 н раствора AgNO_3 , внесенное для осаждения хлора, мл; b – количество 0,01 н раствора роданистого аммония, пошедшее на титрование, мл; K_1 и K_2 – поправки к титру этих растворов; 0,3546 – количество хлора, соответствующее 1 мл 0,01 н AgNO_3 , г; 100 – коэффициент для пересчета в проценты; 1 – навеска, г или мл.

6. Определение серы (7)

Принцип метода. Биологический материал озоляют в присутствии магния нитрата. В растворе золы осаждают серу в форме бария сульфата и далее суспендируют его в растворе твина-80. Оптическую плотность раствора серы измеряют на спектрофотометре.

Подготовка проб к определению общей серы. 0,250 г измельченного сухого вещества корма, органов и тканей или 0,1 г пера, 1 мл плазмы крови, 0,5 мл цельной крови, 2 мл молока или мочи помещают в фарфоровый тигель (объем его около 30 мл, высота 4–5 см), приливают 2,5 мл раствора магния нитрата и оставляют на 2–3 ч (можно на ночь). Далее выпаривают на плитке с регулятором температуры при слабом нагреве до появления белых пятен на вздувшейся массе, после чего прокалывают сначала при сильном нагреве плитки, а затем в муфеле при температуре 500–550°C до полного побеления массы (30–40 мин). Весь процесс озоления длится около 4 ч. Если исследуемое вещество содержит много жира (например, желток, кожа, кость, печень), то его можно обезжирить или добавить двойное количество раствора магния нитрата. К золе приливают 15 мл 2 н HCl и нагревают на плитке до растворения. Далее фильтруют в мерную колбу на 50 мл, тигель и фильтр тщательно промывают и доводят до метки водой.

Подготовка проб к определению органической серы. Около 1 г сухого вещества заливают 25-кратным количеством 1 н HCl и настаивают не менее 3 ч при частом перемешивании (можно оставить на ночь). При этом неорганическая сера переходит в раствор. Жидкость отфильтровывают, осадок многократно промывают на фильтре водой (до исчезновения реакции на серу с барием хлористым). Далее вещество вместе с фильтром высушивают до воздушно-сухого состояния, берут навеску 0,250 г, заливают 2,5 мл раствора магния нитрата, сжигают и определяют органическую серу. По разности между общей и органической серой

рассчитывают содержание неорганической серы. Последнюю можно определить и в промывных водах, если они бесцветны и приведены к определенному объему. При сжигании вещества вместе с фильтром зола не полностью растворяется в HCl.

Подготовка проб к определению неорганической серы. К 1 мл плазмы крови или мочи приливают 1 мл 1 н HCl, перемешивают, добавляют 2 мл 10 %-ного раствора ТХУ и снова перемешивают. Через 15 мин центрифугируют при 3500 об/мин в течение 15 мин. Для анализа берут 0,25–0,5 мл центрифугата и определяют неорганическую серу без озолоения. По разности между общей и неорганической серой рассчитывают содержание органической серы.

Реактивы. 1. Раствор магния нитрата $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$. Помещают 954 г реактива в химический стакан, наливают около 900 мл воды и нагревают до полного растворения при помешивании стеклянной палочкой. Далее раствор фильтруют в мерную колбу на 1 л, доводят водой до метки; 2. 1 н и 2 н раствор HCl; 3. 10 %-ный раствор $BaCl_2$ (фильтруют); 4. 5 %-ный раствор твина-80 на 10 %-ном растворе $BaCl_2$; 5 мл твина-80 прибавляют к 60–70 мл раствора $BaCl_2$, встряхивают до растворения и затем доводят раствором $BaCl_2$ до 100 мл. Раствор можно использовать через 24 ч, хранить не более месяца; 5. Стандартный раствор серы: 0,272 г K_2SO_4 , высушенного при 105°C до постоянной массы, растворяют в 1 л воды. Раствор содержит 50 мкг серы в 1 мл. Для построения калибровочного графика берут 0,5; 1; 2; 3; 4 и 5 мл стандартного раствора серы, прибавляют по 1 мл 2 н HCl, 2 мл твина-80 и далее как при определении серы. Пробы содержат соответственно 25, 50, 100, 150, 200 и 250 мкг серы.

Оборудование. Спектрофотометр, центрифуга, муфельная печь.

Ход определения. 2,5 мл раствора золы (можно до 8,0 мл) переносят в пробирку с меткой на 10 мл, приливают по стенке 2 мл раствора твина-80 и доводят водой до метки. Далее пробирку плавно переворачивают 4–5 раз и измеряют оптическую плотность на спектрофотометре при 410 нм против воды. Суспензия устойчива не менее 2 ч. Если выпал осадок, то содержимое пробирок можно снова перемешать и измерить оптическую плотность. Для определения содержания серы в воде берут 5 мл последней, добавляют 1 мл 2 н HCl, 2 мл твина-80 и далее поступают как указано выше. Для внесения поправки ставят контроль для каждой новой партии реактивов. С этой целью в тигель помещают 2,5 мл раствора магния нитрата, выпаривают на плитке, озолоют и т.д. Из оптической плотности опытной пробы вычитают оптическую плотность контроля. Расчет ведут в г на 100 г или 100 мл анализируемого вещества.

7. Определение меди и железа (8)

Принцип метода. Для определения меди используют дифенилкарбазон. Этот реактив в определенных условиях является строго специфичным по отношению к ионам меди, что позволяет вести определение в присутствии всех остальных катионов. Чувствительность метода довольно высока (0,05 мкг/мл). Оптимум образования комплекса лежит при pH 4–5. Окраска подчиняется закону Бера-Ламберта при содержании в пробе от 0,05 до 10 мкг меди. Железо определяют с о-фенантролином, который образует с Fe^{2+} оранжево-красный комплекс. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации элемента в широких пределах. Чувствительность реакции приближается к 0,2 мкг Fe/мл.

Подготовка материала к исследованию. 0,2–0,5 г воздушно-сухого вещества корма, органов и тканей сжигают мокрым или сухим способом. Объем раствора золы доводят до 10 мл.

Реактивы. 1. 0,5 н и 2 н раствор HCl; 2. 10 %-ный раствор аммиака; 3. 0,1 %-ный водный раствор п-нитрофенола; 4. 1 %-ные растворы аскорбиновой кислоты и солянокислого о-фенантролина (сохраняются

около двух недель в холодильнике и в темной склянке); 5. 0,1 %-ный спиртовый раствор фенолфталеина; 6. 0,1М ацетатный буфер, pH 4,0: в мерной колбе на 1 л растворяют 13,419 г хч натрия уксуснокислого ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), приливают 25 мл ледяной уксусной кислоты хч и доводят водой до метки. Далее буфер фильтруют и определяют pH. Хранят при 4°C; 7. 0,01 %-ный раствор дифенилкарбазона в бензоле: 10 мл реактива переносят в мерную колбу на 100 мл, добавляют 40–50 мл бензола хч и нагревают в стакане с горячей водой до растворения реактива. Колбу охлаждают и доводят бензолом до метки. Раствор может сохраняться в комнатных условиях в темной склянке две недели; 8. Основной стандартный раствор железа (100 мкг/мл): 0,8634 г хч железо-аммонийных квасцов ($\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) растворяют в 1 л воды, подкисленной 5 мл концентрированной H_2SO_4 . 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; 9. Основной стандартный раствор меди (100 мкг/мл): 0,3928 г свежеперекристаллизованной меди сернокислой ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) растворяют в 1 л воды, подкисленной 5 мл концентрированной H_2SO_4 . 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 и 1,5 мл рабочего раствора, доводят до 5 мл водой, добавляют по 0,5 мл 0,5 н HCl, 1 капле фенолфталеина и далее как при определении меди. Пробы содержат соответственно 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 2,0 и 3,0 мкг меди. При необходимости следует приготовить серию рабочих растворов, содержащих от 0,5 до 5 мкг меди в 1 мл.

Оборудование. Спектрофотометр.

Ход определения меди. 5 мл раствора золы (контроль 5 мл воды, подкисленной HCl) вносят в пробирку с притертой пробкой, прибавляют 1 каплю фенолфталеина. Затем из бюретки добавляют по каплям раствор аммиака до появления светло-розовой окраски. В случае перетитрования можно добавить 2 н HCl до получения нужной окраски. Для точного установления pH прибавляют 1 мл ацетатного буфера. Розовая окраска исчезает. Затем в пробирку из бюретки на 50 мл вносят 5 мл раствора дифенилкарбазона и встряхивают в течение 1 мин. После расслаивания бензольный слой, всплывающий на поверхность, приобретает красную окраску, интенсивность которой зависит от содержания меди в пробе. Оптическую плотность бензольного слоя измеряют на спектрофотометре при 540 нм против контроля (или против воды, тогда нужно вычесть оптическую плотность контроля). Кюветы должны быть сухими. Цвет устойчив не менее суток.

Ход определения железа. 1–2,5 мл раствора золы (или 2 мл воды) вносят в пробирку с меткой на 5 мл, добавляют 1 каплю п-нитрофенола и нейтрализуют раствором аммиака до появления желтой окраски. Содержимое оттитровывают 0,5 н HCl до исчезновения окраски. Затем добавляют по 4–6 капель раствора аскорбиновой кислоты, перемешивают и через 10 мин добавляют столько же о-фенантролина, доводят водой до метки и снова перемешивают. Оптическую плотность измеряют на спектрофотометре при 510 нм против контроля и воды. Цвет устойчив не менее суток.

7.1. Определение общей железосвязывающей способности плазмы крови (2)

Принцип метода. При добавлении избыточного количества ионов железа к плазме (сыворотке) крови происходит насыщение железом трансферрина. Избыток железа выпадает в осадок вместе с карбонатом магния и в супернатанте определяют белковосвязанное железо.

Реактивы. 1. Раствор карбоната натрия 0,3М: 8,6 г $\text{NaCO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ в 100 мл воды. Устойчив 1 неделю; 2. Раствор сульфата магния 0,3М: 4,7

г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ растворяют в воде – 100 мл. Устойчив 1 неделю; 3. Раствор железа (2мг/100мл): 140,8 мг соли Мора $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ растворяют в воде, вносят 2 капли H_2SO_4 и доводят водой до 1000 мл. Вместо соли Мора можно использовать хлорное железо.

Оборудование. Атомный абсорбционный спектрофотометр, центрифуга, водяная баня.

Ход определения. В центрифужную пробирку вносят 0,2 мл плазмы крови и 0,1 мл раствора железа (в холостую пробу вносят вместо железа 0,1 мл воды). Перемешивают и помещают на 10 мин в водяную баню при 37°C . Далее в пробирку вносят по 0,2 мл раствора карбоната натрия и по 0,2 мл раствора сульфата магния. Содержимое перемешивают и через 35 мин центрифугируют при 3500 об/мин в течение 10 мин. В супернатанте определяют железо методом атомной абсорбционной спектрофотометрии, внося раствор в пламя без какой-либо предварительной подготовки.

Расчет. Из оптической плотности опытной пробы вычитают оптическую плотность холостой пробы и общую железосвязывающую способность плазмы крови рассчитывают по калибровочной кривой.

8. Определение цинка с дитизоном (9)

Принцип метода. Дитизон образует с цинком ярко окрашенный комплекс. Извлечение цинка дитизоном производят при pH 5 в присутствии тиосульфата натрия.

Подготовка материала к анализу. Навеску 1 г воздушно-сухого размолотого растительного материала помещают в фарфоровом или кварцевом тигле в холодную муфельную печь и обугливают при открытой дверце, повышая температуру до $250\text{--}300^\circ\text{C}$. Затем печь закрывают, повышают температуру до 500°C (темно-красное каление) и выдерживают при этой температуре 4 часа. Охлажденную золу смачивают 5 мл 20 %-ной перегнанной соляной кислоты и осторожно упаривают на плитке досуха, не допуская разбрызгивания массы и прокаливания остатка. К остатку в тигле приливают 2,5 мл 20 %-ной HCl , 5 мл воды, тигель покрывают часовым стеклом и кипятят раствор 10 мин. Полученную смесь охлаждают, переносят, не фильтруя, в мерную колбу, смачивают остатки из тигля водой, доводят объем водой до метки (50 мл), перемешивают и оставляют до просветления или центрифугируют.

Реактивы. 1. Запасной раствор дитизона в четыреххлористом углероде (CCl_4): в делительную воронку вместимостью 250 мл помещают 0,02 г дитизона, приливают 100 мл CCl_4 и растворяют дитизон при энергичном встряхивании в течение 15 мин. Приливают 100 мл раствора аммиака (0,5 мл 25 %-ного аммиака + 100 мл воды) и встряхивают 2–3 мин. Отбрасывают слой CCl_4 и промывают оранжевый аммиачный раствор дитизона 2–3 раза небольшими порциями (по 5–10 мл) CCl_4 . Затем к аммиачному раствору дитизона приливают 2,5 мл разбавленной H_2SO_4 (1:5), раствор перемешивают, приливают 100 мл CCl_4 и встряхивают примерно 1 мин. После разделения фаз раствор дитизона в CCl_4 сливают в чистую делительную воронку и встряхивают с 50 мл воды в течение 1 мин для удаления серной кислоты. Промывку водой повторяют еще два раза. Раствор дитизона фильтруют через очищенный от следов микроэлементов бумажный фильтр в сухую склянку из темного стекла с притертой пробкой и хранят в холодильнике. При длительном хранении дитизон разлагается. Качество запасного раствора проверяют, встряхивая пробу его (5 мл) в делительной воронке с 25 мл 0,01 н аммиака (0,7 мл 25 %-ного раствора аммиака на 1 л воды) в течение 2–3 мин. Органический слой должен быть бесцветным. Если он окрашен в бурый цвет, раствор дитизона для анализа не пригоден; 2. Рабочий раствор дитизона: помещают в сухую мерную колбу вместимостью 500 мл 30 мл запасного раствора дитизона, доливают до метки CCl_4 и перемешивают.

Рабочий раствор дитизона готовят перед употреблением; 3. Маскирующий раствор: ацетатный буферный раствор, pH 5: 272 г уксуснокислого натрия $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ растворяют в воде, прибавляют 58 мл ледяной уксусной кислоты и доводят объем полученного раствора до 1 л водой. В полученный раствор вносят 25 мл 50 %-ного раствора тиосульфата натрия $(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O})_4$ 4. 20 %-ный и 0,3 н растворы соляной кислоты; 5. Запасной стандартный раствор цинка: помещают 0,100 г металлического цинка в мерную колбу вместимостью 1 л, добавляют небольшое количество воды и 10 мл 20 %-ной HCl. После полного растворения цинка доливают до 1 л водой. Полученный раствор содержит 100 мкг/мл цинка; 6. Рабочий стандартный раствор цинка: помещают 1 мл запасного стандартного раствора цинка в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят до метки 0,3 н HCl. Полученный раствор содержит 1 мкг цинка/мл. Рабочий стандартный раствор готовят в день проведения анализа.

Все реактивы обычно загрязнены цинком и должны быть очищены. Соляную кислоту рекомендуется очищать перегонкой, растворы солей – экстракцией дитизоном в CCl_4 . Поступающий в продажу CCl_4 часто содержит примеси, которые быстро разрушают дитизон. Эффективным способом очистки от подобных примесей является обработка активированным углем. К 500 мл CCl_4 добавляют 10 г активированного угля, встряхивают примерно 5 мин и фильтруют через складчатый фильтр. Очистку повторяют с новой порцией активированного угля. Обработанный таким образом CCl_4 перегоняют в стеклянном перегонном аппарате, собранном на шлифах. Бывший в употреблении CCl_4 может быть регенерирован обработкой соответствующими реактивами и перегонкой.

Оборудование. Колориметр, муфельная печь.

Ход определения. В делительную воронку берут 5 мл отстоявшейся прозрачной надосадочной жидкости, прибавляют 10 мл маскирующего раствора и перемешивают. Приливают из бюретки 10 мл рабочего раствора дитизона в CCl_4 и встряхивают воронку 1 мин. После разделения фаз органический слой сливают в кювету фотоколориметра с расстоянием между рабочими гранями в 1 см и фотометрируют при 538 нм относительно холостой пробы.

Расчеты. Содержание цинка в образце находят по калибровочному графику и вычитают из него результат холостого опыта. Если содержание цинка в образце превышает 50 мг/кг, то надосадочную жидкость разбавляют 0,3 н соляной кислотой и анализ повторяют. Найденный затем по калибровочной кривой результат увеличивают во столько раз, во сколько раз была разбавлена аликвотная часть.

9. Определение марганца перйодатным методом (2)

Принцип метода. Определение основано на способности Mn^{++} окисляться в кислой среде перйодатом калия до MnO_4^- . Мешающие вещества (восстановители) удаляют или разрушают при соответствующей обработке золы.

Подготовка материала к анализу. 0,5–2,0 г воздушно-сухого вещества озоляют в фарфоровых чашках или тиглях сначала на плитке, а затем в муфельной печи при 500–550°C в течение 2 ч. Зола обрабатывают 2–3 раза 50 %-ной HNO_3 (по 2–3 мл), удаляя избыток HNO_3 выпариванием на плитке. Если в пробе мало кальция, то можно производить обработку золы 50 %-ной H_2SO_4 . Далее золу растворяют в 10 мл 10 %-ной HNO_3 или 5 %-ной H_2SO_4 и выпаривают досуха, после чего производят трехкратную обработку золы концентрированной HNO_3 , добавляя ее сначала по 2 мл, а последний раз – 1 мл. Зола растворяют в 10 мл растворителя (при подогревании и помешивании стеклянной палочкой) и фильтруют в пробирку с меткой на 25 мл. Тигель споласкивают 5 мл воды и тоже фильтруют в эту пробирку.

Реактивы. 1. 1 %-ный раствор калий периодата: 10 г KJO_4 переносят в химический стакан, добавляют 400 мл воды и 100 мл 85 %-ной фосфорной кислоты. Смесь подогревают до растворения периодата, охлаждают и доводят водой до 1 л; 2. Растворитель: в мерную колбу на 1 л вносят 100 мл концентрированной HNO_3 , 50 мл раствора калия периодата и доводят водой до метки; 3. Стандартный раствор марганца (100 мкг/мл): 0,4388 г перекристаллизованного марганца сернокислого растворяют в 1 л воды. Из этого раствора готовят рабочие растворы с содержанием марганца 1 и 10 мкг/мл. Для построения калибровочной кривой к 10 мл растворителя добавляют от 1 до 5 мл рабочего раствора марганца (1 и 10 мкг/мл), объем доводят водой до 15 мл, прибавляют 10 мл раствора периодата калия, кипятят 1 ч и т.д. Пробы содержат от 1 до 50 мкг Mn.

Оборудование. Колориметр, муфельная печь.

Ход определения. К фильтрату добавляют 10 мл раствора калия периодата и кипятят 1 ч. После охлаждения доводят объем водой до метки (25 мл), перемешивают и через 1 час измеряют оптическую плотность на ФЭК при 500 нм против контроля (10 мл растворителя, 5 мл воды, 10 раствора калия периодата; смесь кипятят в течение 1 ч). Используют кюветы на 10 или 15 мл.

10. Определение кобальта (2)

Принцип метода. Метод основан на получении окрашенного комплекса кобальта с 2-(2-пиридилазо) - 5 - диэтилметааминофенолом (ПААФ) при pH 5, экстракции его хлороформом и измерении оптической плотности среды (метод Гусева С.И.). Для устранения влияния других микроэлементов, реагирующих с ПААФ, их окрашенные комплексы разлагают 10 н H_2SO_4 .

Подготовка материала к анализу. 10 г воздушно-сухого растительного образца переносят в фарфоровые тигли, помещают их в холодный муфель и обугливают при открытой дверце, повышая температуру до 500°C и выдерживают в течение 4 ч. Содержимое тиглей смачивают водой, приливают 2 мл концентрированной HNO_3 и тщательно перемешивают стеклянной палочкой, смывая приставшие к ней частички водой в тигель. Далее пробу упаривают досуха на водяной бане, помещают в муфель, повышают температуру до 500°C и выдерживают 15 мин. При наличии частичек угля содержимое снова обрабатывают HNO_3 и прокалывают. К золе приливают 2,5 мл 20 %-ной HCl и 5 мл воды, накрывают тигель часовым стеклом, кипятят 5 мин и фильтруют в мерную колбу на 50 мл. Отмывают стенки тигля и фильтр небольшими порциями воды. Объем раствора в колбе доводят до метки. При анализе печени или других животных тканей навеску следует увеличить до 50 г и брать на анализ весь солянокислый раствор (10–20 мл).

Реактивы. 1. 20 %-ный раствор натрия цитрата: 200 г соли в 1 л воды; 2. 3M раствор натрия ацетата: 408 г соли растворяют в 1 л воды; 3. 0,3 н раствор HCl : 24 мл кислоты (уд. масса 1,19) разбавляют водой до 1 л; 4. 0,05 %-ный спиртовой раствор ПААФ. Реактив устойчив; 5. Основной стандартный раствор кобальта (100 мкг/мл): 0,2017 г $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ растворяют в 0,5 л 0,3 н HCl . Для построения калибровочной кривой готовят раствор с содержанием 1 мкг Co в 1 мл. В делительные воронки вносят 0,2; 0,4; 0,8; 1,0; 1,5 и 2,0 мл рабочего раствора кобальта и доводят объем до 2 мл 0,3 н HCl .

Оборудование. Колориметр, муфельная печь, водяная баня.

Ход определения. Отбирают пипеткой 10 мл раствора золы, что соответствует 2 г анализируемого материала. В делительные воронки приливают 2,5 мл раствора натрия цитрата, 2,5 мл натрия ацетата, 1 мл раствора ПААФ, тщательно перемешивая содержимое после прибавления каждого реактива. Через 10 мин приливают 10 мл 10 н H_2SO_4 , пере-

мешивают, приливают 5 мл хлороформа из бюретки и встряхивают делительную воронку в течение 1 мин. Дают фазам разделиться и нижний слой сливают непосредственно в кювету колориметра. Интенсивность окраски измеряют на спектрофотометре при 570 нм против контроля в кюветах с толщиной просвечиваемого слоя 3 см.

Расчет ведут по калибровочному графику с учетом взятой навески и разведения. Количество раствора золы может быть больше или меньше 10 мл.

11. Определение йода при помощи роданид-нитратной реакции (10)

Принцип метода. Метод основан на катализирующем действии йодид-иона на реакцию окисления роданид-иона железом. Чувствительность реакции 10^{-5} мкг/мл.

Реактивы. 1. 10 %-ный раствор сернокислого цинка ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$): 100 г соли растворяют в 900 мл воды; 2. 0,5 н раствор едкого натра (NaOH): 20 г щелочи растворяют в 1 л воды; 3. 3 %-ный раствор углекислого калия (K_2CO_3): 300 г соли растворяют в 700 мл воды; 4. 2 н раствор едкого кали (KOH): 112 г щелочи в мерной колбе на 1 л доводят до метки водой; 5. 0,006M раствор роданида калия (KCNS): 0,6 г в мерной колбе на 1 л доводят водой до метки; 6. 0,235M раствор нитрата натрия ($NaNO_3$): 20 г вещества в мерной колбе на 1 л доводят водой до метки; 7. 5 %-ный раствор азотнокислого калия (KNO_3): 50 г соли растворяют в 950 мл воды; 8. 0,255M раствор железоммонийных квасцов ($NH_4Fe(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$) в 2 н, точно оттитрованном растворе азотной кислоты: 100 г квасцов нагревают и растворяют в 1 л 2 н раствора кислоты, выдерживают 10–12 ч и фильтруют; 9. Стандартный раствор йода. Основной раствор должен содержать 500 мкг йода в 1 мл: калия йодид (KJ) высушивают при $105^\circ C$ до постоянной массы и растворяют 0,131 г в воде в мерной колбе на 200 мл. Хранят в холодильнике. Срок хранения пяти последних реактивов, используемых при колориметрировании, не должен превышать шести месяцев.

Рабочие растворы готовят перед опытом: раствор А (концентрация йода 10 мкг/мл) – 2 мл основного раствора в мерной колбе доводят водой до 100 мл; раствор Б (содержание йода 40 нг/мл) – 0,8 мл раствора А доводят водой до 200 мл. Этот последний раствор используется для приготовления стандартов.

Оборудование. Центрифуга, колориметр, сушильный шкаф.

Ход определения. Определение белковосвязанного йода в сыворотке (плазме) крови: в кварцевую центрифужную пробирку (диаметр около 2 см, высота 7 см) вносят 1 мл сыворотки крови, 7 мл бидистиллированной воды, 1 мл 10 %-ного раствора сернокислого цинка и 1 мл 0,5 н раствора едкого натра, тщательно перемешивая раствор после внесения каждого реактива. Параллельно ставят контрольный опыт со всеми реактивами, кроме сыворотки крови. Спустя 30 мин смесь центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин. Центрифугат сливают, а осажденный белок 2–3 раза отмывают от остатков неорганического йода 10 мл воды с последующим центрифугированием и удалением надосадочной жидкости. К осадку добавляют 1 мл 2 н раствора едкого натра, перемешивают стеклянной палочкой, которую затем смывают 1 мл воды. Осадок высушивают в сушильном шкафу при $105^\circ C$ в течение 10–12 ч, а затем помещают в холодную муфельную печь, доводят температуру в ней при закрытой дверце до $600^\circ C$, периодически (3–4 раза) открывая дверцу на 15 с для ускорения процесса озоления. Если озоление произошло не полностью (в пробах имеются частички темного цвета), то пробирки охлаждают, осадок смачивают 2–3 каплями 5 %-ного раствора азотнокислого калия, высушивают при температуре $150^\circ C$ 30 мин, переносят в разогретую (150 – $200^\circ C$) муфельную печь, доводят температуру до $600^\circ C$ и выдерживают 15 мин. Озоление при более низкой темпера-

туре очень длительно, приводит к образованию большого количества продуктов неполного сгорания органического вещества и завышению результатов. Сгорание образцов при температуре выше 620°C вызывает улетучивание йода из йодида цинка. Пробы охлаждают, золу с помощью стеклянной палочки смывают со стенок пробирки, четырехкратно добавляя воду (по 2,5 мл), тщательно перемешивают. Центрифугируют при 3000 об/мин в течение 20 мин.

В чистую пробирку с притертой пробкой вносят 4 мл прозрачного центрифугата, 0,4 мл 0,006М раствора нитрата натрия и 1,6 мл 0,2М раствора железоммонийных квасцов в 2 н азотной кислоте. Пробирку дважды взбалтывают и включают секундомер. С интервалом 1 мин заливают два последних реактива в последующие пробирки.

Через 25 мин от начала реакции при комнатной температуре (22–23°C) фотометрируют на ФЭК при 430 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм против воды. При более низкой температуре для реакции требуется больше времени (при 18°C – 30 мин), а при более высокой – меньше (при 26°C – 20 мин).

Поскольку кинетика реакции сильно зависит от температуры воздуха и растворов, вначале проводят фотометрирование стандартных растворов. Пробирки с анализируемыми растворами следует предохранять от прямых солнечных лучей, поскольку свет, как и йод, катализирует эту реакцию.

Расчеты. Содержание белковосвязанного йода (СБЙ) в пробе определяют по формуле:

$$\text{СБЙ} = A \cdot 10 \cdot 100/4 \cdot 1 \cdot 100 = (1 \text{ проба} - 1 \text{ контроля})/4$$

где А – количество йода (мг), найденное по калибровочному графику за вычетом йода в контроле; 10 – объем раствора золы (мл); 100 – коэффициент для перевода в мкг %; 4 – объем центрифугата, взятого для определения (мл); 1 – объем сыворотки (мл); 1000 – мг в 1 мкг.

Определение общего йода проводят по той же методике, включая предварительное осаждение белка и его промывание. Поэтому к 1 мл сыворотки сразу прибавляют 1 мл 2 н раствора едкого калия, перемешивают и далее повторяют все операции, как и при определении СБЙ.

Неорганический йод определяют по разнице между количеством общего йода и СБЙ.

Исследование молока. 1 мл молока перемешивают с 1 мл 2 н раствора едкого калия, высушивают при 150°C и далее делают все операции, начиная с высушивания в сушильном шкафу при 150°C в течение 10–12 ч.

Исследование воды. 5 мл воды перемешивают с 0,2 мл 3 %-ного раствора углекислого калия, высушивают и озоляют в течение 5 мин после достижения температуры в муфеле 600°C. Далее делают то же, что при определении СБЙ в сыворотке крови.

Исследование кормов. Берут 0,2 г измельченного до однородной массы образца корма в воздушно-сухом состоянии, добавляют 1,2 мл 3 %-ного раствора углекислого калия, перемешивают и оставляют при комнатной температуре на сутки. Затем высушивают при 150°C и далее делают то же, что и при определении СБЙ в сыворотке крови.

Исследование щитовидной железы. Железу измельчают, берут навеску 0,05 г, растирают с 1 мл 30 %-ного раствора углекислого калия до суспензии и оставляют на ночь. Затем высушивают при температуре 150°C, помещают в холодный муфель, доводят температуру до 600°C и озоляют 30 мин. Далее поступают как при определении СБЙ при исследовании сыворотки крови. На анализ берут 0,1–0,2 мл прозрачного центрифугата, доводят до 4 мл водой, добавляют 0,4 мл 0,006М раствора железоммонийных квасцов в 2 н азотной кислоте и проводят исследование как и при определении СБЙ.

12. Определение фтора при помощи ионоселективного электрода (11)

Принцип метода. Определение фтора основано на растворении фтористых соединений пробы в хлорнокислой среде pH 1–2 и измерении потенциала фторидного электрода в суспензии анализируемой пробы с цитратным буфером при pH 4,4–5,2. Предел обнаружения – 1 мкг F в анализируемом объеме раствора.

Реактивы. 1. Раствор хлорной кислоты: к 1 л воды приливают 14 мл HClO_4 , тщательно перемешивают и для установления pH 1 по каплям добавляют кислоту (на pH-метре); 2. Соляная кислота, разбавленная 1:1; 3. Раствор натрия лимоннокислого трехзамещенного: растворяют 300 г соли в 10 мл HCl (1:1) и 600 мл дистиллированной воды и доводят объем до 1 л. Устанавливают pH $6,5 \pm 0,3$ на pH-метре с помощью соляной кислоты (1:1); 4. Приготовление стандартного раствора фтористого натрия 0,1M: в стакан вместимостью 100 мл отвешивают 2,1 г NaF , предварительно прокаленного при 400°C в платиновой чашке в течение 30 минут, приливают 100 мл раствора лимоннокислого натрия и полученный раствор количественно переносят раствором хлорной кислоты в мерную колбу вместимостью 500 мл, доводят объем до метки раствором хлорной кислоты и смесь перемешивают. Из данного раствора готовят раствор фтористого натрия 0,01M и растворы меньшей концентрации. Все стандартные растворы хранят в полиэтиленовой посуде: 0,1M раствор – в течение года, 0,01M раствор – в течение 1 месяца, растворы меньшей концентрации используют свежеприготовленными.

Оборудование. Магнитная мешалка.

Ход определения. Перед испытанием продукт тщательно растирают в фарфоровой ступке до пудрообразного состояния. В две полиэтиленовые мензурки вместимостью 30 мл отвешивают от 0,05 до 0,3 г продукта, чтобы количество фтора в навеске составляло от 1 до 50 мкг. Приливают по 15 мл раствора хлорной кислоты, pH 1, предварительно нагретого до 50°C , ставят в магнитную мешалку с подогревом до 50°C , включают перемешивание и выдерживают 15 мин. Полученную суспензию охлаждают до комнатной температуры, приливают 3 мл раствора лимоннокислого натрия. Далее в порядке возрастания навесок в полученную суспензию погружают электроды, помещают на магнитную мешалку и через 3 мин делают замер потенциала. Одновременно проводят холостой опыт без продукта. Для этого в полиэтиленовую мензурку приливают 15 мл раствора хлорной кислоты и ход определения повторяют до замера потенциала.

Расчеты. Содержание фтора в пробах рассчитывают по предварительно построенному градуировочному графику. Градуировочный график строят на бумаге с полулогарифмической сеткой, откладывая по оси абсцисс концентрацию фтора, а по оси ординат – величину потенциала (мВ).

Подготовка фторидного селективного электрода. Перед началом работы селективный электрод вымачивают в течение суток в 0,1M растворе фтористого натрия. При последующем хранении электрод выдерживают в дистиллированной воде, периодически обновляя ее до достижения исходного значения.

13. Атомная абсорбционная спектрофотометрия минеральных элементов (2)

Принцип метода. В основе атомно-абсорбционного метода лежит явление селективного поглощения световой энергии свободными невозбужденными атомами элемента, подчиняющееся закону Бугера-Ламберта-Бера. Связь между оптической плотностью A поглощающего слоя, его длиной l и концентрацией элемента C выражается зависимо-

стью $A = K\lambda \cdot I \cdot C$, где $K\lambda$ – коэффициент, зависящий от длины волны света (лямбда).

По величине оптической плотности (ОП) поглощающего слоя судят о концентрации в нем определяемого элемента. Прямая пропорциональная зависимость между концентрацией атомов в поглощающем слое и его ОП при атомно-абсорбционном анализе наблюдается для ограниченного интервала концентраций.

Подготовка образцов. Жидкие растворы (вода, моча, плазма или сыворотка) иногда можно распылять в пламени непосредственно без какой-либо предварительной подготовки. При этом нужно знать приблизительно интервал концентраций определяемых элементов с тем, чтобы выбрать нужную степень разбавления анализируемого раствора (если это необходимо). Если содержание определяемого элемента в растворе слишком велико, раствор перед анализом должен быть разбавлен растворителем так, чтобы концентрация определяемого элемента находилась в оптимальном для измерения интервале (в 20–200 раз выше предела обнаружения). Если же, наоборот, концентрация определяемого элемента в растворе мала, могут потребоваться либо предварительная химическая обработка пробы, либо растягивание шкалы при измерении. Для подавления мешающих эффектов может оказаться необходимым добавление к анализируемому водному раствору спектроскопического буфера.

Твердые образцы (корма, органы и ткани животных, кал и т.д.) можно перевести в водный раствор после мокрого или сухого озоления органической основы проб. Сухое озоление – относительно простой, применяемый для многих проб метод, при котором не требуется вводить дополнительные реагенты, внося тем самым возможность загрязнения. Однако основной недостаток этого метода заключается в том, что могут произойти значительные потери элементов вследствие улетучивания, адсорбции на стенках посуды, сорбции кислотонерастворимой частью золы. При мокром озолении образец обрабатывают концентрированными минеральными кислотами и сильными окислителями. Мокрое озоление происходит быстро и при более низких температурах, поэтому оно вызывает намного меньше неприятностей, связанных с потерями из-за улетучивания. Главным недостатком этой методики является возможность внесения загрязнений из-за большого избытка применяемых реагентов.

Выпаривание растворителя применяется в тех случаях, когда анализируемая проба не содержит твердых веществ в качестве ее основных компонентов. Концентрирование путем упаривания растворителя обычно используется для обогащения пробы. Необходимым условием при этом является исключение возможности образования каких-либо летучих соединений определяемого элемента.

Депротенизация биохимических образцов проводится в тех случаях, когда элементы должны определяться непосредственно в образцах крови или сыворотки. Простой метод удаления протеинов из таких образцов заключается в том, что к 1 мл сыворотки добавляют 1 мл 10 %-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Полученную смесь встряхивают и центрифугируют, после чего отстоявшийся слой жидкости можно непосредственно распылять в пламени атомизатора. Добавка трихлоруксусной кислоты вызывает разрыв связей большинства металлов с белками и определяемые элементы (например, медь, цинк, железо) остаются при центрифугировании в жидкой фазе.

Экстрагирование следовых количеств металлов растворителями наиболее широко используется для целей разделения и концентрации при анализе. В атомно-абсорбционном анализе можно, и часто целесообразно, одновременно экстрагировать всю группу определяемых элементов, а не каждый в отдельности. Обычно экстракцию элементов из

водных растворов проводят несмешивающимися органическими растворителями, чаще всего с использованием хелатообразующих реагентов. Органическая фаза анализируется после ее отделения от водной. Использование органических экстрактов в атомно-абсорбционном анализе позволяет не только концентрировать определяемые элементы, но и снижать абсолютный предел их обнаружения, изменяя условия в пламени, и отделять определяемый элемент от значительного избытка других растворенных твердых веществ, которые могут затруднить распыление и атомизацию растворов.

Для экстракции элементов применяют дитизон, купферрон, 8-оксихинолин, диэтилдитиокарбомат натрия и аммонийпирролидиндитиокарбомат (АПДК). Отметим, что АПДК – наиболее универсальный реагент. Комплексы элементов с АПДК растворимы в различных кетонах. Из них метилизобутиленкетон, который входит в число растворителей, рекомендуемых для атомно-абсорбционной спектрофотометрии, позволяет увеличить концентрацию определяемого элемента в растворе примерно в 10 раз.

Экстракция с применением метилизобутиленкетона. К 50 мл раствора образца приливают 5 мл 1 %-ного раствора АПДК и устанавливают нужное значение рН раствора добавлением уксусной кислоты или гидроокиси натрия. Величина рН для большинства элементов должна быть равна 5, за исключением молибдена (рН 3). При определении марганца рН раствора увеличивают до 12, после чего смесь выдерживают при этом рН в течение 2 мин, а затем устанавливают значение рН раствора, равное 5. В случае определения хрома и молибдена анализируемый раствор перед экстракцией нагревают до 80°C, выдерживают при этой температуре в течение 5 мин, переносят раствор в делительную воронку объемом 100 мл и экстрагируют комплекс из горячего раствора (в противном случае может наблюдаться выпадение хрома и молибдена в осадок) добавлением 4 мл метилизобутиленкетона и энергичным встряхиванием содержимого воронки в течение 30 с. После расслоения водной и органической фаз, для чего требуется примерно 2 мин, водный слой переносят в другую делительную воронку и повторяют экстракцию хрома и молибдена, добавляя к раствору 1 мл метилизобутиленкетона. Затем водную фазу отбрасывают (она должна быть бесцветной), объединяют оба экстракта, перемешивают и фильтруют через слой ваты в небольшой стакан. Этот раствор можно использовать непосредственно для распыления в пламени. Стандартные растворы для всех элементов нужно готовить по такой же точно методике после смешивания исходных растворов элементов.

Дитизон образует экстрагируемые комплексы примерно с двадцатью различными металлами, а диэтилдитиокарбоматы обладают почти таким же универсальным характером, как и пирролидиндтиокарбоматы. Эти реагенты образуют комплексы с теми же металлами, что и АПДК, однако по сравнению с последним их преимущества весьма незначительны. Одним из наиболее полезных хелатообразующих реагентов является 8-оксихинолин. Он способен образовывать экстрагируемые комплексы с металлами, обычно не вступающими во взаимодействие с АПДК. В особенности это касается алюминия, кальция, стронция и магния.

Добавка смешивающихся неводных растворителей. В практике атомно-абсорбционного анализа хорошо известно, что добавка ацетона к анализируемому водному раствору вызывает увеличение поглощения в резонансных линиях при определении некоторых элементов. Действительное увеличение сигнала абсорбции наблюдается только в тех случаях, когда фактор "усиления" сигнала превышает величину уменьшения поглощения вследствие разбавления проб. Увеличение чувствительности измерений наблюдается при определении меди, марганца,

железа, кальция и магния, если растворы проб предварительно разбавлять ацетоном в соотношении 1:1.

Построение калибровочных графиков. Связь между измеряемой величиной поглощения и концентрацией определяемого элемента устанавливают в процессе калибровки. Калибровочные кривые строят, откладывая по оси абсцисс концентрации элемента (мкг/мл) и по оси ординат – соответствующие им показатели поглощающей способности. Для приготовления калибровочных растворов вначале обычно готовят основные, сравнительно концентрированные растворы каждого элемента, а затем уже получают рабочие калибровочные растворы путем последовательного разбавления исходных. В случае, когда анализ проводят без предварительной экстракции элемента, разбавление стандартов осуществляют водными растворами тех кислот, которые применяли для подготовки проб (озоление, осаждение белков и т.д.). При использовании метода экстракции стандартные растворы готовят так же, как и анализируемые образцы. Режимы работы атомных абсорбционных спектрофотометров указаны в таблице.

Режим работы атомных абсорбционных спектрофотометров

Элемент	Длина волны, нм	Тип пламени	Предел обнаружения, мкг/мл
Алюминий	309,3	II	0,2
Железо	248,3	I	0,007
Кадмий	228,8	I	0,002
Калий	766,5	I	0,003
Кальций	422,7	I	0,002
Кобальт	240,7	I	0,02
Кремний	251,6	II	0,5
Магний	285,2	I	0,0005
Марганец	279,5	I	0,003
Молибден	313,3	I	0,04
Медь	324,7	I	0,003
Натрий	589,0	I	0,0007
Никель	232,0	I	0,004
Свинец	217,0	I	0,02
Селен	196,1	I	0,1
Хром	357,9	I	0,008
Цинк	213,8	I	0,001

I – воздух-ацетилен; II – закись азота-ацетилен.

Реактивы. 1. Основной стандартный раствор алюминия (1 мг/мл): растворяют 1 г металлической фольги в 20 мл HCl и доводят до 1 л; 2. Основной стандартный раствор железа (1 мг/мл): растворяют 1 г металлического железа, свободного от оксидов, в 20 мл 4M HCl + 5 мл HNO₃ и доводят до 1 л. Можно приготовить стандарт из сернокислого железа закисного особой чистоты (4,979 г FeSO₄ · 7H₂O в 1 л воды); 3. Основной стандартный раствор кадмия (1 мг/мл): растворяют 1 г металлического кадмия в 15 мл HCl и доводят водой до 1 л или 1,142 г CdO растворяют в 20 мл 5M HCl и доводят водой до 1 л. 4. Основной стандартный раствор калия (1 мг/мл): 1,907 г KCl в 1 л воды; 5. Основной стандартный раствор кальция (1 мг/мл): растворяют 2,497 г CaCO₃ в 20 мл 5M HCl и доводят водой до 1 л; 6. Основной стандартный раствор кобальта (100 мг/мл): растворяют 0,477 г CoSO₄ · 7H₂O в 5 мл 5M HCl и доводят водой до 1 л или 0,4037 г CoCl₂ · 6H₂O растворяют в мерной колбе на 1 л водой, подкисленной 2–3 мл HCl; 7. Основной стандартный раствор кремния (1 мг/мл): растворяют 7,6 г Na₂SiO₃ · 5H₂O в воде и доводят до 1 л; 8. Основной стандартный раствор магния (1 мг/мл): 1 г металлического магния, свободного от оксида, растворяют в 50 мл 5M HCl и доводят

водой до 1 л или 1,658 г MgO растворяют в 20 мл 5M HCl и доводят водой до 1 л; 9. Основной стандартный раствор марганца (100 мкг/мл): растворяют 0,1 г металлического марганца в 5 мл HCl и доводят водой до 1 л; 10. Основной стандартный раствор молибдена (1 мг/мл): растворяют 1,829 г $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ в воде и доводят до 1 л; 11. Основной стандартный раствор меди (100 мкг/мл): растворяют 0,1 г металлической меди в 50 мл 5M HCl и доводят водой до 1 л или 0,196 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ растворяют в воде и доводят до 1 л; 12. Основной стандартный раствор натрия (1 мг/мл): 2,542 г NaCl растворяют в 1 л воды; 13. Основной стандартный раствор никеля (1 мг/мл): растворяют 1 г металлического никеля в 50 мл 5M HCl и доводят водой до 1 л; 14. Основной стандартный раствор свинца (1 мг/мл): растворяют 1 г металлического свинца в 50 мл 5M HNO_3 и доводят водой до 1 л; 15. Основной стандартный раствор селена (1 мг/мл): растворяют 1 г элементарного селена в 15 мл HCl + 5 мл HNO_3 и доводят водой до 1 л; 16. Основной стандартный раствор хрома (1 мг/мл): растворяют 1 г металлического хрома в 50 мл HCl и доводят водой до 1 л; 17. Основной стандартный раствор цинка (100 мкг/мл): растворяют 0,1 г металлического цинка в 50 мл 5M HCl и доводят водой до 1 л или 0,440 г $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ растворяют в воде, добавляют 5 мл H_2SO_4 и доводят водой до 1 л; 18. 5 %-ный раствор лантана: 8,8 г LaCl_3 в 100 мл воды; 19. 1 %- и 2 %-ный раствор аммонийной соли пирролидиндителиокарбомата: растворяют 1 или 2 г АПДК в 100 мл воды, энергично помешивая. Далее раствор фильтруют. Устойчив не более суток; 20. 1 %-ный раствор водный диэтилдителиокарбомата натрия; 21. 0,75 %-ный водный раствор динатриевой соли ЭДТА; 22. 5 %-, 10 %- и 20 %-ные водные растворы трихлоруксусной кислоты (ТХУ); 23. Метилизобутилкетон; 24. 2,5M раствор NaOH; 25. Ацетон; 26. 4M и 5M соляная кислота; 27. HNO_3 , HClO_4 , H_2SO_4 , HCl; 28. Сапонин-тритоновый раствор: к 5 мл тритона X-100 добавляют 5 г сапонины и разводят водой до 25 мл.

Ход определения.

Особенности определения кальция и магния. Небольшое количество сыворотки (например, 0,4 мл) разбавляют в 24 раза 0,75 %-ным раствором ЭДТА. Калибровочные растворы готовят с содержанием кальция и магния в пределах 0–15 и 0–4 мг/100 мл соответственно. Эти растворы затем подвергают разбавлению 0,75 %-ным раствором ЭДТА в пропорции 1:24.

Для определения кальция в моче анализируемую пробу разбавляют, чтобы концентрация находилась в интервале 5–20 мг/л с учетом добавки на каждые 5 мл конечного раствора 1 мл 5 %-ного раствора лантана (в виде LaCl_3). Калибровочные растворы содержат 0–20 мг/л кальция в 1 %-ном растворе лантана.

Анализируемую на содержание магния пробу мочи разбавляют водой так, чтобы концентрация элемента находилась в интервале 0,5–2 мг/л. Растворы распыляют в обедненное воздушно-ацетиленовое пламя и измеряют абсорбцию относительно калибровочных растворов, содержащих 0–2 мг/л магния.

Для определения кальция и магния в твердом или других веществах применяют удаление органических веществ с помощью мокрого и сухого озоления. Однако во всех случаях к конечному раствору необходимо добавлять освобождающие агенты для устранения влияния фосфатов, нитратов и перхлоратов.

Особенности определения железа. Прямое распыление в пламя образцов сыворотки может служить причиной нестабильной работы пламени и приводит к засорению горелки и распылительной системы. В случае, если пламя и вся аппаратура работает настолько стабильно, что при измерениях абсорбции допустимо растягивание шкалы, концентрацию железа в сыворотке можно определить после простого разбавле-

ния проб водой в пропорции 1:2, распыляя полученную смесь в пламя через многощелевую горелку. Методики анализа, основанные на предварительном отделении белков, позволяют получать наиболее точные результаты, особенно в тех случаях, когда чувствительность измерений может быть улучшена добавлением ацетона к анализируемому раствору. Такая методика состоит в следующем: к 2 мл сыворотки добавляют 0,1 мл 4М HCl, а затем через час приливают 1 мл 20 %-ной трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Содержимое пробирки перемешивают и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин. Из верхнего слоя жидкости отбирают точно половину первоначального объема (1,55 мл) в сухую пробирку, добавляют 0,5 мл ацетона и раствор распыляют в обедненное воздушно-ацетиленовое пламя. Калибровочные растворы готовят смешиванием 2 мл исходного раствора с содержанием железа в интервале 0–3 мкг/мл, 0,1 мл 4М HCl, 1 мл 20 %-ной ТХУ и 1 мл ацетона. Содержание железа в калибровочном растворе в пересчете на исходные образцы эквивалентно концентрации 0–300 мкг/100 мл.

Кровь и раствор зол кормов и тканей организма животных можно анализировать без предварительной экстракции элемента метилизобутилкетонем. Цельную кровь берут в количестве 0,02 мл, смешивают с 1,98 мл 0,2М HCl и анализируют. Мочу с высокой концентрацией железа можно анализировать прямым распылением в пламени. При низком содержании железа в моче приходится применять экстракцию элемента АПДК в метилизобутилкетоне.

Особенности определения меди и цинка. Вследствие высокой чувствительности измерений меди и цинка сыворотку, плазму крови и мочу можно анализировать без предварительного концентрирования. Твердые образцы подготавливают путем сухого или мокрого озоления с последующим растворением остатка. Если при определении элементов в сыворотке крови необходимо удалить белки, то поступают следующим образом: отбирают 1 мл сыворотки и 1 мл 10 %-ной ТХУ в центрифужную пробирку. Содержимое пробирки тщательно перемешивают и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин. Верхний слой раствора распыляют в обедненное воздушно-ацетиленовое пламя. Калибровочные растворы готовят на основе 5 %-ной ТХУ. Концентрация меди или цинка в калибровочных растворах составляет 0–1 мкг/мл.

Особенности определения натрия и калия. Эти элементы анализируют после разбавления образца (сыворотка, слюна, моча, раствор золы и др.) водой с таким расчетом, чтобы концентрация натрия и калия составляла 0,3–3,0 и 1–10 мг/л соответственно.

Особенности определения кадмия. Берут 10–20 мл раствора золы кормов и тканей, мочи или супернатанта крови и доводят pH среды до 6,0–7,5 при помощи 2,5М NaOH. Далее добавляют 1 мл 1 %-ного раствора диэтилдитиокарбомата натрия, 2,5 мл метилизобутилкетона и встряхивают 2 мин. Если образовалась эмульсия, то центрифугируют и анализируют органическую фазу.

Особенности определения кобальта, марганца, молибдена, никеля, свинца. Берут 10–30 мл раствора золы и доводят pH 2,5М едким натром до 2–3 при определении марганца, кобальта и никеля, до 3,5–4,5 при определении молибдена и до 2,2–2,8 при определении свинца. Добавляют 1–2 мл 2 %-ного раствора АПДК, 5–10 мл метилизобутилкетона, встряхивают 2 мин, центрифугируют в течение 10 мин при 3000 об/мин и далее анализируют органическую фазу. В сыворотке (плазме) крови марганец и кобальт лучше определять методом добавок. В крови свинец концентрируется в основном в эритроцитах, в связи с чем их анализируют следующим образом: отбирают пипеткой 1 мл гепаринизированной крови и добавляют 1 каплю сапонин-триптонового раствора. Содержимое тщательно перемешивают, добавляют 1 мл 2 %-ного раствора АПДК, затем пробирку встряхивают в течение 30 с, вносят 1

мл метилизобутилкетона и снова встряхивают в течение 1 мин. Смесь переливают в пробирку и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин. Верхний слой жидкости распыляют в обедненное воздушно-ацетиленовое пламя. Калибровочные растворы объемом 1 мл, содержащие свинец в интервале концентраций 0–1 мкг/мл, обрабатывают аналогичным образом.

Режим работы на атомно-абсорбционном спектрофотометре зависит от типа прибора и описан в инструкции к нему. Основные правила работы следующие: присоединяют лампу с полым катодом для соответствующего элемента к источнику питания и устанавливают оптимальное значение силы тока, обеспечивающее стабильную работу; устанавливают длину волны; юстируют лампу с полым катодом и устанавливают ширину щели, усиление и напряжение фотоэлектрического умножителя в оптимальном рабочем режиме для прибора; зажигают пламя и юстируют горелку.

Устанавливают оптимальное значение подачи окислителя и горючего газа для определяемого элемента. При этом достигают такого взаимного расположения щели спектрофотометра, спектральной лампы, поглощающей ячейки (пламя) и приемно-регистрающей системы, при которой чувствительность и воспроизводимость для определяемого элемента являются максимальными. Затем устанавливают нулевую позицию шкалы прибора с помощью распыления чистого растворителя или соответствующей контрольной пробы и анализируют рабочие стандартные растворы, которые вводят в пламя в возрастающих концентрациях. После этого проводят анализ исследуемых образцов.

Прибор необходимо проверять через каждые 15–20 проб с помощью наиболее концентрированного рабочего стандартного раствора и в конце работы пропускать повторно все стандарты.

Расчеты. Концентрацию элемента рассчитывают, умножая найденное по калибровочному графику значение на фактор разведения.

14. Анализ кислотно-щелочного состояния организма (2).

Нормальное функционирование органов и систем организма животных возможно только при определенных значениях pH внутренней среды. Первоначально оценку кислотно-щелочного состояния (КЩС) проводили по показателю "щелочной резерв", а термин "ацидоз" употребляли как показатель истощения запаса бикарбоната, а не как показатель снижения pH плазмы крови. В последнее время для характеристики КЩС используют новые показатели: pH – отрицательный логарифм концентрации ионов водорода. В норме pH крови колеблется от 7,28 до 7,48: при pH ниже 6,8 и выше 7,8 процессы жизнедеятельности организма нарушаются. Регуляция постоянства pH крови, внеклеточной и внутриклеточной жидкости осуществляется нейрогуморальным путем через почки, легкие, буферные системы угольной, фосфорной и молочной кислот и оснований, системой гемоглобина и белками крови. По классификации Аструпa нарушения КЩС проявляются в виде метаболического ацидоза (увеличения в крови кислот) и алкалоза (увеличения в крови оснований) и в виде респираторного (дыхательного) ацидоза и алкалоза, которые могут быть компенсированными и некомпенсированными.

H^+ – концентрация ионов водорода, выраженная в наномолях на литр (10^{-9}).

pCO_2 – парциальное давление углекислого газа в миллиметрах ртутного столба, непосредственно связанное с количеством растворенной углекислоты и выраженное или в мм рт.ст., или в килопаскалях (40 мм рт.ст. = 5,3 кПа). pCO_2 является дыхательным компонентом КЩС.

Буферная линия – линия на $\log pCO_2/pH$ -диаграмме, отражающая связь между $\log pCO_2$ и pH для данной пробы крови.

Дыхательный ацидоз – первичная альвеолярная гиповентиляция с $p\text{CO}_2 > 40$ мм рт. ст. ($>5,3$ кПа), ведущая к снижению pH ($\text{pH} < 7,4$ или $\text{H}^+ > 40$ нмоль/л).

Дыхательный алкалоз – первичная альвеолярная гипервентиляция с $p\text{CO}_2 < 40$ мм рт.ст. ($< 5,3$ кПа), ведущая к повышению pH ($\text{pH} > 7,4$ или $\text{H}^+ < 40$ нмоль/ л).

Избыток оснований (BE, base excess) – лучший параметр для оценки метаболического компонента КЩС. Если величина BE отрицательна (отмечается метаболический ацидоз), то лучше говорить о дефиците оснований (ВД, base deficit). Величины BE и ВД выражают в ммоль/л. В связи с тем, что в применяемых номограммах используют только показатель BE, можно пользоваться и его отрицательным значением. BE определяют как количество оснований, которое необходимо, чтобы довести кровь до нормального pH при $p\text{CO}_2$, равной 40 мм рт.ст., температуре 37°C и том же насыщении крови кислородом, которое имелось в организме.

Следует отметить, что если используют эквивалентную технику Аструпa, все результаты получают с поправкой на полное насыщение гемоглобина. Если же в самой пробе содержался ненасыщенный гемоглобин, то величины BE получаются несколько завышенными. Необходимо всегда указывать, при каких условиях (с эквивалентной или без нее) проведены измерения.

Метаболический ацидоз – это первичный дефицит оснований, приводящий к снижению pH, а метаболический алкалоз – первичный избыток оснований, приводящий к повышению pH.

Буферные основания (BB – buffer base) являются вторым метаболическим параметром КЩС и используются в основном для сопоставления последнего с электролитным балансом. BB выражают в ммоль/л. Рост BB наблюдается при метаболическом алкалозе, снижение – при метаболическом ацидозе. Между BE и BB существует следующее соотношение: $\text{BB} = \text{BE} + 42$.

Дыхательная компенсация – это снижение $p\text{CO}_2$ при метаболическом ацидозе и повышение $p\text{CO}_2$ при метаболическом алкалозе. Метаболическая компенсация – повышение BE при дыхательном алкалозе или снижение BE при дыхательном ацидозе.

Достижения в вопросах исследования КЩС, сделавшие измерение pH и $p\text{CO}_2$ одним из самых частых и важных анализов, связаны в основном с новой техникой. Для определения КЩС существуют специальные анализаторы, среди которых наибольшее распространение получили приборы фирм "Корнинг", "Радиометр", "Раделкис", "Пластомед" и др. В основе работы этих приборов заложен метод Аструпa, заключающийся в исследовании КЩС двух образцов венозной или капиллярной крови, которые помещают в термостатированные при 37°C измерительные кюветы газоанализатора. В них кровь насыщается двумя стандартными концентрациями углекислого газа, например, с 4 и 8 или 5,6 и 11,2 % CO_2 и затем измеряется pH крови в этих двух образцах. Подставляя эти величины pH в номограммы Сиггаарда-Андерсена, находят значение $p\text{CO}_2$, стандартных бикарбонатов, бикарбонатной емкости и бикарбонатных оснований ($p\text{CO}_2$, SB, BE и BB). В этих номограммах по оси абсцисс отложено значение pH, а по оси ординат – $p\text{CO}_2$, а также приведены кривая буферных оснований в ммоль/л и кривая избытка оснований в ммоль/л.

Ход определения. Прибор включают в сеть и прогревают 30–35 мин, затем настраивают при помощи стандартных буферных растворов pH 7,383 и 6,841. Для этого капилляр электрода заполняют раствором буфера pH 7,383 и настраивают прибор. В промытый дистиллированной водой капилляр засасывают буфер pH 6,841 и регулируют pH, это повторяют несколько раз до тех пор, пока pH будет соответствовать ука-

занным в стандартах. Затем открывают газовые вентили и регулируют поступление газа через увлажнительную камеру. Количество газовых пузырьков должно быть около 60 в минуту. Просушивают кюветы эквивалентатора, заливают кровь в первую и третью, а затем во вторую и четвертую кюветы, включают встряхиватель и в течение трех минут насыщают кюветы с кровью газовой смесью. После эквивилибрации снимают показания pH (эквивилибрацией называется пропускание газовой смеси с углекислым газом определенной концентрации через кровь в течение строго определенного времени для стандартного насыщения крови CO₂ и определения достоверных показателей КЩС). Помимо этого определяют pH цельной крови без насыщения.

Капилляр после каждого определения промывают изотоническим раствором хлорида натрия и дистиллированной водой; таким же образом промывают и кюветы эквивалентатора. Каждый раз перед работой рассчитывают парциальное давление углекислоты (pCO₂) в насыщающих газах по формуле:

$$pCO_2 = (B - W) \cdot CO_2 / 100,$$

где В – атмосферное давление в мм рт.ст.; W – давление водяных паров при 38°C, которое равно 50 мм рт.ст.; CO₂ – содержание углекислоты в газовой смеси, %. Для определения pCO₂ в формулу подставляют цифровые значения барометрического давления водяных паров при 38°C и содержания CO₂ в газовой смеси, подающейся в прибор. Затем находят значение pCO₂ по номограмме Сиггаарда-Андерсена. Нанося две параллельные прямые полученных значений на номограмму, находят значения pCO₂, стандартного бикарбоната (SB), сдвига буферных оснований (BE) и собственно буферных оснований (BB).

Для нахождения этих значений на проведенных линиях pCO₂, полученных при эквивилибрации с двумя стандартными газовыми смесями, откладывают точки полученных при этом значений pH и проводят между ними буферную линию. На этой линии откладывают третью точку – истинное значение pH крови, полученное без эквивилибрации. Прямая, проведенная через эту точку параллельно оси ординат, отражает истинное значение pCO₂. Точка пересечения буферной линии с кривой BE показывает величину избытка буферных оснований. Пересечение с линией SB дает значение стандартного бикарбоната, а с кривой BB – буферных оснований.

В автоматических моделях анализаторов фирм "Плазтомед", "Корнинг" и "Радиометр" установлена микро-ЭВМ, которая позволяет производить автоматическую калибровку прибора, автоматический забор проб и результаты анализа выводить на цифropечать, что резко увеличивает производительность труда и исключает трудоемкие операции по подсчету полученных данных.

15. Определение оксипролина в костной ткани, крови и моче (12)

Принцип метода. Метод основан на окислении оксипролина паратолуолсульфохлорамином натрия в пиррольное соединение, которое при взаимодействии с параметиламинобензальдегидом дает окрашенный комплекс.

Подготовка кости. 50 мг сухого обезжиренного порошка костной ткани помещают в пробирки с воздушным холодильником или притертыми пробками, добавляют 5 мл концентрированной HCl и проводят гидролиз в течение 4 часов при 124°C. Затем гидролизат нейтрализуют (по фенолфталеину) 5M NaOH до нейтральной или слабокислой реакции и доводят объем до 20 мл. 1 мл нейтрализованного гидролизата разбавляют в 10 раз дистиллированной водой.

Подготовка крови. К 2 мл сыворотки крови добавляют 8 мл охлажденного абсолютного этанола. Осажденные спиртом белки отделяют

центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин. Надосадок выпаривают в фарфоровых чашках на кипящей водяной бане. После охлаждения добавляют 1 мл воды. Далее проводят колориметрическое определение оксипролина.

Подготовка мочи. 2 мл суточной мочи гидролизуют с 2 мл концентрированной HCl в пробирках с притертыми пробками в течение 3–5 часов при 100°C. После окончания гидролиза в гидролизат добавляют по 0,2–0,3 г активированного угля и тщательно перемешивают. Спустя 15 минут смесь центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин. 1 мл прозрачной надосадоочной жидкости нейтрализуют описанным для костной ткани способом и конечный объем доводят до 5 мл.

Реактивы. 1. Раствор окислителя (готовят перед употреблением): 4 части ацетатно-цитратного буфера pH 6,0 смешивают с 0,28М раствором хлорамина Т или 0,26М раствором хлорамина Б в отношении 4:1; 2. Ацетатно-цитратный буфер, pH 6,0: растворяют в воде 57 г трехводного ацетата натрия, 37,5 г трехзамещенного цитрата натрия, 5,5 г лимонной кислоты и 385 мл изопропилового спирта и доводят объем раствора до 1 л; 3. 0,28М водный раствор хлорамина Т или 0,26М хлорамина Б (6,95 г хлорамина Б или 6,87 г хлорамина Т в 100 мл раствора). Готовят непосредственно перед употреблением; 4. Реактив Эрлиха: 8,8 г очищенного п-диметиламинобензальдегида растворяют в 20,4 мл концентрированной хлорной кислоты и доводят объем изопропанолом до 50 мл. Раствор стабилен в течение 3 недель при хранении в темной склянке при комнатной температуре; 5. Стандартный раствор оксипролина 0,1 М: 131 мг оксипролина растворяют в 1 л 0,001М HCl. Раствор можно хранить 1–2 недели в холодильнике. Для калибровочного графика готовят рабочие растворы с концентрацией оксипролина в пределах от 0,005М до 0,1М.

Оборудование. Центрифуга, колориметр, водяная баня.

Ход определения. К 1 мл разведенного нейтрализованного гидролизата, тщательно перемешивая, добавляют 2 мл изопропанола и 1 мл окислителя. Через 4 минуты к смеси прибавляют 2 мл реактива Эрлиха и помещают пробирки на 30 мин в водяную баню при 60°C. Затем пробирки охлаждают на воздухе и колориметрируют при 558 нм против контроля, в котором анализируемый раствор заменен водой. Интенсивность полученной окраски не меняется при комнатной температуре в течение 6 часов, а при 4°C – в течение 11 часов. Содержание оксипролина в каждой пробе находят по калибровочной кривой.

Расчеты. Учитывая, что содержание оксипролина в коллагене является практически постоянной величиной и составляет 13,6 %, пересчет на коллагеновые белки производят по следующей формуле:

$$\text{коллаген} = \text{оксипролин} \cdot 100/13,6$$

16. Определение гидроксилизина в костной ткани и моче (2)

Принцип метода. Метод основан на образовании окрашенного комплекса п-диэтиламинобензальдегида с продуктом окисления оксипролина периодатом в щелочной среде.

Подготовка пробы. Для костной ткани та же, что и при определении оксипролина. Пробы мочи готовят следующим образом: 1 мл мочи суспендируют 30 мин на льду с 5 мл холодного ацетона. Затем пробу центрифугируют 15 мин при 1800 об/мин, трижды промывают осадок 5 мл холодного ацетона, добавляют 2 мл 6М HCl и гидролизуют 4 ч при 110°C.

Реактивы. 1. 0,0015М раствор йодной кислоты: 0,314 г H₅JO₆ в 1 л дистиллированной воды. Реактив устойчив в течение 4 месяцев при хранении в темноте; 2. Экстрактивный раствор: 250 мл толуола смешивают с 250 мл изобутанола и 100 мл n-пропанола; 3. Реактив Эрлиха: в 15 мл изобутанола растворяют 4 г п-диэтиламинобензальдегида, добавляют 4,5 мл концентрированной перхлорной кислоты. Реактив ус-

тойчив в течение нескольких недель при хранении при 4°C; 4. Цитратно-фосфатный буфер (pH 7,0): 150 мл 0,15М лимонной кислоты смешивают с 356 мл 0,6М двузамещенного фосфата натрия.

Оборудование. Центрифуга, колориметр.

Ход определения. К 2 мл нейтрализованного гидролизата добавляют 7 мл цитратного буфера и 0,5 мл 0,0015М йодной кислоты. После тщательного перемешивания приливают 3 мл экстрагирующего раствора и встряхивают в течение 15 минут. Затем смесь центрифугируют 10 мин при 1500 об/мин и 0,6 мл органической фазы переносят в сухую пробирку. Прибавляют 0,15 мл реактива Эрлиха и оставляют на 15 минут при комнатной температуре для развития окраски. Колориметрируют при 565 нм против контроля. В контрольной пробе гидролизат заменяют дистиллированной водой.

Расчет ведут по калибровочному графику.

17. Определение растворимости коллагеновых структур костной ткани (2)

Принцип метода. Метод основан на солюбилизации коллагеновых структур костной ткани растворами солей и денатурирующих агентов.

Подготовка пробы. Костные образцы подвергают деминерализации в 0,5М уксусной кислоте в течение 3 недель при 4°C на магнитной мешалке. Полнота деминерализации определяется озолением образцов.

Реактивы. 1. 0,5М уксусная кислота: 29 мл уксусной кислоты в 1 л воды; 2. 1,0М NaCl: 58,44 г соли растворяют в воде и доводят объем до 1 л; 3. 0,5М ЭДТА: 168,1 г этилендиаминтетраацетата натрия растворяют в небольшом количестве воды и доводят объем до 1 л; 4. 5М LiCl: 211,95 г хлористого лития в 1 л воды; 5. 5М KSCN: 485,9 г роданида калия в 1 л воды; 6. 6М HCl: 498 мл концентрированной HCl доводят до 1 л водой.

Оборудование. Центрифуга, термостат.

Ход определения. Деминерализованные образцы костной ткани для извлечения солерастворимого коллагена помещают на 18 ч в 1,0М раствор NaCl (pH 7,4) при 4°C. Растворимый коллаген отделяют центрифугированием при 8000 g на холоду в течение 30 мин и супернатант анализируют на содержание гидроксипролина. Остаток после экстракции в NaCl переносят в 0,5М ЭДТА (pH 7,4) на 18 ч, затем в 5М LiCl (pH 7,4) на 5 суток и в 5,0М KSCN (pH 7,4) на 2 суток и определяют содержание оксипролина в денатурирующих экстрактах. После солюбилизации в растворе KSCN остаток гидролизуют в 6М HCl при 110°C 12 ч для определения нерастворимого коллагена.

Расчеты. Содержание коллагена в каждой фракции выражают в процентах от общего содержания коллагена в пробе.

18. Определение тирозина в костной ткани (2)

Принцип метода. Метод основан на образовании цветного комплекса п-алкилированных фенолов с нитрозоафтолом и азотной кислотой.

Подготовка пробы. 50 мг порошка сухой обезжиренной кости заливают 5 мл HCl и подвергают гидролизу в пробирках с воздушным холодильником или в запаянных ампулах 18 ч при 110°C. Гидролизат нейтрализуют до pH 7,5 (по фенолфталеину), добавляя по каплям 5М NaOH, доводят объем до 20 мл дистиллированной водой, осадок удаляют центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин.

Реактивы. 1. 0,00005М раствор α -нитрозо- β -нафтола в 96 % этаноле: растворяют 0,05 г α -нитрозо- β -нафтола в 61,8 мл 96 % этанола; 2. 2,5М раствор HNO₃ (d=1,36): 40 мл концентрированной HNO₃ растворяют в 250 мл воды; 3. Концентрированная HCl (хч); 4. Стандартный раствор тирозина 2 М: растворяют 181 мг D-тирозина в 500 мл воды. Перед

калибровкой его разводят в 10 раз. Для построения калибровочного графика используют 5 разведений: 1, 2, 3, 4 и 5 мл, что соответствует 0,002, 0,004, 0,006, 0,008, 0,010 моль/мл. Общий объем в пробирке доводят дистиллированной водой до 5 мл.

Оборудование. Центрифуга, колориметр, термостат.

Ход определения. К 1 мл нейтрализованного гидролизата добавляют 4 мл дистиллированной воды, 0,2 мл 0,00005М раствора α -нитрозоз- β -нафтола, 0,5 мл 2,5М HNO_3 , 1 мл концентрированной HCl . Смесь перемешивают после каждого добавления. Пробирки без пробок помещают в кипящую водяную баню на 3 мин для развития окраски. Охлаждают водопроводной водой, перемешивают. Интенсивность развития малиновой окраски определяют колориметрированием при 420 нм. Содержание тирозина определяют по калибровочному графику.

Расчеты. На основании концентраций тирозина и оксипролина (в граммах) предложена формула для количественной оценки общего содержания неколлагеновых белков (НКБ):

$$\text{НКБ} = [(\text{тирозин} - (\text{оксипролин} \cdot 0,6/13,6))/5,5] \cdot 100$$

19. Определение уроновых кислот в костной ткани (2)

Принцип метода. Метод основан на образовании окрашенных производных углеводного компонента уроновых кислот с карбазолом в 80 % серной кислоте.

Подготовка кости к анализу. 25 мг порошка сухой обезжиренной кости помещают в пробирку для гидролиза, добавляют 5 мл фосфатного буфера pH 6,2, 0,05 мМ ЭДТА, 0,005 мМ цистеина и 10 мг папаина. После гидролиза в течение 48 ч при 65°C к раствору добавляют 1,5 мл 1,22М ТХУ и центрифугируют. Осадок удаляют.

Реактивы. 1. 0,025М $\text{Na}_2\text{B}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$: 0,9531 г буры растворяют в 100 мл концентрированной H_2SO_4 (хч); 2. 0,07 мМ карбазол в 96 % этаноле: 0,116 г карбазола в 100 мл 96 %-ного этанола; 3. Буфер для гидролиза: 18,5 мл 0,2М двухзамещенного фосфата натрия и 81,5 мл 0,2М однозамещенного фосфата натрия доводят до 200 мл дистиллированной водой. 0,2М раствор двухзамещенного фосфата натрия (12-водного): 7,64 г реактива в 100 мл воды. 0,2М раствор однозамещенного фосфата натрия (12-водного): 2,16 г реактива растворяют в 100 мл воды. Буфер хранят в холодильнике не более недели; 4. 1,22М ТХУ: 196,2 г ТХУ в 1 л воды.

Оборудование. Центрифуга, колориметр, водяная баня.

Ход определения. К 0,05 мл гидролизата приливают 0,45 мл дистиллированной воды, 3 мл 0,025М раствора тетрабората натрия в серной кислоте. Перемешивают и охлаждают в холодной воде до комнатной температуры, после чего помещают на 10 мин в кипящую водяную баню. После охлаждения добавляют 0,1 мл 0,07 мМ карбазола в этаноле, перемешивают и нагревают 15 мин на кипящей водяной бане. Охлаждают до комнатной температуры и измеряют оптическую плотность при 530 нм. Окраска стабильна 16 ч. В контрольной пробе гидролизат заменяют водой.

Концентрацию уроновых кислот определяют по графику, построенному с глюкуроналланом или глюкуроновой кислотой.

20. Определение гексозаминов в костной ткани (13)

Принцип метода. Метод основан на фотометрическом определении окрашенных комплексов п-диметиламинобензальдегида с замещенными производными пиррола, образующихся при взаимодействии гексозамина с ацетилацетоном.

Подготовка пробы. К 1 мл гидролизата, приготовленного для определения уроновых кислот, добавляют 1 мл 8М HCl , закрывают пробками

со шлифом и гидролизуют 4 ч при 92°C. После окончания гидролиза содержимое нейтрализуют 2М углекислым натрием до pH 5,0–6,0.

Реактивы. 1. 8М HCl: 24,8 мл концентрированной HCl доводят до 100 мл дистиллированной водой; 2. 2М Na₂CO₃: 10,6 г реактива растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 100 мл; 3. Ацетил-ацетоновый реактив: 2 мл ацетилацетона в 100 мл 2М Na₂CO₃; 4. Реактив Эрлиха: к 0,8 г п-диметиламинобензальдегида добавляют 30 мл 96 % этанола и 30 мл концентрированной HCl; 5. Стандартный раствор – 400 мкг/мл α-глюкозамина гидрохлорида. Из стандартного раствора готовят ряд разведений – от 80 до 240 мкг/мл.

Оборудование. Термостат, колориметр, водяная баня.

Ход определения. К 2 мл нейтрализованного гидролизата добавляют 1 мл 2 %-ного ацетилацетона в 2М Na₂CO₃ и нагревают 20 мин на кипящей водяной бане. Затем пробирки охлаждают, приливают 2 мл 96 % этанола и 1 мл реактива Эрлиха. После добавления реактива Эрлиха осадок исчезает и раствор становится прозрачным. Объем содержимого доводят до 10 мл дистиллированной водой и через 5 мин колориметрируют розовую окраску при 490 нм.

Количество гексозамина рассчитывают по графику.

21. Спектрофотометрическое определение сульфатированных гликозаминогликанов (2)

Принцип метода. Метод основан на различиях в спектрах поглощения комплекса гликозаминогликанов (ГАГ), 1,9- диметилового синего и раствора красителя.

Подготовка пробы. Раствор ГАГ готовят папаиновым протеолизом так же, как и для определения уроновых кислот.

Реактивы. 1. 1,9-диметиловый синий: 16 мг красителя растворяют в 5 мл этанола, добавляют 2 г муравьинокислого натрия и 2 мл муравьиной кислоты, после чего доводят объем до 1 л дистиллированной водой.

Ход определения. 0,25 мл раствора ГАГ помещают в пробирку на 5 мл, добавляют 2,5 мл 1,9-диметилового синего, хорошо перемешивают и немедленно измеряют оптическую плотность при 535 нм против контроля. В контрольную пробу вместо раствора ГАГ вносится вода. Через 10 мин после добавления красителя может выпасть осадок комплекса ГАГ, особенно при высокой концентрации гликозаминогликанов в растворе.

Расчет. Количество сульфатированных ГАГ определяют по калибровочному графику, построенному по стандарту, содержащему от 1 до 25 мг хондроитинсульфата.

22. Определение лимонной кислоты в костной ткани (14)

Принцип метода. Метод количественного определения лимонной кислоты основан на ее исчезновении и очистке полученного раствора с последующим окислением и бромированием в пентабромацетон, который при pH 9,2 образует окрашенные в желтый цвет соединения.

Подготовка материала к анализу. Высушенную до постоянной массы и обезжиренную кость измельчают в порошок в количестве 100–200 мг (в зависимости от степени минерализации) и инкубируют с 2 мл 2М HCl при комнатной температуре 24 часа. Затем к пробе приливают 2 мл дистиллированной воды и центрифугируют 30 мин при 5000 об/мин. Отбирают 3 мл надосадочной жидкости, добавляют 1 мл 0,56М ацетата кальция, 1 мл водного раствора аммиака для получения щелочной реакции и 4 мл 96 %-ного этанола. После этого пробы помещают на 1 ч в водяную баню при 70°C для осаждения лимоннокислого кальция. Осадок промывают спиртом и подсушивают на водяной бане до полного удаления спирта. Затем осадок растворяют в 2 мл 2М HCl и 1 мл дистиллированной воды.

Реактивы. 1. 2М HCl; 2. 0,56М ацетат кальция: 98,56 г (CH₃COO)₂Ca · H₂O в 1 л воды; 3. Водный раствор аммиака (1:1); 4. 96 % этанол; 5. Ванадиевая кислота (20 г ванадиевой кислоты в 1 л 2М H₂SO₄); 6. Бромлирующий реактив (40 г KBr и 11 г KBrO₃ в 1 л дистиллированной воды); 7. 0,41М раствор соли Мора (готовят непосредственно перед использованием): 197,62 г NH₄Fe(SO₄)₂ · 12H₂O в 1 л воды; 8. Хлороформ; 9. Цветной реактив: 2 г безводного сернистого натрия в 100 мл смеси метанол-этиленгликоль (35:65); 10. Стандартный реактив лимонной кислоты 47 · 10⁻⁷М (основной раствор содержит 1 мг лимонной кислоты в 1 мл 2М H₂SO₄). Рабочий раствор получают разведением основного стандарта в 10 раз 2М H₂SO₄. 3 мл рабочего стандарта содержат 141 · 10⁻⁸М лимонной кислоты.

Оборудование. Центрифуга, колориметр, водяная баня.

Ход определения. К полученному раствору лимонной кислоты добавляют в качестве окислителя 1 мл ванадиевой кислоты и спустя 30 мин – 1 мл бромлирующей смеси. Раствор перемешивают и через 30 мин добавляют по каплям свежеприготовленный 0,41М раствор соли Мора до появления изумрудного окрашивания. Затем в пробирку вносят 5 мл хлороформа для экстракции пентабромацетона и встряхивают в течение 5 мин. Отбирают 3 мл хлороформного экстракта и приливают 2 мл цветного реактива. Сразу же появляется желтое окрашивание, интенсивность которого регистрируют спустя 10 мин при 445 нм против холостой пробы (3 мл хлороформа и 2 мл цветного реактива). Окраска устойчива 3–4 часа. Параллельно с определением в опытных пробах ставят контроль со стандартным раствором лимонной кислоты.

Расчет концентрации лимонной кислоты проводят по формуле:

$$X = E_{\text{оп}} \cdot 4 \cdot 100 \cdot 141 \cdot 10^{-8} / E_{\text{станд}} \cdot 3 \cdot C$$

где X – содержание лимонной кислоты, моль; E_{оп} – показатель экстинкции в опыте; E_{станд} – показатель экстинкции в стандартной пробе; 141 · 10⁻⁸ – количество лимонной кислоты в стандартной пробе (моль); 3 – количество экстракта, взятого для анализа, мл; C – навеска костной ткани, г. Предел чувствительности: 0,5–1000 мкг лимонной кислоты.

23. Экстракция нуклеиновых кислот из образцов костной ткани (15)

Принцип метода. Метод основан на ферментном гидролизе образцов костной ткани с последующей хлороформ-фенольной депротеинизацией и осаждением нуклеиновых кислот.

Подготовка пробы. Непосредственно после убоя животного кость очищают от мягких тканей и замораживают в жидком азоте. Готовят 5 %-ный гомогенат разрушением 0,5 г костной ткани в 10 мл буферной смеси, содержащей 0,035М додецилсульфата натрия, 5 мМ ЭДТА, 10 мМ трис (рН 7,5) и 65 г/мл протеиназы К. Гомогенат инкубируют 1 час при 40°C. Гомогенат можно приготовить и папаиновым протеолизом в 0,1М ацетатном буфере рН 5,7–5,8, содержащем 2 мМ цистеина, 2 мМ ЭДТА и 15 мг папаина в 10 мл буфера, при 65°C в течение 48ч.

Реактивы. 1. 0,5М раствор фенола: 4,7 г фенола растворяют в 100 мл трис-буфера; 2. Ацетатный буфер: А) растворяют 8,2 г уксуснокислого натрия в дистиллированной воде и доводят объем до 1 л; в) 5,8 мл ледяной уксусной кислоты доводят до 1 л дистиллированной водой. Смешивают 94 части раствора А и 6 частей раствора Б. На 500 мл буфера добавляют 0,325 г цистеина и 0,293 г ЭДТА; 3. 10 мМ трис-HCl буфер (рН 7,5): к 5 мл 0,2М триса добавляют 7,5 мл 0,1М HCl и доводят общий объем до 100 мл дистиллированной водой; 4. 0,04М NaCl в 66 %-ном этаноле: к 5,85 г NaCl добавляют 68,6 мл 96 % этанола и доводят объем дистиллированной водой до 100 мл; 5. 3М ацетат натрия, содер-

жащий 5 мМ ЭДТА, рН 7,0: 0,14 г ЭДТА и 24,6 г ацетата натрия растворяют в 100 мл раствора; 6. 0,0035М додецилсульфат натрия: 0,1 г реактива в 1 л воды.

Оборудование. Центрифуга.

Ход определения. К 10 мл полученного гомогената добавляют 5 мл 0,5М фенола в 10 мМ трис-НСl буфере рН 7,5 и 5 мл хлороформа. Смесь тщательно перемешивают в течение 5 мин и центрифугируют 20 мин при 25000g. Собирают водную фазу и вновь экстрагируют с фенолом и хлороформом. Нуклеиновые кислоты осаждают из водной фазы добавлением сухого порошка NaCl до конечной концентрации 0,1М и 2 объемов этанола при 20°C в течение ночи. Осадок собирают центрифугированием при 13000 g в течение 10 мин и трижды промывают 0,04М NaCl в 66 % этаноле для ликвидации следов фенола и лиофилизируют. Общие нуклеиновые кислоты растворяют в воде в концентрации 1–2 мг/мл и определяют содержание в растворе ДНК. Для осаждения РНК к раствору добавляют 2 объема 3М ацетата натрия, 5 мМ ЭДТА рН 7,0. Осадок дважды промывают 3М ацетатом натрия, 5 мМ ЭДТА рН 7,0 и 1 раз 0,04М NaCl в 66 %-ном этаноле.

24. Определение механических характеристик костной ткани (2)

Принцип метода. Определение механической прочности костной ткани проводят методами, используемыми в инженерной практике для изучения механической прочности материалов. Сущность методов сводится к выявлению критической нагрузки, необходимой для разрушающей деформации образца костной ткани.

Подготовка кости к анализу. Для исследования отбирают образцы костей не позднее 1–2 суток после убоя животного. Для анализа выбирают кости, наиболее часто подвергающиеся травмам, или пястные, так как считают, что последние наиболее полно отражают крепость костяка в целом. В возрастных группах, в целях снижения статистического разброса данных, подбирают кости приблизительно одинакового размера и с одной и той же (правой или левой) половины тела. Достоверная оценка может быть проведена при исследовании 8–10 образцов. Для предотвращения деградации отобранный материал до начала анализа хранят в полиэтиленовых пакетах при температуре –20°C. Допустимый срок хранения в этих условиях до 4 недель. Понижение температуры ниже –20°C и повышение выше +37°C нежелательно, так как приводит к необратимым изменениям костной ткани и, следовательно, ее механических свойств. Консервирование костной ткани раствором формалина с целью длительного хранения приводит к снижению порога разрушающей деформации. Перед исследованием с кости или ее фрагмента удаляют мягкие ткани, включая надкостницу, и выпиливают отрезок трубки диафиза цилиндрической формы или параллелепипед размером 10x10x50 мм.

Определение прочности костной ткани на сжатие. Прочность костной ткани на сжатие определяют величиной усилия в кг, при котором происходит разрушение образца костной ткани. Однако, поскольку прочность зависит от размеров образца, то для сравнительной оценки прочности различных костей используют показатель удельной прочности. Удельная прочность (сигма) характеризуется отношением нагрузки, при которой происходит разрушение образца (P, кг), к площади поперечного сечения S (см²):

$$\sigma = P/S \text{ (кг/см}^2\text{)}$$

Для трубчатых костей площадь кольца диафиза вычисляют по разнице площади сечения диафиза к площади полости диафиза:

$$S = \pi \cdot r^2 \text{ кости} - \pi \cdot r^2 \text{ полости}$$

Для установления прочности костной ткани на сжатие образец кости устанавливают вертикально на стол пресса. После включения пресса на образец начинает действовать увеличивающееся давление, которое разрушает костную ткань. Скорость увеличения нагрузки должна быть приблизительно 3 кг/мин. Давление, развиваемое прессом в момент разрушения образца, показывает величину критической нагрузки, то есть прочность.

Определение прочности костной ткани на изгиб. Предел прочности костной ткани на изгиб, так же, как и на сжатие, определяют величиной нагрузки в кг, необходимой для полного ее разрушения в поперечном направлении. Удельную прочность на изгиб вычисляют с помощью различных формул.

Для прямоугольных спилов прочность на изгиб определяют отношением изгибающего момента (M) к моменту сопротивления (W):

$$M = P L/4,$$

где P – прилагаемая нагрузка, кг; L – расстояние между двумя опорными призмами, на которых лежит кость, см; M – момент изгиба.

$$W = B h^2/6,$$

где B – ширина образца, см; h – высота, см; W – момент сопротивления.

$$\text{Прочность на изгиб} = M/W = P \cdot L \cdot 6/4 \cdot B \cdot h^2 = 1,5 \cdot P \cdot L/B \cdot h^2$$

Для исследования прочности кости на излом на столе пресса устанавливают две трехгранные призмы, на которые помещают костный образец. Нагрузка на кость поступает через третью призму, укрепленную на верхней плоскости пресса, до полного разрушения образца.

При исследовании цилиндрической костной ткани или цельной кости используют следующую формулу для расчета предела прочности на изгиб:

$$\text{Предел прочности на изгиб} = \text{сила (кг)} \times \text{длина (см)} \times C \text{ (см)} / 4 \times \text{момент инерции (см)}$$

где значение C для плечевой и бедренной кости равно 0,5 диаметра, а для пястных, плюсневых костей и ребер $C = 4 \times \text{высоту}/3$.

Момент инерции J рассчитывают на основании замеров диаметра среза.

Для плечевой и бедренной кости момент инерции равен:

$$J = 0,0491 (ВД^3 - вд^3),$$

Для пястных, плюсневых костей и ребер

$$J = 0,0549 (ВД^3 - вд^3),$$

где D и B – внешние диаметры кости в см в точке приложения силы; d и b – внутренние диаметры кости в см. Диаметры B и b измеряют в направлении, перпендикулярном приложению силы, а D и d – параллельно направлению приложения силы.

Исследование прочности костной ткани на изгиб и сжатие можно проводить в лабораториях, имеющих пресс любой конструкции.

Определение механической прочности может быть выполнено также на различных специальных приборах. Для этих целей используют пресс Гагарина, пресс Амслера, аппарат Шопера типа МФ-100, универсальную испытательную машину ГМС-20, разрывную машину М-500 и др.

25. Определение плотности и порозности костной ткани (2)

Принцип метода. Среднюю плотность образца костной ткани определяют отношением его массы к объему. Для этого высушенную до по-

стоянной массы и обезжиренную костную ткань взвешивают на аналитических весах. Геометрические размеры определяют микрометром или путем взвешивания в жидких средах: воде, ксилоле или четыреххлористом углероде. Кость или ее фрагмент помещают в сосуд с жидкостью так, чтобы образец полностью был погружен в нее и взвешивают на аналитических весах. Расчет объема производят по следующей формуле:

$$\text{Объем} = (\text{масса кости на воздухе} - \text{масса кости в жидкости}) / \text{плотность жидкости}$$

Для исследования степени порозности находят объем высушенного и обезжиренного образца костной ткани в инертных по отношению к кости растворителях: кислоте или четыреххлористом углероде – это начальный объем кости. Затем выдерживают образец в растворителе под отрицательным давлением или в течение 7 суток при нормальных условиях для заполнения пор растворителем. По достижении максимальной массы рассчитывают объем по приведенной выше формуле. Это так называемый "чистый" объем кости. Разницу между начальным и конечным объемами определяют как объем пор. Отношение "чистого" объема к начальному отражает степень порозности костной ткани.

26. Определение активности цитохромоксидазы в митохондриях (16)

Принцип метода определения активности железо- и медь-содержащего фермента цитохромоксидазы (КФ 1.9.3.1) заключается в том, что при контакте митохондрий с диметил - п- фенилендиаминдигидрохлоридом (ДФДХ) образуется пигмент в количестве, пропорциональном активности фермента и времени инкубации в течение первых 3 мин. Прямая пропорциональность сохраняется при количестве митохондрий, содержащих от 1 до 30 мкг общего азота. Специфическим субстратом служит добавляемый цитохром С, а донором электронов – ДФДХ.

Подготовка проб к анализу. 1 г свежей или замороженной в жидком азоте ткани гомогенизируют в 9 мл 0,25М раствора сахарозы в гомогенизаторе с тефлоновым или стеклянным (мышца, стенка кишечника) пестиком и затем центрифугируют в рефрижераторной центрифуге при 2°C и 700 g в течение 10 мин. Надосадочную жидкость сливают, а осадок, содержащий ядра и обломки клеток, дважды промывают, суспендируя при помощи стеклянной палочки в 10 мл 0,25М сахарозы и центрифугируя при тех же условиях. Смывы объединяют с надосадочной жидкостью, а осадок отбрасывают. Объединенную жидкость центрифугируют при 8000 g в течение 10 мин, надосадочную жидкость сливают, а осадок суспендируют в 10 мл 0,25М сахарозы и снова центрифугируют при тех же условиях. Супернатант и промывную жидкость отбрасывают. Осадок, содержащий митохондрии, суспендируют в 9 мл 0,25М раствора сахарозы, тщательно перемешивают палочкой. Затем митохондрии замораживают при -10°C на 10–15 ч. После оттаивания в них определяют содержание белка по Лоури и активность ферментов.

Реактивы. 1. Боратный буфер 1/60 М, pH 8,5: готовят 0,05М раствор натрия тетрабората $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (19,108 г/л) и 0,1 н HCl из фиксанала, смешивают в соотношении 6,3:3,5 и добавляют двойное количество воды (160+90+500). Хранят в холодильнике; 2. 0,4 %-ный водный раствор N,N-диметил-п- фенилендиаминдигидрохлорида (ДФДХ). Готовят перед употреблением; 3. Этанол 96° (ректификат); 4. Раствор цитохрома С: растворяют 0,04 г цитохрома в 100 мл воды. Готовят перед работой; 5. 0,25М водный раствор сахарозы (85,5 г/л). Хранят в холодильнике; 6. Фосфатный буфер, 1/15 М, pH 6,5: смешивают 313 мл 1/15М раствора $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (11,866 г/л) с 687 мл 1/15М рас-

твора KH_2PO_4 (9,073 г/л). Хранят в холодильнике; 7. Раствор калия двухромовокислого ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$): растворяют 0,04 г реактива в 100 мл воды; 8. Основной стандартный раствор ДФДХ (20 мкМ/мл): 0,4184 г в 100 мл воды, 25 мл этого раствора сразу же доводят водой до 100 мл. Рабочий раствор содержит 5 мкмоль ДФДХ в 1 мл. Готовят перед употреблением.

Оборудование. Центрифуга, ультратермостат, колориметр.

Ход определения. В 4 пробирки Вассермана (небольшие центрифужные пробирки с тонкой стенкой) вносят 0,4 мл боратного буфера, 0,4 мл раствора цитохрома С и 1 мл взвеси митохондрий. В одну из пробирок (контроль) добавляют 1 мл спирта. Аккуратно перемешивают и ставят в ультратермостат при 37°C на 3 мин. Затем прибавляют 0,2 мл 0,4 %-ного раствора ДФДХ и инкубируют 3 мин при 37°C (по секундомеру). Содержимое пробирок становится ярко-розовым. Пробы ставят в лед и добавляют по 1 мл этанола (во все, кроме контроля), энергично перемешивают и снова ставят в лед. Затем колориметрируют на спектрофотометре при 536 нм или на ФЭК с зеленым светофильтром (№6) против воды в кювете на 3 мм между рабочими гранями. Цвет неустойчив. Из оптической плотности опытной пробы вычитают оптическую плотность контроля.

Расчеты. Активность фермента (Е) выражают в мкмольях ДФДХ, окисленного за 1 мин в расчете на 1 мг белка или на 1 г свежей ткани при 37°C :

$$E = k/t \cdot b \text{ или } E = k \cdot 10/t \cdot 1,$$

где k – количество ДФДХ по калибровочной кривой, мкмоль; t – время, мин; b – количество белка в 1 мл суспензии митохондрий, мг; 10 и 1 – объем и аликвота суспензии митохондрий, полученных из 1 г ткани, мл.

Для построения калибровочной кривой в 20 пробирок (5 проб по 4 параллельных) вносят от 1,0 до 1,35 мл фосфатного буфера (рН 6,5), 0,05; 0,10; 0,20; 0,30; 0,40 мл рабочего раствора ДФДХ (5 мкмоль/мл) и по 0,6 мл раствора калия бихромата. Содержимое перемешивают, его объем равен 2 мл. Пробы ставят в ультратермостат при 37°C на 3 мин. Затем помещают в лед, добавляют по 1 мл этанола и колориметрируют. В четвертую пробу вместо калия бихромата вносят фосфатный буфер (чтобы вычесть самоокисление ДФДХ). Пробы содержат 0,25; 0,59; 1,00; 1,50 и 2,00 мкмоль ДФДХ.

27. Определение активности сукцинатдегидрогеназы в митохондриях (16)

Принцип метода определения активности железосодержащего фермента цикла Кребса сукцинатдегидрогеназы (КФ 1.3.99.1) состоит в том, что трифенилтетразолий хлорид (ТТХ) в присутствии фермента и сукцината восстанавливается в соединение красного цвета – формазан. В качестве промежуточного переносчика электронов между дегидрогеназой и ТТХ служит феназинметасульфат.

Подготовка проб к анализу такая же, как и для цитохромоксидазы.

Реактивы. 1. Фосфатный буфер, 1/15 М, рН 7,4: готовят 1/15М раствор $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (11,866 г/л) и 1/15М раствор KH_2PO_4 (9,073 г/л) и смешивают их в соотношении 818:182; 2. 0,02М раствор янтарной кислоты: 0,236 г в 100 мл фосфатного буфера; 3. Ацетон; 4. Натрия сульфид (Na_2S); 5. Раствор феназинметасульфата (0,1 г в 100 мл воды); 6. 0,1%-ный раствор 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида (ТТХ) на фосфатном буфере; 7. Стандартный раствор ТТХ (10 мкмоль/мл): 0,3348 г ТТХ в 100 мл фосфатного буфера. Из него готовят рабочие растворы, содержащие от 0,1 до 1,0 мкмоль ТТХ в 1 мл.

Оборудование. Центрифуга, колориметр, термостат.

Ход определения. В три центрифужные пробирки на 10 мл вносят 0,5 мл фосфатного буфера, 0,5 мл раствора сукцината и 1 мл взвеси митохондрий. Содержимое перемешивают и ставят на преинкубацию в водяную баню при 37°C на 10 мин. Затем добавляют 0,5 мл раствора феназинметасульфата и 1 мл 0,1 %-ного раствора ТТХ. Пробы перемешивают и инкубируют при 37°C в течение 1 ч. Далее их охлаждают в ледяной ванне, добавляют 5 мл ацетона и тщательно перемешивают. Пробы центрифугируют в рефрижераторной центрифуге при 3500 об/мин в течение 10 мин. Далее измеряют оптическую плотность на ФЭК (при 490 нм, кювета 5 мм между стенками) против ацетона. Цвет устойчив в темноте и при низкой температуре, но ввиду летучести ацетона колориметрировать следует сразу же.

Расчеты. Активность фермента (Е) выражают в мкмольх ТТХ, восстановленного в течение 1 ч в расчете на 1 мг белка или на 1 г свежей ткани при 37°C.

$$E = k/b \text{ или } E = 10 k/1,$$

где *k* – количество ТТХ по калибровочной кривой, мкмоль; *b* – мг белка в 1 мл взвеси митохондрий; 10 и 1 – объем и аликвота взвеси митохондрий, мл.

Для построения калибровочной кривой в центрифужные пробирки вносят 0,5 мл раствора сукцината, 1 мл стандартного раствора, содержащего 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 и 1,0 мкмоль ТТХ, 0,5 мл феназинметасульфата, доводят фосфатным буфером до 3,5 мл, вносят несколько кристаллов натрия сульфида и инкубируют в течение 1 ч. Далее пробы охлаждают, прибавляют 5 мл ацетона, центрифугируют и колориметрируют против ацетона.

28. Определение активности церулоплазмينا в плазме крови (17)

Принцип метода. Церулоплазмин (КФ 1.10.3.2) – это медьсодержащий фермент, катализирующий окисление двухвалентного железа в трехвалентное и некоторых полиаминов, в том числе п-фенилендиамина, на чем и основано его определение. В холодильнике активность фермента сохраняется около двух недель. Результаты при использовании плазмы и сыворотки получаются одинаковыми.

Реактивы. 1. 0,25 %-ный водный раствор п - фенилендиаминдигидрохлорида. В холодильнике в темной склянке раствор сохраняется неделю. Если же окраска становится бурой, то он к употреблению не годен; 2. Стандартный раствор п - фенилендиаминдигидрохлорида (10 мкмоль): 0,1811 г реактива растворяют в 100 мл воды. Для построения калибровочной кривой из него готовят растворы, содержащие от 0,1 до 0,7 мкмоль п-фенилендиамина в 1 мл; 3. 0,1М ацетатный буфер, рН 6,0: 13,609 г хч натрия ацетата (CH₃COONa·3H₂O) растворяют в мерной колбе на 1 л, прибавляют 0,3 мл хч ледяной уксусной кислоты и доводят водой до метки. Хранят в холодильнике; 4. 0,1 %-ный водный раствор натрия азиды (NaN₃) или 0,1 %-ные растворы цианистого натрия или калия. Раствор натрия азиды устойчив и не требует особых условий для хранения, а водные растворы цианидов следует готовить перед употреблением; 5. Раствор калия двуххромовокислого (K₂Cr₂O₇): 0,1 г в 100 мл воды. Реактивы перед употреблением подогревают до комнатной температуры.

Оборудование. Спектрофотометр, центрифуга, водяная баня.

Ход определения. В три опытные и одну контрольную пробирки (удобны пробирки Вассермана) вносят по 2 мл ацетатного буфера, 0,2 мл гепаринизированной плазмы крови (для птиц), перемешивают, добавляют по 1 мл 0,25 %-ного раствора п-фенилендиамина и снова перемешивают. Пробы инкубируют в водяной бане в течение 1 ч при 37°C, затем их быстро помещают в ледяную воду. После этого в опытные

пробы добавляют из бюретки по 1 мл раствора натрия азида (в контроль его вносят сразу после прибавления плазмы) и тщательно перемешивают, затем центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин. Интенсивность полученной окраски измеряют на спектрофотометре при 530 нм против воды. Окраска устойчива не более 5 ч. Из оптической плотности опытной пробы вычитают оптическую плотность контроля. Плазму крови (сыворотку) свиней, овец и крупного рогатого скота берут в количестве 0,05–0,1 мл, инкубируют в течение 30 мин и не центрифугируют после добавления азида натрия.

Расчеты. Активность церулоплазмينا (Е) выражают в мкмольх п-фенилендиамина, окисленного в течение 1 ч на 1 мл плазмы крови при 37°C.

$$E = k \cdot 1/A,$$

где *k* – количество п-фенилендиамина по калибровочной кривой, мкмоль; *A* и 1 – аликвота плазмы и пересчет на 1 мл.

Для построения калибровочной кривой в опытные пробирки помещают по 2 мл ацетатного буфера, 0,2 мл раствора $K_2Cr_2O_7$ и по 1 мл стандартного раствора, содержащего 0,10; 0,20; 0,30; 0,40; 0,50; 0,60 и 0,70 мкмоль п-фенилендиамина. Пробы инкубируют 1 ч, затем добавляют по 1 мл натрия азида и измеряют оптическую плотность. Контроль (0,2 мл ацетатного буфера вместо раствора $K_2Cr_2O_7$) ставится для учета самопроизвольного окисления п-фенилендиамина.

29. Определение активности щелочной и кислой фосфатаз в плазме крови и тканях (2)

Принцип метода. Цинксодержащая щелочная (КФ 3.1.3.1) и кислая (КФ 3.1.3.2) фосфатазы играют важную роль в обмене фосфорных соединений. Сущность метода заключается в том, что под действием фосфатаз происходит расщепление добавляемого в реакционную среду п-нитрофенола, который в щелочной среде имеет желтый цвет. Интенсивность окраски измеряют спектрофотометрически.

Реактивы. 1. Субстратно-буферный раствор для щелочной фосфатазы, pH 10,5: в мерную колбу на 100 мл вносят 0,375 г глицина, 0,165 г п-нитрофенилфосфата натриевой соли, 42 мл 0,1M NaOH и доводят водой до метки. Проверяют pH. Хранят в холодильнике в темной склянке не более недели; 2. Субстратно-буферный раствор для кислой фосфатазы, pH 4,8: 0,410 г лимонной кислоты, 1,125 г натрия цитрата трехзамещенного и 0,165 г п-нитрофенилфосфата натриевой соли растворяют в 100 мл воды. Хранят так же, как и реактив №1; 3. 0,1 и 0,02M растворы NaOH; 4. Стандартный раствор п-нитрофенола (5 мкмоль/мл): 0,696 г индикатора растворяют в 1 л 0,02M NaOH. Затем берут 10 мл этого раствора и доводят 0,02M NaOH до 1 л. Рабочий раствор содержит 0,05 мкмоль п-нитрофенола в 1 мл.

Оборудование. Спектрофотометр, водяная баня.

Ход определения. Ткани промывают холодным физиологическим раствором и замораживают в жидком азоте. Далее растирают в ступке, берут навеску и гомогенизируют в 0,25M сахарозе в соотношении 1:9. Для определения активности щелочной фосфатазы берут 0,1 мл, для определения кислой – 0,2 мл. Далее в 6 пробирок (по 2 опытных пробы и 1 контрольной для каждого фермента) вносят по 1 мл субстратно-буферных растворов. Пробы для кислой фосфатазы преинкубируют в водяной бане при 37°C в течение 10 мин. Затем в опытные пробы добавляют 0,2 мл плазмы крови для щелочной фосфатазы и 0,1 мл для кислой, перемешивают и инкубируют 30 мин при 37°C. Затем пробы охлаждают, добавляют по 10 мл 0,02M NaOH для щелочной фосфатазы и 5 мл – для кислой. В контрольные пробы вносят соответствующее количество плазмы. Содержимое пробирок перемешивают и через 1 ч

измеряют оптическую плотность на спектрофотометре при 410 нм против воды. Цвет устойчив. Активность ферментов в гомогенате определяют таким же образом. Из оптической плотности опытной пробы вычитают оптическую плотность контроля.

Расчеты. Активность ферментов (Е) выражают в микромолях п-нитрофенола, освободившегося в 1 мл плазмы крови или 1 г ткани в течение 1 ч при 37°C.

$$E(\text{плазмы}) = k \cdot 1 \cdot 2/0,2(0,1); E(\text{ткани}) = k \cdot 2 \cdot 10 \cdot 10/1 \cdot 0,1(0,2)$$

где k – количество п-нитрофенола по калибровочной кривой, мкмоль; 2 – коэффициент пересчета с 30 мин на 1 ч, остальные коэффициенты служат для пересчета на 1 мл плазмы или на 1 г ткани. Активность ферментов в кишечнике целесообразно выражать в мкмольях п-нитрофенола.

Для построения калибровочной кривой в пробы вносят по 1 мл субстратно-буферных растворов, от 1 до 5 мл рабочего раствора п-нитрофенола (0,05 мкмоль/мл) и доводят объем для кислой фосфатазы до 6,1 мл, для щелочной – до 11,1 мл. Пробы содержат от 0,05 до 0,25 мкМ п-нитрофенола. Чтобы не строить калибровочные кривые отдельно для плазмы и гомогената, следует всегда доводить объем содержимого пробирок 0,02М NaOH до определенной величины.

30. Определение активности ксантиндегидрогеназы в цитоплазматической фракции клеток печени (16)

Принцип метода. Ксантиндегидрогеназа (КФ 1.2.3.2) является Мо- и Fe-содержащим флавопротеидом. В некоторых тканях встречаются изоферменты, содержащие вместо молибдена медь. Сущность метода определения активности фермента состоит в том, что ксантиндегидрогеназа катализирует окисление добавленного в среду ксантина с образованием мочевой кислоты. Это ведет к повышению оптической плотности реакционной среды, измеряемой на спектрофотометре при 290 нм.

Подготовка проб к анализу. Печень гомогенизируют в 0,25М сахарозе в соотношении 1:9. Гомогенат центрифугируют при 40000 g в течение 30 мин при 2°C.

Реактивы. 1. Фосфатный буфер 0,05 М, pH 7,8: смешивают 915 мл раствора $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (8,9 г/л) с 85 мл раствора KH_2PO_4 (6,8 г/л). Хранят в холодильнике; 2. Раствор НАД: 0,0108 г в 2 мл фосфатного буфера. Готовят перед употреблением; 3. Раствор ксантина: 0,029 г в 50 мл теплого раствора 0,02 н NaOH. Хранят в холодильнике в темной склянке; 4. Стандартный раствор мочевой кислоты №1: 0,1681 г мочевой кислоты в 100 мл фосфатного буфера (10 мкмоль/мл); 5. Стандартный раствор мочевой кислоты №2: 10 мл раствора №1 в 100 мл фосфатного буфера (1 мкмоль/мл).

Оборудование. Спектрофотометр.

Ход определения. Реактивы перед работой подогревают до комнатной температуры. Реакцию ведут при 30°C в термостатирующей кювете. Устанавливают водородную лампу, длину волны 290 нм, темновой ток. В кювету вносят 2,7 мл фосфатного буфера, 0,1 мл раствора НАД, 0,1 мл супернатанта, перемешивают, ставят в кюветодержатель, устанавливают щель. Затем добавляют 0,1 мл раствора ксантина, перемешивают, ставят в кюветодержатель, закрывают крышку спектрофотометра, стрелку mA приводят к нулю изменением ширины щели, включают секундомер и делают отсчет через каждую минуту в течение 4–5 мин (оптическая плотность нарастает линейно). Среднюю скорость изменения экстинкции за счет ферментативной реакции (ОП) находят по формуле:

$$\text{ОП} = (\text{ОП}_k - \text{ОП}_0)/t$$

где OP_0 и OP_k – оптическая плотность в начале и в конце реакции, t – время отсчета, мин.

Расчеты. Активность фермента (E) выражают в мкмольях мочево́й кислоты, образованной в 1 мин на 1 г ткани или 1 мг белка при 30°C.

$$E = 10/0,1 \cdot K,$$

где 10 и 0,1 – объем и аликвота надосадочной жидкости, мл; K – количество мочево́й кислоты по калибровочной кривой, мкмоль.

Для построения калибровочной кривой в кювету спектрофотометра вносят от 1 до 3 мл стандартного раствора №2 и от 0,5 до 3 мл раствора №1 и доводят фосфатным буфером до 3 мл. Измеряют оптическую плотность при 290 нм. Пробы содержат от 1 до 30 мкМ мочево́й кислоты.

31. Определение сульфгидрильных групп в крови методом амперометрического титрования (16)

Принцип метода. В ходе титрования SH-группы связываются с ионами ртути с образованием меркаптидов. При достижении конечной точки титрования в растворе появляются свободные ионы металла, содержание которых пропорционально возникающему диффузионному току, регистрацию которого осуществляют при помощи микроамперметра. Для этой цели целесообразно использовать полярограф типа ОН-102.

Подготовка проб к анализу. Цельная кровь: к 1 мл крови, содержащей гепарин в качестве антикоагулянта, перед титрованием добавляют 9 мл раствора сапони́на; для анализа берут 0,2 мл гемолизата. Эритроциты: гепаринизированную кровь центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин, плазму сливают, а эритроциты 4 раза отмывают физраствором, центрифугируя при тех же условиях; перед титрованием к 1 мл отмытых эритроцитов добавляют 9 мл воды; для анализа берут 0,2 мл гемолизата. Плазма крови и ее фракции: плазму берут в количестве 1 мл; фракционирование производят методом высаливания, для чего к 1 мл плазмы добавляют 3 мл насыщенного раствора сульфата натрия и инкубируют при 37°C в течение 15 мин; для осаждения глобулинов пробу центрифугируют 10 мин при 4000 об/мин, надосадочную жидкость, содержащую альбумины, сливают в стаканчик для титрования с 27 мл физраствора; содержание SH-групп в глобулиновой фракции находят по разнице их в плазме и альбуминовой фракции.

Реактивы. 1. 0,9 %-ный раствор NaCl (физраствор): 9 г хч соли в 1 л воды, желательнó профильтровать и охладить; 2. 0,01 %-ный раствор сапони́на; 3. Насыщенный раствор сульфата натрия: около 230 г хч $Na_2SO_4 \cdot 10H_2O$ на 1 л воды; 4. 0,001M раствор хлорной ртути: 0,2517 г $HgCl_2$ на 1 л воды; 5. 0,001M раствор восстановленного глутатиона: 0,0307 г реактива на 100 мл воды. Используют свежеприготовленный раствор; 6. Азотная кислота, разбавленная водой (1:1); 7. 1 н раствор HCl и насыщенный раствор KCl.

Оборудование. Полярограф типа ОН-102.

Ход определения. Аликвоту крови и ее фракций вносят в стаканчик, содержащий 30 мл физраствора, и устанавливают его на магнитную мешалку типа ОР-912. В стаканчик опускают магнит (в защитной оболочке, прилагается к мешалке), скорость вращения которого должна быть около 500 об/мин. Нужную скорость вращения можно установить и опытным путем. Для этого в стаканчик с 30 мл физраствора приливают 1 мл 0,001M раствора восстановленного глутатиона и титруют 0,001M раствором двухлористой ртути. Подбирают такую скорость вращения, чтобы на титрование 1 мл раствора глутатиона шло такое же количество раствора двухлористой ртути. Аналогичным образом можно проверить работу полярографа и качество подготовки электродов.

В стаканчик опускают платиновый электрод и электрод сравнения (каломельный), которые прилагаются к полярографу, закрепляют их на штатив электромешалки и присоединяют соответствующим образом к полярографу. Режим работы прибора: селектор в положении УА, двигатель потенциометра отключен, поляризационное напряжение (шкала потенциометра) – 0,2 В, предел измерения – 0,5 В, чувствительность $2 \cdot 10^{-8}$, время пробега – 8 мин, остальные переключатели в нулевом положении.

Включают магнитную мешалку и титруют из микробюретки на 1 мл (по каплям) 0,001М раствором двухлористой ртути. 1 мл этого раствора эквивалентен 1 мкмолью SH-групп. В ходе титрования, когда SH-группы связывают ионы ртути, перо компенсографа чертит прямую линию. При достижении конечной точки титрования перо резко отходит в сторону (начинает чертить кривую линию), после этого добавляют еще одну каплю и записывают количество миллилитров раствора двухлористой ртути, пошедшее на титрование. Можно продолжить титрование дальше и найти точку эквивалентного количества раствора $HgCl_2$ другим способом. Она соответствует основанию перпендикуляра, опущенного из точки пересечения прямых, проведенных через начальные и конечные точки титрования. Если подача раствора производится с постоянной скоростью (при помощи поршневой бюретки или других устройств), то объем пошедшего на титрование раствора можно определить по длине сматываемой бумаги.

Перед каждым определением платиновый электрод тщательно промывают водой, вымачивают 2–3 мин в 50 %-ной HNO_3 (в вытяжном шкафу), снова промывают водой и снимают капли воды с электрода фильтровальной бумагой. Каломельный электрод (можно использовать аналогичный по форме и составу электрод от рН-метра) тщательно промывают водой, периодически вымачивают 2–3 мин в 1 н HCl , после чего снова промывают в воде. Хранят каломельный электрод в насыщенном растворе KCl , а платиновый – сухим.

Расчеты. Количество SH-групп крови (в микромолях на 100 мл) определяют по формуле:

$$SH = a \cdot 10 \cdot 100 / 0,2 = a \cdot 5000$$

где a – количество 0,001М раствора двухлористой ртути, пошедшее на титрование, мл; 10 – разведение, 100 – пересчет на 100 мл крови, 0,2 – аликвота гемолизата. Количество SH-групп в плазме и альбуминовой фракции определяют по формуле:

$$SH = a \cdot 100.$$

Литература

1. Лебедев П.Т., Усович А.Т. Методы исследования кормов, органов и тканей животных. М., 1976: 192-194.
2. Кальницкий Б.Д., Кузнецов С.Г., Батаева А.П. и др. Методические указания по изучению минерального обмена у сельскохозяйственных животных. Боровск, 1988: 103 с.
3. Fiske C.H., Subbarow G. The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol.Chem., 1925, 66: 375-400.
4. Pulls G. Phosphatanalyse mit dem Molybdat-Vanadat-Reagents nach Kjeldahlauflschluss von Futtermitteln. Landwirtsch.Forschung, 1961, 14, 11: 38-42.
5. Davies N.T., Reid H. An evaluation of the phytate, zinc, copper, iron and manganese contents from soya-based textured-vegetable protein, meat-substitutes or meat-extenders. Brit.J.Nutr., 1979, 41, 3:579-589.
6. Кузнецов С.Г. К методике определения фосфорных соединений в организме животных. Бюллетень ВНИИФБиП с.-х. животных, 1979, 3(55): 66-69.

7. Кузнецов С.Г. Определение серы в биологическом материале. Ветеринария, 1980, 7: 63-64.
8. Кузнецов С.Г. Одновременное определение меди и железа в различных биологических объектах. Ветеринария, 1973, 7: 203-206.
9. Чеботарева Н.А. Усовершенствованная методика определения цинка с дитионом в кормах и растениях. Химия в сельском хозяйстве, 1977, 9: 50-52.
10. Аброськина Л.С., Кондратьев Ю.Н. Определение йода в различных объектах. Ветеринария, 1985, 6: 64-66.
11. Методические указания по измерению концентрации фтора в кормах экспресс-методом. М., 1983.
12. Кузнецова Т.П., Пронина Л.Я., Приваленко М.И. Модификация определения содержания оксипролина в сыворотке крови. Лабораторное дело, 1982, 8: 456-459.
13. Леонтьев В.К., Гайдамак А.Н. Методы определения белковосвязанных углеводов в минерализованных тканях. Лабораторное дело, 1978, 5: 290-293.
14. Френкель Л.А. Модификация микрометода определения содержания лимонной кислоты в костной ткани. Вопросы медицинской химии, 1976, 22, 3: 410-413.
15. Rove D.W., Moen R.C., Davidson J.M. et al. Correlation of procollagen mRNA levels in normal and transformed chick embryo-fibroblasts with different rates of procollagen synthesis. Biochemistry, 1978, 17, 9:1581- 1590.
16. Кузнецов С.Г., Кальницкий Б.Д. Изучение минерального обмена у сельскохозяйственных животных (методические указания). Боровск, 1983:83 с.
17. Кузнецов С.Г. К методике определения активности церулоплазмينا в плазме крови птиц. С.-х. биология, 1975, 10, 2: 290-293.

V.

Методы анализа гормонов в крови

1. Введение

В реализации генетических возможностей животных важная роль принадлежит эндокринной системе, которая, наряду с нервной системой, осуществляет регуляцию сложных метаболических процессов в организме, определяющих рост, развитие и продуктивность. Функциональная деятельность эндокринной системы проявляется в постоянной секреции в кровь гормонов. Уровень их в крови и тканях долгое время определяли с помощью биологических методов. Однако в последние годы одним из наиболее применяемых методов в экспериментальной работе стал радиоиммунологический анализ (РИА). Радиоиммунологический анализ гормонов обладает специфичностью иммунологических реакций и высокой чувствительностью, относительно прост и нетрудоемок.

Большинство пептидных гормонов имеют строгую видовую специфичность, поэтому стандартные наборы, предназначенные для определения гормонов человека – СТГ, ТТГ, ПРЛ, ЛГ и ФСГ не могут быть использованы для анализа этих гормонов у сельскохозяйственных животных. В этом случае, а также при отсутствии готовых наборов для определения других гормонов можно воспользоваться одной из имеющихся в литературе схем РИА (1-3).

РИА белковых гормонов основан на способности определяемого гормона (антигена) взаимодействовать со специфическими антителами. В присутствии меченого гормона происходит конкуренция между определяемым и меченым гормонами за связь с антителами, которые содержатся в инкубационной среде в количестве, недостаточном для полного связывания обоих гормонов. При этом необходимо, чтобы связывающая способность молекул определяемого и меченого гормонов не различалась. Чем больше добавлено немеченого гормона, тем меньше радиоактивных молекул меченого гормона будет связано с антителами, то есть больше радиоактивных молекул будет находиться в свободной форме. Когда в пробе содержится постоянное количество антител и молекул радиоактивного гормона, доля связанных молекул радиоактивного гормона будет обратно пропорциональна добавленному количеству немеченого гормона. Для любого данного количества гормонов можно определить процентную долю свободного и связанного с антителами гормона.

Абсолютное количество определяемого гормона вычисляют путем сравнения процентной доли свободной или связанной радиоактивности образцов с графиком стандарта, для построения которого используют разные разведения известного количества высокоочищенного гормона-стандарта.

Для успешного проведения РИА необходимы: достаточное количество гормона для иммунизации; антисыворотка, содержащая специфические антитела; высокоочищенный меченый гормон с высокой удельной активностью и удобный метод для разделения свободной и связанной форм гормонов.

Основные этапы РИА:

- а) экстракция определяемого гормона из плазмы (ряд гормонов определяют непосредственно без экстракции);
- б) добавление к экстракту анализируемого гормона определенного количества радиоактивного гормона, идентичного определяемому;
- в) добавление определенного количества специфических антител (антисыворотки);
- г) инкубация пробирок с определяемыми образцами;
- д) разделение свободной и связанной с антителами форм гормона;

е) измерение радиоактивности той или другой формы и вычисление количества определяемого гормона по графику стандарта.

График стандарта строят в координатах: по оси абсцисс – концентрация стандартного гормона, по оси ординат – процент связывания с антителами радиоактивного гормона при разных концентрациях стандартного гормона по отношению к нулевой пробе (связывание без стандарта).

Точность метода зависит от наличия примесей в исследуемом образце, которые могут конкурировать с определяемым гормоном за связывание с антителами. Для определения специфичности реакции предложено, наряду с графиком стандарта, строить график разведения исследуемой плазмы (4). В случае специфического взаимодействия антител с одним определяемым гормоном, график разведения, построенный в логарифмических координатах, будет параллелен графику стандарта. Последний следует делать в каждом опыте одновременно с анализом образцов, поскольку он в значительной степени зависит от условий эксперимента.

При статистической обработке результатов РИА необходимо вводить показатели процентного выхода гормона и воспроизводимости как внутри одного опыта, так и между разными сериями опытов.

Процентный выход гормона рассчитывают путем определения известных количеств стандартного гормона, добавленного к плазме, не содержащей этот гормон. Если компоненты, присутствующие в плазме, не мешают анализу определяемого гормона, выход его по отношению к добавленному количеству составляет $100 \pm 5\%$.

Воспроизводимость РИА оценивают определением концентрации гормона в контрольном образце (например, в смешанной плазме, полученной от нескольких животных) в 10–12 параллельных пробах одного опыта или в 2–3 параллельных пробах, но не менее чем в 5–6 разных сериях опытов. В оптимальных условиях воспроизводимость результатов в одном опыте составляет не менее 95%, а между опытами – 90%.

При интерпретации данных РИА необходимо иметь в виду, что антигенная активность гормонов, являющаяся основой для определения их этим методом, не обязательно связана с их биологической активностью. В некоторых условиях гормон теряет свою биологическую активность без изменений иммунологических свойств. Поэтому биологические, радиорецепторные и другие методы анализа гормонов являются необходимым дополнением для полной характеристики функциональной активности гормонов.

2. Определение соматотропного гормона

Принцип метода. Соматотропный гормон (СТГ) – полипептид, состоящий из одной цепи с двумя дисульфидными мостиками. Молекулярная масса его у человека, быка, свиньи и овцы составляет 20500, 26000, 22500 и 24000 дальтон соответственно.

Излагаемый ниже радиоиммунологический метод определения соматотропина у сельскохозяйственных животных отработан в лаборатории эндокринной регуляции ВНИИФБиП.

Получение антисыворотки. Антисыворотку получали от кроликов живой массой 2–3 кг, иммунизированных эмульсией СТГ, полученной из гипофиза свиней во ВНИИ технологии кровезаменителей и гормональных препаратов (Москва), или использовали соматотропин крупного рогатого скота АГР-6117В и овцы НИИ-СН-S-7.

Для иммунизации 2 мг гормона растворяют в 4 мл 0,05М фосфатного буфера pH 7,6, содержащего NaCl в концентрации 0,15 М. К раствору гормона добавляют 12 мл неполного адьюванта Фрейнда (1 часть обезвоженного ланолина и 2 части стерильного вазелинового масла). При первой иммунизации дополнительно вводят 100 мг убитых микобакте-

рий туберкулеза (вакцина БЦЖ). Раствор гормона тщательно гомогенизируют с адьювантом Фрейнда путем многократного набирания и выталкивания раствора из цельностеклянного шприца, снабженного металлической иглой. Полученный гомогенат вводят подкожно по 2 мл пяти кроликам дробно в 4–6 точек вдоль спины. В последующем иммунизацию повторяют трижды с недельным интервалом без добавления вакцины БЦЖ. На 9-й день после последней иммунизации у кроликов берут из ушной вены 2–3 мл крови, получают из нее сыворотку и оценивают ее качество по реакции кольцепреципитации или иммунодиффузии в агаровом геле (двойная радиальная иммунодиффузия по Оухтерлони). При получении хороших результатов (четкие кольца, появляющиеся через 5 минут при разведении антисыворотки 1:2 и гормона 1:1000 в реакции кольцепреципитации или наличие заметных линий преципитации при разведении антисыворотки не менее 1:5 в реакции Оухтерлони) на 10–11 день после последней иммунизации у кроликов берут кровь из ушной вены в количестве 20–30 мл, получают сыворотку, расфасовывают ее в полиэтиленовые капсулы по 1 мл, замораживают в жидком азоте и хранят при -20°C . Активность антисыворотки сохраняется не менее двух лет.

Йодирование соматотропина. 2 мг СТГ растворяют в 1 мл фосфатного буфера pH 7,6, содержащего 0,15M NaCl. Центрифугируют при 2500 g в течение 20 мин. Супернатант используют для йодирования гормона и для получения серии стандартных растворов.

К 10 мл супернатанта добавляют 25 мкл раствора Na^{125}J (40 МБк) в 0,2M фосфатном буфере pH 7,6. Реакцию запускают добавлением 25 мкл (1 мг/мл) раствора хлорамина-Т в 0,05M фосфатном буфере pH 7,6, содержащем 0,15M NaCl. Раствор хлорамина готовят непосредственно перед йодированием, которое проводят в течение 45 сек при энергичном встряхивании. Реакцию останавливают добавлением 100 мкл (100 мкг) раствора метабисульфита натрия и 10 мкл 16%-ного раствора сахарозы. Смесь наносят на колонку (1x25 см) с сефадексом G-75, уравновешенную 0,05M фосфатным буфером pH 7,6, содержащим 0,15M NaCl, 0,5% сывороточного альбумина человека и 0,05% азида натрия. Собирают фракции по 0,5 мл. Для работы используют фракции первого пика, которые разводят так, чтобы 100 мкл его раствора обеспечивали счет на приборе Ультра-гамма фирмы ЛКБ 25000–30000 имп/мин.

Ход определения. Рабочие разведения йодированного гормона, стандартов и антисыворотки получают добавлением 0,05M фосфатного буфера pH 7,6, содержащего 0,15M NaCl, 0,5% сывороточного альбумина человека и 0,05% азида натрия. Антисыворотку к соматотропину разводят так, чтобы данный раствор обеспечивал связывание около 40% йодированного гормона. Анализ проводят в специальных пластиковых пробирках.

Схема анализа.

NN пробирок	Буфер, мл	Плазма, мл	Стандарт, мл	A-СТГ, мл	^{125}I -СТГ	Обозначение
1 - 2	–	–	–	–	0,1	Общ.счет
3 - 4	0,1	–	–	0,1	0,1	'0' стандарт
5 - 6	0,2	–	–	–	0,1	неспец. связ.
7 - 8	–	–	0,1	0,1	0,1	0,1 нг/мл
9 - 10	–	–	0,1	0,1	0,1	0,5 нг/мл
11 - 12	–	–	0,1	0,1	0,1	1,0 нг/мл
13 - 14	–	–	0,1	0,1	0,1	5,0 нг/мл
15 - 16	–	–	0,1	0,1	0,1	10,0 нг/мл
17 - 18	–	–	0,1	0,1	0,1	25,0 нг/мл
19 - 20	–	–	0,1	0,1	0,1	50,0 нг/мл
21 - 22	–	0,1	–	0,1	0,1	проба плазмы

Содержимое пробирок перемешивают и инкубируют 18–20 ч при комнатной температуре. Добавляют во все пробирки, кроме 1 и 2, по 500 мкл 10%-ного раствора полиэтиленгликоля-6000 на фосфатном буфере, содержащем ослиную антисыворотку для иммуноэлектрофореза против глобулинов сыворотки кролика в конечном разведении 1:50, перемешивают и инкубируют при комнатной температуре 2–3 ч. Содержимое пробирок центрифугируют при 1500–2000 г 20 мин, отсасывают надосадочную жидкость с помощью пастеровской пипетки, соединенной с водоструйным насосом. Подсчитывают радиоактивность осадка в пробирках на счетчике Ультра-гамма.

Расчеты. Определяют концентрацию соматотропина в плазме крови крупного рогатого скота при диапазоне калибровочного графика от 0,1 нг/мл (97% по отношению к нулевому стандарту) до 50 нг/мл (3% по отношению к нулевому стандарту). Обычно регистрируемая концентрация соматотропина в плазме крови (0,5–15 нг/мл) укладывается в наиболее чувствительный и достоверный участок калибровочного графика.

3. Определение пролактина

Принцип метода. Пролактин (ПРЛ) или лютеотропный гормон (ЛТГ) вырабатывается в передней доле гипофиза и является филогенетически одним из наиболее древних гормонов. У млекопитающих основная роль его состоит в регуляции развития молочной железы. В последние годы появились сообщения об участии ПРЛ в развитии стресс-реакции у животных. Молекула гормона состоит из одной полипептидной цепи и имеет относительную молекулярную массу у разных животных от 20000 до 25000 дальтон.

Получение антисыворотки. Антисыворотку получали от кроликов живой массой 2–3 кг, иммунизированных эмульсией пролактина, полученного из Национального института здоровья (США) или с использованием ПРЛ крупного рогатого скота, приготовленного во ВНИИ технологии кровезаменителей и гормональных препаратов.

Для иммунизации одного кролика растворяют 1 мг гормона в 1 мл 0,15M NaCl, pH 7,4 и смешивают с равным объемом неполного адъюванта Фрейнда. Для первой иммунизации используют полный адъювант (вместе с вазелиновым маслом в смесь вносят БЦЖ). Эмульсию растирают в фарфоровой ступке до полной гомогенности (при стоянии в течение часа и последующем центрифугировании не должно происходить ее расслоения).

Гормон вводят с интервалом 7 дней в течение месяца. Через 9–12 дней после четвертой инъекции из ушной вены берут кровь (15–20 мл) и оставляют ее при температуре 37°C в течение часа для образования сгустка. Сыворотку отделяют центрифугированием в течение 20 мин при 2000 г и хранят при температуре -20°C. Лиофилизированный препарат такой антисыворотки может храниться в течение года или нескольких лет. Конечное разведение антисыворотки в нашей системе РИА составляло 1:64000.

Йодирование ПРЛ. Для включения ^{125}J в молекулу гормона используют метод Гринвуда (5) с некоторыми модификациями: 5 мкг гормона в 10 мкл фосфатного буфера смешивают с 40 МБк Na^{125}J (25 мкл в 0,4M фосфатном буфере pH 7,4). Реакцию инициируют добавлением 25 мкг хлорамина-Т и проводят в течение 30 с при энергичном встряхивании. Затем добавляют 100 мкг метабисульфита натрия и 100 мкл 16%-ного раствора сахарозы. Общий объем смеси должен составлять 260 мкл.

Очистку меченого гормона от свободного ^{125}J проводят гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50 (10x150 мм); элюируют гормон 0,05M фосфатным буфером pH 7,4, содержащем 1% сывороточного альбумина человека, со скоростью 1 мл за 3–5 мин и собирают

фракции по 1 мл. Меченый гормон обычно содержится во фракциях первого пика. Для работы отбирают фракцию, следовавшую после первого пика, и разводят так, чтобы в 0,1 мл содержалось 30000 имп/мин при анализе на приборе Ультра-гамма фирмы ЛКБ с эффективностью счета 80%.

Оборудование. Центрифуга, гамма-счетчик.

Ход определения. Для рабочих разведений гормонов, антисыворотки и, при необходимости, образцов плазмы крови используют 0,05M фосфатный буфер pH 7,4, содержащий 1% сывороточного альбумина человека. Для определения ПРЛ в пробы вносят по 100 мкл стандартного бычьего гормона или определяемого образца (плазмы крови), меченого гормона, антисыворотки к бычьему пролактину и буфера. Пробы инкубируют 24 ч при комнатной температуре, затем добавляют 100 мкл ослиной сыворотки против глобулинов кролика (вторые антитела), титр 1:1280 в разведении 1:30 и продолжают инкубировать еще 24 ч.

Для осаждения комплекса гормон + антитело-1 + антитело-2 в каждую пробу вносят по 500 мкл холодного буфера, содержащего 0,5% твина-20, и центрифугируют 20 мин при 2000 г. Чтобы осадок не всплывал при декантации, необходимо его уплотнить с помощью вторых антител, иммобилизованных на какой-нибудь нерастворимой основе, например, ковалентно связанных с целлюлозой, сефадексом или другим носителем. Однако при добавлении этих иммуносорбентов в пробы, чтобы они сразу не выпадали в осадок, необходимо непрерывно помешивать (вращать) пробы в течение всего периода инкубации со вторым антителом. Для этой цели рекомендуем также использовать метод, применяемый в лаборатории генетики желез внутренней секреции ВНИИ разведения и генетики с.-х. животных, согласно которому, не сливая надосадочную жидкость и даже не извлекая пробирки из ротора центрифуги, чтобы не менять их положения по отношению к оси ротора, в каждую пробирку добавляют 200 мкл 5 %-ной суспензии синтетического поливинилацетатного клея и повторяют центрифугирование. Выпадающий при этом белый осадок клея прочно прижимает предыдущий осадок ко дну пробирки, делая его хорошо различимым. После этого аккуратно и полностью отсасывают водную фазу из пробирок с помощью пастеровской пипетки, соединенной с водоструйным насосом.

Разделение свободной и связанной с антителами фракций гормона можно осуществить значительно быстрее, используя для этого вторые антитела, предварительно осажденные полиэтиленгликолем. Этот способ используется в лаборатории нейроэндокринной регуляции ВНИИФ-БиП при анализе пролактина, тиреотропина и соматотропина крупного рогатого скота. В этом случае ослиную сыворотку против глобулинов кролика (вторые антитела, титр 1280) растворяют в буфере в соотношении 1:15 и смешивают на магнитной мешалке с равным объемом 20% полиэтиленгликоля (3000–6000). В полученной смеси конечное разведение вторых антител составляет 1:30, а концентрация полиэтиленгликоля – 10%.

Радиоактивность в пробирках с осадками просчитывают в счетчике Ультра-гамма. В качестве контроля на специфичность связывания антителами меченого гормона ставят пробы с сывороткой интактного неиммунизированного кролика вместо антисыворотки.

Расчеты. Для построения графика стандарта использовали отечественный препарат пролактина крупного рогатого скота, полученный во ВНИИ технологии кровезаменителей и гормональных препаратов (г. Москва), овечий пролактин NIH-P-S-8 с активностью 28 ИЕ/мг, полученный из Национального института здоровья (США) или овечий пролактин фирмы Сигма с активностью 38,9 ИЕ/мг. В диапазоне 0,1–100 нг/мл график стандарта строили в логарифмических координатах на бумаге, специально выпускаемой для спрямления стандартных кривых в РИА

(logit-log paper, фирма CEA-Sarin, Франция). Связывание радиоактивного гормона (в процентах по отношению к нулевой пробе – это связывание без добавления стандартного раствора гормона) при увеличении концентрации стандарта от 0,1 до 100 нг/мл изменяется соответственно от 95 до 5%.

4. Определение адренокортикотропина

Принцип метода. Адренокортикотропный гормон (АКТГ) передней доли гипофиза представляет собой полипептид из 39 аминокислотных остатков с молекулярной массой 4500. Видовая специфичность АКТГ слабо выражена. В связи с этим в системах радиоиммунологического анализа АКТГ могут быть использованы гормоны разных видов животных.

Концентрация АКТГ в крови является объективным показателем функциональной активности гипофизарно-надпочечниковой системы, играющей важную роль в развитии адаптационного синдрома у животных. Его уровень в крови различных животных составляет 38–580 пг/мл (6,7) и зависит от циркадного ритма и действия внешних раздражителей. Максимальный уровень АКТГ обнаруживается в утренние часы, минимальный – вечером (8). Действие стрессовых факторов вызывает увеличение концентрации АКТГ в плазме крови (6,9), поэтому при взятии крови для анализа следует соблюдать максимальную осторожность и лучше использовать для этой цели катетеры, предварительно введенные в сосуды.

Кровь для определения АКТГ собирают в пробирки с гепарином (1 мг/мл крови) и для получения плазмы центрифугируют при 2000 об/мин в течение 20 мин. Если анализ гормона ведут в день получения плазмы, то достаточно ее охладить до 2–6°C. В других случаях требуется глубокое замораживание (–20°C), что обеспечивает ее стабильность в течение 2-х месяцев. Если требуется хранить плазму более 2-х месяцев, рекомендуется добавлять в пробы трасилол.

Для контроля за воспроизводимостью результатов рекомендуется иметь контрольную плазму, которую хранят при –20°C и используют в день определения.

4.1 Биологическое определение АКТГ в плазме крови

Метод основан на измерении прироста содержания кортикостерона в надпочечниках мышей под влиянием экзогенного кортикотропина. Эндогенную секрецию кортикотропина при этом блокируют дексаметазоном.

Реактивы. 1. Стандарт кортикостерона; 2. Стандарт кортикотропина; 3. Дексаметазон; 4. Нембутал; 5. Этанол; 6. 0,02 н HCl в физиологическом растворе; 7. Гексан; 8. Хлористый метилен; 9. Серная кислота пробы Саваля; 10. Белые мыши-самцы 18–22 г.

Оборудование. Шприцы, иглы, центрифуга, спектрофотометр.

Ход определения. Мышам внутрибрюшинно вводят 0,2 мг дексаметазона в объеме 0,05 мл растворителя и через 4 ч после этого – 0,1 мл 1%-ного раствора нембутала. Через 10 мин препарируют яремную вену и вводят в нее стандартный раствор АКТГ в 0,5 мл растворителя (4, 8, 16, 32, 64, 128 мкед АКТГ в объеме 0,5 мл подкисленного 0,02 н HCl физиологического раствора или такого же объема тестируемой плазмы). Через 5 мин после введения раствора мышь декапитируют, извлекают надпочечники, очищают их от жировой и соединительной ткани, взвешивают на аналитических весах с точностью до 0,1 мг и гомогенизируют. В гомогенат надпочечниковой ткани вносят 5,15 мл 20%-ного раствора этанола в физиологическом растворе и в течение 10 мин закрытый пробкой гомогенизатор встряхивают. Затем добавляют 2 мл гексана и встряхивают еще 10 мин. После центрифугирования при 2000 г в течение 10 мин 4,5 мл нижнего слоя переносят в новую пробирку и добав-

ляют в нее 3 мл хлористого метилена, экстрагируют в течение 10 мин, снова центрифугируют 10 мин и переносят в новые пробирки по 2 мл нижнего слоя, куда затем добавляют 3 мл серно-этанольной смеси (7:3), энергично встряхивают и помещают в темное место. Через 30 мин с помощью водоструйного насоса отсасывают верхний слой, а в оставшихся 3 мл флюоресцентной среды измеряют содержание кортикостерона. Измерение производят при длинах волн возбуждения и флюоресценции 470 и 520 мкм соответственно.

По графику стандарта, построенному для кортикостерона, пересчитывают показания прибора на абсолютное содержание кортикостерона в пробе, после чего, зная массу надпочечников, вычисляют концентрацию кортикостерона в микрограммах на 1 г массы надпочечников.

Метод характеризуется высокой специфичностью, чувствительностью (5–10 мкМЕ/мл или 50–100 пг/мл), что позволяет определять АКТГ в малых объемах плазмы крови животных. В нормальной плазме крови молодняка крупного рогатого скота содержится 70–500 мкМЕ/мл АКТГ, у крыс – 50–100 мкМЕ/мл.

4. 2. Радиоиммунологическое определение АКТГ в крови

Реактивы. В качестве стандарта используют высокоочищенный натуральный или синтетический бычий или свиной кортикотропин. Для построения графика стандарта из маточного раствора гормона (200 мкг/мл в 0,005М соляной кислоте), путем разведения его изотоническим раствором хлорида натрия, содержащим 3% БСА, готовят следующие концентрации: 20, 40, 80, 160, 320 и 640 пг/мл. Реакционную среду готовят последовательным добавлением в коническую пробирку 1 мкКи ^{125}J (удельная активность 100–150 мкКи/мл) в объеме 0,01 мл; 0,02 мл 0,25М фосфатного буферного раствора, рН 7,4; 2 мкг стандарта кортикотропина в 0,005 мл 0,005М соляной кислоты; 50 мкг хлорамина-Т в 0,015 мл фосфатного буфера. После добавления каждого компонента смесь встряхивают в течение нескольких минут на смесителе. Через 1 мин после добавления хлорамина в пробирку вносят 90 мкг метабисульфита в 0,02 мл фосфатного буфера и 1 мл нормальной бычьей сыворотки.

В пробирку с реакционной смесью вносят 5 мг сорбента QuSO g-32, встряхивают 3 мин, центрифугируют 10 мин при 3000 г. Супернатант отбрасывают, осадок ресуспендируют в 3 мл бидистиллированной воды, повторно центрифугируют и снова отбрасывают супернатант. АКТГ- ^{125}J элюируют встряхиванием с 0,5 мл 40%-ного водного ацетона с 1%-ной уксусной кислотой. Добавляют 1,5 мл бидистиллированной воды, центрифугируют 10 мин при 3000 г, супернатант переносят в чистую силиконовую пробирку, разводят 0,04М фосфатным буфером, содержащем 5% БСА и 0,5% меркаптоэтанола до радиоактивности 80 тыс. имп/мин в 1 мл, распределяют на порции и хранят при температуре не выше 20°C. Удельная радиоактивность кортикотропина составляет 200–500 мкКи/мкг.

Антисыворотку к кортикотропину получают иммунизацией морских свинок. 40 ед. АКТГ суспендируют с адъювантом Фрейнда и вводят 3-кратно подкожно с интервалом в 10 дней. Кровь берут на 10-й день после последней инъекции, отделяют плазму и разводят в соотношении 1:1000 изотоническим раствором хлорида натрия с 0,02% мертиолата (хранится при 4°C в течение нескольких месяцев). Рабочие аликвоты антисыворотки готовят разведением в 0,02М барбитуратном буферном растворе, содержащем 400 ед. трасилола в 1 мл 0,4%-ного меркаптоэтанола и 1% нормальной плазмы крови животного. Разведение подбирают таким образом, чтобы антисыворотка связывала около 50% меченого кортикотропина.

Для анализа также необходимы нормальная плазма морской свинки, разведенная в соотношении 1:1000, активированный уголь, гепарин,

трасилол, меркаптоэтанол, сорбент QuSO g-32, 0,125M фосфатный буферный раствор, pH 7,4, 0,15 н соляная кислота с 3% БСА, 1,4 н едкий натр.

Оборудование. Центрифуга рефрижераторная, низкотемпературный холодильник, смеситель, магнитная мешалка, гамма-счетчик.

Ход определения. Перед определением АКТГ экстрагируют из плазмы крови. Для этого к 1,5 мл плазмы добавляют 1 мл суспензии сорбента в 0,125M фосфатном буфере (50 мг/мл), встряхивают 5 мин, центрифугируют 5 мин при 3000 г, супернатант отбрасывают. Осадок промывают 3 мл 0,125M фосфатного буферного раствора, pH 7,4, центрифугируют, супернатант снова отбрасывают. Кортикотропин элюируют из сорбента встряхиванием в течение 5 мин с 1,5 мл 0,15 н соляной кислоты, содержащей 3% БСА. 1 мл элюата нейтрализуют добавлением 0,1 мл 1,4 н едкого натра.

В пластиковую пробирку вносят 1,95 мл антисыворотки, 0,05 мл ^{125}J -АКТГ, 0,4 мл экстракта плазмы или 0,4 мл стандарта кортикотропина в указанных выше концентрациях. Все пробы анализируют в дубликатах. Пробирки инкубируют 72 ч при 4°C и вносят по 10 мг активированного угля в 0,5 мл буфера. Суспензию готовят на все пробы и перемешивают на магнитной мешалке. Содержимое пробирок перемешивают на смесителе и центрифугируют в течение 10 мин при 2000 г. Уголь адсорбирует свободную фракцию меченого кортикотропина. Супернатант удаляют и подсчитывают радиоактивность осадка. Концентрацию кортикотропина в плазме определяют по графику стандарта.

Чувствительность метода 10 пг/мл. Содержание АКТГ в плазме крови свиньи составляет 380–660 пг/мл, у крыс – 50–200 пг/мл.

4.3. Определение АКТГ с помощью набора АСТНК (CEA-IRE-SORIN)

Реактивы. В набор входят: меченый ^{125}J АКТГ (свиной), стандарт АКТГ человека (1-39), антисыворотка, буфер, стабилизирующий агент и активированный уголь. Один флакон меченого ^{125}J АКТГ (лиофилизированного) рассчитан на определение АКТГ в 100 образцах. Общая радиоактивность составляет 0,6 мКи. Срок годности указывается на упаковке. Нулевой стандарт представляет собой плазму, в которой отсутствует АКТГ. Стандарты АКТГ содержат плазму и АКТГ в количестве от 50 до 800 пг/мл. Перед использованием стандарты растворяют в 1 мл дистиллированной воды. Растворы хранят не более 3 суток при температуре 2–6°C. Антисыворотку к АКТГ вырабатывают у кроликов на свиной кортикотропин, конъюгированный с альбумином крупного рогатого скота. Реагент находится в лиофилизированной форме. Растворяют антисыворотку перед использованием и хранят непродолжительное время. В наборе используется 0,02M вероналовый буфер pH 8,4, в который добавляют 0,2%-ный меркаптоэтанол. Буфер готовят непосредственно перед использованием набора. Активированный уголь (норит) перед использованием суспендируют в буфере. Суспензию охлаждают до температуры 2–6°C и во время работы постоянно перемешивают на магнитной мешалке.

Оборудование. В дополнение к обычному лабораторному оборудованию рекомендуется иметь следующие приборы: точные автоматические микропипетки со сменными наконечниками или автоматический дозатор проб, смеситель малых объемов, магнитную мешалку, центрифугу с охлаждением для большого количества образцов и гамма-счетчик для определения радиоактивности ^{125}J .

Для проведения анализа требуется подготовить следующие группы пробирок: Т-группа – определение общей активности; С-группа – изотопный контроль и расчет контроля; О-группа – нулевая точка графика стандарта и определение связывающей способности антисыворотки; Стандартная группа – 5 стандартных растворов АКТГ для построения

калибровочной кривой; Sx-группа – образцы плазмы крови; Sx-группа – контроль для образцов плазмы крови.

Рекомендуется проводить анализы в 3-х параллельных пробах для групп Т, С, О и стандартных точек и в 2-х параллелях для групп Sx, Sx.

Ход определения. Добавлять реагенты следует при комнатной температуре в последовательности: буфер, стандарты и образцы, меченый гормон, антисыворотка в указанных на схеме 1 количествах.

Схема 1

Группы	Буфер, мл	Стандарты и образцы, мл	Меченый гормон, мл	Антисыворотка, мл
Т	1,3	–	0,1	–
С	0,8	0,1 ст. 0	0,1	–
О	0,7	0,1 ст. 0	0,1	0,1
Ст. 1–5	0,7	0,1 ст. от 1 до 5	0,1	0,1
Sx	0,7	0,1	0,1	0,1
Cx	0,8	0,1	0,1	–

Общий объем реагентов составляет 1 мл во всех пробирках, кроме группы Т. Содержимое пробирок тщательно смешивают и инкубируют в течение 48 ч при температуре 2–6°C. После этого во все пробирки (кроме пробирок группы Т) добавляют охлажденную суспензию активированного угля по 0,5 мл, а пробирки с образцами и стандартами в это время должны находиться в ледяной бане. Период внесения угольной суспензии должен быть предельно коротким и не превышать 5 мин. Тщательно перемешивают содержимое пробирок и оставляют их в ледяной бане на 5 мин, после чего центрифугируют при 2000 г в течение 15 мин для отделения осадка. Определенный объем надосадочной жидкости переносят в пробирки для количественного определения радиоактивности.

Расчет. Для каждой группы рассчитывают средние величины. Определяют связывающую способность аналитической системы в процентном отношении между О и Т. При этом связывающая способность должна быть не ниже 40%:

$$Vo/T\% = \{(O - C)/(T - C)\} \times 100$$

Далее строят калибровочный график, для чего выражают средние величины для каждого стандарта и неизвестного образца в процентах от нулевого стандарта. Для стандартов:

$$Vo/Vo\% = \{(O_T - C)/(O - C)\} \times 100$$

где Vo – связывающая способность антисыворотки; O_T – общая активность.

Для неизвестных образцов:

$$Vx/Vo\% = \{(Sx - Cx)/(O - C)\} \times 100$$

Результаты могут быть выражены также в процентном отношении от общей активности Т. Для стандартов:

$$Vx/T\% = (C_T - C)/(T - C)$$

Для неизвестных образцов:

$$Vx/T\% = \{(Sx - Cx)/(T - C)\} \times 100$$

Величины процентов каждого стандарта переносят на логарифмическую бумагу против количества АКТГ, выраженного в нг/мл. Количество АКТГ каждого неизвестного образца считывают с калибровочного графика.

Чувствительность радиоиммунологического метода определения АКТГ (наименьшая обнаруживаемая доза) равна 10 ± 4 пг/мл. Срок годности набора определяется сроком годности изотопа. Обычно он равен 1 месяцу со дня изготовления и маркируется на флаконах с реагентами и упаковке.

5. Определение инсулина

Инсулин вырабатывается β -клетками поджелудочной железы и является одним из гормонов, регулирующих анаболические процессы в клетке. Свободный инсулин оказывает действие как на мышечную, так и на жировую ткань, но первая является более чувствительной к нему (10). Связанный инсулин представляет собой комплекс гормона с белками сыворотки крови, основная часть которого связана с трансферрином и в меньшей степени с гаптоглобулином (11). Гормон в основном воздействует на метаболизм жировой ткани, в результате чего активизируются процессы липогенеза. Связанный инсулин не стимулирует поглощение глюкозы печенью и мышечной тканью и, в отличие от свободного, не определяется биологическими и иммунологическими методами без предварительного разделения комплекса на гормон и связанный с ним белок.

Инсулин в основном метят ^{125}J , период полураспада которого составляет 60 суток. РИА инсулина является высокоспецифическим, точным, чувствительным и производительным и для анализа требуется минимальное количество плазмы или сыворотки крови (0,1 мл). Определение иммунореактивного (ИРИ) и связанного (СИ) инсулина дает достаточно полную характеристику циркулирующего в крови инсулина, что позволяет судить об интенсивности и направленности метаболических процессов в организме. У молодых животных в период интенсивного роста, связанного с увеличением массы тела преимущественно за счет увеличения мышечной ткани, в крови преобладает ИРИ. В заключительной стадии откорма бычков и особенно свиней концентрация СИ в крови в 1,5–2,0 и более раз превышает ИРИ (12–14), что способствует активизации синтеза липидов и отложению жира в туше. Аминокислотный состав инсулина человека, свиньи и быка идентичен и не имеет видовой специфичности. Принцип определения инсулина с помощью радиоиммунологических наборов различных фирм существенно не различается, но имеются некоторые особенности, относящиеся к ходу анализа. Концентрацию инсулина в крови принято выражать в международных микроединицах в 1 мл плазмы (сыворотки) крови, но можно перевести и в весовую концентрацию, принимая во внимание, что 1 мг равен 26 МЕ, или 1 нг равен 26 мкЕд.

5.1. Определение иммунореактивного инсулина

Радиоиммунологическое определение ИРИ в плазме крови проводят с использованием наборов RIA-gnost insulin (BEHRIGWERKE), ФРГ, радиоиммуноаналитического (РИА) набора (Институт изотопов Венгерской академии наук) и рио-ИНС-ПГ- ^{125}J (Белорусской АН). Во всех случаях используют полуавтоматические пипетки (Finipipette, Финляндия) со сменными пластиковыми наконечниками, позволяющими отбирать объемы в 0,1; 0,2; 0,5; 0,8 и 1,0 мл, центрифугу с охлаждением (Rotixa/K, Hettich, ФРГ) и гамма-счетчик (Ultra-gamma-1280 или Rchgama-1270, Wallac, Швеция).

Перед использованием наборы РИА, хранящиеся при 2–8°C, выдерживают при комнатной температуре 1,5–2 часа. Плазму крови, хранившуюся при –20°C, перед анализом размораживают при комнатной температуре и перемешивают.

Набор RIA-gnost insulin состоит из 100 пробирок с пробками, в каждой из которых содержится ^{125}J -инсулин и антисыворотка в лиофильно

высушенной форме. В отдельных флаконах находятся стандарты инсулина: 0, 10, 20, 40, 80, 160 и 320 мкЕд/мл, которые перед использованием растворяют в 0,5 мл бидистиллята. При определении невысоких значений ИРИ в плазме крови (меньше 10 мкЕд/мл) для построения калибровочного графика используют концентрацию 5 мкЕд/мл, для чего отбирают в чистый флакон 0,2 мл из стандартного флакона с концентрацией 10 мкЕд/мл и добавляют 0,2 мл бидистиллята. При необходимости можно сделать разведение 2,5 и 1,0 мкЕд/мл. К набору прилагается контрольная сыворотка с известным содержанием ИРИ, которую также растворяют с 0,5 мл бидистиллята.

Анализ выполняют с двумя параллельными пробами. Для построения калибровочного графика в пробирки добавляют по 0,1 мл определенного стандарта (для каждого используют новый пластиковый накопитель). В последующие пробирки добавляют по 0,1 мл контрольной сыворотки и анализируемых образцов плазмы крови. Пробирки слегка встряхивают для растворения лиофилизата и не позднее, чем через 15 мин в каждую пробирку добавляют по 0,5 мл бидистиллята и, закрыв пробкой, смешивают содержимое на роторном смесителе в течение 3 мин. Затем пробы инкубируют при 17–18°C в течение 17–20 часов. После инкубации добавляют в каждую пробирку по 1,0 мл полиэтиленгликоля (в наборе на 100 проб имеется 110 мл), закрывают пробкой и смешивают на роторном смесителе 5 мин. Центрифугируют при 1500 g 20 мин. В дальнейшем надосадочную жидкость, содержащую свободный гормон, осторожно отсасывают пипеткой с пластиковым наконечником при помощи водоструйного насоса, не касаясь осадка на дне пробирки. Для стекания жидкости пробирки можно перевернуть и поставить на фильтровальную бумагу. В полученном осадке определяют активность на гамма-счетчике. Из каждой величины радиоактивности вычитают среднее значение фона (двух чистых пробирок). Активность нулевого стандарта (0 мкЕд/мл) принимают за 100% и рассчитывают величину каждого показателя. Калибровочный график строят на логарифмической бумаге, исходя из значения активности стандартных проб. На основании этого находят концентрацию гормона в плазме (сыворотке) крови. Точность построения калибровочного графика можно проверить по значению показателя сыворотки с известным содержанием иммунореактивного инсулина.

Набор РИА (Венгрия) состоит из упаковок с фосфатным буфером, который перед использованием растворяют в 100 мл бидистиллированной воды; стандартов с 0, 10, 20, 40, 80, 200 мкЕд/мл инсулина, которые растворяют в 0,5 мл бидистиллята каждый (рекомендуется стандарты дополнительно разводить до 2,5 и 5,0 мкЕд/мл); 2-х флаконов антисыворотки, растворяемой в таком количестве фосфатного буфера, который указан на этикетке; 2-х флаконов декстринированного угля, содержимое которых растворяют в 15 мл буфера и суспендируют на магнитной мешалке; 1 ампулы лиофилизованного ¹²⁵J-инсулина, который растворяют в 15 мл бидистиллята и 100 пробирок разового пользования.

Оборудование. Центрифуга, гамма-счетчик.

Ход определения. Процесс определения концентрации ИРИ состоит из ряда последовательных операций. Для определения тотальной активности в 2 пробирки (Т) вносят по 3 мл буфера и во все остальные – по 0,1 мл буфера, что препятствует адсорбции инсулина и ¹²⁵J-инсулина на внутренней поверхности пробирок. Во все пробирки вносят по 0,1 мл ¹²⁵J-инсулина, после чего пробирки Т готовы для инкубации. В остальные пробирки добавляют по 0,1 мл соответствующих стандартов и образцы плазмы крови встряхивают на Vortex в течение 30с. В пробирки (кроме Т) добавляют по 0,1 мл антисыворотки и тщательно перемешивают. Все пробирки инкубируют в течение 15–20 ч при 4–8°C. После инкубации во все пробирки вносят по 0,2 мл суспензии угля из расчета,

чтобы с момента ее добавления и последующего центрифугирования пробирок прошло не более 5 мин. Пробирки закрывают и энергично встряхивают 1 мин, затем центрифугируют 10 минут при 2500–3000 г. Из всех пробирок, за исключением Т, отсасывают надосадочную жидкость. Измеряют радиоактивность осадка в случае Т вместе с раствором (общая активность) и строят калибровочный график на логарифмической бумаге, принимая активность Т за 100%. В инструкции РИА инсулина рекомендуется строить калибровочный график на обычной миллиметровой бумаге по интенсивности счета ^{125}J , что, на наш взгляд, снижает точность определения.

Набор риа-ИНС-ПГ- ^{125}J (Белорусская АН) состоит из ^{125}J -инсулина; стандартов 0, 10, 25, 50, 100, 200 мкед/мл инсулина; 12 мл буферного раствора pH 7,4; антисыворотки; 90 мл раствора полиэтиленгликоля и 100 пробирок с пробками. Перед использованием ^{125}J -инсулин и антисыворотку растворяют в 11 мл бидистиллята. Содержимое стандартных флаконов инсулина растворяют в 0,5 мл бидистиллята минимум за 10 мин до использования с целью полного растворения. Для построения калибровочного графика готовят дополнительно стандарты с 2,5 и 5,0 мкед/мл инсулина. Перед анализом маркируют пробирки: 1–2 – общая активность (Т); 3–4, 5–6, 7–8 – неспецифическое связывание инсулина в определяемых пробах (для этого берут 3 различных образца плазмы крови): 9–10 – 0 мкед/мл; 11–12 – 2,5 мкед/мл; 13–14 – 5,0 мкед/мл; 15–16 – 10 мкед/мл; 17–18 – 25 мкед/мл; 19–20 – 50 мкед/мл; 21–22 – 100 мкед/мл; 23–24 – 200 мкед/мл инсулина; 25–26 и далее – образцы плазмы крови. В пробирки 1–2 и 3–4 вносят по 0,3 и 0,2 мл буферного раствора соответственно, во все остальные – по 0,1 мл. Далее во все пробирки добавляют по 0,1 мл ^{125}J -инсулина, после чего пробирки 1–2 (Т) готовы к инкубации. В пробирки 9–24 вносят по 0,1 мл соответствующего раствора (стандарта), а в пробирки 3–8 и 25 и далее – по 0,1 мл определяемых проб плазмы крови. Все пробирки встряхивают и в пробирки с калибровочными пробами инсулина (9–24) и образцами плазмы крови (25 и далее) добавляют по 0,1 мл антисыворотки. Содержимое этих пробирок тщательно перемешивают и инкубируют 12–18 ч при 2–8°C. После инкубации во все пробирки, кроме Т, добавляют по 0,8 мл полиэтиленгликоля и содержимое их интенсивно перемешивают на смесителе в течение 5–8 мин. Все пробирки, кроме Т, центрифугируют при 1500–2000 г при 2–8°C в течение 20 мин. После центрифугирования отсасывают пастеровской пипеткой надосадочную жидкость и для полноты ее удаления пробирки опрокидывают на фильтровальную бумагу на 10–15 мин. Определяют радиоактивность содержимого всех пробирок в гамма-счетчике Ультра-гамма-1280 или Ракгамма-1270 в течение 1 мин. При измерении скорости счета на Ультра-гамма-1280 калибровочный график строят по отношению средней величины скорости счета пробирок со стандартами инсулина к средней величине скорости счета нулевого 0 мкед/мл стандарта, то есть V/V_0 и наносят полученные данные на логарифмическую бумагу. В случае, если отношение V_n (неспецифическое связывание) к V_t (общая активность) составляет более 5%, то от соответствующего значения $V/V_0 \times 100$ вычитают $V_n/V_t \times 100\%$. Эффективность связывания меченого инсулина $V_0/V_t \times 100\%$ обычно составляет 35–50%. При измерении активности счета на Ракгамма задается программа эффективности счета к V_0 и получают данные на каждый образец в соответствующих величинах, мкед/мл.

5.2. Определение связанного инсулина

Определение СИ проводят одним из вышеуказанных методов РИА, для чего связанный гормон предварительно выделяют из плазмы крови и разделяют гормон-белковый комплекс (15). Для этих целей рекомендуется использовать ионообменную смолу амберлит IR-120 (ФРГ), кото-

рая относится к сульфакатионам слабого набухания. Она не сорбирует свободную форму инсулина из плазмы (сыворотки) крови, но задерживает связанный инсулин. Разделение свободной и связанной форм гормона проводят на колонке из стекла высотой 160 мм и диаметром 20 мм. При этом заполненный рабочий объем колонки (нижняя часть) должен быть высотой 100 мм и иметь внутренний диаметр 5 мм. Нижняя часть колонки должна сходиться на конус с внутренним диаметром 0,4–0,5 мм. В устье колонки помещают химически чистый фильтр из стекловаты Quartz Wool (Япония). Над фильтром помещают 1 г смолы амберлит IR-120, которую предварительно, за 10–12 ч до работы, замачивают бидистиллированной водой в химических стаканчиках и перед перенесением на колонку многократно промывают бидистиллятом. Скорость элюции из колонки должна составлять 40–50 мл/час. Перед нанесением образца плазмы колонку слегка продувают резиновой грушей для удаления избытка воды. Плазму крови объемом 2 мл наносят осторожно по стенке колонки и стекающую жидкость, содержащую свободный инсулин, собирают в отдельные пробирки. Элюирование СИ проводят 0,4%-ным раствором Na_2CO_3 , для чего осторожно по стенке, избегая взбалтывания смолы, наносят 2 мл раствора этой смолы и собирают жидкость в мерные пробирки до объема 2 мл. Для полноты элюции колонку слегка продувают воздухом из резиновой груши. Для нейтрализации элюата, собранного в мерные пробирки, добавляют каплю 1 н соляной кислоты. В результате пропускания через смолу щелочного раствора карбоната натрия происходит диссоциация гормонсвязывающего комплекса на гормон и связывающее вещество (16), что позволяет определить содержание СИ в плазме крови одним из методов РИА. До проведения анализа пробы СИ так же, как и пробы плазмы (сыворотки) крови, сохраняют при температуре -20°C .

6. Определение глюкагона

Панкреатический глюкагон секретируется α -клетками островков Лангерганса поджелудочной железы. Молекулы глюкагона представляют собой неразветвленные полипептидные цепи, состоящие из 29 аминокислотных остатков, имеющих молекулярную массу 3458 дальтон. Глюкагон отличается от инсулина сравнительно высоким содержанием азота и низким – серы, хорошо кристаллизуется из воды. В кислых растворах легко образуются его фибриллы. Он оказывает множественное действие на организм животных, проявляющееся повышением уровня глюкозы в крови за счет усиления распада гликогена в печени. Считают, что активация распада гликогена в печени животных под влиянием глюкагона происходит за счет усиленного образования циклического аденозинмонофосфата. Последний активизирует киназу фосфорилазы, что приводит к усилению распада гликогена в печени и повышению уровня глюкозы в крови.

В настоящее время высокоспецифичным и чувствительным методом определения концентрации глюкагона в крови человека и животных является радиоиммунологический анализ, принцип которого является общим с методами определения других гормонов, описанных ранее. Для РИА глюкагона выпускаются готовые наборы (США) и отдельные реагенты.

6.1. Радиоиммунологическое определение панкреатического глюкагона в плазме крови с применением набора RSL Glucagon KIT

Набор состоит из специальных стеклянных пробирок и следующих реагентов: 0,01М фосфатного буфера pH 7,5, содержащего 0,01М ЭДТА и 1% нормальной кроличьей сыворотки; кроличьей антисыворотки к панкреатическому глюкагону (А-глюк); стандартов глюкагона, содержащих

10, 25, 50, 100, 250, 500 и 1000 пг гормона в 1 мл; вторичных антител; трасилола и ¹²⁵J-глюкагона.

Оборудование. Центрифуга, гамма-счетчик.

Ход определения. К 5 мл только что полученной пробы крови добавляют 0,5 мл трасилола, перемешивают и центрифугируют при 4°C 20 мин при 1500 g. Плазму помещают в пластиковые пробирки, замораживают при -20°C и хранят в замороженном состоянии до момента анализа.

В специальные стеклянные пробирки добавляют буфер, стандарт глюкагона, плазму, ¹²⁵J-глюкагон и кроличью антисыворотку к глюкагону по указанной ниже схеме.

Схема

№№ пробирок	Буфер, мл	Плазма, мл	A-глюк, мл	Стандарт, мл	¹²⁵ J – глюкагон, мл	Обозначение
1 – 2	0,4	–	–	–	0,1	общ. счет.
3 – 4	0,3	–	0,1	–	0,1	“0”
5 – 6	0,2	–	0,1	0,1	0,1	10 пг / мл
7 – 8	0,2	–	0,1	0,1	0,1	25 пг / мл
9 – 10	0,2	–	0,1	0,1	0,1	50 пг / мл
11 – 12	0,2	–	0,1	0,1	0,1	100 пг / мл
13 – 14	0,2	–	0,1	0,1	0,1	250 пг / мл
15 – 16	0,2	–	0,1	0,1	0,1	500 пг / мл
17 – 18	0,2	–	0,1	0,1	0,1	1000 пг / мл
19 – 100	0,2	0,1	0,1	–	0,1	проба плазмы

Затем перемешивают содержимое пробирок и инкубируют 5 дней при 4°C. На 6-й день вносят во все пробирки по 0,1 мл вторых антител, перемешивают и инкубируют не менее 4 ч при 4°C. Во все пробирки (за исключением пробирки с общим счетом) добавляют по 1 мл дистиллированной воды, перемешивают, центрифугируют при 2300–2500 g 15 мин. С помощью водоструйного насоса и пастеровской пипетки отсасывают надосадочную жидкость. Радиоактивность осадка подсчитывают на гамма-счетчике. Калибровочный график строят на специальной логарифмической бумаге, где по оси абсцисс наносят значения концентрации глюкагона, а по оси ординат – отношение счета стандартной пробы к нулевой в процентах. По калибровочному графику определяют содержание глюкагона в образцах плазмы.

6.2. Радиоммунологическое определение глюкагона с применением набора ¹²⁵J Glucagon Radioimmunoassay KIT

Состав набора аналогичен вышеописанному и различия состоят лишь в схеме анализа и подготовке стандарта глюкагона.

Ход определения. Образцы плазмы готовят также аналогично описанному выше. Для приготовления стандарта делают серию разведений: в пробирки из набора №1–6 добавляют по 500 мкл буфера, в пробирки №6 и 7 – по 500 мкл основного раствора стандарта глюкагона, содержащего 3200 пг/мл гормона. Перемешивают. Затем из пробирки №6 в пробирку №5 переносят 500 мкл раствора и вновь перемешивают. Повторяют процедуру, то есть переносят 500 мкл раствора гормона из 5-й в 4-ю, из 4-й в 3-ю, из 3-й во 2-ю и из 2-й в 1-ю. В результате получают 7 разведений стандарта, содержащих соответственно 3200, 1600, 800, 400, 200, 100 и 50 пг/мл глюкагона.

Подготавливают и нумеруют стеклянные пробирки из набора: 1–2 – общая активность, 3 и 4 – неспецифическое связывание, 5 и 6 – нулевой стандарт, 7–20 – разведения стандартов, 21 и дальше – неизвестные образцы плазмы крови с двумя параллельными.

Добавляют 100 мкл трасилола во все пробирки, за исключением 1 и 2. В пробирки 3 и 4 вносят 300 мкл буфера, в пробирки 5 и 6 – 200 мкл

буфера, в пробирки 7–20–200 мкл стандартного раствора глюкагона, в пробирки 21 и далее – по 200 мкл плазмы. Затем во все пробирки добавляют по 100 мкл антисыворотки к глюкагону, за исключением пробирок 1–4, и во все пробирки по 100 мкл ^{125}J -глюкагона. Перемешивают, инкубируют 16–24 ч при 4°C и в пробирки 3–20 вносят по 200 мкл нормальной овечьей сыворотки, а в пробирки 21 и далее – по 200 мкл буфера и во все пробирки, кроме 1 и 2 – по 100 мкл вторых антител. Перемешивают и инкубируют при комнатной температуре 2 ч. И, наконец, во все пробирки, кроме 1 и 2, вносят по 1 мл холодного 0,15М раствора хлористого натрия, перемешивают и центрифугируют при 1500–1600 g 20 минут. Последующие процедуры и расчеты, как описано выше.

6.3. Радиоиммунологическое определение глюкагона с использованием реагентов, выпускаемых разными фирмами

При отсутствии готовых наборов можно использовать реагенты, выпускаемые разными фирмами. В частности, можно использовать следующую систему.

1. Буфер 0,05М фосфатный, pH 7,5, содержащий 0,01М ЭДТА – для разведения реактивов при йодировании глюкагона.

2. Буфер 0,05М фосфатный pH 7,5, содержащий 0,01М ЭДТА, 0,5% ЧСА и 0,05% азида натрия – для разведения реактивов в ходе анализа и при фракционировании ^{125}J -глюкагона на колонке с сефадексом G-25.

3. Апротинин (трасилол), фирма Сигма (ФРГ) – при приготовлении образцов плазмы.

4. Глюкагон (фирма Сигма) – в качестве стандарта и для йодирования.

5. Кроличья антисыворотка к бычьему панкреатическому глюкагону фирмы Calbiochem–Behring – в качестве высокоспецифического связывающего реагента.

6. В качестве вторых антител – 10%-ный раствор полиэтиленгликоля-6000 на 0,05М фосфатном буфере (см. №2) с добавлением сыворотки барана для иммуноэлектрофореза против глобулинов сыворотки кролика в конечном разведении 1/50 (сыворотку выпускает ИЭМ им.Н.Ф.Гамалея).

7. ^{125}J -глюкагон, получаемый путем йодирования глюкагона фирмы Сигма хлораминовым методом. Отделение ^{125}J -глюкагона от ^{125}J проводят на колонке с сефадексом G-25 размером 1x25 см, уравновешенным белковым буфером (реактив №2). Время йодирования 30–40 сек. Фракции с колонки собирают по 10 капель, просчитывают их на гамма-счетчике, находят фракции, соответствующие пику ^{125}J -глюкагона и разводят эти фракции фосфатным буфером (реактив №2) с расчетом, чтобы 100 мкл раствора давали на гамма-счетчике счет 15000–10000 имп/мин.

Оборудование. Центрифуга.

Ход определения. Для анализа используют обычные пластиковые пробирки объемом около 3,5 мл. Подготавливают их как описано в методе определения глюкагона с набором ^{125}J Glucagon Radioimmunoassay:

в пробирки 3 и 4 по 200 мкл реактива №2;

в пробирки 5 и 6 по 100 мкл реактива №2;

в пробирки 7–20 по 100 мкл раствора стандарта;

в пробирки 21 и дальше по 100 мкл плазмы.

Затем во все пробирки, кроме 1–4 – по 100 мкл реактива №5 и во все пробирки по 100 мкл реактива №7, перемешивают содержимое пробирок и инкубируют при 4°C 16–24 ч.

Добавляют во все пробирки, кроме 1 и 2, по 500 мкл реактива №6, перемешивают, инкубируют 2 ч при комнатной температуре, центрифугируют при 1500–2000 g 20 мин, отсасывают надосадочную жидкость, а пробирку с осадком просчитывают на гамма-счетчике. Расчет концентрации глюкагона проводят как описано выше.

7. Определение тиреоидных гормонов

Щитовидная железа вырабатывает и выделяет в кровь несколько гормонов, которые оказывают на организм разностороннее действие. Одним из основных гормонов является тироксин или тетраiodтиронин (T_4), который оказывает влияние на множество функций: рост и развитие организма, дифференциацию органов и тканей и регуляцию энергетического, белкового, углеводного, жирового и минерального обмена (17,18).

Основное количество тиреоидных гормонов в крови связано со специфическим белком – тироксинсвязывающим глобулином (ТСГ). Количество гормонов в свободной форме крайне незначительно (1%). Известно, что биологической активностью обладают лишь свободные T_4 и T_3 и только свободная фракция T_4 способна проникать в клетки периферических органов. Монодейодирование T_4 и превращение его в триiodтиронин (T_3) занимает одно из центральных мест не только в клеточном метаболизме, но и в механизме их эффекта на уровне целостного организма. Такое превращение является необходимым условием связывания последнего с рецепторами отдельных субклеточных структур; его следует рассматривать как один из терминальных механизмов регуляции тиреоидного статуса организма (17).

В последние годы более широко применяются высокочувствительные и производительные радиоиммунологические методы определения тиреоидных гормонов (19). Метод конкурентного связывания, разработанный Мерфи и Петти (20), также нашел широкое применение в определении тиреоидных гормонов. Как отмечалось выше, T_4 в крови в основном связан с ТСГ. С этим же белком связана большая часть T_3 . Принцип конкурентного связывания заключается в том, что при добавлении к раствору, содержащему меченый T_4 и ТСГ, тироксина, содержащегося в плазме крови, радиоактивный T_4 будет вытеснен из комплекса с ТСГ в количестве, пропорциональном немеченому гормону плазмы крови. Вытесненный меченый T_4 можно удалить из раствора при помощи ионообменного сорбента и определить величину оставшейся радиоактивности. Если в качестве немеченого гормона взять стандартный раствор с известным содержанием T_4 , то можно построить график зависимости вытеснения меченого T_4 соответствующими количествами добавляемых стандартов. Возможен и другой вариант определения содержания T_4 в крови, основанный на осаждении комплекса меченого и немеченого гормонов со специфической антисывороткой к ним и подсчета радиоактивности в осадке. Точно таким же способом определяют и концентрацию T_3 .

Методы определения тиреоидных гормонов, предложенные рядом исследователей, принципиально мало различаются, но проведение анализа имеет некоторые особенности. Поскольку тиреоидные гормоны не обладают видовой специфичностью, то способ их определения также неспецифичен в отношении вида животных. Определение гормонов проводят в негемолизированной плазме крови, которую до использования хранят при -20°C с использованием наборов RIA-mat T_4 и RIA-mat T_3 фирмы Вук-Mallincrodt (ФРГ) и RIA-gnost T_4 , RIA-gnost T_3 фирмы Behringwerke AG (ФРГ). В работе используют полуавтоматические микропипетки (Finnpipette, Финляндия), центрифугу с рефрижератором Rotixa (K/Hettich, ФРГ) и гамма-счетчики Ultra-gamma-1280, Rackgamma-1270 (Wallac, LKB, Швеция). Эффективность счета импульсов не ниже 60%.

7.1. Определение тетраiodтиронина

Радиоиммуноанализ T_4 с помощью набора RIA-gnost T_4 прост по выполнению и высокопроизводителен. Набор содержит 100 пробирок, в которых находятся в лиофилизированной форме $^{125}\text{J-T}_4$ и антисыворотка к этому гормону. В 6 флаконах содержится ряд стандартов, имеющих

0, 25, 50, 100, 200 и 400 нг/мл гормона. Дополнительно можно приготовить еще один стандарт – 12,5 нг/мл, для чего в чистый флакон вносят 0,2 мл стандарта с 25 нг/мл и добавляют 0,2 мл бидистиллята. В одном флаконе имеется готовая к использованию тест-сыворотка с известной концентрацией T_4 (указана на этикетке), что позволяет контролировать качество калибровочного графика. К каждому набору прилагается в упаковке 110 мл полиэтиленгликоля.

Оборудование. Центрифуга, термостат, гамма-счетчик.

Ход определения. После маркировки в каждую из двух параллельных пробирок вносят по 20 мкл каждого из 7 стандартов (1–14), тест-сыворотку (21), а в последующие пробирки – образцы плазмы крови. Далее добавляют в каждую пробирку по 500 мкл бидистиллята (время между первой и последней операциями не должно превышать 15 мин). Предварительно перемешав, пробы инкубируют при дневном свете и температуре 17–27°C не менее 3 и не более 20 ч (обычно 4–5). После этого вносят в каждую пробирку по 1,0 мл полиэтиленгликоля и тщательно встряхивают на миксере до однородной эмульсии. Центрифугируют 20 мин при 5–20°C и не менее 1500 g. Осторожно, не касаясь осадка, отсасывают пастеровской пипеткой надосадочную жидкость. От ее остатка можно избавиться, перевернув пробирки на 10 мин на фильтровальную бумагу. Радиоактивность проб считают в течение 1 мин к нулевому стандарту на установке Ультра-гамма-1280. Калибровочный график строят на логарифмической бумаге, проверив его правильность на тест-сыворотке.

Выполнение анализа при помощи наборов RIA-mat T_4 и RIA-mat T_4 -bulk 300 одинаково, за исключением того, что первый рассчитан на 50, а второй на 300 анализов. Кроме того, в первом наборе в каждом флаконе содержится по 1,0 мл раствора $^{125}\text{J-T}_4$, а имеющиеся во втором наборе 300 мл раствора $^{125}\text{J-T}_4$ необходимо разлить по 1,0 мл в каждую пробирку. К каждому набору прилагается соответствующее количество стандартных растворов, содержащих 0, 1, 2, 5, 10, 20, 40 мкг% гормона из расчета один образец на 50 проб. При необходимости можно приготовить стандарт, содержащий 0,5 мкг% гормона путем смешивания 0,2 мл нулевого стандарта с 0,2 мл стандарта, содержащего 1,0 мкг% гормона. На каждые 50 проб имеется флакон лиофилизированной антисыворотки, которую перед использованием растворяют в 5,5 мл бидистиллята. К набору на каждые 50 проб прилагается 50 микрокапилляров по 10 мкл каждый, 50 ионообменных полосок бумаги, логарифмическая бумага для построения калибровочной кривой и пинцет.

Сделав маркировку пробирок, набирают в капилляр соответствующие растворы стандартов или плазму крови; держат капилляр пинцетом под углом 45° к поверхности раствора (жидкость быстро заполняет весь объем). Помещают капилляры с образцами в пробирки, где уже имелся 1 мл раствора $^{125}\text{J-T}_4$ и встряхивают. Добавляют в каждую пробирку по 0,1 мл антисыворотки, тщательно встряхивают и инкубируют 1 час при температуре 20–28°C. После этого пинцетом в каждую пробирку помещают по 1 ионообменной полоске, закрывают пробирки пробками и перемешивают содержимое пробирок 30 мин на роторной установке. При помощи пинцета удаляют по краю пробирки (избегая капель!) ионообменные полоски. Радиоактивность измеряют на Ультра-гамма-1280 по отношению к нулевому стандарту и строят калибровочный график. В случае измерения активности на установке Ракгамма-1270 по заданной программе получают средние значения образцов в мкг%.

7.2. Определение трийодтиронина

Набор RIA-gnost T_3 рассчитан на анализ 100 образцов и состоит из 100 пробирок, в каждой из которых имеются лиофилизированные гормоны $^{125}\text{J-T}_3$ и антисыворотка. К имеющимся растворам стандартов T_3

(по 0,5 мл): 0; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4 нг/мл можно дополнительно готовить стандарт 0,2 нг/мл разбавлением 0,2 мл стандарта, содержащего 0,4 нг/мл гормона, 0,2 мл бидистиллята. К набору прилагается 0,5 мл раствора тест-сыворотки с известным содержанием T_3 и 110 мл полиэтиленгликоля.

Оборудование. Центрифуга, термостат, гамма-счетчик.

Ход определения. После маркировки заливают в две параллельные пробирки соответствующие растворы стандартов, тест-сыворотки или плазмы крови по 0,1 мл каждого и встряхивают их. В каждую пробирку добавляют по 400 мкл бидистиллята (время между добавлением образцов и бидистиллята не должно превышать 10 мин), содержимое перемешивают и инкубируют в темноте при 18–28°C не менее 4 часов и не более 24 часов (обычно 5 часов). После этого добавляют в каждую пробирку 1 мл полиэтиленгликоля, перемешивают до однородной эмульсии и центрифугируют 15 мин не менее чем при 1500 g. Надосадочную жидкость осторожно отсасывают при помощи пастеровской пипетки со съемным пластиковым наконечником и водоструйного насоса. Для полного удаления жидкости пробирку переворачивают на фильтровальную бумагу. Определяют активность проб на Ультра-гамма-1280 в течение 1 мин по отношению к нулевому стандарту и строят калибровочный график на логарифмической бумаге, проверяя его по значению тест-сыворотки.

Наборы RIA-mat T_3 и RIA-mat T_3 -300 аналогичны, но первый рассчитан на 50, а второй – на 300 образцов. В первом наборе в каждом флаконе уже имеется по 1,0 мл $^{125}J-T_3$, а во втором весь меченый гормон в одном сосуде, поэтому его сначала разливают по флаконам по 1,0 мл. На каждые 50 образцов прилагается набор стандартов по 0,5 мл: 0, 50, 100, 200, 400 и 800 нг%; можно готовить дополнительно 25 нг% из стандарта 50 нг% путем разведения его (0,2 мл) равным объемом (0,2 мл) бидистиллята. В наборе на 50 проб имеется флакон лиофилизированной сыворотки, которую перед анализом разводят в 5,5 мл бидистиллята, 50 ионообменных полосок и пинцет.

Ход определения. После маркировки пробирок к имеющемуся в них 1,0 мл раствора $^{125}J-T_3$ добавляют 0,1 мл соответствующего стандарта или плазмы крови, встряхивая при этом пробирки, вносят в каждую пробирку по 0,1 мл антисыворотки и тщательно перемешивают. Инкубируют пробы в пробирке 3 часа при 18–28°C. По истечении времени инкубации в каждую пробирку вкладывают пинцетом по одной ионообменной полоске, закрывают пробирки пластиковыми пробками и перемешивают их на роторной установке 45 мин не быстрее 40 об/мин, избегая образования пены. Удаляют пинцетом по краю пробирок ионообменные полоски (избегая капель). Измеряют активность содержимого каждой пробирки по отношению к нулевому стандарту и строят калибровочный график на логарифмической бумаге при измерении активности на Ультра-гамма-1280. В случае измерения активности на установке Ракгамма-1270 по заданной программе получают средние данные для каждого образца в нг%.

8. Определение кортизола

Кортизол (11- β -,17L-21-тригидрокси-4-прегнен-3,20-дион) синтезируется клетками коры надпочечников и, не накапливаясь, поступает непосредственно в кровь, связываясь с транскортином. В норме около 90% гормона связано с белками плазмы крови. Кортизол участвует в процессах адаптации организма к изменяющимся условиям среды. Он оказывает большое влияние на обмен веществ в организме, в частности, на отложение гликогена в печени, образование глюкозы из аминокислот и темп окисления ее (в сторону уменьшения). Изменение концентрации гормона в крови обеспечивает регуляцию его секреции путем

изменения функциональной активности системы гипоталамус-гипофиз-кора надпочечников.

Радиоиммуноанализ проводят в образцах плазмы или сыворотки крови без предварительной экстракции.

Набор для определения кортизола (Cortek) состоит из следующих реагентов: 1. Меченый йодом ^{125}J -кортизол, каждый флакон которого содержит достаточное для 50 определений количество меченого гормона с радиоактивностью около 1,7 мКи/флакон; время использования указывается на этикетке флакона, температура хранения 2–8°C; реагент окрашен в малиновый цвет. 2. Стандарт кортизола. Для построения стандартного графика кортизола готовят разведения с концентрациями 0, 5, 12,5, 25, 50, 100, 200, 400 нг/мл. 3. Пробирки, на внутренней поверхности каждой из которых адсорбированы антитела кролика, полученные к конъюгату кортизола, хранятся в холодильнике в тщательно закрытой упаковке во избежание конденсации воды. 4. Сухая смесь фосфатно-цитратного буфера, которую растворяют в 60 мл дистиллированной воды и получают раствор с pH 3,2; хранят при 2–8°C в течение 2 суток. Реагенты растворяют непосредственно перед использованием. Для внесения реагентов рекомендуется использовать автоматическую микропипетку со сменными наконечниками (для каждой группы веществ используется новый наконечник).

Оборудование. Кроме обычного лабораторного оборудования необходимо иметь: автоматические микропипетки на 100 и 500 мкл и пластиковые наконечники к ним; смеситель малых объемов Vortex (при отсутствии его можно добиться удовлетворительного смешивания, подставляя пробирки к резиновым лопастям вращающегося пропеллера вентилятора); водоструйный насос; гамма-счетчик, пригодный для измерения радиоактивности ^{125}J и логарифмическую бумагу.

Ход определения. Плазму крови получают обычным методом. При необходимости длительного хранения ее замораживают и хранят при температуре –20°C. Экстракцию гормона не проводят. Для определения высокого уровня кортизола (более 400 нг/мл) образцы разбавляют раствором нулевого стандарта или плазмой, не содержащей стероидов (обрабатывают углем с декстраном).

Для определения достаточно 0,1 мл плазмы, которую помещают в пробирку, покрытую антителом, и добавляют в нее 0,5 мл меченого кортизола, перемешивают 3 – 5 сек на Vortex и инкубируют при температуре 37°C в течение 1,5 часов или при комнатной температуре 3 часа.

Для построения калибровочного графика вместо образца берут такое же количество стандартных растворов гормона различной концентрации.

После инкубации содержимое пробирок удаляют пипеткой с водоструйным насосом и промывают осторожно 1 мл дистиллированной воды, которую также затем удаляют. Закрывают пробирки пробками и определяют радиоактивность в течение 1 мин.

Расчет. Для каждой группы пробирок высчитывают средние показатели. Рассчитывают соотношение В/Во для каждого стандарта и пробы по формуле:

$$\text{В/Во}\% = \frac{\text{Средний показатель стандарта для образца}}{\text{Средний показатель нулевого стандарта}}$$

График строят, используя логарифмическую бумагу.

Концентрация кортизола в плазме крови, определенная с помощью описанного набора, составляет для свиней 30–100 нг/мл, для крупного рогатого скота – 19–80 нг/мл.

Ход определения кортизола в моче. Собирают суточную мочу, смешивают ее и берут аликвоту. Добавляют борную кислоту из расчета

1 г/100 мл мочи и хранят при 2–8°C или, в случае длительного хранения – при –20°C.

В две пробирки (А и Б) вносят по 200 мкл мочи. В пробирку А прибавляют 100 мкл стандартного маточного раствора гормона (400 нг/мл) и содержимое тщательно смешивают. В обе пробирки добавляют по 2 мл дихлорметана и смешивают на роторном смесителе в течение 30 мин. Затем отсасывают водную фазу и переносят по 1,0 мл в чистые пробирки. Нижнюю часть фазы выпаривают. Осадок растворяют 0,5 мл буфера, смешивают на Vortex и оставляют на 30 мин при комнатной температуре. Переносят 100 мкл из обеих пробирок в счетные пробирки и продолжают анализ так же, как при определении кортизола в плазме крови.

Расчеты. Расчеты делают для каждой группы пробирок (А и Б) отдельно. Отношение В/В₀ вычисляют по формуле:

$$В/В_0 = (\text{Стандарт или образец/Нулевой стандарт}) \times 100$$

Строят калибровочный график и определяют абсолютное количество кортизола в пробе.

При расчете окончательного результата принимают во внимание коэффициент экстракции, который высчитывают по формуле:

$$ЕУ = (А - Б) / 4,$$

где ЕУ – степень экстракции; А – концентрация кортизола в пробирке А; Б – концентрация кортизола в пробирке Б; 4 – количество кортизола в маточном растворе в нг, если принять экстракцию за 100%.

Суточную экскрецию гормона с мочой вычисляют по формуле:

$$X/24 \text{ часа} = Б \cdot 50 \cdot V / ЕУ \cdot 1000$$

где X – количество кортизола, экскретированного за 24 ч; V – объем мочи в мл, 50 – фактор перевода из нг/пробирки в нг/мл; 1000 – фактор перевода из нг в мкг.

Количество выделяемого кортизола с мочой у молодняка крупного рогатого скота составляет 50–170 мкг/24 ч.

9. Определение прогестерона

Прогестерон (ПГ) является стероидным гормоном с молекулярной массой 314,5. Он синтезируется во всех стероидсинтезирующих железах и образуется как промежуточный продукт при синтезе кортизола и других стероидных гормонов. Небольшие количества гормона продуцируются в клетках желтого тела под влиянием гипофизарного лютеинизирующего гормона. Наименьшая концентрация гормона в крови обнаруживается в фолликулярную фазу полового цикла. После овуляции уровень ПГ быстро увеличивается, достигая максимума у коров на 12-й день цикла, и остается высоким до 18–19-го дня. После этого концентрация гормона в крови быстро снижается до начального уровня или, в случае оплодотворения, продолжает возрастать. В период беременности значительные количества ПГ синтезируются плацентой. Низкая концентрация гормона на 21-й день после осеменения коров указывает на отсутствие стельности.

Уровень ПГ в молоке повторяет его динамику в плазме крови, поэтому определение концентрации гормона в молоке коров используют для ранней диагностики стельности. Показатели уровня ПГ в крови и молоке могут быть использованы для исследовательских целей, а также для выявления гинекологических заболеваний коров и контроля за их лечением.

Эндогенный ПГ метаболизируется в печени и продукты его распада выделяются с мочой.

В нашей стране с 1983 года налажен выпуск стандартных наборов для радиоиммунологического анализа прогестерона в сыворотке крови человека – стерон-П-¹²⁵J и стерон-П-³H. Исследования в лаборатории нейроэндокринной регуляции роста и развития животных ВНИИФБиП с.-х. животных показали, что эти наборы с некоторыми модификациями пригодны для определения гормона в плазме крови крупного рогатого скота. Необходимость модификации набора была вызвана тем, что концентрация прогестерона в крови коров почти на порядок ниже, чем в крови человека. Поэтому образцы анализируемой плазмы нетелей и коров не разбавляли буфером в 6 раз, как это предлагается в инструкции к набору, а использовали нативную плазму. В связи с этим при расчете концентрации гормона в плазме необходимо вводить коэффициент пересчета, так как данные калибровочной кривой в наборе указаны с учетом 6-кратного разбавления.

Оборудование. Центрифуга, гамма-счетчик.

Ход определения. Набор Стерон-П-¹²⁵J предназначен для прямого (безэкстракционного) определения гормона. В пробирки для проведения радиоиммунологического анализа вносят нативную плазму (0,1 мл). После добавления антисыворотки (0,1 мл) и раствора ¹²⁵J-прогестерона (0,1 мл) пробы перемешивают и оставляют для инкубации при комнатной температуре в течение 2 часов, а затем в ледяной бане – в течение 15 мин.

Для разделения свободного и связанного с антителами гормонов используют активированный уголь, покрытый декстраном. Охлажденную суспензию угля при постоянном помешивании добавляют в пробирки по 0,5 мл, пробы выдерживают еще 10 мин. При выполнении этого этапа необходимо помнить, что время контакта содержимого всех проб должно быть одинаковым, то есть нельзя растягивать процедуру добавления угля от первой до последней пробирки более чем на 2 минуты. Поэтому уголь вносят не сразу во все пробы, а партиями не более чем по 40 пробирок.

После центрифугирования отбирают аликвоты по 0,5 мл в пробирки для счета радиоактивности. Параллельно с неизвестными образцами плазмы ставят пробы для калибровочного графика со стандартными разведениями прогестерона, содержащимися в наборе: 2,0; 8,0; 20,0; 50,0; 100,0 нмоль/л. Для перевода молярной концентрации прогестерона в объемно-весовую следует пользоваться соотношением: 1 нг прогестерона/мл = 3,14 нмоль/л.

Однако, как уже было отмечено, эти концентрации стандартов даны с учетом 6-кратного разведения исследуемых образцов плазмы. В наших условиях они должны быть уменьшены в 6 раз. Для всех разведений стандарта прогестерона при построении калибровочного графика необходимо пользоваться соотношениями, указанными ниже:

Указано в работе: нмоль / л	Следует использовать	
	нмоль / л	нг / мл
0	0	0
2	0,33	0,106
8	1,33	0,424
20	3,33	1,060
50	8,33	2,650
100	16,67	5,310

Расчет. Расчет концентрации прогестерона в исследуемых образцах проводят по калибровочному графику, который строят в полулогарифмических или "logit-log" координатах по оси ординат и логарифмических – по оси абсцисс.

Система определения прогестерона высокоспецифична: перекрестная реакция антисыворотки с другими стероидами, структурно родственными прогестерону, для большинства из них не превышает 1%, лишь для прегнандиона и прегненолона она составляет соответственно 10,3 и 5,4%. Процент "открытия" экзогенного прогестерона, добавленного в образцы сыворотки крови, составляет 95–100%. Коэффициент вариации для 10 определений содержания прогестерона в одном и том же образце сыворотки крови не превышает 10%.

Набор Стерон-П-¹²⁵J рассчитан на 43 анализа неизвестных и 6 калибровочных проб в дубликатах. Измерения радиоактивности проводили на Ультра-гамма счетчике.

10. Определение тестостерона

Тестостерон (17-β-гидрокси-4-андростен-3-ОН) – мужской половой гормон, продуцируемый клетками Лейдига, корой надпочечников и яичниками. Он представляет собой стероид с относительной молекулярной массой 288,4. Биологически активным соединением является 5-α-дигидротестостерон. Обе формы гормона циркулируют в организме, конкурируя за участки связывания в гормонзависимых тканях. С помощью радиоиммунологического анализа невозможно отдельно определить эти гормоны. Для определения общей андрогенной активности данный метод вполне пригоден, а для определения собственно тестостерона необходима хроматографическая очистка гормона, которую проводят следующим образом: 1 мл плазмы экстрагируют в течение 2 мин 6 мл этилового эфира, затем смесь центрифугируют, переносят 2/3 объема экстракта в пробирки и выпаривают в токе воздуха. Сухой осадок концентрируют на дне пробирки, смывая со стенок 1 мл эфира и высушивают. Полоски ватмана №2 предварительно промывают в аппарате Сокслета смесью метанол-вода (95:5). Запас промытой бумаги можно хранить в хроматографической бачке, содержащей смесь метанола с дихлорметаном (3:1). На одну из полосок наносят свидетель – тестостерон-³H, не менее 50 нанокури. Сухой осадок растворяют в 0,2 мл смеси метанол-дихлорметана (3:1) и перемешивают на смесителе. После этого 50 мкл переносят на хроматографическую бумагу и хроматографируют 2–3 ч при температуре 25°C в системе Буша 3 (петролейный эфир-бензин-метанол-вода 330:170:400:100). Локализацию пятна определяют с помощью автоматического β-сканера; зоны образцов, соответствующих стандарту, вырезают, разрезают на мелкие кусочки и помещают в пробирку с 1 мл смеси метанол-дихлорметан (3:1). После 30-минутного встряхивания элюат переносят в другую пробирку и повторяют экстракцию с новой порцией растворителя. Элюаты объединяют и высушивают в струе азота. Каждую пробу затем растворяют в 1 мл фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 0,1% бычьего сывороточного альбумина и тщательно перемешивают содержимое с помощью смесителя. 0,1 мл образца переносят в пробирки для радиоиммунологического анализа.

Если процедура хроматографического выделения тестостерона не применяется, то отбирают 0,1 мл плазмы или сыворотки крови и экстрагируют в течение 2 мин 3 мл этилового эфира, центрифугируют 5 мин при 2000 g, 2 мл экстракта переносят в пробирку для анализа и выпаривают при комнатной температуре.

Для определения тестостерона используют набор Testok (CEA-IRA SORIN), позволяющий определять концентрацию гормона в диапазоне от 2,5 до 300 пг в пробе. Набор содержит:

- ³H-тестостерон, в каждом флаконе которого содержится определенное количество меченого гормона, достаточное для определения 100 образцов. Общая радиоактивность 0,5 мккюри/флакон;
- стандарт тестостерона (400 нг гормона в 1 мл этанола); перед использованием готовят рабочую концентрацию;

– лиофилизированную антисыворотку, получаемую от кроликов к конъюгату тестостерона: антисыворотка в рабочем разведении должна связывать 30–50% меченого тестостерона;

– фосфатный буфер рН 7,4, в состав которого входит ЭДТА-натриевая соль и бычий сывороточный альбумин; перед использованием содержимое пакета растворяют в 200 мл дистиллированной воды;

– уголь, покрытый декстраном; в каждом флаконе содержится 0,13 г сухой смеси 10:1. В колбу, содержащую 60 мл буфера, помещают смесь угля и декстрана и суспендируют на магнитной мешалке.

Приготовление стандарта. Разбавляя буфером рабочий раствор тестостерона, готовят 6 стандартов, имеющих концентрацию от 4 до 0,125 нг/мл. Рекомендуется проводить исследования в 2 параллелях, а стандартный график строить в 3 параллелях.

Оборудование. Центрифуга, термостат, сцинтилляционный счетчик.

Ход определения. Реагенты добавляют в пробирки в последовательности и количествах, указанных ниже.

Схема

Реагенты	Полная активность	Нулевой стандарт	Стандарты A ₁ /A ₆	Образцы
Буфер, мл	0,9	0,3	0,2	0,3
Стандарт тестостерона, мл	–	–	0,1	–
Образцы	–	–	–	Сухой экстракт
Тестостерон ³ Н	0,1	0,1	0,1	0,1
Антисыворотка	–	0,1	0,1	0,1

Содержимое пробирок перемешивают с помощью смесителя и инкубируют 30 мин при температуре 37°C, затем все образцы выдерживают в холодильнике 1 ч. В каждую пробирку, находящуюся в ледяной бане (исключая пробирки для измерения общей радиоактивности) вносят 0,5 мл суспензии уголь-декстран. Содержимое тщательно перемешивают и инкубируют в течение 10 мин от момента прибавления угля. Этот срок надо выдерживать точно, поэтому количество одновременно обрабатываемых проб должно быть ограничено возможностью оператора. Пробирки центрифугируют при 2000 г в течение 10 мин. Переносят 0,5 мл супернатанта в счетные флаконы с 10 мл сцинтилляционной жидкости: 2,5-дифенилоксазол (ППО) – 7 г; дифенилоксазолилбензол (ПОПОП) – 0,3 г; нафталин – 100 г; диоксан – до 1 л. Счет радиоактивности ведут в сцинтилляционном счетчике 5–10 мин.

Расчеты. Для каждой группы пробирок определяют средний результат по формуле:

$$B/T\% = (\text{средн. счет нулевого стандарта} / \text{средн. счет общей активности}) \times 100$$

Определяют связывающую способность сыворотки, которая должна быть не ниже 30%.

Стандарты и образцы рассчитывают по формуле:

$$B/B_0\% = (\text{средний счет стандарта или образца} / \text{средний счет нулевого образца}) \times 100$$

Результаты подсчета переносят на логарифмическую бумагу и строят калибровочный график. Количество тестостерона в пробе считывают непосредственно с калибровочного графика.

Концентрацию тестостерона подсчитывают по формуле:

$$X / X_0 = Y_1 / Y_2 \cdot 1 / Y_3 \cdot 1 / ПЭ$$

где X – концентрация тестостерона, нг/мл; X_0 – содержание тестостерона в образце, пг; Y_1 – объем растворителя при экстрагировании; Y_2 – объем экстракта, взятого для анализа; Y_3 – объем экстрагированной плазмы крови; ПЭ – полнота экстракции (определяется отдельно по способности растворителя экстрагировать меченый тестостерон).

11. Определение катехоламинов флюориметрическим методом

К катехоламинам относится группа аминов, в молекулах которых содержится ядро катехола (диоксифенол, называемый пирокатехином или ортодиоксибензолом). Наибольшее биологическое значение среди них имеют три соединения: адреналин [β -(3,4-дигидроксифенил)- β -гидрокси-N-метилэтиламин, эпинефрин, А]; норадреналин [β -(3,4-дигидроксифенил)- β -гидроксиэтиламин, называемый также артеренолом или норэпинефрином, НА] и дофамин [β -3,4-дигидроксифенил-этиламин, окситирамин, ДОФА].

Флюориметрические методы основаны на том, что катехоламины, выделенные из тканей, при химической обработке превращаются в вещества, способные флуоресцировать под действием ультрафиолетовых лучей. Флуоресценция катехоламинов без химической обработки (со спектрами возбуждения 285 и 325 нм) неспецифична, поскольку обусловлена наличием в них фенольного фрагмента. Чаще всего для окисления катехоламинов используют феррицианид калия, при этом образуются адренохромы, переходящие в щелочной среде и в присутствии аскорбиновой кислоты в флуоресцентные триоксииндольные производные (21–24). Дифференцирование катехоламинов может осуществляться либо за счет способности их максимально окисляться при различных рН среды, либо за счет различия в спектральных характеристиках люминонов. Обычно применяют сочетание обоих принципов.

Принцип метода. Катехоламины выделяют из надосадков после центрифугирования гомогенатов ткани или образцов крови и мочи, доведенных до рН 8,2–8,5 путем колоночной хроматографии с применением в качестве адсорбента окиси алюминия. Элюируют 0,25 н раствором уксусной кислоты. Дифференцируют их окислением феррицианидом калия при различных рН (4,6–6,2): при рН 4,2 окисляется только адреналин, а при рН 6,2 – адреналин, норадреналин и ДОФА.

Реактивы. 1. Трихлоруксусная кислота 5%, 10%; 2. ЭДТА (этилендиаминтетраацетат); 3. Соляная кислота 0,2 н, 2 н; 4. Уксусная кислота 0,25 н; 5. Серная кислота 2 н, концентрированная; 6. Глицерин; 7. Щелочь натриевая 0,5 н; 8. Фосфатный буфер: 1/15 моль/л рН 4,2; 6,2; 9. Окись алюминия активированная: 500 г химически чистой окиси алюминия вносят в фарфоровую чашку, заливают 2 л 2 н соляной кислоты и кипятят в течение 30–40 мин при постоянном помешивании стеклянной палочкой. После прекращения нагревания и отстаивания осадка раствор соляной кислоты сливают и повторяют аналогичную процедуру. Затем надосадочную жидкость сливают и добавляют к осадку 1 л бидистиллированной воды. Смесь переносят в воронку Бюхнера, осадок окиси алюминия промывают несколько раз до рН 6,0 промывных вод и высушивают в сушильном шкафу при температуре 200–500°C в течение 4 часов. Возможно также применение стандартной окиси алюминия для хроматографии без предварительной обработки ее соляной кислотой; 10. 0,25%, 0,50% растворы перекристаллизованного феррицианида калия; 11. 0,2% раствор аскорбиновой кислоты, перекристаллизованной из 5 н NaOH; 12. Растворы для калибровочных графиков в 0,25 н уксусной кислоте, содержащие 100 мг/мл адреналина, норадреналина и ДОФА, хранят в холодильнике.

Оборудование. Центрифуга, колонки, сушильный шкаф, флюориметр.

Подготовка проб крови. Сразу же после взятия 10 мл крови заливают 10 мл 10% ТХУ, содержащей 10 мг/ пробу ЭДТА, перемешивают

стеклянной палочкой, выдерживают в холодильнике 30 мин, центрифугируют 10 мин при 1000 g и надосадок используют для определения А, НА, ДОФА.

Подготовка проб мочи. Мочу консервируют 2 н раствором серной кислоты из расчета 10 мл кислоты на 100 мл мочи и добавляют ЭДТА (250 мг на 100 мл мочи), который хранили при температуре 2–4°С не более 4 ч (в замороженном виде можно хранить в течение месяца). После центрифугирования для анализа берут 22 мл мочи.

Для определения уровня экскреции катехоламинов у птиц под клетки ставят эмалированные кюветы с консервирующим составом: глицерин 25 мл, серная кислота концентрированная – 1 мл, ЭДТА – 1 г, вода дистиллированная – 73 мл (из расчета 100 мл смеси на 1 птицу). После истечения времени сбора помета (обычно 4–6 ч) содержимое кюветы сливают в банки с притертыми пробками и хранят в холодильнике (не более 1–2 суток). Перед началом анализа содержимое банок энергично встряхивают 1–2 мин, затем центрифугируют 10 мин при 1000 g, после чего для анализа берут 20 мл верхнего слоя.

При определении катехоламинов в печени и мышцах берут 1 г ткани, в надпочечниках – 20–100 мг ткани, гомогенизируют с 10 мл 5%-ной ТХУ. Гомогенаты выдерживают в холодильнике 30 мин, центрифугируют, надосадок сливают и используют для анализа.

Хроматография катехоламинов. В качестве адсорбента катехоламинов чаще всего используют химически чистую окись алюминия. С этой целью применяют колонки с внутренним диаметром 0,7 см (длина узкой части 15 см), резервуар вместимостью 50 мл. На дно колонки помещают небольшой кусочек ваты, отмытой дистиллированной водой при кипячении и высушенной. Для создания небольшого разрежения колонку подключают к водоструйному насосу. 1,2 г Al_2O_3 встряхивают в 3 мл воды, отсасывают и сливают воду. Эту процедуру повторяют еще 3 раза. Затем окись алюминия количественно переносят на колонку. Пробу перед нанесением на колонку доводят 1 н и 0,5 н NaOH до pH 8,2 при перемешивании на магнитной мешалке под контролем pH-метра. Пробу немедленно переносят на колонку с окисью алюминия и дают стечь под действием силы тяжести, затем промывают 5 мл воды, подщелоченной 1 каплей 0,5 н NH_4OH при отсасывании водоструйным насосом.

Элюирование катехоламинов. Катехоламины элюируют 5 мл 0,24 н уксусной кислоты. Элюат стекает под действием силы тяжести; время между подщелачиванием пробы и окончанием элюации не должно превышать 30 мин. Для элюирования ДОФА используют 3 мл 0,2 н соляной кислоты.

Проведение реакции. Кислотность уксуснокислых элюатов варьирует в пределах pH 3,5–3,9. Их можно использовать сразу же или хранить в замороженном виде 2–3 дня до анализа. Перед анализом их осторожно размораживают и центрифугируют 10 мин при 1000 g для удаления взвешенных частиц окиси алюминия. При определении адреналина к 1 мл элюата добавляют 1 мл холодного фосфатного буфера pH 4,2, каплю 0,5 н NH_4OH (при этом pH смеси устанавливается в пределах 4,1–4,3) и 0,1 мл 0,25% раствора феррицианида калия. Через 2 мин окисление останавливают добавлением 1 мл 0,2% раствора аскорбиновой кислоты в 0,5 н NaOH и записывают на СФ-4а спектр возбуждения при длине волны 520 нм.

При определении норадреналина к 1 мл отцентрифугированного элюата добавляют 1 мл холодного фосфатного буфера pH 7,3 (при этом pH смеси устанавливается в пределах 6,2–6,5) и 0,1 мл 0,5% раствора феррицианида калия. Через 2 мин окисление останавливают добавлением 1 мл 0,2% раствора аскорбиновой кислоты в 0,5 н NaOH. Интенсивность флюоресценции записывают при длине волны 520 нм. Одновременно с опытными образцами ставят и контрольные пробы, к кото-

рым вместо раствора феррицианида прибавляют такое же количество воды.

Определение ДОФА в солянокислом элюате проводят так же, как и А и НА. Для этого 1 мл солянокислого элюата вносят в 2 пробирки, туда же добавляют по 1 мл ацетатного буфера с рН 6,2, затем в первую пробирку прибавляют 0,1 мл феррицианида калия и через 2 мин – 1 мл щелочного раствора аскорбиновой кислоты. Во вторую пробирку сначала вносят аскорбиновую кислоту, затем феррицианид калия. Измеряют флюоресценцию содержимого пробирок при 520 нм.

Расчет. Для калибровочного графика берут стандартные растворы А, НА, ДОФА в 0,25 н уксусной кислоте и обрабатывают по описанной методике. При этом следят, чтобы рН смеси перед окислением была соответственно 4,2 и 6,2.

Для расчета содержания адреналина, норадреналина, ДОФА берут разность между величинами максимумов спектров возбуждения флюоресценции опытных и контрольных проб при возбуждении 410 нм (для ДОФА 360 нм) и флюоресценции при 520 нм. Затем по калибровочным графикам, полученным при прямом окислении (т.е. минуя этап выделения на колонках) растворов, содержащих определенное количество катехоламинов, рассчитывают содержание А, НА и ДОФА.

Примечание. Расчет содержания биогенных аминов в нанограммах на 1 мл можно вести по формуле:

$$X = F_{4,2} \cdot Y / n_1 \cdot P$$

где X – содержание адреналина, нг/мл; $F_{4,2}$ – интенсивность флюоресценции пробы при рН 4,2; n_1 – интенсивность флюоресценции 1 нг стандарта адреналина; P – объем пробы; Y – объем элюата.

$$X = (F_{6,2} - F_{4,2} \cdot Y) / n_2 \cdot P$$

где X – содержание норадреналина, нг/мл; $F_{6,2}$ – интенсивность флюоресценции норадреналина; n_2 – интенсивность флюоресценции 1 нг норадреналина.

$$X = F_{6,2} \cdot Y / n_3 \cdot P$$

где X – содержание ДОФА, нг/мл; $F_{6,2}$ – интенсивность флюоресценции при светофильтрах 360–520; n_3 – интенсивность флюоресценции 1 нг ДОФА.

Интенсивность флюоресценции 1 нг устанавливают расчетным путем.

12. Определение активности моноаминоксидазы в сыворотке крови и гомогенатах тканей

Основными ферментами, катализирующими превращение катехоламинов, являются моноаминоксидаза (МАО) и катехолоксиметилтрансфераза. МАО широко распространена в организме, характеризуется сравнительно широкой субстратной специфичностью и принимает участие в регуляции уровня внутриклеточных биогенных аминов (НА, ДОФА, серотонина). Установлено, что окислительному дезаминированию подвергается и адреналин. Продукты окисления – биогенные альдегиды, спирты участвуют в регуляции активности ряда ферментов тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования в митохондриях. Описываемый метод определения активности МАО в крови и тканях основан на способе, изложенном Е.А.Солоимской (25), содержит ряд модификаций, улучшающих воспроизводимость результатов анализа.

Реактивы. 1. Фосфатный буфер рН 7,4–7,5; 2. Свежеприготовленный раствор тирамина: 5 мг тирамина гидрохлорида растворяют в 50 мл фосфатного буфера; 3. 5%-ный раствор сернокислого цинка; 4. 0,4 н раствор едкого натра; 5. Концентрированная соляная кислота; 6. Све-

жеприготовленный 1%-ный спиртовый раствор α -нитрозо- β -нафтола; 7. Концентрированная азотная кислота; 8. 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты.

Оборудование. Центрифуга, термостат, колориметр.

Ход определения. В центрифужную пробирку вносят 1 мл анализируемой сыворотки крови, 1,5 мл фосфатного буфера и 0,5 мл раствора тирамина (100 мкг тирамина в 1 мл раствора); во вторую пробирку – 1 мл сыворотки и 1,5 мл буфера (контроль 1), третья пробирка служит вторым контролем и содержит 3 мл буфера, а четвертая – стандартной пробой с 2,5 мл буфера и 0,5 мл раствора тирамина. Содержимое пробирок перемешивают и инкубируют 1 ч при температуре 37°C. После инкубации во все пробирки вносят по 1 мл 10%-ного раствора ТХУ, во вторую пробирку добавляют 0,5 мл раствора тирамина, тщательно перемешивают стеклянной палочкой и центрифугируют 15 мин при 1500 г. Отсасывают по 1 мл надосадка в центрифужные пробирки, добавляют в них по 0,2 мл концентрированной соляной кислоты, 1 каплю раствора α -нитрозо- β -нафтола, 3 капли концентрированной азотной кислоты. Содержимое пробирок встряхивают и помещают в водяную баню при температуре 90°C на 30–60 сек, в течение которых пробы окрашиваются в красный цвет. После охлаждения в каждую пробирку добавляют по 1 мл дистиллированной воды, затем центрифугируют 10 мин при 1000 г и колориметрируют с зеленым светофильтром (кювета 5 мм) против контроля II. Из показания 2 пробирки (контроль I) вычитают показания первой опытной пробирки по формуле:

$$A = a \cdot 50 / v,$$

где A – убыль тиронина, мкг/мл сыворотки/час инкубации; a – разница показателя экстинкции второй (контроль I) и первой проб; v – оптическая плотность стандартной пробы; 50 – количество тирамина в стандартной пробе, мкг.

Для определения активности фермента в тканях гомогенат печени готовят на фосфатном буфере в соотношении 1:10 (для мышц 1:5). После 30-минутного выдерживания при температуре 4°C гомогенат центрифугируют 5 мин при 1000 г. Для анализа берут 2 мл надосадка и 0,5 мл тирамина (опытная проба), в контроль I тирамин вносят после инкубации. Ставят контроль на реактивы и стандартную пробу. Определение ведут так же, как и для фермента крови.

В отличие от метода Е.А.Солоимской, модифицированный способ определения активности MAO пригоден как для крови, так и для тканей и, кроме того, он имеет ряд преимуществ: инактивация фермента и внесение тирамина в контроль I после инкубации учитывает окисление собственных аминов в тканях. Добавление азотной кислоты перед помещением проб в баню обеспечивает стабильность окраски, а дополнительное центрифугирование перед колориметрированием осветляет мутные растворы.

Определенная по описанному методу активность MAO у крупного рогатого скота составляет: в сыворотке крови – от 9,4 до 26,1 мкг/мл/час, в печени – от 16 до 59 мкг/г/час, в надпочечниках – от 11,9 до 83,3 мкг/г/час, гипоталамусе – от 27 до 134 мкг/г/час. Активность MAO изменяется с возрастом животных, при введении транквилизаторов и при длительном воздействии неблагоприятных факторов окружающей среды (25). Между активностью фермента в печени и концентрацией адреналина в крови установлена отрицательная коррелятивная связь ($r = -0,90$).

Литература

1. Балаболкина М.И. Радиоиммунологические методы определения гормона роста в сыворотке крови. Проблемы эндокринологии, 1969, 15, 5.
2. Волчек А.Т., Смирнов А.Н. Конкурентный белковосвязывающий анализ гормонов (основные элементы, краткие сведения о применении, теоретические аспекты). Проблемы эндокринологии, 1974, 20, 6.
3. Федотов В.П., Соколов Я.А. Основные принципы, некоторые итоги и перспективы применения радиоиммунологического метода определения белковых гормонов. В кн.: Современные вопросы эндокринологии, М., 1969.
4. Ekins R.P. *Expert.Med.Int.Congr.Ser.*, 1968, 161:575.
5. Hunter W.E., Greenwood F.C. *Nature*, 1963, 194:495.
6. Brown D.E., Hacker R.R., King G.J. Growth and ACTH responses to cold stress of young pigs fed ad libitum. *Can.J.Anim.Sci.*, 1976, 56, 3:365.
7. Vague P., Oliver S. *Le dosage radioimmunologiques.*, Paeis, 1972.
8. Genazzany A., Fraioli F., Felber S. ACTH radioimmunoassay methodological problems and clinical applications. *Symp.on radioimmunoassay and related procedures in clinical medicine and reearch. Istanbul.*, 1973.
9. Andersen P. Adrenocorticotropin releasing hormone in peripheral blood increases during stress. *Science*, 1966, 152:379.
10. Акиева Б.А. Сравнение характера секреции инсулина, определяемого радиоиммунным и биохимическим методами, в норме и при сахарном диабете. Проблемы эндокринологии, 1976, 2.
11. Грачева Н.К., Харитонов И.Г. Изучение "связанного инсулина" сыворотки крови доноров и больных сахарным диабетом методом краевого дихроизма. Проблемы эндокринологии, 1978, 3.
12. Бутров Е.В. Роль инсулина в обмене липидов в тканях бычков. Труды ВНИИФБиП с.-х. животных, Боровск, 1978, 20.
13. Радченков В.П., Хаданович И.В., Бутров Е.В. и др. Содержание гормонов в крови свиней в связи с возрастом и уровнем кормления. Доклады ВАСХНИЛ, 1980, 7.
14. Радченков В.П., Бутров Е.В., Голенкевич Е.К. и др. Гормоны и продуктивность свиней.. *Вестник с.-х. науки*, 1982, 11.
15. Бутров Е.В. К вопросу определения свободного и связанного инсулина в плазме крови животных радиоиммунометодом. Бюллетень ВНИИФБиП с.-х. животных, Боровск, 1975, 2(37).
16. Старосельцева Л.К., Грачева Н.К., Цветкова И.В. Изучение роли сиаловой кислоты в образовании связанной формы инсулина. Проблемы эндокринологии, 1977, 5.
17. Таракулов Я.Х. Тиреоидные гормоны, Ташкент, 1972.
18. Schulke V., Tegeler G. Die Sekretion von C-21-Kortikosteroiden durch die Nebennierenrinde des Schweines unter besondere Berücksichtigung der Sekretion von blautetrasoliiinpositiven Verbindungen Kortisol, Kortikosteron und Aldosteron. *Arch. fur exptl.Vet.Med.*, 1971, 25, 3: 523.
19. Verner S.C., Acebedo G., Radichevich S. Rapid radioimmunoassay of both T₄ and T₃ in the same sample of human serum. *S.C.E. and M.*, 1974, 38, 493.
20. Murphy B.E., Pattee C.J. Determination of thyroxine utilizing the property of protein-binding. *J.Clin.Endocrinol.Metabol.*, 1964, 24, 1964.
21. Меньшиков В.В. Методы клинической биохимии гормонов и медиаторов. М., 1969.
22. Матлина Э.Ш. Адреналин и норадреналин. М., 1964.
23. Матлина Э.Ш., Киселева З.М. Методы исследования некоторых гормонов и медиаторов. М., 1965.
24. Euler U.S., Lishaiko F. The estimation of catecholamines in urine. *Acta physiol. Scand.*, 1959, 45, 2-3:122.
25. Солоимская Е.А. К методике определения активности моноаминоксидазы (тираминазы). Лабораторное дело, 1967, 9.

VI. Методы анализа метаболитов и активности ферментов азотистого обмена

1. Определение белка в плазме крови по Лоури (1)

Принцип метода. Метод основан на образовании окрашенного соединения при взаимодействии белка с реактивом Фолина, в присутствии которого тирозин и триптофан, содержащиеся в белках, дают цветную реакцию с молибденовой кислотой в щелочной среде. Взаимодействие ионов меди с пептидной связью также вносит свою долю в образование окраски, что используется в последующих модификациях метода. Хромогенность разных белков различна, однако в плазме крови большое количество разнообразных белков содержатся в определенных пределах, в связи с чем применение этого чувствительного метода возможно для определения белка в плазме и он широко используется. Оптическая плотность цветной реакции не является строго пропорциональной количеству белка, за исключением узкого интервала от 30 до 80 мкг, что является недостатком этого метода. Здесь описывается модификация Hartree E.F. (2), позволяющая получать линейную зависимость оптической плотности в интервале 15–110 мкг белка в пробе.

Реактивы. 1. 1,0 н раствор гидрата окиси натрия - NaOH (40,0 г NaOH и вода до 1 л); хранят закрытым в емкости из полиэтилена; 2. 2,0 г калия-натрия виннокислого ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) + 100 г углекислого натрия (Na_2CO_3) растворяют в 500 мл 1,0 н NaOH и доводят водой до 1 л (раствор стабилен до 6 месяцев); 3. 2,0 г калия-натрия виннокислого + 1,0 г сернокислой меди ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) растворяют в 90 мл воды и добавляют 10 мл 1,0 н NaOH (раствор стабилен до 6 месяцев); 4. Реактив Фолина-Чиокалтеу (рабочий раствор готовят ежедневно, разбавляя 1 часть реактива 15-ю частями воды; он должен иметь плотность 0,15–0,18 н; 5. Стандарт – 12 мг% раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) – 60,0 мг + 3 капли хлороформа и вода до 500 мл (хранят в холодильнике).

Оборудование. Колориметр, водяная баня.

Ход определения. Плазму разбавляют в 1000 раз. Вносят 1,0 мл разбавленной плазмы в пробирку на 20 мл, добавляют 0,9 мл раствора №2, инкубируют 10 мин при температуре 50°C в водяной бане, затем охлаждают. Добавляют 0,1 мл раствора №3 и выдерживают 10 мин при комнатной температуре. Добавляют 3,0 мл 0,15 н реактива Фолина-Чиокалтеу, инкубируют 10 мин при 50°C и затем охлаждают. Оптическую плотность (ОП) измеряют при 650 нм в кювете толщиной 1 см (при 750 нм ОП в 2 раза выше, но ухудшается линейность цветной реакции).

Расчеты. Калибровочную кривую строят по оптической плотности ряда растворов, приготовленных разведением стандарта (12 мг% раствора БСА). При каждом анализе ставят стандарт, а концентрацию белка в плазме исчисляют по формуле:

$$\text{Соб(мг\%)} = \text{ОП об} \times (\text{Сст (мг\%)} / \text{ОПст}) \times \text{Роб},$$

где Соб и Сст – концентрация белка в образцах и стандарте; ОПоб и ОПст – оптическая плотность образца и стандарта; Роб – кратность разбавления испытуемого образца.

Ошибка метода $\pm 3\%$. Концентрация белка в плазме составляет в среднем от 4 до 9%.

2. Определение белка в плазме крови биуретовым методом

Принцип метода. Метод основан на образовании окрашенного комплекса при взаимодействии белка с биуретовым реактивом, при котором в щелочной среде каждый ион меди образует координационные связи с четырьмя атомами азота пептидных связей. Аммиак, аминокислоты, мочевины и другие азотистые вещества не дают окрашивания и не ме-

шают определению белка этим методом. Существует множество модификаций метода. Здесь приводится методика, описанная в Фармакопее ФРГ (3).

Реактивы. 1. 0,2 н раствор гидрата окиси натрия (NaOH) – 8,0 г NaOH и вода до 1 л; 2. Запасной биуретовый реактив – 4,5 г калия-натрия виннокислого ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) + 1,5 г сернокислой меди ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) + 0,5 г йодистого калия (KJ) растворяют и доводят объем до 100 мл 0,2 н раствором NaOH; 3. 0,5%-ный раствор йодистого калия (KJ) в 0,2 н растворе NaOH; 4. Рабочий биуретовый реактив – 1 часть раствора №2 смешивают с 4 частями раствора №3; 5. Стандарт – 10%-ный (в/о) раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) в 0,9%-ном растворе хлористого натрия (10,0 г БСА + 3 капли хлороформа + 0,9 г NaCl и вода до 100 мл).

Оборудование. Колориметр.

Ход определения. В пробирку на 20 мл вносят 0,1 мл плазмы крови. Добавляют 5,0 мл рабочего биуретового реактива (раствор №4), перемешивают. Через 30 мин измеряют оптическую плотность окраски на фотоколориметре с зеленым светофильтром (540 нм) в кювете толщиной 1 см. Слепая проба – вместо плазмы вода.

Расчеты. Калибровочный график строят по оптической плотности ряда растворов, приготовленных разведением стандарта (10%-ного раствора БСА). При каждом анализе ставят стандарт, концентрацию белка в плазме определяют по формуле:

$$\text{Соб(мг\%)} = \text{ОПоб} \times \text{Сст(мг\%)} / \text{ОПст}$$

где С об и Сст – концентрация белка в образцах и стандарте; ОПоб и ОПст – оптическая плотность образцов и стандарта.

3. Определение свободного α -аминного азота в плазме крови

Принцип метода. Метод основан на взаимодействии amino- и иминогрупп аминокислот с нингидрином с образованием окрашенного комплекса. Имеется много модификаций метода. Ниже приводится методика Braithwood J.L. (4), которая разработана автором на основе сравнения и оценки более десяти методик и детального изучения последовательных стадий цветной реакции. Методика доработана нами применительно к специфике исследований на сельскохозяйственных животных.

Реактивы. 1. 4,05%-ный раствор вольфрамвокислого натрия – 2,02 г Na_2WO_4 и вода до 50 мл или 2,27 г $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (раствор устойчив); 2. 0,3 н раствор серной кислоты; 3. Хромогенный агент: уксусная кислота ледяная 0,75 мл + уксуснокислый натрий ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 5,11 г + метилцеллозольв 75,0 мл + нингидрин 2,0 г + гидриндантин 0,30 г и вода до 100 мл. Хранить в холодильнике; 4. 60%-ный раствор изопропанола – 120 мл изопропанола и вода до 200 мл. Раствор устойчив; 5. 1,0 мг% раствор α -аминного азота - 53,8 мг глицина + 5 капель хлороформа и вода до 1,0 л.

Оборудование. Центрифуга, колориметр, водяная баня.

Ход определения. Образец – плазма крови. Сыворотка крови не используется, так как в ней изменчива концентрация свободных аминокислот вследствие выхода их из сгустка в процессе фибринолиза. Для получения безбелкового образца плазмы крови вносят 0,2 мл плазмы в центрифужную пробирку на 10 мл и добавляют 0,8 мл воды (соотношение плазмы и воды можно изменять). Приливают 1,0 мл 4,05%-ного раствора вольфрамвокислого натрия, перемешивают, добавляют 1,0 мл 0,3 н раствора серной кислоты, вновь перемешивают и оставляют на 10 мин. Центрифугируют 15 мин при 2000 об/мин.

Для образования цветной реакции вносят в пробирку на 20 мл 0,5 мл надосадочной жидкости, добавляют 1,0 мл хромогенного реагента №3. Выдерживают в кипящей водяной бане 15 мин. Охлаждают пробир-

ки под струей водопроводной воды и добавляют 3,5 мл 60%-ного раствора изопропанола. После добавления каждого реагента раствор перемешивают. Измеряют оптическую плотность (ОП) окрашенного раствора на фотоколориметре при 560 нм (550–570) в кювете толщиной 10 (или 5) мм.

Расчеты. Калибровочный график строят по оптической плотности ряда растворов, приготовленных разведением стандарта. Оптическая плотность стандартного раствора (1,0 мг% раствора глицина) приблизительно равна 1,2. Окраска устойчива. При анализе каждой партии образцов целесообразно определять ОП стандартного раствора, которая колориметрируется против слепой пробы со всеми реактивами и водой вместо испытуемого образца и, следовательно, минуя стадию осаждения белка.

Концентрацию α -аминного азота в образцах вычисляют по формуле:

$$\text{Соб(мг\%)} = \text{ОПоб} \times (\text{Сст(мг\%)} / \text{ОПст}) \times \text{Роб},$$

где Соб и Сст – концентрация α -аминного азота в испытуемых образцах и стандарте; ОПоб и ОПст – оптическая плотность образцов и стандарта; Роб – кратность разбавления образца в стадии осаждения белка.

Концентрация α -аминного азота в плазме крови в среднем составляет от 5 до 10 мг%.

Для приготовления гидриндантина (компонент реактива №3) из нингидрина по Stein W., Moore S. (5) в 500 мл колбе растворяют 10 г нингидрина в 250 мл воды. Подогревают и выдерживают (до растворения) при 90°C. Добавляют при перемешивании 50 мл 20%-ного (в/о) раствора аскорбиновой кислоты. После 30-минутной выдержки при этой температуре охлаждают до комнатной температуры и хранят в холодильнике при 4°C (5–6 ч). Фильтруют кристаллы гидриндантина через воронку Бюхнера и фильтровальную бумагу В №1. Промывают кристаллы холодной водой. Высушивают. Досушивают гидриндантин до постоянного веса в эксикаторе над P₂O₅. Выход 70–80%. Хранят в темной посуде при комнатной температуре.

4. Определение аммиака фенол-гипохлоридным методом (6)

Принцип метода. Метод основан на образовании окрашенного соединения в реакции аммиака с фенол-гипохлоридным реактивом Бартолета.

Реактивы. 1. 10,0 г фенола + 0,05 г нитропруссид натрия и вода до 1 л (можно хранить в холодильнике до 1 месяца); 2. 5,00 г гидрата окиси натрия (NaOH) + 53,7 г фосфорнокислого натрия двузамещенного (Na₂HPO₄·12 H₂O) + 10 мл раствора гипохлорида натрия (NaOCl), содержащего 10–14% хлора, и вода до 1 л (можно хранить в холодильнике до 1 месяца); 3. 1,0 н раствор серной кислоты (H₂SO₄); 4. 10,0%-ный раствор вольфрамовокислого натрия – Na₂WO₄ · 2H₂O (раствор устойчив); 5. Стандарт – 0,25 мг% раствор аммонийного азота (0,0118 г сернокислого аммония (NH₄)₂SO₄ и вода до 1 л, можно хранить в холодильнике до 1 месяца).

Все растворы следует готовить на бидистиллированной воде, освобожденной от аммиака. При дистилляции воду слегка подкисляют серной кислотой, а перед приготовлением растворов кипятят ее в открытой колбе в течение 15 мин. Оптическая плотность такой воды должна быть не более 0,08.

Оборудование. Центрифуга, спектрофотометр, водяная баня.

Ход определения. Осаждение белка и получение безбелковой надосадочной жидкости проводят немедленно после взятия крови. В центрифужную пробирку вносят 1,0 мл 10%-ного раствора вольфрамовокислого натрия, добавляют 2,0 мл анализируемого образца и переме-

шивают стеклянной палочкой. Добавляют 1,0 мл 1 н раствора серной кислоты, перемешивают и центрифугируют при 1200 g в течение 15 мин. Надосадочную жидкость можно хранить в холодильнике до 3 суток. Вносят в пробирку на 20 мл 0,5 мл надосадочной жидкости, добавляют 2,5 мл раствора №1 и перемешивают. Добавляют 2,5 мл раствора №2, перемешивают и инкубируют 35 мин при температуре 37°C. Оптическую плотность измеряют на спектрофотометре при длине волны 625 нм в кювете толщиной 10 мм или на фотоколориметре при 600 нм. Окраска устойчива в течение 2 часов.

Расчеты. Калибровочную кривую строят по оптической плотности ряда растворов, приготовленных разведением стандартного раствора. Стандартные растворы и слепую пробу, содержащую вместо образца воду, обрабатывают так же, как и исследуемые образцы, начиная с процедуры осаждения белка. Концентрацию азота аммиака подсчитывают по формуле:

$$\text{Соб(мг\%)} = \text{ОПоб} \times \text{Сст(мг\%)} / \text{ОПст},$$

где Соб и Сст – концентрация аммонийного азота в образцах и стандарте; ОПоб и ОПст – оптическая плотность образца и стандарта.

Методика обладает высокой специфичностью. Мочевина, мочевая кислота, аминокислоты, креатинин не мешают определению.

Раствор гипохлорида натрия получают по методу, описанному Ю.В. Корякиным и И.И.Ангеловым (7).

5. Определение аммиака микродиффузионным методом

Принцип метода. Метод основан на реакции аммиака с реактивом Несслера, при которой образуется окрашенный в желтый цвет комплекс. В щелочной среде аммиак из образца улетучивается и улавливается капелькой раствора серной кислоты. Здесь приводится в основном пропись методики по Seligson D., Hurahara K. (8).

Реактивы. 1. Карбонатный буфер pH 10,2 (29,420 г углекислого калия K_2CO_3 + 19,375 г кислого углекислого калия KHCO_3 и вода до 1 л). Хранят в закрытой полиэтиленовой емкости; 2. 1 н раствор серной кислоты; 3. Реактив Несслера (рабочий реактив разбавляют водой в 5 раз; хранят в холодильнике); 4. Стандарт – 0,25 мг%-ный раствор аммонийного азота (0,0118 г сернокислого аммония $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и вода до 1 л; раствор готовят на бидистиллированной воде; хранят в холодильнике).

Оборудование. Спектрофотометр, роторные устройства.

Ход определения. Вносят во флакончик из-под пенициллина 1,0 мл крови немедленно после взятия (резиновую пробку к флакончику снабжают стеклянной палочкой длиной 25 мм и диаметром 4 мм, конец которой на 10 мм грубо шлифуют). Флаконы и пробки моют кипячением в подщелоченной дистиллированной воде. Добавляют 0,5 мл буферного раствора. Флакон быстро закрывают пробкой, предварительно погрузив шлифованный конец палочки в 1 н раствор серной кислоты (конец палочки не должен соприкасаться с образцом). Флаконы в горизонтальном положении ставят в гнезда специального роторного устройства и вращают в течение 75 мин со скоростью 40 - 60 об/мин. Выключают устройство, осторожно извлекают пробки и смывают шлифованные концы стеклянных палочек в стаканчик с 5,0 мл разбавленного реактива Несслера. Переливают жидкость из стаканчика в кювету толщиной 10 мм и измеряют оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 420 нм. Слепая проба – аналогично с опытной, но с водой вместо образца.

Расчеты. Калибровочный график строят по оптической плотности ряда растворов, приготовленных разведением стандарта. При каждом анализе следует ставить стандарт. Концентрацию аммонийного азота вычисляют по формуле:

$$\text{Соб(мг\%)} = \text{ОПоб} \times \text{Сст(мг\%)} / \text{ОПст},$$

где Соб и Сст – концентрация аммонийного азота в исследуемых образцах и стандарте; ОПоб и ОПст – оптическая плотность образцов и стандарта.

6. Определение аммиака в содержимом пищеварительного тракта и моче

Принцип метода. Метод основан на вытеснении аммиака щелочью в замкнутом пространстве (в чашках Конвея) и улавливании его титрованием раствором серной кислоты (9,10). Избыток последней титруется щелочью. По количеству связанной кислоты судят о количестве аммиака.

Реактивы. 1. Насыщенный раствор поташа (K_2CO_3); 2. 0,02 н раствор серной кислоты; 3. 0,02 н раствор едкого натра; 4. Индикатор Таширо: 0,125 г метилпрота + 0,0825 г метиленового синего растворяют в 100 мл спирта; 5. Смазка (300 г вазелина + 50 г воска + 50 г парафина).

Оборудование. Чашки Конвея с крышками.

Ход определения. Во внутреннюю камеру чашки Конвея (можно также применять микродиффузионные конические сосуды Фойгета и Страгера) вносят точно отмеренное количество раствора серной кислоты. При определении аммиака в содержимом рубца, химусе или в моче достаточно бывает 2–3 мл 0,02 н серной кислоты. Туда же добавляют 2–3 капли индикатора Таширо.

В наружную камеру вносят 1 мл профильтрованной рубцовой жидкости, химуса или 0,5 мл мочи. Затем к исследуемым образцам в наружную камеру добавляют 2 мл раствора поташа. Крышку быстро закрывают, проверяют герметичность закрытия камеры и осторожно смешивают исследуемую жидкость с поташом. Чашки в условиях лаборатории оставляют на 24 часа. Одновременно с опытными образцами заряжают еще одну чашку, в которой вместо исследуемого образца – равное по объему количество дистиллированной воды (контрольный опыт).

Через 24 часа проводят титрование кислоты в центральной камере 0,02 н раствором едкого натра до появления зеленой окраски индикатора.

Расчет. Расчет производят по следующей формуле:

$$X = (\text{П}_1 - \text{П}_2) \times 0,34 \times 100,$$

где X – концентрация аммиака, мг%; П_1 и П_2 – количество щелочи (мл), пошедшей на титрование кислоты в контрольной (П_1) и исследуемой (П_2) пробках; 0,34 – количество аммиака (мг), эквивалентное 1 мл 0,02 н раствора едкого натра или серной кислоты.

7. Определение амидного азота глутамина

Принцип метода. Существующие методы определения глутамина, а также их модификации не всегда могут быть использованы в исследованиях. Метод определения глутамина в чашках Конвея по приросту аммиака после 2-часового щелочного гидролиза (11) считается недостаточно специфичным, так как за такое длительное время могут гидролизиться и другие азотистые соединения. Микрометод определения глутамина, основанный на использовании полунасыщенного раствора едкого калия в трихлоруксусном экстракте (12), также имеет свои недостатки – требует немедленного, после взятия образцов, проведения анализов, специальной роторной установки и диффузионных герметически закрывающихся сосудов. Принцип описываемого метода основан на образовании окрашенного комплекса при взаимодействии аммиака, освобождающегося при гидролизе глутамина, с фенолгипохлоритным реактивом. Достоинством метода является относительная простота анализа и хорошая воспроизводимость. Применяемый при этом метод

осаждения белков в исследуемых пробах (10 %-ный раствор вольфрамвокислого натрия и 1 н раствор серной кислоты) дает возможность сохранять полученный безбелковый супернатант при температуре 4°C в течение трех суток.

Реактивы. 1. 10%-ный раствор вольфрамвокислого натрия $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 2. 1 н раствор H_2SO_4 ; 3. Раствор №1 – 10 г фенола и 50 мг нитропруссид натрия растворяют в 1 л воды; 4. Раствор №2 – 5 г гидрата окиси натрия, 53,7 г двухзамещенного фосфорнокислого натрия $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ и 10 мл гипохлорита натрия NaOCl , содержащего 10–14 % хлора, растворяют в 1 л воды; 5. Стандартный раствор аммиака – 0,471 г сернокислого аммония растворяют в 1 л бидистиллированной воды (в 1 мл раствора содержится 100 мкг азота аммиака; перед работой готовят из стандартного рабочий раствор, который содержит 2 мкг азота аммиака в 1 мл); 6. 5 н H_2SO_4 ; 7. 5 н NaOH .

Растворы №№ 1 и 2 и стандартный раствор сернокислого аммония хранят при температуре 4°C, возобновляя каждый месяц. Все растворы готовят на бидистиллированной воде, освобожденной от аммиака, этой же водой ополаскивают необходимую для работы посуду.

Оборудование. Центрифуга, спектрофотометр.

Ход определения. Для осаждения белков в пробирку с 1 мл 10%-ного раствора вольфрамата натрия приливают 2 мл крови или 2 мл гомогената печени, мышцы (1:10), тщательно перемешивают и сразу же приливают 1 мл 1 н раствора серной кислоты, после чего снова тщательно перемешивают стеклянной палочкой и центрифугируют при 1200 g в течение 15 мин.

Для определения амидного азота глутамина в пробирку с притертой пробкой берут 1,5 мл надосадка, приливают 0,25 мл 5 н H_2SO_4 и гидролизуют 10 мин в кипящей водяной бане. После гидролиза пробы нейтрализуют добавлением 0,25 мл 5 н NaOH . Затем разливают в пробирки по 0,5 мл гидролизата и надосадка до гидролиза и определяют в них содержание аммиака фенол-гипохлоритным методом (см. определение аммиака).

Расчет. Амидный азот глутамина вычисляют (в мкг на 100 мл крови или 100 г ткани) по разности отщепленного аммиака в исследуемых пробах до и после 10-минутного кислотного гидролиза.

8. Определение мочевины с диацетилмонооксимом

Принцип метода. Метод основан на том, что мочевина при кипячении с диацетилмонооксимом и ортофосфорной кислотой образует окрашенный в красный цвет комплекс, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию мочевины (23). Метод пригоден для определения мочевины в крови, слюне, содержимом рубца и кишечника.

Реактивы. 1. 2/3 н раствор серной кислоты; 2. 10%-ный вольфрамвокислый натрий; 3. Реактив А (600 мг диацетилмонооксима и 30 мг тиосемикарбазида растворяют в 100 мл воды); 4. Реактив В (60%-ный раствор ортофосфорной кислоты); 5. Реактив С (готовят непосредственно в день определения: смешивают 2 объема реактива А с 10 объемами реактива В); 6. Мочевина хч.

Оборудование. Фотоколориметр или спектрофотометр; центрифуга; пробирки с притертыми пробками.

Ход определения. 1 мл исследуемого раствора разбавляют 7 мл дистиллированной воды, добавляют 1 мл 10%-ного раствора вольфрамата натрия, хорошо перемешивают и выдерживают 10 мин. Затем приливают 1 мл 2/3 н серной кислоты, перемешивают и выдерживают еще 15 мин. После этого смесь центрифугируют при 1200 g в течение 10 мин. Далее в термостойкую пробирку с притертой пробкой берут 0,2–0,5 мл надосадочной жидкости, смешивают с 5 мл реактива С и помещают в кипящую водяную баню на 20 мин. После 5-минутного охлаждения в

проточной водопроводной воде окрашенный раствор в пробирке спектрофотометрируют или колориметрируют при длине волны 530 нм. Одновременно ставят контрольную пробу на реактивы, которую обрабатывают так же, только вместо исследуемого объема берут равный объем дистиллированной воды. Так же определяют величину экстинкции в пробе стандартного раствора мочевины. Стандартную пробу подготавливают так же, как и опытную, но вместо исследуемого раствора берут 0,2–0,5 мл стандартного раствора мочевины. В зависимости от предполагаемого уровня мочевины в исследуемых пробах стандартные растворы мочевины готовят 10–30 мг% концентрации.

Расчет. Расчет проводят по формуле:

$$X = C \times \text{Экст. опытной пробы} / \text{Экст. стандарт. пробы},$$

где X – содержание мочевины в пробе, мкг; C – содержание мочевины в стандартном растворе, мкг.

9. Определение нитратов и нитритов в крови, содержимом рубца и кормах

Принцип метода. Метод основан на извлечении нитратов из проб дистиллированной водой, восстановлении нитратов до нитритов и взаимодействии последних с реактивом Грисса, в результате чего образуется азокраситель розово-красного цвета. Реакция специфична для нитратов.

Реактивы. 1. Уксусная кислота 12%-ная; 2. Альфа-нафталин чда; 3. Сульфаниловая кислота, чда; 4. Цинковая пыль; 5. Сульфат марганца; 6. 5%-ный раствор сернокислого цинка; 7. 0,3 н раствор едкого натра (0,3 моль/л); 8. Реактив Грисса: 0,5 г сульфаниловой кислоты растворяют в 150 мл 12%-ного раствора уксусной кислоты (раствор а), 0,1 г α -нафталина растворяют при нагревании в 20 мл дистиллированной воды, фильтруют через бумажный фильтр и смешивают со 150 мл 12%-ного раствора уксусной кислоты (раствор б). Растворы "а" и "б" хранят отдельно в холодильнике не более 2 месяцев. Перед употреблением растворы смешивают в соотношении 1:1. Реактив Грисса должен быть бесцветным; 9. Стандартный раствор нитрата калия (основной): в мерной колбе на 1 л растворяют 1,630 г нитрата калия (высушенного при 105°C до постоянной массы). 1 мл раствора содержит 1 мг нитрат-иона (NO_3^-). Хранят в холодильнике 3 месяца. Рабочий стандартный раствор нитрата калия готовят из основного в день анализа. Для этого 20 мл основного раствора переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят водой до метки. 1 мл этого раствора содержит 0,2 мг (200 мкг) нитрат-ионов; 10. Восстановитель: готовят из смеси 1 г цинковой пыли и 100 г сульфата марганца. Смесь растирают в ступке или смешивают в мельнице для измельчения сухих кормов. Цинковую пыль перед приготовлением восстановителя необходимо очистить. Для очистки 15 г пыли обрабатывают 50 мл 6% $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ при температуре 30°C в течение часа, затем промывают 15 мин теплой (40–50°C) смесью 2 мл NH_4OH (пл. 0,91) и раствора 3 г NH_4Cl в 50 мл воды. Затем промывают дистиллированной водой и сушат при комнатной температуре. Очищенная цинковая пыль устойчива при хранении.

Оборудование. Фотоэлектроколориметр, центрифуга, водяная баня.

Ход определения. Берут 1 г сухого измельченного корма (если корм сырой, навеску увеличивают в 5–10 раз) в стакан или колбу объемом 100 мл, заливают 40 мл дистиллированной воды и экстрагируют в течение 20 мин в водяной бане при температуре 80°C. Затем белки в экстракте осаждают путем добавления 5 мл 0,3 н NaOH и 5 мл ZnSO_4 и центрифугируют при 1200 г в течение 15 мин.

В содержимом рубца жвачных белки осаждают по следующей прописи: 3 мл содержимого разбавляют 12 мл воды и добавляют 3 мл 0,3 н NaOH и 3 мл 5% ZnSO₄.

Непременным условием хорошего осаждения белков является тщательное перемешивание смеси и отстаивание перед центрифугированием 20–25 мин. Если есть опасение, что центрифугат будет окрашен (зеленый корм), в пробирки добавляют по 100–200 мг активированного угля марки ОУ-Б и смесь фильтруют через бумажный фильтр.

Кровь осаждают от белков теми же осадителями по прописи: 2 мл крови гемолизируют 8 мл дистиллированной воды и добавляют 4 мл 0,3 н NaOH и 4 мл 5% ZnSO₄. Количество крови можно брать больше при соблюдении пропорции воды и осадителя.

В пробирку вносят 7 мл анализируемого безбелкового прозрачного центрифугата, приливают 2 мл 12%-ной уксусной кислоты и 200 мг восстановителя. Пробирки встряхивают в течение 30 секунд. Затем в пробирки приливают по 1 мл реактива Грисса, перемешивают содержимое и через 15 мин колориметрируют при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, против контроля, в который вливают все реактивы, а вместо фугата – дистиллированную воду. Наиболее точные измерения оптической плотности лежат в интервале 0,3–0,6. Поэтому, если растворы окажутся сильно окрашенными, следует брать меньшее количество центрифугата и учитывать это при расчете.

Расчет проводят по калибровочному графику, построенному по результатам колориметрирования разведений стандартного 20 мг% раствора, содержащего от 0,01 до 0,12 мг NO₃⁻.

Лучше расчет проводить при помощи стандарта, оптическую плотность которого определяют при каждом анализе. Для этого в пробирку вливают 0,3 мл 20 мг% (0,06 мг NO₃⁻) раствора KNO₃ и 6,7 мл воды, 2 мл 12%-ной уксусной кислоты, 200 мг восстановителя и 1 мл реактива Грисса. В этом случае используют для расчета следующие формулы (1):

$$X = D_1 \times C \times V \times 100 / D_2 \times V_1 \times P \quad (1)$$

где X – содержание нитритов NO₃⁻ в мг%; D₁ – оптическая плотность образца; D₂ – оптическая плотность стандарта; C – количество NO₃⁻, мг в стандарте; V – общий объем центрифугата; V₁ – объем центрифугата, взятый для анализа; P – навеска корма или объем крови и содержимого, взятых для анализа.

Если в пробах кроме нитрата есть и нитрит, то в этих случаях оптическая плотность образца складывается из оптической плотности нитрита и нитрата. Но это не простая сумма, так как в одной и той же концентрации с нитратом нитрит имеет оптическую плотность в 2 раза выше. Поэтому формула для расчета нитрата в смеси с нитритом будет следующей:

$$X = (D_1 - D_3) \times C \times V \times 100 / D_2 \times V_1 \times P \quad (2)$$

где D₃ – оптическая плотность образца при определении нитритов.

Определение нитритов производят таким же образом, только в пробирки не вносят восстановитель.

При одновременном определении нитратов и нитритов объем центрифугатов, взятых для анализа, должен быть одинаков.

Расчет количества нитритов можно проводить по калибровочному графику, построенному по результатам колориметрирования разведения 1 мг% рабочего раствора NaNO₂. Основной стандартный раствор готовят путем растворения 0,15 г высушенного при температуре 80°C NaNO₂ в 1 л дистиллированной воды. Раствор хранят в холодильнике 1 месяц. 1 мл такого раствора содержит 0,1 мг NO₂⁻. Рабочий стандартный раствор готовят разведением основного раствора 1:10. 1 мл такого раствора содержит 0,01 мг NO₂⁻. Для стандарта при каждом проведении

анализов берут, например, 0,5 мл рабочего раствора в пробирку, приливают 2 мл 12%-ной уксусной кислоты, 6,5 мл воды и 1 мл реактива Грисса. Колориметрируют при длине волны 540 нм через 15 мин после смешивания.

Содержание нитритов находят по формуле 1:

$$X = D_1 \times C \times V \times 100 / D_2 \times V_1 \times P,$$

где X – количество NO_2^- , мг%; D_1 – оптическая плотность образца; D_2 – оптическая плотность стандарта; C – содержание NO_2^- в стандарте, мг%; V – объем центрифугата; V_1 – объем центрифугата, взятого для анализа; P – навеска корма или объем крови, содержащего, взятых для анализа.

При пересчете количества ионов нитратов и нитритов на содержание азота этих соединений, перемножают полученное количество нитратов на 0,229, а нитритов – на 0,292. Эти величины соответствуют содержанию азота в ионе нитрата и нитрита.

10. Определение метгемоглобина в крови

Принцип метода. Метгемоглобин в кислом растворе дает характерную полосу поглощения света при длине волны 630 нм. Под действием цианида метгемоглобин превращается в цианметгемоглобин, который не имеет максимума поглощения в этой области спектра. Поэтому уменьшение оптической плотности, наступающее после обработки гемолизата крови цианидами, пропорционально количеству метгемоглобина в растворе.

Реактивы. 1. 0,1М фосфатный буфер pH 6,8: 34,6 г KH_2PO_4 и 45,25 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ растворяют в мерной колбе емкостью 250 мл, нагревают на водяной бане до 60°C. Охлажденный раствор доводят до метки. Перед применением основной раствор разводят в 20 раз, при этом получается 0,1М раствор фосфатного буфера; 2. 5%-ный раствор ферроцианида калия $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ в 0,25%-ном растворе соды; 3. 5%-ный раствор KCN или NaCN; 4. 0,9%-ный раствор NaCl (физиологический раствор).

Оборудование. Спектрофотометр, центрифуга.

Ход определения. В центрифужную пробирку заливают 10 мл раствора, добавляют 0,2–0,3 мл крови и центрифугируют. Осажденные эритроциты гемолизируют 6 мл дистиллированной воды в течение 30–60 мин. После этого добавляют 4 мл 0,1М фосфатного буфера pH 6,8. Гемолизат центрифугируют при 1200g 30 мин. Прозрачный гемолизат разливают в две кюветы с толщиной слоя 1 см.

В одну кювету добавляют каплю 5%-ного раствора $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ и размешивают. Получают две пробы: №1 – первичный гемолизат, №2 – гемолизат с ферроцианидом калия. В дальнейшем содержимое каждой кюветы фотометрируют 2 раза: до и после прибавления в нее цианида. Спектрофотометрируют при длине волны 630 нм против контроля с дистиллированной водой. Результат анализа пробы №1 обозначается Э_1 , пробы №2 – Э_3 . После измерения оптической плотности этих проб к ним добавляют по капле 5%-ного раствора цианида, хорошо размешивают и затем снова фотометрируют относительно дистиллированной воды. Полученные экстинкции обозначают Э_2 и Э_4 соответственно.

Расчет. Содержание метгемоглобина в крови в процентах от общего гемоглобина рассчитывают по формуле:

$$\text{H}\% = 100 \times (\text{Э}_1 - \text{Э}_2) / (\text{Э}_3 - \text{Э}_4)$$

Если известна концентрация гемоглобина крови в граммпроцентах, то можно вычислить и абсолютное содержание метгемоглобина в данной пробе в г%. Во избежание ошибок определение метгемоглобина должно быть выполнено непосредственно после взятия крови.

11. Определение свободного и общего триптофана в крови и плазме

Принцип метода. Метод основан на реакции взаимодействия двух молекул триптофана с одной молекулой глиоксиловой кислоты с образованием соединения красно-фиолетового цвета. Достоинством метода является относительная простота проведения анализа и хорошая воспроизводимость данных (ошибка метода 8–10%) (13).

Определение свободного триптофана

Реактивы. 1. 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ); 2. Концентрированная H_2SO_4 ; 3. Железо-глиоксиловый реактив: 50 мг глиоксиловой кислоты, 5 мг хлорного железа ($FeCl_3$) растворяют в 100 мл ледяной уксусной кислоты. Реактив стоек и хранится в темной посуде с притертой пробкой.

Оборудование. Центрифуга, колориметр, сушильный шкаф, водяная баня.

Ход определения. Предварительно проводят осаждение белков в плазме или цельной крови 10%-ным раствором ТХУ в соотношении 1:1. Центрифугируют в течение 10–15 мин при 1200 г. Затем 0,5 мл надосадочной жидкости переносят в термостойкие пробирки с притертыми пробками, содержащими 1,5 мл железо-глиоксилового реактива и 0,75 мл концентрированной H_2SO_4 , тщательно перемешивают и помещают пробирки на 5 мин в кипящую водяную баню. После охлаждения под струей водопроводной воды колориметрируют при длине волны 540 нм против холостой пробы в кювете с толщиной слоя 0,5 см. Холостую пробу подготавливают так же, как и опытную, но вместо центрифугата добавляют 0,5 мл дистиллированной воды.

Расчеты концентрации свободного триптофана проводят по калибровочному графику. Исходный стандартный раствор триптофана должен содержать 20 мг% аминокислоты, из которого готовят серию рабочих растворов с понижающейся концентрацией триптофана. Реакции с триптофаном для стандартной кривой проводят согласно описанной последовательности.

Определение общего триптофана.

Реактивы. 1. 4 н раствор $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$; 2. 48% раствор H_2SO_4 .

Ход определения. Образцы корма, органов и тканей высушивают ($t^\circ = 105^\circ C$ 4 часа), обезжиривают и измельчают. Навеску образца (200 мг) помещают в термостойкие флаконы со шлифами и прибавляют 10 мл 4 н $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$. Флаконы наполняют азотом или аргоном в течение 2–3 мин для удаления атмосферного кислорода (14), закрывают шлифами, смазанными вазелином, и ставят в сушильный шкаф на 16 часов при $105^\circ C$. После гидролиза и охлаждения содержимое разбавляют теплой дистиллированной водой (10–15 мл) и переносят количественно в центрифужные стаканы, для чего флаконы ополаскивают дважды 5–10 мл дистиллированной воды. Затем в центрифужные стаканы добавляют 4,1 мл 48% H_2SO_4 , хорошо перемешивают и центрифугируют в течение 15 мин при 1200g. Надосадок сливают через фильтр (стекловату) в мерную колбу емкостью 200 мл. Осадок промывают дважды дистиллированной водой, центрифугируют и сливают в ту же колбу. Полученный раствор доводят водой до метки. Для анализа берут отсюда 0,5 мл и определяют далее общий триптофан так же, как и свободный.

Расчеты содержания связанного триптофана производят аналогично описанному для свободной формы с учетом разбавления исходной навески и взятой для анализа доли, то есть 0,5 мл.

12. Определение серусодержащих аминокислот в кормах

Принцип метода. Метод основан на окислении серусодержащих аминокислот (метионина и цистина) надмуравьиной кислотой с образованием метионинсульфона и цистеиновой кислоты (15).

Реактивы. 1. Муравьиная кислота 88%(концентрированная); 2. Перекись водорода; 3. 6 н раствор соляной кислоты (HCl); 4. Набор аминокислот; 5. 40%-ный раствор брома; 6. Цитратный буфер: 31,37 г натрия лимоннокислого, 26,6 мл концентрированной соляной кислоты, 32 мл тиодигликоля, 0,16 мл каприловой кислоты растворить в 1600 мл дистиллированной воды.

Оборудование. Аминокислотный анализатор, роторный испаритель, водяная баня.

Ход определения. Навеску образца кормов (200 мг) помещают в колбу или ампулу, добавляют 5 мл свежеприготовленной надмуравьиной кислоты, для чего к 9 мл муравьиной кислоты добавляют 1 мл перекиси водорода. Смесь оставляют на 1–2 часа при комнатной температуре в закрытой посуде и проводят окисляцию в холодильнике в течение 4–6 ч. После окисляции удаляют избыток кислоты, для чего к образцу приливают 0,3 мл 40% раствора брома. Свободный бром удаляют путем выпаривания на роторном испарителе до сухого остатка. Затем сухой остаток корма переносят в ампулу, добавляют 20 мл 6 н HCl и помещают в автоклав на 6 часов при 2,0–2,5 атм и температуре 120–130°C. После гидролиза содержимое ампул фильтруют через бумажный фильтр и упаривают до сухого остатка на водяной бане в вытяжном шкафу. Сухой остаток растворяют в 5 мл цитратного буфера (pH 2,2). Для анализа на аминокислотном анализаторе берут 0,1 мл образца.

Для идентификации пиков метионинсульфона и цистеиновой кислоты на хроматограмме в стандартную смесь аминокислот вводят эти соединения.

13. Определение 3-метилгистидина в моче животных

Принцип метода. Метод определения 3-метилгистидина основывается на использовании ионообменной хроматографии и выполняется с применением автоматического аминокислотного анализатора. Метод позволяет с высокой точностью и достоверностью определять концентрацию 3-метилгистидина в моче животных.

Реактивы. 1. Дозировочный буферный раствор pH 2,2: 9,5 г цитрата лития, 8,5 г концентрированной соляной кислоты, дистиллированная вода до 1 л; 2. Элюирующие буферные растворы:

Характеристики растворов	Номера растворов				
	I	II	III	IV	V
Нормальность Li – иона	0,18	0,20	0,35	0,33	1,20
Молярность цитратных ионов	0,053	0,06	0,07	0,10	0,22
pH	2,90	3,10	3,35	4,05	4,90
Состав растворов (в граммах)					
Лимонная кислота	9,40	9,70	10,50	9,50	8,50
Цитрат лития	2,31	3,90	5,65	15,45	50,63
Хлорид лития	9,39	9,57	17,51	10,00	39,94

Дистиллированная вода до 1 л; 3. Регенерирующий раствор – 0,3 н LiOH (12,59 г LiOH, дистиллированная вода до 1 л); 4. Стандартный раствор 3-метилгистидина 0,0423 мг/мл (0,25 мкмоль) – стандарт аминокислот №2 из комплекта реактивов для аминокислотного анализатора, разведенный дозировочным буфером pH 2,2 в соотношении 1:9; 5. Концентрированная соляная кислота (чда).

Оборудование. Автоматический аминокислотный анализатор типа ААА Т-339м, сблокированный с интегратором типа CI-100; центрифуга, сушильный шкаф до 120°C; водяная баня; стеклянные ампулы для гидролиза.

Подготовка проб. Белки осаждают 3%-ным раствором сульфосалициловой кислоты в соотношении 1:1. Для анализа достаточно 25–35 мл мочи. После добавления к моче сульфосалициловой кислоты пробы выдерживают 24 ч при +3–+5°C, затем центрифугируют 15 мин при 1200 g. Надосадочную жидкость упаривают досуха в выпарительных чашках на водяной бане. Сухой остаток из чашки смывают дозировочным буфером pH 2,2 в мерную пробирку объемом 10 мл, после чего через бумажный фильтр переносят в пенициллиновый флакон и закрывают пробкой. При необходимости подготовленные пробы хранят в холодильнике.

Ход определения. Автоматический аминокислотный анализатор подготавливают к работе в соответствии с инструкцией к прибору. Аналитическая колонка 3x230 мм заполняется ионообменной смолой, подготовленной для работы на литиевых буферных растворах. Устанавливают скорость истечения буферных растворов 15 мл/час, нингидринового реактива –10 мл/час. В проток буферных растворов до аналитической колонки обязательно устанавливают предколонку, заполненную ионообменной смолой OSTION LG № 0804. На термостате устанавливают температуру $T_1 = 38^\circ\text{C}$ и $T_2 = 62^\circ\text{C}$. Рабочая программа для анализатора устанавливается приблизительно такая: начальные условия – 1 буферный раствор pH 2,9; T_1 .

Минуты	Включение функций
1	Ввод пробы
13	II буферный раствор; pH 3,1
50	III буферный раствор; pH 3,35
75	T_2
94	IV буферный раствор; pH 4,05
115	V буферный раствор; pH 4,9
190	Регенерация 0,3 н NaOH, охлаждение до T_1
200	I буферный раствор, pH 2,9
245	Включение следующего цикла

Примечание: Время включения функций и значение T_1 и T_2 корректируется в процессе подготовки прибора к работе на стандартных смесях аминокислот.

Подготовленные для анализа пробы набираются в петли резервуаров дозатора и анализатор включается в рабочий режим. По завершении анализов ленты самописца и интегратора снимаются и идентифицируется пик 3-метилгистидина. Он должен выходить приблизительно на 160-й минуте между пиками 1-метилгистидина и аргинина, впрочем, в образцах мочи возможно появление вблизи пика 3-метилгистидина дополнительных небольших неидентифицированных пиков, но при тщательном соблюдении условий анализа эти пики не мешают ни идентификации, ни количественной оценке 3-метилгистидина.

Расчет концентрации 3-метилгистидина в моче производят по формуле:

$$X = 0,0423 \times S_{\text{пр}} \times 10/S_{\text{ст}} \times q_{\text{пр}},$$

где X – концентрация 3-метилгистидина, мг/мл; 0,0423 – концентрация 3-метилгистидина в стандартном растворе (0,25 мкмоль/мл), выраженная в мг/мл; $S_{\text{ст}}$ – площадь пика 3-метилгистидина на аминокрамме стандартного раствора, выраженная в условных единицах площади на ленте интегратора; $S_{\text{пр}}$ – площадь пика 3-метилгистидина на аминокрамме пробы; 10 – объем пробы (мл), подготовленной для анализа (разведение); $q_{\text{пр}}$ – объем мочи, взятый для анализа (мл).

Для определения суточной экскреции 3-метилгистидина в формулу добавляют величину суточного выделения мочи ($Q_{\text{сут}}$), выраженную в мл, и она приобретает следующий вид:

$$X = 0,0423 \times S_{\text{пр}} \times 10 \times Q_{\text{ст}}(\text{мг}) / S_{\text{ст}} \times q_{\text{пр}}$$

14. Определение аллантаина в моче

Принцип метода. Метод основан на реакции Римини-Шривера, примененный к глиоксиловой кислоте. Аллантаин превращается в аллантаиновую кислоту, при гидролизе которой образуется мочевины и глиоксиловая кислота. Окраска развивается за счет окисления последней железосинеродистым калием. Имеется несколько модификаций метода, здесь приводится методика, усовершенствованная Young G., Copway C.F. (16). Наибольшие изменения нами внесены относительно объемов растворов и охлаждения их жидким азотом вместо водно-солевой смеси.

Реактивы. 1. 0,5 н раствор гидрата окиси натрия (NaOH); 2. 0,5 н раствор соляной кислоты; 3. 0,33%-ный раствор фенилгидразина гидрохлорида, используют свежеприготовленный; 4. Концентрированная соляная кислота; 5. 1,67%-ный свежеприготовленный раствор железосинеродистого калия $K_3[Fe(CN)_6]$; 6. 1 мг% раствор аллантаина, приготовленный в день проведения анализа (до 3 месяцев хранится в холодильнике раствор аллантаината калия в 0,01 н растворе гидрата окиси натрия, но берется его в 1,36 раз больше аллантаина).

Оборудование. Колориметр, водяная баня.

Ход определения. Разбавляют мочу в 100 раз и вносят в пробирку (на 20 мл) 1,5 мл разбавленной мочи, добавляют 0,5 мл 0,5 н раствора гидрата окиси натрия, перемешивают и нагревают 7 мин в кипящей водяной бане, после чего пробирки с содержимым охлаждают в струе водопроводной воды. Добавляют 0,5 мл 0,5 н соляной кислоты и затем еще 2 капли. Вносят 0,5 мл 0,33%-ного раствора фенилгидразина гидрохлорида, прогревают в кипящей водяной бане 2 мин, затем погружают в жидкий азот до начала замораживания (около 3 мин), добавляют 1,5 мл концентрированной соляной кислоты и опять охлаждают в жидком азоте. Вносят 0,5 мл 1,67%-ного раствора железосинеродистого калия и оставляют на 30 мин. После этого добавляют 5,0 мл воды. После добавления каждого реагента растворы перемешивают. Оптическую плотность раствора красной окраски измеряют на фотоколориметре с зеленым светофильтром ($\text{№}6$) в кювете толщиной 10 мм. Слепая проба – с водой вместо мочи.

Расчеты. Калибровочный график строят по оптической плотности ряды растворов, приготовленных разведением стандарта. Оптическая плотность стандартного раствора (1 мг% раствора аллантаина) приблизительно равна 0,60. Погрешность определения по этой методике $\pm 5\%$. В некоторых случаях отдельные пробы мочи после цветной реакции дают иные оттенки окраски, к тому же окраска неустойчива во времени. Поэтому при анализе каждой партии образцов целесообразно определять ОП стандартного раствора. Незначительную хромогенность проявляют также компоненты мочи, такие как аллоксан, аллоксантин, глицин, молочная и мочевины кислоты.

Концентрацию аллантаина в образцах определяют по формуле:

$$C_{\text{об}}(\text{мг}\%) = O_{\text{Поб}} \times C_{\text{ст}}(\text{мг}\%) / O_{\text{Пст}} \times R_{\text{об}},$$

где $C_{\text{об}}$ и $C_{\text{ст}}$ – концентрация аллантаина в исследуемых образцах и стандарте соответственно; $O_{\text{Поб}}$ и $O_{\text{Пст}}$ – оптическая плотность образцов и стандарта; $R_{\text{об}}$ – кратность разбавления образца.

15. Определение креатинина в моче

Принцип метода. Колориметрический метод определения креатинина в моче основан на реакции Яффе, заключающейся в образовании оранжево окрашенного соединения при взаимодействии креатинина с

щелочным пикратом. Имеется ряд модификаций метода, ниже приводится методика в прописи Лемперта М.Д. (17), в которую в течение многолетнего ее применения нами внесены некоторые изменения, позволившие сделать ее более удобной и хорошо воспроизводимой.

Реактивы. 1. 0,5%-раствор пикриновой кислоты (хранится длительное время без изменений); 2. 4,0%-ный раствор гидрата окиси натрия (NaOH), в закрытой полиэтиленовой посуде хранится долго; 3. 2 мг% раствор креатинина (стандарт); хранится в холодильнике до 1–2 месяцев.

Оборудование. Колориметр.

Ход определения. Мочу разбавляют водой в 50 или 100 раз, вносят в пробирку (на 20 мл) 1,0 мл разбавленной мочи (2–3 параллельные пробы). Добавляют 0,5 мл 0,5%-ного раствора пикриновой кислоты, перемешивают и вносят 0,5 мл 4,0%-ного раствора гидрата окиси натрия и 3,0 мл воды. После добавления каждого реагента содержимое пробирок перемешивают. Через 15 мин измеряют оптическую плотность (ОП) оранжево окрашенного раствора на фотоколориметре с синим светофильтром в кювете толщиной 10 мм. Слепая проба – с водой вместо мочи.

Расчеты. Калибровочный график строят по оптической плотности ряда растворов креатинина, приготовленных разведением стандарта. Оптическая плотность стандартного раствора креатинина (2 мг%) составляет приблизительно 0,36. Окраска устойчива во времени. Поскольку эта величина лежит в зоне прямой пропорциональной зависимости ОП от концентрации, то при анализе каждой партии образцов нет нужды строить калибровочную кривую, но целесообразно определять ОП стандартного раствора. Если ОП стандарта значительно меньше 0,36, то это указывает на необходимость повторения анализа для исключения возможных погрешностей.

Концентрацию креатинина в образцах вычисляют по формуле:

$$\text{Соб(мг\%)} = \text{ОПоб} \times (\text{Сст(мг\%)} / \text{ОПст}) \times \text{Роб},$$

где Соб и Сст – концентрация креатинина в исследуемых образцах и стандарте соответственно; ОПоб и ОПст – оптическая плотность образцов и стандарта; Роб – кратность разбавления образца.

Концентрация креатинина в моче крупного рогатого скота колеблется в пределах от 50 до 275 мг%.

16. Определение активности кислых тканевых протеиназ

Принцип метода. В основу определения активности протеиназ положен метод Ансона (18) в модификации Пресс и Портера (19), основанный на спектрофотометрическом измерении аминокислот, образующихся в процессе протеолиза.

Реактивы. 1. 1,2% раствор кислотно-денатурированного гемоглобина: 1,2 г гемоглобина, растворенного в 0,16М растворе лимонной кислоты (3,361 г лимонной кислоты в 100 мл воды), инкубируют в течение 1 часа в водяной бане при 30°C, затем добавляют 0,01М цистеингидрохлорид (0,078 г на 100 мл); 2. Цитратфосфатный буфер pH 3,5: 0,1М раствор лимонной кислоты (21,008 г $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ на 1 л воды) и 0,2М раствор фосфата натрия (35,628 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ на 1 л воды). К раствору лимонной кислоты приливают раствор фосфата до достижения pH 3,5; 3. 10%-ный раствор ТХУ.

Оборудование. Спектрофотометр, водяная баня.

Ход определения. Гомогенат тканей (источник фермента) готовят на охлажденном цитратфосфатном буфере в соотношении 1:5 (1 г ткани и 4 мл буфера) на льду в стеклянном гомогенизаторе. Для каждого анализируемого образца в 3 пробирки (параллельные пробы) вносят по 2 мл гомогената и по 2 мл раствора гемоглобина, предварительно прогретого в водяной бане при 30°C в течение 5 мин, и инкубируют при тех же условиях в течение 30 мин. Реакцию останавливают добавлением в инку-

бационную смесь 6 мл 10%-ного раствора ТХУ. Пробы тщательно встряхивают и через 10 мин фильтруют через бумажный фильтр. Фильтрат спектрофотометрируют при длине волны 280 нм против контрольной пробы. В контрольную пробу, отдельную для каждого образца, сразу же после добавления гемоглобина в пробирки с гомогенатом добавляют 6 мл 10%-ного раствора ТХУ.

Расчеты. За единицу протеолитической активности принимают величину экстинкции, которая соответствует увеличению поглощения фильтратом на 1,0 ед. по отношению к контролю. Расчет ведется на 1 г сырой ткани или 1 мг белка.

17. Определение общей протеиназной активности в химусе и слизистой кишечника

Принцип метода. Определение протеиназной активности, основанное на анализе прироста тирозина в неосаждаемых ТХУ-фракциях, позволяет получить только относительную информацию об интенсивности протеолиза. Более точно протеиназная активность определяется по приросту свободных α -аминогрупп, освобождающихся при гидролизе пептидных связей белковых субстратов.

Принцип описываемой методики определения общей протеиназной активности состоит в том, что при pH 5,0 и выше α -аминокислоты и α -аминогруппы пептидов реагируют с нингидрином с образованием окрашенного в синий цвет соединения с максимальным поглощением при 597 нм. Интенсивность окраски пропорциональна количеству α -аминогрупп (20).

Реактивы. 1. Фосфатный буфер pH 7,1; 1/15M K_2HPO_4 (9,078 г в 1000 мл дистиллированной воды) смешивают в соотношении 66,6 мл второго и 33,4 мл первого растворов; 2. Цитратный буфер pH 5,4: 0,1M раствор лимонной кислоты (21,01 г в 1000 мл дистиллированной воды) и 0,1M раствор лимоннокислого натрия ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (29,41 г в 1000 мл дистиллированной воды): смешать 32 мл первого и 68 мл второго растворов; 3. 0,5%-ный раствор углекислого натрия; 4. 10%-ный раствор ТХУ; 5. 0,01 н раствор соляной кислоты; 6. 2%-ный раствор казеина (готовят на 0,5%-ном растворе Na_2CO_3). Навеску казеина по Гаммерстону в количестве 2 г переносят в химический стакан, заливают 30 мл 0,5% раствора Na_2CO_3 и ставят в водяную баню при 70°C. По мере растворения казеина добавляют до половины объема 0,5%-ный раствор соды, остальной объем доводят 0,01 н HCl. Соотношение соды и кислоты составляет 1:1; 7. 60%-ный раствор глицерина; 8. 1% раствор нингидрина: растворяют 1 г нингидрина в цитратном буфере с подогреванием; препараты нингидрина темного цвета подлежат очистке; 9. Из растворов 2, 7 и 8 готовят раствор С в следующих соотношениях: 240 мл 60% глицерина, 100 мл 1% нингидрина и 40 мл цитратного буфера. Смесь нестабильна и ее готовят перед употреблением.

Оборудование. Колориметр, водяная баня.

Ход определения. Для определения протеиназной активности в пробирку высотой 18 см и диаметром 2 см вносят 4 мл раствора казеина, 1 мл фосфатного буфера и помещают в водяную баню при 30°C. Через 10 мин добавляют в пробирку 1 мл источника фермента (химус или гомогенат слизистой кишечника), который предварительно разводят холодной дистиллированной водой в отношении 1:20, перемешивают и инкубируют 60 мин при 30°C. Через 60 мин добавляют в пробирку 4 мл 10%-ной ТХУ, содержимое пробирок хорошо встряхивают, выдерживают в течение 10 мин для полного осаждения белков, центрифугируют 10–20 мин при 3000 г или фильтруют через бумажный фильтр в сухие пробирки. Фильтрат должен быть совершенно прозрачен. Берут 0,2 мл фильтрата или надосадочной жидкости, добавляют 3,8 мл раствора С, пробирки закрывают стеклянными пробками (во избежание испарения) и ставят в

кипящую водяную баню на 20 мин. После кипячения пробы, окрашенные в синий цвет образцы охлаждают водопроводной водой и определяют интенсивность окраски через 10–20 мин. Контроль готовят, прибавляя реагенты в обратном порядке: к 1 мл ферментного раствора того же разведения как и в опыте вносят 1 мл фосфатного буфера, добавляют 4 мл ТХУ, выдерживают 10 мин в водяной бане при температуре 30°C, затем вносят 4 мл раствора субстрата (казеина), перемешивают и фильтруют. Остальные процедуры выполняют аналогично опытной пробе.

Расчеты. Анализ проб ведут на электрофотокolorиметре с красным светофильтром. Интенсивность окраски устойчива в течение часа. Прирост свободного аминного азота устанавливают по калибровочному графику, для чего берут стандартный раствор тирозина или глицина и готовят ряд растворов, содержащих разное количество (мкмоль), и далее реакцию проводят, как описано выше. Активность фермента выражают в микромолях аминного азота за 1 минуту на 1 г источника фермента, что соответствует 1 Е.

Изложенная методика позволяет определить активность нейтральных протеиназ. Сравнительные анализы изменения активности в пределах рН от 6,0 до 8,0 показали, что при идентичных условиях анализа максимальная активность обнаруживается при рН 7,1.

18. Определение активности аспартат- и аланин-аминотрансфераз по методу Райтман и Френкель (21)

Принцип метода. Метод основан на разнице поглощения света динитрофенилгидразонами α -кетоглутаровой, щавелевоуксусной и пировиноградной кислот при определении их на фотокolorиметре, при длине волны 508–540 нм. Под воздействием аспартатаминотрансферазы NH_3 -группа аспарагиновой кислоты присоединяется к α -кетоглутаровой кислоте с высвобождением щавелевоуксусной, которая в свою очередь превращается в пировиноградную. Аланинаминотрансфераза катализирует перенос NH_3 -группы аланина на α -кетоглутаровую кислоту с высвобождением пировиноградной кислоты. При взаимодействии кетокислот с 2,4-динитрофенилгидразином образуются динитрофенилгидразоны. Оптическая плотность смеси гидразонов возрастает пропорционально увеличению концентрации пировиноградной кислоты, что является результатом деятельности аспартат- и аланинаминотрансфераз и отражает их активность.

Реактивы. 1. 0,1М фосфатный буфер рН 7,4: смешивают 840 мл 0,1М раствора Na_2HPO_4 (17,81 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ в 1 л дистиллированной воды) и 160 мл 0,1М раствора KH_2PO_4 (13,61 г в 1 л). На 1 л буферного раствора добавляют 609 мг MgCl_2 ; 2. Субстратная смесь для аспартатаминотрансферазы готовится в день определения активности фермента. Для приготовления 50 мл субстратной смеси взвешивают 650 мг I-аспарагиновой кислоты, 20 мг α -кетоглутаровой кислоты, 740 мг $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 110 мг KH_2PO_4 , добавляют 5,2 мл 1 н NaOH. Всю смесь хорошо растирают пестиком в фарфоровой ступке, переносят количественно дистиллированной водой в мерную колбу и доводят рН до 7,4 1 н NaOH; 3. Субстратная смесь для аланинаминотрансферазы – на 50 мл смеси взвешивают 445 мг I-аланина, 20 мг α -кетоглутаровой кислоты, 740 мг $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 110 мг KH_2PO_4 ; вносят 0,7–0,5 мл 1 н NaOH, растворяют в ступке, содержимое переносят в мерную колбу и доводят рН до 7,4; 4. Раствор 2,4-динитрофенилгидразина – готовят в день проведения анализа. 100 мг 2,4-динитрофенилгидразина переносят в 100 мл мерную колбу, добавляют 20 мл концентрированной HCl, растворяют в кипящей водяной бане в течение 1–2 мин. После охлаждения доводят до метки дистиллированной водой; 5. 0,4 н NaOH (16 г NaOH на 1 л); 6. Стандартный раствор пирувата натрия – 44 мг пирувата натрия растворяют в 20 мл дистиллированной воды.

Оборудование. Центрифуга, колориметр, водяная баня.

Ход определения. 1 г свежеполученной или замороженной ткани (печени, мышц, стенки кишечника) гомогенизируют с 9 мл 0,1М фосфатного буфера (рН 7,4) стеклянным гомогенизатором на холоду. Полученный гомогенат замораживают, а затем после оттаивания центрифугируют при 16000 об/мин в течение 10 мин в рефрижераторной центрифуге. Для определения аспаратаминотрансферазы гомогенат (надосадочную жидкость) разбавляют фосфатным буфером рН 7,4 (1:200 печень, 1:100 мышцу и стенку кишечника). В реакционную пробирку вносят 1 мл соответствующей субстратной смеси и помещают в водяную баню при температуре 38°C на 10 мин, после чего добавляют 0,2 мл гомогената и продолжают инкубацию еще 30 мин – для аланинаминотрансферазы и 60 мин – для аспаратаминотрансферазы. Реакцию останавливают добавлением 1 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина. Для каждой опытной пробы готовят контрольную. В пробирке смешивают 1 мл субстрата и 0,2 мл гомогената, быстро добавляя 1 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина. Все пробы оставляют на 20 мин при комнатной температуре. Затем в каждую пробирку приливают по 10 мл 0,4 н NaOH и тщательно перемешивают. Через 30 мин фотометрируют против контрольной пробы при 540 нм.

Расчеты. Активность фермента выражают в микромолях пирувата натрия, образовавшегося за 1 мин на 1 г сырой ткани или 1 мг белка. Для этого строят калибровочную кривую. Для удобства при построении калибровочной кривой можно пользоваться следующей схемой:

№№ проб	Стандартный раствор пирувата натрия, мл	Содержание пирувата натрия в пробе, мкг	Субстрат, мл	Дистиллированная вода, мл
1	0,01	4,4	1	0,19
2	0,02	9,8	1	0,18
3	0,04	17,6	1	0,16
4	0,06	26,4	1	0,14
5	0,08	35,2	1	0,12
6	0,10	44,0	1	0,10
7	0,12	52,8	1	0,08
8	0,14	61,6	1	0,06
9	0,16	70,4	1	0,04
10	0,18	79,2	1	0,02
11	0,20	88,0	1	0,00

19. Определение активности глутаминсинтетазы в печени

Принцип метода. Активность глутаминсинтетазы (L-глутамат-аммиак-лигаза, КФ 6.3.1.2) определяют методом, описанным Г.П.Труш (22). В основу метода положена способность глутаминсинтетазы катализировать реакцию образования глутамина, в которой аммиак замещается гидроксиламином. В этом случае вместо глутамина образуется L-глутамилгидроксамовая кислота, дающая с хлорным железом устойчивую окраску, которую определяют колориметрически.

Реактивы. 1. 0,05М трис-HCl буфер: 44,2 мл 0,2М HCl смешивают с 50 мл 0,2М три и доводят до 200 мл дистиллированной водой. Для приготовления 0,2М HCl 4,375 мл концентрированной HCl (уд.в. 1,19) растворяют в 250 мл H₂O; для 0,2М триса – 6,05 г трис-основного растворяют в 250 мл H₂O; 2. L-глутаминовая кислота – 2,7587 г растворяют в 25 мл H₂O при слабом подогреве; 3. Гидроксиламин солянокислый – растворяют 868,75 мг в 25 мл H₂O; 4. MgCl₂·6H₂O – 1,27 г в 25 мл H₂O; 5. АТФ – 688,95 мг в 25 мл воды; 6. Цистеин-HCl – 590,625 мг в 25 мл воды; 7. Осаждающий раствор – к 1,05 г ТХУ и 6 г FeCl₃ добавляют 2,5 мл

концентрированной HCl и растворяют в дистиллированной воде (общий объем 110 мл).

Все растворы доводят до pH 7,2 раствором КОН. Растворы АТФ, цистеина, гидроксилamina готовят и нейтрализуют непосредственно перед употреблением.

В качестве исследуемого материала используют гомогенат тканей. Гомогенаты печени в разведении 1:9 готовят на растворе следующего состава: 0,005M NaHCO₃ и 0,15M NaCl (в 1 л бидистиллированной воды растворяют 420 мг NaHCO₃ и 8,775 г NaCl). Реакционная смесь состоит из следующих компонентов: 1,7 мл 0,05M трис-HCl (pH 7,2); 0,2 мл (150 мкмоль) глутаминовой кислоты; 0,2 мл гидроксилamina солянокислого (100 мкмоль); 0,2 мл (30 мкмоль) цистеина солянокислого; 0,1 мл MgCl₂ (25 мкмоль); 0,2 мл АТФ (10 мкмоль); 0,4 мл гомогената.

Оборудование. Центрифуга, спектрофотометр, водяная баня.

Ход определения. В стеклянные центрифужные пробирки заливают все компоненты среды инкубации (за исключением АТФ), добавляют 0,4 мл источника фермента (гомогената печени), перемешивают и помещают в водяную баню при температуре 37°C на 5 мин. После 5-минутной инкубации субстрата с ферментом в систему вводят источник энергии АТФ. В каждую опытную пробирку быстро добавляют 10 мкмоль АТФ, перемешивают и инкубируют еще 15 мин. Реакцию останавливают добавлением в инкубационную среду 2 мл осаждающего раствора. Пробу охлаждают в проточной воде и для развития окраски выдерживают при комнатной температуре в течение 1 час. К каждому гомогенату ставят свой контроль – гомогенат инкубируют со смесью реактивов без АТФ. Через 1 час осадок отделяют центрифугированием в течение 15 мин при 1200 g. Интенсивность окраски в надосадке определяют на спектрофотометре при длине волны 520 нм.

Расчет. Концентрацию глутамилгидроксамовой кислоты рассчитывают по калибровочному графику. Активность фермента выражают в интернациональных единицах – в микромолях глутамилгидроксамовой кислоты, образовавшихся за 1 мин на 1 г сырой ткани.

20. Определение активности аргиназы в тканях (23)

Принцип метода. Активность I-аргинин-амидингидролаза, КФ 3.5.3.1) определяют по приросту мочевины, образующейся в процессе ферментативного гидролиза аргинина.

Реактивы. 1. 0,05M аргинин: 870 мг I-аргинина солянокислого растворяют в 100 мл дистиллированной воды и доводят pH до 9,5 с помощью 0,1 н HCl; 2. 0,0001M MnCl₂: 197,9 мг MnCl₂ растворяют в 1000 мл дистиллированной воды; 3. 0,1M натрий-глициновый буфер pH 9,5: 70 мл раствора А смешивают с 30 мл раствора В. Раствор А: 0,7507 г глицина растворяют в 100 мл дистиллированной воды, 0,280 г NaCl растворяют в таком же количестве воды, оба раствора смешивают. Раствор В: 0,4 г NaOH растворяют в 100 мл воды.

Оборудование. Колориметр, водяная баня.

Ход определения. Гомогенат печени готовят в стеклянном гомогенизаторе на холоду на охлажденной дистиллированной воде в соотношении 1:400, стенки рубца – 1:100. Для каждого анализируемого образца в 3 пробирки (параллельные пробы) вносят по 2 мл 0,1M натрийглицинового буфера, добавляют по 0,2 мл гомогената и по 0,5 мл раствора MnCl₂ (50 мкмоль). После перемешивания пробирки помещают в водяную баню на 30 мин при 37°C. Затем в систему добавляют 0,5 мл раствора аргинина (25 мкмоль) и инкубируют еще 10 мин. Для каждой опытной пробы ставят контроль – пробу без субстрата (аргинина), в которую вместо аргинина добавляют 0,2 мл дистиллированной воды. Реакцию останавливают 1 мл 10%-ного раствора ТХУ. Белковый преципитат отделяют центрифугированием проб при 1200 g в течение 15 мин.

Количество образовавшейся мочевины (продукта действия аргиназы) определяют в надосадке диацетилмоноксимовым методом (см. методику определения мочевины).

Расчет. Активность фермента выражают в микромолях мочевины, образовавшейся за 1 мин на 1 г сырой ткани или 1 мг белка.

21. Определение активности лейцинаминотрансферазы в тканях

Принцип метода. Реакция переаминирования лейцина по схеме лейцин + α -кетоглутаровая кислота \rightarrow кетоизокапроновая кислота + глутаровая кислота катализируется специфическим ферментом лейцинаминотрансферазой (КФ 2.6.1.6). Активность фермента определяют по накоплению α -кетоизокапроновой кислоты, которая образует в щелочной среде с 2,4-динитрофенилгидразином окрашенный в бордовый цвет комплекс (24).

Реактивы. 1. L-лейцин; 2. Альфа-кетоглутаровая кислота; 3. Альфа-кетоизокапроновая кислота; 4. Пиросернокислый натрий ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_7$); 5. Циклогексан; 6. 10%-ный раствор углекислого натрия (Na_2CO_3); 7. 1,0 н раствор гидрата окиси натрия (NaOH); 8. Калий-фосфатный буфер 0,05M pH 7,0: однозамещенный фосфат калия (0,2 M) – 10 мл, калиевая или натриевая щелочь (0,2 M) – 5,82 мл, дистиллированная вода – до 40 мл; 9. Динитрофенилгидразиновый реактив: 600 мг 2,4-динитрофенилгидразина растворяют в 34 мл концентрированной соляной кислоты в мерной колбе емкостью 200 мл и доливают до метки дистиллированной водой. Если выпадает осадок, то следует профильтровать реактив и хранить в темной посуде в холодильнике в течение 2-х недель.

Оборудование. Центрифуга, водяная баня.

Ход определения. Инкубационная смесь содержит 20 мкмоль L-лейцина, 20 мкмоль α -кетоглутаровой кислоты и 100 мкмоль пиросернокислого натрия pH 8,3. Воду добавляют в таком количестве, чтобы конечный объем смеси в пробирке, с учетом гомогената, равнялся 3,0 мл. Хорошо перемешивают, выдерживают 5 мин в водяной бане при температуре 37°C и после этого добавляют 0,5–1,0 мл гомогената, приготовленного в 0,05M калий-фосфатном буфере (1:1) pH 7,0. Смесь инкубируют 10 мин, прибавляют 1,0 мл динитрофенилгидразинового реактива и оставляют пробирки на 10 мин при комнатной температуре (22°C) для образования гидразона α -кетоизокапроновой кислоты, который экстрагируют циклогексаном (5 мл) при интенсивном встряхивании в течение 30 сек. Смесь разделяют на две фазы центрифугированием (1500 об/мин в течение 5–7 мин). Верхнюю фазу в количестве 4,1 мл переносят шприцом в конические центрифужные пробирки, содержащие 1,5 мл 10%-ного раствора Na_2CO_3 . Тщательно встряхивают, центрифугируют в течение 1 мин при 2000 об/мин и отбирают 1,0 мл нижней фазы бордового цвета в пробирки, которые содержат 2,0 мл 1 н раствора NaOH . После перемешивания определяют оптическую плотность на спектрофотометре при 440 нм в течение 5–8 мин.

Расчет. Активность фермента выражают в микромолях α -кетоизокапроновой кислоты на 1 г ткани или мг белка. Контрольную пробу ставят без L-лейцина или α -кетоглутаровой кислоты.

Для построения калибровочного графика из стандартного раствора α -кетоизокапроновой кислоты, содержащего 1,0 мкмоль этого вещества, готовят серию рабочих растворов объемом 3,0 мл с понижающейся концентрацией α -кетоизокапроновой кислоты (1,0; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2; 0). Последовательность операций – согласно описанной методики.

22. Определение активности орнитинкарбамоилтрансферазы

Принцип метода. Предлагаемый метод представляет собой модификацию методов Шимке (25) и Гутоклайн, Кнаппе (26). Принцип метода

заключается в том, что синтезируемый из орнитина и карбамоилфосфата цитруллин при наличии редокс-буфера образует с диацетилмоноксидом розовую окраску с максимумом поглощения при 490 нм. Интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству цитруллина в растворе.

Реактивы. 1. Раствор А (0,05М раствор глицил-глицина): 330 мг глицил-глицина растворяют в бидистиллированной воде в 50 мл мерной колбе, рН доводят до 8,0 концентрированным раствором NaOH; 2. Раствор Б (0,15М раствор l-орнитина): 99 мг l-орнитина растворяют в растворе А в 50 мл мерной колбе; 3. Раствор В (0,02М раствор карбамоилфосфат-дилитиевой соли): 91,5 мг 76%-ного карбамоилфосфата-дилитиевого растворяют в 30 мл раствора Б. Раствор готовят перед употреблением, так как он нестабилен; 4. 0,025М редокс-буфер: 9 г $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ и 12 г $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 100 мл 1 н H_2SO_4 ; 5. Смесь кислот: 200 мл воды + 300 мл H_3PO_4 (уд.в. 1,74) + 100 мл H_2SO_4 (уд.в. 1,84). Лучше использовать серную кислоту для пробы Савалы; 6. Раствор диацетилмоноксима: в 100 мл дистиллированной воды растворяют 0,75 г диацетилмоноксима; 7. 15%-ный раствор хлорной кислоты (HClO_4 , уд.в. 1,51); 8. Стандартный раствор dl-цитруллина: 175,2 мг dl-цитруллина растворяют в 100 мл дистиллированной воды; хранят в течение недели при 4°C.

Оборудование. Центрифуга, колориметр, водяная баня.

Ход определения. Навеску печени 1 г гомогенизируют в 9 мл охлажденной бидистиллированной воды в стеклянном гомогенизаторе на льду. Полученный гомогенат используют в качестве источника фермента для определения активности орнитинкарбамоилтрансферазы. В центрифужную пробирку наливают 1 мл раствора В и помещают в водяную баню. Через 5 мин вносят 0,2 мл гомогената печени, предварительно разведенного бидистиллированной водой 1:300. После 15-минутной инкубации при температуре 37°C реакцию останавливают добавлением 2,5 мл 15%-ного раствора HClO_4 . Затем содержимое пробирки центрифугируют в течение 15 мин при 1200 g. Для определения содержания цитруллина 1 мл надосадка переносят в пробирку с притертой пробкой, добавляют 0,25 мл редокс-буфера, 1,25 мл смеси кислот и 0,5 мл раствора диацетилмоноксима. Содержимое тщательно перемешивают и выдерживают в течение 20 мин в кипящей водяной бане в темноте. Затем охлаждают под струей водопроводной воды в течение 5 мин.

Контрольная проба, содержащая 1 мл раствора В, 2,5 мл 15%-ного раствора HClO_4 и 0,2 мл гомогената, внесенных в пробирку с притертой пробкой, а также все последовательно добавляемые реактивы для определения цитруллина, выдерживаются в кипящей водяной бане и охлаждаются вместе с опытными пробами.

Расчеты. Интенсивность окраски опытной пробы определяют на фотоэлектроколориметре в кювете 1 см при длине волны 490 нм против контрольной пробы. Расчет количества цитруллина ведут по калибровочной кривой. Для построения калибровочного графика из стандартного раствора цитруллина готовят ряд разведений, содержащих от 1 до 15 мкмоль dl-цитруллина в 1 мл раствора. Все операции по выявлению окраски выполняют аналогично контрольной пробе, только вместо 0,2 мл гомогената берут 0,2 мл бидистиллированной воды. Активность орнитинкарбамоилтрансферазы выражают в микромолях цитруллина, образовавшегося за 1 мин на 1 г сырой ткани или 1 мг белка.

23. Препаративное выделение ^{15}N при помощи прибора Сереньева

Принцип метода. Физиолого-биохимические исследования с использованием изотопов, в том числе и стабильного изотопа ^{15}N , требуют получения анализируемых метаболитов в чистом виде. В настоящее время наибольшее распространение получил метод подготовки образ-

цов для измерения концентрации изотопной метки азота, состоящий из двух этапов: 1) получение меченого азота в аммонийной форме с последующей отгонкой аммиака и 2) перевод аммиака в молекулярный азот.

Измерение изотопного состава азота позволяет установить только относительное содержание ^{15}N в исследуемом образце (его атомный процент). Для того, чтобы определить абсолютное количество ^{15}N , вместе с изотопным составом необходимо определить общее количество азота обычным химическим методом и на основании полученных результатов рассчитать содержание ^{15}N в образце.

Обычно отгонка аммиака из минерализованных азотсодержащих веществ производится на дистилляционных аппаратах различной конструкции.

Основными недостатками этих аппаратов являются сравнительно длительный период отгонки пробы и трудность очистки ее от остатков ^{15}N . Эти недостатки в значительной степени устраняются при использовании прибора Сереньева, выпускаемого промышленностью серийно. Аппарат предназначен для определения аммонийного азота в пробах растительного, животного и минерального происхождения. С помощью прибора Сереньева можно выделять ^{15}N азота аммиака, амидного азота глутамина, азота мочевины, азота аминокислот (после препаративной хроматографии), фракций общего, белкового и остаточного азота из проб биологического материала для последующего масс-спектрометрического изотопного анализа. Для выделения азота аммиака, глутамина и мочевины не требуется предварительного озоления пробы, в остальных случаях эта операция необходима. Для получения ^{15}N прибор существенной перестройки не требует, необходимо только барботер отсоединить от сливной магистрали для сбора отогнанной пробы и присоединить "ловушку" с концентрированной H_2SO_4 для поглощения NH_3 воздуха (для этой цели можно использовать склянку Дрекселя). Преимущество прибора Сереньева для препаративного выделения ^{15}N перед применяемыми аппаратами состоит в следующем:

- вакуумный метод отгонки аммиака значительно сокращает время анализа пробы;
- совмещение отгонки и титрования исключает применение титрованного раствора щелочи;
- гидролиз пробы при выделении азота глутамина и мочевины можно проводить непосредственно в реакционном сосуде прибора, наличие реостата позволяет поддерживать температуру в нужных пределах;
- препаративное выделение ^{15}N на этом приборе совмещается с количественным определением азота в пробе;
- прибор хорошо очищается от остатков ^{15}N путем дистилляции водяного пара или этилового спирта, так как состоит из стекла и имеет минимум шланговых соединений.

Реактивы. 1. 0,1; 0,01 н и 5 н серная кислота (в зависимости от количества азота в пробе); 2. Индикатор – смесь метиленового синего и метиленового красного (на 10 л раствора 200 мг метиленового красного и 100 мг метиленового синего); 3. Этиловый спирт; 4. Насыщенный раствор K_2CO_3 ; 5. 5,0 н NaOH ; 6. Фосфатный буфер pH 6,9; 7. 0,5% уреазы.

Оборудование. Прибор Сереньева.

Ход определения. Работа на приборе по выделению ^{15}N и количественному его определению из предварительно минерализованных проб (общий азот, белковый, остаточный, азот аминокислот и т.д.) сводится к следующему: после подготовки прибора к работе, как это описано в инструкции, из бюретки в барботер наливают несколько миллилитров титранта, но заведомо меньше, чем требуется для связывания всего аммиака исследуемой пробы. Затем в воронку реакционного сосуда выливают озоленную пробу из колбы Къельдаля и колбу ополаскивают не-

сколько раз дистиллированной водой. Из сосуда тонкой струйкой добавляют раствор щелочи до перехода окраски реактива Таширо из лилового в зеленый. Воронку закрывают пробкой со шлангом от "ловушки" с концентрированной серной кислотой, краном включают вакуум и увлекаемый потоком воздуха аммиак из реакционного сосуда поступает в барботер, где связывается титрантом. Для связывания всего аммиака анализируемой пробы добавляют из бюретки титрант до перехода окраски раствора в барботере от зеленой до лиловой. Постоянство такой окраски в течение 20–30 сек свидетельствует о том, что отгонка окончена.

По окончании отгонки кран переключают на свободный доступ воздуха, через другой кран пробу из барботера собирают для упаривания и дальнейшего анализа на масс-спектрометре.

Отработанную жидкость из реакционного сосуда сливают. После каждой пробы аппарат промывают путем дистилляции этилового спирта (20–25 мл). Это особенно важно после отгонки ^{15}N с высоким обогащением.

Для определения концентрации и выделения азота аммиака, мочевины и глутамин минерализации проб не требуется. Выделение азота мочевины и глутамин требует предварительной отгонки аммиака. Для этого в биологическом материале (кровь, гомогенат ткани, содержимое желудочно-кишечного тракта и т.д.) осаждают белки методом Сомоджи, Фолина-Ву или др., в зависимости от характера материала. Безбелковый центрифугат (фильтрат) с несколькими каплями индикатора Таширо вносят в реакционный сосуд прибора. Туда же заливают насыщенный раствор K_2CO_3 из расчета 1 часть поташа на 2 части центрифугата. Отгонку аммиака производят так же, как описано выше.

По окончании отгонки содержимое барботера собирают для упаривания и дальнейшего анализа на масс-спектрометре, а содержимое реакционного сосуда собирают, измеряют его количество и делят на две части. Из одной в последующем выделяют азот мочевины, из другой – азот глутамин.

Для определения и выделения азота глутамин 1 часть безаммиачного центрифугата снова вносят в реакционный сосуд, нейтрализуют сначала 5 н H_2SO_4 . Далее в сосуд для кислотного гидролиза вносят 0,1 н H_2SO_4 из расчета 2,5 мл кислоты на 10 мл раствора. Включают латр прибора и производят гидролиз при температуре 100°C в течение 10 мин. По окончании гидролиза смеси дают остыть, нейтрализуют 5 н NaOH и затем отгоняют образовавшийся аммиак, как описано выше.

Другую часть безаммиачного центрифугата также нейтрализуют 5 н H_2SO_4 и 0,1 н H_2SO_4 . В нейтральный раствор на каждые 10 мл добавляют 5 мл фосфатного буфера pH 6,9 и 1 мл 0,5% уреазы (активность 650–700 ед.). Смесь переносят в реакционный сосуд прибора Сереньева, с помощью латра устанавливают температуру $48\text{--}50^\circ\text{C}$ и инкубируют в течение 20 мин. Далее производят отгонку образовавшегося аммиака, собирая отгон для масс-спектрометрического анализа.

На приборе Сереньева были исследованы стандартные растворы различных соединений (аммония, глутамин, мочевины) разных концентраций, результаты определения представлены в таблице.

Количество азота аммиака, глутамин, мочевины, полученное при отгонке отдельных соединений и их смесей, мг

Азот	Отдельные соединения		Смесь аммиака, глутамин, мочевины	
	взято	выделено	взято	выделено
Аммония	10,00	$9,98 \pm 0,014$	5,00	$5,07 \pm 0,11$
	5,00	$4,97 \pm 0,008$		
	2,50	$2,48 \pm 0,003$		
Глутамин	10,00	$9,94 \pm 0,020$	2,50	$2,44 \pm 0,02$
	5,00	$4,97 \pm 0,270$		

Мочевины	5,00	4,97 ± 0,001	5,00	4,94 ± 0,01
----------	------	--------------	------	-------------

Расчет. После определения общего количества азота химическим методом на основании полученных результатов рассчитывают содержание ^{15}N в образце.

24. Определение свободных аминокислот в тканях и органах

Принцип. Свободные аминокислоты определяют в безбелковом центрифугате биологического материала (плазма крови, печень, мышцы и т.д.). Осаждение белков осуществляют с помощью сульфосалициловой кислоты (27).

Реактивы. 1. Сульфосалициловая кислота (хч) – 3%; 2. Цитратный буфер рН 2,2.

Оборудование. Аминокислотный анализатор, центрифуга, водяная баня.

Ход определения. Берут 10 мл плазмы крови или тканевого гомогената, добавляют 10 мл 3%-ного раствора сульфосалициловой кислоты (соотношение 1:1), тщательно перемешивают и оставляют в холодильнике на 24 часа. Затем содержимое колбочек переносят в центрифужные стаканы, стенки колбочек дважды ополаскивают дистиллированной водой, которую сливают в стаканы и центрифугируют в течение 15 мин при 1200 г. Надосадочную жидкость сливают в выпаривательные чашки и выпаривают на водяной бане при температуре 80°C. Сухой остаток разбавляют в пенициллиновых флаконах до 5 мл цитратным буфером (рН 2,2). В таком виде образцы свободных аминокислот поступают на аминокислотный анализатор.

Литература

- Lowry O. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. J.Biol.Chem., 1951, 193:265-275.
- Hartry E.F. Anal.Biochem., 1972, 28, 22:427.
- Фармакопея ГДР, 7-е изд., Берлин, 1968.
- Braithwood J.L. The New Zealand J.Med.Labor.Technology, 1968, 22, 2: 62-80.
- Stein W., Moore S. In: Methods in Enzimology (Ed. S. Colomic and N. Caplan), Acad.Press, New-York, 1965.
- Окуда Х., Юджи С. Saisin igaku, 1966, 21, 3:622-627.
- Корякин Ю.В., Ангелов И.И. Чистые химические реактивы. М., 1955:421.
- Seligson D., Hurahara K. J.Labor.Clin.Med., 1957, 45, 6: 962.
- Петрунькина А.М. Практическая биохимия, М., 1961.
- Изучение пищеварения у жвачных. Боровск, 1987.
- Messer M. Biochem.Biophys.Acta, 1955, 17:151-155.
- Силакова А.Н., Труш Г.П., Яковлева Я. Микрометод определения аммиака и глутамина в тканевых трихлоруксусных экстрактах. Вопросы медицинской химии, 1962, 8: 5.
- Puech A., Duru C. Dosage du triptophan par colorimetric a l'acide glyoxylique. Ann.Pharm.Franc., 1971, 29:9-10, 493-500.
- Steinhart H.L. Eine directe fluorometrische Bestimmungsmethode fur Tryptophan aus Futtermittel Hydrolysaten. Z.Tierphysiol.Tierern.Futter., 1978, 41: 54-56.
- Алексеев А.П. Определение серусодержащих аминокислот. В кн.: Современные методы в биохимии (под ред. Орехова В.И.), 1964: 154.
- Young G., Conway C.F. J.Biol.Chem., 1942, 142, 2: 839.
- Лемперт М.Д. Биохимические методы исследования. Кишинев, 1968: 18-20.
- Anson M.G. J.Gen.Physiol., 1937, 20, 2:561.
- Press E.M., Porter R.R. Biochem.J., 1960, 74:501-514.
- Lee Ya Pin, Tunekazu Takahaschi. An improved colorimetric determination of amino acids with the use of ninhydrin. Anal.Biochem., 1966, 14, 1:71-76.

21. Reitman S.F., Frankel S. A colorimetric method for the determinations glutaminoxalacetic and glutamicpyruvic transaminases. Amer.J.Clin.Path., 1957,28,1:305-308.
22. Труш Г.П. Ферменты обмена глутамина в сердечной мышце. Укр. биохим. журнал. 1968, 35: 713.
23. Coulambe C.C., Favre G. Clin.Chem.,1963,9,1.
24. Taylor R.T., Jenkins W.T. Leucine aminotransferase colorimetric assays. J.Biol.Chem., 1966,24,19:4391-96.
25. Schimke R. Adaptive characteristics of urea cycle enzymes in the rat. J.Biol.Chem., 1962,237,2:459-465.
26. Guthoklein G., Knappe J. Modified determination of citrulline. J. Anal. Biochem., 1968,26,1:188-191.
27. Perry T.L., Hansen S. Clinica chim.acta, 1969,25:53.

VII. Методы анализа метаболитов и активности ферментов углеводного обмена

1. Определение углеводов корма

Методы определения углеводов растительных кормов в значительной степени зависят от вида и химического состава кормовых средств. По степени переваривания и использования в организме углеводы делятся на 2 группы. Первая группа – резервные углеводы (крахмал, олигосахариды), которые ферментируются в желудочно-кишечном тракте животных. Вторая группа (гемицеллюлозы, целлюлозы и лигнин) – структурные углеводы, формирующие собой скелетные стенки растений и требующие для разделения и переваривания в преджелудках значительного длительного контакта с микрофлорой.

Принцип метода. Для разделения углеводов в лабораторной практике применяют схемы, предложенные Ван-Соестом, Саутгейтом и Ермаковым (1–3). При этом соблюдается следующая последовательность обработки растительного материала: 1) растворение олигосахаридов в воде и осаждение полисахаридов этанолом, 2) извлечение пектинов, 3) обработка кормов диастазой для растворения крахмала, 4) вымывание неуглеводных компонентов: белков, жиров, таннинов и кремнеземов нейтральным детергентом для получения полимера, состоящего из гемицеллюлоз, целлюлоз и лигнина, 5) воздействие кислым детергентом с целью растворения гемицеллюлоз, неуглеводных компонентов и получения в остатке лигноцеллюлозного комплекса, 6) обработка осадка 72%-ным раствором серной кислоты для растворения целлюлоз и выделения лигнина.

Реактивы. 1. 85%-ный этанол; 2. 72%-ный раствор серной кислоты плотностью 1,64 (620 мл H_2SO_4 плотностью 1,84–380 мл воды); 3. 1%-ный раствор лимоннокислого аммония; 4. 2 н раствор хлористого кальция ($d = 1,09$, 250 г $CaCl_2$ на 1 л воды); 5. 0,1 н NaOH; 6. 0,05 н HCl; 7. 20% NaOH; 8. 1 н раствор уксусной кислоты; 9. 1% AgO_3 ; 10. Ацетон; 11. Серный эфир; 12. Нейтральный детергентный реактив по Залевски (4): 30 г додецилсульфоуксусной кислоты натриевой соли ($C_{12}H_{25}O_4NaS$), 18,61 г динатрий этилендиаминтетраацетата (трилон-Б), 6,81 г тетрабората натрия ($Na_2B_4O_7$), 4,56 динатрийфосфата (Na_2HPO_4) растворяют в отдельности в теплой воде, смешивают, добавляют 10 мл этиленгликоля, 5 г декалина, нагревают до 80° , охлаждают и доводят до 1 л водой (рН 6,9–7,1); 13. Кислотно-детергентный реактив по Кланси и Вильсону (5): в 1 л 1 н раствора серной кислоты растворяют 10 г ацетилтриметиламмония бромистого ($C_{19}H_{42}BrNa$), 5 г декалина, смесь подогревают до просветления и охлаждают.

Оборудование. ФЭК, весы аналитические, муфельная печь, сушильный шкаф, закрытые электроплитки, штатив-держатель для стеклянных холодильников, водоструйный насос, колба Бунзена, воронки Бюхнера, колбы конические на 250 мл со шлифом, колбы мерные на 0,1 и 1 л, холодильники воздушные со шлифом, фильтры бумажные.

Ход определения. Навеску исследуемого вещества 1,0 г, высушенного при температуре $65^\circ C$ и измельченного на лабораторной мельнице, помещают в коническую колбу на 100 мл и заливают горячим ($50^\circ C$) раствором этанола (50 мл), периодически помешивая в течение 30 мин, фильтруют через предварительно взвешенный фильтр и промывают теплой водой. Остаток на фильтре (1-й) используют для последующего выделения пектинов, а фильтрат – для определения сахаров, как описано ниже.

1.1. Определение сахара в кормах по Рою (6, 7)

Принцип метода. Основные сахара кормов – глюкоза и сахароза, в присутствии крепкой соляной кислоты превращаются в оксиме-

тилфурфурол, который при добавлении резорцина образует соединение розового цвета, по степени окраски которого определяют количество сахара в пробе. Метод чувствителен для всех гексоз.

Реактивы. 1. 0,1% раствор резорцина в 95% этиловом спирте; 2. Осветляющие растворы Карреца: а – 150 г $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ растворяют в 1 л воды; б–230 г $Zn(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$ растворяют в 1 л воды; 3. 20%-ный раствор соляной кислоты, содержащий 0,001% хлорного железа; 4. Стандартный раствор, содержащий 1 мг глюкозы в 1 мл.

Оборудование. ФЭК, водяная баня.

Ход определения. К фильтрату, оставшемуся после экстракции сахаров водой и спиртом, прибавляют по 5 мл каждого из осветляющих растворов Карреца (а и б), доводят общий объем до 50–100 мл и фильтруют. В пробирку вносят 0,5–2,0 мл испытуемого раствора с содержанием сахара от 10 до 100 мкг, доводят водой до 2 мл, добавляют 2 мл 0,1% раствора резорцина, приготовленного на 95% этаноле, и 6 мл 20% HCl, содержащей 0,001% хлорного железа. Содержимое пробирки перемешивают и ставят на 8 мин в водяную баню при температуре 80°C для проявления окраски. Пробирки охлаждают и колориметрируют на ФЭКе с зеленым светофильтром при длине волны 490 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм против контрольной пробы, в которой вместо сахарного раствора берут воду.

Расчет. Для построения калибровочного графика берут стандартного раствора 0,2; 0,3; 0,4 мл и больше, используя стандартные растворы глюкозы и сахарозы (100 мг%), доводят водой до 2 мл, прибавляют растворы резорцина и HCl и колориметрируют аналогично испытуемым растворам. Строят график для определения концентрации сахара в пробе и ведут расчет по формуле:

$$X = v \cdot V_1 / a \cdot V_2$$

где X – концентрация сахара в пробе, мг%; а – навеска вещества, г; v – количество глюкозы, мг%, найденное по графику; V_1 – объем, до которого была доведена сахарная вытяжка, мл; V_2 – объем вытяжки, взятой для анализа, мл.

1.2. Определение пектинов (8)

Принцип метода. Пектины определяют весовым методом после выпадения в осадок пектата кальция.

Ход определения. Осадок с фильтра (1-й) после экстракции сахаров переносят в колбу со шлифом, добавляют 50 мл 0,05 н HCl и экстрагируют 30 мин на водяной бане при температуре 80°C и сливают отстоявшийся верхний слой (1-й фильтрат) в колбу. К оставшемуся осадку добавляют 50 мл 1% лимоннокислого аммония и гидролизуют на кипящей водяной бане 1 час. Фильтруют. Осадок на фильтре промывают ацетоном и высушивают в шкафу при температуре 65°C для последующего определения крахмала (3), а фильтрат 2-й сливают с 1-м, нейтрализуют 20% NaOH и доводят объем до 100 мл. К полученному раствору пектинов добавляют 100 мл 0,1 н NaOH и оставляют для омыления пектина на 7 часов, после чего нейтрализуют 50 мл 1 н раствора уксусной кислоты, вносят 50 мл $CaCl_2$ и через 1 час полученный раствор кипятят 5 мин для выпадения пектата кальция в осадок. Последний промывают на фильтре горячей водой до исчезновения реакции на ион хлора (проба с 1% $AgNO_3$), высушивают, взвешивают и полученный результат, то есть количество пектата кальция, умножают на 0,92, исходя из того, что пектат кальция содержит в своем составе 8% кальция.

1.3. Определение крахмала по Максакову (8)

Принцип метода. Крахмал кормовых средств ферментируется под действием диастазы до мальтозы, которая при нагревании со слабыми кислотами расщепляется до глюкозы.

Реактивы. 1. Водный раствор йода и йодистого калия (1 г кристаллического йода и 1 г КJ в 100 мл дистиллированной воды); 2. Сухой препарат диастазы.

Оборудование. Водяная баня, колориметр, термостат.

Ход определения. Высушенный остаток корма (2-й) после экстракции сахаров и пектинов, как описано выше, смачивают горячей водой (50 мл) и кипятят на водяной бане 30 мин для клейстеризации крахмала, часто взбалтывая содержимое колбы. После охлаждения раствора до 50° добавляют 50–100 мг диастазы и инкубируют смесь в термостате при температуре 50–55° до полного осветления раствора, то есть перехода всего крахмала в мальтозу. Окончание гидролитического распада крахмала проверяют реакцией на йод. После гидролиза крахмала раствор фильтруют в колбу, осадок на фильтре (3-й) высушивают, взвешивают и используют для дальнейшего определения. В полученном фильтрате определяют сахар по Рою, как описано в разделе "Определение сахара в кормах по Рою".

Расчет. Содержание крахмала в исследуемом образце рассчитывают по формуле:

$$X = v \cdot Y_1 \cdot 0,9/a \cdot Y_2,$$

где v – количество глюкозы в пробе, найденное по калибровочному графику; a – навеска образца, г; Y_1 – общий объем жидкости, мл; Y_2 – количество раствора, взятого на анализ; 0,9 – коэффициент для пересчета количества глюкозы на крахмал.

1.4. Определение нейтральнодетергентной клетчатки (4)

После извлечения сахаров, пектинов и крахмала из образца переходят к определению структурных углеводов. Под действием нейтрального детергента из навески корма извлекаются неуглеводные компоненты и остается полимер, состоящий из гемицеллюлоз, целлюлоз и лигнина (НДК). Для этого осадок (3-й) высушивают, взвешивают, количественно переносят с фильтра в колбу на 250 мл со шлифом, заливают раствором нейтрального детергента в количестве 100 мл и гидролизуют на закрытой электроплитке с медленным подогревом и обратным холодильником в течение часа с момента закипания. После окончания гидролиза содержимое колбы фильтруют через воронку Бюхнера, соединенную колбой Бунзена с водоструйным насосом. Остаток на фильтре (4-й) промывают горячей водой и ацетоном, высушивают до постоянного веса и по разнице веса между фильтром с веществом и пустым фильтром определяют количество нейтральнодетергентной клетчатки.

1.5. Определение кислотодетергентной клетчатки по Ван-Соесту (3)

Кислотодетергентная клетчатка представляет собой прочное соединение целлюлозы с лигнином, остающееся после выделения гемицеллюлозы кислым детергентом из нейтральнодетергентного полимера. Продолжая последовательное выделение углеводов из одной навески вещества, остаток (4-й) с фильтра переносят аналогично вышеописанному методу и гидролизуют в течение часа со 100 мл кислотодетергентного реактива. Количество лигноцеллюлозы (кислотодетергентной клетчатки) определяют путем взвешивания.

1.6. Определение лигнина (9)

Лигнин является кислотоустойчивым соединением, которое играет роль физического барьера для ферментов, воздействующих на клетчат-

ку и гемицеллюлозу, и фактически не переваривается в организме животных. В связи с этим содержание лигнина в корме служит индикатором переваримости структурных углеводов. Для его определения лигноцеллюлозу, полученную вышеописанным методом, количественно переносят в колбу для гидролиза, заливают 10 мл 72% H_2SO_4 из клювика-дозатора, выдерживают 2,5 часа при комнатной температуре, периодически перемешивая. Разбавляют водой до 150 мл, гидролизуют в течение 1 часа с обратным холодильником, фильтруют и промывают большим количеством воды до нейтральной реакции промывных вод. Серная кислота растворяет целлюлозу, в результате чего на фильтре остается сырой лигнин, который определяют путем взвешивания. После озоления фильтра с лигнином определяют количество золы, а чистый лигнин рассчитывают по разнице между массой сырого лигнина и золы.

Расчет. По разнице между массой фильтра с осадком и чистого фильтра вычисляют массу исследуемого вещества в каждом отдельном случае (для НДК, КДК, лигнина). Процентное содержание исследуемых веществ вычисляют по формуле:

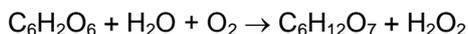
$$X = v \cdot 100/a$$

где a – навеска исследуемого корма, г; v – масса вещества (НДК, КДК или лигнина), г; 100 – коэффициент для перевода в %. Количество гемицеллюлоз определяют путем вычитания (гемицеллюлозы = НДК – КДК; целлюлозы = КДК – чистый лигнин).

2. Определение глюкозы в крови глюкозооксидазным методом

В настоящее время глюкозооксидазный метод определения глюкозы широко используется в нашей стране и за рубежом. Существует много разных вариантов этого метода, которые не оказывают существенно влияния на конечные результаты. Преимущественно эти различия сводятся к способам регистрации скорости глюкозооксидазной реакции – по убыли кислорода или по приросту образующейся перекиси водорода, а также по характеру красителя, используемого для регистрации пероксидазной реакции. До последнего времени для регистрации пероксидазной реакции использовали производные бензидина. Однако из-за канцерогенности в большинстве стран от них отказались и стали использовать другие, менее токсичные индикаторы. Наиболее широкое распространение получил вариант метода по Gallati H. (10) с использованием антипирина в комплексе с фенолом. Мы взяли за основу этот метод при отработке условий анализа для определения концентрации глюкозы в крови сельскохозяйственных животных.

Принцип метода. Метод определения глюкозы основан на использовании фермента глюкозооксидазы, которая высокоспецифически окисляет β -(D+)-глюкозу кислородом до глюконовой кислоты. При этом в реакции образуется перекись водорода в эквимольных количествах.



Образовавшаяся перекись водорода в присутствии пероксидазы и фенола окисляет хромоген 4-аминоантипирин, который, будучи бесцветным в восстановленном состоянии, меняет окраску на красную в окисленном состоянии.

Реактивы. 1. 0,6 н раствор хлорной кислоты; 2. Стандартные растворы глюкозы: 100 мг D(+)-глюкозы растворяют в 100 мл воды, что соответствует концентрации глюкозы 100 мг%. Из этого раствора готовят серию разведений с концентрацией глюкозы 20, 40, 60 и 80 мг% соответственно. Один объем из каждого разведения смешивают с двумя объемами 0,6 н раствора хлорной кислоты. Раствор глюкозы с хлорной кислотой может храниться при температуре не выше $-20^\circ C$ до 6 месяцев; 3. Реактив для определения глюкозы: 27,22 г калия фосфорнокислого однозамещенного растворяют в 500 мл воды; добавляют 406,4 мг

аминоантипирина, 2,353 г фенола и перемешивают; под контролем рН-метра доводят до 7,25 с помощью 1М раствора NaOH; водой доводят объем до 1000 мл. Реактив хранят в посуде из темного стекла при температуре 4°C до 30 дней; 4. Раствор ферментов: 10 мг глюкозооксидазы и 10 мг пероксидазы из хрена растворяют в 10 мл воды, фильтруют и хранят при 4°C до 10 дней.

Подготовка проб к анализу. При исследовании содержания глюкозы в крови сельскохозяйственных животных необходимо наряду со стандартными требованиями к проведению эксперимента учесть следующее: проводить взятие проб крови с минимальным стрессовым воздействием на животных; сразу после получения образцов крови необходимо добавить реагенты, обеспечивающие денатурацию белков крови с целью прекращения процессов гликолиза. В центрифужную пробирку налить 1 мл гепаринизированной крови, добавить 2 мл реактива №1, тщательно перемешать стеклянной палочкой. Через 30 мин центрифугировать в течение 15 мин при 2000–2500 г. Для дальнейшего анализа берут прозрачный супернатант.

Оборудование. Центрифуга, колориметр.

Ход определения. 2 мл реактива №3 для определения глюкозы вносят в пробирки, добавляют 100 мкл раствора глюкозы с известной концентрацией или 100 мкл надосадочной жидкости, полученной после центрифугирования смеси 1 мл крови с 2 мл 0,6 н хлорной кислоты. Вносят 100 мкл реактива №4, перемешивают и инкубируют при комнатной температуре 40 мин, а затем колориметрируют на ФЭКе или спектрофотометре при длине волны 492 нм.

Расчет. На миллиметровой бумаге строят калибровочный график и рассчитывают концентрацию глюкозы. Если в пробах крови содержание глюкозы превышает 100 мг%, то необходимо предварительно надосадок развести 0,6 н раствором хлорной кислоты и при расчете концентрации глюкозы учесть фактор разведения.

Концентрация глюкозы в крови крупного рогатого скота зависит от возраста, продуктивности, условий содержания и кормления. Например, в крови коров-первотелок на 2-м, 3-м и 4-м месяцах лактации концентрация глюкозы в крови составила 59,5±2,2; 52,0±1,8 и 54,5±1,3 мг% соответственно.

3. Определение молочной кислоты по методу Gutmann I., Wohlefeld A.W. (11)

Принцип метода. L-молочная кислота под действием фермента лактатдегидрогеназы в присутствии никотинамидадениндинуклеотида (НАД) превращается в пировиноградную кислоту:



При этом НАД переходит в восстановленную форму, количество которой регистрируется путем измерения экстинкции на спектрофотометре при длине волны 365 или 340 нм. Равновесие реакции превращения молочной кислоты сдвинуто влево. Поэтому, чтобы достигнуть количественного превращения молочной кислоты в пировиноградную, реакцию проводят при щелочном рН, а образующийся в процессе реакции пируват удаляют из реакционного объема путем связывания его с гидразином.

Для количественной и достаточно быстрой реакции нужны относительно высокие концентрации НАД и лактатдегидрогеназы.

Реактивы. 1. 0,6 н раствор хлорной кислоты; 2. Гидразин-глициновый буфер рН 9,0 (0,5М глицин и 0,4М раствор гидразина). В 500 мл бидистиллированной воды растворяют 37 г глицина и 530 мг гидразин-сульфата, доводят рН раствора до 9,0 и бидистиллированной водой доводят объем буфера до 1000 мл. Щелочной гидразин-глициновый

буферный раствор хранят при комнатной температуре и используют только в течение 10 дней; 3. Раствор НАД (27 ммоль/л). 180 мг НАД растворяют в 10 мл бидистиллированной воды и используют для анализа в этот же день; 4. Лактатдегидрогеназа (ЛДГ). Для работы используют коммерческий препарат ЛДГ, который обычно представляет суспензию фермента в 2,1М растворе сульфата аммония с активностью не ниже 650 ед/мл.

Подготовка проб к анализу. Кровь берут из кровеносного сосуда и непосредственно после взятия осаждают белки. С этой целью 1 мл крови добавляют в центрифужные пробирки, содержащие 2 мл 0,6 н холодного раствора хлорной кислоты. Содержимое пробирок тщательно перемешивают стеклянной палочкой и через 30 мин центрифугируют 15 мин при 2000–2500 г. Супернатант помещают в чистый флакон или пробирку и хранят до проведения анализа при 4°C.

Оборудование. Центрифуга, спектрофотометр, водяная баня.

Ход определения. Готовят серию стеклянных пробирок из расчета проведения не менее двух параллельных исследований каждой пробы. В две пробирки отмеривают по 2 мл раствора №2, 0,2 мл раствора №1, 0,2 мл раствора №3 и 0,02 мл суспензии ЛДГ и перемешивают. Это контрольная проба. В другие пробирки отмеривают по 2 мл раствора №2, 0,2 мл супернатанта исследуемой пробы, 0,2 мл раствора №3, 0,02 мл суспензии ЛДГ (реактив №4) и перемешивают. Все пробирки помещают одновременно в водяной термостат и выдерживают при температуре 25°C в течение 60 мин. Измеряют экстинкцию на спектрофотометре при длине волны 334, 365 или 340 нм против воздуха.

Расчет. Определяют разность (ΔE) между экстинкцией опытной пробы, содержащей супернатант, и контрольной, содержащей раствор хлорной кислоты. По величине этой разницы рассчитывают концентрацию молочной кислоты, исходя из известных значений коэффициентов молярной экстинкции для восстановленных форм НАД при длине волны 334, 340 или 365 нм и фактора разведения. В данном варианте метода используют следующие коэффициенты при расчете:

Концентрация молочной кислоты	Длина волны спектрофотометра, нм		
	365	340	334
мг / 100 мл	91,3 × ΔЕ	49,3 × ΔЕ	50,2 × ΔЕ
мМоль / л	10,1 × ΔЕ	5,47 × ΔЕ	5,58 × ΔЕ

При необходимости юстировки прибора и проверки правильности расчета делают серию стандартных разведений раствора молочной кислоты и в дальнейшем проводят все операции, включая добавление 0,6 н раствора хлорной кислоты к раствору молочной кислоты.

Многолетняя работа по анализу содержания молочной кислоты в крови сельскохозяйственных животных показала высокую чувствительность метода и хорошую воспроизводимость результатов анализа. Содержание молочной кислоты в крови животных зависит от многих факторов, включая условия содержания и питания. Обычно в крови растущего молодняка крупного рогатого скота концентрация молочной кислоты составляет 4–12 мг%.

4. Определение гликогена в крови колориметрическим методом с орцином по Хорейши

Принцип метода. Большинство методов определения гликогена в крови и тканях состоит из двух этапов: обработка ткани концентрированным горячим раствором щелочи с последующим осаждением гликогена спиртом; гидролиз гликогена с последующим определением глюкозы. Чаще всего методы определения гликогена различаются по способу гидролиза гликогена (гидролиз с помощью кислоты или с применением разных систем ферментов) и по методу определения глюкозы. Описаны чувствительные и достаточно специфические методы с использованием различных ферментов. Однако эти методы требуют значительных затрат на приобретение дорогостоящих реагентов. Мы в процессе проведения исследований сравнивали эффективность ряда методов определения концентрации гликогена в органах и тканях сельскохозяйственных животных и, в том числе, с использованием некоторых ферментов. В результате этой работы мы остановились на методе определения гликогена в крови по Хорейши, который был детально описан в справочнике под редакцией А.А.Покровского (12). По этому методу органические вещества в исследуемой пробе, мешающие определению гликогена, разрушаются кипячением в концентрированном растворе едкого натра. Гликоген при этом не разрушается. Его в дальнейшем осаждают спиртом, гидролизуют в кислой среде до глюкозы и определяют ее количество. Для этого раствор глюкозы нагревают с крепкой серной кислотой и в результате этого она превращается в оксиметилфурфурол, который, конденсируясь с орцином, образует окрашенное соединение. Интенсивность окраски определяют колориметрически.

Реактивы. 1. 40%-ный раствор едкого кали; 2. 96% этиловый спирт; 3. Полунасыщенный раствор сернистого натрия; 4. 52% раствор серной кислоты: к 900 мл концентрированной серной кислоты, осторожно перемешивая, добавляют 400 мл дистиллированной воды, охлаждают; 5. 1%-ный раствор орцина в 52%-ной серной кислоте (см. приготовление раствора №4); 6. Стандартный раствор глюкозы: 10 мг глюкозы растворяют в 300 мл дистиллированной воды.

Оборудование. Центрифуга, водяная баня.

Подготовка проб к анализу. При исследовании содержания гликогена в органах и тканях необходимо иметь в виду, что гликоген очень быстро способен разрушаться в образцах проб в результате реакций гликогенолиза. Поэтому при определении содержания его в крови необходимо тотчас после взятия пробы крови поместить необходимое ее количество в пробирку с раствором щелочи (см. ход проведения анали-

за). При определении количества гликогена в печени и мышце, полученные образцы ткани быстро помещают в сосуд с жидким азотом и хранят в нем до анализа.

Ход определения. В центрифужную пробирку наливают 0,5 мл раствора №1. С помощью микропипетки в пробирку добавляют 0,1 мл крови, перемешивают и пробирку помещают на 2 часа в кипящую водяную баню. Если необходимо определить содержание гликогена в пробах печени или мышцы, то откалывают небольшой кусочек замороженной в жидком азоте ткани и помещают в пробирку, которую предварительно взвешивают. Затем взвешивают пробирку с пробой и записывают вес пробы в пробирке. Обычно бывает достаточно для анализа 20–40 мг ткани печени или 50–100 мг мышцы. Добавляют в пробирку 0,5 мл раствора №1 и помещают на 2 часа в кипящую водяную баню. После этого, независимо от характера анализа (анализ крови, печени или мышцы), пробирку охлаждают, прибавляют 2 мл этилового спирта, размешивают и ставят на лед на 30 мин. Центрифугируют 10–15 мин при 200–2500 об/мин, сливают и отбрасывают надосадочную жидкость, а осадок растворяют, добавляя 1 мл полунасыщенного раствора сернокислого натрия и снова осаждают 2 мл спирта. Оставляют на льду на 30 мин. Снова центрифугируют, надосадочную жидкость отбрасывают, а осадок растворяют, прибавляя 3 мл воды. Одновременно приливают еще в одну чистую пробирку 3 мл воды (контроль), а в третью пробирку – 3 мл стандартного раствора глюкозы. Во все пробирки – с гликогеном, со стандартным раствором глюкозы и в контроль приливают по 13 мл серной кислоты и по 1 мл 1%-ного раствора орцина. Все пробирки помещают на 20 мин в водяную баню при 80°C, затем их охлаждают. В присутствии глюкозы развивается коричнево-желтое окрашивание. Фотометрируют против контроля при синем светофильтре.

Расчет содержания гликогена в крови проводят по формуле:

$$X = E_0 \cdot 0,1 \cdot 100 / E_{ст} \cdot V$$

где E_0 – экстинкция опытной пробы; $E_{ст}$ – экстинкция стандартного раствора; 0,1 мг – содержание глюкозы в 3 мл стандартного раствора, мг; V – количество взятой для анализа крови в мл или в г для печени (мышцы); 100 – коэффициент для пересчета на 100 мл крови или 100 г ткани; X – содержание гликогена, мг%.

В случае, если экстинкция опытной пробы будет превышать 1, необходимо сделать дополнительные разведения. Например, осадок гликогена развести не в 3 мл воды, а в 6 мл, но для дальнейшего анализа взять 3 мл. В этом случае полученные результаты необходимо умножить на коэффициент разведения 2.

Результаты исследований показали, что в среднем у молодняка крупного рогатого скота концентрация гликогена составляет: в крови 10–25 мг%, в печени – 1000–2000 мг%, в скелетной мышце – 400–1200 мг%.

5. Определение активности дегидрогеназ цикла Кребса (пируватдегидрогеназы, изоцитратдегидрогеназы, α -кетоглутаратдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы и малатдегидрогеназы)

Принцип метода. Цикл Кребса является одним из основных звеньев этапа окисления метаболитов энергетического обмена, а также донором восстановительных эквивалентов (НАДН, НАДФН), используемых в процессах биосинтеза. Через этот цикл осуществляется также взаимопереключение основных метаболических путей. Указанные процессы осуществляют митохондриальные ферменты, представляющие собой полифункциональные комплексы, состоящие из нескольких субъединиц, каждая из которых выполняет функцию определенного фермента, но функционирует только в составе комплекса. К ним относятся: пи-

руватдегидрогеназа, изоцитратдегидрогеназа, α -кетоглутаратдегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа и малатдегидрогеназа. Пируватдегидрогеназа (пируват:липоат-оксидоредуктаза, КФ 1.2.4.1) катализирует окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты. Этот сложный полиферментный комплекс состоит из трех функционально различных субъединиц – пируватдегидрогеназы, дигидролипоилтрансацилазы и дигидролипоилдегидрогеназы. В результате серии реакций, осуществляемых этими ферментами, из пировиноградной кислоты образуются ацетилированное производное КоА и НАДН. Изоцитратдегидрогеназа (изоцитрат:НАД-оксидоредуктаза, КФ 1.1.1.41) представляет собой ферментный комплекс, катализирующий окисление изоцитрата до α -кетоглутаровой кислоты и образование в этой реакции восстановленной формы никотинамиддинуклеотида (НАДН). Альфа-кетоглутаратдегидрогеназа (2-оксиглутарат:липоат - оксидоредуктаза, КФ 1.2.4.2) – сложный полиферментный комплекс, по составу и функционированию входящих в него мономеров аналогичен пируватдегидрогеназе и катализирует окислительное декарбоксилирование α -кетоглутарата. В результате сложной серии реакций, осуществляемой комплексом мономеров, входящих в состав ферментного комплекса, образуется сукцинат и восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотида. Сукцинатдегидрогеназа (сукцинат:флавопротеиноксидоредуктаза, КФ 1.3.99.1) – ферментный комплекс, катализирующий окисление сукцината. В результате реакции образуется фумарат и восстановленная форма флавинадениндинуклеотида. Малатдегидрогеназа (L-малат:НАД-оксидоредуктаза, КФ 1.1.1.37) катализирует окисление малата до оксалацетата с образованием в этой реакции восстановленной формы никотинамидадениндинуклеотида.

Эти ферменты занимают главные позиции на развилках метаболических путей. Только один фермент – малатдегидрогеназа катализирует обратимое окисление яблочной кислоты и, по-видимому, не является регуляторным ферментом, но несет важную функцию завершения метаболического цикла. Он также катализирует обратную реакцию превращения оксалацетата, для которого митохондриальная мембрана непроницаема, в малат, который, в свою очередь, способен выходить из митохондрий в цитоплазму. Важное значение этот процесс имеет для жвачных животных, так как у них часть пируваткарбоксилазной реакции осуществляется в митохондриях. Участвуя в образовании и удалении оксалацетата – мощного ингибитора сукцинатдегидрогеназы, этот фермент косвенно выполняет роль регулятора активности сукцинатдегидрогеназы.

Для определения активности дегидрогеназ используют ряд методов, принципиально отличающихся друг от друга. Можно определять их активность по концентрации конечного продукта реакции $\text{НАД}^+ \rightarrow \text{НАДН}$ или по убыли субстрата при завершении инкубации. Возможно также определять активность спектрофотометрически по измерению возрастания оптической плотности НАДН при его восстановлении; флуориметрически, манометрически, с использованием красителей (феназинметасульфата, метиленовой сини, феррицианида, различных солей тетразолия), выполняющих функцию акцепторов электронов и изменяющих окраску при изменении окислительно-восстановительного потенциала.

При работе с большим количеством исследуемых объектов, в серийных исследованиях или на большом количестве животных целесообразно использовать метод Нордмана с сотр. в модификации Путилиной Ф.Е. и Ещенко Н.Д. (13). В данном методе в качестве акцепторов водорода используют трифенилтетразолий. Соли тетразолия хорошо растворимы в воде, а при восстановлении образуют формазаны, нерастворимые в воде, но хорошо растворимые в ацетоне. Эти соли – соединения кремowego или желтого цвета. В противоположность им, формазаны имеют яркую окраску, поэтому они применяются как редокс-индикаторы. Соли

тетразолия имеют различные окислительно-восстановительные потенциалы, поэтому они принимают электроны на различных этапах окислительно-восстановительных реакций. В отличие от тетразолия, используемого Нордманом, авторы модификаций использовали тетразолий синий (химическое название 3,3-дианизол-бис-4,4'-3,5-дифенил тетразолий хлорид ($C_{40}H_{32}N_8O_2Cl_2$, молекулярная масса 727,7). Тетразолий синий относится к группе дитетразолиев, поэтому является более активным акцептором электронов. Он принимает электроны в самом конце дыхательной цепи от восстановленной цитохромоксидазы, поэтому на результат анализа могут повлиять и другие компоненты дыхательной цепи, предшествующие цитохромоксидазе. Для того, чтобы исключить влияние этих компонентов на образование формазана, необходимо "приблизить" акцептор электронов (тетразолий синий) к определяемой дегидрогеназе введением в инкубационную среду вспомогательного переносчика водорода ФМС – феназинметасульфата (5 - метилфеназинметилсульфат, $C_{14}H_{14}N_2O_4S$, молекулярная масса 306,34), окисленная и восстановленная формы которого растворимы в воде.

Реактивы, оборудование, подготовка исследуемого материала и техника определения активности указанных ферментов однотипны, поэтому они описаны на примере определения активности пируватдегидрогеназы, а особенности определения каждого отдельного фермента будут оговорены ниже.

5.1. Определение активности пируватдегидрогеназы

Реактивы. 1. Фосфатный буфер 0,1М рН 7,4: однозамещенный фосфорнокислый калий (KH_2PO_4) – 0,1 моль и двухзамещенный фосфорнокислый натрий ($NaHPO_4$) – 0,1 моль растворяют в 800 мл бидистиллированной воды (или дистиллированной), доводят 0,1 н NaOH рН до 7,4 и водой до 1 л. Можно использовать только KH_2PO_4 – 0,1 моль растворяют в 800 мл воды и доводят рН до 7,4 гидроокисью натрия (6–10 н раствор NaOH добавляют осторожно по каплям при постоянном помешивании на магнитной мешалке) и под контролем рН-метра до рН 7,0, затем используют раствор слабой концентрации (0,1 н NaOH), после чего объем доводят водой до 1 л. Концентрация всех указанных ниже реактивов будет дана из расчета содержания их в инкубационной среде; 2. Магний хлористый ($MgCl_2$) – 4 мкМ (то есть готовят из расчета 4 мкМ в инкубационной среде); 3. Аденозинтрифосфат (АТФ) – 3,3 мкМ; 4. Натрий пировинограднокислый – 33 мкМ (в методах определения других дегидрогеназ этот реактив будет другим); 5. Феназинметасульфат (ФМС) – 3,3 мкМ; 6. Тетразолий синий – 1,4 мкМ; 7. Натрий углекислый (Na_2CO_3) – 166 мкМ (этот реактив применяется только для определения пируватдегидрогеназы); 8. Натрий сернистый (Na_2S) – добавляется в избытке для восстановления тетразолия синего при построении калибровочного графика. Значения рН всех растворов доводят до 7,4 или эти растворы готовят на фосфатном буфере, используемом в методе. Раствор АТФ готовят перед употреблением. Растворы ФМС и тетразолия готовят также перед употреблением в темной посуде и помещают в темное место. Остальные растворы можно хранить в холодильнике длительное время.

Оборудование. Термостат с регулируемой температурой, спектрофотометр (можно ФЭК или Спекол), центрифуга с охлаждением, рН-метр, штативы для пробирок. Так как соли тетразолия в водных растворах на свету неустойчивы, все процедуры в присутствии тетразолия необходимо проводить с меньшим доступом света. С этой целью штативы окрашивают в черный цвет, а пробы во время инкубации прикрывают черной бумагой.

Подготовка исследуемого материала. Гомогенаты тканей готовят на холоду на фосфатном буфере рН 7,4, при жесткой гомогенизации.

Для дополнительного разрушения митохондрий гомогенаты замораживают и оттаивают. Активность фермента значительно колеблется в зависимости от вида и возраста животного и в большей степени от органа, из которого была взята проба, поэтому для анализа берут различные количества ткани. Для определения активности пируватдегидрогеназы берут: печени (крупный рогатый скот, свиньи, мыши) – 100 мг, поджелудочной железы (крупный рогатый скот) – 100 мг, длиннейшей мышцы спины (крупный рогатый скот, свиньи) – 200–400 мг, стенки рубца – 400 мг, печени и кишечника цыпленка – по 50 мг. Количество ткани для определения других дегидрогеназ будет указано ниже. В зависимости от взятого количества ткани гомогенаты готовят в соответствующих разведениях ткань:буфер. Для анализа используют гомогенат или супернатант, полученный при центрифугировании гомогената на холоду при 700 g в течение 10 мин.

Ход определения. В пробирки для инкубации (можно сразу центрифужные) вносят 1 мл натрия пировинограднокислого, по 0,5 мл АТФ, $MgCl_2$, Na_2CO_3 и 1,5 мл буфера. Ставят в термостат с регулируемой температурой (30°C) и строго через определенные промежутки времени, например, через 10 сек, добавляют по 1 мл источника фермента (гомогената или супернатанта) и преинкубируют 10 мин. После этого добавляют 0,5 мл ФМС и 1 мл тетразолия в указанной последовательности и через такие же промежутки времени, как и источник фермента. Время инкубации зависит от активности фермента и колеблется для печени и кишечника от 30 до 60 мин, длиннейшей мышцы спины и стенки рубца – до 120 мин. Реакцию останавливают холодом, например, погружением в ледяную баню. Образовавшийся осадок формазана отделяют центрифугированием на холоду при 1500 g в течение 15 мин. Надосадочную жидкость сливают, осадок формазана растворяют в 10 мл ацетона и через 1 час снова центрифугируют при прежнем режиме. Интенсивность окраски определяют колориметрически при длине волны 570 нм (зеленый светофильтр, №6) против контрольной пробы или против воды.

5.2. Определение активности изоцитратдегидрогеназы

Реактивы. 4. Цитрат из расчета 66 мкМ в инкубационной среде. Реактив №7 не применяется.

Подготовка исследуемого материала. Для анализа берут: печени (крупный рогатый скот) – 100–150 мг, длиннейшей мышцы спины – 200–400 мг, стенки рубца – 400 мг.

Ход определения. В пробирки для инкубации вносят 1 мл цитрата, по 0,5 мл АТФ и $MgCl_2$ и 2,0 мл буфера. Все остальные процедуры как и при определении активности пируватдегидрогеназы. Время инкубации для печени – 30–70 мин, длиннейшей мышцы спины – 130 мин, стенки рубца – 145 мин.

5.3. Определение активности α -кетоглутаратдегидрогеназы

Реактивы. 4. альфа-кетоглутарат – из расчета 33 мкМ в инкубационной среде. Реактив №7 не применяется.

Подготовка исследуемого материала. Для анализа берут: печени (крупный рогатый скот) – 50–100 мг, длиннейшей мышцы спины – 150–300 мг, стенки рубца – 400 мг.

Ход определения. В пробирки для инкубации вносят 1 мл α -кетоглутарата, по 0,5 мл $MgCl_2$ и АТФ и 2 мл буфера. Время инкубации печени – 30–70 мин, длиннейшей мышцы – 130 мин, стенки рубца – 145 мин.

5.4. Определение активности сукцинатдегидрогеназы

Реактивы. 4. Сукцинат – из расчета 66 мкМ в инкубационной среде. Реактив №7 не применяется.

Подготовка исследуемого материала. Для анализа берут: печени (крупный рогатый скот, мыши) – 25–100 мг, длиннейшей мышцы спины – 100–200 мг, стенки рубца – 200–400 мг.

Ход определения. В пробирки для инкубации вносят 1 мл сукцината, по 0,5 мл АТФ и $MgCl_2$ и 2 мл буфера. Время инкубации печени – 30–70 мин, длиннейшей мышцы спины – 120 мин, стенки рубца – 150 мин.

5.5. Определение активности малатдегидрогеназы

Реактивы. 4. Малат – из расчета 66 мкМ в инкубационной среде. Реактив №7 не применяется.

Подготовка исследуемого материала. Для анализа берут: печени (крупный рогатый скот) – 100 - 150 мг, длиннейшей мышцы спины – 200–400 мг, стенки рубца – 400 мг.

Ход определения. В пробирки для инкубации вносят 1 мл малата, по 0,5 мл АТФ и $MgCl_2$ и 2 мл буфера. Время инкубации печени – 30–70 мин, длиннейшей мышцы спины – 140 мин, стенки рубца – 160 мин.

Активность ферментов выражают в наномолях (нм) формазана, образовавшегося за 1 мин инкубации на 1 г ткани или на 1 г белка.

Калибровочный график. Из основного раствора, содержащего 1 мкМ тетразолия в 1 мл раствора готовят серию разведений и восстанавливают его натрием сернистым (Na_2S). Образовавшийся формазан отделяют центрифугированием и растворяют в 10 мл ацетона. Через 1 час колориметрируют при соответствующей длине волны. При наличии формазана (тетразолиевый синий – диформазан, $C_{40}H_{34}N_8O_2$, молекулярная масса 658,78) растворяют его в ацетоне из расчета 1 мкмоль в 1 мл и делают серию разведений ацетоном. Через час фотометрируют и строят график.

Расчет активности ферментов. ΔE получают сразу, если фотометрируют против контроля, или вычитают значения контрольной пробы из опытной, если фотометрируют против воды.

$$\Delta E = E_o - E_k,$$

где E_o – экстинкция опытной пробы, E_k – экстинкция контрольной пробы.

По калибровочному графику находят концентрацию формазана, соответствующую найденному значению ΔE и активность ферментов рассчитывают по формуле:

$$X = A \cdot 1000/a \cdot v,$$

где A – количество нмоль формазана, найденного по калибровочному графику; 1000 – коэффициент для пересчета активности на 1 г ткани; a – количество ткани в пробе, мг; v – время инкубации в мин; X – активность фермента, нмоль формазана/мин/г.

Формула для расчета активности на 1 г белка:

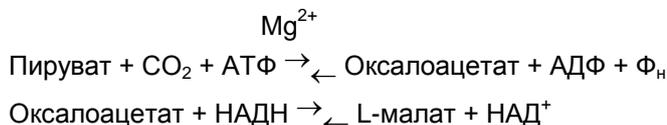
$$Y = X \cdot 1000/C,$$

где X – активность фермента на 1 г ткани; 1000 – коэффициент для расчета на 1 г белка; C – содержание белка в 1 г ткани, мг; Y – активность фермента, нмоль формазана/мин/г белка.

6. Определение активности пируваткарбоксилазы

Принцип метода. Пируваткарбоксилаза (ПК) – пируват:CO₂ лигаза (КФ 6.4.1.1) – первый ключевой фермент глюконеогенеза из пирувата. Это АТФ-зависимый, биотинсодержащий монофермент, состоящий из 4-х субъединиц, каждая из которых содержит по молекуле биотина. Биотин ковалентно связан с ферментным белком через эпсилон-аминогруппу остатка лизина, находящегося в активном центре фермента. Один из атомов азота биотина (при достаточном обеспечении процесса

АТФ) присоединяет углекислый газ и таким образом связывается с активным центром фермента, а затем переносится на пируват с образованием оксалоацетата. Для проявления максимальной активности пируваткарбоксилазы необходимо присутствие ацетил-КоА (аллостерический активатор ПК) и ионов магния.



Вторая реакция сдвинута вправо и при высокой концентрации восстановленного никотинамидадениннуклеотида, создаваемой в инкубационной среде и накоплении оксалоацетата она легко протекает в прямом направлении. Этому же способствует АТФ, создаваемая в инкубационной среде. Эти две реакции положены в основу метода определения активности пируваткарбоксилазы, а критерием является интенсивность окисления НАДН, количественно эквивалентного образованию малата из оксалоацетата.

Активность фермента определяют по убыли оптической плотности при окислении НАДН, которую измеряют при длине волны 340 нм. Метод предусматривает наличие в 1 мл среды инкубации 100 мкМ трис-НСI (рН 7,8), 10 мкМ трис-пирувата (рН 6,8), 1 мкМ АТФ (рН 7,0), 5 мкМ магния хлористого (MgCl_2), 15 мкМ калия углекислого кислого (KHCO_3), 0,225 мкМ НАДН, а также 0,1 мкМ ацетил-КоА, 5 ед. малатдегидрогеназы (14). Ферментативную реакцию проводят в термостатируемой спектрофотометрической кювете при 30°C. Реакцию начинают добавлением или фермента (гомогената), или MgCl_2 . Контролем служит проба без ацетил-КоА или лучше проба с 20-минутной преинкубацией и с избытком авидина (авидин, имея высокое сродство к биотину, соединяется с ним и ингибирует фермент).

Ацетил-КоА, малатдегидрогеназа, авидин – дефицитные дорогостоящие импортные реактивы. Направленность реакции карбоксилирования пирувата может быть обеспечена не только добавлением в инкубационную среду ацетил-КоА в сочетании с малатдегидрогеназой, но и за счет других активаторов фермента. Пируваткарбоксилаза активируется высокими отношениями АТФ/АДФ+P_i, ацетил-КоА/КоА, НАДН/НАД и наличием ионов Mg^{2+} . В то же время эти отношения являются ингибиторами пируватдегидрогеназы (значит, в данной ситуации будет ингибироваться окисление пирувата) и малатдегидрогеназы (также ингибируется окисление малата до оксалоацетата). Все это обеспечит направленность реакции карбоксилирования пирувата без дополнительного введения в среду инкубации ацетил-КоА и малатдегидрогеназы. Ингибирование активности пируваткарбоксилазы в контрольной пробе может достигаться не только за счет исключения введения в нее ацетил-КоА или 20-минутной преинкубации пробы с авидином, но и за счет исключения из среды инкубации активаторов фермента – АТФ, MgCl_2 и субстрата карбоксилирования KHCO_3 . На основании вышеизложенного предложены способы определения активности ПК без использования ацетил-КоА, малатдегидрогеназы и авидина.

Способ 1

Реактивы. 1. Трис-буферный раствор (трис-буфер) готовят из расчета 100 мкмоль в 1 мл (рН 7,8): растворяют 12,11 г трисгидрокси метиламинометана солянокислого (трис-НСI) в 80 мл воды (при приготовлении 100 мл буфера) и доводят до требуемого значения рН соляной кислотой под контролем рН-метра при постоянном помешивании (сначала добавляют осторожно по каплям концентрированную соляную кислоту до рН 7,4, после чего до нужного значения рН – 0,1 н НСI) и доводят в мерной колбе объем буфера до 100 мл; 2. Натрий пировинограднокис-

лый – из расчета 10 мкмоль в 1 мл инкубационной среды (доводят до pH 6,8 с помощью 0,1 н гидроокиси калия); 3. Аденозинтрифосфат (АТФ) – из расчета 1 мкмоль в 1 мл инкубационной среды (доводят pH 7,0 с помощью 0,1 н гидроокиси калия); 4. Магний хлористый – из расчета 5 мкмоль в 1 мл инкубационной среды; 5. Калий углекислый – из расчета 15 мкмоль в 1 мл инкубационной среды; 6. Восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (НАДН) готовят на трис-буфере, используемом в методе, из расчета 0,225 мкмоль в 1 мл инкубационной среды. Раствор АТФ готовят перед употреблением. НАДН может храниться в холодильнике до 10 дней. Остальные реактивы при хранении в холодильнике – до месяца и больше.

Оборудование. Спектрофотометр с термостатируемой кюветой; термостат с регулируемой температурой; pH-метр; центрифуга с охлаждением.

Подготовка исследуемого материала. Гомогенаты тканей готовят на холоде на бидистиллированной воде в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым или стеклянным пестиком.

Активность фермента зависит от метода определения, возраста животного, органа, из которого взята проба и в большей степени от вида животного, поэтому для анализа берут различные количества ткани: печени (крупный рогатый скот – 4–8 мг, свиньи – 8–20 мг, цыплята – 10 мг, мыши – 50 мг), стенки рубца – 4–20 мг, поджелудочной железы крупного рогатого скота – 4 мг, тонкого кишечника цыпленка – 10 мг, плазмы крови крупного рогатого скота – 12,5–200 мкл. В зависимости от этого гомогенаты готовят в соответствующих разведениях ткань:вода. Гомогенаты центрифугируют на холоду при режиме, достаточном для осаждения крупных частиц и просветления надосадка в течение 10 мин. Для анализа используют супернатант.

Ход определения. Объем инкубационной среды зависит от объема кюветы. При объеме кюветы 3 мл в нее вносят по 0,3 мл натрия пировинограднокислого, АТФ, $MgCl_2$, $KHCO_3$ и НАДН, 0,1 мл источника фермента (супернатанта) и 1 мл воды. При изменении объема кюветы соответственно меняется объем и концентрация вносимых реактивов, с учетом сохранения в инкубационной среде требуемых конечных концентраций реагентов. Можно перед проведением анализов приготовить соответствующие смеси в необходимых соотношениях реактивов, используемых для инкубации опытных и контрольных проб, и в кювету заливать непосредственно смеси реактивов, а не отдельные реагенты.

Определение оптической плотности ведут при длине волны 340 нм.

Если определение ведут на приборе с термостатируемой кюветой, то температуру инкубации поддерживают 30°C. Если такого прибора нет, то инкубацию лучше проводить при температуре 25°C. Для поддержания такой температуры (в зависимости от температуры окружающей среды) подогревают в термостате или охлаждают в холодной воде реактивы, используемые для среды инкубации. Например, температура в комнате 17–21°C – температура в термостате – 42–34°C. Опытным путем регулируют температуру термостата так, чтобы в кювете, подготовленной для внесения гомогената, она была 26°C (контролируют термометром). После внесения охлажденного гомогената температура снижается. Если температура воздуха выше 25°C, соответственно реактивы охлаждают.

В кювету вносят необходимые компоненты инкубационной среды, устанавливают ее в кюветной камере. Реакцию начинают внесением фермента и быстро перемешивают палочкой. Через 10 сек после внесения фермента проводят первый отсчет показания прибора (если вносят плазму крови, первый отсчет через 30 сек). Последующие интервалы отсчета – 15 сек. Контроль ставят к каждой пробе. Контролем служит проба без активаторов (АТФ и $MgCl_2$) и карбоксилирующего агента –

КНСО₃. Вместо этих растворов вносят такие же объемы воды. Остальные процедуры как и в опытной пробе.

Расчет активности фермента. Активность ПК выражают в мкМ НАДН, окисленного за 1 мин инкубации 1 граммом ткани или же в расчете на 1 г белка. Для расчета берут разность оптических плотностей, полученных за 1 минуту инкубации, в течение которой происходит ее линейное изменение в опытной и контрольной пробах:

$$\Delta E = \Delta E_{оп} - \Delta E_{к},$$

где $\Delta E_{оп}$ – изменение оптической плотности опытной пробы за 1 минуту инкубации; $\Delta E_{к}$ – изменение оптической плотности контрольной пробы за 1 мин инкубации.

Полученную разницу (ΔE) используют в дальнейших расчетах по формуле:

$$X = ((\Delta E \cdot 0,1/0,207) \times 1000) / a,$$

где 0,1 – коэффициент для пересчета на мкМ НАДН; 0,207 – оптическая плотность 0,1 мкМ раствора НАДН для толщины слоя 1 см; 1000 – коэффициент для расчета на 1 г ткани; а – количество ткани в пробе, мг; X – активность фермента, мкмоль НАДН/мин/г ткани.

Рассчитать активность фермента на 1 г белка можно по формуле:

$$Y = X \cdot 1000/C,$$

где X – активность фермента, рассчитанная на 1 г ткани; 1000 – коэффициент для расчета на 1 г белка, C – содержание белка в 1 г ткани, мг.

Способ 2

Этот способ отличается от первого тем, что реакцию ведут в пробирках и останавливают ее по способу, описанному для глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (15).

Реактивы. Дополнительно к реактивам, используемым в способе 1, используют: 1. Этанол 96%; 2. Натрий серноокислый 10% (вес/объем).

Ход определения. В химические пробирки (можно центрифужные) вносят 0,4 мл буфера, по 0,3 мл натрия пировинограднокислого, АТФ, MgCl₂, КНСО₃ и НАДН, 0,05 мл воды (в случае если конечный объем кюветы 2 мл), ставят в водяной термостат (температура 30°C). Преинкубируют 5 мин и строго через 10–15 сек вносят 0,05 мл фермента (супернатанта). В нем должно содержаться: печени 5 мг, а плазма крови должна быть разведена 1:4. Пробы перемешивают и по истечении 20 мин добавляют 2,5 мл этанола и снова перемешивают стеклянной палочкой. Затем добавляют 0,1 мл натрия серноокислого и хорошо перемешивают. После этого пробы помещают на 30 мин в холодную (ледяную) баню для формирования осадка. Если инкубацию проводили в химических пробирках, то перед помещением в холодную баню их содержимое переносят в центрифужные пробирки. Затем центрифугируют на холоду 20 мин при 700 г. Надосадочную жидкость осторожно сливают и фотометрируют при длине волны 340 нм. Контрольную пробу (ставят для каждого образца) проводят как опытную, только из инкубационной среды исключают активаторы фермента (АТФ и MgCl₂) и субстрат карбоксилирования (КНСО₃), а соответственно их объему вводят воду.

Расчет активности фермента. Активность фермента выражают в мкмольях НАДН, окисленного за 1 минуту инкубации в расчете на 1 г ткани или 1 г белка и рассчитывают следующим образом:

$$\Delta E = E_{к} - E_{оп},$$

где $E_{к}$ – оптическая плотность контрольной пробы; $E_{оп}$ – оптическая плотность опытной пробы.

$$X = ((\Delta E \cdot 0,1/0,207) \cdot 1000)/a \cdot v,$$

где 0,1 – коэффициент для расчета на 1 мкМ НАДН; 0,207 – оптическая плотность 0,1 мкМ раствора НАДН для толщины слоя 1 см; 1000 – коэффициент для расчета на 1 г ткани; а – количество ткани в пробе, мг; в – время инкубации, мин; X – активность фермента, мкмоль НАДН/мин/г ткани.

Можно вместо коэффициента молярной экстинкции НАДН построить калибровочный график раствора НАДН. По этому графику найти, какой концентрации НАДН соответствует полученное значение ΔЕ и рассчитать полученное значение (с учетом количества ткани, взятой для анализа, и времени инкубации) на 1 г ткани или 1 г белка.

Формула для расчета активности на 1 г белка дана в способе 1.

7. Определение активности лактатдегидрогеназы

Принцип метода. Лактатдегидрогеназа – ЛДГ (L–лактат:НАД-оксидоредуктаза; КФ 1.1.1.27) – гликолитический фермент, открытый Мейергофом в 1918 году, катализирует обратимую реакцию восстановления пировиноградной кислоты в молочную.

ЛДГ



ЛДГ широко распространена в организме животных и ее активность регистрируется в почках, сердце, скелетных мышцах, поджелудочной железе, печени, селезенке, легких, сыворотке крови и т.д.

Многочисленные варианты метода определения активности ЛДГ можно разделить на два типа – спектрофотометрические и колориметрические. Спектрофотометрические методы основаны на различии поглощения окисленной и восстановленной форм НАД (оптический тест Варбурга). Эти методы являются более чувствительными и специфичными. Колориметрические методы имеют два принципиальных различия. Одни варианты их основаны на регистрации скорости образования или убыли пировиноградной кислоты. Чаще для этих целей используют реакцию пировиноградной кислоты с 2,4-динитрофенилгидразином. Другие колориметрические методы (редоксиндикаторные) основаны на превращении бесцветной окисленной формы тетразолиевых солей в окрашенную восстановленную форму за счет окисления НАДН. Колориметрические методы более доступные, но менее точные.

Мы в своей работе после сравнительных испытаний остановились на использовании унифицированного спектрофотометрического варианта метода определения активности ЛДГ (16,17).

Реактивы. 1. Калия фосфат однозамещенный (чда, хч); 2. Калия фосфат двузамещенный 3-водный (чда); 3. Натрия пируват: содержание основного вещества не менее 99%; 4. Никотинамидадениндинуклеотид (НАД) восстановленный, динатриевая соль; 5. Фосфатный буфер 0,1 моль/л рН 7,4, содержащий раствор НАДН 0,165 мМ и раствор пирувата натрия 0,00103 моль/л. Реактив стабилен в течение суток при хранении в холодильнике и 8 часов при хранении при комнатной температуре; 6. Раствор натрия хлорида 154 мМ.

Оборудование. Спектрофотометр с термостатируемой кварцевой кюветой. При наличии можно использовать микрокюветы; полуавтоматические пипетки.

Подготовка проб к анализу. Для анализа используют свежую сыворотку или гепаринизированную плазму крови, свободную от следов гемолиза. Содержание ЛДГ в эритроцитах в 100 раз выше, чем в сыворотке. Поэтому при наличии в плазме или сыворотке следов гемолиза наблюдается существенное повышение результатов анализа. Анализ активности ЛДГ в пробах органов и тканей желательнее проводить в день получения образцов. При отсутствии этой возможности образцы органов

и тканей замораживают в жидком азоте и хранят для дальнейшего анализа при температуре -20°C . Для определения активности ЛДГ пробы размораживают и гомогенизируют в стеклянном гомогенизаторе желательнее с использованием тефлонового пестика. На 1 г ткани для гомогенизирования берут 9 мл ледяного 0,1М фосфатного буфера рН 7,4 или раствора хлорида натрия (реактив №6). Гомогенат центрифугируют 10 мин при 200 г и для дальнейшей работы используют супернатант.

Ход определения. Перед определением активности фермента температуру всех реагентов и анализируемых проб доводят до температуры измерения (25°C). В термостатированную кварцевую кювету спектрофотометра с толщиной слоя жидкости 1 см наливают 2,6 мл фосфатного буфера, содержащего НАДН и пируват (реактив №5). Реакцию начинают добавлением 100 мкл исследуемого образца; перемешивают, тотчас измеряют экстинкцию и одновременно включают секундомер. Точно через 1 и 2 минуты (можно с более короткими интервалами) измеряют экстинкцию в течение 10 мин. Измерение опытной пробы проводят против воды при 340 нм. Скорость реакции прямолинейна в первые 5–7 мин, после чего она начинает падать. Для оценки активности фермента учитывается именно линейный участок изменения скорости, когда в единицу времени происходит одинаковое снижение значения экстинкции. Если скорость снижения экстинкции велика, то необходимо сделать дополнительное разведение пробы буфером или раствором хлорида натрия.

Пример расчета активности ЛДГ. 1 г мышечной ткани гомогенизировали с 9 мл фосфатного буфера. После центрифугирования супернатант дополнительно развели буфером в соотношении 1:100. Для анализа в кювету спектрофотометра внесли 100 мкл разведенного супернатанта. В процессе анализа были зарегистрированы следующие значения экстинкции:

- исходное значение (E_0) = 0,900;
- через 1 мин (E_1) = 0,800;
- через 2 мин (E_2) = 0,700;
- через 3 мин (E_3) = 0,600;
- через 4 мин (E_4) = 0,500;
- через 5 мин (E_5) = 0,400;
- через 6 мин (E_6) = 0,330;
- через 7 мин (E_7) = 0,290.

Из приведенных данных видно, что через 5 мин скорость реакции начинает снижаться. Для расчета учитываем величину изменения экстинкции в течение первых 5 мин. Например: $(E_2 - E_4)/2 = (0,700 - 0,500)/2 = 0,100$ (ΔE). Комиссией по ферментам Международного биохимического союза рекомендовано, что за одну международную единицу активности любого фермента принимают такое его количество, которое соответствует превращению одного микромоля субстрата в 1 минуту при 25°C . В данном случае мы регистрировали окисление восстановленной формы НАД. Коэффициент молярной экстинкции раствора соответствует величине поглощения, которую дает 1 моль вещества, находящийся в 1 мл раствора, при измерении на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя измеряемого раствора 1 см. Коэффициент молярной экстинкции для восстановленной формы НАД равен $6,22 \cdot 10^{-6}$. Следовательно, изменение экстинкции на 0,622 означает, что произошло образование (или убыль) 0,1 мкмоль восстановленной формы НАД при расчете на 1 мл реакционной смеси. В нашем примере величина экстинкции изменялась со скоростью 0,100 в минуту. Объем инкубационной среды равен 2,7 мл. Проводим расчет по формуле:

$$X = E \cdot 0,1 \cdot V \cdot P / 0,622 = 0,1 \cdot 0,1 \cdot 2,7 \cdot 10000 / 0,622 = 434$$

где ΔE – изменение экстинкции за 1 мин; V – объем инкубационной среды; P – фактор разбавления во время гомогенизирования и дополнительного разведения во время анализа для пересчета на 1 г ткани; X – активность фермента, МЕ.

8. Колориметрический метод определения лактозы в молоке

Количественная информация о содержании лактозы в молоке необходима для исследования процессов лактации, так как именно лактоза, являясь главным осмотически активным веществом, определяет объем секреции молока. Существует множество разнообразных методов определения содержания лактозы. Большинство из них основаны на восстановлении сульфата меди до нерастворимого оксида меди. Последний определяется гравиметрически, титрованием с тиосульфатом натрия (18) или электролитическим осаждением из растворов азотной кислоты (22). Лактоза также определяется поляриметрически после депротеинизации йодистой ртутью. Многие методы основаны на цветных реакциях (19,20). Имеются и энзиматические методы (21).

Колориметрический метод определения лактозы, предложенный Телес с соавт. (23), по нашему мнению, является наиболее простым, быстрым, не требующим дорогостоящих реактивов и оборудования.

Принцип метода. Метод основан на комбинированном действии лактозы с фенолом, оксидом натрия, пикриновой кислотой и бисульфитом натрия. Количество образовавшегося окрашенного продукта определяют колориметрически при 520 нм.

Реактивы. 1. 4% раствор $\text{Ba}(\text{OH})_2$; 2. 5%-ный ZnSO_4 ; 3. Маточные растворы для приготовления реактива Телеса готовятся следующим образом в дистиллированной воде: 1%-ный фенол (устойчив), 5%-ный NaOH (устойчив), 1%-ная пикриновая кислота (устойчива), 1%-ный Na -бисульфит (готовится в день определения). Из этих растворов рабочий раствор готовят таким образом: к 1 объему раствора фенола добавляют 2 объема едкого натра, 2 объема пикриновой кислоты и 1 объем раствора гидросульфита натрия. После каждого добавления смесь следует тщательно перемешивать. Хранить рабочий раствор в темном флаконе; 4. Стандартный раствор лактозы. Для приготовления используют сухую лактозу из расчета 1 мл/мл или лактозу· H_2O из расчета 1,052 г в 1000 мл дистиллированной воды (хранить неделю в холодильнике).

Оборудование. Центрифуга, спектрофотометр или ФЭК, водяная баня, мерные колбы, пробирки.

Ход определения. 2,0 мл молока или молочной сыворотки переносят в 100 мл мерную колбу и доводят водой до метки. Перемешивают, после чего 2,5 мл разведенной пробы переносят в центрифужную пробирку, добавляют 0,2 мл 5%-ного сульфата цинка, затем 0,2 мл 4,5%-ного оксида бария. Перемешивают и центрифугируют 30 сек при 2500 об/мин или 1 мин при 1000 об/мин. Затем 10 мл прозрачного супернатанта переносят в сахарную (широкую) пробирку, добавляют 2,5 мл реактива Телеса, закрывают плотно сухой резиновой пробкой. Нижнюю часть пробирки (4–6 см) помещают в сильно кипящую водяную баню ровно на 6 мин, после чего быстро охлаждают в водопроводной воде. В зависимости от содержания лактозы в пробе в пробирку добавляют 12,5 мл или 25 мл дистиллированной воды. Тщательно перемешивают и колориметрируют при 520 нм против холостой пробы, в которой молоко заменяют водой. Окраска устойчива в течение 12 час. Сравнивают образцы молока со стандартным раствором лактозы.

Расчет содержания лактозы ведут по формуле:

$$C = E_0/E_{ст} \times 50,$$

где C – содержание лактозы, мг/мл; E_0 – экстинкция образца; $E_{ст}$ – экстинкция стандарта; 50 – коэффициент разведения молока.

Сахароза, этанол или ацетат не мешают определению.

Литература

1. Ермаков А.И. Методы биохимических исследований растений. Л., Колос, 1972.
2. Devendra C., Kewis D. Anim.Prod., 1973,17,3:275-280.
3. Van-Soest P.G. Ass.Off.Agric.Chem., 1963,43:829-835.
4. Salewski A., Seibold C., Froschee H. Landwirtsch. Forschung, 1974,27,2:112-113.
5. Clancy M.J., Wilson R.K. Proc.1nt crosland Congr.Helsinki, 1966, Sect.2, 22: 445-453.
6. Асатиани В.С. Новые методы биохимической фотометрии. М., 1965: 279.
7. Покровский А.А. Справочник " Биохимические методы исследования в клинике", М., 1969: 226.
8. Максаков В.Я., Дюкарев В.В., Минько Л.А., Сергеев В.М. Оценка качества комбикормов. М.:Колос, 1977: 79-81, 162.
9. Изучение пищеварения у жвачных. Методические указания. Боровск, 1987: 74-77.
10. Galati H. Enzym-immunologische Activitats Bestimmung von Peroxidase mit Hilfe des Trinder-Reagents. J.Clin.Chem.Clin.Biochem., 1977,15, 12: 699-703.
11. Gutman I., Wahlefeld A.W. L(+)-Lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD In: (H.U.Bergmeyer, ed) Methods of Enzymatic Analysis, 2nd ed., New-York and London, 1974.
12. Биохимические методы исследований в клинике. Справочник под ред. А.А.Покровского, М.:Медицина, 1969:230-231.
13. Путилина Ф.Е.,Ещенко Н.Д. Активность некоторых дегидрогеназ цикла Кребса в мозгу, печени и почках. Вестник ЛГУ, 1969,21:112-115.
14. Scrutton M.C.,Olmsted M.R.,Utter V.F. Pyruvate caeboxylase from chicken liver. Citric acid.cycle. In: Methods in Enzymology, 1969,8:235.
- 15.Glock G.E. and Mc Lean P. Futher studies on the properties and assay of glucose-6-phosphate, dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. Biochem,1953,55:400-408.
- 16.Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. Под ред. С.Е. Северина. М.:Высшая школа, 1971.
17. Лабораторные методы исследования в клинике. Под ред. В.В.Меньшикова. М.:Медицина, 1987.
18. Bright H.A. J.Res.Nat.Bur.Stds.,1937,19:691.
19. Narier J.R., Boulet M. J.Dairy Sci.,1959,42:1390.
20. Potter F.E. J.Dairy Sci., 1950,33:803.
21. Reikhel F.J. Methods of enzymatic analysis. Ed.Bergmeyer H.U.,1965, 2- nd Rev.Verlag Chemie.
22. Scherrer J.A., Bell C.K., Stull J.W. J.Dairy Sci.,1978,61:506.
23. Teles F.F., Young C.K., Stull J.W. J.Dairy Sci.,1978,61:506.

VIII. Методы анализа метаболитов и активности ферментов энергетического обмена

1. Определение валовой энергии вещества с помощью адиабатического калориметра

Принцип метода. Использовали принцип прямой калориметрии органических веществ при сжигании их в калориметрическом сосуде (бомбе), в атмосфере кислорода при 25–30 атм (1). Адиабатический калориметр исключает теплообмен между калориметрическим сосудом и окружающей средой за счет автоматической регуляции температуры воды во внешнем сосуде.

Реактивы. 1. Бензойная кислота (хч или чда) для периодической проверки удельной теплоемкости калориметра; 2. 0,1М раствор едкого калия; 3. Дистиллированная вода.

Оборудование. Адиабатический калориметр В-08-МА; баллон кислорода; сушильный шкаф; мельница; пресс для приготовления таблеток (брикетов); весы рычажные на 10 кг; водяная баня.

Отбор проб для анализа. Образцы грубых кормов измельчают ножами или лабораторной резкой до размера частиц не более 1 см, тщательно перемешивают, распределяют равномерным слоем и берут из разных (4–8) мест 50–100 г соломы или сена и не менее 200 г силоса или травы для определения воздушно-сухого вещества. Пробы жидких кормов, по 500 г от каждого объема, предварительно выпаривают на водяной бане и после подсыхания помещают в термостат при температуре 63–65°C. Пробы картофеля и свеклы (не менее 1 кг) предварительно очищают от земли, затем измельчают и берут навески для определения первоначальной влажности и воздушно-сухого вещества в количестве 300–500 г. Пробу концентратов (500–1000 г) распределяют тонким слоем на столе и берут из 4–8 мест по 100 г для определения воздушно-сухого вещества и первоначальной влажности при температуре 63–65°C. Пробу кала на анализ берут из тщательно смешанных среднесуточных образцов в количестве 300–500 г и высушивают в термостате при температуре 63–65°C.

Пробу гомогената целого организма животного или отдельных органов и тканей берут в количестве 50–100 г (и меньше) и высушивают в термостате также при температуре 63–65°C. Пробы крови берут при убое животных или из магистральных сосудов в количестве, необходимом для анализа влажности и сухого вещества.

Из средней пробы мочи после тщательного перемешивания берут 10–50 мл для определения сухого остатка; мочу высушивают в фарфоровых чашках вначале на водяной бане, затем в термостате.

Определение воздушно-сухого вещества. Навеску корма, кала, других образцов помещают в фарфоровую, стеклянную или жестяную тару размером 15–20 см. Жидкие корма, молоко, мочу берут в фарфоровые чашки диаметром 10–15 см и помещают в термостат на 6–8 часов, затем охлаждают 1–2 часа при комнатной температуре и взвешивают с точностью до 10 мг; снова ставят в термостат на несколько часов, затем охлаждают, взвешивают и так до постоянной массы, повторяющейся при очередном взвешивании. Температура в термостате поддерживается на уровне 63–65°C.

Процентное содержание сухого вещества вычисляют по формуле:

$$X = (X_1 - X_2) \cdot 100 / X_1,$$

где X_1 —первоначальная масса навески; X_2 — разница в массе пробы до и после высушивания.

Подготовка проб для сжигания в калориметрической бомбе. После определения воздушно-сухого вещества исследуемые пробы размалывают и просеивают через специальное сито, чтобы размер частиц

не превышал 0,5 см. Для размолва образцов используют мельницы различных систем. Образцы костной ткани предварительно дробят. Размолотые образцы пересыпают в банки с притертыми крышками, на банку наклеивают этикетку, где указывают дату и номер опыта, название образца, его характеристику по воздушно-сухому веществу.

Хранение размолотых образцов до проведения анализа должно проводиться с учетом многих факторов. В первую очередь на содержание энергии анализируются гомогенаты органов и тканей, моча, кровь, жидкие и полужидкие корма, а также корма, содержащие много липидов. Более длительное время (до года) могут храниться образцы кала и кормов. Однако при длительном хранении влажность образца может измениться, а поэтому перед анализом его необходимо подсушить в термостате при температуре 63–65°C в течение 1–2 часов.

Непосредственно перед анализом содержания валовой энергии из размолотых образцов корма и кала изготавливают таблетки массой 0,7–0,8 г. Таблеточный пресс располагается на столике калориметра. Для изготовления таблеток нужной массы сжигаемый материал предварительно взвешивают на технических весах, а изготовленные таблетки взвешивают на аналитических весах и хранят каждую отдельно в бюксах. Для проведения анализа достаточно трех таблеток одного вещества.

Если вещество богато жиром (свыше 10% от сухого вещества) и возможна его потеря при прессовании, то его предварительно экстрагируют и определяют количественно. Сжигание жиров проводят непосредственно в тигле. Жидкие жиры можно сжигать, пропитывая ими спрессованную таблетку целлюлозы. Твердые и жидкие жиры следует предварительно растворить в эфире, петролейном эфире или хлороформе, затем пропитать этим раствором таблетку целлюлозы и подсушиванием удалить растворитель.

Для определения содержания энергии в моче берут 10 г исследуемой мочи, помещают ее в фарфоровую чашку, куда также кладут высушенную до постоянной массы таблетку целлюлозы массой 0,5–0,7 г. Высушивая при температуре 30°C, сухое вещество мочи периодически смывают дистиллированной водой со стенок чашки и собирают на таблетку, приготовленную из чистой целлюлозы. Теплота сгорания таблетки вычитается из общего результата. При определении калорийности мочи ошибки происходят от потери азота при высушивании. Для определения потерь азота высушивание мочи проводится в вакуум-эксикаторе с концентрированной серной кислотой (10–15 мл), которая улавливает пары аммиака. Затем содержание азота в серной кислоте определяют по Кьельдалю.

Молоко и кровь в количестве 5–10 г вносят для сжигания непосредственно в тигель и высушивают в вакуум-эксикаторе с серной кислотой при комнатной температуре. Можно также использовать метод пропитывания исследуемым веществом таблетки химически чистой целлюлозы.

Техника калориметрических измерений. Калориметр В-08-МА предназначен для определения теплоты сгорания твердых, жидких и газообразных органических веществ. Перед проведением исследований необходимо определить теплоемкость калориметра. Для этого подготавливают 3–4 брикета бензойной кислоты массой 1,001–1,010 г каждый, взвешенные с точностью до 0,0002 г. Брикет помещают в тигель, который находится в кольце держателя крышки, установленной на специальной подставке. Электроды держателя соединяют стандартной запальной проволокой с известной величиной теплоты сгорания. Один из концов проволоки проходит через отверстие брикета. В цилиндр бомбы заливают 1 мл дистиллированной воды. Далее завинчивают крышку бомбы и заполняют ее кислородом из кислородного баллона с предварительной продувкой в течение 2 мин при давлении 0,5 атм. Затем закрывают выпускной клапан и наполняют бомбу кислородом при

давлении 29,4 атм. Контроль ведут по манометру – при избытке давления срабатывает перепускной клапан манометра. Отсоединяют кислородпроводящую трубку от впускного клапана бомбы. К электродам крышки бомбы подсоединяют проводники, другие концы которых присоединяют к клеммам крышки калориметрического сосуда. С помощью винта бомбу переносят в калориметрический сосуд, заполненный водой так, чтобы верхние части бомбы были полностью погружены в воду (3000–3100 мл воды). Температура воды в сосуде должна быть не более 24,5°C. Сосуд закрывают крышкой и взвешивают с точностью до 0,5 г. Сосуд устанавливают в гнездо калориметрического кожуха. Подсоединяются контакты проводников цепи зажигания и разъем нагревателя к гнездам, имеющимся на сосуде. Пускают охлаждающую воду через калориметр, включают шнур питания в сеть 220 вольт, 50 Гц и последовательно нажимают кнопки "сеть", "мешалки", "осветитель термометра", "вибратор", "зуммер". Гнездо сосуда закрывают крышкой и устанавливают термометр Бекмана в специальное гнездо. Включают нагреватели, которые нагревают воду в оболочке до 27,5°C, что регулируется контактным термометром автоматически, о чем свидетельствует периодическое отключение сигнальной лампочки (кнопка "нагреватели оболочки"). Затем включают нагреватель калориметрического сосуда (кнопка "нагреватель сосуда"). При достижении температуры воды в калориметрическом сосуде $24,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$ (отметка 0,4 по шкале термометра) выключают нагреватель нажатием кнопки нагревателя сосуда.

Отсчет показателей термометра проводят в три периода: начальный, главный и конечный. Показатели снимают по последним (третьим) звуковым сигналам. После наступления равномерного изменения температуры воды в калориметрическом сосуде от значения $25,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$ (отметка 1,2 по шкале термометра или 0,800 вольт по вольтметру), отсчитывают 10 показателей в начальный период, на одиннадцатом отсчете необходимо нажать кнопку "зажигание". В главный период отсчитывают 20 показателей с учетом одиннадцатого отсчета начального периода. В конечном периоде отсчитывают 10 показателей по шкале термометра.

После снятия отсчета выключают все кнопки и вилку шнура питания из сети, снимают термометр, крышку, отсоединяют провода от сосуда, вынимают сосуд из гнезда кожуха и бомбу из сосуда, снимают провода, бомбу закрепляют на подставке, выпускают газ через выпускной клапан. Отвинчивают крышку бомбы, снимают остатки запальной проволоки и взвешивают с точностью 0,0002 г. Цилиндр бомбы смывают дистиллированной водой, сливают в стакан и титруют 0,1 н раствором едкого калия в присутствии метиленового красного с целью определения поправок на образование азотной кислоты.

Калориметрическую бомбу и тигель промывают горячей водой, затем дистиллированной, протирают и высушивают при открытых клапанах.

Обработку результатов проводят с учетом начальной и конечной температуры главного периода; $K = 1^\circ\text{C}/\text{В}$ в диапазоне измерений 0–5 вольт. Эффективная теплоемкость калориметра считается нормальной в пределах от 14850 до 15150 Дж/К, а предел погрешности ее определения не превышает 0,1%.

Удельную теплоту сгорания вещества определяют по формуле:

$$Q = C \cdot \Delta T / m ,$$

где C – эффективная теплоемкость калориметра; ΔT – изменение температуры калориметрической системы; m – масса образца вещества.

2. Метод расчета баланса энергии у животных

Принцип метода. Для продуктивных животных при кормлении их на уровне поддержания и выше возможно применение закона сохранения

энергии относительно энергии, поступающей с кормом, выделенной с калом, мочой, газами, образовавшейся в желудочно-кишечном тракте и в процессах тканевого обмена (с учетом энергетических эквивалентов), и энергии, выделенной с продукцией (молоко и др.) и отложенной в организме животного (прирост массы и др.). Расчет баланса энергии позволяет определить потребность животных в энергии и установить содержание доступной для усвоения энергии в кормах и рационах. Энергия поступает в организм животных с органическими веществами корма. Выделяется энергия из организма с калом, мочой, молоком, в виде тепла с поверхности тела, с выдыхаемым воздухом, с недоокисленными газообразными веществами (метан, сероводород и др. газы). Для расчета баланса энергии в животном организме необходимы следующие показатели: валовая энергия корма; валовая энергия кала; энергия переваримых питательных веществ; энергия метана; теплота ферментации; суммарная энергия субстратов, доступных для усвоения; энергия мочи; обменная энергия; теплопродукция тканевого метаболизма; энергия продукции (молоко, прирост массы и др.).

Ход определения. Для определения баланса энергии используют следующие приемы: калориметрические измерения валовой энергии, содержащейся в кормах, кале, моче, молоке, продуктах убоя животных; определение величины суточной теплопродукции животных масочным методом или в респирационных камерах по потребленному кислороду и выделенной двуокиси углерода с учетом дыхательного коэффициента; определение потерь энергии с метаном и другими газами.

При проведении исследований в респирационной камере учитывают все количество двуокиси углерода, образовавшейся в желудочно-кишечном тракте и в процессах тканевого обмена. Но при этом величина дыхательного коэффициента оказывается завышенной. Объективную оценку дыхательного коэффициента получают при изучении легочного газообмена масочным методом. Двуокись углерода, образующаяся в желудочно-кишечном тракте при этом не учитывается, а величина суточной теплопродукции тканевого метаболизма позволяет рассчитать "скорректированную" обменную энергию в животном организме.

Количество двуокиси углерода, образовавшейся в желудочно-кишечном тракте у жвачных, эквивалентно теплоте ферментации. На основе стехиометрических расчетов принимают, что 1 л двуокиси углерода эквивалентен 12 кДж энергии.

Количество энергии, содержащейся в метане, определяют прямой калориметрией или рассчитывают по калорическому эквиваленту, который равен 39,5 кДж/л метана.

Уровень обменной энергии у животных определяют на основе баланса энергии с учетом его основных показателей. До настоящего времени используют величины "нескорректированной" и "скорректированной" обменной энергии. Первую рассчитывают из валовой энергии рациона путем вычитания потерь энергии с калом, мочой и метаном. Вторую величину рассчитывают путем дополнительного вычитания из "нескорректированной" обменной энергии поправки на теплоту ферментации, которая значительно варьирует в зависимости от соотношения питательных веществ в рационе, доступности углеводов и протеина корма для микроорганизмов в преджелудках жвачных и ряда других факторов. "Скорректированную" обменную энергию можно рассчитать и путем суммирования величин теплопродукции тканевого метаболизма и энергии продукции ($OЭ = Tп + Э \text{ прод.}$).

Обменная энергия в животном организме не всегда соответствует величине обменной энергии потребленного корма. Так, у коров в начальный период лактации наблюдается дополнительная мобилизация энергии из жировых депо, которая включается в обменные процессы, в том числе используется на синтез молока.

Пример расчета баланса энергии у лактирующих коров приведен в таблице.

Таблица

Баланс энергии у лактирующих коров, Мдж/сут

Показатели	Опыт I	Опыт II
Валовая энергия корма	292,0	288,9
Валовая энергия кала	97,7	99,8
Энергия переваримых питательных веществ	194,3	189,1
Энергия метана	17,9	19,8
Теплота ферментации	15,1	16,1
Суммарная энергия субстратов, доступных для усвоения	161,3	152,2
Энергия мочи	6,6	6,3
Обменная энергия корма	154,7	146,9
Теплопродукция тканевого метаболизма	90,1	109,0
Энергия удоя	44,3	41,3
Отложение или мобилизация энергии в организме(+, -)	+ 20,3	- 3,4
Обменная энергия в животном организме	154,7	150,3

3. Определение процентного содержания кислорода и двуокиси углерода во вдыхаемой и выдыхаемой газовой смеси масс-спектрометрическим методом

Принцип метода. Кислород и двуокись углерода определяют на масс-спектрометре МК-6202, который предназначен для одновременной регистрации процентного содержания кислорода и двуокиси углерода в газовых смесях. Прибор имеет систему забора пробы, аналитическую систему и электронный блок записи результатов измерений. По принципу действия масс-спектрометр является радиочастотным прибором. Небольшая часть газовой смеси через капилляр подается в анализатор, где молекулы газа ионизируются электронным пучком в области источника ионов. Образовавшиеся ионы с массовыми числами 32 а.е.м. (кислород) и 44 а.е.м. (двуокись углерода) разделяются из общего потока под воздействием постоянных и высокочастотных электрических полей. Ионные токи записываются на ленте записывающего блока (2).

Калибровка прибора. Перед началом работы проводят калибровку прибора по воздуху и газовым смесям. Для калибровки прибора по воздуху переключают тумблеры в положение "работа" и шкалы на 100%. Ручкой "калибровка O₂" выставляют самописец на 21% при токе высокого вакуума, равном 56 мка. Переключают шкалу по кислороду на 10% и ручками "смещение" устанавливают перо самописца на необходимое положение. По шкале анализа двуокиси углерода устанавливают нуль. Затем проводят калибровку прибора с использованием газовых смесей, содержащих различные концентрации кислорода и двуокиси углерода. Через капилляр проводят запуск смеси, содержащей двуокись углерода в концентрации, близкой к конечному значению шкалы. Ручкой "калибровка CO₂" перо самописца устанавливают на конец шкалы, а ручкой "смещение CO₂" устанавливают нуль при запуске воздуха или газовой смеси, не содержащей двуокиси углерода (эту операцию проводят несколько раз). Калибровка прибора по кислороду проводится по двум смесям, содержащим 10 и 20% кислорода. Погрешность в измерении концентрации не превышает ±0,25% объема.

Ход определения. Пробу исследуемой газовой смеси отбирают в стеклянный газоприемник. Для анализа пробу газовой смеси вытесняют из газоприемника в капилляр масс-спектрометра. Устанавливают ручку переключателя в положение "высокий вакуум", включают прибор в сеть 220 в, проверяют высокий вакуум (он должен быть не более 20 мка), проверяют форвакуум (не более 40 мка), включают клапан (включение сопровождается звуком срабатывающего электромагнита), открывают

ручкой вентиль, снимают колпачок с капилляра, еще раз проверяют высокий вакуум вторым включением клапана (ток должен быть не более 80 мка), включают катод.

Включают самописец при скорости 1 мм/сек и при отключенных штекерах устанавливают перья на середину шкалы; переключают тумблер в положение "нуль", а тумблер по кислороду в положение 100% и перо на нулевую отметку. Ручки «смещение» ставят в крайнее правое положение. Тумблеры переключают в положение 10% (перо по кислороду ставят на 80% шкалы), а по двуокиси углерода перо ставят на 10%. В течение 25–30 сек проводят анализ изучаемой газовой смеси.

Расчет процентного содержания кислорода и двуокиси углерода проводят путем сопоставления полученных данных с результатами калибровки прибора газовыми смесями известного состава.

4. Определение концентрации метана и двуокиси углерода оптико-акустическим методом

Принцип анализа. Газоанализаторы оптико-акустические ОА 2309М и ОА 2209М предназначены для непрерывного измерения объемной концентрации метана и двуокиси углерода в газовых смесях, содержащих азот, кислород, метан и двуокись углерода (3). Приборы пригодны для анализа газовых смесей при проведении респираторных исследований в камерах на крупных животных. В газоанализаторах использован оптико-акустический принцип анализа газов, основанный на способности метана и двуокиси углерода к поглощению энергии в инфракрасной области спектра (метан – 3,3–7,65 мкм; двуокись углерода – 2,7–4,3 мкм). Для регистрации измеряемой концентрации газов использован акустический метод, улавливающий разность переменных давлений газов, возникающих при их нагревании, что преобразуется конденсаторным микрофоном в электрический сигнал и записывается самописцем.

В респираторной камере предельная концентрация метана не должна превышать 0,1%, а двуокиси углерода – 0,5%, что обеспечивают скоростью откачивания воздуха из камеры. Поэтому рабочими параметрами газоанализаторов будут указанные выше концентрации.

Ход определения. Перед началом работы ведут подготовку анализаторов, для чего их включают в сеть и прогревают 3 часа. Затем проверяют нулевое показание газоанализаторов, пропустив через прибор воздух или азот при расходе $0,008 \pm 0,0033$ л/с (0,5 л/мин). Далее проверяют показания газоанализаторов по контрольным газовым смесям, содержащим измеряемый компонент в количестве, соответствующем $70 \pm 3\%$ от верхнего предела измерений, и азот – остальное. Регулировку расхода контрольной смеси осуществляют вентилем точной регулировки, установленным на баллоне, по ротаметру РС-3А. Показания контролируют в течение 10–20 мин по записи на диаграммной ленте самописущего прибора, после чего приборы подключают к анализу газовых смесей, поступающих из респираторной камеры.

При проведении респираторных исследований рассчитывают не только концентрации метана и двуокиси углерода, но и количество этих газов, выделенных животным за сутки. Для этого учитывают общее количество газовой смеси, поступившее из респираторной камеры за сутки. Эти данные необходимы для оценки энергетического обмена у животных и эффективности использования энергии корма. Продукция метана приводит к снижению эффективности использования энергии корма животными. Например, лактирующие коровы в среднем за сутки выделяют 400–600 л метана, что снижает энергетическую питательность рациона на 6–8%.

5. Исследование тканевого энергетического обмена

5.1. Манометрический метод Варбурга

Манометрический метод Варбурга позволяет изучать энергетический обмен на тканевом, клеточном и субклеточном уровнях. Установлено, что интенсивность окисления в изолированных тканях сопоставима с таковой в интактном организме животных, что позволяет определить вклад отдельных тканей и органов в общую энергетику организма. Методика позволяет количественно определить потребление кислорода и выделение углекислого газа в тканях и, что особенно важно, процессы окисления и фосфорилирования на уровне изолированных митохондрий.

Калибровку сосудиков с манометрами производят ртутью или водой. С помощью стеклореза наносят постоянную метку приблизительно на 1 см выше шлифа, соединяющего сосудик с манометром. Взвешивают пустой сосудик. Наполняют его чистой ртутью и затем насаживают на сухой шлиф манометра. Если при этом оказывается, что ртути слишком много или мало, чтобы подняться точно до метки, сделанной на капилляре манометра, то ее удаляют или приливают, пользуясь капиллярной пипеткой, до тех пор, пока при плотном соприкосновении поверхности шлифов ртуть точно достигает метки. Снимают сосудик с манометра, определяя температуру ртути, взвешивают сосудик с ртутью и определяют объем сосуда до метки. Далее аналогично определяют объем капилляра манометра от метки до деления 250 мм на шкале. Объем вычисляют посредством деления найденной массы ртути на ее плотность при измеренной температуре. Сумма объемов сосуда и манометра до деления 250 мм за минусом объема жидкости, которая будет находиться в сосудаке, дает значение, которое следует использовать в уравнении, чтобы определить константу сосудака.

Вычисление константы сосудака сводится к такому калиброванию системы, которое дает возможность из наблюдающихся изменений давления вычислить количество потребленного или выделившегося газа в микролитрах. Применяются следующие обозначения: h – наблюдавшееся по манометру (открытое левое колено) изменение давления в мм, K – константа сосудака; X – количество газа, мл газа (0° ; 760 мм рт. ст.), V_g – объем газового пространства сосудака, включая объем капилляра манометра до нулевой точки (250 мм на закрытом правом колене манометра), V_f – объем жидкости в сосудаке, P_0 – 760 мм Hg (стандартное давление), выраженное в миллиметрах манометрической жидкости, a – растворимость исследуемого газа в жидкости сосудака, выраженная в мл газа/мл жидкости при условии, что количество газа измерено при давлении в 1 атм (760 мм Hg) и температуре T ; T – температура ванны в градусах абсолютной шкалы. Константа вычисляется по формуле:

$$K = (V_g \cdot 273/T + a \cdot V_f) / P_0$$

Пример: $V_f = 3,2 \text{ мл} = 3200 \text{ мкл}$;

$V_g = \text{общий объем} - \text{объем жидкости} = 12,616 - 3,2 = 9,416 \text{ мл} = 9416 \text{ мкл}$;

$T = 273 + 28 = 301$;

$a = 0,027$;

$P_0 = 10000$.

$K = (9416 \times 273 / 301 + 3200 \times 0,027) / 1000 = (8540 + 86) / 10000 = 0,863$

Определив константу, получаем возможность на основании найденного изменения давления в мм вычислить потребление O_2 в мкл по формуле $X = h \cdot K$.

5.2. Изучение тканевого дыхания

Изучение потребления тканями кислорода производят на срезах, в кашицах, гомогенатах, а также на эритроцитах птиц, имеющих в своем

составе ядро. Каждый из этих методов имеет свои достоинства и недостатки. В срезах тканей клетки травмируются меньше. В кашицах травмирование клеток зависит от степени измельчения. В гомогенатах клеточная структура разрушена. Преимущество метода гомогенатов по сравнению с методом тканевых срезов состоит в том, что здесь отсутствует тормозящая проницаемость клеточной мембраны. При проведении исследований ткань берут сразу же (не позже 10 мин) после убоя животного и непрерывно проводят все процедуры по приготовлению срезов, кашиц, гомогенатов, выделению эритроцитов и дальнейшей инкубации в аппарате Варбурга. Иногда используют ткань, полученную методом биопсии. Время инкубации зависит от интенсивности поглощения кислорода в пределах 30–60 мин.

Исследование потребления кислорода тканевыми срезами. Ткань, извлеченную после убоя животного, помещают в чашки Петри с увлажненной фильтровальной бумагой, находящиеся на льду. Срезы готовят с помощью обыкновенной бритвы или лезвия так, чтобы толщина параллельных срезов была одинаковой и не превышала 0,2 мм. Полученные срезы помещают в охлажденный физиологический раствор. Из раствора срезы вынимают пинцетом, осушают фильтровальной бумагой и взвешивают на заранее приготовленных розетках из фильтровальной бумаги диаметром 15–20 мм. Рекомендуется работать с одинаковыми навесками ткани (около 100 мг).

В заранее приготовленный сосудик с 10%-ным раствором КОН или NaOH в центральном или боковом цилиндре помещают срез ткани с 2 мл изотонического раствора, чаще всего Кребс-Рингер-фосфата. В состав Кребс-Рингер-фосфата входят: натрий хлористый 0,9% (0,154M); калий хлористый (0,154M); кальций хлористый (0,11M); однозамещенный фосфорнокислый калий (0,154M); сернокислый магний, гидрат (0,154M); 0,1M фосфатный буфер pH 7,4 (17,8 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 20 мл 1 н HCl разбавляют до 1 л). Для получения рабочей смеси эти растворы смешивают в соотношениях 100:4:3:1:1:2.

После помещения среза и Кребс-Рингер-фосфата в сосудик наливают 0,2 мл 10%-ного раствора глюкозы, соединяют сосудик с манометром и опускают в водяную ванну аппарата Варбурга с температурой 37,5°C. Через 10 мин выравнивания температуры устанавливают уровень манометрической жидкости на нулевую точку (250 мм), перекрыв кран манометра, фиксируют время начала инкубации, включают качание панели, на которой зафиксированы манометры с сосудиками. Через 60 мин качание панели останавливают, определяют изменение уровня манометрической жидкости в капиллярах манометров и записывают данные в журнал. Если одновременно изучают гликолиз, то сосудики ставят на лед и определяют интенсивность гликолиза.

Техника работы с тканевыми кашицами. Для получения тканевой кашицы кусочек ткани измельчают ножницами на охлажденном часовом стекле. Полученную кашку делят на несколько порций, каждую помещают в заранее приготовленную розетку из фильтровальной бумаги и взвешивают. Навески следует брать одинаковые, равные 100–300 мг кашицы. Заполнив сосудики 2 мл Кребс-Рингер-фосфата и 0,2 мл глюкозы, а их дополнительные части щелочью, помещают розетки с кашкой, слегка перемешивают стеклянной палочкой, а затем проводят инкубацию и другие процедуры так же, как и с тканевыми срезами. Расчет потребления кислорода проводят на массу влажной или сухой ткани и на белок.

Техника работы с гомогенатами тканей. Ткань измельчают в гомогенизаторе с охлаждением. Наиболее удобными являются гомогенизаторы типа Уоринга и Поттера. Для приготовления гомогената используют часто раствор Кребс-Рингер-фосфата в соотношении 1 часть ткани:9 частей раствора pH 7,4. Приготовление гомогената проводят быстро

на холоду. В сосудики наливают гомогенат в количестве 2 мл, добавляют 0,2 мл 10%-ной глюкозы и инкубируют при 37°C в течение 30–40 мин.

Определение дыхания эритроцитов. В основу взята методика, описанная И.Ф.Сейцем (4). Взвесь выделенных эритроцитов в объеме, соответствующем 2 мл крови, инкубируют в 2 мл Кребс-Рингер-фосфатного буфера с добавлением 0,2 мл 10%-ного раствора глюкозы в аппарате Варбурга. В сосудики с пробами, предназначенными для изучения анаэробного гликолиза, вводят KCN до конечной концентрации 5 мкМ. Инкубацию проводят при температуре 37,5°C в течение 60 мин. Газовой фазой является атмосферный воздух. Количество поглощенного кислорода рассчитывают в микромолях и микролитрах на объем эритроцитов, соответствующих 1 мл крови.

Изучение интенсивности анаэробного дыхания (гликолиза). Гликолиз определяют по приросту молочной кислоты в среде инкубации тканей. Исследования проводят на срезах, кашацах, эритроцитах птиц в аэробных и анаэробных условиях и в сосудиках Варбурга. Для создания анаэробных условий используют газообразный азот или цианистый калий, который добавляют в инкубационную среду до конечной концентрации 5 мкМ. Условия инкубации те же, что и при изучении дыхания с той лишь разницей, что дополнительно берут сосудики и туда вводят все компоненты, что и в сосудиках, которые помещают в аппарат Варбурга для инкубации, а дополнительные не инкубируют. Эти сосудики необходимы для определения прироста молочной кислоты за время инкубации проб.

5.3. Определение молочной кислоты (5)

Принцип метода. Молочная кислота при кипячении в концентрированной серной кислоте разлагается до ацетальдегида, который при взаимодействии с параоксидифенилом в присутствии серной кислоты образует продукт фенольной конденсации, окрашивающийся в фиолетовый цвет. Интенсивность окраски пропорциональна количеству ацетальдегида, а, следовательно, и количеству молочной кислоты.

Реактивы. 1. Трихлоруксусная кислота (ТХУ) 5%-ный раствор; 2. Сернокислая медь, 4%- и 20%-ный раствор; 3. Гидроокись кальция, Ca(OH)₂; 4. Серная кислота (уд.в. 1,84); 5. п-оксидифенил 1,5%-ный раствор в 5%-ном едком натрии (хранится 2–3 недели); 6. Лактат лития, кальция или цинка для стандартного раствора.

Ход определения. После инкубации ткани в аппарате Варбурга содержимое сосудиков со срезами мышечной ткани гомогенизируют. Аналогично поступают перед опытом со срезами мышцы и остальным содержимым сосудиков, которые не инкубировались. Гомогенат (с 2 мл Кребс-Рингер-фосфата, используемого для лучшего смывания содержимого из сосудиков) переливают в центрифужные пробирки, в которые предварительно наливают по 6 мл 5%-ной ТХУ для осаждения белка. Содержимое этих пробирок перемешивают стеклянной палочкой и выдерживают 30 мин при комнатной температуре, затем снова перемешивают и центрифугируют 10 мин при 5000 об/мин. В пробирки берут 2,5 мл центрифугата, 1,5 мл дистиллированной воды, 1 мл 20%-ного раствора сернокислой меди, добавляют 0,5 г Ca(OH)₂, тщательно перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 30 мин. Затем центрифугируют в течение 10 мин при 5000 об/мин. Берут 0,5 мл центрифугата, добавляют 1 каплю 4%-ного раствора сернокислой меди, приливают 3 мл охлажденной химически чистой H₂SO₄, перемешивают, ставят на 5 мин в кипящую водяную баню, охлаждают до 20°C, добавляют 0,5 мл 1,5%-ного раствора параоксидифенила в 5%-ном растворе химически чистого NaOH. Содержимое тщательно перемешивают и помещают в водяную баню на 30 мин при 30°C. Потом ставят в кипящую водяную баню на 90 сек, охлаждают и определяют экстинкцию на ФЭКе с красным светофильтром №6.

Ввиду низкого содержания молочной кислоты в печени по сравнению с мышцей, берут 3 мл 5%-ной ТХУ. Кроме того берут не 2,5 мл, а 4 мл центрифугата (вместо 1,5 мл воды берут центрифугат). Все остальное делают так же, как и с мышцей.

С эритроцитами, при изучении гликолиза, поступают следующим образом. После инкубации в сосудик с эритроцитами добавляют 6 мл 5%-ной ТХУ и переливают в центрифужные пробирки. Смывание из сосудиков производят 2 мл воды. Необходимо брать 2,5 мл центрифугата, 1,5 мл воды и 1 мл 20%-ного раствора химически чистой сернокислой меди. Все остальное делают так же, как и при работе с тканями.

Расчет. Содержание молочной кислоты определяют по калибровочному графику.

5.4. Изучение окислительного фосфорилирования манометрическим методом

Все процедуры, связанные с выделением митохондрий, проводят при температуре 0—+2°C. После убоя методом декапитации у животных немедленно извлекают ткани и помещают их в стакан с предварительно охлажденной средой выделения. После охлаждения и промывания берут навески для приготовления гомогената. Для печени и поджелудочной железы в качестве среды выделения используют 0,25М раствор сахарозы с 0,001М ЭДТА, а для грудной мышцы применяют солевой раствор 0,1М КСl, куда добавляют 0,05М трис-буфер и 0,001М MgCl₂.

Полученные гомогенаты тканей центрифугируют в рефрижераторной центрифуге при температуре около 0°C в течение 10 мин при 650 g. При этом осаждаются неразрушенные клетки, клеточные оболочки, ядра, эритроциты и др. Из полученного центрифугата митохондрии осаждают повторным центрифугированием в течение 10 мин при 10000 g.

Выделенные митохондрии печени и поджелудочной железы суспендируют в 0,25М сахарозе, а митохондрии грудной мышцы – в среде выделения, содержащей 0,1М КСl, 0,05М трис-буфер и 0,001М MgCl₂.

Изолированные митохондрии инкубируют в аппарате Варбурга при 28°C в течение 20 мин. Инкубационная смесь (2 мл) содержит субстрат окисления – 30 мкМ сукцината, 10 мкМ MgCl₂, 40 мкМ КН₂РO₄, 4 мкМ АТФ или АДФ, 100 мкМ КСl, 120 мкМ глюкозы, 0,5 мг гексокиназы, митохондрии из 100 мг печени или 500 мг грудной мышцы. Для митохондрий дополнительно в инкубационную среду вносят 0,04 мкМ цитохрома С и, в большинстве случаев, в качестве субстрата окисления используют альфа-кетоглутаровую кислоту. Условия инкубации митохондрий поджелудочной железы аналогичны печени. Инкубационные смеси имеют рН 7,4, газовая фаза – воздух.

Инкубацию митохондрий прекращают введением в сосудики 5 мл 5%-ного раствора ТХУ. Параллельно с введением компонентов инкубационной среды, в том числе и митохондрий, в сосудики для проведения инкубации, эти компоненты вводят и в контрольные (нулевые пробы) сосудики. Одновременно с началом инкубации в контрольные сосудики заливают по 5 мл 5%-ной ТХУ и ставят на лед. Это делают для того, чтобы найти разницу в содержании неорганического фосфора до и после инкубации.

Неорганический фосфор определяют по Фиске-Суббароу (6). Разницу в содержании неорганического фосфора в мкг, определенного по калибровочному графику, переводят в микрограмм-атомы. Количество потребленного митохондриями кислорода также переводят в микрограмм-атомы и рассчитывают на 1 мг белка митохондрий и 1 г массы сырой ткани. Сначала рассчитывают количество потребленного O₂ на пробу по следующей формуле:

$$O_2 = X \cdot K \cdot 2/22,4,$$

где O₂ – количество, мкг-атомов кислорода; X – поглощение кислорода в мм³ по разнице в показаниях манометра; K – константа

сосудиков; 22,4 – объем грамм-молекулы газа, л; 2 – количество атомов в молекуле кислорода. Из формулы видно, что для данного сосудика величина $K \cdot 2/22,4$ является постоянной и выражает количество кислорода в микрограмм-атомах, которое соответствует одному делению манометра. Для упрощения расчетов эти величины вычисляют для каждого сосудика заранее.

Пример расчета: h (разница в показаниях манометра за 21 мин инкубации) = 60; K (константа сосудика) = 1,50; $1,50 \cdot 21/22,4 = 0,134$ микрограмм-атома, что соответствует одному делению манометра. Постоянная величина для данного сосудика $0,134 \times 60 = 8,04$ микрограмм-атома кислорода, израсходованного пробой за 21 мин инкубации. Затем делают пересчет потребленного кислорода на сырую массу ткани и на белок митохондрий.

Неорганический фосфор в микрограмм-атомы переводят следующим образом. Например, за 21 мин инкубации митохондрий из неорганической фракции перешло в органическую 550 мкг фосфора. Так как 1 микрограмм-атом фосфора равняется 31 мкг, то $550/31 = 17,77$ микрограмм-атом фосфора. Полученные результаты также пересчитывают на единицу массы сырой ткани и белок митохондрий.

6. Измерение АТФ-азной активности митохондрий

Принцип метода. АТФ-аза является ферментом, с помощью которого осуществляется гидролиз АТФ и использование энергии макроэргической связи на различные функции: поддержание потенциала на мембранах, биосинтез, сокращение миозина и др. АТФ-азная реакция является обратимой, поэтому при изучении АТФ-азной активности митохондрий рассматривают последовательно все основные функциональные состояния митохондрий, главными из которых являются зависимость окислительного фосфорилирования от сопрягающих и разобщающих факторов (хлористый магний, ЭДТА, альбумин, 2,4-динитрофенол). Действием этих факторов определяется эффективность образования и использования энергии на клеточном уровне. Образующийся при гидролизе АТФ неорганический фосфор определяют по изменению оптической плотности. АТФ-азная активность митохондрий служит удобным объектом для изучения механизма окислительного фосфорилирования (7).

Реактивы. 1. 0,25М раствор сахарозы (для выделения митохондрий из печени, раствор №1); 2. 0,1М раствор КСl в 0,05М трис-НСl (рН 7,4) (для выделения митохондрий скелетных мышц, раствор №2); 3. 0,3М раствор КСl в 0,015М трис-НСl рН 7,4 (раствор №3); 4. 0,025М раствор АТФ (рН 7,4); 5. Растворы $MgCl_2$: 0,005; 0,010; 0,025; 0,050; 0,075 и 0,100 М, которые готовят разведением 0,1М раствора $MgCl_2$, устанавливая концентрацию титрованием с эриохромом черным Т; 6. $4 \cdot 10^{-4}$ М раствор 2,4-динитрофенола (ДНФ) рН 7,5; 7. Раствор ЭДТА 0,1М, рН 7,4; 8. 1М раствор хлорной кислоты ($HClO_4$); 9. Бычий сывороточный альбумин (для митохондрий скелетных мышц – 1% раствор).

Ход определения. Перед выделением митохондрий в 11 колбочках готовят среды инкубации следующего состава (мл):

№№ проб	Раствор № 3	$MgCl_2$, по 0,2 мл	ДНФ	ЭДТА	Альбумин, 1% р-р	H_2O , мл ^x
1	0,6	0,005	–	–	0,2	0,4
2	0,6	0,010	–	–	0,2	0,4
3	0,6	0,025	–	–	0,2	0,4
4	0,6	0,050	–	–	0,2	0,4
5	0,6	0,075	–	–	0,2	0,4
6	0,6	0,100	–	–	0,2	0,4
7	0,6	–	–	–	0,2	0,6
8	0,6	–	0,2	–	0,2	0,4
9	0,6	0,025	0,2	–	0,2	0,2

10	0,6	0,025	0,2	0,2	0,2	—
11	0,6	0,050	0,2	0,2	0,2	—

x – В случае исследования митохондрий печени воды добавляют в каждую пробу на 0,2 мл больше.

Митохондрии выделяют по методике, описанной в разделе "Определение показателей энергетического обмена". Полученный осадок ополаскивают раствором №2 и суспендируют в той же среде. Для этого к осадку митохондрий, полученному из 10 г мышц, добавляют 1 мл раствора №2, суспендируют, отбирают 0,1 мл для определения белка, а оставшийся объем доводят той же средой до 12 мл. При работе с печенью осадок митохондрий суспендируют в 4 мл раствора №2.

В пробу №11 добавляют 1 мл 1М HClO₄, затем во все колбы вносят по 0,2 мл суспензии митохондрий, помещают пробу №11 в лед, а остальные закрепляют в штативе и инкубируют в термостате аппарата Варбурга 15 мин при температуре 26°C. После окончания инкубации во все пробы добавляют по 1 мл 1М HClO₄, колбы помещают в лед и через 15 мин фильтруют. Для определения неорганического фосфата отбирают по 1 мл фильтрата.

Рассчитывают во всех пробах АТФ-азную активность в микромолях фосфата за 1 минуту на 1 мг белка митохондрий.

7. Микрокалориметрические измерения энергетического обмена в тканях

Микрокалориметр дает возможность осуществлять непрерывную запись изменений термогенеза микроорганизмов, переживающих тканей, клеток и субклеточных структур. Фактически каждый процесс, связанный с обменом веществ, сопровождается выделением или поглощением тепла. Принцип действия прибора заключается в измерении тепловой мощности, выделяемой или поглощаемой в калориметрической камере при изменении структуры макромолекул и функции субклеточных структур, за счет преобразования теплового сигнала в электрический, что позволяет регистрировать результаты на ленте самописца.

Химические и биологические процессы в организме сопровождаются тепловыми эффектами. Методически возможно изучение термокинетики этих процессов при использовании микрокалориметров самой различной конструкции, позволяющих измерять тепловые эффекты. Обычные калориметры являются приборами-интеграторами, рассчитанными на ограничение рассеивания тепла от калориметрического сосуда во внешнюю среду (адиабатический тип калориметра). С другой стороны, если необходимо измерить малые тепловые потоки, то предпочтительно использовать прибор с осциллографом, который допускает значительный теплообмен между калориметрическим сосудом, где помещен образец ткани, и остальной массой прибора, то есть прибор с малой термической инертностью и с большим отношением поверхности к объему внутреннего сосуда (микрокалориметр) (8).

Микрокалориметр имеет внутреннюю цилиндрическую камеру, в которой изучают термокинетику химических и биологических процессов. Камера помещена внутри окружающей ее оболочки с постоянной температурой (внешняя оболочка). Внутренняя камера свободно извлекается из внешней камеры для удобства подготовки ее к проведению опытов. Внутренняя и внешняя оболочки соединены термопарами. Внутренняя камера изготовлена из стекла (толщина стенок 0,2 мм), металлизированного с внешней поверхности. Возможно изготовление цельнометаллической внутренней камеры из платины или нержавеющей стали. Сверху камера закрывается пробкой из теплоизолирующего материала. Предварительно определяют константу внутренней камеры,

которая является наиболее важной характеристикой прибора; константу рассчитывают калибровкой прибора.

В современных моделях микрокалориметров большое значение придается термостатированию и регулированию температуры в приборе. Однако следует обратить внимание на то, что точный термостат может надежно функционировать, если он помещен в лабораторную комнату с достаточно постоянной температурой. Присутствие одного человека в комнате не должно повышать температуру свыше $0,05^{\circ}\text{C}$, что возможно при кондиционировании воздуха по температуре и влажности. Рассчитывают экспериментальный нуль прибора. В дальнейшем во внутреннюю камеру прибора помещают дозированные источники теплоты и записывают результаты. Точность микрокалориметрических измерений зависит от точности калибровки.

Дифференциальный адиабатический сканирующий микрокалориметр (ДАСМ-4) производства МНТК "Биоген" используется для определения стандартных термодинамических параметров исследуемых макромолекул, фосфолипидных мембран, субклеточных биологических структур. Микрокалориметр выполнен в виде компактного настольного прибора и разделен на две функциональные части: калориметрический блок и измерительный блок. Измерительный блок обеспечивает обработку сигналов, поступающих с калориметрического блока, а также регулирование процессов, происходящих в калориметрическом блоке. Объем каждой (контрольной и измерительной) камеры не превышает $0,5\text{ см}^3$. Идентичные платиновые калориметрические камеры окружены системой тепловых экранов, температура которых в процессе прогрева поддерживается равной температуре камер с помощью прецизионных регуляторов. При этом создаются условия прогревания камер, близкие к адиабатным, что позволяет обеспечить уникальную чувствительность прибора.

8. Определение компонентов адениловой системы (АТФ, АДФ, АМФ)

Принцип метода. АТФ является источником энергии в клетках и тканях для процессов биосинтеза, сокращения мышечных волокон, поддержания потенциала на мембранах и др. функциях. При гидролизе конечной фосфатной группы АТФ выделяется около 30 кДж/моль , при гидролизе двух фосфатных связей – до 65 кДж/моль . При этом АТФ превращается в АДФ или АМФ. Соотношение компонентов адениловой системы определяет энергетический потенциал клеток и тканей, увеличение которого связывают с накоплением АТФ. В основу разделения нуклеотидов положен метод, предложенный Коном и Картером в описании Горкина (9) для анализа аденозин-5-фосфатных кислот на анионите Дауэкс-1. Количественное разделение нуклеотидов достигается путем последовательного извлечения их различными элюирующими растворами:

Реактивы. 1. Анионит типа Дауэкс-1 или Дауэкс-2; 2. HCl – $0,003\text{ н}$, $0,01\text{ н}$ и 1 н растворы; 3. NaCl – $0,02\text{ М}$ и $0,2\text{ М}$ растворы, приготовленные на $0,01\text{ н}$ HCl ; 4. NH_4OH – 1 н раствор; 5. NH_4Cl – $0,01\text{ М}$ раствор; 6. Спирт этиловый.

Оборудование. Хроматографическая колонка размером $1,2 \times 10\text{ см}$; коллектор для сбора фракций; делительная воронка на 500 мл .

Подготовка анионита и заполнение колонки. 2 г анионита заливают $30\text{--}50\text{ мл}$ дистиллированной воды, хорошо перемешивают, дают отстояться и жидкость с осадка декантируют. Для перевода смолы в Cl^- форму осадок заливают $20\text{--}30\text{ мл}$ 1 н HCl , перемешивают и оставляют на 30 мин . Затем надосадочную жидкость сливают, осадок заливают дистиллированной водой, перемешивают, отделяют осадок центрифугированием и центрифугат сливают. Промывание водой повторяют $5\text{--}6$

раз. Промытую смолу взмучивают в 20–30 мл дистиллированной воды и приступают к заполнению колонки, пока высота сорбента не достигает 8–10 см. Верхний слой сорбента должен иметь гладкую горизонтальную поверхность.

Ход определения. Перед нанесением пробы колонка должна быть уравновешена, для чего через нее пропускают 6–8 объемов (около 100 мл) 1 н раствора аммиака. Раствор пропускают до тех пор, пока pH вытекающего из колонки раствора не станет равной pH 1 н раствора аммиака. Наносят на колонку раствор нуклеотидов, подлежащих разделению (примерно 10–12 мкмоль в 1–2 мл 1 н раствора аммиака). Затем колонку промывают дистиллированной водой до нейтральной реакции, после чего последовательно пропускают следующие растворы: 150–200 мл 0,01М хлористого аммония; 0,003 н раствор HCl – для элюции АМФ. Как только pH вытекающего раствора будет равна 3,0, начинают собирать при помощи коллектора фракций по 3 мл и анализировать их на спектрофотометре при 260 нм; обычно для элюирования АМФ необходимо пропустить около 300 мл 0,003 н раствора HCl; для элюции АДФ используют 0,02М NaCl в 0,01 н HCl. Для извлечения АДФ требуется, как правило, около 200 мл раствора. Для элюции АТФ используют 0,2М NaCl в 0,01 н HCl. Необходимо около 200 мл раствора. Все фракции фотометрируют.

Для препаративного выделения фракций, обладающих наибольшей оптической плотностью, элюаты сливают в один сосуд и осаждают 10-кратным объемом охлажденного спирта. Раствор энергично перемешивают и оставляют на ночь в холодильнике. Осадок отделяют центрифугированием, промывают 96%-ным спиртом, затем абсолютным спиртом и сушат в эксикаторе над CaCl₂. Смолу регенерируют 2 н HCl и промывают водой до нейтральной реакции.

Расчет. Количественное определение компонентов адениловой системы проводят по фосфору. Для этого элюаты после хроматографического разделения помещают в колбочки для сжигания. В качестве контроля используют элюаты, не содержащие компонентов адениловой системы. В колбочки приливают концентрированную серную кислоту и определяют содержание фосфора после минерализации проб.

9. Определение активности пируватдегидрогеназного комплекса

Принцип метода. Пируватдегидрогеназный комплекс осуществляет окислительное декарбоксилирование пирувата с одновременным восстановлением НАД, который измеряют спектрофотометрически при длине волны 340 нм (10). При постоянной длине волны показатель зависит от концентрации (плотности раствора) вещества в растворе.

Реактивы. 1. 0,01М фосфатный буфер (pH 7,5) для выделения митохондрий из тканей; 2. Инкубационная среда, мкмоль (в расчете на 1 пробу объемом 1,8 мл): буфер трис-HCl – 140, пируват калия – 5, MgCl₂ – 20, тиаминпирофосфат – 2, НАД – 2, меркаптоэтанол – 5, ЭДТА – 1. Инкубационную среду готовят непосредственно перед использованием; меркаптоэтанол можно заменить другим SH-реагентом, например, дитиотриэтолом; 3. 0,1% раствор КоА (готовят на буфере трис-HCl, 70 мМ, pH 8,0, перед спектрофотометрированием).

Оборудование. Спектрофотометр.

Ход определения. Выделяют митохондрии из исследуемой ткани в 0,01М фосфатном буфере дифференцированным центрифугированием. Для анализа берут навеску ткани около 1 г и гомогенизируют в 4-кратном объеме буфера. Осадок митохондрий подвергают 3-кратному замораживанию-оттаиванию для того, чтобы разрушить субклеточные частицы и обеспечить максимальную доступность субстрата и кофакторов для фермента. После окончания этой процедуры пробы центрифугируют при 1800–2000 g.

Для проведения ферментативной реакции в кювету спектрофотометра шириной 1 см наливают 1,8 мл инкубационной среды, добавляют 0,1 мл митохондриального препарата, помещают в прибор. Реакцию начинают внесением в кювету 0,1 мл раствора коэнзима А. Изменение оптической плотности пробы, вызванное образованием восстановленной формы НАД, регистрируют при длине волны 340 нм через каждые 15 секунд в течение 2 минут.

Расчет. Активность пируватдегидрогеназы (в молях НАДН/мин на 1 мг белка) вычисляют по формуле:

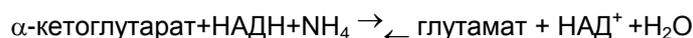
$$X = \Delta E \cdot V \cdot 6,22 \cdot a,$$

где ΔE – изменение оптической плотности пробы за 1 мин; V – конечный объем пробы в кювете (2,0 мл); 6,22 – коэффициент микромолярной экстинкции восстановленной формы пиридиновых нуклеотидов при длине волны 340 нм; a – количество белка в пробе, определенное параллельно с проведением ферментативного анализа в той же суспензии митохондрий (методом Лоури и др.), мг.

10. Определение α -кетоглутарата в тканях по Бергмейеру и Бернату (12)

Принцип метода. В присутствии избытка ионов аммония α -кетоглутарат превращается в глутамат в ходе реакции, катализируемой глутаматдегидрогеназой:

ГДГ



Убыль НАДН в ходе реакции регистрируется спектрофотометрически при длине волны 340 нм (320 или 366 нм).

Реактивы. 1. 0,6М раствор HClO_4 (готовят перед использованием); 2. 1М раствор K_3PO_4 ; 3. $8 \cdot 10^{-3}$ М раствор НАДН (готовят непосредственно перед употреблением) на 1% растворе NaHCO_3 ; 4. Глутаматдегидрогеназа (КФ 1.4.1.3). Хранящийся в холодильнике препарат непосредственно перед употреблением разводят в 3–5 раз 2,8М раствором сульфата аммония. Содержание белка в разведенном ферментативном препарате составляет около 1,5–2,0 мг/мл.

Оборудование. Центрифуга, спектрофотометр, водяная баня.

Ход определения. Навеску замороженной жидким азотом и растертой ткани (около 500 мг) помещают в находящуюся на льду центрифужную пробирку, куда предварительно наливают 4,0 мл 0,6М HClO_4 . После перемешивания к пробе добавляют 0,6М хлорную кислоту до конечного соотношения 9,0 мл на 1 г ткани. Пробы тщательно перемешивают, оставляют на 10 минут во льду, после чего осаждают белки центрифугированием при 3000 g в течение 10 минут.

В обычные пробирки переносят по 4,0 мл безбелкового центрифугата и нейтрализуют 0,8 мл 1М K_3PO_4 , при этом pH проб достигает значения всего около 7,6. Для полного осаждения пробы помещают в лед на 10 минут, после чего осадок отделяют центрифугированием при 3000 g в течение 5 минут.

В кювету спектрофотометра (1 см) вносят 3,75 мл нейтрализованного тканевого экстракта, предварительно нагретого до комнатной температуры. Добавляют 0,05 мл раствора НАДН, перемешивают пробу и измеряют исходное показание прибора (E_1) при длине волны 340 нм. Затем добавляют 0,05 мл раствора глутаматдегидрогеназы и перемешивают. Конечное значение экстинкции (E_2) измеряют после окончания реакции, о которой судят по прекращению изменения оптической плотности (обычно через 3–5 мин). Для внесения поправки, связанной с изменением оптической плотности пробы за счет добавления фермента-

тивного препарата, в кювету после окончания реакции дополнительно вносят еще 0,05 мл раствора глутаматдегидрогеназы, перемешивают и сразу измеряют оптическую плотность (E_3).

Расчет. Содержание α -кетоглутарата в мкмольях на 1 г ткани вычисляют, учитывая изменение оптической плотности пробы за время инкубации (ΔE) и фактор разведения по отношению к 1 г ткани (K) по формуле:

$$X = \Delta E \cdot V \cdot K / 6,22$$

где $\Delta E = (E_1 - E_2) - (E_3 - E_2)$; V – конечный объем пробы в кювете (3,85 мл); $K = 3,12; 6,22$ – коэффициент микромолярной экстинкции пиридиновых нуклеотидов при длине волны 340 нм. Точность метода $\pm 0,003$ мкмоль α -кетоглутарата в пробе.

11. Определение активности α -кетоглутаратдегидрогеназы

Принцип метода. Альфа-кетоглутаратдегидрогеназа катализирует одновременно дегидрирование и декарбоксилирование кетоглутарата с образованием сукцинил-КоА.

Активность α -кетоглутаратгидразного комплекса оценивают по скорости восстановления НАД, о чем судят по возрастанию оптической плотности пробы при длине волны 340 нм.

Реактивы. 1. Среда для выделения митохондрий из ткани следующего состава (рН 7,4): 0,225М маннитол, 0,075М сахараза, 0,1Мм ЭДТА (готовят накануне опыта и до использования хранят в холодильнике); 2. Среда для разрушения митохондрий – 0,33% раствор дезоксихолата, содержащий 2 мг сывороточного альбумина в 1 мл раствора; 3. Инкубационная среда для проведения ферментативной реакции, содержащая в объеме 2,9 мл следующие компоненты (в мкмольях): K – фосфатный буфер, рН 7,4 – 300, α -кетоглутарат – 6, НАД – 1, коэнзим А – 0,45, дитиотрейтол – 1,5, тиаминпирофосфат – 0,2. Инкубационную среду готовят непосредственно перед использованием.

Оборудование. Центрифуга, спектрофотометр.

Ход определения. Выделение митохондрий из исследуемой ткани проводят с помощью метода дифференцированного центрифугирования в среде, содержащей 0,225М маннитол, 0,075М сахаразу и 0,1Мм ЭДТА. Навеску ткани около 1 г гомогенизируют в 4-кратном объеме буфера. Для разрушения митохондрий к осадку добавляют 1 мл 0,33% раствора дезоксихолата, содержащего 1 мг сывороточного альбумина. Осадок митохондрий суспензируют в среде и затем подвергают 3-кратному замораживанию-оттаиванию. После окончания этой процедуры пробы центрифугируют 25 минут при 18000 g.

Ферментативную реакцию проводят в кювете шириной 1 см. В кювету наливают 2,9 мл инкубационной среды, реакцию начинают внесением 0,1 мл лизата митохондрий. Изменение величины оптической плотности пробы регистрируют при длине волны 340 нм через 15–30 секунд в течение 2 минут.

Расчет. Активность α -кетоглутаратдегидрогеназы (в мкмольях НАДН/мин на 1 мг белка) рассчитывают по формуле:

$$X = \Delta E \cdot V \cdot 6,22 \cdot a,$$

где ΔE – изменение оптической плотности пробы за 1 мин, V – конечный объем в кювете (3,0 мл); a – количество белка в пробе (в мг), определенное методом Лоури.

Литература

1. Методические указания “Изучение обмена энергии и энергетического питания у с.-х. животных”, Боровск, 1986.
2. Инструкция “Масс-спектрофотометр медицинский МХ-6202”, Сумы, 1986.

3. Инструкция "Газоанализаторы оптикоакустические", Смоленск, 1981.
4. Сейц И.Ф. Взаимодействие дыхания и гликолиза в клетке и сопряженное фосфорилирование. Л.: Медгиз, 1958. 178с.
5. Barke S.B., Summerson U.H. J.Biol.Chem. 194. 138:535
6. Fiske C., Subbarou J. J.Biol.Chem. 1925. 66:375-400.
7. Измерение АТФ-азной активности митохондрий. Практикум по биохимии. М. 1989. с.471-474.
8. Кальве Э., Грат А. Микрокалориметрия. Изд.ин.мет. М. 1963. с.478.
9. Горкин В.З. Разделение на ионитах и очистка 5-фосфорных эфиров аденозина и инозина. В кн.: Современные методы в биохимии. М.: Медицины. т1. 1964. с.250.
10. Определение количества пировиноградной кислоты и активности пируватдегидрогеназы. Методы биохимических исследований. Л. 1982. с.190-194.
11. Определение количества α -кетоглутарата и активности α -кетоглутаратдегидрогеназы. Методы биохим.исследований. М. 1982. с.202-205.