

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
ВИТАМИНА В₁₂ В МОЛОКЕ, СУХОМ МОЛОКЕ И СУХИХ
МОЛОЧНЫХ СМЕСЯХ, МУКЕ, КОРМАХ, ПРЕМИКСАХ,
ВИТАМИНИЗИРОВАННЫХ ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ И
ВИТАМИННЫХ ПРЕПАРАТАХ С ПОМОЩЬЮ ТЕСТ-СИСТЕМЫ
VITAFAST ВИТАМИН В₁₂
(производство фирмы R-Biopharm, Германия)

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 измерений, вспомогательные устройства, реактивы, материалы	3
4	Метод измерения	5
5	Требования безопасности	5
6	Требования к квалификации оператора	6
7	Условия выполнения измерений	6
8	Подготовка к выполнению измерений	6
9	Выполнение измерений	11
10	Обработка результатов измерений	12
11	Оформление результатов измерений	13

1 Область применения

Методика предназначена для количественного определения витамина В₁₂ в молоке, сухом молоке и сухих молочных смесях, муке, кормах, премиксах, витаминизированных продуктах питания и витаминных препаратах с использованием тест-системы «ВитаФаст» (VitaFast) производства фирмы R-Biopharm, Германия.

Витамин В₁₂ (цианокобаламин) представляет собой темно-красные кристаллы, без запаха и вкуса. При нагревании до 300-320°С разлагается, растворим в воде, спиртах и других полярных растворителях.

Основное значение витамина В₁₂ заключается в его антианемическом действии. Кроме того, витамин В₁₂ необходим для нормального усвоения фолиевой кислоты, которая играет важную роль в метаболизме аминокислот и биосинтезе нуклеотидов.

Метод заключается в измерении оптической плотности растворов, полученных в результате воздействия витамина В₁₂, обладающего ростостимулирующим эффектом, на аукотрофные бактерии *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis (leichmannii)*, адсорбированные на планшете.

Диапазон измерений 0,03-0,18 мкг/100 г (мл) продукта.

Нижний предел измерения методики составляет 0,03 мкг/100 г (мл)

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 (мл)	Метрологические параметры, $P = 0,95$, $n = 7$				
	Нижний предел об-наружения мкг/100 г (мл)	Показатель повторяемости $\sigma_r, \%$	Показатель внутрिला-бораторной воспроизводимости $\sigma_R, \%$	Предел повторяемости $r, \%$	Предел воспроизводимости $R, \%$
0,03-0,18	0,03	5	8	14	23

3 Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

3.1 Средства измерений

Автоматический микропланшетный фотометр с фильтром на 610-

630 нм (540-550 нм) Весы лабораторные АС-210Р, (диапазон взвешивания 0,0100-210,0000 г, погрешность взвешивания 0,2 мг) рН-метр		ГОСТ 24104-2001
Колбы мерные	2-10-2	ГОСТ 1770-74
	2-100-2	ГОСТ 1770-74
	2-1000-2	
Пипетки градуированные	1-1-1-2	ГОСТ 29227-91
	1-1-1-5	ГОСТ 29227-91
	1-1-1-25	ГОСТ 29227-91
Цилиндры мерные	100 см ³	ГОСТ 1770-74
Пробирки для центрифугирования стерильные вместимостью	15-50 см ³	
Автоматический пипет-дозатор с переменным объемом 20-200 мкл с шагом 1,0 мкл и точностью дозирования не более ± 2%		
Автоматический пипет-дозатор с переменным объемом 100-1000 мкл с шагом 5,0 мкл и точностью дозирования не более ± 1,5%		
Многоканальный пипет-дозатор с переменным объемом 50-250 мкл с шагом 1,0 мкл и точностью дозирования не более ± 2%		
Стерильные реакционные сосуды вместимостью	1,5 см ³	
	2,0 см ³	
Химический стакан вместимостью	100 см ³	
Закручивающиеся сосуды вместимостью	500 см ³	
Одноразовые наконечники для автоматических пипет-дозаторов		

3.2 Вспомогательные устройства и оборудование

Гомогенизатор тканей или блендер	ГОСТ 15906
Ступка с пестиком	
Лабораторный встряхиватель, обеспечивающий скорость вращения до 1000 об/мин	
Центрифуга с устанавливаемым ускорением 8000 g	
Стерильный бокс	
Водяная баня с подогревом до 95 °С	

Стерильный фильтр полиэфирсульфон 0,2 мкм со стерильным шприцем

Инкубатор с темной камерой инкубации, 37°C

Барометр

ТУ 2504-1797-75

3.3 Реактивы и материалы

Такадиастаза, *Aspergillus oryzae*

Fluka 86250

Цианид натрия

J.T. Baker 0281

Ацетат натрия

Merck 106268

Соляная кислота концентрированная, х.ч

ГОСТ 3118-77

Вода дистиллированная

ГОСТ 6709-72

Тест-система «ВитаФаст Витамин В₁₂» в стандартной комплектации включающая:

фирма R-Biopharm,
Германия

Микротитровальный планшет на 96 лунок (12 стрипов по 8 лунок), покрытыми *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis (leichmannii)*

1 шт

Бидистиллированная стерильная вода (30 см³) для приготовления градуировочных растворов, средства для анализа, а также разбавления экстрактов проб

3 шт

Средство для анализа витамина В₁₂ (тверд.)

3 шт.

Стандарт витамина В₁₂ (цианокобаламин) (тверд.)

3 шт.

Запасная рамка для закрепления стрипов

1 шт.

Клеящаяся пленка

3 шт.

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

4 Метод измерения

Микробиологическая тест-система VitaFast® используется для определения общего содержания витамина В₁₂ в молоке, сухом молоке и сухих молочных смесях, муке, кормах, премиксах, витаминизированных продуктах питания и витаминных препаратах.

Суть метода заключается во взаимодействии витамина В₁₂, содержащегося в пробе, с аукоотрофными бактериями *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis (leichmannii)*, адсорбированными на планшете, последующем росте бактерий, выражающемся в помутнении раствора, и измерении его оптической плотности, зависящей от концентрации витамина В₁₂ в исследуемом образце.

5 Требования безопасности

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

- электробезопасности (ГОСТ 12.2.003)
- пожарной безопасности (ГОСТ 12.1.004)
- техники безопасности при работе в химической лаборатории (ППБ 1.04)
- техники безопасности, изложенные в эксплуатационных документах на средства измерений и оборудование, применяемые при проведении измерений.

Меры предосторожности:

- цианид натрия NaCN является сильно токсичным и может вызывать раздражения слизистых оболочек, глаз и кожи. Пробоподготовка с использованием NaCN должна осуществляться под вытяжкой. При обращении с NaCN и при его утилизации необходимо строго соблюдать правила техники безопасности;
- после окончания теста стрипы должны быть правильно утилизированы (например, автоклавированы).

6 Требования к квалификации оператора

К выполнению измерений могут быть допущены лица, имеющие высшее образование, изучившие настоящую методику и прошедшие подготовку для работы в микробиологической лаборатории и на ИФА-анализаторе.

7 Условия выполнения измерений

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

- температура воздуха при приготовлении растворов, в том числе градуировочных (20 ± 2)°C;
- температура воздуха при выполнении измерений (20 ± 5)°C;
- атмосферное давление (630 – 800) мм рт. ст.;
- влажность воздуха (65 ± 15) % при температуре 25°C;
- напряжение питающей сети (220 ± 10)В;
- частота переменного тока ($50 \pm 0,5$)Гц

Помещения для проведения измерений должны быть оснащены приточно-вытяжной вентиляцией и подводкой воды.

8 Подготовка к выполнению измерений

8.1 Отбор проб для анализа

Отбор проб осуществляют в соответствии с действующей нормативной документацией по отбору проб. Пробы доставляют в лабораторию немедленно после их отбора.

Пробы, предназначенные для анализа, должны храниться в холодном, сухом, темном месте.

8.2 Предварительная подготовка тест-системы

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

8.3 Приготовление растворов

8.3.1 Приготовление ацетатного буфера

Взвешивают 0,66 г ацетата натрия с точностью $\pm 0,001$ г и помещают в стакан емкостью 100 см³ с магнитной мешалкой, приливают 50 см³ дистиллированной либо деионизированной воды. Раствор перемешивают. Добавляют 0,69 см³ уксусной кислоты, проверяют уровень pH (4,5). При необходимости уровень pH доводят до 4,5 с помощью раствора HCl концентрации 0,1 моль/л. Раствор перемешивают и переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят дистиллированной водой до метки. Раствор хранят в бутылке из темного стекла не более 7 дней при температуре от +2°C до +8°C.

8.3.2 Приготовление 1%-раствора NaCN

Навеску 100,0 мг NaCN, взвешенную с точностью $\pm 0,001$ г, растворяют в 3-5 см³ дистиллированной воды в мерной колбе на 10 см³. Доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают. Раствор хранят в бутылке из темного стекла не более 7 дней при температуре от +2°C до +8°C.

8.3.3 Приготовление соляной кислоты концентрации 0,1 моль/л

8,03 см³ концентрированной соляной кислоты ($\rho=1,185$ г/см³) растворяют в 300-500 см³ дистиллированной воды в мерной колбе вместимостью 1000 см³, доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают.

8.4 Подготовка анализируемых образцов

8.4.1 Общее содержание витамина В₁₂ в молочных продуктах, крупах, детском питании, хлебе, муке, БАД

Исследуемый образец продуктов питания (100-150 г), отобранный по п. 8.1, гомогенизируют в блендере или в гомогенизаторе в течение 3-5 минут. От гомогенизированной смеси отбирают навеску массой 1,000 г, взвешивают с точностью не менее 0,001 г, помещают в стерильную центрифужную пробирку вместимостью 50 см³. К пробе прибавляют 20 см³ дистиллированной либо деионизированной воды, 250 мкл свежеприготовленного 1%-раствора NaCN. Емкость плотно закрывают пробкой и перемешивают в течение 3 минут. С помощью HCl регулируют уровень pH до 4,5.

Альтернативно вместо дистиллированной воды добавляют 20 см³ ацетатного буфера и 250 мкл свежеприготовленного 1%-раствора NaCN.

0,300 г такадиастазы взвешивают с точностью не менее 0,001 г и добавляют к раствору. Содержимое пробирки перемешивают в течение 3 минут и инкубируют в течение 1 часа при температуре 37°C в темноте. Время от времени пробирку необходимо встряхивать.

К пробе прибавляют дистиллированную либо деионизированную воду до отметки 40 см³. Пробирку помещают на водяную баню и прогревают в течение 30 минут при 95°C. Каждые пять минут пробирку необходимо встряхивать.

Пробирку быстро охлаждают до комнатной температуры, центрифугируют. Пипет-дозатором отбирают 1 см³ прозрачной надосадочной части раствора пробы и фильтруют в стерильный реакционный сосуд через фильтр 0,2 мкм.

8.4.2 Витаминизированные крупы, детское питание, хлеб, мука, БАД

Исследуемый образец продуктов питания (100-150 г), отобранный по п. 8.1, гомогенизируют в блендере или в гомогенизаторе в течение 3-5 минут. От гомогенизированной смеси отбирают навеску массой 1,000 г, взвешивают с точностью не менее 0,001 г, помещают в стерильную центрифужную пробирку вместимостью 50 см³. К пробе прибавляют 30 см³ дистиллированной либо деионизированной воды. Пробирку плотно закрывают пробкой и перемешивают в течение 3 минут. К раствору прибавляют дистиллированную либо деионизированную воду до отметки 40 см³. Содержимое пробирки перемешивают.

Пробирку помещают на водяную баню и проводят экстрагирование в течение 30 минут при 95°C. Каждые пять минут пробирку необходимо встряхивать.

Пробирку быстро охлаждают до комнатной температуры, центрифугируют. Пипет-дозатором отбирают 1 см³ прозрачной надосадочной части раствора пробы и переносят в стерильный реакционный сосуд через фильтр 0,2 мкм.

8.4.3 Витаминизированные соки, спортивные напитки

От образца пробы по п. 8.1 с помощью пипет-дозатора отбирают 1 см³ и помещают в стерильную центрифужную пробирку вместимостью 50 см³. К пробе приливают дистиллированную либо деионизированную воду до отметки 40 см³. Содержимое пробирки перемешивают в течение 3 минут.

Раствор стерильно фильтруют (либо нагревают в течение 30 минут при 95°C на водяной бане, затем быстро охлаждают до комнатной температуры). Пипет-дозатором отбирают 1 см³ раствора пробы и фильтруют в стерильный реакционный сосуд через стерильный фильтр 0,2 мкм.

8.4.4 Витаминизированные жевательные конфеты и сладости

Навеску (20,000 г) пробы, отобранной по п. 8.1, взвешивают с точностью не менее 0,001 г, помещают в стерильную центрифужную пробирку вместимостью 50 см³. К пробе прибавляют дистиллированную либо деионизированную воду до отметки 40 см³. Пробирку помещают на водяную баню и проводят экстрагирование в течение 30 минут при 95°C. Каждые пять минут пробирку необходимо встряхивать.

Пробирку быстро охлаждают до комнатной температуры. Содержимое пробирки переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят дистиллированной либо деионизированной водой до метки. Содержимое колбы перемешивают.

Пипет-дозатором отбирают 5 см³ раствора пробы и переносят в стерильную центрифужную пробирку вместимостью 50 см³. К пробе прибавляют дистиллированную либо деионизированную воду до отметки 40 см³. Содержимое пробирки перемешивают в течение 3 минут.

Раствор стерильно фильтруют (либо нагревают в течение 30 минут при 95°C на водяной бане, затем быстро охлаждают до комнатной температуры). Пипет-дозатором отбирают 1 см³ раствора пробы и фильтруют в стерильный реакционный сосуд через стерильный фильтр 0,2 мкм.

8.4.5 Витаминные смеси, таблетки, капсулы

Отобранную пробу (5-10 таблеток) тщательно растирают в ступке. От гомогенизированной смеси отбирают навеску массой 1,000 г, взвешивают с точностью не менее 0,001 г, помещают в закручивающийся сосуд вместимостью 500 см³.

К пробе прибавляют 400 см³ дистиллированной либо деионизированной воды, 500 мкл свежеприготовленного 1%-раствора NaCN. Емкость плотно закрывают пробкой и перемешивают в течение 3 минут.

Сосуд помещают на водяную баню и проводят экстрагирование в течение 30 минут при 95°С. Пробирка должна быть плотно закрыта. Каждые пять минут пробирку необходимо встряхивать.

Затем быстро охлаждают раствор до комнатной температуры, содержимое сосуда переносят в мерную колбу вместимостью 1000 см³ и доводят дистиллированной либо деионизированной водой до метки.

Пипет-дозатором отбирают 1 см³ раствора пробы и переносят в стерильную центрифужную пробирку вместимостью 50 см³. К пробе прибавляют дистиллированную либо деионизированную воду до отметки 40 см³. Содержимое пробирки перемешивают в течение 3 минут.

Раствор стерильно фильтруют (либо нагревают в течение 30 минут при 95°С на водяной бане, затем быстро охлаждают до комнатной температуры). Пипет-дозатором отбирают 50 мкл раствора пробы и переносят в стерильный реакционный сосуд вместимостью 2 см³. В реакционный сосуд вносят 1 см³ стерильной воды из тест-набора, раствор перемешивают путем набора и слива жидкости из пипет-дозатора.

8.5 Подготовка микротитровального планшета

По формуле рассчитывают необходимое количество лунок (N), исходя из того, что каждое исследование выполняется трижды.

$$N=3C + 3П$$

где С – количество градуировочных растворов,

П – количество исследуемых проб,

N – количество лунок, необходимое для исследования.

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.

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

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
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						
J	П-1	П-1	П-1	П-9	П-9	П-9						
G	П-2	П-2	П-2	П-10	П-10	П-10						

Рис. 1 – Схема расположения лунок для градуировочных растворов и проб, где C-0, C-2,...C-5 – градуировочные растворы, П-1, П-2,...П-10 – исследуемые пробы, 1, 2, 3, ...12 – номера в планшете, А, D, ...G – обозначения лунок в стрипах.

8.6 Подготовка теста

8.6.1 Подготовка средства для анализа

Бутылка средства для анализа достаточна минимум для 6 стрипов. Средство для анализа должно заново изготавливаться перед тестом.

Бутылку открывают. Осушитель, стряхнув средство для анализа в бутылку, достают с помощью пинцета. 10 см³ стерильной воды из набора для теста добавляют в бутылку средства для анализа. Бутылку средства для анализа хорошо закрывают и встряхивают. Помещают плотно закрытую бутылку средства для анализа на водяную баню и нагревают в течение 5 минут при 95°С, в течение этого времени встряхивают минимум 2 раза. Бутылку средства для анализа быстро охлаждают до комнатной температуры. Средство для анализа стерильно фильтруют в стерильную центрифужную пробирку вместимостью 15 см³ через фильтр 0,2 мкм.

8.6.2 Приготовление градуировочных растворов витамина В₁₂

Бутылку со стандартом витамина В₁₂ открывают. Добавляют в бутылку x см³ (x см³ – указано на бутылке со стандартом витамина В₁₂) стерильной воды из тест-набора. Бутылку хорошо закрывают и встряхивают. Получившийся концентрат градуировочного раствора далее используют в соответствии с ниже приведенной схемой:

В 6 реакционных сосудов (объемом 1,5-2,0 см³) вносят стерильную воду из тест-набора и затем по следующей схеме пипеткой добавляют концентрат градуировочного раствора.

Концентрация в мкг / 100 г (см ³)	Стерильная вода в мкл		Концентрат градуировочного раствора в мкл		Общий объем в мкл
Нулевая величина:0	900	+	0	=	900
Градуировочный раствор 1: 0,030	900	+	100	=	1000
Градуировочный раствор 2: 0,060	400	+	100	=	500
Градуировочный раствор 3: 0,090	350	+	150	=	500
Градуировочный раствор 4: 0,120	300	+	200	=	500
Градуировочный раствор 5: 0,180	200	+	300	=	500

Градуировочные растворы готовятся 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.

– 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°C);

– вносят по 150 мкл средства для анализа в лунки микротитровального планшета;

– 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;

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

– герметично заклеивают планшет пленкой из тест-набора и инкубируют при 37°C в темноте в течение 44-48 часов в инкубаторе;

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

- 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;
- имеющиеся на поверхности исследуемых растворов пузырьки разрушают с помощью наконечника пипет-дозатора либо иглы;
- 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 измерений

Все представленные расчеты и построение градуировочного графика следует проводить с помощью программного обеспечения RIDA Soft, разработанного фирмой R-Biopharm (Германия) специально для обработки результатов измерений, полученных с помощью тест-систем Ридаскрин.

Тест был проведен правильно при выполнении следующих условий:

оптическая плотность нулевого градуировочного раствора < оптическая плотность градуировочного раствора 1.

оптическая плотность градуировочного раствора $5 > 0,6$

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

Содержание витамина В₁₂ рассчитывают по следующей формуле

конц. на градуировочной кривой x фактор разбавления

$$\text{Витамин В}_{12} = \frac{\text{-----}}{\text{объем пробы в г/ см}^3}$$

(в мг/100 г)

Пример оценки:

навеска:	1 г
фактор разведения при экстрагировании:	1:40 (не учитывается)
фактор разведения (экстракта пробы):	1:20 (должен учитываться)
измеренная концентрация по градуировочной кривой:	0,06 мкг витамина В ₁₂ /100г

$$0,06 \times 20 / 1 = 1,2 \text{ мг витамина В}_{12} / 100 \text{ г}$$

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 измерений

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.

Мл.н.с. лаборатории ХПП ГУ «РНПЦ гигиены»

О.В. Шуляковская

С.И. Войтенко