
ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО
ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ
СТАНДАРТ
РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р
53124—
2008

ПРОПОЛИС

Антимикробная активность

Издание официальное

БЗ 12—2008/560



Москва
Стандартинформ
2009

Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения национальных стандартов Российской Федерации — ГОСТ Р 1.0—2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения»

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 Техническим комитетом по стандартизации ТК 432 «Пчеловодство»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 18 декабря 2008 г. № 544-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом 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, 2009

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

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ПРОПОЛИС

Антимикробная активность

Propolis. Antimicrobial activity

Дата введения — 2010—01—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/см³ 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 Р ИСО 5725-1—2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения

ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025—2006 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий

ГОСТ Р 51446—99 Микробиология. Продукты пищевые. Общие правила микробиологических исследований

ГОСТ Р 51652—2000 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

ГОСТ Р 52001—2002 Пчеловодство. Термины и определения

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 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

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 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

П р и м е ч а н и е — 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 ежегодно издаваемому информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году.

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 Р 52001, ГОСТ Р ИСО 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 [1].

6 Средства измерения, вспомогательное оборудование, реактивы, материалы

6.1 Весы лабораторные с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания не более $\pm 0,001$ 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 по [2] с диапазоном объемов дозирования от 0,02 до 0,2 см³.

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

6.6 Пипетки вместимостью 5 см³ 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 Р 51652.

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 209р, ATCC 6538Р).

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

6.24 Вспомогательное оборудование для проведения микробиологических исследований, измерительное оборудование и тесты для контроля качества проведения микробиологических исследований по ГОСТ Р 51446.

Допускается использование других средств измерений с метрологическими характеристиками, вспомогательного оборудования и материалов с характеристиками, 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 см³ по ГОСТ 1770 вносят 730 см³ этилового спирта по ГОСТ Р 51652 и доводят объем дистиллированной водой по ГОСТ 6709 до 1000 см³.

7.2 Приготовление водно-спиртового экстракта прополиса

В колбу вместимостью 250 см³ по ГОСТ 25336 вносят навеску прополиса $(5,0 \pm 0,5)$ г и 100 см³ 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 Р 51446 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 10⁹ клеток/см³ по стандарту мутности (см. 6.23). Из исходной суспензии тремя 10-кратными разведениями в физиологическом растворе получают взвесь тест-культуры плотностью 10⁶ клеток/см³.

8 Проведение испытания

8.1 Круглодонную колбу вместимостью 10 см³ по ГОСТ 25336 взвешивают с записью результата до третьего десятичного знака, пипеткой вместимостью 5 см³ по ГОСТ 29227 вносят 4 см³ ЭП, приготовленного по 7.2. Растворитель отгоняют на ротаторном 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 см³ по ГОСТ 1770 наливают по 10 см³ 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 см³, перемешивают и разливают в стерильные чашки Петри по 6.14.

В чашки с застывшей средой, содержащей ЭП, вносят по 0,1 см³ 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 удастся, испытание по 8.2 повторяют, увеличивая количество вносимого в среду экстракта, но не более чем до 0,3 см³.

9 Обработка и представление результатов

9.1 Значение МПК прополиса в пересчете на сухой экстракт C , мкг/см³, 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, см³;

10^{-1} — объем среды культивирования, см³;

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

4^{-1} — объем ЭП, высушенного по 8.1, см³;

10^6 — коэффициент для пересчета граммов в микрограммы.

Пример — Масса сухого экстракта, полученного по 8.1, составила 0,243 г. После культивирования по 8.2 тест-культуры отсутствовал в чашках с добавлением водно-спиртового экстракта в объеме 0,06 см³ 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/см³».

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 Р ИСО 5725-6. Значение предела повторяемости r приведено в таблице 1.

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

Т а б л и ц а 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.	$0,18 \bar{C}$	$0,21 \bar{C}$	$0,35 \bar{C}$

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 Р ИСО 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/см³ в документах, предусматривающих его использование, представляют в виде:

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

где \bar{C} — среднеарифметическое значение результатов определений по 9.2, мкг/см³;

$\pm \Delta$ — границы абсолютной погрешности результатов определений по разделу 10, мкг/см³.

В случае, если результат измерений превышает 600 мкг/см³, его представляют в виде «Более 600 мкг/см³».

10 Характеристика погрешности испытания

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

11 Оформление результатов испытаний

Результаты испытаний оформляют записью и протоколом в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025.

Библиография

- | | |
|---|--|
| [1] Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2322—2008 | Безопасность работы с микроорганизмами III — IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней |
| [2] ТУ 64-13329—81 | Дозаторы пипеточные |

УДК 638.16:006.354

ОКС 65.140

С52

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

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *Н.С. Гришанова*
Корректор *В.Е. Нестерова*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 30.07.2009. Подписано в печать 10.08.2009. Формат 60 × 84 $\frac{1}{8}$. Бумага офсетная. Гарнитура Ариал.
Печать офсетная. Усл. печ. л. 0,93. Уч.-изд. л. 0,60. Тираж 218 экз. Зак. 503.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru

Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ.

Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.