УДК 619:611-013.11:577.1(083.74) Группа Р39

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ СОЮЗА ССР

СПЕРМА БЫКОВ НЕРАЗБАВЛЕННАЯ
Методы биохимических исследований

Non-diluted spern of bulls.
Methods of biochemicaltests

ГОСТ 20909.6—75

Постановлением Государственного комитета стандартов Совета Министров СССР от 19 сентября 1975 г. № 2440 срок действия установлен

с 01.07.76
до 01.07.81

Несоблюдение стандарта преследуется по закону

Настоящий стандарт распространяется на неразбавленную свежеполученную сперму быков и устанавливает методы биохимических исследований с целью определения содержания аденозинфосфатов в спермиях и микроэлементов и кетоновых тел в сперме.

1. МЕТОД ОТБОРА ПРОБ

1.1. Отбор проб — по ГОСТ 20909.1—75.

1.2. Для проведения испытаний применяют свежеполученную сперму, хранившуюся при температуре 30—35°С не более 30 мин.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АДЕНОЗИНФОСФАТОВ В СПЕРМИЯХ

Сущность метода заключается в определении содержания лабильного фосфора, освобожденного при гидролизе аденозинтрифосфорной и аденозиндифосфорной кислот, предварительно адсорбированных на активированном угле.

2.1. Оборудование и реактивы

2.1.1. Для проведения испытания применяют:

центрифугу;

шкаф сушильный лабораторный по ГОСТ 7365—55;

фотоэлектроколориметр;

баню водяную;

пробирки центрифужные;

Издание официальное **Перепечатка воспрещена**

холодильнички;
воронки стеклянные по ГОСТ 8613—64;
пипетки стеклянные градуированные вместимостью 2 и 5 мл по ГОСТ 12487—67;
уголь активированный марки БАУ по ГОСТ 6217—74;
фильтры бумажные по ГОСТ 12026—66;
кислоту трихлоруксусную, х. ч.;
спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962—67;
кислоту соляную по ГОСТ 3118—67, х.ч.;
кислоту серную по ГОСТ 4204—66, х. ч.;
аммоний молибденовокислый по ГОСТ 3765—72, х.ч.;
кислоту аскорбиновую по ГОСТ 4815—54, х.ч.;
калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4198—75, х. ч.;
воду дистиллированную по ГОСТ 6709—72.

2.2. Подготовка к испытанию

2.2.1. *Подготовка активированного угля*

К 100 г тщательно растертого угля добавляют 500 мл 3 н. соляной кислоты. Смесь кипятят в течение 60 мин, затем кислоту удаляют фильтрованием. Уголь заливают 1 л дистиллированной воды, кипятят в течение 60 мин, фильтруют через фильтровальную бумагу. Эту операцию повторяют три раза. Промытый уголь высушивают при температуре 140°С. Затем еще раз проводят трехкратное кипячение активированного угля с 1 л дистиллированной воды в течение 40 мин с последующим фильтрованием. Уголь на фильтре промывают горячей дистиллированной водой до получения фильтрата с pH 4, затем уголь высушивают при температуре 140°С.

2.2.2. *Построение градуировочного графика*

Из перекристаллизованного однозамещенного фосфата калия готовят основной раствор фосфора.

Перекристаллизацию фосфата калия ведут, охлаждая при 2—5°С профильтрованный через двойной бумажный фильтр горячий насыщенный раствор фосфата калия, который приготавливают на бидистиллированной воде. Выпавшие кристаллы высушивают в течение трех-четырех дней при температуре 36—37°С до постоянной массы. Растворяют 0,4394 г перекристаллизованного фосфата калия в мерной колбе вместимостью 1 л и доливают дистиллированной водой до метки. Приготовленный раствор перемешивают. 1 мл основного раствора содержит 0,1 мг фосфора.

Для построения градуировочного графика из основного раствора фосфора готовят ряд разведений. Для этого в мерные колбы вместимостью 100 мл помещают соответственно 1, 2, 3, 4, 5 мл основного раствора. Колбы доливают бидистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают. В 1 мл каждого из приготовленных растворов будет содержаться соответственно 2, 3, 4, 5 мкг

фосфора. Из каждой колбы в пробирки берут 1 мл раствора фосфата калия, добавляют 1 мл 2,5%-ного молибдата в 5 н. растворе серной кислоты и 1 мл 0,5%-ного свежеприготовленного раствора аскорбиновой кислоты. Объем раствора в пробирках доводят бидистиллированной водой до 10 мл. Пробирки ставят на водяную баню при 37°С на 10 мин и затем охлаждают. Оптическую плотность растворов измеряют на фотоэлектроколориметре при красном светофильтре в кюветах с рабочей длиной, против бидистиллированной воды 10 мм.

По полученным значениям оптической плотности растворов строят градуировочный график. Для этого по оси абсцисс откладывают численные значения концентрации фосфора, а по оси ординат — соответствующую оптическую плотность раствора. Точки пересечения восстановленных перпендикуляров соединяют линией.

Градуировочный график строят для каждого фотоэлектроколориметра и проверяют его ежемесячно.

2.2.3. Определение концентрации спермиев в сперме — по ГОСТ 20909.5—75.

2.3. Проведение испытания

2.3.1. К пробе спермы (независимо от ее объема) с содержанием не менее 400 млн спермиев добавляют равный объем 20%-ной трихлоруксусной кислоты.

Пробы ставят на 1 ч в холодильник при температуре 2—3°С, помешивая через каждые 10—15 мин. По истечении указанного срока к исследуемому материалу добавляют равный объем дистиллированной воды (концентрацию трихлоруксусной кислоты доводят таким образом до 5%), тщательно размешивают стеклянной палочкой и центрифугируют в течение 7—10 мин при частоте вращения 3—4 тыс. об/мин.

Центрифугат сливают в центрифужные пробирки или в чистые флаконы вместимостью 10—15 мл, в которые предварительно помещают по 250 мг специально подготовленного активированного угля. Параллельно с опытными пробами ставят контрольные: в две пробирки, содержащие по 250 мг угля, вместо центрифугата вносят по 4 мл 5%-ной трихлоруксусной кислоты.

Пробирки с центрифугатом и углем, а также контрольные пробирки ставят в холодильник на 20 мин, перемешивая их содержимое не менее двух раз. Для лучшего оседания угля к смеси добавляют 0,2—0,3 мл этилового спирта. Смесь центрифугируют в течение 10—15 мин при частоте вращения 3—4 тыс. об/мин.

Центрифугат сливают и уголь дважды промывают. В начале добавляют 5 мл дистиллированной воды и 0,2—0,3 мл спирта. Смесь центрифугируют при частоте вращения 2—3 тыс. об/мин в течение 3—6 мин и центрифугат сливают. Вторично осадок про-

мывают без добавления спирта (осадок каждый раз помешивают стеклянной палочкой).

К промытому осадку добавляют 0,5 мл 2 н. раствора соляной кислоты и 2 мл 1 н. раствора соляной кислоты. Смесь гидролизуют 10 мин на кипящей водяной бане в пробирках, закрытых холодильничками. Пробирки с раствором охлаждают до 18—20°С, добавляют 2 мл дистиллированной воды, перемешивают и центрифугируют 5—7 мин при частоте вращения 3—4 тыс. об/мин. Центрифугат отфильтровывают через бумажный фильтр.

Фильтрат в количестве 2 мл переносят в чистые пробирки или флаконы, добавляют 1 мл 2,5%-ного раствора молибденовокислого аммония, приготовленного на 5 н. серной кислоте и 1 мл 0,5%-ного раствора свежеприготовленной аскорбиновой кислоты. Раствор доливают до 10 мл дистиллированной водой, ставят на водяную баню при 37°С на 10 мин и затем охлаждают. Охлажденный раствор колориметрируют на фотоэлектроколориметре при красном светофильтре против контрольных растворов в кюветах с рабочей длиной 10 мм.

2.4. Обработка результатов

2.4.1. Оптическую плотность (D_1) в пересчете на 1 млрд спермиев вычисляют по формуле

$$D_1 = \frac{D \cdot 2{,}5}{c},$$

где D — оптическая плотность исследуемого раствора;

c — концентрация спермиев в сперме, млрд/мл;

2,5 — коэффициент пересчета.

Содержание фосфора аденозинтрифосфорной и аденозиндифосфорной кислот в 1 млрд спермиев в микрограммах определяют по градуировочному графику, находя значение фосфора по соответствующей величине оптической плотности.

За окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений. Допускаемые расхождения между результатами параллельных определений не должны превышать ±10%.

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В СПЕРМЕ

Содержание микроэлементов в сперме определяют химическим или спектральным методом.

3.1. Химический метод определения микроэлементов

Сущность метода заключается в выделении микроэлементов из спермы и последующем колориметрировании растворов, содержащих микроэлементы.

3.1.1. *Оборудование и реактивы*

Для проведения испытания применяют:

фотоэлектроколориметр;

баню водяную;
воронки делительные вместимостью 150—200 мл;
тигли кварцевые или фарфоровые вместимостью 50 мл;
колбы термостойкие вместимостью 100—150 мл;
флаконы с притертыми пробками вместимостью 50—100 мл;
цилиндры мерные с притертыми пробками вместимостью 10 или 25 мл;
дитизон по ГОСТ 10165—62, 0,04%-ный раствор на хлороформе;
хлороформ;
кислоту соляную по ГОСТ 14261—69, 0,02%-ный раствор;
фенолфталеин по ГОСТ 5850—51, 5%-ный спиртовый раствор;
кислоту азотную по ГОСТ 11125—73;
натрия диэтилдитиокарбамат по ГОСТ 8864—71;
перекись водорода по ГОСТ 10989—64;
аммиак водный по ГОСТ 3760—64;
кобальт сернокислый по ГОСТ 4462—68;
медь сернокислую по ГОСТ 4165—68;
квасцы железоаммонийные по ГОСТ 4205—68;
цинк металлический по ГОСТ 989—62;
кислоту сульфосалициловую по ГОСТ 4478—68, 10%-ный раствор;
нитрозо-*R*-соль по ГОСТ 10553—63, 0,05%-ный раствор;
эфир сернокислый по ГОСТ 6265—52.

3.1.2. *Подготовка к испытанию*

3.1.2.1. **Приготовление стандартных растворов железа**

0,863 г железоаммонийных квасцов растворяют в воде. Если раствор мутный, его просветляют, прибавляя несколько капель кислоты. Объем раствора доводят водой до 1000 мл. В 1 мл раствора содержится 100 мкг железа. Из основного раствора готовят четыре разведения с содержанием железа в 1 мл раствора соответственно 25, 50, 75 и 100 мкг для каждого разведения.

3.1.2.2. **Приготовление стандартных растворов меди**

3,93 г сульфата меди растворяют в воде, добавляют две-три капли серной кислоты и доводят объем раствора водой до 1000 мл. В 1 мл раствора содержится 1 мг меди.

Из основного раствора готовят четыре разведения с содержанием меди в 1 мл раствора соответственно 5, 10, 15 и 20 мкг для каждого разведения.

3.1.2.3. **Приготовление стандартных растворов цинка**

0,1 г х.ч. металлического цинка растворяют сначала в 1 мл концентрированной серной кислоты, затем в 50 мл воды. Объем раствора доводят водой до 1000 мл. В 1 мл раствора содержится 100 мкг цинка.

Из основного раствора готовят четыре разведения с содержанием цинка в 1 мл раствора соответственно 5, 10, 15 и 20 мкг для каждого разведения.

3.1.2.4. **Приготовление стандартных растворов кобальта**

0,477 г сульфата кобальта растворяют в воде, добавляют две-четыре капли серной кислоты и объем доводят водой до 1000 мл. В 1 мл раствора содержится 100 мкг кобальта.

Из стандартного раствора готовят четыре разведения с содержанием кобальта в 1 мл раствора соответственно 0,25, 0,5, 0,75 и 1 мкг для каждого разведения.

Примечание. Стандартные растворы микроэлементов приготавливают на бидистиллированной воде.

3.1.2.5. **Построение градуировочных графиков**

Готовят отдельно смесь растворов первых, вторых, третьих и четвертых разведений микроэлементов, отбирая для этого по 1 мл каждого раствора. Каждую смесь разведений в общем объеме 4 мл вносят в термостойкую колбу или фарфоровый тигель и упаривают на водяной бане досуха. К остатку прибавляют одну-две капли концентрированной азотной кислоты и вновь упаривают досуха, не прокаливая. Затем проводят испытания, как указано в пп. 3.1.3.1—3.1.3.7. По полученным значениям оптической плотности строят для каждого микроэлемента градуировочный график, откладывая по оси абсцисс концентрации микроэлемента в каждом из приготовленных разведений, а по оси ординат — соответствующую оптическую плотность.

3.1.2.6. **Подготовка спермы**

5 мл цельной спермы высушивают в тигле, а затем озоляют в муфельной печи. Вначале озоление проводят при температуре 100—200°С. После обугливания пробы температуру муфеля повышают и озоление проводят при температуре 450°С. К полученной золе прибавляют 1 мл концентрированной азотной кислоты и высушивают досуха.

Золу растворяют в 20 мл соляной кислоты, разведенной 1:1. Раствор из тигля количественно переносят в делительную воронку вместимостью 200 мл.

3.1.3. *Проведение испытания*

3.1.3.1. **Выделение железа**

Железо экстрагируют из полученного раствора эфиром порциями 5—8 мл, встряхивая раствор в течение 3—4 мин. После разделения верхнего (эфирного) и нижнего (солянокислого) слоев последний вливают в одну колбу, а эфирный слой в другую. Солянокислый раствор элементов переносят в делительную воронку и снова повторяют экстракцию тем же количеством эфира.

Экстрагирование железа проводят три-четыре раза до тех пор, пока не будет получена отрицательная реакция эфирного экстракта с сульфосалициловой кислотой, которая с солями трехвалентного железа дает красно-фиолетовое окрашивание. Эфирные экстракты железа собирают в термостойкую колбу и в вытяжном шкафу удаляют эфир. Из оставшейся водной фазы выделяют медь.

3.1.3.2. **Выделение меди**

К водной фазе, находящейся в делительной воронке, добавляют воду, доводя количество раствора до 50 мл. Устанавливают pH раствора 2,0 добавлением 5,7 мл концентрированного аммиака.

Экстрагирование меди проводят 0,04%-ным раствором дитизона в хлороформе, который готовят перед употреблением и хранят в темном прохладном месте во флаконе с притертой пробкой. Для этого в делительную воронку прибавляют 5 мл раствора дитизона и встряхивают 5—6 мин. После расслоения водной и органической фаз (для полного разделения требуется 2—3 мин) образовавшийся дитизонат меди переносят во флакон с притертой пробкой. Экстрагирование повторяют до полного прекращения изменения окраски после прибавления порции раствора дитизона и встряхивания с водной фазой. Во флакон добавляют 0,5 мл концентрированной азотной кислоты и 0,5 мл соляной кислоты в разведении 1:1 и смесь оставляют на сутки на свету.

3.1.3.3. **Выделение цинка и кобальта**

К водной фазе, оставшейся в делительной воронке, прибавляют одну-две капли раствора фенолфталеина и нейтрализуют ее аммиаком до слабо-розового окрашивания (pH 8,3). Затем в делительную воронку вносят 3 мл раствора дитизона и встряхивают 4—5 мин. Экстракцию цинка и кобальта раствором дитизона проводят до тех пор, пока внесенная в делительную воронку порция раствора дитизона не перестанет при встряхивании менять окраску. Экстракты дитизона цинка и кобальта собирают в другую делительную воронку.

Для отделения цинка от кобальта в делительную воронку приливают 50 мл 0,02 н. раствора соляной кислоты и встряхивают 10 мин. При этом дитизонат цинка разлагается и цинк переходит в водную фазу в виде солянокислой соли. В органической фазе содержимого воронки остается дитизонат кобальта. После расслоения органической и водной фаз первую переносят во флакон с притертой пробкой. Остатки дитизоната кобальта и дитизона в порции хлороформа присоединяют к экстракту дитизоната кобальта во флаконе. Во флакон, содержащий дитизонат кобальта, добавляют 0,5 мл концентрированной азотной кислоты и 0,5 мл соляной кислоты в разведении 1:1 и смесь оставляют на сутки на свету.

После выделения каждого микроэлемента и в дальнейшем при количественных определениях тщательно промывают водную фазу хлороформом для полного удаления дитизонатов металлов из водной фазы.

3.1.3.4. **Определение содержания железа**

Железо в трехвалентной форме, оставшееся в колбе после упаривания эфира, растворяют в 0,5 мл разведенной 1:1 соляной кислоте, добавляют 10 мл воды и нагревают до кипения. К получен-

ному раствору после его охлаждения добавляют 5 мл 10%-ного раствора сульфосалициловой кислоты. Раствор количественно переносят в мерный цилиндр. Объем раствора доводят до 20 мл и колориметрируют с зеленым светофильтром против воды в кюветах с рабочей длиной 30 мм.

3.1.3.5. **Определение содержания меди**

Полученный при выделении меди раствор дитизона меди в хлороформе переносят в делительную воронку и добавляют к нему два раза по 10—15 мл воды. При встряхивании содержимого воронки в течение 3—5 мин дитизонат меди разлагается на дифенилкарбодиазон, имеющий желтую окраску, и медь, которая в виде солянокислой соли переходит в водную фазу. Водную фазу, содержащую солянокислую медь, оставляют в воронке. Органическую фазу переносят в другую делительную воронку и дважды промывают водой по 10—15 мл. Промывные воды присоединяют к водной фазе в первой делительной воронке. Солянокислую водную фазу промывают 3—5 мл хлороформа, чтобы удалить продукты распада дитизона. Собранный солянокислый раствор меди в термостойкой колбе упаривают досуха. В колбу с остатком прибавляют 1 мл концентрированной азотной кислоты, которую затем упаривают. Колбу помещают в муфельную печь и содержимое ее озоляют при температуре 500°С до полного выгорания остатков разрушенного дитизона. Озоление считают законченным, когда остаток становится белым. Если остаток озоляется трудно, повторно добавляют азотную кислоту и озоление продолжают.

После озоления в колбу вносят 2 мл соляной кислоты, разведенной 1:1, смесь подогревают, промывают два раза 10 мл воды и количественно переносят в делительную воронку. Затем в делительную воронку добавляют пять капель аммиака, 1 мл 1%-ного раствора диэтилдитиокарбамата натрия и 5 мл хлороформа. При встряхивании в течение 5 мин медь переходит в органическую фазу в виде диэтилдитиокарбаматного комплекса. Экстрагирование 3—4 мл хлороформа проводят вторично. Хлороформную фазу, окрашенную в желтый цвет, сливают в мерный цилиндр и доводят до 10 мл хлороформом. Полученный раствор колориметрируют при синем светофильтре против хлороформа в кюветах с рабочей длиной 20 мм.

3.1.3.6. **Определение содержания цинка**

К раствору солянокислого цинка, содержащемуся в делительной воронке, прибавляют одну-две капли раствора фенолфталеина и нейтрализуют аммиаком, разведенным 1:10 до появления слаборозового окрашивания. Затем к раствору прибавляют 10 мл 1%-ного раствора диэтилдитиокарбамата натрия и 3 мл 0,04%-ного раствора дитизона. Смесь встряхивают. Образующийся дитизонат цинка переходит в органическую фазу, которую после полного расслоения с водой переносят в другую делительную воронку. Экстра-

гирование цинка раствором дитизона продолжают до тех пор, пока прибавленная порция раствора дитизона не перестанет изменять свою окраску. К собранной во второй делительной воронке органической фазе добавляют 25 мл 0,01 н. раствора аммиака и встряхивают 2—3 мин для вымывания избытка дитизона, который переходит в водную фазу. Вымывание дитизона повторяют до тех пор, пока прибавленная следующая порция 0,01 н. раствора аммиака после встряхивания в течение 2—3 мин перестанет окрашиваться в желтый цвет. При проведении этой операции не следует допускать избытка 0,01 н. раствора аммиака, в котором частично может растворяться дитизонат цинка.

Дитизонат цинка, имеющий розовую окраску, останется в органической фазе. Интенсивность розового окрашивания зависит от концентрации цинка. Дитизонат цинка переносят в мерный цилиндр и объем раствора доводят хлороформом до 25 мл и колориметрируют при зеленом светофильтре против хлороформа в кюветах с рабочей длиной 3 мм.

3.1.3.7. **Определение содержания кобальта**

Дитизонат кобальта переносят в делительную воронку и прибавляют к нему 50 мл 0,02 н. раствора соляной кислоты. При встряхивании смеси в течение 10 мин хлороформная фаза окрашивается в желтый цвет вследствие образования дифенилтиокарбодиазона, который не способен связывать кобальт.

Водную фазу оставляют в делительной воронке, а органическую фазу переносят в другую делительную воронку и промывают 25 мл бидистиллированной воды. Промывную воду присоединяют к водной фазе, находящейся в делительной воронке.

Солянокислый раствор кобальта отмывают хлороформом от остатков продуктов окисления дитизона. После промывания жидкость переносят в термостойкую колбу и упаривают досуха. Затем к остатку добавляют 1 мл концентрированной азотной кислоты и упаривают досуха. Остаток озоляют в муфельной печи при температуре 500°С. После озоления в колбу добавляют 0,25 мл раствора соляной кислоты в разведении 1:1, две капли концентрированной азотной кислоты, 10 мл воды, 1 мл 0,05%-ного раствора нитрозо-*R*-соли и 1 г уксуснокислого натрия. Смесь кипятят 45 с, затем к ней прибавляют 0,75 мл концентрированной азотной кислоты и вновь кипятят 45 с. После охлаждения объем раствора доводят до 25 мл водой и колориметрируют при синем светофильтре против контроля, обработанного аналогично опытной пробе в кюветах с рабочей длиной 50 мм.

3.1.4. *Обработка результатов*

Содержание железа, меди, цинка и кобальта в пробе спермы в микрограммах определяют по градуировочным графикам, находя значение каждого микроэлемента по соответствующей величине оптической плотности.

Концентрацию микроэлемента (C) в микрограммах в 100 мл спермы вычисляют по формуле

$$C = \frac{m \cdot 100}{V},$$

где m — содержание микроэлемента в пробе, мкг;

V — объем спермы, мл.

За окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений.

Допускаемые расхождения между результатами параллельных определений не должны превышать: для железа и меди — 7%, для цинка — 5% и для кобальта — 6%.

3.2. Спектральный метод определения микроэлементов

Метод применяют при серийных испытаниях проб спермы.

Сущность метода заключается в измерении интенсивности спектральных линий определяемого элемента и элемента сравнения внутреннего стандарта.

3.2.1. *Оборудование, материалы и реактивы*

Для проведения испытания применяют:

спектрограф кварцевый ИСП-30;
генератор ИГ-3;
микрофотометр МФ-2 или ИФО-451;
спектропроектор ПС-18 или ДСП-1;
электроплитку с терморегулятором;
штатив для угольных электродов;
печь муфельную;
приспособление для заточки электродов;
фотопластинки спектральные типа I или II;
электроды угольные спектральные чистые;
атлас дуговых и искровых спектров железа;
пипетки пастеровские по ГОСТ 1770—74;
тигли кварцевые или фарфоровые;
цинк сернокислый по ГОСТ 4174—69;
марганец сернокислый по ГОСТ 4165—68;
кобальт хлористый по ГОСТ 4525—68;
ортооксихинолин по ГОСТ 5847—62, х.ч.;
натрий уксуснокислый по ГОСТ 1999—60, х. ч.;
аммиак водный, ос.ч;
серебро азотнокислое по ГОСТ 1277—75, х. ч.;
натрий вольфрамовокислый по ГОСТ 18289—72, ос.ч;
кислоту соляную по ГОСТ 14261—69, ос. ч.

3.2.2. *Подготовка к испытанию*

3.2.2.1. **Приготовление стандартных растворов марганца, меди, цинка и кобальта**

Навески солей марганца, меди, цинка массой 400 мг и кобальта массой 40 мг растворяют отдельно в колбах вместимостью

100 мл. Затем делают разведения 1:100 — для растворов солей марганца, меди и кобальта и 1:10 — для раствора соли цинка. Растворы смешивают в равных объемах.

Для построения градуировочного графика берут смесь микроэлементов в количестве 0,2 мл (первая концентрация), 0,4 мл (вторая концентрация), 1,0 мл (третья концентрация) и 2,0 мл (четвертая концентрация).

Логарифмы концентраций (lg C) приготовленных растворов микроэлементов указаны в таблице.

Микроэлементы	Логарифмы концентраций			
	первой	второй	третьей	четвертой
Медь	—6,29	—5,99	—5,59	—5,29
Цинк	—5,34	—5,04	—4,64	—4,34
Марганец	—6,34	—6,04	—5,62	—5,34
Кобальт	—7,01	—6,71	—6,31	—6,01

3.2.2.2. **Приготовление раствора внутреннего стандарта**

В колбу вместимостью 50 мл наливают небольшое количество воды и добавляют 0,5 мл 0,2%-ного раствора азотнокислого серебра и 1 мл 10%-ного раствора вольфрамовокислого натрия. Смесь растворов перемешивают и доводят водой до метки.

3.2.3. *Проведение испытания*

3.2.3.1. Помещают 1 мл спермы в тигель, высушивают ее в сушильном шкафу при температуре 105°С и затем озоляют в муфельной печи при температуре 450—500°С. К зольному осадку в тигле добавляют 2 мл 2 н. раствора соляной кислоты и раствор подогревают на плитке до кипения. Содержимое тигля сливают в центрифужную пробирку при температуре 450—500°С. К зольному осадку в тигле добавляют 2 мл 2н. раствора соляной кислоты и раствор подогревают на плитке до кипения. Содержимое тигля сливают в центрифужную пробирку. Тигель ополаскивают три раза водой по 2 мл и промывные воды сливают в ту же центрифужную пробирку. К солянокислому раствору элементов добавляют 0,5 мл 50%-ного раствора уксуснокислого натрия и 0,5 мл 2,5%-ного раствора ортооксихинолина, приготовленного на 6%-ной уксусной кислоте. К полученной смеси растворов добавляют несколько капель концентрированного аммиака, доводя pH смеси до 8,0—9,0. Полученную смесь выдерживают 10 мин в термостате или на водяной бане при температуре 80°С и затем центрифугируют 20 мин при частоте вращения 2000 об/мин.

Центрифугаты фильтруют, сливают в одну колбу и используют для построения градуировочного графика.

Осадки в центрифужных пробирках растворяют двумя каплями концентрированной азотной кислоты и добавляют 0,25 мл раство-

ра внутреннего стандарта. Полученную смесь из центрифужных пробирок переносят в тигли, высушивают, а затем озоляют при температуре 450—500°С.

Содержимое тиглей растворяют, добавляя одну каплю концентрированной азотной кислоты и четыре капли воды, и подогревают.

Для построения градуировочного графика в четыре центрифужные пробирки вносят по 5 мл центрифугата и в каждую из пробирок добавляют смесь микроэлементов в следующих количествах: в первую пробирку вносят 0,2 мл, во вторую — 0,4 мл, в третью — 1,0 мл и в четвертую— 2,0 мл. Микроэлементы, содержащиеся в растворе, выпадают в осадок за счет избытка ортооксихинолина. Выпавший осадок центрифугируют 20 мин при частоте вращения 2000 об/мин, растворяют в концентрированной азотной кислоте, добавляют раствор внутреннего стандарта и затем обрабатывают так же, как осадок, полученный из пробы спермы.

3.2.3.2. Растворы проб и стандартные растворы микроэлементов из тиглей наносят пастеровской пипеткой на торцевую поверхность подготовленных и подогретых до 70°С спектрально чистых угольных электродов.

Снимают на одну и ту же спектральную пластинку спектры микроэлементов проб и стандартных растворов, соблюдая следующие условия съемки: искра конденсированная, схема сложная (вариант 1), емкость конденсатора 0,01 мкФ, самоиндукция 0, искровой рабочий промежуток 3 мм, сила тока 2,0—2,5 А, размер цели 0,005 мм.

Для спектрографирования применяют спектральные пластинки типа I чувствительностью 6 ед ГОСТ и выдержкой 60 с. Пластинки проявляют в гидрохиноновом проявителе.

3.2.3.3. Проводят идентификацию спектральных аналитических линий определяемых микроэлементов и элементов внутреннего стандарта с помощью спектропроектора и атласа дуговых и искровых спектров железа.

Используют следующие аналитические линии микроэлементов и внутреннего стандарта: для меди — 3247, 540А, для цинка — 3345, 020А, для марганца — 2593, 726А, для кобальта — 3453, 505А, для серебра — 3280, 683А и 3382, 89А, для вольфрама — 2589, 167А.

Измеряют на микрофотометре интенсивность почернений аналитических линий определяемых микроэлементов и линий внутреннего стандарта.

Для линий меди и цинка внутренним стандартом является линия серебра с длиной волны соответственно 3280, 683А и 3382, 89А; для линий марганца и кобальта внутренним стандартом служит линия вольфрама.

Фотометрируют аналитические линии меди, цинка, марганца и кобальта приготовленных стандартных растворов микроэлементов

и строят для каждого микроэлемента градуировочный график, откладывая по оси абсцисс величину логарифма концентраций микроэлемента в соответствии с таблицей, а по оси ординат — соответствующее для каждой концентрации значение разности почернений линии определяемого микроэлемента и линии элемента внутреннего стандарта.

В случае, если интенсивность почернения линии определяемого элемента превышает интенсивность почернения линии элемента внутреннего стандарта, разность почернений имеет положительное значение и ее величину откладывают по оси ординат вверх от нулевой точки.

Если интенсивность почернения линии элемента внутреннего стандарта превышает интенсивность почернения линии определяемого элемента, разность почернений имеет отрицательное значение и ее величину откладывают по оси ординат вниз от нулевой точки. Величины почернений откладывают в пределах от плюс 1,0 до минус 1,0 с ценой деления 0,1 в 1 см.

В таком же масштабе откладывают по оси абсцисс значение логарифма концентраций микроэлементов. Градуировочный график строят по результатам трех параллельных определений. Фотометрируют аналитические линии микроэлементов испытуемых проб и внутреннего стандарта и по разности почернений линий находят на градуировочном графике соответствующую величину логарифма концентрации определяемого элемента.

3.2.4. *Обработка результатов*

По логарифму концентрации определяемого микроэлемента вычисляют его содержание в пробе.

Концентрацию микроэлемента (C) в микрограммах в 100 мл спермы вычисляют по п. 3.1.4.

За окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений. Допускаемые расхождения между результатами параллельных определений не должны превышать 12%.

4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КЕТОНОВЫХ ТЕЛ В СПЕРМЕ

Содержание кетоновых тел в сперме определяют методами полуколичественного и количественного анализа.

4.1. Полуколичественный метод определения содержания кетоновых тел

Сущность метода заключается в положительной реакции нитропруссидной пробы в присутствии кетоновых тел и визуальной оценке интенсивности окрашивания.

4.1.1. *Оборудование и реактивы*

Для проведения испытания применяют:

пробирки по ГОСТ 1770—74;

пипетки пастеровские;

натрий нитропруссид, насыщенный раствор;

сульфосалициловую кислоту по ГОСТ 4478—68, 10%-ный водный раствор;

натрий гидрат окиси (натрий едкий) по ГОСТ 4328—66, 40%-ный водный раствор;

воду дистиллированную по ГОСТ 6709—72.

4.1.2. *Проведение испытания*

В пробирку вносят 0,4 мл цельной спермы, прибавляют три капли 10%-ного водного раствора сульфосалициловой кислоты. Пробирку встряхивают, затем добавляют одну каплю насыщенного раствора нитропруссида натрия. Пробирку снова тщательно встряхивают, после чего осторожно пастеровской пипеткой с длинным концом подслаивают на дно пробирки 0,2—0,3 мл водного раствора едкого натрия. При наличии кетоновых тел в сперме на границе соприкосновения раствора едкого натрия со спермой в течение 30 с образуется окрашенное кольцо.

4.1.3. *Обработка результатов*

Содержание кетоновых тел в процентах определяют по интенсивности окрашивания кольца:

слабо-розовое и светло-малиновое окрашивание — $0{,}5—1{,}9 \cdot 10^{-3}\%$;

окрашивание в малиновый цвет — $3{,}0—3; 4 \cdot 10^{-3}\%$;

окрашивание в вишневый цвет — $3{,}5/4{,}9 \cdot 10^{-3}\%$;

окрашивание в темно-вишневый цвет — более $5 \cdot 10^{-3}\%$ кетоновых тел.

4.2. Количественный метод определения содержания кетоновых тел

4.2.1. *Оборудование и реактивы*

Для проведения испытания применяют:

оборудование и реактивы, указанные в п. 4.1.1;

молоко коровье.

4.2.2. *Подготовка к испытанию*

Неразбавленную сперму разводят коровьим молоком, в котором не должно содержаться кетоновых тел. Для этого готовят ряд пробирок, содержащих по 0,4 мл спермы, разведенной молоком в соотношении от 1:1 до 1:10. При обнаружении ацетона в сперме, разведенной 1:10, сперму дополнительно разводят до получения отрицательной реакции (отсутствие светло-малинового окрашивания).

Сперму, разбавленную средами и сохраненную при плюсовой температуре или в замороженном состоянии, разводят молоком в соотношениях от 1:1 до 1:3.

Присутствие кетоновых тел в молоке определяют, как указано в п. 4.1.2, добавляя к 4 мл молока десятикратное количество реактивов.

4.2.3. *Проведение испытания*

Содержание кетоновых тел в пробирках со спермой, разведенной молоком, определяют по п. 4.1.2. Фиксируют номер пробирки, в которой образовалось кольцо слабо-розового цвета (соответствует содержанию $0{,}5 \cdot 10^{-3}\%$ кетоновых тел).

4.2.4. *Обработка результатов*

Содержание кетоновых тел ($K_т$) в процентах вычисляют по формуле

$$K_т = 0{,}5 \cdot 10^{-3} Д_1,$$

где $Д_1$ — разведение спермы молоком, при котором появляется слабо-розовое окрашивание;

$0{,}5 \cdot 10^{-3}$ — содержание кетоновых тел при слабо-розовом окрашивании, %.

Содержание кетоновых тел в сперме, предварительно разбавленной средами для разбавления, вычисляют по формуле

$$K_т = 0{,}5 \cdot 10^{-3} \cdot Д_1 \cdot Д,$$

где $Д$ — разведение спермы средами.

За окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений. Допускаемые расхождения между результатами параллельных определений не должны превышать ±10%.

К

Изменение № 1 ГОСТ 20909.6—75 Сперма быков неразбавленная. Методы биохимических исследований

Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 08.06.81 № 2857 срок введения установлен

с 01.07.81

Пункт 2.1.1. Заменить ссылки: ГОСТ 8613—64 на ГОСТ 8613—75, ГОСТ 12487—67 на ГОСТ 20292—74, ГОСТ 12026—66 на ГОСТ 12026—76, ГОСТ 3118—67 на ГОСТ 3118—77, ГОСТ 4204—66 на ГОСТ 4204—77, ГОСТ 3765—72 на ГОСТ 3765—78, ГОСТ 4815—54 на ГОСТ 4815—76.

Пункт 2.2.2. Третий абзац. Заменить слова: «соответственно 2, 3, 4, 5 мкг» на «соответственно 1, 2, 3, 4, 5 мкг».

Пункт 2.3.1. Второй абзац. Заменить значение: 2—3°С на 2—5°С.

Пункт 3.1.1. Заменить слова и ссылки: «эфир сернокислый по ГОСТ 6265—52» на «эфир петролейный по ГОСТ 11992—66», ГОСТ 10165—62 на ГОСТ 10165—79, ГОСТ 14261—69 на ГОСТ 14261—77, ГОСТ 5850—51 на ГОСТ 5850—72, ГОСТ 11125—73 на ГОСТ 11125—78, ГОСТ 3760—64 на ГОСТ 3760—79, ГОСТ 4462—68 на ГОСТ 4462—78, ГОСТ 4165—68 на ГОСТ 4165—78, ГОСТ 4205—68 на ГОСТ 4205—77, ГОСТ 989—62 на ГОСТ 989—75, ГОСТ 4478—68 на ГОСТ 4478—78, ГОСТ 10553—63 на ГОСТ 10553—75; после слов «перекись водорода» исключить слова: «по ГОСТ 10989—64»,

(Продолжение см. стр. 238)

(Продолжение изменения к ГОСТ 20909.6—75)

Пункт 3.1.2.6. Первый абзац. Заменить значение: 450°С на 500°С.

Пункт 3.1.3.4. Заменить слова: «с зеленым светофильтром» на 530 ммк.

Пункт 3.1.3.5. Второй абзац. Заменить слова: «синем светофильтре» на 435 ммк.

Пункт 3.1.3.6. Второй абзац. Заменить слова: «зеленом светофильтре» на 535 ммк.

Пункт 3.1.3.7. Третий абзац. Заменить слова: «синем светофильтре» на 420 ммк.

Пункт 3.2.1 после слов «пипетки пастеровские» исключить слова: «по ГОСТ 1770—74»; после слов «натрий уксуснокислый» исключить слова: «по ГОСТ 1999—60»; после слов «титли кварцевые или фарфоровые» дополнить словами: «бумагу универсальную, индикаторную»; заменить ссылки: ГОСТ 4174—69 на ГОСТ 4174—77, ГОСТ 4165—68 на ГОСТ 4165—78, ГОСТ 4525—68 на ГОСТ 4525—77, ГОСТ 5847—62 на ГОСТ 5847—76, ГОСТ 18289—72 на ГОСТ 18289—78, ГОСТ 14261—69 на ГОСТ 14261—77.

Пункт 4.1.1. Заменить ссылки: ГОСТ 1770—74 на ГОСТ 10515—75, ГОСТ 4478—68 на ГОСТ 4478—78, ГОСТ 4328—66 на ГОСТ 4328—77.

Пункт 4.1.3. Вторй абзац. Заменить значение: 1,9 на 2,9; третий абзац. Заменить значения: 3; 4 на 3, 4; четвертый абзац. Заменить значения: 3,5/4,9 на 3,5—4,9.

(ИУС № 8 1981 г.)

СОДЕРЖАНИЕ

ГОСТ 20909.3—75 Сперма быков неразбавленная. Методы морфологических исследований 1

ГОСТ 20909.4—75 Сперма быков неразбавленная. Методы биологических исследований 12

ГОСТ 20909.5—75 Сперма быков неразбавленная. Методы испытаний физических свойств 23

ГОСТ 20909.6—75 Сперма быков неразбавленная. Методы биохимических исследований 35

Редактор *Н. Е. Шестакова*
Технический редактор *О. Н. Никитина*
Корректор *И. Л. Хинищ*

Сдано в набор 10. 10.75 Подп. в печ. 12. 12.75 3,25 п. л. Тир. 12000 Цена 17 коп.

Ордена «Знак Почета» Издательство стандартов. Москва, Д-22, Новопресненский пер., 3
Калужская типография стандартов, ул. Московская, 256, Зак. 2175