МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 31772— 2012

ПРОПОЛИС

Антимикробная активность

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2014

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0—92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, применения, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Обществом с ограниченной ответственностью «Центр исследований и сертификации «Федерал» и Государственным научным учреждением Научно-исследовательским институтом пчеловодства Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ НИИП Россельхозакадемии)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии (Росстандарт)

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 1 октября 2012 г. № 51)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29 ноября 2012 г. № 1661-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 31772—2012 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2013 г.

5 Настоящий стандарт подготовлен на основе применения ГОСТ Р 53124—2008

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет

© Стандартинформ, 2014

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПРОПОЛИС

Антимикробная активность

Propolis. Antimicrobial activity

Дата введения — 2013—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на прополис и устанавливает метод определения минимальной подавляющей концентрации водно-спиртового экстракта прополиса (в пересчете на сухой экстракт) в диапазоне измерений от 100 до 600 мкг/см^3 для характеристики его антимикробной активности.

Требования к контролируемому показателю установлены в ГОСТ 28886.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 1770—74 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 3145—84 Часы механические с сигнальным устройством. Общие технические условия

ГОСТ ISO 5725-1—2003 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения

ГОСТ ISO 5725-6—2003 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

ГОСТ 5962—67 Спирт этиловый ректификованный. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ ISO 7218—2011 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям

ГОСТ 10444.1—84 Консервы. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе

ГОСТ 24104—2001* Весы лабораторные. Общие технические требования

ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 25629—83 Пчеловодство. Термины и определения

ГОСТ 28498—90 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 28886—90 Прополис. Технические условия

ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

* На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 53228—2008 «Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания».

Издание официальное

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по ГОСТ 25629, ГОСТ ISO 5725-1, а также следующий термин с соответствующим определением:

3.1 **минимальная подавляющая концентрация:** МПК (minimal inhibitory concentration): Минимальная концентрация антимикробного агента в среде культивирования, вызывающая полное подавление видимого невооруженным глазом роста микроорганизма.

4 Отбор и подготовка пробы

Отбор и подготовка пробы — по ГОСТ 28886 (пункт 3.1.1).

5 Требования безопасности проведения работ

При проведении испытаний необходимо соблюдать требования безопасности при работе с микроорганизмами III—IV групп патогенности в соответствии с установленными санитарными правилами и нормами, гигиеническими нормативами, действующими на территории государства, принявшего стандарт.

6 Средства измерения, вспомогательное оборудование, реактивы, материалы

6.1 Весы лабораторные с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания не более ±0,001 г по ГОСТ 24104.

6.2 Термометр жидкостный стеклянный с допускаемой погрешностью ±1 °С в диапазоне измерения от 0 °С до 70 °С по ГОСТ 28498.

6.3 Часы механические по ГОСТ 3145.

6.4 Дозатор ручной пипеточный одноканальный с диапазоном объемов дозирования от 0,02 до 0,2 $см^3$.

6.5 Цилиндры 3-10-2, 3-100-2, 3-1000-2 по ГОСТ 1770.

6.6 Пипетки вместимостью 5 $см^3$ по ГОСТ 29227.

6.7 Термостат для культивирования микроорганизмов при температуре (36 ± 1) °С.

6.8 Аппарат для встряхивания жидкости в колбах и пробирках с диапазоном частот колебаний штатива от 100 до 150 колебаний в минуту, амплитудой колебаний (25 ± 5) мм.

6.9 Роторный испаритель.

6.10 Баня водяная с терморегулятором с диапазоном поддерживаемой температуры от 40 °С до 55 °С и точностью регулировки температуры ±2 °С.

6.11 Колбы Кн-1-250-29/32, К-1-10-14/23 по ГОСТ 25336.

6.12 Воронка лабораторная В-75-110 ХС по ГОСТ 25336.

6.13 Пробирки П1-21-200 по ГОСТ 25336.

6.14 Чашки Петри по ГОСТ 25336, номинальным диаметром 100 мм или чашки одноразовые стерильные из полимерных материалов номинальным диаметром от 90 до 100 мм.

6.15 Шпатели бактериологические стеклянные или стерильные из полимерных материалов.

6.16 Фильтры обеззоленные (синяя лента).

6.17 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

6.18 Спирт этиловый по ГОСТ 5962.

6.19 Агар питательный сухой.

6.20 Агар Мюллера-Хинтона сухой.

6.21 Физиологический раствор по ГОСТ 10444.1 (подраздел 4.29).

6.22 Культура Staphylococcus aureus, штамм 209р (FDA 209p, ATCC 6538P).

6.23 Стандарт мутности 1,0 по MacFarland или стандартный образец мутности бактерийных взвесей БАК-10 с аттестованным значением оптической плотности (0,36 ± 0,01) ед. оптической плотности.

6.24 Вспомогательное оборудование для проведения микробиологических исследований, измерительное оборудование и тесты для контроля качества проведения микробиологических исследований по ГОСТ ISO 7218.

Допускается использование других средств измерений, вспомогательного оборудования по метрологическим, техническим характеристикам не хуже указанных в настоящем стандарте.

Допускается использование других реактивов по качеству и чистоте не ниже вышеуказанных.

7 Подготовка к испытаниям

7.1 Приготовление 70 %-ного водного раствора этилового спирта

В цилиндр вместимостью 1000 см^3 по ГОСТ 1770 вносят 730 см^3 этилового спирта по ГОСТ 5962 и доводят объем дистиллированной водой по ГОСТ 6709 до 1000 см^3.

7.2 Приготовление водно-спиртового экстракта прополиса

В колбу вместимостью 250 см^3 по ГОСТ 25336 вносят навеску прополиса (5,0 ± 0,5) г и 100 см^3 70 %-ного водного раствора этилового спирта, приготовленного по 7.1, закрывают корковой пробкой и экстрагируют на аппарате для встряхивания по 6.8 при комнатной температуре в течение (24 ± 1) ч. Содержимое колбы фильтруют через бумажный складчатый фильтр по 6.16. Экстракт прополиса (ЭП) хранят в темном месте при температуре не выше 25 °С.

7.3 Подготовка к микробиологическим исследованиям

Подготовку стерильной посуды и материалов, контроль работы испытательного оборудования, приготовление питательных сред и обеззараживание посевов тест-культуры проводят в соответствии с ГОСТ ISO 7218 и инструкциями производителей.

7.4 Приготовление тест-культуры

Культуру Staphylococcus aureus по 6.22 выращивают в течение (24 ± 2) ч на питательном агаре (см. 6.19) при температуре (36 ± 1) °С. В физиологическом растворе по ГОСТ 10444.1 готовят суспензию клеток S. aureus, соответствующую 10^9 клеток/см^3 по стандарту мутности (см. 6.23). Из исходной суспензии тремя 10-кратными разведениями в физиологическом растворе получают взвесь тест-культуры плотностью 10^6 клеток/см^3.

8 Проведение испытания

8.1 Круглодонную колбу вместимостью 10 см^3 по ГОСТ 25336 взвешивают с записью результата до третьего десятичного знака, пипеткой вместимостью 5 см^3 по ГОСТ 29227 вносят 4 см^3 ЭП, приготовленного по 7.2. Растворитель отгоняют на роторном испарителе при (45 ± 2) °С до постоянного веса (разность между двумя последовательными взвешиваниями не превышает 0,001 г). Массу сухого экстракта рассчитывают как разность веса колбы с сухим экстрактом и пустой колбы.

8.2 В стерильные пробирки П2-21-200 по ГОСТ 25336 стерильным цилиндром вместимостью 10 см^3 по ГОСТ 1770 наливают по 10 см^3 расплавленного агара Мюллера-Хинтона (МХА), приготовленного по 7.3, и выдерживают на водяной бане по 6.10 при (52 ± 2) °С для выравнивания температуры. В МХА дозатором по 6.4 вносят ЭП в объеме 0,02; 0,04; 0,06; ...; 0,20 см^3, перемешивают и разливают в стерильные чашки Петри по 6.14.

В чашки с застывшей средой, содержащей ЭП, вносят по 0,1 см^3 взвеси тест-культуры S. aureus, приготовленной по 7.3, и равномерно распределяют по поверхности среды стерильным шпателем по 6.15. Для контроля ростовых качеств среды и жизнеспособности тест-культуры производят посев на МХА без добавления ЭП; для проверки отсутствия подавления растворителем роста тест-культуры производят посев на МХА с добавлением 70 %-ного водного раствора этилового спирта в объеме, равном максимальному добавленному объему ЭП. Чашки с засеянной средой культивируют при (36 ± 1) °С и через (24 ± 1) ч учитывают наличие роста.

8.3 В случае, если рост тест-культуры наблюдается при всех концентрациях ЭП и значение МПК определить не удается, испытание по 8.2 повторяют, увеличивая количество вносимого в среду экстракта, но не более чем до 0,3 см^3.

9 Обработка и представление результатов

9.1 Значение МПК прополиса в пересчете на сухой экстракт C, мкг/см^3, рассчитывают по формуле

$$C = V \cdot 10^{-1} \cdot m \cdot 4^{-1} \cdot 10^6, \quad (1)$$

где V — минимальное количество экстракта прополиса, подавляющее рост тест-культуры на среде культивирования по 8.2, см^3;

10^{-1} — объем среды культивирования, см^3;

m — масса сухого экстракта прополиса, полученная по 8.1, г;

4^{-1} — объем ЭП, высушенного по 8.1, см^3;

10^6 — коэффициент для пересчета граммов в микрограммы.

Пример — Масса сухого экстракта, полученной по 8.1, составила 0,243 г. После культивирования по 8.2 рост тест-культуры отсутствовал в чашках с добавлением водно-спиртового экстракта в объеме 0,06 см^3 и более. Результат вычислений по формуле (1) составляет:

$$C_I = 0{,}06 \cdot 10^{-1} \cdot 0{,}243 \cdot 4^{-1} \cdot 10^6 = 364{,}5 \text{ (мкг/см}^3\text{)}.$$

МПК прополиса в пересчете на сухой экстракт учитывают в виде «364,5 мкг/см^3».

9.2 За результат испытаний принимают среднеарифметическое значение двух параллельных определений, полученных в условиях повторяемости, если абсолютное расхождение между ними не превышает предел повторяемости r по ГОСТ ISO 5725-6. Значение предела повторяемости r приведено в таблице 1.

При превышении предела повторяемости r целесообразно произвести дополнительное определение МПК прополиса и получить еще один результат. Если при этом расхождение ($C_{макс} - C_{мин}$) не превосходит результатов трех определений, значения критического диапазона $CR_{0,95}(3)$, то в качестве окончательного результата принимают среднеарифметическое значение результатов трех определений. Значение критического диапазона $CR_{0,95}(3)$ приведено в таблице 1.

Таблица 1

Минимальная подавляющая концентрация C, мкг/см^3	Предел повторяемости r, мкг/см^3	Критический диапазон при трех измерениях $CR_{0,95}(3)$, мкг/см^3	Предел воспроизводимости R, мкг/см^3
От 100 до 600 включ.	0,18 $\overline{C}$	0,21 $\overline{C}$	0,35 $\overline{C}$

При невыполнении этого условия проводят повторные испытания.

9.3 Абсолютное расхождение между результатами испытаний, полученными в двух лабораториях в условиях воспроизводимости, не должно превышать предела воспроизводимости R по ГОСТ ISO 5725-6. При выполнении этого условия приемлемы оба результата испытания и в качестве окончательного результата может быть использовано их среднеарифметическое значение. Значение предела воспроизводимости R приведено в таблице 1.

9.4 Результат измерений, округленный до целого числа, в диапазоне измерений от 100 до 600 мкг/см^3 в документах, предусматривающих его использование, представляют в виде

$$(\overline{C} \pm \Delta), \text{ мкг/см}^3, \text{ при } P = 0{,}95,$$

где $\overline{C}$ — среднеарифметическое значение результатов определений по 9.2, мкг/см^3;

$\pm \Delta$ — границы абсолютной погрешности результатов определений по разделу 10, мкг/см^3.

В случае, если результат измерений превышает 600 мкг/см^3, его представляют в виде «Более 600 мкг/см^3».

10 Характеристика погрешности испытания

Границы абсолютной погрешности результатов испытаний, получаемых согласно данному методу, при доверительной вероятности $P = 0{,}95$, $\pm \Delta = \pm 0{,}25\overline{C}$.

11 Оформление результатов испытаний

Результаты испытаний оформляют записью и протоколом.

УДК 638.16:006.354 МКС 65.140 С52

Ключевые слова: прополис, водно-спиртовый экстракт прополиса, антимикробная активность, минимальная подавляющая концентрация, агар Мюллера-Хинтона, тест-культура Staphylococcus aureus 209р

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *Р.А. Ментова*
Компьютерная верстка *В.И. Грищенко*

Сдано в набор 10.10.2014. Подписано в печать 29.10.2014. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал. Усл. печ. л. 0,93. Уч.-изд. л. 0,65. Тираж 56 экз. Зак. 4406.

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru