

PASZE	N O R M A   B R A N Ż O W A	BN-86
	Pasze	9160-30
	Oznaczanie kwasu nikotynowego i jego amidu w polfamiksach	Grupa katalogowa 1549

## 1. WSTĘP

Przedmiotem normy jest mikrobiologiczna metoda oznaczania zawartości kwasu nikotynowego i jego amidu w polfamiksach.

## 2. METODA BADANIA

**2.1. Zasada metody** polega na spostrzeżeniu, że mikroorganizm *Lactobacillus arabinosus* 17-5 wymaga dla swego wzrostu obecności pewnych witamin, między innymi kwasu nikotynowego lub jego amidu. Stosując podłoże pozbawione kwasu nikotynowego lub jego amidu, dodając następnie określone jego ilości, uzyskuje się wzrost komórek bakteryjnych proporcjonalny do ilości dodanej witaminy. Wzrost 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,  $\text{CH}_3\text{COONa}$ .
- e) Kwas solny stężony,  $\text{HCl}$ .
- f) Sól fizjologiczna. Należy rozpuścić 9 g chlorku sodowego w 1000  $\text{cm}^3$  wody. Rozlać po 10  $\text{cm}^3$  do probówek i sterylizować 20 min w temperaturze 121°C (ciśnienie 0,1 MPa).
- g) Wodorotlenek sodowy, roztwór o  $c(\text{NaOH}) = \text{mol/dm}^3$ .
- h) Bacto Niacin Assay Medium.
- i) Roztwór soli A. Należy rozpuścić 25 g bezwodnego jednozasadowego fosforanu potasowego i 25 g bezwodnego dwuzasadowego fosforanu potasowego w 200  $\text{cm}^3$  gorącej wody zakwaszonej kilkoma kroplami stężonego kwasu solnego, oziębic i uzupełnić wodą do 250  $\text{cm}^3$ .
- j) Roztwór soli B. Należy rozpuścić 10 g siedmiowodnego siarczanu magnezowego, 0,5 g chlorku sodowego, 0,5 g siedmiowodnego siarczanu żelazowego,

0,5 g czterowodnego siarczanu manganawego w 200  $\text{cm}^3$  gorącej wody zakwaszonej kilkoma kroplami stężonego kwasu solnego, oziębic i uzupełnić wodą do 250  $\text{cm}^3$ .

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

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

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

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

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

p) Roztwór adenino-guanino-uracylu o stężeniu 1  $\text{mg/cm}^3$ . 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 zmieszać, oziębic i uzupełnić wodą do 100  $\text{cm}^3$ .

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

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

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

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)

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

w) Kwaśny hydrolizat bezwitaminowy kazeiny.

y) Błękit bromotymolowy.

**2.3. Aparatura i przyrządy.** Fotokolorometr.

#### 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 pomiarowej pojemności  $100 \text{ cm}^3$ . Ustalić pH 6,8 za pomocą roztworu wodorotlenku sodowego wg 2.2 g) wobec błękitu bromotymolowego i uzupełnić wodą do  $100 \text{ cm}^3$ .

Zawartość kolby należy przenieść do zlewki, dodać 1,5 g Bactoagaru i ogrzewać w łaźni wodnej do rozpuszczenia agaru. Następnie rozlać po  $10 \text{ cm}^3$  do probówek bakteriologicznych, nakryć korkami z waty i sterylizować 15 min w temperaturze  $121^\circ\text{C}$  (ciśnienie 0,1 MPa). Po wyjęciu z autoklawu należy pozostawić do zastygnięcia w pozycji pionowej.

Pożywka służy do przechowywania szczepu w postaci hodowli klutej.

##### 2.4.2. Pożywka testowa

a) **Pożywka testowa z gotowej pożywki Bacto Niacin Assay Medium.** Należy rozpuścić 7,5 g pożywki w  $100 \text{ cm}^3$  gorącej wody, doprowadzić do wrzenia i pozostawić wrzącą w ciągu 2-3 min. Po ochłodzeniu należy rozlewać po  $5 \text{ cm}^3$  do każdej probówki z analizowanymi roztworami próbek i 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 Niacin Assay Medium. Należy zmieszać ze sobą następujące ilości składników i roztworów:

— kwaśny hydrolizat bezwitaminowy kazeiny — 0,5 g,

— roztwór dl-tryptofanu wg 2.2 l) —  $5 \text{ cm}^3$ ,

— roztwór L-cystyny wg 2.2 k) —  $5 \text{ cm}^3$ ,

— roztwór adenino-guanino-uracylu wg 2.2 p) —  $1 \text{ cm}^3$ ,

— roztwór tiaminy wg 2.2 o) —  $0,1 \text{ cm}^3$ ,

— roztwór ryboflawiny wg 2.2 m) —  $0,8 \text{ cm}^3$ ,

— roztwór pirydoksyny wg 2.2 r) —  $0,1 \text{ cm}^3$ ,

— roztwór d-pantotenianu wapnia wg 2.2 t) —  $0,1 \text{ cm}^3$ ,

— roztwór biotyny o stężeniu  $1 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  wg 2.2 n) —  $0,4 \text{ cm}^3$ ,

— roztwór kwasu p-aminobenzoesowego wg 2.2 s) —  $0,1 \text{ cm}^3$ ,

— roztwór soli A wg 2.2 i) —  $0,5 \text{ cm}^3$ ,

— roztwór soli B wg 2.2 j) —  $0,5 \text{ cm}^3$ ,

— glukoza — 1 g,

— octan sodowy bezwodny — 1 g.

Podane składniki należy zmieszać, roztwór doprowadzić do pH 8,8 za pomocą roztworu wodorotlenku sodowego o  $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol}/\text{dm}^3$  i uzupełnić wodą do  $50 \text{ cm}^3$ .

**2.4.3. Pożywka wzrostowa.** Należy rozpuścić 1 g glukozy, 1 g ekstraktu drożdżowego i 0,5 g bezwodnego octanu sodowego w  $75 \text{ cm}^3$  wody, ustalić pH 6,8 i uzupełnić wodą do  $100 \text{ cm}^3$ .

Pożywkę należy rozlać po  $10 \text{ cm}^3$  do probówek, zakryć korkami z waty i sterylizować 15 min w temperaturze  $121^\circ\text{C}$  (ciśnienie 0,1 MPa).

#### 2.5. Szczep testowy

**2.5.1. Hodowla i przechowywanie szczepu.** Szczep *Lactobacillus arabinosus* 17-5 należy przechowywać w postaci hodowli klutej na stałym podłożu agarowym wg 2.4.1 w chłodni w temperaturze  $4^\circ\text{C}$  nie dłużej jednak jak 3 tygodnie. Po upływie tego czasu szczep należy zregenerować przeszczepiając na pożywkę wzrostową wg 2.4.3 i hodować 18 h w temperaturze  $37^\circ\text{C}$ . Następnie należy przeszczepić na świeżą pożywkę agarową wg 2.4.1 i hodować 24 h w temperaturze  $37^\circ\text{C}$ .

Szczep można przechowywać w chłodni dalsze 3 tygodnie.

**2.5.2. Przygotowanie szczepu do oznaczeń.** W przeddzień oznaczania szczep testowy należy przeszczepić z hodowli klutej na pożywkę wzrostową wg 2.4.3 i hodować  $18 \div 20 \text{ h}$  w temperaturze  $37^\circ\text{C}$ .

Po okresie inkubacji hodowlę należy odwirowywać przez 15 min przy 3000 obr/min. Po wirowaniu pożywkę należy zdekantować, a osad zawiesić w  $10 \text{ cm}^3$  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  $10 \text{ cm}^3$  sterylnej soli fizjologicznej wg 2.2 f).

Po dokładnym wymieszaniu 2 krople uzyskanej zawiesiny należy przenieść do  $10 \text{ cm}^3$  sterylnej soli fizjologicznej wg 2.2 f) i dobrze wymieszać.

Tak rozcieńczona zawiesina bakterii służy do szczepienia próbek badanych i wzorca.

**2.6. Przygotowanie do analiz próby danego polfamiksu.** Należy odważyć  $5 \div 10 \text{ g}$  badanego polfamiksu tak, aby próbka zawierała około 5 mg kwasu nikotynowego lub jego amidu i przenieść do kolby pomiarowej pojemności  $500 \text{ cm}^3$ . Dodać  $300 \text{ cm}^3$  wody i wytrząsać 15 min.

Następnie należy uzupełnić wodą do  $500 \text{ cm}^3$ , wymieszać i pozostawić próbkę do odstania.

Następnie rozcieńczyć wodą tak, aby przygotowany roztwór zawierał w  $1 \text{ cm}^3$  około  $0,1 \mu\text{g}$  kwasu nikotynowego lub jego amidu.

**2.7. Przygotowanie roztworu wzorcowego.** Roztwór niacyny, przygotowany wg 2.2u), należy rozcieńczyć wodą do stężenia  $0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ .

**2.8. Wykonanie oznaczania.** Do trzech szeregów probówek należy wlać następujące ilości roztworu wzorcowego o stężeniu  $0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ :  $0,0 \text{ cm}^3$ ,  $0,5 \text{ cm}^3$ ,  $1,0 \text{ cm}^3$ ,  $1,5 \text{ cm}^3$ ,  $2,0 \text{ cm}^3$ ,  $2,5 \text{ cm}^3$ ,  $3,0 \text{ cm}^3$ ,  $4,0 \text{ cm}^3$ , po czym uzupełnić wodą do objętości  $5 \text{ cm}^3$ . Następnie do każdej probówki należy dodać po  $5 \text{ cm}^3$  pożywki testowej wg 2.4.2.

Do czterech szeregów probówek należy wlać następujące ilości roztworu badanego o stężeniu około  $0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ,  $0,5 \text{ cm}^3$ ,  $1,0 \text{ cm}^3$ ,  $2,0 \text{ cm}^3$ ,  $3,0 \text{ cm}^3$ , uzupeł-

nić wodą do objętości 5 cm<sup>3</sup> i do każdej próbki dodać po 5 cm<sup>3</sup> pożywki testowej wg 2.4.2.

W celu sprawdzenia jałowości próbek, należy przygotować dwie próbki kontrolne w następujący sposób: do każdej próbki wlać po 1 cm<sup>3</sup> wody, 4 cm<sup>3</sup> roztworu wzorcowego kwasu nikotynowego o stężeniu 0,1 µg/cm<sup>3</sup> i 5 cm<sup>3</sup> pożywki testowej wg 2.4.2.

Po rozlaniu roztworów próbki należy zakorkować i sterylizować 10 min w temperaturze 121°C (ciśnienie 0,1 MPa).

Po sterylizacji próbki należy szybko schłodzić i szczepić 1 kroplę, uprzednio przygotowanej wg 2.5.2, zawiesiny szczepu *Lactobacillus arabinosus* 17-5, z wyjątkiem jednej próbki kontrolnej.

Próbki należy umieścić w cieplarni o temperaturze 37°C na 48 h. Po upływie czasu inkubacji zawartość próbek należy wstrząsnąć w celu uzyskania jednorodnej zawiesiny wyrosniętego szczepu i zmierzyć przepuszczalność roztworów fotokolorymetrycznie przy długości fali 570 nm.

Jako odnośnika w pomiarze należy użyć próbkę zawierającą wodę i pożywkę zaszczipioną zawiesiną szczepu *Lactobacillus arabinosus* 17-5.

**2.9. Obliczanie wyników oznaczania.** Należy obliczyć wartości średnie przepuszczalności dla każdego trzech próbek wzorca o jednakowym stężeniu. Na podstawie

uzyskanych wyników wykreślić krzywą wzorcową ilustrującą zależność przepuszczalności roztworu od stężenia wzorca kwasu nikotynowego lub jego amidu.

Należy obliczyć wartość średnią przepuszczalności dla każdego czterech prób badanych.

Zawartość kwasu nikotynowego lub jego amidu w badanych próbkach należy odczytać z wykresu krzywej wzorcowej w oparciu o uzyskane wartości średnie przepuszczalności. Obliczyć średnią arytmetyczną stężenia kwasu nikotynowego lub jego amidu w próbce w µg/cm<sup>3</sup>.

Zawartość kwasu nikotynowego lub jego amidu w badanym polfamiksie  $X$  obliczyć w g/kg wg wzoru

$$X = \frac{R \cdot a}{b \cdot 100}$$

w którym:

$R$  — rozcieńczenie próbki,

$a$  — średnia arytmetyczna stężenia kwasu nikotynowego lub jego amidu w badanej próbce, µg/cm<sup>3</sup>,

$b$  — 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 oznaczaniami nie powinna przekraczać 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.