

|       |   |                       |
|-------|---|-----------------------|
| PASZE | N O R M A B R A N Ż O W A   | BN-86                 |
|       | <b>Pasze</b>  | 9160-36               |
|       | <b>Oznaczanie cynk-bacytracyny<br/>w premiksach i mieszankach paszowych</b> | Grupa katalogowa 1549 |

## 1. WSTĘP

Przedmiotem normy jest metoda płytkowo-studzienkowa oznaczania cynk-bacytracyny w premiksach i mieszankach paszowych.

## 2. METODA BADANIA

**2.1. Zasada metody** polega na pomiarze średnicy stref zahamowania wzrostu szczepu testowego *Micrococcus flavus* ATCC 10240 i obliczeniu na tej podstawie wartości cynk-bacytracyny.

### 2.2. Aparatura i przyrządy

- a) Autoklaw.
- b) Cieplarka.
- c) Aparat Kocha.
- d) Wstrząsarka.
- e) Pehametr.
- f) Wirówka.
- g) Aparat do pomiaru stref zahamowania lub suwmiarka.
- h) Korkobor o średnicy 8 mm.
- i) Płytki Petriego o średnicy 12 cm.
- j) Butelki Roux.

**2.3. Odczynniki, roztwory i materiały.** Podczas analizy, jeżeli nie zaznaczono inaczej, należy stosować odczynniki cz.d.a. oraz wodę destylowaną lub o równoważnej czystości. W przypadku stosowania roztworów sterylnych, sterylizację należy prowadzić w autoklawie pod ciśnieniem 0,1 MPa przez 20 min. Szkło należy sterylizować w suszarce laboratoryjnej w temperaturze 160°C przez 1,5 h.

- a) Substancja wzorcowa cynk-bacytracyna o znanej aktywności.
- b) Chlorek sodowy 0,9% sterylny.
- c) Alkohol metylowy, cz.
- d) Kwas solny 36%.
- e) Kwas solny o  $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$ : do kolby pomiarowej pojemności 100 ml wprowadzić 8,3 ml HCl 36% i uzupełnić wodą destylowaną do kreski.
- f) Kwas solny o  $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$ : do kolby pomiarowej pojemności 100 ml wprowadzić 0,83 ml

HCl 36% i uzupełnić do kreski wodą destylowaną.  
g) Wodorotlenek sodowy o  $c(\text{NaOH}) = 1,0 \text{ mol/l}$ : do kolby pomiarowej pojemności 100 ml wsypać 4,0 g NaOH i uzupełnić wodą destylowaną do kreski.

h) Siarczan amonowy 20%: do kolby pomiarowej pojemności 100 ml wsypać 20,0 g siarczanu amonowego i uzupełnić do kreski wodą destylowaną.

i) Bufor fosforanowy o pH 6,5: odważyć 22,15 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  i 27,85 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , przenieść do kolby pomiarowej pojemności 1000 ml i uzupełnić do kreski wodą destylowaną.

j) Mieszanina ekstrakcyjna: do kolby pomiarowej pojemności 1000 ml wprowadzić 800 ml alkoholu metylowego 25 ml 36% HCl i 16 ml 20% siarczanu amonowego, uzupełnić wodą destylowaną do kreski.

### 2.4. Pożywki, szczep testowy

#### 2.4.1. Pożywka do hodowli, przechowywanie szczepu testowego i wykonanie oznaczenia

- a) Pepton 6,0 g.
- b) Trypton (wyciąg trzustkowy kazeiny) 4,0 g.
- c) Ekstrakt drożdżowy 3,0 g.
- d) Ekstrakt mięsny 1,5 g.
- e) Glukoza 1,0 g.
- f) Agar 20,0 g.
- g) Woda destylowana do 1000 ml.

Składniki pożywki należy rozpuścić w wodzie przez podgrzanie. Rozlać po około 300 ml do butelek Roux i po około 7 ml do probówek, sterylizować. Po sterylizacji pH powinno wynosić 6,5. Butelki Roux po sterylizacji ustawić w pozycji poziomej, a probówki w pozycji ukośnej i pozostawić do zakrzepnięcia podłoża.

**2.4.2. Hodowla i przechowywanie szczepu.** Na skos agarowy wg 2.4.1 posiać drobnoustrój testowy i inkubować 48 h w temperaturze 37°C. Hodowlę należy przechowywać w lodówce w temperaturze 4°C i przed upływem trzech tygodni przesiać na świeży skos agarowy.

**2.4.3. Przygotowanie zawiesiny drobnoustroju testowego.** 2 skosy agarowe ze świeżo wyhodowanym szczepem *Micrococcus flavus* zmyć 5 ml roztworu chlorku sodowego wg 2.3b) przy użyciu jałowych perełek szklanych. Uzyskaną zawiesinę przenieść na podłoże w bu-

Zgłoszona przez Centralne Laboratorium Przemysłu Paszowego  
Ustanowiona przez Dyrektora Centralnego Laboratorium Przemysłu Paszowego dnia 10 września 1986 r.  
jako norma obowiązująca od dnia 1 kwietnia 1987 r.  
(Dz. Norm. i Miar nr 15/1986, poz. 30)

telce Roux wg 2.4.1 i równomiernie rozprowadzić po całej powierzchni podłoża. Inkubować 24 h w temperaturze 37°C. Po okresie inkubacji hodowlę zmyć 25 ml chlorku sodowego wg 2.3b) przy użyciu jałowych perełek szklanych i przenieść do jałowej kolby stożkowej. Zawiesina bakteryjna może być przechowywana w lodówce w temperaturze 4°C przez 12 dni.

**2.4.4. Określenie optymalnej gęstości zawiesiny używanej w badaniach.** Pożywkę wg 2.4.1 rozpuścić na łaźni wodnej i rozlać po 30 ml do 6 kolb stożkowych pojemności 100 ml. Do każdej kolby z pożywką ostudzoną do temperatury około 50°C wprowadzić następujące ilości 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 ml zawiesiny *Micrococcus flavus* przygotowanej wg 2.4.3. Zawartość kolb dobrze wymieszać i po 18 ml wlać na przygotowane uprzednio płytki Petriego. Po zastygnięciu podłoża sterylnym korkoborem na każdej płytce wyciąć 4 studzienki. Studzienki napełnić 0,15 ml wzorca cynk-bacytracyny o stężeniu 1,0; 0,5; 0,25; 0,125 j · m/ml. Płytki pozostawić przez 2 h na stole laboratoryjnym, a następnie przenieść do cieplarki i inkubować przez 24 h w temperaturze 37°C. Po inkubacji ocenić wielkość i ostrość uzyskanych stref zahamowania wzrostu i wybrać optymalną ilość zawiesiny, która będzie stosowana w badaniach.

Optymalna jest ta ilość zawiesiny, przy której uzyskuje się wyraźne strefy zahamowania wzrostu bakterii o następujących średnicach:

- $S_1$  — około 15 mm,
- $S_2$  — około 18 mm,
- $S_3$  — około 21 mm,
- $S_4$  — około 24 mm.

## 2.5. Przygotowanie roztworów standardowych

**2.5.1. Roztwór wzorcowy podstawowy.** Odważyć z dokładnością do 0,001 g taką ilość substancji wzorcowej o znanej aktywności, aby po rozpuszczeniu w 50 ml otrzymać stężenie antybiotyku 100 j · m/ml. Do kolby pomiarowej, w której umieszczono wzorec cynk-bacytracyny należy wprowadzić 5 ml kwasu solnego o  $c(\text{HCl})$  0,1 mol/l wg 2.3d) i po 15 min dodać 30 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , a następnie buforu fosforanowego wg 2.3i) w takiej ilości, aby pH roztworu wynosiło 4,5. Uzpełnić wodą destylowaną do kreski.

Trwałość roztworu przechowywanego w temperaturze 4°C wynosi 7 dni.

**2.5.2. Roztwory wzorcowe robocze.** Z roztworu podstawowego wg 2.5.1 wykonać roztwory standardowe robocze o stężeniu 1,0; 0,5; 0,25; 0,125 j · m/ml w buforze fosforanowym wg 2.3i). Stężenie należy zmniejszyć rozcieńczając w stosunku 1:1.

Roztwory wzorcowe robocze należy przygotować w dniu oznaczenia. Będą one oznakowane w dalszym ciągu badań jako  $S_4$ ,  $S_3$ ,  $S_2$ ,  $S_1$ .

## 2.6. Wykonanie oznaczania

### 2.6.1. Przygotowanie ekstraktów próbek do analizy

**2.6.1.1. Przygotowanie ekstraktów z premiksów.** Średnią próbkę laboratoryjną przygotować wg PN-75/R-64769. Odważyć 5 g badanego premiksu z dokładnością do 0,01 g do kolby pomiarowej pojemności

100 ml, dodać 10 ml kwasu solnego o  $c(\text{HCl}) = 1,0$  mol/l wg 2.3e) i 50 ml buforu fosforanowego wg 2.3i) i wstrząsać na wstrząsarce laboratoryjnej przez 20 min. Następnie uzupełnić buforem fosforanowym wg 2.3i) do kreski, dokładnie wymieszać i przesączyć. Z otrzymanego przesącza należy przygotować roztwory o stężeniu 1,0; 0,5; 0,25; 0,125 j · m/ml, rozcieńczając próbkę buforem fosforanowym wg 2.3i).

Stężenie należy zmniejszać rozcieńczając w stosunku 1:1. Będą one oznakowane w dalszym ciągu badań jako  $U_4$ ,  $U_3$ ,  $U_2$ ,  $U_1$ .

**2.6.1.2. Przygotowanie ekstraktów z mieszanek paszowych.** Średnią próbkę laboratoryjną przygotować wg PN-75/R-64769. Odważyć z dokładnością do 0,01 g, 20 g próbki do kolby stożkowej pojemności 250 ml. Dodać 50 ml mieszaniny ekstrakcyjnej wg 2.3j). Wstrząsać na wstrząsarce 10 min, następnie dodać 50 ml buforu fosforanowego wg 2.3i) i wstrząsać dalsze 15 min. Do zamkniętej probówki wirówkowej przenieść około 50 ml ekstraktu i wirować 5 min przy 3000 obr/min. Z probówki wirówkowej pobrać 20 ml klarownego ekstraktu do kolby z dnem okrągłym. Doprowadzić pH badanego ekstraktu do 6,5 za pomocą wodorotlenku sodowego o  $c(\text{NaOH}) = 1$  mol/l wg 2.3g). Ekstrakt zagęścić na odparowywaczu pod próżnią przy temperaturze łaźni wodnej 35°C do objętości około 4 ml. Otrzymany zagęszczony ekstrakt rozcieńczyć buforem fosforanowym wg 2.3i) do zawartości 1,0 j · m/ml. Z tego roztworu za pomocą rozcieńczeń buforem fosforanowym wg 2.3i) w stosunku 1:1, przygotować roztwory o stężeniu 0,5; 0,25; 0,125 j · m/ml. Będą one oznakowane w dalszych badaniach jak roztwory  $U_4$ ,  $U_3$ ,  $U_2$ ,  $U_1$ .

**2.6.2. Przygotowanie płytek do oznaczeń i przeprowadzenie badań.** Dla każdej próby należy przygotować 4 płytki. Rozpuścić uprzednio przygotowaną wg 2.4.1 pożywkę agarową przez podgrzanie i ostudzić do temperatury około 50°C, aby wprowadzić zawiesinę szczepu bakteryjnego *Micrococcus flavus* otrzymanej wg 2.4.3 w ilości określonej jako ilość optymalna wg 2.4.4. Ustawić płytki Petriego o równym dnie na wypoziomowanym stole i rozlać po 18 ml zaszczepionej pożywki. Po zastygnięciu pożywki wstawić płytki do lodówki o temperaturze około 4°C na 1 h. Na każdej płytce po wyjęciu z lodówki należy wyciąć korkoborem osiem studzienek. Studzienki powinny się znajdować w jednakowej odległości jedna od drugiej z jednoczesnym zachowaniem odstępów około 1,5 cm od brzegu płytki. Poszczególne studzienki napełnić w ilości 0,15 ml wzorcem cynk-bacytracyny o odpowiednim stężeniu  $S_4$ ,  $S_3$ ,  $S_2$ ,  $S_1$  wg 2.5.2 oraz roztworem badanej próbki w ilości 0,15 ml ( $U_4$ ,  $U_3$ ,  $U_2$ ,  $U_1$ ), zaznaczając na obwodzie dermatografem pierwsze stężenie, a następnie stężenie roztworu wprowadzić zgodnie z kierunkiem ruchu wskazówek zegara. Płytki pozostawić przez 2 h na stole laboratoryjnym w temperaturze pokojowej w celu uzyskania dobrej dyfuzji roztworów, następnie należy wstawić je do cieplarki i inkubować 24 h w temperaturze 37°C.

**2.7. Obliczanie wyników.** Po okresie inkubacji należy zmierzyć średnice stref zahamowania wzrostu szczepu testowego przyrządem do pomiaru stref z dokładnością do 0,1 mm. Wyniki pomiarów zapisać w tablicy i wyliczyć średnie arytmetyczne wyników pomiarów dla odpowiadających sobie stężeń i stref z 4 płytek, zarówno dla roztworu wzorcowego jak i dla badanego. Uzyskane średnie wyniki są podstawą do wyliczenia uśrednionej wartości wielkości stref zahamowania wzrostu dla najniższego  $SL$  i najwyższego  $SH$  stężenia standardu oraz próbki  $U$  wg wzorów:

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

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

w którym  $S_1, S_2, S_3, S_4$  — średnie arytmetyczne stref zahamowania wzrostu dla kolejnych rozcieńczeń wzorca cynk-bacytracyny przy stężeniach wg 2.5.2.

W celu obliczenia wielkości stref zahamowania wzrostu bakterii dla próby należy wykorzystać te same wzory wstawiając zamiast symboli  $S$ , symbol  $U$ . Wyliczyć różnice  $SH-SL$  i  $UH-UL$ . Jeżeli wyliczone różnice nie są większe niż 10% ich średniej wartości, należy uznać, że został spełniony warunek równoległości obrazujący zależność pomiędzy stężeniem cynk-bacytracyny a wielkością stref zahamowania wzrostu bakterii, odpowiednio dla roztworów standardowych jak i badanych.

Mając zebrane w tablicach średnie wartości stref zahamowania wzrostu bakterii dla poszczególnych stężeń standardu i próby, należy obliczyć logarytm  $N$  wg wzoru

$$\lg N = \frac{(U_1 + U_2 + U_3 + U_4 - S_1 - S_2 - S_3 - S_4) \cdot 0,6021}{U_4 + U_3 + S_4 + S_3 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2} \quad (3)$$

Zawartość cynk-bacytracyny ( $X$ ) obliczyć w g/kg lub mg/kg w badanej próbce wg wzoru

$$x = \frac{N \cdot M \cdot R}{42 \cdot b} \quad (4)$$

w którym:

$N$  — współczynnik proporcjonalności odczytany z logarytmu  $N$ ,

$M$  — założona moc dla roztworu badanego, j · m/ml,

$R$  — rozcieńczenie próbki,

$b$  — odważka, g,

42 — teoretyczna zawartość jednostek cynk-bacytracyny w 1 mg substancji wzorcowej.

**2.8. Wynik końcowy oznaczania.** Za wynik należy przyjąć średnią arytmetyczną wyników dwóch równoległych oznaczeń. Dopuszczalna różnica między dwoma równoległymi oznaczeniami nie powinna przekraczać 15% błędu względnego dla premiksów i 10% błędu względnego w przypadku mieszanek paszowych. Wynik należy podać w zaokrągleniu do jednego miejsca po przecinku.

K O N I E C

#### INFORMACJE DODATKOWE

1. Instytucja opracowująca normę — Centralne Laboratorium Przemysłu Paszowego, Lublin z siedzibą w Snopkowie.

#### 2. Normy związane

PN-75/R-64769 Pasze. Pobieranie próbek

3. Autorzy projektu normy — mgr Maria Jakubowska — Centralne Laboratorium Przemysłu Paszowego, Lublin; mgr inż. Ewa Garstka — Kutnowskie Zakłady Farmaceutyczne POLFA, Kutno.