

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

«УТВЕРЖДАЮ»
Заместитель Министра
здравоохранения – Главный
государственный санитарный врач
Республики Беларусь



Н.П.Жукова
«19» декабря 2018 г.
Регистрационный № 008-1118

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНОВ ГРУППЫ З (В₇,
В₈, В₁₂) В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ, ПРОДОВОЛЬСТВЕННОМ СЫРЬЕ,
ВИТАМИННЫХ ПРЕПАРАТАХ И ПРЕМИКСАХ
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ МЕТОДОМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
АУКСОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр гигиены»

АВТОРЫ: Н.В. Дудчик, С.И.Сычик, Д.С. Грек, А.В. Адамович,
О.А. Емельянова

Минск, 2018

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра —
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ Н. П. Жукова
19.12.2018
Регистрационный № 008-1118

**МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНОВ
ГРУППЫ В (В₇, В₈, В₁₂) В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ,
ПРОДОВОЛЬСТВЕННОМ СЫРЬЕ, ВИТАМИННЫХ ПРЕПАРАТАХ
И ПРЕМИКСАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АУКСОТРОФНЫХ
МИКРООРГАНИЗМОВ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: РУП «Научно-практический центр гигиены»

АВТОРЫ: канд. биол. наук, доц. Н. В. Дудчик, канд. мед. наук, доц. С. И. Сычик,
Д. С. Грек, А. В. Адамович, О. А. Емельянова

Минск 2018

ГЛАВА 1 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) устанавливает методы количественного определения витаминов В₇, В₈, В₁₂ в витаминизированных соках, детском питании, мучных продуктах, крупах, спортивном питании, конфетах, БАД и др. (далее — объекты исследования).

2. Настоящая инструкция предназначена для специалистов учреждений, осуществляющих государственный санитарный надзор, иных учреждений, осуществляющих количественное определение витаминов В₇, В₈, В₁₂ в пищевых продуктах, продовольственном сырье, витаминных препаратах и др.

ГЛАВА 2 ПРИНЦИП МЕТОДА

1. Метод количественного определения витаминов группы В в пищевых продуктах, продовольственном сырье, витаминных препаратах и премиксах заключается в измерении оптической плотности растворов, полученных в результате воздействия определяемого витамина, обладающего ростостимулирующим эффектом, на соответствующий штамм ауксотрофных бактерий, адсорбированных на планшете. Измеряемая оптическая плотность зависит от концентрации витамина в исследуемом образце.

2. Основные характеристики методов количественного определения витаминов В₇, В₈, В₁₂ представлены в таблице 1.

Таблица 1. — Характеристики методов количественного определения витаминов группы В

Характеристика	Исследуемый витамин		
	В ₇ (биотин)	В ₈ (инозитол)	В ₁₂ (цианокобаламин)
Тест-штамм ауксотрофных микроорганизмов	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis (leichmannii)</i>
Диапазон измерений	0,08–0,72 мкг/100 г (мл)	0,5–5,0 мг/100 г (мл)	0,03–0,18 мкг/100 г (мл)
Нижний предел измерения	0,08 мкг/100 г (мл)	0,5 мг/100 г (мл)	0,03 мкг/100 г (мл)
Коэффициент вариации для стандартов	<10 %	<10 %	<10 %
Погрешность метода	±18,8 %	±14,8 %	±14,6 %

ГЛАВА 3 ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ, РЕАКТИВЫ

1. Для количественного определения витаминов В₇, В₈, В₁₂ в пищевых продуктах используются оборудование, лабораторная посуда, материалы:

Стерильный бокс

Анализатор потенциометрический (рН-метр), ГОСТ 19881

погрешность измерений рН±0,1

Автоматический микропланшетный фотометр
с фильтром на 610–630 нм (540–550 нм) ГОСТ 14686-69

Инкубатор с темной камерой, 37 °С

Водяная баня с подогревом до 95 °С

Центрифуга лабораторная (>8 000 г)

Весы лабораторные (диапазон взвешивания ГОСТ 24104

0,0100–210,0000 г, погрешность взвешивания
0,2 мг)

Лабораторный встряхиватель

Термогигрометр

Бактерицидные лампы

Дистиллятор

Холодильник бытовой, обеспечивающий ГОСТ 16317

поддержание температуры (4±2 °С)

Шкаф сушильный электрический
общелабораторного назначения (для
стерилизации и сушки посуды)

Термометр с ценой деления шкалы 1 °С ГОСТ 112-78

Пинцеты медицинские ГОСТ 21241-89

Пробирки пластиковые стерильные с
завинчивающимися крышками (15 и 50 мл)

Колбы разной вместимости ГОСТ 25336

Пробирки стерильные вместимостью 1,5
или 2,0 мл

Стерильные мембранные фильтры 0,2 мкм
со стерильным шприцем

Ступка с пестиком

Гомогенизатор или блендер

Штативы для пробирок

Перчатки медицинские стерильные

Контейнер для сброса наконечников

Контейнеры стерильные из полимерных
материалов для отбора образцов

Автоматические пипеточные дозаторы
с переменным объемом 20–200, 100–1 000,
1 000–5 000 мкл

Наконечники одноразовые с фильтром
для дозаторов

Ножницы медицинские	ГОСТ 21239
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709
Соляная кислота	ГОСТ 3118
Натр едкий	ГОСТ 11078
Ацетат натрия безводный	
Уксусная кислота	
Лимонная кислота	
Такадиастаза	
Пепсин	
Микротитровальный планшет, лунки которого покрыты соответствующим тест-штаммом микроорганизмов	
Бидистиллированная стерильная вода	
Питательные среды для анализа витаминов	
Стандарты витаминов	
Рамка для закрепления стрипов	
Клеящаяся пленка	

2. Допускается использование оборудования и материалов с аналогичными по назначению техническими и метрологическими характеристиками для выполнения исследований в соответствии с настоящей инструкцией. При их использовании следует руководствоваться рекомендациями изготовителя.

ГЛАВА 4 ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ И РЕАКТИВОВ

1. *Приготовление ацетатного буфера с рН 4,5.* Взвешивают 0,66 г ацетата натрия и помещают в стакан объемом 100 см³ с магнитной мешалкой, добавляют 50 мл дистиллированной или деионизированной воды и перемешивают. Добавляют 0,69 см³ уксусной кислоты, проверяют уровень рН (4,5). При необходимости корректировку производят с помощью раствора HCl концентрацией 0,1 моль/дм³. Раствор перемешивают и переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят дистиллированной водой до метки. Буфер хранят в бутылке из темного стекла не более 7 дней при температуре от 2 до 8 °С.

2. *Приготовление цитратного буфера с рН 4,5.* В химический стакан объемом 100 см³ помещают 1,5 г моногидрата лимонной кислоты, добавляют 50 мл дистиллированной или деионизированной воды и перемешивают. Затем добавляют 12 см³ раствора NaOH концентрации 1 моль/дм³ (либо 0,48 г NaOH); рН раствора должен быть 4,5 (при необходимости корректировку производят с помощью раствора HCl концентрации 0,1 моль/дм³). Раствор перемешивают и переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят дистиллированной водой до метки. Буфер хранят не более 3 дней при температуре от 2 до 8 °С.

3. *Приготовление соляной кислоты концентрации 0,1 моль/дм³:* 8 см³ концентрированной соляной кислоты плотностью 1,185 г/см³ растворяют в 300 см³ дистиллированной воды в мерной колбе вместимостью 1 000 см³, доводят объем до метки и перемешивают.

ГЛАВА 5

ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ ПОДГОТОВКИ ПРОБ К АНАЛИЗУ

1. Отбор проб осуществляется в соответствии с действующей нормативной документацией по отбору проб. Пробы, предназначенные для анализа, должны храниться в прохладном, сухом, темном месте.

2. При исследовании образцов с низким содержанием витаминов допускается использование навески 5 г (мл), что необходимо учесть при обработке результатов.

3. Подготовленные экстракты образцов используются в течение 1 сут и до постановки анализа хранятся в прохладном темном месте.

4. Экстракты подготовленных проб разводятся стерильной водой таким образом, чтобы итоговая концентрация экстракта образца находилась в диапазоне калибровочной кривой (предпочтительно на уровне градуировочных растворов 2–3). Данное разведение будет учитываться как фактор разбавления (f_d) при дальнейшем расчете содержания витаминов в образце.

ГЛАВА 6

ПОДГОТОВКА ПРОБ К АНАЛИЗУ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ВИТАМИНА В₇

1. *Витаминизированные соки, напитки:* 1 см³ пробы помещают в пробирку для центрифуги объемом 50 см³ и добавляют 40 см³ дистиллированной либо деионизированной воды и встряхивают, стерильно фильтруют (либо нагревают в течение 30 мин при 95 °С на водяной бане, затем быстро охлаждают до температуры ниже 30 °С). Пипет-дозатором в стерильный реакционный сосуд отбирают 1 см³ прозрачной надосадочной части раствора пробы.

2. *Витаминизированные жевательные конфеты и сладости.* Навеску 15–20 г жевательных конфет/сладостей взвешивают в пробирку для центрифуги объемом 50 см³, добавляют 40 см³ дистиллированной либо деионизированной воды, растворяют на водяной бане в течение 30 мин при 95 °С, периодически встряхивая, затем быстро охлаждают до температуры ниже 30 °С. Раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят дистиллированной либо деионизированной водой до метки. Отбирают объем раствора, соответствующий 1 г пробы, и переносят в пробирку объемом 50 см³ для центрифуги, доливают дистиллированной либо деионизированной водой до метки 40 см³, встряхивают. Раствор стерильно фильтруют (либо нагревают в течение 30 мин при 95 °С на водяной бане, затем быстро охлаждают до температуры ниже 30 °С). Пипет-дозатором в стерильный реакционный сосуд отбирают 1 см³ прозрачной надосадочной части раствора пробы.

3. *Таблетки, капсулы, витаминные смеси, премиксы.* Гомогенизируют в ступке или миксере 5–10 таблеток или капсул (без оболочек). Взвешивают 0,2±0,01 г пробы таблетки, витаминной смеси, премикса или содержимого капсулы, помещают в пробирку объемом 50 см³ для центрифуги, добавляют 40 см³ дистиллированной либо деионизированной воды и встряхивают, стерильно фильтруют (либо нагревают в течение 30 мин при 95 °С на водяной бане, затем быстро охлаждают до температуры ниже 30 °С). При необходимости центрифугируют или стерильно фильтруют. Пипет-дозатором в стерильный

реакционный сосуд отбирают 1 см³ прозрачной надосадочной части раствора пробы. При обработке результатов учитывают массу навески (0,2 г).

4. *Витаминизированные продукты (крупа, хлеб, мука, детское питание).* Навеску $1 \pm 0,01$ г пробы помещают в пробирку для центрифуги объемом 50 см³ и добавляют 30 см³ дистиллированной или деионизированной воды, встряхивают, доводят дистиллированной либо деионизированной водой до метки 40 см³ и экстрагируют в течение 30 мин при 95 °С (на водяной бане). В течение этого времени встряхивают минимум 5 раз. Необходимо следить за тем, чтобы пробирка была плотно закрыта. Затем пробирку быстро охлаждают до температуры ниже 30 °С, центрифугируют, при необходимости стерильно фильтруют. Пипет-дозатором в стерильный реакционный сосуд отбирают 1 см³ прозрачной надосадочной части раствора пробы.

5. *Витаминизированные молочные продукты, детские смеси, многокомпонентные продукты растительного и животного происхождения.* Навеску $1,0 \pm 0,01$ г гомогенизированной пробы помещают в пробирку для центрифуги объемом 50 см³, добавляют 20 см³ воды, встряхивают и устанавливают рН 4,5 с помощью соляной кислоты. Вместо воды возможно использование цитратного буфера с рН 4,5. К полученному раствору добавляют 300 мг такадиастазы, хорошо встряхивают и инкубируют в течение 1 ч при 37 °С в темноте, периодически помешивая. Затем доводят дистиллированной либо деионизированной водой до метки 40 см³ и прогревают в течение 30 мин на водяной бане при 95 °С. В течение этого времени встряхивают минимум 5 раз. Необходимо следить за тем, чтобы пробирка была плотно закрыта. Затем раствор быстро охлаждают до температуры ниже 30 °С и центрифугируют, при необходимости стерильно фильтруют. Пипет-дозатором в стерильный реакционный сосуд отбирают 1 см³ прозрачной надосадочной части раствора пробы.

6. *Дрожжи и дрожжевые продукты.* Навеску $1,0 \pm 0,01$ г гомогенизированной пробы помещают в пробирку для центрифуги объемом 50 см³, добавляют 30 см³ 1 моль/л H₂SO₄, встряхивают. Экстракцию проводят 2 ч на водяной бане при 95 °С. В течение этого времени встряхивают минимум 5 раз. Необходимо следить за тем, чтобы пробирка была плотно закрыта. Затем раствор быстро охлаждают до температуры ниже 30 °С и устанавливают рН 6–7 с помощью 2 мол/л NaOH. Затем доводят дистиллированной либо деионизированной водой до метки 40 см³ и прогревают в течение 30 мин на водяной бане при 95 °С. Затем раствор быстро охлаждают до температуры ниже 30 °С и центрифугируют, при необходимости стерильно фильтруют. Пипет-дозатором в стерильный реакционный сосуд отбирают 1 см³ прозрачной надосадочной части раствора пробы.

ГЛАВА 7

ПОДГОТОВКА ПРОБ К АНАЛИЗУ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ВИТАМИНА В₈

В пробирку для центрифуги объемом 50 см³ помещают 1,0 г (мл) $\pm 0,01$ г (мл) гомогенизированной пробы, добавляют 20 см³ воды, встряхивают и устанавливают рН 4,5 с помощью соляной кислоты. Вместо воды возможно использование цитратного буфера с рН 4,5. К полученному раствору добавляют

100 мг такадиастазы и 100 мг пепсина, хорошо встряхивают и инкубируют в течение 1 ч при 37 °С в темноте, периодически помешивая. Затем доводят дистиллированной либо деионизированной водой до метки 40 см³ и прогревают в течение 30 мин на водяной бане при 95 °С. В течение этого времени встряхивают минимум 5 раз. Необходимо следить за тем, чтобы пробирка была плотно закрыта. Затем раствор быстро охлаждают до температуры ниже 30 °С и центрифугируют, при необходимости стерильно фильтруют. Пипет-дозатором в стерильный реакционный сосуд отбирают 1 см³ прозрачной надосадочной части раствора пробы.

ГЛАВА 8 ПОДГОТОВКА ПРОБ К АНАЛИЗУ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ВИТАМИНА В₁₂

1. *Витаминизированные соки, напитки*: 1 см³ пробы помещают в пробирку для центрифуги объемом 50 см³ и добавляют 40 см³ дистиллированной либо деионизированной воды и встряхивают, стерильно фильтруют (либо нагревают в течение 30 мин при 95 °С на водяной бане, затем быстро охлаждают до температуры ниже 30 °С). Пипет-дозатором в стерильный реакционный сосуд отбирают 1 см³ прозрачной надосадочной части раствора пробы.

2. *Витаминизированные жевательные конфеты и сладости*. Навеску 15–20 г жевательных конфет/сладостей взвешивают в пробирку для центрифуги объемом 50 см³, добавляют 40 см³ дистиллированной либо деионизированной воды, растворяют на водяной бане в течение 30 мин при 95 °С, периодически встряхивая, затем быстро охлаждают до температуры ниже 30 °С. Раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят дистиллированной либо деионизированной водой до метки. Отбирают объем раствора, соответствующий 1 г пробы, и переносят в пробирку объемом 50 см³ для центрифуги, доливают дистиллированной либо деионизированной водой до метки 40 см³, встряхивают. Раствор стерильно фильтруют (либо нагревают в течение 30 мин при 95 °С на водяной бане, затем быстро охлаждают до температуры ниже 30 °С). Пипет-дозатором в стерильный реакционный сосуд отбирают 1 см³ прозрачной надосадочной части раствора пробы.

3. *Таблетки, капсулы, витаминные смеси, премиксы*. Гомогенизируют в ступке или миксере 5–10 таблеток или капсул (без оболочек). Взвешивают 0,2±0,01 г пробы таблетки, витаминной смеси, премикса или содержимого капсулы, помещают в пробирку объемом 50 см³ для центрифуги и добавляют 40 см³ дистиллированной либо деионизированной воды и встряхивают, стерильно фильтруют (либо нагревают в течение 30 мин при 95 °С на водяной бане, затем быстро охлаждают до температуры ниже 30 °С). При необходимости центрифугируют или стерильно фильтруют. Пипет-дозатором в стерильный реакционный сосуд отбирают 1 см³ прозрачной надосадочной части раствора пробы. При обработке результатов учитывают массу навески (0,2 г).

4. *Витаминизированные продукты (крупы, хлеб, мука, детское питание)*. Навеску 1±0,01 г пробы помещают в пробирку для центрифуги объемом 50 см³ и добавляют 30 см³ дистиллированной или деионизированной воды, встряхивают,

доводят дистиллированной либо деионизированной водой до метки 40 см³ и экстрагируют в течение 30 мин при 95 °С (на водяной бане). В течение этого времени встряхивают минимум 5 раз. Необходимо следить за тем, чтобы пробирка была плотно закрыта. Затем пробирку быстро охлаждают до температуры ниже 30 °С, центрифугируют, при необходимости стерильно фильтруют. Пипет-дозатором в стерильный реакционный сосуд отбирают 1 см³ прозрачной надосадочной части раствора пробы.

5. *Витаминизированные молочные продукты, детские смеси, многокомпонентные продукты растительного и животного происхождения.* Навеску 1,0±0,01 г гомогенизированной пробы помещают в пробирку для центрифуги объемом 50 см³, добавляют 20 см³ воды, встряхивают и устанавливают рН 4,5 с помощью соляной кислоты. Вместо воды возможно использование ацетатного или цитратного буфера с рН 4,5. К полученному раствору добавляют 300 мг такадиастазы, хорошо встряхивают и инкубируют в течение 1 ч при 37 °С в темноте, периодически помешивая. Затем доводят дистиллированной либо деионизированной водой до метки 40 см³ и прогревают в течение 30 мин на водяной бане при 95 °С. В течение этого времени встряхивают минимум 5 раз. Необходимо следить за тем, чтобы пробирка была плотно закрыта. Затем раствор быстро охлаждают до температуры ниже 30 °С и центрифугируют, при необходимости стерильно фильтруют. Пипет-дозатором в стерильный реакционный сосуд отбирают 1 см³ прозрачной надосадочной части раствора пробы.

ГЛАВА 9

ПОДГОТОВКА МИКРОТИТРОВАЛЬНОГО ПЛАНШЕТА

1. Перед началом работы микротитровальный планшет извлекают из холодильника и выдерживают при комнатной температуре (20–25 °С) в течение не менее 30 мин.

2. По формуле 1 рассчитывают необходимое количество лунок (N):

$$N = 3 C + 3 П, \quad (1)$$

где С — количество градуировочных растворов;

П — количество исследуемых проб;

N — количество лунок, необходимое для исследования.

3. Экстракты образцов с неизвестным содержанием витамина должны быть исследованы как минимум в 2 разведениях (на усмотрение оператора).

4. Размечают координаты рабочих градуировочных растворов и проб, используя рисунок 1.

	1	2	3	4	5	6
A	C-0	C-0	C-0	П-3	П-3	П-3
B	C-1	C-1	C-1	П-4	П-4	П-4
C	C-2	C-2	C-2	П-5	П-5	П-5
D	C-3	C-3	C-3	П-6	П-6	П-6
E	C-4	C-4	C-4	П-7	П-7	П-7
F	C-5	C-5	C-5	П-8	П-8	П-8
G	П-1	П-1	П-1	П-9	П-9	П-9
H	П-2	П-2	П-2	П-10	П-10	П-10

С — стандарты; П — пробы

Рисунок 1. — Форма записи координат лунок перед выполнением анализа

ГЛАВА 10 ТЕСТИРОВАНИЕ И ВЫПОЛНЕНИЕ ИЗМЕРЕНИЙ

1. Градуировочные растворы витаминов (стандарты) для построения калибровочной кривой готовят согласно рекомендации производителя непосредственно перед использованием. При построении калибровочной кривой необходимо учитывать фактор разведения образцов при экстракции — $f_{\text{ex}} = 40$.

2. Рекомендуемые расчетные значения стандартов на калибровочной кривой (с учетом f_{ex}) приведены в таблице 2:

Таблица 2. — Рекомендуемые значения стандартов на калибровочной кривой

Название	Концентрация на калибровочной кривой		
	V_7 , мкг/100 г (мл)	V_8 , мкг/100 г (мл)	V_{12} , мкг/100 г (мл)
Нулевая величина	0	0	0
Градуировочный раствор 1	0,08	0,5	0,03
Градуировочный раствор 2	0,24	1,0	0,06
Градуировочный раствор 3	0,4	2,0	0,09
Градуировочный раствор 4	0,56	3,0	0,12
Градуировочный раствор 5	0,72	5,0	0,18

3. Градуировочный раствор готовится не более чем за 15 мин до выполнения теста.

4. Жидкую питательную среду для культивирования ауксотрофных бактерий *Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis (leichmannii)* готовят согласно рекомендации производителя непосредственно перед использованием.

5. Извлекают необходимое количество стрипов микротитровального планшета, закрепляют их в рамке (остальные стрипы хранят вместе с осушителем в фольгированном пакете при температуре 2–8 °С).

6. В лунки микротитровального планшета вносят по 150 мкл питательной среды для культивирования соответствующего ауксотрофного микроорганизма. Затем в лунки микротитровального планшета согласно рабочей схеме вносят по 150 мкл градуировочных растворов и 150 мкл рабочих разведений экстрактов проб.

7. Герметично заклеивают планшет пленкой и инкубируют в темноте в течение 44–48 ч *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis (leichmannii)* при 37 °С, а *Saccharomyces cerevisiae* — при 30 °С.

37. По завершении инкубации планшет переворачивают и кладут на поверхность стола, хорошо встряхнув (переворачивают в обратное положение). Начиная с правого верхнего угла, придерживая рукой планшет, осторожно снимают по диагонали пленку под углом 180°. Имеющиеся на поверхности исследуемых растворов пузырьки разрушают с помощью наконечника пипет-дозатора либо иглы.

38. Измеряют оптическую плотность в каждой лунке на автоматическом микропланшетном фотометре при длине волны 610–630 нм (альтернативно при 540–550 нм). Измерения производят в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора.

ГЛАВА 11

ОБРАБОТКА И ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ

1. По полученным значениям оптической плотности для нулевого и градуировочных растворов строят калибровочную кривую.

2. Для расчета результата измерений вводят значения оптической плотности (OD), измеренные для проб. На основании этих данных осуществляется расчет.

3. По указанной ниже формуле 2 рассчитывают концентрацию витамина с учетом разбавления экстракта проб (фактор разбавления), а также отклоняющуюся навеску пробы (0,2; 5 г (мл)).

$$B_{7,8,12} = \frac{\text{концентрация на градуировочной кривой} \times \text{фактор разбавления} (f_d)}{\text{объем пробы в г (мл)}}, \quad (2)$$

где $B_{7,8,12}$ — концентрация определяемого витамина: для B_7 и B_{12} в мкг/100 г (мл), для B_8 в мг/100 г (мл).

4. Тест был выполнен правильно при соблюдении следующих условий:
 OD нулевого градуировочного раствора < OD градуировочного раствора 1.
 OD градуировочного раствора 5 > 0,6.

5. Пример оценки содержания B_{12} в исследуемом образце:

Навеска:	1 г	Не учитывается Должен учитываться
фактор разведения при экстракции (f_{ex}):	1:40	
фактор разбавления экстракта пробы (f_d):	1:20	
измеренная концентрация витамина B_{12} / 100 г по калибровочной кривой: $0,06 * 20 / 1 = 1,2$ мкг B_{12} / 100 г	0,06 мкг	

6. Результаты измерений оформляют по форме, установленной действующей в лаборатории системой регистрации данных.

ГЛАВА 12 ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ

1. При выполнении работ персонал должен знать и строго соблюдать на рабочем месте требования:

электробезопасности при работе с электроустановками;

пожарной безопасности;

техники безопасности при работе с химическими реактивами;

техники безопасности, изложенные в эксплуатационных документах на средства измерений и оборудование, применяемые при выполнении измерений.

2. Общие меры безопасности микробиологической лаборатории.

3. В ходе исследований необходимо соблюдать Санитарные нормы и правила «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки».

4. Соблюдать осторожность при работе с водяной баней во время подготовки проб исследуемых образцов, использовать термостойкие водонепроницаемые перчатки и не допускать приближения лица и рук к открытым элементам водяной бани.

5. Соблюдать осторожность при работе вблизи пламени горячей спиртовки, при фламбировании инструментария.

6. Соблюдать требования безопасности при работе бактерицидных облучателей: не заходить в помещение при работающих облучателях, не начинать работу в помещении в течение 30 мин после окончания работы бактерицидных облучателей.