

PASZE	N O R M A B R A N Ź O W A	BN-86
	Pasze Oznaczenie d-pantotenianu wapnia w polfamiksach	9160-29
		Grupa katalogowa 1549

1. WSTĘP

Przedmiotem normy jest mikrobiologiczna metoda oznaczania d-pantotenianu wapnia w polfamiksach.

2. METODA BADANIA

2.1. Zasada metody polega na spostrzeżeniu, że mikroorganizm *Lactobacillus arabinosus* 17-5 wymaga dla swego wzrostu obecności w podłożu pewnych witamin, między innymi d-pantotenianu wapnia i dodając następnie określone jego ilości uzyskuje się wzrost komórek bakteryjnych, proporcjonalny do ilości dodanej witaminy. Wzrost ten porównuje się z analogicznym wzrostem uzyskanym dla wzorca.

2.2. Odczynniki i roztwory. Podczas analizy, jeśli nie zaznaczono inaczej, należy stosować wyłącznie odczynniki cz.d.a oraz wodę redestylowaną lub wodę o równoważnej czystości.

- a) Bacto-agar.
- b) Ekstrakt drożdżowy.
- c) Glukoza.
- d) Octan sodowy bezwodny, CH_3COONa .
- e) Kwas solny stężony, HCL.
- f) Sól fizjologiczna. Należy rozpuścić 9 g chlorku sodowego w 1000 cm^3 wody. Rozlać po 10 cm^3 do probówek i sterylizować 20 min przy ciśnieniu 0,1 MPa.
- g) Wodorotlenek sodowy, roztwór o $c(\text{NaOH}) = 1\text{ mol/dm}^3$.
- h) Bactō Pantothenate Assay Medium.
- i) Roztwór soli A. Należy rozpuścić 25 g bezwodnego jednozasadowego fosforanu potasowego i 25 g bezwodnego dwuzasadowego fosforanu potasowego w 200 cm^3 gorącej wody zakwaszonej kilkoma kroplami stężonego kwasu solnego, oziębic i uzupełnić wodą do 250 cm^3 .
- j) Roztwór soli B. Należy rozpuścić 10 g siedmiowodnego siarczanu magnezowego, 0,5 g chlorku sodowego, 0,5 g siedmiowodnego siarczanu żelazawego, 0,5 g czterowodnego siarczanu manganowego w 200 cm^3 gorącej wody, zakwaszonej kilkoma kroplami stężonego kwasu solnego, oziębic i uzupełnić wodą do 250 cm^3 .

k) Roztwór L-cystyny o stężeniu 4 mg/cm^3 . Należy rozpuścić 4 g L-cystyny w 600 cm^3 gorącej wody zakwaszonej kilkoma kroplami stężonego kwasu solnego, oziębic i uzupełnić wodą do 1000 cm^3 .

l) Roztwór dl-tryptofanu o stężeniu 2 mg/cm^3 . Należy rozpuścić 2 g dl-tryptofanu w 600 cm^3 gorącej wody zakwaszonej kilkoma kroplami stężonego kwasu solnego, oziębic i uzupełnić wodą do 1000 cm^3 .

m) Roztwór ryboflawiny o stężeniu $25\text{ }\mu\text{g/cm}^3$. Należy rozpuścić 25 mg ryboflawiny w 600 cm^3 gorącej wody z dodatkiem $2,6\text{ cm}^3$ lodowatego kwasu octowego, oziębic i uzupełnić wodą do 1000 cm^3 .

n) Roztwór biotyny o stężeniu $100\text{ }\mu\text{g/cm}^3$. Należy rozpuścić 25 mg biotyny w 100 cm^3 alkoholu etylowego 25% (V/V), uzupełnić tym alkoholem do 250 cm^3 . Po sporządzeniu pożywki należy używać roztworu biotyny o stężeniu $1\text{ }\mu\text{g/cm}^3$.

o) Roztwór tianiny o stężeniu $100\text{ }\mu\text{g/cm}^3$. Należy rozpuścić 25 mg tianiny w 100 cm^3 kwasu solnego o $c(\text{HCl}) = 0,1\text{ mol/l}$, uzupełnić tym kwasem do 250 cm^3 .

p) Roztwór adenino-guanino-uracylu o stężeniu 1 mg/cm^3 . Należy rozpuścić oddzielnie 100 mg adeniny, 100 mg guaniny i 100 mg uracylu w niewielkich ilościach gorącej wody zakwaszonej kilkoma kroplami stężonego kwasu solnego, następnie wszystkie roztwory należy mieszać, oziębic i uzupełnić wodą do 100 cm^3 .

r) Roztwór pirydoksyny o stężeniu $100\text{ }\mu\text{g/cm}^3$. Należy rozpuścić 25 mg pirydoksyny w 100 cm^3 alkoholu etylowego 25% (V/V), następnie uzupełnić tym alkoholem do 250 cm^3 .

s) Roztwór kwasu p-aminobenzoesowego o stężeniu $100\text{ }\mu\text{g/cm}^3$. Należy rozpuścić 25 mg kwasu p-aminobenzoesowego w 100 cm^3 alkoholu etylowego 25% (V/V), następnie uzupełnić tym alkoholem do 250 cm^3 .

t) Roztwór niacyny o stężeniu $100\text{ }\mu\text{g/cm}^3$. Należy rozpuścić 25 mg niacyny w 100 cm^3 alkoholu etylowego 25% (V/V), następnie uzupełnić tym alkoholem do 250 cm^3 .

u) Roztwór d-pantotenianu wapnia o stężeniu $100\text{ }\mu\text{g/cm}^3$. Należy rozpuścić 25 mg d-pantotenianu wapnia w 100 cm^3 alkoholu etylowego 25% (V/V), następnie uzupełnić tym alkoholem do 250 cm^3 .

Zgłoszona przez Centralne Laboratorium Przemysłu Paszowego
Ustanowiona przez Dyrektora Centralnego Laboratorium Przemysłu Paszowego dnia 21 kwietnia 1986 r.
jako norma obowiązująca od dnia 1 stycznia 1987 r.
(Dz. Norm. i Miar nr 10/1986 poz. 20)

w) kwaśny hydrolizat bezwitaminowy kazeiny.

y) błękit bromotymolowy.

2.3. Aparatura i przyrządy. Fotokolorymetr.

2.4. Pożywki

2.4.1. Pożywka do hodowli i przechowywania szczepu.

Należy rozpuścić 1 g glukozy, 1 g ekstraktu drożdżowego i 0,5 g octanu sodowego bezwodnego w niewielkiej ilości wody w kolbie miarowej pojemności 100 cm³, ustalić pH 6,8 za pomocą roztworu wodorotlenku sodowego wg 2.2 g) wobec błękitu bromotymolowego i uzupełnić wodą do 100 cm³. Zawartość kolby należy przenieść do zlewki, dodać 1,5 g Bacto-agaru i ogrzewać w łaźni wodnej do rozpuszczenia agaru. Następnie należy rozlać po 10 cm³ do probówek bakteriologicznych, zakryć korkami z waty i sterylizować 15 min przy ciśnieniu 0,1 MPa. Po wyjęciu z autoklawu należy pozostawić do zastygnięcia w pozycji pionowej.

Pożywka służy do przechowywania szczepu w postaci hodowli kłutej.

2.4.2. Pożywka testowa

a) Pożywka testowa z gotowej pożywki Bacto Pantothenata Assay Medium. Należy rozpuścić 7,3 g pożywki w 100 cm³ gorącej wody, doprowadzić do wrzenia i pozostawić wrzącą 2-3 min.

Po ochłodzeniu należy rozlać po 5 cm³ do każdej probówki z analizowanymi roztworami próbek wzorców. Z powodu utrzymującego się niewielkiego osadu należy mieszać pożywkę przed każdorazowym pobraniem pipetą.

b) Pożywka testowa z poszczególnych składników — przygotowana w laboratorium przy braku pożywki Bacto Pantothenate Assay Medium. Należy mieszać ze sobą następujące ilości składników i roztworów:

— kwaśny hydrolizat bezwitaminowy kazeiny wg 2.2 w) — 0,5 g

— roztwór dl-tryptofanu wg 2.2 l) — 2,5 cm³

— roztwór L-cystyny wg 2.2 k) — 2,5 cm³

— glukoza wg 2.2 c) — 1 g

— octan sodowy bezwodny wg 2.2 d) — 0,3 g

— roztwór adenino-guanino-uracylu wg 2.2 p) — 1 cm³

— roztwór tiaminy wg 2.2 o) — 1 cm³

— roztwór ryboflawiny wg 2.2 m) — 4 cm³

— roztwór pirydoksyny wg 2.2 r) — 2 cm³

— roztwór niacyny wg 2.2 t) — 1 cm³

— roztwór biotyny wg 2.2 n) — 0,25 cm³

— roztwór kwasu p-aminobenzoesowego wg 2.2 s) — 0,1 cm³

— roztwór soli A wg 2.2 i) — 0,5 cm³

— roztwór soli B wg 2.2 j) — 0,5 cm³

Podane składniki należy mieszać ze sobą, roztwór doprowadzić do pH 6,8 za pomocą roztworu wodorotlenku sodowego o $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/dm}^3$ wg 2.2 g) i uzupełnić wodą do 50 cm³.

2.4.3. Pożywka wzrostowa. Należy rozcieńczyć 50 cm³ pożywki testowej wg 2.4.2 w 50 cm³ wody, dodać 0,02 cm³ roztworu d-pantotenianu wapnia o stężeniu 100 µg/cm³ wg 2.2 n) i wymieszać. Rozlać po 10 cm³ do probówek bakteriologicznych, zakryć korkami z waty i sterylizować 15 min w temperaturze 129°C przy ciśnieniu 0,1 MPa.

2.5. Szczep testowy

2.5.1. Hodowla i przechowywanie szczepu. Szczep *Lactobacillus arabinosus* 17-5 należy przechowywać w postaci hodowli kłutej na stałym podłożu agarowym wg 2.4.1 w chłodni o temperaturze 4°C nie dłużej jak trzy tygodnie. Po upływie tego czasu szczep należy przeszczepić na pożywkę wzrostową wg 2.4.3 i hodować 18 h w temperaturze 37°C.

Następnie z hodowli płynnej należy przeszczepić na świeżą pożywkę agarową wg 2.4.1 i hodować 24 h w temperaturze 37°C. Wyhodowany szczep można przechowywać w chłodni dalsze trzy tygodnie.

2.5.2. Przygotowanie szczepu do oznaczeń. W przeddzień oznaczania szczep testowy należy przeszczepić z hodowli kłutej na pożywkę wzrostową wg 2.4.3 i hodować 15 ÷ 20 h w temperaturze 37°C. Po okresie inkubacji hodowlę należy odwirowywać przez 15 min przy 3000 obr/min. Po odwirowaniu pożywkę należy zdekantować, a osad po dekantacji zawiesić w 10 cm³ sterylnej soli fizjologicznej wg 2.2 f) i jeszcze raz odwirować w tych samych warunkach. Następnie płyn należy zdekantować, a osadzone komórki bakterii zawiesić ponownie w 10 cm³ sterylnej soli fizjologicznej wg 2.2 f) i dobrze wymieszać. Następnie kilka kropli uzyskanej zawiesiny należy przenieść do 10 cm³ sterylnej soli fizjologicznej wg 2.2 f) i dobrze wymieszać. Tak przygotowana zawiesina bakterii służy do szczepienia próbek badanych i wzorca.

2.6. Przygotowanie badanej próby do oznaczeń. Należy odważyć 5 ÷ 10 g badanego polfamixsu tak, aby próbka zawierała około 5 mg d-pantotenianu wapnia i przenieść do kolby pomiarowej pojemności 500 cm³. Dodać 300 cm³ wody i wytrząsać 15 min. Uzupełnić wodą do 500 cm³ i wymieszać. Pozostawić próbkę do odstania, a następnie należy wykonać rozcieńczenie tak, aby przygotowany roztwór zawierał około 0,1 µg d-pantotenianu wapnia w 1 cm³.

2.7. Przygotowanie roztworu wzorcowego. Roztwór d-pantotenianu wapnia przygotowany wg 2.2 u) należy rozcieńczyć wodą do stężenia 0,1 µg/cm³.

2.8. Wykonanie oznaczania. Do trzech szeregów probówek należy wlać następujące ilości roztworu wzorcowego o stężeniu 0,1 µg/cm³: 0,0 cm³, 0,25 cm³, 0,50 cm³, 0,75 cm³, 1,0 cm³, 1,5 cm³, 2,0 cm³, po czym uzupełnić wodą do łącznej objętości 5 cm³. Następnie do każdej probówki należy dodać po 5 cm³ pożywki testowej wg 2.4.2. Do czterech szeregów probówek należy wlać następujące ilości roztworu badanego o stężeniu około 0,1 µg/cm³: 0,5 cm³; 0,75 cm³, 1,0 cm³, 1,5 cm³, uzupełnić wodą do objętości 5 cm³ i do każdej probówki dodać po 5 cm³ pożywki testowej wg 2.4.2. W celu sprawdzenia jałowości próbki należy przygotować dwie próbki kontrolne w następujący sposób do każdej probówki wlać po 3 cm³ wody, po 2 cm³ roztworu wzorcowego o stężeniu 0,1 µg/cm³ wg 2.7 i po 5 cm³ pożywki testowej wg 2.4.2. Po rozlaniu roztworów probówki należy zakorkować i sterylizować 10 min w temperaturze 121°C przy ciśnieniu 0,1 MPa. Po sterylizacji próby należy szybko ochłodzić i szczepić 1 kroplą uprzednio przygotowanej zawiesiny szczepu wg 2.5.2

z wyjątkiem 1 próbki kontrolnej. Probówki należy umieścić w cieplarni w temperaturze 37°C na okres 24 h.

Po okresie inkubacji zawartość probówek należy wstrząsnąć w celu uzyskania jednorodnej zawiesiny wyrośniętego szczepu i zmierzyć przepuszczalność roztworów fotokolorymetrem przy długości fali 570 nm. Jako odnośnika w pomiarze należy użyć próbkę zawierającą wodę i pożywkę zaszczerpioną zawiesiną szczepu *Lactobacillus arabinosus* 17-5.

2.9. Obliczanie wyników oznaczania. Należy obliczyć wartości średnie przepuszczalności dla każdych trzech próbek wzorca o jednakowym stężeniu. Na podstawie uzyskanych wyników należy wykreślić krzywą wzorcową, ilustrującą zależność przepuszczalności roztworu od stężenia wzorca d-pantotenianu wapnia.

Obliczyć wartość średnią przepuszczalności dla każdych czterech próbek badanych. Zawartość d-pantotenianu wapnia w badanych próbkach należy odczytać

z wykresu krzywej wzorcowej na podstawie uzyskanych wartości średnich przepuszczalności. Obliczyć średnią arytmetyczną stężenia d-pantotenianu wapnia w próbce w $\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

Zawartość d-pantotenianu wapnia X należy obliczyć w g/kg wg wzoru

$$X = \frac{R \cdot a}{b \cdot 1000}$$

w którym:

R — rozcieńczenie próbki,

a — średnia arytmetyczna stężenia d-pantotenianu wapnia, $\mu\text{g}/\text{cm}^3$,

b — odważka badanego polfamiksu, g.

2.10. Wynik końcowy oznaczania. Za wynik należy przyjąć średnią arytmetyczną co najmniej dwóch równoległych oznaczeń. Dopuszczalna różnica między dwoma równoległymi oznaczeniami nie powinna przekroczyć 15% błędu względnego.

K O N I E C

INFORMACJE DODATKOWE

1. Instytucja opracowująca normę — Centralne Laboratorium Przemysłu Paszowego w Lublinie.

2. Autor projektu normy — mgr inż. Ewa Garstka, Kutnowskie Zakłady Farmaceutyczne Polfa — Kutno.