

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Определение	ОФС.1.2.4.0012.15
содержания витаминов в	
многокомпонентных препаратах	
микробиологическим методом	Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод микробиологического определения количественного содержания витаминов в многокомпонентных лекарственных препаратах. Его осуществляют чашечным или пробирочным методами с использованием указанных ниже тест-штаммов микроорганизмов.

Определение количественного содержания витаминов чашечным методом

Тест-штаммы микроорганизмов. Для определения содержания цианокобаламина ($C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$) используют штамм *Escherichia coli* 113-3 (ATCC 11105).

Выполнение испытания

Точную навеску порошка растертых драже или таблеток испытуемого препарата, указанную в соответствующих фармакопейных статьях, количественно переносят в мерную колбу определенной вместимости, доводят объем раствора водой очищенной до метки, перемешивают и фильтруют. Из полученного раствора готовят разведение 1 % раствором натрия цитрата^{a)} так, чтобы концентрация раствора для испытания была близкой к контрольной концентрации раствора стандартного образца (СО) цианокобаламина – 0,05 мкг/мл.

В чашки Петри (6 чашек для построения стандартной кривой и 3 чашки для раствора испытуемого препарата) одинакового диаметра с ровным и плоским дном, установленные на строго горизонтальной поверхности (регулируют по ватерпасу), разливают по 10–12 мл расплавленной и охлажденной до температуры 48 – 50 °С основной среды, засеянной суспензией *Escherichia coli* 113-3 из расчета от 4 до 6 мл суспензии на 200 мл основной среды. После застывания среды в каждой чашке стерильным бором по трафарету делают лунки в агаре: 6 лунок диаметром 8 мм под углом 60 ° друг к другу.

В 3 лунки (через одну) каждой из 6 чашек, используемых для построения стандартной кривой, и 3 чашек – для раствора испытуемого препарата, вносят по 0,1 мл раствора СО контрольной концентрации (0,05 мкг/мл). В 3 лунки (через одну) каждой из 3 чашек препарата вносят по 0,1 мл одной из концентраций остальных растворов СО, а также раствора испытуемого препарата. Чашки инкубируют при температуре 37 °С в течение 16 – 18 ч.

По окончании инкубации измеряют диаметры зон стимуляции роста тест-микроорганизма для каждой концентрации растворов СО. После измерения зон роста для всех концентраций рассчитывают среднюю величину зоны, учитывая в каждом случае 3 чашки, т. е. 9 зон. Затем рассчитывают среднюю величину зоны для контрольной концентрации, учитывая все чашки (27 зон).

По разности между средней величиной зоны контрольной концентрации раствора (0,05 мкг/мл), рассчитанной из всех чашек, и средней величиной зоны контрольной концентрации раствора СО, полученной из 3 чашек с каждой отдельной концентрацией, находят поправку к величине зоны данной концентрации. Найденную поправку прибавляют к средней величине зоны данной концентрации, если она положительная, и вычитают, если она отрицательная. Аналогичным образом делают поправку к концентрации раствора испытуемого препарата.

Содержание цианокобаламина в 1 драже или 1 таблетке в граммах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{C \cdot b \cdot K}{a \cdot 10^6}$$

где: C – содержание цианокобаламина в 1 мл испытуемого раствора, найденное по стандартной кривой, мкг;

K – коэффициент разведения;

a – навеска препарата в граммах или количество таблеток;

b – средняя масса одной таблетки, г;

10^6 – коэффициент для пересчета в граммы.

Построение стандартной (калибровочной) кривой. По исправленным значениям величин зон стимуляции роста при добавлении приготовленных концентраций и средней величине зоны контрольной концентрации на всех чашках строят стандартную кривую, откладывая на оси абсцисс концентрации цианокобаламина в мкг/мл, а на оси ординат соответствующие им величины диаметров зон роста. По полученным точкам строят стандартную кривую, находят концентрацию цианокобаламина в мкг/мл и вычисляют его содержание в образце.

Примечания.

1. Приготовление основного раствора СО цианокобаламина 100 мкг/мл. В мерной колбе вместимостью 250 мл в 25 % спирте растворяют 0,0250 г СО цианокобаламина (в пересчете на сухое вещество), доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор годен к использованию в течение 2 мес при температуре 2 – 8 °С во флаконе темного стекла с притертой пробкой.

2. Приготовление рабочего раствора СО цианокобаламина 1 мкг/мл. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,0 мл основного раствора СО цианокобаламина и доводят объем раствора водой очищенной до метки. Раствор годен в течение 5 сут при температуре 2 – 8 °С.

Растворы, содержащие цианокобаламин, не должны подвергаться воздействию прямых солнечных лучей.

Из рабочего раствора СО цианокобаламина в день исследования готовят растворы, содержащие 0,025; 0,050 и 0,075 мкг цианокобаламина в 1 мл. Для этого соответственно 2,5; 5,0 и 7,5 мл рабочего раствора СО помещают в мерные колбы вместимостью 100 мл, доводят объемы растворов в колбах 1 % раствором натрия цитрата до метки и перемешивают.

Раствор, содержащий 0,05 мкг цианокобаламина в 1 мл, принимают за раствор СО контрольной концентрации.

3. Хранение и подготовка тест-культуры для анализа. Культуру тест-микроорганизма выращивают на скошенной агаризованной среде при температуре $(32,5 \pm 2,5)$ °С в течение 16–18 ч. Тест-культуру хранят при температуре 2 – 8 °С, пересевая не реже одного раза в месяц.

Состав среды для хранения тест-микроорганизма:

- казеиновый кислотный гидролизат 10 % 6 мл⁶⁾
 - калия фосфат двузамещенный 0,02 г
 - железа сульфат 0,0005 г
 - магния сульфат 0,02 г
 - L-аспарагин 0,02 г
 - глицерин 0,2 г
 - агар микробиологический 1,5 г
 - цианокобаламин 10 мкг
 - вода очищенная до 100 мл
- pH среды до стерилизации $(7,0 \pm 0,2)$

Приготовление среды. Ингредиенты (гидролизат казеина и соли) последовательно растворяют в воде. Аспарагин растворяют отдельно в 10 мл воды с добавлением 2 капель 1 М раствора хлористоводородной кислоты при слабом нагревании и добавляют к раствору солей. Устанавливают pH 7,0 полученной смеси 15 % раствором натрия гидроксида, после чего доводят объем среды водой очищенной до 100 мл, прибавляют 0,2 г глицерина и 1,5 г агара микробиологического. Смесь нагревают на водяной бане до полного растворения агара, затем прибавляют 10 мкг цианокобаламина.

За 1сут до проведения испытания тест-микроорганизм пересевает на пептонно-солевую среду следующего состава:

А) Пептонно-солевая среда агаризованная:

- пептон ферментативный сухой 2,0 г
- натрия хлорид 0,5 г
- агар микробиологический 1,8 г
- вода очищенная до 100 мл

Б) Пептонно-солевая среда жидкая:

- пептон ферментативный сухой 2,0 г
 - натрия хлорид 0,5 г
 - вода очищенная до 100 мл
- pH среды до стерилизации $(7,0 \pm 0,2)$.

Приготовление сред. Жидкую и агаризованную среды разливают в пробирки по 5 мл, стерилизуют насыщенным паром под давлением в паровом стерилизаторе при температуре 120–121 °С в течение 15 мин. Для получения скошенного агара среду охлаждают в наклонном положении. На обе среды делают посев тест-культуры *E. coli* из рабочего музея и инкубируют в течение 16 – 18 ч при температуре $(32,5 \pm 2,5)$ °С и используют для приготовления посевного материала.

4. Состав и приготовление основной среды.

Состав основной среды:

- аммония хлорид 2,0 г
 - натрия хлорид 3,0 г
 - калия фосфат двузамещенный 0,4 г
 - натрия цитрат трехзамещенный 3,0 г
 - лактоза 3,0 г
 - агар микробиологический 15,0 г
 - вода очищенная до 1000 мл
- рН среды до стерилизации $(7,0 \pm 0,2)$

Приготовление среды. Среду разливают по 200 мл в колбы и стерилизуют насыщенным водяным паром при температуре 120 – 121 °С в течение 15 мин. Хранят при температуре 2 – 8 °С не более 2 мес.

Перед розливом в чашки Петри на каждые 200 мл расплавленной среды добавляют по 5 мл стерильного 40 % раствора глюкозы. Раствор глюкозы стерилизуют при температуре 120 – 121 °С в течение 10 мин.

5. Приготовление посевного материала. Со скошенного пептонно-солевого агара (А) делают смыв суточной тест-культуры 0,9 % раствором натрия хлорида или используют бульонную культуру с жидкой питательной среды (Б). Плотность микробной взвеси должна быть $(1-2)10^9$ КОЕ/мл.

Вся работа должна выполняться в асептических условиях. В работе используют только химически чистую лабораторную посуду.

Определение содержания витаминов пробирочным методом

Пробирочный метод используют для определения количественного содержания D-биотина ($C_{10}H_{16}N_2S$), кальция пантотената ($C_{18}H_{32}CaN_2O_{10}$), фолиевой кислоты ($C_{19}H_{19}N_7O_6$), никотиновой кислоты (или никотинамида) в многокомпонентных препаратах.

Тест-штаммы микроорганизмов

- *Lactobacillus plantarum* ВКМ В-578 (АТСС 8014) используют для

определения D-биотина, кальция пантотената и кислоты никотиновой (или никотиламида);

- *Enterococcus faecalis* (*E. faecium*) ВКМ В-602 применяют для определения фолиевой кислоты.

Выполнение испытания

Точную навеску порошка растертых драже или таблеток, указанную в соответствующих фармакопейных статьях или в нормативной документации, количественно переносят водой в мерную колбу определенной вместимости, доводят объем раствора водой очищенной до метки, перемешивают и фильтруют (основной раствор).

Готовят растворы рабочих стандартных и испытуемых образцов. Для этого в 2–3 ряда пробирок одинакового размера разливают по 1 мл свежеприготовленной воды очищенной. Образцы в количестве 1 мл с концентрацией D-биотина около 0,002 мкг/мл, кальция пантотената – 0,2 мкг/мл, фолиевой кислоты – 0,004 мкг/мл, никотиновой кислоты (или никотиламида) – 0,32 мкг/мл вносят в первые пробирки соответствующих рядов и делают 6 последовательных разведений в каждом ряду, перемешивая и перенося 1 мл раствора в следующие пробирки ряда; из последней отбирают 1 мл и удаляют в дезинфицирующий раствор. Затем во все пробирки добавляют по 1 мл основной среды. При этом общий объем полученных растворов в каждой пробирке должен быть равен 2 мл.

В каждом ряду ставят отрицательный контроль, содержащий 1 мл воды очищенной и 1 мл основной среды.

Все пробирки стерилизуют насыщенным паром под давлением в паровом стерилизаторе при температуре 120 – 121 °С в течение 10–15 мин. После охлаждения в каждую пробирку вносят по 0,1 мл разведенной взвеси тест-культуры (п.5).

Засеянные пробирки инкубируют при температуре (32,5±2,5)°С в течение 16–24 ч. Интенсивность роста тест-культуры в пробирках

стандартного и испытуемого образцов измеряют на фотометре-нефелометре при длине волны около 540 нм.

Содержание определяемого витамина в одной таблетке в граммах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{C \cdot b \cdot V \cdot V_1}{a \cdot V_2 \cdot 10^6}$$

где C – среднеарифметическое содержание D-биотина в 1 мл, найденное по стандартной кривой для шести концентраций растворов испытуемого образца с учетом всех разведений (4; 8; 16; 32; 64 и 128), в мкг;

V, V_1, V_2 – разведения, мл;

a – навеска испытуемого образца в граммах или количество таблеток;

b – средняя масса одной таблетки, г;

10^6 – коэффициент для пересчета, г.

Примечания.

Приготовление рабочих растворов СО витаминов

1. СО D-биотина. В мерную колбу вместимостью 500 мл помещают 200 мл 25 % спирта, в котором растворяют 0,0010 г D-биотина на кипящей водяной бане. После охлаждения объем раствора доводят тем же растворителем до метки (основной раствор) и перемешивают. В 1 мл основного раствора содержится 2 мкг D-биотина.

В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 5 мл основного раствора и доводят объем раствора водой очищенной до метки. Переносят 1 мл полученного раствора в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора водой до метки (рабочий раствор). Рабочий раствор содержит 0,002 мкг D-биотина в 1 мл. Содержание D-биотина в стандартном ряду разведений должно соответствовать 0,0005; 0,00025; 0,000125; 0,0000625; 0,000031; 0,0000156 мкг/мл и 0 мкг/мл – в отрицательном контроле.

2. СО кальция пантотената. В мерной колбе вместимостью 50 мл в 25 % спирте растворяют 0,050 г кальция пантотената (в пересчете на сухое вещество по содержанию азота) и доводят объем раствора тем же растворителем до метки (основной раствор). В 1 мл основного раствора содержится 1 мг кальция пантотената.

В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1 мл основного раствора и доводят объем раствора водой очищенной до метки. Переносят 1 мл полученного раствора в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора водой очищенной до метки (рабочий раствор). Рабочий раствор содержит 0,2 мкг кальция пантотената в 1 мл. Содержание кальция

пантотената в стандартном ряду разведений должно соответствовать 0,05; 0,025; 0,0125; 0,00625; 0,0031; 0,00156 мкг/мл и 0 мкг/мл – в отрицательном контроле.

3. СО фолиевой кислоты. В мерной колбе вместимостью 100 мл в 5 мл 1 % раствора натрия двууглекислого^{в)} растворяют 0,0100 г фолиевой кислоты, доводят объем водой очищенной до метки (основной раствор). В 1 мл основного раствора содержится 100 мкг фолиевой кислоты.

В мерную колбу вместимостью 100 мл вносят 1 мл основного раствора и доводят объем раствора водой очищенной до метки. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1 мл полученного раствора, доводят объем раствора водой очищенной до метки.

10 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл (рабочий раствор). Рабочий раствор содержит 0,004 мкг фолиевой кислоты в 1 мл.

Содержание фолиевой кислоты в стандартном ряду при приготовлении разведений должно соответствовать 0,001; 0,0005; 0,00025; 0,000125; 0,0000625; 0,00003125 мкг/мл и 0 мкг/мл – в отрицательном контроле.

4. СО никотиновой кислоты (или никотинамида). В мерной колбе вместимостью 100 мл в 25 % спирте растворяют 0,0100 г никотиновой кислоты (или никотинамида) и доводят объем раствора тем же растворителем до метки (основной раствор). В 1 мл основного раствора содержится 100 мкг никотиновой кислоты или никотинамида. Раствор хранят при температуре 2 – 8 °С не более 1 мес.

В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 2 мл основного раствора и доводят объем раствора водой очищенной до метки. 4 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора водой до метки. Рабочий раствор содержит 32 мкг/мл никотиновой кислоты или никотинамида.

Содержание кислоты никотиновой или никотинамида в стандартном ряду разведений должно соответствовать 0,08; 0,04; 0,02; 0,01; 0,005 мкг/мл и 0 мкг/мл – в отрицательном контроле.

Растворы годны к использованию в течение 2–3 мес при хранении в емкости с притертой пробкой при температуре 2 – 8 °С.

2. Построение стандартной кривой. На оси абсцисс откладывают содержание определяемого витамина (в мкг/мл) в пробирках стандартного ряда, а на оси ординат – соответствующие им значения процента светопропускания. По полученным точкам вычерчивают стандартную кривую, находят концентрацию соответствующих витаминов в мкг/мл и вычисляют их содержание в образце.

3. Хранение и подготовка тест-культуры для анализа

3.1. *L. plantarum* ВКМ В-578 (АТСС 8014) поддерживают на питательной среде следующего состава:

- дрожжевой экстракт 2,0 г

- пептон 0,5 г
- глюкоза 0,5 г
- натрия ацетат 0,5 г
- твин-80 0,01 г
- агар микробиологический 1,6 г
- вода очищенная до 100 мл
рН (6,8 ± 0,2)

3.2. *E. faecalis* ВКМ В-602 поддерживают на питательной среде следующего состава:

- дрожжевой экстракт 1,0 г
- глюкоза 0,5 г
- натрия ацетат 0,5 г
- агар микробиологический 1,8 г
- вода очищенная до 100 мл
рН (6,8 ± 0,2).

Ингредиенты последовательно растворяют в воде, устанавливают требуемое значение рН 6,8 и доводят объем водой очищенной до 100 мл. Смесь нагревают при перемешивании на кипящей водяной бане до полного растворения агара, разливают по 5 мл в пробирки, стерилизуют насыщенным паром под давлением в паровом стерилизаторе при температуре 120 – 121 °С в течение 10–15 мин, охлаждают в наклонном положении для получения скошенной поверхности агара.

Посевы инкубируют при температуре (32,5 ± 2,5) °С в течение 16–24 ч. Тест-культуру хранят при температуре 2 – 8 °С, пересевая не реже одного раза в мес.

Примечания.

Состав и приготовление основной среды

1. Состав среды для определения содержания D-биотина:

- глюкоза 40 г
- натрия ацетат 20 г
- раствор гидролизата казеина 10% 100 мл^{б)}
- раствор L-цистина и D, L-триптофана 100мл^{в)}
- раствор твина-80 1 мл^{д)}
- раствор аденина, гуанина и урацила 10 мл^{е)}

- раствор кальция пантотената и тиаминa 20 мл^{жс)}
- раствор рибофлавина 40 мл^{з)}
- раствор ПАБК, пиридоксина, никотиновой кислоты 20 мл^{и)}
- растворы солей А^{к)} и солей Б^{л)} по 10 мл
- вода очищенная до 1000 мл
рН (6,8 ± 0,2)

2. Состав среды для определения содержания кальция пантотената:

- глюкоза 40 г
- натрия ацетат 20 г
- раствор гидролизата казеина^{б)} 100 мл
- раствор L-цистина и D, L-триптофана^{в)} 100 мл
- раствор твина-80^{д)} 1 мл
- раствор аденина, гуанина, урацила^{е)} 20 мл
- раствор рибофлавина, тиаминa, D-биотина^{м)} 20 мл
- раствор ПАБК, пиридоксина, никотиновой кислоты^{и)} 20 мл
- растворы солей А^{к)} и солей Б^{л)} по 20 мл
- вода очищенная до 1000 мл
рН (6,8 ± 0,2)

3. Состав среды для определения содержания фолиевой кислоты:

- глюкоза 40 г
- натрия цитрат^{а)} 20 г
- раствор гидролизата казеина^{б)} 120 мл
- раствор L-цистина, D,L-триптофана, L-аспарагина^{н)} 100мл
- раствор аденина, гуанина, урацила и ксантина^{о)} 10мл
- раствор тиаминa, рибофлавина, никотиновой кислоты^{п)} 10мл
- раствор кальция пантотената^{р)} 8 мл
- раствор пиридоксина^{с)} 24мл
- раствор ПАБК^{т)} 10 мл
- раствор биотина^{у)} 0,5 мл
- раствор солей Б^{л)} 10 мл
- вода очищенная до 1000 мл
рН (6,8 ± 0,2).

4. Состав среды для определения содержания никотиновой кислоты (никотинамида):

- глюкоза 40 г
- натрия ацетат 20 г
- раствор гидролизата казеина^{б)} 100 мл
- раствор аденина, гуанина, урацила^{в)} 10 мл
- раствор L-цистина и D, L-триптофана^{г)} 100 мл
- раствор тиаминa и кальция пантотената^{жс)} 2 мл

- раствор рибофлавина ^{з)} 8 мл
- раствор пиридоксина и ПАБК ^{ф)} 2 мл
- раствор биотина ^{у)} 4 мл
- растворы солей А ^{к)} и солей Б ^{л)} по 10 мл
- вода очищенная до 1000 мл
рН (6,8 ± 0,2)

5. Приготовление питательных сред для определения содержания витаминов. Глюкозу предварительно обрабатывают углем активированным осветляющим. Для этого к 200 мл 20 % раствора глюкозы добавляют 10 г угля, встряхивают в течение 40 мин и фильтруют через плотный бумажный фильтр. К раствору глюкозы добавляют остальные растворы, устанавливают рН 6,8 и доводят объем среды водой очищенной до 1000 мл. Среду нагревают на кипящей водяной бане 5 мин, охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр. Готовую среду разливают по 70 мл в колбы вместимостью 100 мл, закрывают и хранят в морозильной камере при температуре минус 18 – 25 °С в течение 3 мес. Перед использованием среду размораживают при комнатной температуре.

Приготовление посевного материала

Для приготовления посевного материала используют один из нижеприведенных способов:

1) За 1 сут до испытания тест-микрорганизм пересевают на питательную среду соответствующего состава (п.3) и инкубируют при температуре (32,5 ± 2,5) °С в течение 16 – 24 ч. Клетки отделяют центрифугированием в асептических условиях, надосадочную жидкость сливают, а осадок суспендируют в 10 мл стерильного раствора натрия хлорида ^{х)}. Вносят 0,05 мл полученной суспензии в 10 мл стерильного изотонического раствора натрия хлорида. Мутность используемой суспензии должна быть (90 ± 1) % по шкале светопропускания фотометра-нефелометра при длине волны около 540 нм.

2) При определении D-биотина, кальция пантотената и никотиновой кислоты (или никотинамида) за 1сут до испытания небольшое количество исходной тест-культуры *L.plantarum* ВКМ В-758 (АТСС 8014) пересевают бактериологической петлей на агаризованную среду для лактобактерий (п.3.1). Инкубируют при температуре (32,5 ± 2,5) °С в течение 16–24 ч. После этого культуру смывают стерильным раствором натрия хлорида и доводят содержание микробных клеток до 10⁹ КОЕ/мл по оптическому стандарту мутности. Затем переносят 0,2 мл взвеси в пробирку с 9,0 мл раствора натрия хлорида, перемешивают и используют в качестве посевного материала для внесения в основную питательную среду (пп. 4.1, 4.2 и 4.4).

Enterococcus faecalis (faecium) ВКМ В-602 пересевают в жидкую питательную среду следующего состава:

- дрожжевой экстракт 2,0 г
 - пептон 0,5 г
 - глюкоза 0,5 г
 - натрия ацетат 0,5 г
 - твин-80 0,01г
 - вода очищенная до 100 мл
- рН (6,8 ± 0,2).

Готовую среду разливают в пробирки по 10 мл и стерилизуют насыщенным паром под давлением в паровом стерилизаторе при температуре 120 – 121 °С в течение 10–15 мин.

Последующие этапы работы проводят по той же схеме, что и для *L.plantarum* ВКМ В-758 (АТСС 8014).

При испытании допускается использование коммерческих сухих стандартных питательных сред известных производителей.

В работе используют только химически чистую лабораторную посуду.

Примечания.

а) Приготовление 1 % раствора натрия цитрата. В мерной колбе вместимостью 1000 мл в воде очищенной растворяют 10 г натрия цитрата и доводят объем раствора водой до метки. Раствор годен к использованию в течение 7 сут в условиях хранения при температуре 2 – 8 °С.

б) Приготовление 10 % раствора кислотного гидролизата казеина (свободного от витаминов). При приготовлении среды для хранения культуры можно использовать коммерческий сухой солянокислый гидролизат казеина в соответствующем количестве или 10 % казеиновый кислотный гидролизат, для которого используют казеин размолотый.

В круглодонной колбе вместимостью 1000 мл смешивают 100 г казеина размолотого с 500 мл 20 % раствора хлористоводородной кислоты¹⁾. Смесь нагревают с обратным холодильником в течение 24 ч. Первые 5 – 8 ч растворения казеина нагревание проводят на кипящей водяной бане, затем на электроплитке с асбестовой сеткой. Из полученного гидролизата при пониженном давлении отгоняют хлористоводородную кислоту. К густому остатку прибавляют 300 мл воды очищенной, перемешивают и снова отгоняют до получения густого сиропа. Указанную операцию повторяют дважды. Далее растворяют оставшуюся массу в 100 мл воды, доводят рН раствора до 3,5 с помощью 30 % раствора натрия гидроксида и доводят объем раствора водой очищенной до 1000 мл. К готовому раствору прибавляют 20 г угля активированного, встряхивают в течение 1 ч,

фильтруют на воронке Бюхнера с отсасыванием. Обработку углем повторяют, получают бесцветный или светло-желтый раствор, который разливают во флаконы по 100 мл, и стерилизуют насыщенным паром под давлением в паровом стерилизаторе при температуре 120 – 121 °С в течение 15 мин. Хранят при температуре 2 – 8 °С.

в) Приготовление 1 % раствора натрия двууглекислого. Растворяют в 100 мл воды очищенной 1 г натрия двууглекислого и хранят при температуре 2 – 8 °С не более 1 нед.

г) Приготовление раствора L-цистина и D,L-триптофана. В мерной колбе вместимостью 500 мл в 20 мл 20 % раствора хлористоводородной кислоты^{н)} растворяют 1 г L-цистина и 1 г D,L-триптофана (или 0,5 г L-триптофана), нагревают до 70 – 80 °С, периодически помешивая, до полного растворения аминокислот. После охлаждения объем доводят водой очищенной до метки и хранят при температуре 2 – 8 °С.

д) Приготовление раствора твина-80. Растворяют 2,5 г твина-80 в 25 мл спирта. Хранят при температуре 2 – 8 °С.

е) Приготовление раствора аденина, гуанина и урацила. По 0,2 г аденина сульфата, гуанина и урацила растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 100 мл с добавлением 10 мл 20 % раствора хлористоводородной кислоты^{н)} при длительном нагревании на кипящей водяной бане. После охлаждения доводят объем водой очищенной до метки и хранят при температуре 2 – 8 °С в течение 1 мес.

ж) Приготовление раствора кальция пантотената и тиамин. В мерной колбе вместимостью 100 мл растворяют 10 мг кальция пантотената и 5 мг тиамина хлорида в 25 мл 25 % спирта, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и хранят при температуре 2 – 8 °С в течение 2 нед.

з) Приготовление раствора рибофлавина. В мерной колбе вместимостью 200 мл растворяют 10 мг рибофлавина в небольшом количестве воды с добавлением 1 мл ледяной уксусной кислоты, доводят объем водой очищенной до метки. Хранят в емкости из темного стекла при температуре 2 – 8 °С в течение 2 нед.

и) Приготовление раствора пара-аминобензойной кислоты (ПАБК), никотиновой кислоты и пиридоксина. Раствор готовят в 25 % спирте из расчета, чтобы в 1 мл содержалось 10 мкг ПАБК, 40 мкг никотиновой кислоты и 20 мкг пиридоксина гидрохлорида. Раствор хранят при температуре 2 – 8 °С в течение 2 нед.

к) Приготовление раствора солей А. Растворяют 5 г калия фосфата однозамещенного и 5 г калия фосфата двузамещенного в 50 мл воды очищенной.

л) Приготовление раствора солей Б. Растворяют 1 г магния сульфата, 0,05 г натрия хлорида, 0,01 г железа сульфата и 0,05 г марганца сульфата в 50 мл воды очищенной.

Растворы солей А и Б хранят при температуре 2 – 8 °С.

м) Приготовление раствора рибофлавина, тиамин и D-биотин. В мерной колбе вместимостью 100 мл растворяют 20 мг рибофлавина, 10 мг тиамин хлорида и 4 мг D-биотин в 50 мл раствора 0,02 М уксусной кислоты, объем доводят водой очищенной до метки. Хранят в емкости из темного стекла при температуре 2 – 8 °С.

н) Приготовление раствора L-цистин, D,L-триптофан и L-аспарагин. По 1 г L-цистин, D,L-триптофан и L-аспарагин растворяют в 200 мл воде очищенной с добавлением 20 мл 20 % раствора хлористоводородной кислоты^{п)} в мерной колбе вместимостью 500 мл, нагревают до 70 – 80 °С, периодически помешивая, до полного растворения аминокислот. После охлаждения объем раствора доводят водой до метки и хранят при температуре 2 – 8 °С.

о) Приготовление раствора аденин, гуанин, урацил и ксантин. По 0,1 г аденин сульфата, гуанин хлорида, урацил и ксантин растворяют в воде очищенной в мерной колбе вместимостью 100 мл с добавлением 10 мл 20 % раствора хлористоводородной кислоты^{п)} при длительном нагревании на кипящей водяной бане. После охлаждения доводят объём водой очищенной до метки и хранят при температуре 2—8 °С.

п) Приготовление раствора тиамин, рибофлавин и никотиновой кислоты (никотинамид). По 10 мг тиамин хлорида, рибофлавин и 30 мг никотиновой кислоты растворяют приблизительно в 150 мл воды очищенной с добавлением 1 мл уксусной кислоты ледяной в мерной колбе вместимостью 250 мл, объём доводят водой очищенной до метки. Хранят в емкости из тёмного стекла при температуре 2–8 °С в течение 2 нед.

р) Приготовление раствора кальция пантотенат. В мерной колбе вместимостью 100 мл растворяют 10 мг кальция пантотенат в 25 мл воды очищенной, добавляют 25 мл спирта, доводят водой до метки. Хранят при температуре 2 – 8 °С в течение 1 мес.

с) Приготовление раствора пиридоксин. В мерной колбе вместимостью 100 мл растворяют 10 мг пиридоксин гидрохлорида в 25 мл воды очищенной, добавляют 25 мл этилового спирта, доводят водой до метки. Хранят при температуре 2 – 8 °С в течение 1 мес.

т) Приготовление раствора ПАБК. В мерной колбе вместимостью 100 мл растворяют 2мг ПАБК в 25 мл воды очищенной, добавляют 25 мл этилового спирта, доводят водой до метки и перемешивают. Хранят при температуре 2 – 8 °С в течение 1 мес.

у) Приготовление раствора D-биотина. В мерной колбе вместимостью 500 мл растворяют 1 мг D-биотина при нагревании на кипящей водяной бане в 200 мл воды очищенной с добавлением 2 мл уксусной кислоты ледяной, доводят водой до метки. Хранят при температуре 2 – 8 °С.

ф) Приготовление раствора пиридоксина и ПАБК. По 10 мг пиридоксина и ПАБК растворяют в 25 мл воды очищенной в мерной колбе вместимостью 100 мл, прибавляют 25 мл этилового спирта, доводят объем раствора тем же растворителем до метки. Хранят при температуре 2 – 8 °С не более 1 мес.

х) Приготовление раствора натрия хлорида (0,9 %) изотонического. Растворяют 2,25 г натрия хлорида в 250 мл воды очищенной, разливают по 10–15 мл в пробирки, стерилизуют насыщенным паром под давлением в паровом стерилизаторе при температуре 120 – 121 °С в течение 15 мин.

ц) Приготовление 20 % раствора хлористоводородной кислоты. Разбавляют 425 мл хлористоводородной кислоты концентрированной ($d = 1,19$) водой очищенной до 1000 мл и перемешивают.