

Определение неорганического фосфора

Принцип метода определения неорганического фосфора в плазме (сыворотке) крови и моче по Белла-Бригса-Юдилевичу (цитированного по Ю.Н.Неменовой, 1972) основан на способности неорганического фосфора в кислой среде образовывать с молибдатом аммония фосфорно-молибденовую кислоту, которая при окислении образует комплекс синего цвета, интенсивность которого пропорциональна концентрации фосфора.

Необходимые приборы:

- спектрофотометр;
- центрифуга.

Необходимые реактивы:

1. **20,0% раствор трихлоруксусной кислоты** (к 20,0 г ТХУ добавить 80,0 мл дистиллированной воды);
2. **2,0% свежеприготовленной раствор аскорбиновой кислоты** (к 200,0 мг аскорбиновой кислоты добавить 9,8 мл дистиллированной воды или же в зависимости от количества исследуемых проб приготовить соответствующий объём);
3. **Молибденовый реактив:**
 - 25,0 г молибденовокислого аммония растворить в 300,0 мл дистиллированной воды;
 - к 125,0 мл дистиллированной воды прилить 75,0 мл химически чистой серной кислоты и после охлаждения смешать с раствором молибденовокислого аммония;
4. **0,1 М (100,0 ммоль/л) стандартный раствор** (1,361 г $\text{KН}_2\text{PО}_4$ растворить в 100 мл дистиллированной воды. *Для большей сохранности можно добавить 1,0 мл хлороформа*);
 - калибровочные стандартные растворы с концентрацией фосфора в 4,0, 2,0, 1,0, 0,5 и 0,25 ммоль/л готовят путём разведения из основного стандартного раствора.

Ход определения:

В крови К 0,2 мл негемолизированной плазмы крови добавить 0,8 мл дистиллированной воды и 0,5 мл трихлоруксусной кислоты, перемешать и 10 минут центрифугировать при 3000 оборотах. К 1,0 мл отобранного супернатанта последовательно прилить по 0,2 мл молибденового реактива и аскорбиновой кислоты и через 5 минут добавить 1,6 мл дистиллированной воды, а спустя 10 минут определить оптическую плотность при длине волны 650 нм.

В моче К 0,2 мл разведенной мочи (в 5-10 раз при водном диурезе и в 10-20 раз мочу. Полученную в спонтанном состоянии) последовательно прилить по 0,2 мл молибденового реактива и аскорбиновой кислоты 4,4 мл дистиллированной воды и, спустя 10 минут, посмотреть оптическую плотность против контроля, состоящего из 0,2 мл раствора молибденового реактива, 0,2 мл аскорбиновой кислоты и 4,6 мл дистиллированной воды.

Расчёт Содержания фосфора (ммоль/л или мкмоль/мл) рассчитать по заранее построенной калибровочной кривой или же показания оптической плотности исследуемых проб разделить на показания стандартного раствора и умножить на его концентрацию

П Л А З М А К Р О В И		Контроль (мл)	Проба (мл)	Стандарт (мл)
	Дистиллированная вода	1,0	0,8	0,8
	Стандартный раствор			0,2
	Исследуемая проба		0,2	
	Трихлоруксусная кислота	0,5	0,5	0,5
			Центрифугировать 10 минут при 2000 оборотах	
		Отобрать 1,0 мл и к ней добавить:		
	Молибденовый реактив	0,2	0,2	0,2
	Аскорбиновая кислота	0,2	0,2	0,2
	Дистиллированная вода	1,6	1,6	1,6
Через 10 минут определить оптическую плотность при длине волны 650 нм				

М О Ч А		Контроль (мл)	Проба (мл)	Стандарт (мл)
	Стандартный раствор	-	-	0,2
	Исследуемая проба	-	0,2	-
	Молибденовый реактив	0,2	0,2	0,2
	Аскорбиновая кислота	0,2	0,2	0,2
	Дистиллированная вода	4,6	4,4	4,4
Через 10 минут определить оптическую плотность при длине волны 650 нм				