ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 57200— 2016

ВИТАМИН B_2 КОРМОВОЙ

Технические условия

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2020

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Некоммерческим партнерством «Координационно-информационный центр содействия предприятиям по вопросам безопасности химической продукции» при участии ООО «Центр промышленной биотехнологии имени княгини Е.Р. Дашковой»

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 326 «Биотехнологии»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 1 ноября 2016 г. № 1556-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

5 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Февраль 2020 г.

*Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 26 Федерального закона от 29 июня 2015 г. № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации». Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (*gost.e-ecolog.ru

© Стандартинформ, оформление, 2016, 2020

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ВИТАМИН B_2 КОРМОВОЙ

Технические условия

Feed vitamin B_2. Specifications

Дата введения — 2017—05—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на кормовой витамин B_2, получаемый путем микробиологического синтеза с использованием культуры *Eremotheciumashbyii*.

Кормовой витамин B_2 предназначен для витаминизации кормов, используемых в животноводстве и птицеводстве.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 12.1.005 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.008 Система стандартов безопасности труда. Биологическая безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.2.003 Система стандартов безопасности труда. Оборудование производственное. Общие требования безопасности

ГОСТ 246 Гидросульфит натрия технический. Технические условия

ГОСТ 857 Кислота соляная синтетическая техническая. Технические условия

ГОСТ 1770 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 2081 Карбамид. Технические условия

ГОСТ 2226 Мешки из бумаги и комбинированных материалов. Общие технические условия

ГОСТ 2493 Реактивы. Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный. Технические условия

ГОСТ 3118 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 3769 Реактивы. Аммоний сернокислый. Технические условия

ГОСТ 4148 Реактивы. Железо (II) сернокислое 7-водное. Технические условия

ГОСТ 4197 Реактивы. Натрий азотисто-кислый. Технические условия

ГОСТ 4198 Реактивы. Калий фосфорнокислый однозамещенный. Технические условия

ГОСТ 4233 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4328 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 4403 Ткани для сит из шелковых и синтетических нитей. Общие технические условия

ГОСТ 4523 Реактивы. Магний сернокислый 7-водный. Технические условия

ГОСТ 4525 Реактивы. Кобальт хлористый 6-водный. Технические условия

ГОСТ 4528 Реактивы. Кобальт (II) азотнокислый 6-водный. Технические условия

ГОСТ 5644 Сульфит натрия безводный. Технические условия

ГОСТ 5789 Реактивы. Толуол. Технические условия

ГОСТ 6038 Реактивы. D-глюкоза. Технические условия

ГОСТ 6217 Уголь активный древесный дробленый. Технические условия

ГОСТ 6259 Реактивы. Глицерин. Технические условия

ГОСТ 6691 Реактивы. Карбамид. Технические условия

ГОСТ 6709 Вода дистиллированная. Технические условия

Издание официальное

ГОСТ 8465 Калий цианистый технический. Технические условия
ГОСТ 9147 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия
ГОСТ 10354 Пленка полиэтиленовая. Технические условия
ГОСТ 10678 Кислота ортофосфорная термическая. Технические условия
ГОСТ 11683 (ИСО 3627—76) Пиросульфит натрия технический. Технические условия
ГОСТ 12026 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия
ГОСТ 14192 Маркировка грузов
ГОСТ 14919 Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия
ГОСТ 16280 Агар пищевой. Технические условия
ГОСТ 17206 Агар микробиологический. Технические условия
ГОСТ 17626 Казеин технический. Технические условия[1)]
ГОСТ 20730 Питательные среды. Бульон мясопептонный (для ветеринарных целей). Технические условия
ГОСТ 22280 Реактивы. Натрий лимоннокислый 5,5-водный. Технические условия
ГОСТ 22967 Шприцы медицинские инъекционные многократного применения. Общие технические требования и методы испытаний
ГОСТ 24104 Весы лабораторные. Общие технические требования[2)]
ГОСТ 25336 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры
ГОСТ 32901 Молоко и молочная продукция. Методы микробиологического анализа
ГОСТ Р ИСО 6497 Корма для животных. Отбор проб[3)]
ГОСТ Р 51232 Вода питьевая. Общие требования к организации и методам контроля качества
ГОСТ Р 51850 Продукция комбикормовая. Правила приемки. Упаковка, транспортирование и хранение
ГОСТ Р 52305 Сахар-сырец. Технические условия
ГОСТ Р 54951 (ИСО 6496:1999) Корма для животных. Определение содержания влаги
ГОСТ Р 55301 Дрожжи кормовые из зерновой барды. Технические условия

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Технические требования

3.1 Кормовой витамин B_2 должен изготовляться в соответствии с требованиями настоящего стандарта по технологическому регламенту с соблюдением санитарных норм и правил по ГОСТ 12.1.005, ГОСТ 12.1.008 и ГОСТ 12.2.003, утвержденных в установленном порядке.

3.2 Для производства кормового витамина B_2 должны применяться следующие сырье и вспомогательные материалы:

- сахар-сырец по ГОСТ Р 52305 или *dl*-меласса;
- кукурузный экстракт по [1];
- кобальт хлористый по ГОСТ 4525 или кобальт азотнокислый по ГОСТ 4528;
- карбамид по ГОСТ 2081 или мочевина по ГОСТ 6691;
- дрожжи кормовые по ГОСТ Р 55301;

[1)] Действует ГОСТ Р 51463—99 «Казеины сычужные и казеинаты. Метод определения массовой доли золы».

[2)] Действует ГОСТ Р 53228—2008 «Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания».

[3)] Действует ГОСТ ISO 6497—2014 «Корма. Отбор проб».

- кислота соляная синтетическая техническая по ГОСТ 857, или кислота соляная техническая, или кислота ортофосфорная термическая по ГОСТ 10678;
- диаммонийфосфат кормовой по ГОСТ Р ИСО 6497;
- сульфит натрия кристаллический по НТД, или гидросульфит натрия технический по ГОСТ 246, или пиросульфит натрия технический по ГОСТ 11683, или сульфит натрия безводный по ГОСТ 5644.

3.3 По органолептическим, физико-химическим и биологическим показателям кормовой витамин B_2 должен соответствовать требованиям и нормам, указанным в таблице.

Таблица 1 — Физико-биологические показатели кормового витамина B_2

Наименование показателя	Нормы
Внешний вид и свойства. Запах	Однородный сыпучий порошок коричневого цвета, свойственный для данного продукта
Массовая доля влаги, %, не более	8,0
Массовая концентрация витамина B_2, мг/кг	Не менее 500,0
Крупность: остаток на сите из шелковой ткани № 27, %, не более	10,0
Безвредность в тест-дозе: - на одного цыпленка, мг - на одну мышь, м	 800,0—1200,0 100,0
Число микробных клеток, тыс/г, не более	300,0

4 Правила приема

4.1 Кормовой витамин B_2 принимают партиями. Партией считают любое количество однородного по органолептическим, физико-химическим и биологическим показателям кормового витамина B_2, фасованное и упакованное в однородную тару и оформленное одним документом о качестве.

4.2 В документе о качестве должны быть указаны:
- наименование предприятия-изготовителя и его товарный знак;
- наименование препарата;
- номер партии;
- масса нетто партии;
- дата изготовления препарата;
- номер документа о качестве;
- дата выдачи документа о качестве;
- количество мест в партии;
- результаты анализа;
- штамп ОТК;
- обозначение настоящего стандарта.

4.3 Для проверки качества кормового витамина B_2 от каждой партии до 100 единиц продукции делают выборку в количестве 10 %, но не менее четырех упаковочных единиц. Если в партии более 100 единиц продукции, отбирают 5 % упаковочных единиц. Выборку составляют из единиц продукции, отобранных из разных мест партии.

4.4 При неудовлетворительных результатах испытаний хотя бы по одному из показателей по нему проводят повторные испытания на удвоенном количестве выборки, взятой от той же партии кормового витамина B_2.

4.5 Изготовитель определяет число микробных клеток и безвредность в каждой десятой партии препарата.

5 Методы испытаний

5.1 Методы отбора проб

5.1.1 Отбор проб — по ГОСТ Р 54951. Масса объединенной пробы должна быть не менее 300 г.

5.2 Внешний вид и цвет кормового витамина B_2 определяют визуально в каждой единице продукции в момент отбора точечной пробы.

5.3 Определение запаха

5.3.1 Навеску массой 20 г высыпают на чистую бумагу и органолептическим методом определяют запах. Для усиления ощущения запаха навеску помещают в фарфоровую чашку, которую накрывают стеклом, ставят на предварительно нагретую до кипения водяную баню (или сосуд с водой) и прогревают в течение 5 мин.

5.4 Определение массовой доли влаги кормового витамина B_2 — по ГОСТ Р 54951.

5.5 Определение содержания витамина B_2 микробиологическим методом с использованием в качестве тест-микроба E. coli штамм 113-3

Метод основан на способности культуры E. coli штамм 113-3 расти только в присутствии витамина B_2.

5.5.1 Аппаратура, реактивы и материалы

Для проведения испытания применяют:

- весы технические I, II классов типов Т-1, Т-2;
- весы аналитические с разновесами марки АДВ-200 или других аналогичных марок;
- холодильник стеклянный лабораторный по ГОСТ 25336;
- плитку электрическую по ГОСТ 14919;
- термостат;
- автоклав;
- pH-метр или бумагу индикаторную универсальную pH 1—10; фотоэлектроколориметр или нефелометр;
- баню водяную;
- колбы мерные по ГОСТ 1770 вместимостью 50, 100 и 1000 $см^3$, 500 и 250 $см^3$;
- колбы стеклянные лабораторные по ГОСТ 25336 вместимостью 100 $см^3$;
- пробирки биологические длиной не менее 180 мм по ГОСТ 25336;
- пипетки вместимостью 2—5 и 10 $см^3$;
- петлю микробиологическую;
- воронку Бюхнера по ГОСТ 9147;
- воронку стеклянную по ГОСТ 25336;
- калий фосфорнокислый двузамещенный по ГОСТ 2493;
- железо сернокислое закисное по ГОСТ 4148;
- магний сернокислый по ГОСТ 4523;
- глицерин по ГОСТ 6259;
- агар микробиологический по ГОСТ 17206 или агар пищевой по ГОСТ 16280;
- воду бидистиллированную по ГОСТ 6709;
- аспарагин;
- цианокобаламин (витамин B_2) по Государственной фармакопее, изд. X, ст. 192 [2] или раствор цианокобаламина для инъекций по Государственной фармакопее, изд. X, ст. 193 [2];
- кислоту соляную по ГОСТ 3118, 1 н., 20%-ный раствор;
- натрия гидрат окиси (натр едкий) по ГОСТ 4328, 0,2; 0,5 и 1,5 н. растворы;
- казеин технический по ГОСТ 17626 или гидролизат казеина;
- уголь активированный марки «Бау» по ГОСТ 6217;
- толуол по ГОСТ 5789;
- калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4198;
- натрий лимоннокислый трехзамещенный по ГОСТ 22280;
- аммоний сернокислый по ГОСТ 3769;
- глюкозу по ГОСТ 6038;
- натрий хлористый по ГОСТ 4233;
- натрий азотнокислый по ГОСТ 4197 или калий цианистый технический по ГОСТ 8465;
- dl-метионин;
- бумагу фильтровальную лабораторную по ГОСТ 12026;
- спектрофотометр СФ-26 или других аналогичных марок.

5.5.2 Подготовка к испытанию

5.5.2.1 Приготовление 10%-ного казеинового кислотного гидролизата

100 г размолотого казеина, взвешенного с погрешностью не более 0,01 г, помещают в колбу вместимостью 1000 $см^3$, добавляют 500 $см^3$ 20%-ной соляной кислоты и перемешивают.

К колбе присоединяют обратный холодильник и нагревают в течение 24 ч. Первые 5—8 ч нагревание проводят на водяной бане при температуре 100 °С, а затем на плитке с асбестовой сеткой.

Из полученного гидролизата под вакуумом отгоняют соляную кислоту до получения густого сиропа. Затем добавляют 300 $см^3$ дистиллированной воды и снова отгоняют до получения густого сиропа. Указанную операцию повторяют еще один раз.

Оставшуюся массу растворяют в 100 $см^3$ дистиллированной воды, доводят pH до 3,5 5 н. раствором едкого натра, помещают в мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$ и доливают до метки дистиллированной водой.

Добавляют 20 $см^3$ активированного угля и периодически встряхивают в течение 1 ч, затем полученную смесь фильтруют на воронке Бюхнера. Фильтрат еще раз обрабатывают углем до получения бесцветного или слабо-желтого раствора, который разливают в колбы вместимостью до 100 $см^3$ и стерилизуют в автоклаве при 1 $кгс/см^2$ в течение 20 мин и затем охлаждают. Раствор хранят в холодильнике под слоем толуола.

5.5.2.2 Выращивание чистой культуры E. coil штамм 113-3

Культуру выращивают в пробирках на агаровых косяках и хранят в холодильнике при температуре 3 °С — 5 °С.

Состав агаровой среды в расчете на 100 $см^3$:

- казеиновый кислотный 10%-ный гидролизат — 6 $см^3$;
- калий фосфорнокислый двузамещенный — 20 мг;
- железо сернокислое — 0,5 мг;
- магний сернокислый — 20 мг;
- аспарагин — 20 мг;
- глицерин — 200 мг;
- агар — 1,5 г;
- витамин B_2 — 10 мкг;
- вода дистиллированная — до 100 $см^3$.

В колбу вместимостью 100 $см^3$ наливают дистиллированную воду и последовательно растворяют в ней первые четыре компонента.

Аспарагин отдельно растворяют в дистиллированной воде с прибавлением нескольких капель 1 н. соляной кислоты, а затем приливают к раствору в колбе. 1 н. раствора едкого натра доводят pH-раствором до 7,0. Избыток щелочи нейтрализуют 1 н. раствором соляной кислоты.

К раствору добавляют глицерин, агар и доливают дистиллированной водой до метки. Затем колбу с содержимым подогревают на водяной бане до растворения агара, вносят витамин B_2 и смесь тщательно перемешивают. Смесь разливают по 5 $см^3$ в пробирки и стерилизуют 15 мин под давлением 1 $кгс/см^2$.

Культуру раз в месяц пересевают на свежую агаровую среду и выдерживают в термостате в течение 24 ч при температуре 37 °С.

5.5.2.3 Приготовление основной среды

Состав среды в расчете на 1000 $см^3$:

- калий фосфорнокислый двузамещенный — 7 г;
- калий фосфорнокислый однозамещенный — 3 г;
- натрий лимоннокислый — 0,5 г;
- магний сернокислый — 0,1 г;
- аммоний сернокислый — 1 г;
- глюкоза — 2 г;
- натрий хлористый — 0,5 г;
- натрий азотистокислый — 0,5 г или калий цианистый — 0,02%-ный раствор — 5 $см^3$;
- вода дистиллированная — до 1000 $см^3$.

В колбу вместимостью 1000 $см^3$ наливают дистиллированную воду и последовательно растворяют в ней все компоненты. Затем доводят содержимое колбы дистиллированной водой до метки. Конечное значение pH среды устанавливают 6,8—7,0.

5.5.2.4 Приготовление посевной культуры

Посевную культуру готовят за сутки до постановки опыта. Для этого пробирки с 10 $см^3$ основной среды и витамином B_2 (из расчета 0,025 мкг в 1 $см^3$ среды) или dl-метионином (из расчета 1 мкг в 1 $см^3$ среды) стерилизуют в автоклаве при 1 $кгс/см^2$ в течение 20 мин и после охлаждения петлей вносят культуру с агаровой среды.

Пробирки выдерживают в термостате 16—20 ч при температуре 37 °С. Полученную бактериальную суспензию разводят стерильным 0,9%-ным раствором хлористого натрия или стерильной основной средой, разбавленной вдвое стерильной дистиллированной водой в соотношении одна капля суспензии на 10 $см^3$ раствора или среды.

5.5.2.5 Приготовление разведений стандартного раствора витамина B_2

Перед приготовлением стандартного раствора витамина B_2 определяют его содержание в кристаллическом цианокобаламине или в его растворе на спектрофотометре.

Для этого около 0,1 г кристаллического цианокобаламина, взвешенного с погрешностью не более 0,0001 г, растворяют в бидистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 500 $см^3$ и доводят объем раствора до метки.

25 $см^3$ полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 250 $см^3$ и доводят объем раствора бидистиллированной водой до метки. Оптическую плотность определяют на спектрофотометре при длине волны 361 нм в кювете с толщиной слоя 1 см.

Массовую долю цианокобаламина (X) в процентах вычисляют по формуле (1)

$$X = \frac{(D \cdot 500 \cdot 10)}{(207 \cdot m)}, \quad (1)$$

где D — оптическая плотность испытуемого раствора;

207 — удельный показатель поглощения $E^{1\%}_{1см}$ чистого безводного цианокобаламина при длине волны 361 нм;

m — масса навески, г.

Раствор цианокобаламина из ампулы разводят бидистиллированной водой до содержания около 0,02 мг цианокобаламина в 1 $см^3$, измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 361 нм в кювете с толщиной слоя 1 см.

В качестве контрольного раствора применяют бидистиллированную воду. Содержание цианокобаламина (X_1) в мг в $см^3$ вычисляют по формуле (2)

$$X_1 = \frac{(D \cdot 10 \cdot V_1)}{(207 \cdot V)}, \quad (2)$$

где V_1 — конечный объем раствора, $см^3$;

V — объем раствора цианокобаламина, взятый для разведения, $см^3$.

Стандартный раствор готовят из расчета 10 мкг витамина B_2 на 1 $см^3$ бидистиллированной воды.

Раствор хранят в холодильнике в темной стеклянной посуде с притертой пробкой под слоем толуола в течение месяца. По истечении срока хранения раствор подлежит проверке на спектрофотометре по методике для раствора цианокобаламина.

В день опыта раствор разводят в $2 \cdot 10^5$ раз (последовательно в 100, 100, а затем в 20 раз). Затем из этого разведения готовят четыре рабочих разведения и одно контрольное. Каждое из них готовят в трех повторностях, для чего в 15 пробирок (по три для каждого разведения и контроля) пипеткой вносят по 5 $см^3$ основной среды и следующие количества раствора витамина B_2: 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 $см^3$. Затем объем содержимого каждой пробирки доводят до 10 $см^3$ добавлением дистиллированной воды.

5.5.2.6 Подготовка исследуемой пробы кормового витамина B_2 для анализа

Навеску препарата массой 1 г, взвешенную с погрешностью не более 0,0001 г, измельчают и суспензируют в 50 $см^3$ дистиллированной воды. Для стабилизации добавляют 0,05—0,10 г азотисто-кислого натрия или 1—2 $см^3$ 0,02%-ного раствора цианистого калия и несколькими каплями 1 н. соляной кислоты доводят pH суспензии до 5,0—5,5. Избыток кислоты нейтрализуют 0,5 н. раствором едкого натра.

Затем суспензию кипятят в течение 20 мин на водяной бане или помещают в автоклав на 15 мин при давлении 0,5—1,0 $кгс/см^2$, после чего охлаждают.

Охлажденную суспензию переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, доводят pH до 6,8—7,0 добавлением 0,5 н. раствора едкого натра и 1 н. раствора соляной кислоты и доливают колбу дистиллированной водой до метки.

Смесь фильтруют через бумажный фильтр и часть профильтрованного экстракта разбавляют водой до концентрации приблизительно 0,02—0,05 мг витамина B_2 на 1 $см^3$.

5.5.2.7 Приготовление контрольной пробы

В исследуемой пробе может содержаться метионин, к которому чувствителен штамм E. coli 113-3, поэтому проводят контрольный анализ исследуемого экстракта, где витамин B_2 предварительно

разрушают. Для этого 5 см^3 экстракта смешивают с 5 см^3 0,2 н. едкого натра и кипятят в течение 20 мин на водяной бане с обратным холодильником. После охлаждения раствор нейтрализуют добавлением 1 н. соляной кислоты и разбавляют водой до такой же степени, как и в опыте с неразрушенным витамином B_2.

5.5.2.8 Приготовление разведений исследуемого раствора кормового витамина B_2

Из исследуемой пробы готовят три разведения (в двух повторностях каждое), для чего в шесть пробирок (по две для каждого разведения) вносят по 5 см^3 основной среды и следующие количества экстракта: 0,5; 1,0; 2,0 см^3. Кроме того, готовят три разведения контрольного раствора. Для этого в три пробирки вносят по 5 см^3 основной среды и следующие количества контрольного раствора: 3; 4; 5 см^3. Затем объем содержимого каждой пробирки доводят до 10 см^3 добавлением дистиллированной воды.

5.5.3 Проведение испытания

Испытание состоит из составления калибровочной линии для чистого витамина B_2 и непосредственного испытания исследуемой пробы.

Пробирки с разведением стандартного и исследуемого растворов помещают в автоклав на 20 мин при давлении 1 кгс/см^2, после чего охлаждают. Затем засевают каждую пробирку одной каплей бактериальной суспензии (приготовленной по п. 5.5.2.4) и ставят в термостат на 20—24 ч при температуре 37 °С.

По истечении указанного времени пробирки прогревают в автоклаве текучим паром 15 мин и охлаждают. После охлаждения содержимое пробирок взбалтывают и измеряют мутность на фотоэлектроколориметре или нефелометре. При использовании фотоэлектроколориметра замеры делают при синем светофильтре. Контрольным раствором для определения мутности является дистиллированная вода.

По полученным данным на миллиметровой бумаге строят калибровочный график. На оси ординат откладывают значение мутности для каждого стандартного разведения (среднее из трех пробирок), а на оси абсцисс — соответствующее количество витамина B_2. При соединении полученных точек получают калибровочную линию.

При незначительном разбросе точек калибровочную линию проводят между ними на расстоянии, равноудаленном от большинства точек.

5.5.4 Обработка результатов

Содержание витамина B_2 определяют отдельно в каждой пробирке исследуемой пробы при помощи калибровочной линии. Данные, которые не укладываются в калибровочную линию, отбрасывают. По данным, которые уложились в линию (не менее двух разведений), определяют количество витамина B_2 в исследуемой пробе, затем вычисляют среднее арифметическое результатов двух разведений.

Если наблюдается рост бактерий в контрольных пробирках, где витамин разрушен, то находят по калибровочному графику соответствующие росту значения, которые вычитают из найденного количества витамина B_2 в исследуемой пробе.

За окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений.

Допускаемые расхождения между результатами двух параллельных определений не должны превышать 4,5 отн. %. Погрешность метода — ± 15 %.

Примечание — При разногласиях между поставщиками и потребителем и при поставке продукции на экспорт определение массовой доли витамина B_2 проводят с использованием цианистого калия.

5.6 Определение безвредности

5.6.1 Аппаратура и реактивы

Для проведения испытания применяют:

- шприц медицинский инъекционный типа «Рекорд» по ГОСТ 22967;
- ступку по ГОСТ 9147;
- воду питьевую по ГОСТ Р 51232.

5.6.2 Проведение испытания.

Для проведения испытания отбирают пять цыплят 6—8-недельного возраста массой по 400—600 г или пять белых мышей массой по 18—20 г.

Кормовой витамин B_2 тщательно растирают в ступке с водой. Воду добавляют с таким расчетом, чтобы 1 см^3 готовой суспензии содержал 100 мг препарата. Суспензию вводят цыплятам шприцем с тонким резиновым зондом через рот в течение пяти суток в дозе 8—12 см^3 на каждого (из расчета 2 см^3 на 100 г живой массы).

Мышам взвесь вводят через рот с помощью иглы, на конец которой наплавлена олива диаметром не более 1 мм. Препарат вводят ежедневно в течение пяти суток в дозе 1 см^3 на каждую мышь (из расчета 100 мг препарата на одну мышь).

5.6.3 Обработка результатов

Препарат считают безвредным, если все цыплята остаются живыми в течение пяти, а мыши в течение двух последующих суток наблюдения.

При гибели части их проверку повторяют на удвоенном количестве цыплят и мышей. При гибели хотя бы одного цыпленка или мыши в повторном опыте препарат бракуют.

Каждого цыпленка или мышь используют в опыте один раз.

5.7 Определение крупности частиц

5.7.1 Аппаратура

Для проведения испытания применяют:

- рассев лабораторный с электрическим или ручным приводом с частотой вращения 180—200 об/мин;
- сито лабораторное с сеткой из облегченной шелковой ткани № 27 по ГОСТ 4403;
- весы технические I, II классов типов Т-1, Т-2.

5.7.2 Проведение испытания

50 г препарата, взвешенного с погрешностью не более 0,01 г, просеивают через сито в течение 8 мин. Затем слегка постукивают по обечайке сита и вновь просеивают в течение 2 мин. Для очистки сит при просеивании применяют пять резиновых кружочков массой около 0,5 г каждый. Допускается просеивание ручным способом при 110—120 движениях в минуту и размахе колебаний сита около 10 см.

Остаток на сите взвешивают на технических весах с погрешностью не более 0,01 г.

5.7.3 Обработка результатов

Крупность частиц (остаток на сите) (X) в процентах вычисляют по формуле (3)

$$X = \frac{(m_1 \cdot 100)}{(m)}, \quad (3)$$

где m — масса навески, г;

m_1 — масса остатка на сите, г.

Вычисление производят до 0,01 %.

За окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений.

Допускаемые расхождения между результатами двух параллельных определений не должны превышать 0,2 абс. %.

5.8 Определение числа микробных клеток

5.8.1 Аппаратура и реактивы

Для проведения испытания применяют:

- весы лабораторные рычажные 1-го и 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104 или других аналогичных типов;
- термостат типа ТС-80 или других аналогичных типов для поддержания температуры с отклонением ± 0,2 °С от заданной;
- лупу с увеличением в 8—10 раз;
- прибор для подсчета колоний бактерий;
- колбы стеклянные лабораторные по ГОСТ 25336 вместимостью 250 см^3;
- пипетки 4-го или 5-го исполнения, 1-го или 2-го класса точности, вместимостью 1 см^3;
- пробирки биологические по ГОСТ 25336;
- чашки стеклянные лабораторные по ГОСТ 25336 типа ЧБН, исполнения 2;
- натрий хлористый по ГОСТ 4233;
- агар микробиологический по ГОСТ 17206 или агар пищевой по ГОСТ 16280;
- бульон мясопептонный по ГОСТ 20730;
- воду дистиллированную по ГОСТ 6709.

5.8.2 Подготовка к испытанию

Мясопептонный агар готовят по ГОСТ 32901.

5.8.3 Проведение испытания

1 г препарата, взвешенного с погрешностью не более 0,01 г, помещают в колбу с 99 см^3 стерильного физиологического раствора, получают разведение 1 : 100 и тщательно встряхивают. Из полученной взвеси готовят последующие разведения 1 : 1000 и 1 : 10 000. После оседания взвешенных частиц из

верхнего слоя жидкости берут суспензию каждого разведения и засевают на 2—3 чашки следующим образом: 1 $см^3$ суспензии, взятый стерильной пипеткой, помещают в центр каждой чашки и заливают около 15 $см^3$ расплавленного и охлажденного до 45 °С мясопептонного агара. При посеве и заливке агаром крышку чашки Петри быстро приоткрывают и закрывают. Сразу после заливки агара содержимое тщательно перемешивают, делая чашками круговые движения на гладкой поверхности стола, для равномерного распределения посевного материала. После застывания агара чашки переворачивают крышками вниз, помещают в термостат и выдерживают в течение 48 ч при температуре 37 °С.

5.8.4 Обработка результатов

Число выросших колоний подсчитывают в каждой чашке, поместив ее вверх дном (без крышки), пользуясь лупой и прибором для подсчета колоний. Каждую подсчитанную колонию отмечают на дне чашки чернилами. При большом числе колоний и равномерном их распределении дно чашки делят на четыре одинаковых сектора, подсчитывают число колоний в двух-трех секторах, находят среднее арифметическое и умножают на общее число секторов. Таким образом находят общее число колоний, выросших на одной чашке. Для подсчета общего числа микробных клеток в 1 г препарата число колоний, выросших на каждой чашке, умножают на соответствующее разведение.

Полученные результаты по отдельным чашкам складывают, делят на количество подсчитанных чашек и выводят среднее арифметическое, которое принимают за окончательный результат.

6 Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение

6.1 Кормовой витамин B_2 фасуют по 10, 12 и 15 кг с погрешностью не более 1,25 % в мешки из полиэтиленовой пленки по ГОСТ 10354, которые затем запаивают и упаковывают в бумажные четырехслойные мешки марок НМ, ВМ, ПМ или ВМП по ГОСТ 2226.

6.2 На каждый бумажный мешок наклеивают, пришивают или наносят трафаретом этикетку, содержащую данные об упакованной продукции:

- наименование предприятия-изготовителя и его товарный знак;
- наименование препарата;
- марку препарата;
- массовая доля витамина B_2;
- массу нетто;
- номер партии;
- дату изготовления;
- назначение препарата;
- норму ввода;
- срок хранения;
- условия хранения;
- обозначение настоящего стандарта.

6.2.1 Маркировка транспортной тары — по ГОСТ 14192 с нанесением манипуляционного знака «Беречь от влаги».

6.2.2 Витамин B_2 кормовой, предназначенный для экспорта, маркируют по ГОСТ 14192 и в соответствии с заказом-нарядом внешнеторгового объединения.

6.3 Транспортирование — по ГОСТ Р 51850.

6.4 Хранение — по ГОСТ Р 51850.

7 Гарантии изготовителя

7.1 Изготовитель гарантирует соответствие кормового витамина B_2 требованиям настоящего стандарта при соблюдении потребителем условий применения и хранения.

7.2 Гарантийный срок хранения кормового витамина B_2 — 1 год со дня изготовления.

Библиография

[1] ОСТ 18–005 Крахмало-паточные продукты. Экстракт кукурузный сгущенный
[2] Государственная фармакопея СССР X. М.: Медицина, 1968. 1079 с.

УДК 577.164.12:006.354 ОКС 65.120

Ключевые слова: витамин кормовой B_2, микробиологический синтез, тест-культура, пробы

Редактор переиздания *Е.И. Мосур*
Технические редакторы *В.Н. Прусакова, И.Е. Черепкова*
Корректор *Е.И. Рычкова*
Компьютерная верстка *Г.В. Струковой*

Сдано в набор 27.02.2020. Подписано в печать 28.04.2020. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 1,20.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ИД «Юриспруденция», 115419, Москва, ул. Орджоникидзе, 11.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

Создано в единичном исполнении во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.
gost.e-ecolog.ru stinfo.ru

gost.e-ecolog.ru