

PASZE	N O R M A B R A N Ź O W A	BN-86
	Pasze Oznaczenie flawomycyny w polfamiksach	9160-35
		Grupa katalogowa 1549

1. WSTĘP

1.1. Przedmiot normy. Przedmiotem normy jest mikrobiologiczna metoda oznaczania flawomycyny w polfamiksach.

1.2. Zakres stosowania metody. Normę należy stosować w laboratoriach zajmujących się kontrolą i oceną jakości pasz.

2. METODA BADANIA

2.1. Zasada metody polega na pomiarze kolistych stref zahamowania wzrostu szczepu testowego *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P i obliczaniu na tej podstawie zawartości flawomycyny.

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

- Wzorzec Flawomycin Reference Standard.
- Głukoza.
- Wyciąg mięsny.
- Ekstrakt drożdżowy.
- Pepton.
- Trypton.
- Bacto-agar.
- Silikon Se-2 lub Tween 80.
- Wodorotlenek sodowy, roztwór o $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/dm}^3$.
- Roztwór metanolowy do ekstrakcji. Metanol i wodę destylowaną należy mieszać w stosunku objętościowym 1:1. Ustalić pH na 8,2.
- Sól fizjologiczna. Należy rozpuścić 9 g chlorku sodowego w wodzie destylowanej i uzupełnić wodą destylowaną do 1000 cm^3 , sterylizować 20 min w temperaturze 121°C (ciśnienie 0,1 MPa).

2.3. Aparatura i przyrządy

- Pehametr.
- Korkobory o średnicy 8 mm.
- Płytki Petriego o średnicy 12 cm.

2.4. Pożywki, szczep testowy

2.4.1. Pożywka do hodowli szczepu i wykonania oznaczeń

- Wyciąg mięsny — 1,5 g,

- Ekstrakt drożdżowy — 3,0 g,

- Pepton — 6,0 g,
- Trypton — 4,0 g,
- Głukoza — 1,0 g,
- Bacto-agar — 15 g,
- Woda destylowana do 1000 cm^3 .

Składniki należy rozpuścić podgrzewając w autoklawie lub we wrzącej łaźni wodnej, ustalić pH 6,5, rozlać po 10 cm^3 do probówek oraz po 250 cm^3 do kolb, dodając do każdej kolby po 0,5 g silikonu SE-2 lub Tween 80 — $0,8 \text{ cm}^3$. Sterylizować 20 min w temperaturze 121°C (ciśnienie 0,1 MPa).

Po sterylizacji probówki należy ułożyć skośnie do wystygnięcia.

Podłoże w kolbach stanowi pożywkę do wykonania oznaczeń.

2.4.2. Szczep testowy *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P. Na skos agarowy, przygotowany wg 2.4.1, należy posiać drobnoustrój testowy i inkubować 24 h w temperaturze 37°C . Hodowlę należy przechowywać w chłodni w temperaturze 4°C , przeszczepiając raz w miesiącu na świeży skos agarowy.

2.4.3. Przygotowanie szczepu testowego do oznaczeń. W przeddzień oznaczania należy przeszczepić szczep testowy na skos agarowy wg 2.4.1 i inkubować 18 ÷ 24 h w temperaturze 37°C . Wyrośnięty szczep należy zmyć 5 cm^3 roztworu soli fizjologicznej wg 2.2 k) i tak rozcieńczyć, aby uzyskać 20% transmisji przy 570 nm w stosunku do soli fizjologicznej.

2.5. Przygotowanie roztworów wzorcowych. Należy odważyć taką ilość substancji Flawomycin Reference Standard, aby po rozpuszczeniu w roztworze metanolowym wg 2.2 j) w kolbie pomiarowej pojemności 50 cm^3 , otrzymać roztwór o stężeniu $1000 \mu\text{g/cm}^3$. Roztwór można przechowywać w chłodni, w temperaturze 4°C do 3 miesięcy. Raz w tygodniu należy przygotować roztwór o stężeniu $100 \mu\text{g/cm}^3$ w roztworze metanolowym wg 2.2 j), a bezpośrednio przed oznaczaniem wodne roztwory o stężeniach: $2 \mu\text{g/cm}^3$, $1 \mu\text{g/cm}^3$, $0,5 \mu\text{g/cm}^3$ i $0,25 \mu\text{g/cm}^3$. Stężenia należy zmniejszać rozcieńczając w stosunku 1:1.

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)

2.6. Przygotowanie roztworu badanej próbki. Do kolby pomiarowej pojemności 200 cm³ należy przenieść odważkę 5 ÷ 10 g badanego polfamiksu tak, aby odważka zawierała 2 mg flawomycyny. Dodać 150 cm³ roztworu metanolowego do ekstrakcji wg 2.2 j) i wytrząsać. Po 15 min należy doprowadzić roztwór do pH 8,0 używając wodorotlenku sodowego wg 2.2.1, a następnie należy uzupełnić do 200 cm³ roztworem metanolowym wg 2.2 j).

Po dokładnym wymieszaniu, całość roztworu należy przenieść do kolby z dnem okrągłym ze szlifem, podłączyć do chłodnicy zwrotnej i ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej, utrzymując przez 15 min w stanie wrzenia. Po ochłodzeniu kolbę należy odłączyć od chłodnicy, a mieszaninę odwirowywać przy 3000 obr/min przez 10 min.

Płyn z nad osadu należy zlać ostrożnie i rozcieńczyć w jałowej wodzie destylowanej do stężeń: 2 µg/cm³, 1 µg/cm³, 0,5 µg/cm³ i 0,25 µg/cm³. Stężenia należy zmniejszać rozcieńczając w stosunku 1:1.

2.7. Wykonanie oznaczania. Dla każdej próby badanej należy przygotować 4 sterylne płytki Petriego. Rozpuścić uprzednio przygotowaną pożywkę wg 2.4.1 i po ostudzeniu do temperatury 50°C należy zaszczerpić przygotowaną wg 2.4.3 hodowlę szczepu testowego, dodając 1 cm³ przygotowanej zawiesiny (wg 2.4.3) na 100 cm³ pożywki.

Sterylnie płytki Petriego należy ustawić na wypoziomowanym stole i do każdej wlać po 50 cm³ zaszczerpionej pożywki. Po zakrzepnięciu agaru płytki zakryć i po 30 min na każdej płytce, należy wyciąć korkoborem osiem studzienek.

Poszczególne studzienki należy napępniać, począwszy od naznaczonego miejsca, zgodnie z ruchem zegara, roztworami wzorca i próby badanej, wlewając w każdą studzienkę 0,15 cm³ roztworów:

- S_1 — roztwór wzorcowy o stężeniu 0,25 µg/cm³,
- S_2 — roztwór wzorcowy o stężeniu 0,5 µg/cm³,
- S_3 — roztwór wzorcowy o stężeniu 1,0 µg/cm³,
- S_4 — roztwór wzorcowy o stężeniu 2,0 µg/cm³,
- B_1 — roztwór badanej próby o stężeniu 0,25 µg/cm³,
- B_2 — roztwór badanej próby o stężeniu 0,5 µg/cm³,
- B_3 — roztwór badanej próby o stężeniu 1,0 µg/cm³,
- B_4 — roztwór badanej próby o stężeniu 2,0 µg/cm³.

W celu uzyskania dobrej dyfuzji, płytki należy pozostawić na 2 h w temperaturze pokojowej, a następnie inkubować przez 18 h w temperaturze 37°C.

2.8. Obliczanie wyników oznaczania. Po okresie inkubacji należy zmierzyć średnice stref zahamowania wzrostu szczepu testowego. Wyniki pomiarów zapisać w tabelicy i obliczyć średnie arytmetyczne dla odpowiadających sobie stężeń z czterech płytek, zarówno dla roztworu wzorcowego jak i dla badanego. Uzyskane średnie wyniki są podstawową do obliczenia uśrednionej wartości wielkości stref zahamowania wzrostu dla najniższego S_L i najwyższego S_H stężenia wzorca wg wzorów

$$S_L = \frac{7S_1 + 4S_2 + S_3 - 2S_4}{10} \quad (1)$$

$$S_H = \frac{7S_4 + 4S_3 + S_2 - 2S_1}{10} \quad (2)$$

Uśrednione wartości wielkości stref zahamowania wzrostu dla najniższego B_L i najwyższego B_H stężenia próby należy obliczyć, wykorzystując te same wzory, wstawiając zamiast symboli S symbole B .

Obliczyć różnice ($S_H - S_L$) i ($B_H - B_L$). Jeżeli obliczone różnice nie są większe niż 10% ich średniej wartości, należy uznać, że został spełniony warunek równoległości obrazujący zależność między stężeniem flawomycyny a wielkością stref zahamowania wzrostu bakterii odpowiednio dla roztworów wzorcowych jak i badanych.

Mając obliczone średnie wartości stref zahamowania wzrostu bakterii dla poszczególnych stężeń wzorca i próby badanej należy obliczyć logarytm N wg wzoru

$$\lg N = \frac{B_1 + B_2 + B_3 + B_4 - S_1 - S_2 - S_3 - S_4}{B_4 + B_3 + S_4 + S_3 - B_1 - B_2 - S_1 - S_2} \cdot 0,6021 \quad (3)$$

Zawartość flawomycyny X w g/kg, w badanej próbce, należy obliczyć wg wzoru

$$X = \frac{N \cdot M \cdot R}{1000 \cdot b} \quad (4)$$

w którym:

- N — współczynnik proporcjonalności odczytany z logarytmu N ,
- M — założona zawartość flawomycyny w roztworze badanym = 2 µg/cm³,
- R — rozcieńczenie próbki,
- b — naważka badanego polfamiksu, g.

2.9. 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 Ewa Garstka — Kutnowskie Zakłady Farmaceutyczne POLFA — Kutno.

3. Informacja o płytkach. Płytki po zmierzeniu stref zahamowania wzrostu należy przed umyciem poddać sterylizacji przy ciśnieniu 0,1 MPa.