

СОГЛАСОВАНО  
Заместитель Председателя  
Государственного комитета  
по стандартизации  
Республики Беларусь

\_\_\_\_\_ С.А. Ивлев

«\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2009 г.

УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель Министра  
Главный государственный  
санитарный врач  
Республики Беларусь

\_\_\_\_\_ В.И. Качан

«\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2009 г.

**ВРЕМЕННАЯ МЕТОДИКА  
КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОТИНА (ВИТАМИНА Н) В  
ДЕТСКОМ ПИТАНИИ, МОЛОКЕ, МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТАХ, МУКЕ,  
КОРМАХ, ВИТАМИНИЗИРОВАННЫХ ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ И  
ВИТАМИННЫХ ПРЕПАРАТАХ С ПОМОЩЬЮ ТЕСТ-СИСТЕМЫ**

Срок действия методики с 01.06.2009 г по 01.06.2011 г

Минск 2009

## СОДЕРЖАНИЕ

1	Область применения	3
2	Показатели прецизионности методики	3
3	Средства измерения, вспомогательные устройства, реактивы, материалы	4
4	Методы измерения	5
5	Требования безопасности	5
6	Требования к квалификации оператора	6
7	Условия выполнения измерений	6
8	Подготовка к выполнению измерений	6
9	Подготовка анализируемых образцов	11
10	Обработка результатов измерений	12
11	Оформление результатов измерений	13

## 1 Область применения

Методика предназначена для количественного определения биотина (витамина Н) в детском питании, молоке, молочных продуктах, муке, кормах, витаминизированных продуктах питания и витаминных препаратах с помощью микробиологической тест-системы VitaFast® биотин.

Эмпирическая формула биотина  $C_{10}H_{16}O_3N_2S$ . Структура витамина соответствует 2-кето-3,4-имидазолито-2-тетрагидротиофен-н-валериановой кислоте.

Молекула биотина состоит из имидазольного и тиофенового колец. Гетероцикл можно рассматривать как тиофеновое кольцо, связанное с уреидной группировкой. В молекуле имеется три асимметрических атома углерода, что обуславливает существование 8 стереоизомеров.

Биотин плохо растворим в воде (22 мг в 100 см<sup>3</sup>), но при нагревании его растворимость увеличивается, в спирте, эфире и хлороформе растворяется 88 мг в 100 см<sup>3</sup> при 25<sup>0</sup>С, в других растворителях (углеводородах парафинового ряда, в циклогексане, бензоле, галогенизированных углеводородах, спиртах и кетонах (ацетон)) биотин практически не растворим.

В данной методике содержание биотина определяется с помощью автоматического микропланшетного фотометра микробиологическим методом с использованием тест-системы VitaFast® биотин производства R-Biopharm (Германия).

Диапазон измерений 0,08 – 0,72 мкг/100 г (см<sup>3</sup>).

Нижний предел измерения – 0,08 мкг/100 г.

## 2 Показатели прецизионности методики

Относительные значения показателей прецизионности (повторяемости и воспроизводимости) и относительные значения пределов повторяемости и воспроизводимости при доверительной вероятности  $P = 0,95$  МВИ представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Относительные значения показателей повторяемости, воспроизводимости и относительные значения пределов повторяемости и воспроизводимости МВИ при доверительной вероятности  $P = 0,95$

Диапазон измерений, мкг/100 г (см <sup>3</sup> )	Метрологические параметры, $P = 0,95$ , $n = 7$				
	Нижний предел обнаружения мкг/100 г	Показатель повторяемости $\sigma$ , %	Показатель внутрилабораторной воспроизводимости $\sigma_R$ , %	Предел Повторяемости $r$ , %	Предел воспроизводимости $R$ , %
0,08 -0,72	0,08	5	8	14	23

### *3 Средства измерения, вспомогательные устройства, реактивы и материалы*

#### *3.1 Средства измерения*

Автоматический микропланшетный фотометр с фильтром

610 - 630 нм (540 - 550 нм) (допустимая погрешность не более  $\pm 5\%$ )

рН-метр

Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г и ценой деления 0,001 г

ГОСТ 24104-88

Автоматический одноканальный дозатор со стерильными наконечниками для пипет-дозаторов 20 – 200 мкл точностью дозирования не более  $\pm 2\%$

Автоматический одноканальный пипет-дозатор с переменным объемом 100 – 1000 мкл с шагом 5,0 мкл и точностью дозирования не более  $\pm 1,5\%$

Мерные колбы вместимостью 100  
1000 см<sup>3</sup>

ГОСТ 1770-74 Е

Химический стакан 100 см<sup>3</sup>

ГОСТ 25336-82

Одноразовые наконечники для автоматических пипет-дозаторов

#### *3.2 Вспомогательные устройства*

Микротитровальный планшет (6 стрипов по 8 лунок)

Стерильный бокс (рекомендуется стерильная работа)

Инкубатор с темной камерой инкубации, 37 °С

Водяная баня с подогревом до 95 °С

Центрифуга, выше 6 000 об./мин.

Стерильные пробирки для центрифуги с завинчивающейся крышкой и градуировкой, 15 и 50 см<sup>3</sup>

Стерильные реакционные сосуды 1,5 или 2,0 см<sup>3</sup>

Стерильный фильтр полиэфирсульфон 0,2 мкм со стерильным шприцем

Холодильник бытовой, позволяющий поддерживать

температуру от 2 до плюс 8 °С

Лабораторный встряхиватель (шейкер), обеспечивающий скорость вращения до 1000 об/мин.

Бумага фильтровальная

ГОСТ 12026

### *3.3 Реактивы, материалы*

Такадиастаза

Фирма «Fluka, кат.№ 86250»

Серная кислота, х.ч.

ГОСТ 4204

Едкий натр, ч.д.а

ГОСТ 4328

Соляная кислота, х.ч.

ГОСТ 3118

Дистиллированная или деионизированная вода

ГОСТ 6709

Микробиологическая тест-система VitaFast® в стандартной комплектации, включающая :

Фирм R-Biopharm  
(Германия)

- микротитровальный планшет с 96 лунками, покрытыми

*Lactobacillus plantarum*

- бидистиллированная стерильная вода (30 см<sup>3</sup>) для

приготовления градуировочных растворов, средства для анализа, а также разбавления экстрактов проб

- средство для анализа биотина (тверд.)

- стандарт биотина (тверд.)

- клеящаяся пленка

- запасная рамка для закрепления стрипов

Могут быть использованы другие средства измерения и вспомогательные устройства по точности, не уступающие рекомендуемым, а также реактивы не ниже указанной чистоты

### *4 Методы измерения*

Принцип метода заключается в специфическом воздействии биотина, экстрагированного из образца, на ауксотрофные бактерии *Lactobacillus plantarum*, адсорбированные на микротитровальном планшете, приводящем к росту бактерий, выражающемся в помутнении раствора и последующем измерении оптической плотности полученного раствора.

### *5 Требования безопасности*

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

- электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019

- пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.018

- техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007
- техники безопасности, изложенные в эксплуатационных документах на средства измерений и оборудование, применяемые при проведении измерений.

Помещение, в котором производится выполнение измерений, должно быть снабжено приточно-вытяжной вентиляцией и подводкой воды.

#### *6 Требования к квалификации оператора*

К выполнению измерений и обработке их результатов допускают специалиста, имеющего высшее или среднее специальное образование, владеющего техникой иммуноферментного анализа и прошедшего подготовку для работы в микробиологической лаборатории.

#### *7 Условия выполнения измерения*

При выполнении измерений в лаборатории согласно ГОСТ 15150-69 должны быть соблюдены следующие условия:

- температура воздуха 18 - 30 °С;
- атмосферное давление 84,0 - 106,7 кПа (630 - 800 мм. рт. ст.);
- влажность воздуха Не более 80% при температуре 25°С;
- напряжение в сети 220±10 В;
- частота переменного тока 50 ± 1 Гц;

Замена отдельных реагентов на реагенты из тест-наборов других партий не допускается.

#### *8 Подготовка к проведению испытания*

Перед выполнением измерений должны быть проведены следующие работы: подготовка измерительной аппаратуры, приготовление растворов реактивов, ферментных препаратов, отбор проб и подготовка к анализу.

##### *8.1 Подготовка измерительной аппаратуры*

Включают фотометр согласно инструкции по эксплуатации. Устанавливают рабочие режимы. Проводят подготовительные работы.

##### *8.2 Предварительная подготовка тест-системы*

Перед началом работы тест-систему извлекают из холодильника и выдерживают при комнатной температуре (20 - 25°С) в течение не менее 30 минут.

##### *8.3 Приготовление растворов*

###### *8.3.1 Приготовление водного раствора серной кислоты концентрации 1 моль/дм<sup>3</sup>*

56,6 см<sup>3</sup> концентрированной серной кислоты плотностью 1,84 г/см<sup>3</sup> растворяют в 50 см<sup>3</sup> дистиллированной воды в мерной колбе вместимостью 100 см<sup>3</sup>, доводят объем до метки и перемешивают.

### *8.3.2 Приготовление водного раствора гидроксида натрия молярной концентрации 2 моль/дм<sup>3</sup>*

8,0 г гидроксида натрия, взвешенного с точностью  $\pm 0,001$  г, помещают в мерную колбу на 100 см<sup>3</sup>, растворяют в 75 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, доводят объем дистиллированной водой до метки и перемешивают.

### *8.3.3 Приготовление водного раствора соляной кислоты концентрации 0,1 моль/дм<sup>3</sup>*

8 см<sup>3</sup> концентрированной соляной кислоты плотностью 1,185 г/см<sup>3</sup> растворяют в 50 см<sup>3</sup> дистиллированной воды в мерной колбе вместимостью 100 см<sup>3</sup>, доводят объем до метки и перемешивают.

### *8.3.4 Приготовление цитратного буфера с рН 4,5*

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

### *8.3.5 Приготовление водного раствора гидроксида натрия концентрации 1 моль/дм<sup>3</sup>*

4,0  $\pm$  0,001 г гидроксида натрия помещают в мерную колбу на 100 см<sup>3</sup>, растворяют в 75 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, доводят объем дистиллированной водой до метки и перемешивают.

### *8.3.6 Приготовление водного раствора гидроксида натрия концентрации 0,1 моль/дм<sup>3</sup>*

0,4  $\pm$  0,001 г гидроксида натрия помещают в мерную колбу на 100 см<sup>3</sup>, растворяют в 75 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, доводят объем дистиллированной водой до метки и перемешивают.

## *8.4 Подготовка анализируемых образцов*

### *8.4.1 Витаминизированные мультивитаминные соки, спортивные напитки*

1 см<sup>3</sup> пробы помещают в пробирку объемом 50 см<sup>3</sup> для центрифуги и добавляют 40 см<sup>3</sup> дистиллированной либо деионизированной воды и встряхивают, фильтруют (либо нагревают в течение 30 минут при 95°С на водяной бане, затем быстро охлаждают до температуры ниже 30°С).

Пипет-дозатором отбирают 1 см<sup>3</sup> прозрачной надосадочной части раствора пробы и фильтруют в стерильный реакционный сосуд через фильтр 0,2 мкм.

### *8.4.2 Витаминизированные жевательные конфеты и сладости*

Навеску 15 - 20 г жевательных конфет/сладостей взвешивают с точностью  $\pm 0,001$  г в пробирку объемом 50 см<sup>3</sup> для центрифуги, добавляют 40 см<sup>3</sup> дистиллированной либо деионизированной воды, растворяют на водяной бане в течение 30 минут при 95°С, периодически встряхивая, затем быстро

охлаждают до температуры ниже 30°C. Раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> и доводят дистиллированной либо деионизированной водой до метки. Отбирают объем раствора, соответствующий 1 г пробы и переносят в пробирку объемом 50 см<sup>3</sup> для центрифуги, доливают дистиллированной либо деионизированной водой до метки 40 см<sup>3</sup>, встряхивают. Раствор фильтруют (либо нагревают в течение 30 минут при 95°C на водяной бане, затем быстро охлаждают до температуры ниже 30°C).

Пипет-дозатором отбирают 1 см<sup>3</sup> прозрачной надосадочной части раствора пробы и фильтруют в стерильный реакционный сосуд через фильтр 0,2 мкм.

#### 8.4.3 Биотин в таблетках, капсулах и витаминных смесях

5 - 10 таблеток или капсул гомогенизируют в ступке или миксере. Капсулы разрезают и разрезанные экстрагируют.

Взвешивают  $1,0 \pm 0,001$  г пробы таблетки, витаминной смеси либо премикса или разрезанной капсулы, помещают в стерильный закручивающийся сосуд объемом 500 см<sup>3</sup>, добавляют 400 см<sup>3</sup> дистиллированной или деионизированной воды, встряхивают, устанавливают рН  $8,0 \pm 0,2$  с помощью растворов HCl или NaOH. Экстрагируют в течение 30 минут при 95°C на водяной бане. В течение этого времени раствор встряхивают минимум 5 раз. Затем быстро охлаждают раствор пробы до температуры ниже 30 °C и переносят в мерную колбу на 1000 см<sup>3</sup>, и доливают дистиллированной или деионизированной водой до метки. Отбирают 1 см<sup>3</sup> раствора и переносят в пробирку объемом 50 см<sup>3</sup> для центрифуги, доливают дистиллированной (деионизированной) водой до метки 40 см<sup>3</sup> и встряхивают. Раствор фильтруют (либо нагревают в течение 30 минут при 95°C на водяной бане, затем быстро охлаждают до температуры ниже 30°C).

Пробирку быстро охлаждают до комнатной температуры, центрифугируют. Пипет-дозатором отбирают 1 см<sup>3</sup> прозрачной надосадочной части раствора пробы и фильтруют в стерильный реакционный сосуд через фильтр 0,2 мкм.

Внимание: при расчете результата необходимо учитывать фактор разведения 20000 (1 г до 1000 см<sup>3</sup> и разведение 1:20). Шаг разведения 1 см<sup>3</sup> на 40 см<sup>3</sup> уже учтен на градуировочной кривой.

#### 8.4.4 Витаминизированные продукты ( крупа, хлеб, мука )

Навеску  $1 \pm 0,01$  г пробы помещают в пробирку для центрифуги объемом 50 см<sup>3</sup> и добавляют 30 см<sup>3</sup> дистиллированной или деионизированной воды, устанавливают рН  $8,0 \pm 0,2$ , встряхивают, доводят дистиллированной либо деионизированной водой до метки 40 см<sup>3</sup> и экстрагируют в течение 30 минут при 95°C (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°C, центрифугируют.

Пипет-дозатором отбирают 1 см<sup>3</sup> прозрачной надосадочной части раствора пробы и фильтруют в стерильный реакционный сосуд через фильтр 0,2 мкм.

#### 8.4.5 Витаминизированное детское питание (молочные продукты, крупы, корма)

Навеску 1,0 ± 0,001 г гомогенизированной пробы помещают в пробирку для центрифуги объемом 50 см<sup>3</sup>, добавляют 20 см<sup>3</sup> воды или 20 см<sup>3</sup> цитратного буфера с рН - 4,5, встряхивают и устанавливают рН - 4,5 с помощью соляной кислоты.

К полученному раствору добавляют 300 мг такадиастазы, хорошо встряхивают и инкубируют в течение 1 часа при 37°C в темноте, периодически слегка помешивая. Затем добавляют 40 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и прогревают в течение 30 минут на водяной бане при 95°C. 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.

Пипет-дозатором отбирают 1 см<sup>3</sup> прозрачной надосадочной части раствора пробы и фильтруют в стерильный реакционный сосуд через фильтр 0,2 мкм.

#### 8.4.6 Дрожжи и дрожжевые продукты (витаминизированные)

1,0 ± 0,001 г гомогенизированной пробы помещают в пробирку для центрифуги объемом 50 см<sup>3</sup> и добавляют 30 см<sup>3</sup> серной кислоты концентрации 1,0 моль/дм<sup>3</sup>, встряхивают, экстрагируют в течение 120 минут при 95°C. Затем раствор быстро охлаждают до температуры ниже 30 °С, устанавливают рН = 6,0 - 7,0 с помощью гидроксида натрия или раствора гидроксида натрия 2 моль/л. Затем добавляют дистиллированную воду до 40 см<sup>3</sup>, встряхивают. Раствор фильтруют и нагревают в течение 30 минут при 95°C на водяной бане, затем быстро охлаждают до температуры ниже 30°C.

Пипет-дозатором отбирают 1 см<sup>3</sup> прозрачной надосадочной части раствора пробы и фильтруют в стерильный реакционный сосуд через фильтр 0,2 мкм.

### 8.5 Подготовка микротитровального планшета

8.5.1 По формуле 1 рассчитывают необходимое количество лунок (N)

$$N = C + П; \quad (1)$$

где C – количество градуировочных растворов,

П – количество исследуемых проб,

N – количество лунок, необходимое для исследования.

8.5.2 Извлекают микротитровальный планшет из фольгированного пакета, отделяют необходимое количество лунок и помещают их в рамку микротитровального планшета.

Остальные лунки сразу помещают в фольгированный пакет с осушителем, закрывают и хранят в холодильнике при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

8.5.3 Размечают координаты рабочих градуировочных растворов и проб, используя приведенный ниже рисунок 1.

С1	С1	П3	П3	П1 1	П1 1	П1 9	П1 9	П2 7	П2 7	П3 5	П3 5
С2	С2	П4	П4	П1 2	П1 2	П2 0	П2 0	П2 8	П2 8	П3 6	П3 6
С3	С3	П5	П5	П1 3	П1 3	П2 1	П2 1	П2 9	П2 9	П3 7	П3 7
С4	С4	П6	П6	П1 4	П1 4	П2 2	П2 2	П3 0	П3 0	П3 8	П3 8
С5	С5	П7	П7	П1 5	П1 5	П2 3	П2 3	П3 1	П3 1	П3 9	П3 9
С6	С6	П8	П8	П1 6	П1 6	П2 4	П2 4	П3 2	П3 2	П4 9	П4 9
П1	П1	П9	П9	П1 7	П1 7	П2 5	П2 5	П3 3	П3 3	П4 1	П4 1
П2	П2	П1 0	П1 0	П1 8	П1 8	П2 6	П2 6	П3 4	П3 4	П4 2	П4 2

Рисунок 1. Пример формы записи координат лунок перед выполнением анализа (С-стандарты, П-пробы).

### 8.6 Подготовка теста

Открывают бутылку. Достают с помощью пинцета осушитель, стряхнув средство для анализа в бутылку, добавляют 10 см<sup>3</sup> стерильной воды из набора для теста в бутылку средства для анализа. Бутылку средства для анализа хорошо закрывают и встряхивают, затем помещают ее на водяную баню и нагревают в течение 5 минут при 95°С, в течение этого времени встряхивают минимум 2 раза, охлаждают до комнатной температуры, стерильно фильтруют в стерильную центрифужную пробирку вместимостью 15 см<sup>3</sup> через фильтр 0,2 мкм.

#### 8.6.2 Приготовление градуировочных растворов биотина

Открывают бутылку со стандартным раствором биотина, добавляют  $x$  см<sup>3</sup> ( $x$  см<sup>3</sup> – указано на бутылке со стандартом биотина) стерильной воды из тест-набора, закрывают и встряхивают. Получившийся концентрат градуировочного раствора далее используют в соответствии с нижеприведенной схемой:

В 6 реакционных сосудов (объемом 1,5-2,0 см<sup>3</sup>) вносят стерильную воду из тест-набора и затем по следующей схеме пипеткой доводят концентрат градуировочного раствора.

Градуировочная кривая в мкг / 100 г (см <sup>3</sup> )	Стериль- ная вода, мкл		Концентрат градуировочного раствора, мкл		Общий объем, мкл
Нулевая величина	900	+	0	=	900
Градуировочный раствор 1: 0,08	900	+	100	=	1000
Градуировочный раствор 2: 0,24	350	+	150	=	500
Градуировочный раствор 3: 0,40	250	+	250	=	500
Градуировочный раствор 4: 0,56	150	+	350	=	500
Градуировочный раствор 5: 0,72	50	+	450	=	500

\* В градуировочной кривой уже учтен фактор разведения 1:40.

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

### *9 Выполнение измерений*

Перед выполнением измерений (постановкой реакции) необходимо встряхнуть все компоненты тест-системы в течение 10-15 сек.

9.1 Затем извлекают необходимое количество стрипов из планшета, закрепляют их в дополнительной рамке (остальные стрипы хранят в рамке вместе с осушителем в фольгированном пакете при температуре (2-8)°С;

9.2 Вносят по 150 мкл средства для анализа в лунки микротитровального планшета;

9.3 Вносят по 150 мкл градуировочных растворов в лунки микротитровального планшета. Наконечник пипет-дозатора предварительно ополаскивают раствором соответствующего градуировочного раствора путем набора и слива жидкости из пипет-дозатора;

9.4 Вносят по 150 мкл растворов проб, подготовленных по п. 8.1-8.5, в соответствующие лунки микротитровального планшета. Наконечник пипет-дозатора предварительно ополоснуть раствором соответствующей пробы путем набора и слива жидкости из пипет-дозатора;

9.5 Герметично заклеивают планшет пленкой из тест-набора и инкубируют при 37°С в темноте в течение 44-48 часов в инкубаторе;

9.6 Пленку тщательно прижимают к краям стрипов, планшет переворачивают и кладут на поверхность стола, хорошо встряхнув;

9.7 Планшет переворачивают в обратное положение, кладут на поверхность стола. Начиная с правого верхнего угла, придерживая рукой планшет, осторожно снимают по диагонали пленку, под углом 180° назад;

9.8 Имеющиеся на поверхности исследуемых растворов пузырьки разрушают с помощью наконечника пипет-дозатора либо иглы;

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

#### 10 Обработка результатов

10.1 Построение градуировочного графика и расчет результата измерения следует проводить с помощью специального программного обеспечения «RIDA® Soft», разработанного фирмой R-Biopharm (Германия) специально для обработки результатов измерений, полученных с помощью микробиологической тест-системы VitaFast® биотин.

10.2 Для расчета результата измерений в программное обеспечение «RIDA® Soft» вводят значения оптической плотности, измеренные для нулевого градуировочного раствора и для пробы, а также значения величин процентов связывания  $V/V_0$  для градуировочных растворов 2-7 (с концентрацией 2,5; 5; 10; 20 и 40 мкг/дм<sup>3</sup> соответственно), представленные в сертификате, имеющемся в каждом отдельном наборе тест-системы. На основании этих данных программное обеспечение автоматически осуществляет расчет и построение градуировочного графика.

Тест был проведен правильно при выполнении следующих условий:

- оптическая плотность нулевого градуировочного раствора < оптической плотности градуировочного раствора 1.
- оптическая плотность градуировочного раствора 5 > 0,6.

Фактор разбавления проб 40 уже учтен при изображении градуировочной кривой. В ниже указанных формулах учитывают дальнейшее разбавление экстракта проб (фактор разбавления), а также отклоняющуюся навеску пробы.

$$\text{Биотин} = \frac{\text{Конц. на градуировочной кривой} \times \text{фактор разбавления}}{\text{объем пробы в г (см}^3\text{)}} \quad \text{(в мкг / 100 г)}$$

Пример оценки:

навеска:	1 г
фактор разведения при экстрагировании:	1:40 (не учитывается)
фактор разведения (экстракта пробы):	1:300 (должен учитываться)
измеренная концентрация по градуировочной кривой:	0,24 мкг биотина/100г
$0,24 * 300 / 1 = 72 \text{ мкг биотина/ 100 г}$	

При работе с двумя этапами разбавления экстракта пробы отклонение должно составлять менее 10%. Если большее разбавление показывает более высокое содержание, могут присутствовать ингибиторы, такие как тяжелые металлы и антибиотики.

### *11 Оформление результатов испытаний*

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

Результаты должны включать следующую информацию:

- Наименование (шифр) пробы;
- Дату проведения измерений;
- Результаты измерений, включая все необходимые данные и промежуточные расчеты;
- Результаты параллельных определений;
- Окончательный результат измерений;
- Фамилию оператора.

Методика разработана лабораторией химии пищевых продуктов отдела физико-химических исследований ГУ «РНПЦ гигиены» МЗ РБ.

Разработчики:

Зав. лабораторией ХПП ГУ «РНПЦ гигиены», к.х.н.

О.В. Шуляковская

Н.с. лаборатории ХПП ГУ «РНПЦ гигиены»

О.С. Воронцова