

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 В₆ В МОЛОКЕ, СУХОМ МОЛОКЕ И СУХИХ МОЛОЧНЫХ
СМЕСЯХ, МУКЕ, КОРМАХ, ПРЕМИКСАХ, ВИТАМИНИЗИРОВАННЫХ
ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ И ВИТАМИННЫХ ПРЕПАРАТАХ С ПОМОЩЬЮ
ТЕСТ-СИСТЕМЫ ВИТАFAST ВИТАМИН В₆
(производство фирмы R-Biopharm, Германия)**

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	5
7	Условия выполнения измерений	5
8	Подготовка к выполнению измерений	6
9	Выполнение измерений	12
10	Обработка результатов измерений	13
11	Оформление результатов измерений	14

1 Область применения

Методика предназначена для количественного определения общего содержания пиридоксина (внесенного и естественного витамина В₆) 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.

Пиридоксин – 2-метил–3гидрокси-4,5дигидроксиметил пиридин – представляет собой бесцветные призматические кристаллы с т. пл. 160 °С (с разл.), обладающие слабым горьким вкусом. Он хорошо растворим в воде, спирте, хуже – в ацетоне, плохо растворим в эфире и хлороформе.

Метод заключается в измерении оптической плотности растворов, полученных в результате воздействия витамина В₆, обладающего ростостимулирующим эффектом, на бактерии *Saccharomyces cerevisiae*, адсорбированные на планшете.

Диапазон измерений 0,002-0,012 мкг/100 г (см³) продукта.

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, мг/100г (см ³)	Метрологические параметры, $P = 0,95$			
	Показатель повторяемости, $\sigma_r, \%$	Показатель внутрилабораторной воспроизводимости, $\sigma_R, \%$	Предел повторяемости, $r, \%$	Предел воспроизводимости, $R, \%$
0,002-0,012	10	15	28	40

3 Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

3.1 Средства измерений

Микропланшетный фотометр 610 - 630 нм (540 - 550 нм)

pH-метр

Весы лабораторные общего назначения ВЛР 200, 2-го класса ГОСТ 24104-2001

точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г

Колбы мерные	2-100-2	ГОСТ 1770-74
	2-1000-2	ГОСТ 1770-74
Одноканальный дозатор со стерильными наконечниками для пипет-дозаторов	20 – 200 мкл; 100 – 1000 мкл	
Стерильные пробирки для центрифуги с завинчивающейся крышкой и градуировкой	15 см ³ 50 см ³	
Стерильные реакционные сосуды	1,5 или 2,0 см ³	
Стерильные закручивающиеся емкости	500 см ³	ГОСТ 1770-74
Химический стакан	100 см ³	ГОСТ 25336-82

3.2 Вспомогательные устройства и оборудование

Стерильный бокс (рекомендуется стерильная работа)

Инкубатор с темной камерой инкубации, 37 °С

Вводяная баня с подогревом до 95 °С

Автоклав

Центрифуга, выше 8 000 об/мин (если пробу нельзя профильтровать) Например, фирма Beckman

3.3 Реактивы и материалы

Такадиастаза, <i>Aspergillus oryzae</i>	Fluka 86250
Кислая картофельная фосфатаза	Sigma P3752
Кислота серная ч.д.а. или х.ч.	ГОСТ4204-77
Ацетата натрия тригидрат	Fluka 71190
Кислота лимонная моногидрат х.ч.	
Натрия гидроксид ч.д.а. или х.ч.	ГОСТ 4328-77
Кислота соляная х.ч.	ГОСТ 3118-77
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709-72
Тест-система «ВитаФаст», содержащая:	фирма R-Biopharm, Германия.
Микротитровальный планшет с 96 лунками, покрытыми <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Бидистиллированная стерильная вода (30 мл) для приготовления градуировочных растворов, средства для анализа, а также разбавления экстрактов проб	
Средство для анализа витамина В ₆ (тверд.)	

Стандарт витамина В₆ (гидрохлорид пиридоксина) (тверд.)

Клеящаяся пленка

Запасная рамка для закрепления стрипов

Примечание: по окончании срока годности производитель не несет гарантии по качеству

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 В₆ в молоке, сухом молоке и сухих молочных смесях, муке, кормах, премиксах, витаминизированных продуктах питания и витаминных препаратах.

Суть метода заключается во взаимодействии витамина В₆, содержащегося в пробе, с ауксотрофными бактериями *Saccharomyces cerevisiae*, адсорбированными на планшете, последующем росте бактерий, выражающемся в помутнении раствора, и измерении его оптической плотности, зависящей от концентрации витамина В₆ 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:

- средство для анализа может вызывать раздражения слизистых оболочек, глаз и кожи
- 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 $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$;
- температура воздуха при выполнении измерений $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$;
- атмосферное давление (630 – 800) мм рт. ст.;
- влажность воздуха $(65 \pm 15) \%$ при температуре 25°C ;
- напряжение питающей сети $(220 \pm 10)\text{В}$;
- частота переменного тока $(50 \pm 0,5)\text{Гц}$

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

8 Подготовка к выполнению измерений

Перед выполнением измерений должны быть проведены следующие работы: подготовка измерительной аппаратуры, приготовление растворов, установление градуировочной характеристики, отбор и подготовка проб к анализу.

8.1 Подготовка измерительной аппаратуры

Включают микропланшетный фотометр согласно инструкции по эксплуатации. Устанавливают рабочие режимы. Проводят стабилизацию работы микропланшетного фотометра на рабочих режимах в течение 30-40 мин.

8.2 Приготовление растворов

8.2.1 Приготовление водного раствора соляной кислоты молярной концентрации 0,1 моль/дм³

8,0 см³ концентрированной соляной кислоты плотностью 1,185 г/см³ растворяют в 300-500 см³ дистиллированной воды в метной колбе вместимостью 1000 см³, доводят объем до метки и перемешивают.

8.2.2 Приготовление водного раствора соляной кислоты молярной концентрации 1 моль/дм³

80,3 см³ концентрированной соляной кислоты плотностью 1,185 г/см³ растворяют в 300-500 см³ дистиллированной воды в метной колбе вместимостью 1000 см³, доводят объем до метки и перемешивают.

8.2.3 Приготовление водного раствора серной кислоты молярной концентрации 0,1 моль/дм³

2,8 см³ концентрированной соляной кислоты плотностью 1,835 г/см³ растворяют в 300-500 см³ дистиллированной воды в метной колбе вместимостью 1000 см³, доводят объем до метки и перемешивают.

8.2.4 Приготовление водного раствора гидроксида натрия молярной концентрации 2 моль/дм³

Взвешивают 8,00±0,001 г гидроксида натрия, растворяют в 30-50 см³ дистиллированной воды в фарфоровом стакане, охлаждают до 20±5°C, переносят в мерную колбу на 100 см³, доводят объем дистиллированной водой до метки и перемешивают.

8.2.5 Приготовление водного раствора гидроксида натрия молярной концентрации 1 моль/дм³

Взвешивают 4,00 ± 0,001 г гидроксида натрия, растворяют в 30-50 см³ дистиллированной воды в фарфоровом стакане, охлаждают до 20 ± 5°C, переносят в мерную колбу на 100 см³, , доводят объем дистиллированной водой до метки и перемешивают.

8.2.6 Приготовление водного раствора ацетата натрия молярной концентрации 2,5 моль/дм³

34,0 ± 0,001 г ацетата натрия помещают в мерную колбу на 100 см³, растворяют в 75 см³ дистиллированной воды, доводят объем дистиллированной водой до метки и перемешивают.

8.2.7 Приготовление цитратного буферного раствора с рН 4,5³

В химический стакан на 100 см³ с магнитной мешалкой помещают 1,5±0,001 г моногидрата лимонной кислоты, растворяют в 50 см³ дистиллированной воды, добавляют 12 см³ раствора гидроксида натрия концентрацией 1 моль/дм³. рН полученного раствора должен быть 4,5 (при необходимости корректировку рН производят с помощью раствора соляной кислоты с концентрацией 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 2 - 8°C.

8.6 Подготовка анализируемых образцов

8.6.1 Подготовка жидких образцов с внесенным витамин В₆ (мультивитаминные соки, спортивные напитки)

1,0 см³ анализируемого образца помещают в центрифужную пробирку на 50 см³, добавляют 20 см³ дистиллированной воды, устанавливают рН 4,5 с помощью 0,1 м раствора соляной кислоты.

Вместо воды можно использовать цитратный буфер (при этом не требуется регулировки уровня рН для различных проб). К навеске пробы добавляют 20 см³ цитратного буфера с рН4,5 и перемешивают.

К полученному раствору добавляют 0,010 ±0,001 г кислой картофельной фосфатазы, хорошо перемешивают и инкубируют в течение 1 часа при 37°C в темноте, периодически

перемешивая. Затем доводят объем дистиллированной водой до 40 см³, перемешивают и нагревают 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 быстро охлаждают до температуры ниже 30 °С, центрифугируют и в зависимости от концентрации проводят дальнейшее разведение надосадочной жидкости в реакционных сосудах объемом 1,5 либо 2 см³ стерильной водой из тест-набора. Для этого к 0,1см³ надосадочной жидкости добавляют 0,5-1,9 см³ стерильной воды из тест-набора.

8.6.2 Подготовка образцов с внесенным витамином В₆ (жевательные конфеты и сладости)

15-20±0,001 г гомогенизированной пробы жевательных конфет/сладостей взвешивают в центрифужную пробирку на 50 см³ добавляют 20 см³ дистиллированной воды, растворяют на водяной бане в течение 30 минут при 95°C, периодически встряхивая, затем быстро охлаждают до температуры ниже 30°C. Раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят дистиллированной водой до метки. 1 см³ полученного раствора помещают в центрифужную пробирку на 50 см³ добавляют 20 см³ дистиллированной воды, перемешивают, устанавливают рН 4,5 с помощью 0,1 м раствора соляной кислоты.

Вместо воды можно использовать цитратный буфер (при этом не требуется регулировки уровня рН для различных проб). К навеске пробы добавляют 20 см³ цитратного буфера с рН 4,5 и перемешивают.

К полученному раствору добавляют 0,010 ±0,001 мг кислой картофельной фосфатазы, тщательно перемешивают и инкубируют в течение 1 часа при 37°C в темноте, периодически помешивая. Затем доводят объем дистиллированной водой до 40 см³, встряхивают и нагревают 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 быстро охлаждают до температуры ниже 30°C, центрифугируют и в зависимости от концентрации производят дальнейшее разведение надосадочной жидкости в реакционных сосудах объемом 1,5 либо 2 см³ стерильной водой из тест-набора. Для этого к 0,1см³ надосадочной жидкости добавляют 0,5-1,9 см³ стерильной воды из тест-набора.

Например: навеска пробы 17 ±0,001 г жевательных конфет

расчет 100 см³/17 г навески = 5,88 см³/г

1 г пробы содержится в 5,88 см³. Следовательно в центрифужную пробирку на 50 см³ переносят 5,88 см³ и готовят как описано выше.

8.6.3. Подготовка образцов с внесенным витамином В₆ (таблетки, капсулы и витаминные смеси)

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

Точно взвешивают $1 \pm 0,001$ г таблеток, витаминной смеси либо премикса или разрезанной капсулы в стерильный закручивающийся сосуд на 500 см^3 , добавляют 400 см^3 дистиллированной воды, перемешивают, устанавливают уровень pH 4,5. Добавляют 50 мг кислой картофельной фосфатазы, тщательно перемешивают и инкубируют в течение 1 часа при 37°C в темноте, периодически перемешивая. Затем экстрагируют в течение 30 минут при 95°C на водяной бане. В течение этого времени встряхивают минимум 5 раз. Затем быстро охлаждают раствор пробы до температуры ниже 30°C , переносят в мерную колбу на 1000 см^3 и доводят дистиллированной водой до метки. 1 см^3 полученного раствора переносят в центрифужную пробирку на 50 см^3 , доводят объем дистиллированной водой до 40 см^3 , перемешивают. Раствор стерильно профильтровывают (либо нагревают в течение 30 минут при 95°C на водяной бане), затем быстро охлаждают до температуры ниже 30°C и проводят дальнейшее разведение 1:20 в реакционных сосудах объемом 1,5 либо 2 см^3 стерильной водой из тест-набора. Для этого к $0,1 \text{ см}^3$ надосадочной жидкости добавляют $1,9 \text{ см}^3$ стерильной воды из тест-набора.

8.6.4. Подготовка образцов с внесенным витамином В₆ (детское питание, хлеб, мука)

Взвешивают $1 \pm 0,001$ г гомогенизированной пробы в центрифужную пробирку на 50 см^3 , добавляют 20 см^3 дистиллированной воды, устанавливают pH 4,5 с помощью 0,1 м раствора соляной кислоты.

Вместо воды можно использовать цитратный буфер (при этом не требуется регулировки уровня pH для различных проб). К навеске пробы добавляют 20 см^3 цитратного буфера с pH 4,5 и перемешивают.

К полученному раствору добавляют 10 мг кислой картофельной фосфатазы, тщательно перемешивают и инкубируют в течение 1 часа при 37°C в темноте, периодически перемешивая. Затем доводят объем дистиллированной водой до 40 см^3 , перемешивают и нагревают 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 быстро охлаждают до температуры ниже 30°C , центрифугируют и в зависимости от концентрации производят дальнейшее разведение надосадочной жидкости в реакционных сосудах объемом 1,5 либо 2 см^3 стерильной водой из тест-набора. Для этого к $0,1 \text{ см}^3$ надосадочной жидкости добавляют 0,5-1,9 см^3 стерильной воды из тест-набора.

8.6.5. Подготовка образцов содержащих естественный и внесенный витамин В₆ (молочные продукты, крупы, детское питание)

Чтобы определить связанный и естественный витамин В₆ в обогащенных продуктах или в невитаминизированных продуктах питания, необходимо провести ферментативный гидролиз пробы.

Для этого $1 \pm 0,001$ г гомогенизированной пробы помещают в центрифужные пробирки на 50 см^3 , добавляют 20 см^3 дистиллированной воды, устанавливают рН 4,5 с помощью 0,1 м раствора соляной кислоты.

Вместо воды можно использовать цитратный буфер (при этом не требуется регулировки уровня рН для различных проб). К навеске пробы добавляют 20 см^3 цитратного буфера рН 4,5 и перемешивают.

К полученному раствору добавляют 300 мг такадиастазы и 10 мг кислой картофельной фосфатазы, хорошо встряхивают и инкубируют в течение 1 часа при 37°C в темноте, периодически перемешивая. Затем доводят объем дистиллированной водой до 40 см^3 и нагревают 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 быстро охлаждают до температуры ниже 30°C , центрифугируют и в зависимости от концентрации производят дальнейшее разведение надосадочной жидкости в реакционных сосудах объемом 1,5 либо 2 см^3 стерильной водой из тест-набора. Для этого к $0,1 \text{ см}^3$ надосадочной жидкости добавляют 0,5-1,9 см^3 стерильной воды из тест-набора.

8.6.6 Подготовка образцов содержащих естественный и внесенный витамин В₆ (дрожжи и дрожжевые продуктах)

$1 \pm 0,001$ г гомогенизированной пробы помещают в центрифужную пробирку на 50 см^3 , добавляют 10 см^3 серной кислоты концентрации 0,1 моль/ дм^3 , встряхивают и автоклавируют в течение 30 минут при 121°C (пробирку плотно не закручивать). Затем быстро охлаждают до температуры ниже 30°C , добавляют 3 см^3 раствора ацетата натрия концентрации 2,5 моль/ дм^3 , перемешивают, добавляют 300 мг такадиастазы и 10 мг кислой картофельной фосфатазы. Смесь тщательно перемешивают, инкубируют в течение 12-16 часов в темноте при температуре 37°C . Затем доводят объем дистиллированной водой до 40 см^3 и нагревают 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 быстро охлаждают до температуры ниже 30°C , центрифугируют и в зависимости от концентрации производят дальнейшее разведение надосадочной жидкости в реакционных сосудах объемом 1,5 либо 2 см^3 стерильной водой из тест-набора. Для этого к $0,1 \text{ см}^3$ надосадочной жидкости добавляют 0,5-1,9 см^3 стерильной воды из тест-набора.

8.7 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 С-0, С-2, ...С-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.

8.8 Подготовка теста

8.8.1 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°C, 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.

8.8.2 Приготовление градуировочных растворов витамина В₆

Бутылку со стандартом витамина В₆ открывают. Добавляют в бутылку х см³ (х см³ –указано на бутылке со стандартом витамина В₆) 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: 0,002	900	+	100	=	1000
Градуировочный раствор 2: 0,004	400	+	100	=	500
Градуировочный раствор 3: 0,006	350	+	150	=	500
Градуировочный раствор 4: 0,008	300	+	200	=	500
Градуировочный раствор 5: 0,012	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 В₆ рассчитывают по следующей формуле

Градуировка осуществляется с помощью гидрохлорида пиридоксина. Для пересчета в активный витамин В₆ – пиридоксин – необходимо учитывать коэффициент 0,822

Содержание витамина В₆ рассчитывают по следующей формуле

конц. на градуировочной кривой x фактор разбавления x 0,822

Витамин В₆ = -----

(в мг/100 г)

объем пробы в г/см³

(в мг/100 см³)

Пример оценки:

навеска:	1 г
фактор разведения при экстрагировании:	1:40 (не учитывается)
фактор разведения (экстракта пробы):	1:1000 (должен учитываться)
измеренная концентрация по градуировочной кривой:	0,004 мг витамина В ₆ /100г

$$0,004 * 1000 * 0,822 / 1 = 3,3 \text{ мг активного витамина В}_6 \text{ (пиридоксина) / 100 г}$$

При работе с 2 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.

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

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

О.В. Шуляковская

Л.Л. Бельшева

Е.И. Полянских