


СОГЛАСОВАНО

Директор ФГУН «НИИ
дезинфектологии»
Роспотребнадзора,
академик РАМН


М.Г.Шандала
2006 г.



УТВЕРЖДАЮ

по поручению лаборатории
«АНИОС» (Франция)
генеральный директор
ООО «РамТЭК»


Р.Ю.Нажим
2006 г.



ИНСТРУКЦИЯ № 05/06 А

по применению средства «АНИОЗИМ №2» (Лаборатория «АНИОС», Франция) для очистки изделий медицинского назначения

Москва 2006 г.

ИНСТРУКЦИЯ № 05/06 А

по применению средства «АНИОЗИМ №2» (Лаборатория «АНИОС», Франция) для очистки изделий медицинского назначения

Инструкция разработана Федеральным Государственным учреждением науки «Научно-исследовательский институт дезинфектологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Авторы: Абрамова И.М., Дьяков В.В., Панкратова Г.П., Новикова Э.А.

1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1. Средство «Аниозим №2» представляет собой прозрачную жидкость оранжевого цвета с характерным запахом ароматизатора. Содержит протеазу, альфа-амилазу (далее - амилаза) и липазу в качестве действующих веществ, а также ряд функциональных добавок (неионные и амфотерные ПАВ, стабилизирующие агенты, краситель, консерванты, в том числе - полигексанид, и воду; рН средства составляет 6,5-8,5.

Средство расфасовано в полиэтиленовые флаконы вместимостью 1 и 5 л.

По данным изготовителя, срок годности средства при условии его хранения в невскрытой упаковке при температуре от плюс 5°С до плюс 35°С составляет 3 года. Срок годности рабочих растворов - 24 часа.

1.2. Средство обладает хорошими моющими свойствами при малом пенообразовании.

1.3. Средство по параметрам острой токсичности по ГОСТ 12.1.007-76 относится к 4 классу малоопасных веществ, при введении в желудок и нанесении на кожу; по степени летучести (пары) средство малоопасно (4 класс опасности); малотоксично при парентеральном введении (в брюшную полость) по классификации К.К.Сидорова; при непосредственном контакте оказывает слабое местно-раздражающее действие на кожу и вызывает умеренное раздражение слизистых оболочек глаз; сенсibilизирующие свойства не выражены.

Рабочие растворы средства при однократных аппликациях не оказывают местно-раздражающего действия на кожу, могут вызвать сухость кожи при многократных повторных нанесениях.

ПДК в воздухе рабочей зоны для действующих веществ не требуется, т.к. в составе средства нет летучих компонентов, и средство не предназначено для использования в аэрозольной форме.

1.4. Средство предназначено для использования в лечебно-профилактических учреждениях:

- для предстерилизационной очистки изделий медицинского назначения, включая хирургические (в том числе микрохирургические) и стоматологические (в том числе вращающиеся) инструменты, жесткие и гибкие эндоскопы и инструменты к ним из различных материалов ручным способом;
- для предварительной очистки эндоскопов и инструментов к ним, а также для предварительной очистки изделий медицинского назначения перед дезинфекцией фиксирующими средствами;
- для окончательной очистки эндоскопов ручным способом перед дезинфекцией высокого уровня (ДВУ);
- для предстерилизационной очистки хирургических (включая микрохирургические) и стоматологических (включая вращающиеся) инструментов механизированным способом в ультразвуковых установках «Кристалл-5» и «УЗВ-10/150-ТН - «РЭЛТЕК».

2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧИХ РАСТВОРОВ СРЕДСТВА

2.1. Рабочие растворы средства готовят в эмалированных (без повреждения эмали), пластмассовых емкостях путем добавления соответствующих количеств средства к питьевой приготавливаемых растворов комнатной температуры температурой не ниже 18°С.

Таблица 1 Ингредиенты для приготовления рабочих растворов средства «Аниозим №2»

Концентрация рабочего раствора (по препарату), %	Количество ингредиента (мл), необходимое для приготовления рабочего раствора объемом		
	1л	10л	15л

	Средство	Вода	Средство	Вода	Средство	Вода
0,4	4	996	40	9960	60	14940
0,5	5	995	50	9950	75	14925

3. ПРИМЕНЕНИЕ СРЕДСТВА

3.1. Средство применяют для предстерилизационной очистки изделий медицинского назначения, включая хирургические (в том числе - микрохирургические) и стоматологические (в том числе - вращающиеся) инструменты, жесткие и гибкие эндоскопы и инструменты к ним из различных материалов ручным способом; для предварительной очистки эндоскопов и инструментов к ним ручным способом; для окончательной очистки эндоскопов ручным способом перед (ДВУ); для предстерилизационной очистки хирургических (включая микрохирургические) и стоматологических (включая вращающиеся) инструментов механизированным способом в ультразвуковых установках «Кристалл-5» и «УЗВ-10/150-ТН-«РЭЛТЕК».

3.2. Предстерилизационную очистку изделий (кроме эндоскопов и инструментов к ним) проводят после их дезинфекции любым зарегистрированным в Российской Федерации и разрешенным к применению в лечебно-профилактических учреждениях для этой цели средством и ополаскивания от остатков этого средства питьевой водой в соответствии с инструкцией (методическими указаниями) по применению конкретного средства.

3.3. Очистку эндоскопов и инструментов к ним проводят с учетом требований санитарно-эпидемиологических правил СП 3.1.1275-03 «Профилактика инфекционных заболеваний при эндоскопических манипуляциях» и методических указаний «Очистка, дезинфекция и стерилизация эндоскопов и инструментов к ним» (МУ 3.5.1937-04 от 04.03.2004г.).

3.4. Предварительную очистку эндоскопов и инструментов к ним осуществляют согласно п.п. 3.1.-3.6. МУ 3.5.1937-04 от 04.03.2004г, используя 0,4% и 0,5% (по препарату) растворы средства.

3.5. Предстерилизационную очистку изделий, а также окончательную очистку эндоскопов перед ДВУ раствором средства «Аниозим №2» ручным способом проводят в пластмассовых, эмалированных (без повреждения эмали) емкостях, закрывающихся крышками, при полном погружении изделий в раствор, обеспечивая заполнение всех каналов и полостей раствором, избегая образования воздушных пробок. Толщина слоя раствора над изделиями должна быть не менее 1 см.

Разъемные изделия помещают в раствор в разобранном виде. Инструменты, имеющие замковые части (ножницы, корнцанги, зажимы и др.), погружают раскрытыми, предварительно сделав ими в растворе несколько рабочих движений для лучшего проникновения раствора в труднодоступные участки изделий в области замка.

3.6. Предстерилизационную очистку изделий проводят в соответствии с этапами и режимами, указанным в табл. 2-б.

3.7. Окончательную очистку эндоскопов перед ДВУ проводят аналогично предстерилизационной очистке эндоскопов, как указано в табл. 3.

3.8. Растворы средства, имеющие комнатную температуру (не менее 18°C), для предстерилизационной очистки изделий (окончательной очистки эндоскопов - перед ДВУ) ручным способом используют многократно в течение суток, если их внешний вид не изменился (изменение цвета, появление хлопьев, помутнение раствора и пр.). При первых признаках изменения внешнего вида раствор необходимо заменить. Растворы средства, имеющие комнатную температуру (не менее 18°C), для предстерилизационной очистки изделий механизированным способом используют однократно.

Этапы очистки	Режимы очистки		
	Концентрация рабочего раствора(по	Температура раствора,	Время выдержки/ обработки

	препарату), %	°С	на этапе, мин.
Замачивание при погружении изделий в раствор и заполнение каналов изделий: •не имеющих частей, каналов или полостей (кроме стоматологических с амальгамой);	0,4	Не менее	10
	•имеющих замковые каналы или полости, также зеркала с амальгамой;		0,5
Мойка каждого раствора, в каждом замачивание с щетки, ватно-или тканевой салфетки, каналов помощью шприца: •имеющих замковые каналы или полости; •остальных изделий	В концентрации раствора, использованн на этапе замачивания	То же	1,0
			0,5
Ополаскивание питьевой водой помощью шприца или электроотсоса)	Не нормируется		7,0
Ополаскивание дистиллированной - с помощью электроотсоса)	Не нормируется		0,5

Таблица 3

Режимы предстерилизационной очистки (окончательной очистки - перед ДВУ) гибких и жестких эндоскопов раствором средства «Аниозим №2» ручным способом

Этапы очистки	Режимы очистки
---------------	----------------

	Концентрация рабочего раствора(по препарату), %	Температура, рабочего раствора, °С	Время выдержки/ обработки на этапе, мин.
Замачивание эндоскопов при полном погружении (у не полностью погружаемых эндоскопов - их рабочих частей, разрешенных к погружению) в рабочий раствор средства и заполнении им полостей и каналов изделия	0,4	Не менее 18	10
Мойка каждого эндоскопа в том же растворе, в котором проводили замачивание: ГИБКИЕ ЭНДОСКОПЫ: • инструментальный канал очищают щеткой для очистки инструментального канала; • внутренние каналы промывают с помощью шприца или электроотсоса; наружную поверхность моют с помощью марлевой (тканевой) салфетки ЖЕСТКИЕ ЭНДОСКОПЫ: • каждую деталь моют с помощью ерша	0,4	То же	2,0 3,0 1,0 2,0 2,0
Ополаскивание проточной питьевой водой (каналы - с помощью шприца или электроотсоса)	Не нормируется		7,0
Ополаскивание дистиллированной водой (каналы - с помощью шприца или электроотсоса)	Не нормируется		1,0

Таблица 4 Режимы предстерилизационной очистки инструментов к эндоскопам раствором средства «Аниозим №2» ручным способом

Этапы предстерилизационной очистки	Режимы очистки
------------------------------------	----------------

	Концентрация рабочего раствора (по препарату), %	Температура, рабочего раствора, °С	Время выдержки/обработки на этапе, мин.
Замачивание инструментов при полном погружении в рабочий раствор средства и заполнении им внутренних каналов с помощью шприца	0,5	Не менее 18	15
Мойка каждого инструмента в том же растворе, в котором проводили обеззараживание (замачивание): - наружной (внешней) поверхности при помощи щетки или марлевой (тканевой) салфетки; - внутренних открытых каналов -при помощи шприца	0,5	То же	2,0 1,5
Эполаскивание проточной питьевой водой (каналы - с помощью шприца или электроотсоса)	Не нормируется		7,0
Ополаскивание дистиллированной водой (каналы - с помощью шприца или электроотсоса)	Не нормируется		1,0

Примечание: * при погружении инструментов в раствор средства необходимо сделать не менее 5 рабочих движений в растворе для лучшего его проникновения в труднодоступные участки инструментов.

Таблица 5 Режимы предстерилизационной очистки хирургических (включая микрохирургические) и стоматологических (включая вращающиеся) инструментов растворами средства «Аниозим №2» механизированным способом в ультразвуковой установке «Кристалл-5»

Этапы очистки	Режимы очистки		
	Концентрация рабочего раствора (по препарату), %	Температура рабочего раствора, °С	Время обработки, мин.

Ультразвуковая обработка в установке: • инструментов, не имеющих замковых частей, кроме зеркал с амальгамой	0,4	Не менее 18	5
• инструментов, имеющих замковые части, и стоматологических зеркал с амальгамой	0,5		10
Ополаскивание проточной питьевой водой вне установки	Не нормируется		7,0
Ополаскивание дистиллированной водой вне установки	Не нормируется		0,5

Таблица 6 Режимы предстерилизационной очистки хирургических (включая микрохирургические) и стоматологических (включая вращающиеся) инструментов растворами средства «Аниозим №2» механизированным способом в ультразвуковой установке «УЗВ-10/150-ТН-«РЭЛТЕК»

Этапы очистки	Режимы очистки		
	Концентрация рабочего раствора (по препарату),	Температура рабочего раствора, °С	Время обработки мин.
Ультразвуковая обработка в установке: •Инструментов, не имеющих замковых частей, кроме стоматологических зеркал с амальгамой	0,4	Не менее	5
• Инструментов, имеющих замковые части, а также стоматологических зеркал с амальгамой	0,4		10
Ополаскивание проточной питьевой водой вне установки	Не нормируется		7,0
Ополаскивание дистиллированной водой вне установки	Не нормируется		0,5

3.9. Контроль качества предстерилизационной очистки проводят путем постановки азопирамовой или амидопириновой пробы на наличие остаточных количеств крови согласно методикам,

изложенным в Приложении 4 «Методических указаний по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» (№ МУ-287-113 от 30.12.1998 г.).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- 4.1. К работе со средством не допускаются лица моложе 18 лет, лица с аллергическими заболеваниями и чувствительные к химическим веществам.
- 4.2. Все работы со средством следует проводить с защитой кожи рук резиновыми перчатками.
- 4.3. Избегать попадания средства в глаза и на кожу.
- 4.4. Средство следует хранить отдельно от лекарственных препаратов в местах, недоступных детям.

5. МЕРЫ ПЕРВОЙ ПОМОЩИ

- 5.1. При попадании средства в глаза сразу промыть их под струей воды в течение 10-15 мин; при появлении гиперемии - закапать 20% или 30% раствор сульфацила натрия. При необходимости обратиться к врачу.
- 5.2. При попадании средства на кожу смыть его водой.
- 5.3. При попадании средства в желудок следует выпить несколько стаканов воды с 10-20 измельченными таблетками активированного угля или любой другой заменяющий его адсорбент. Рвоту не вызывать. При необходимости обратиться к врачу.
- 5.4. Ингаляционное отравление маловероятно вследствие отсутствия летучих компонентов в средстве.

6. УПАКОВКА, УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

- 6.1. Средство «Аниозим № 2» должно быть упаковано в оригинальную тару предприятия-изготовителя: в полиэтиленовые флаконы вместимостью 1 и 5 л.
- 6.2. Средство необходимо хранить в прохладном месте, вдали от источников тепла при температуре от + 5°C до + 35°C.
- 6.3. Средство пожаро- и взрывобезопасно.
- 6.4. При уборке пролившегося средства его следует адсорбировать удерживающим жидкость веществом (силикагель, песок, опилки), собрать и отправить на утилизацию. Остатки смыть большим количеством воды.
- 6.5. Меры защиты окружающей среды: не допускать попадания неразбавленного средства в сточные/поверхностные или подземные воды и в канализацию.
- 6.6. Транспортирование средства возможно любым видом транспорта в оригинальной упаковке предприятия - изготовителя в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на каждом виде транспорта и гарантирующими сохранность средства и тары.

6. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И АНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА СРЕДСТВА «АНИОЗИМ №2»

- 6.1. По физико-химическим показателям средство должно соответствовать требованиям и нормам, указанным в табл. 7.11

Таблица 7 Физико-химические характеристики и нормы средства «Аниозим №2»

Наименование показателя	Норма
Внешний вид и запах	Прозрачная жидкость оранжевого цвета с характерным запахом ароматизатора
Энзимная активность средства (энзимного комплекса действующих веществ: протеаза + липаза + альфа амилаза)	Определение ферментативной активности

Показатель активности водородных ионов, ед. рН	6,5 - 8,5
Плотность (20°C), г/см ³	1,050-1,100
Показатель преломления (20°C)	1,4030-1,4045
Массовая доля полигексанида (консервант средства), %	0,036-0,044

6.2. Определение внешнего вида.

Внешний вид определяют просмотром 25 - 50 мл средства в стакане из бесцветного стекла на белом фоне.

6.3. Определение показателя активности водородных ионов. Показатель активности водородных ионов рН определяют потенциометрически.

6.4. Определение плотности.

Плотность средства при 20°C определяют с помощью ареометра или пикнометра.

6.5. Определение показателя преломления. Показатель преломления определяют рефрактометрически.

6.6. Определение ферментативной активности.

Оценку ферментативной активности средства проводят по эффективности ферментативного расщепления тест-субстратов при воздействии 0,5% раствором средства в течение 15 мин. при комнатной температуре с последующим обнаружением продуктов гидролиза.

Раствор средства с массовой долей 0,5% готовят растворением в водопроводной воде 0,5 г средства в мерной колбе вместимостью 100 мл.

6.6.1. Определение активности амилазы.

Для оценки активности амилазы в средстве используют в качестве тест-субстрата 0,1% раствор гликогена, ферментативное расщепление которого происходит до глюкозы. Обнаружение гликогена и продуктов гидролиза проводят с помощью тонкослойной хроматографии.

6.6.1.1. Реактивы и растворы.

Тест - субстрат: гликоген (G 0885 Сигма); водный раствор массовой долей 0,1%.

Пластинки для хроматографии (Мерк 1.05553) - силикагель 60, толщина слоя 0,25мм на алюминиевой подложке Этанол абсолютированный Кислота уксусная х.ч. Кислота серная х.ч. Вода дистиллированная

Подвижная фаза: 29 мл дистиллированной воды

70 мл абсолютированного этанола

1 мл уксусной кислоты Проявляющий реагент: раствор серной кислоты с массовой долей 10%.

6.6.1.2. Выполнение анализа.

Для проведения гидролиза гликогена в пробирку вносят 1 мл 0,5% раствора средства, добавляют 100 мкл 0,1% раствора гликогена и выдерживают в течение 15 мин. Через 15 мин. останавливают реакцию, охлаждая пробирку со смесью во льду, после чего проводят хроматографирование раствора.

На хроматографической пластинке намечают стартовую линию на расстоянии 1,5 см от края, на которую через 2 см наносят по 30 мкл анализируемой пробы и по 3 мкл 0,1% раствора гликогена (в качестве контрольного раствора). После нанесения проб пластинку подсушивают на воздухе. Затем пластинку помещают в хроматографическую камеру, в которую предварительно залита подвижная фаза в таком количестве, чтобы пластинка погружалась в нее не более, чем на 0,5 см. После того, как подвижная фаза поднимется до 1 см от верхнего края сорбента, пластинку вынимают из камеры и высушивают на воздухе в вытяжном шкафу, затем опрыскивают проявляющим реагентом, снова подсушивают и нагревают при 180°C. Зоны локализации продуктов гидролиза гликогена проявляются в виде темных пятен в средней и верхней части хроматограммы, пятно от контрольного раствора гликогена остается на стартовой линии хроматограммы.

6.6.2. Определение активности липазы.

Для оценки активности липазы в средстве используют в качестве тест-субстрата 0,1% раствор триолеина, ферментативное расщепление которого происходит до ди- и моноглицеридов.

Обнаружение триглицеридов и продуктов гидролиза проводят с помощью тонкослойной хроматографии.

6.6.2.1. Реактивы и растворы.

Тест-субстрат триглицеридов: триолеин (Т 9517 Сигма); раствор в абсолютированном этаноле с массовой долей 0,1% .

Контрольный раствор диглицеридов: 1,3-дидиолеин (D 9508 Сигма); раствор в абсолютированном этаноле с массовой долей 0,1% .

Контрольный раствор моноглицеридов: 1-монолинолеоилглицерол (M13 7640 Сигма); раствор в абсолютированном этаноле с массовой долей 0,1% .

Пластинки для хроматографии (Мерк 1.05553) -силикагель 60, толщина слоя 0,25мм на алюминиевой подложке.

Этанол абсолютированный.

н-Гексан х.ч.

Диэтиловый эфир х.ч.

Метанол х.ч.

Кислота фосфорная; раствор с массовой долей 75%.

Кислота уксусная х.ч.

Сульфат меди х.ч.

Вода дистиллированная.

Подвижная фаза: 100 мл н-гексана

1 мл диэтилового эфира

2 мл уксусной кислоты

3 мл метанола

Проявляющий реагент: в мерную колбу вместимостью 50 мл вносят 5 г сульфата меди, 4,5 мл 75% раствора фосфорной кислоты, добавляют до калибровочной метки дистиллированную воду и перемешивают.

6.6.2.2 Выполнение анализа.

Для проведения гидролиза липидов в пробирку вносят 1 мл 0,5% раствора средства, добавляют 100 мкл 0,1% раствора триолеина и выдерживают в течение 15 мин. Через 15 мин. останавливают реакцию, охлаждая пробирку со смесью во льду, после чего проводят хроматографирование раствора.

На хроматографической пластинке намечают стартовую линию на расстоянии 1,5 см от края, на которую через 2 см наносят по 60 мкл анализируемой пробы и по 60 мкл 0,1% контрольного раствора. После нанесения проб пластинку подсушивают на воздухе. Затем пластинку помещают в хроматографическую камеру, в которую предварительно наливают подвижную фазу в таком количестве, чтобы пластинка погружалась в нее не более, чем на 0,5 см. После того, как подвижная фаза поднимется до 1 см от верхнего края сорбента, пластинку вынимают из камеры и сушат на воздухе в вытяжном шкафу, затем опрыскивают проявляющим реагентом, снова подсушивают и нагревают при 180°C. Зоны локализации продуктов гидролиза липидов проявляются в виде темных пятен в средней и верхней части хроматограммы.

Обнаружение продуктов ферментативного расщепления триолеина проводят путем сравнения Rf триолеина и продуктов гидролиза в пробе и Rf триолеина в контрольном растворе.

6.6.3. Определение активности протеазы.

Для оценки активности протеазы в средстве используют в качестве тест-субстрата 0,3% раствор сыворотки человеческого белка (альбумин), ферментативное расщепление которого происходит до пептидов. Обнаружение продуктов гидролиза проводят с помощью электрофореза в 14 полиакриловом геле в присутствии додецилсульфата натрия.

6.6.3.1 Приборы, реактивы и растворы.

Прибор для вертикального электрофореза (165-5051 BIO-RAD).

Микрошприц, вместимостью 5 мкл.

Сыворотка человеческого белка (альбумин) /A 163 SIGMA/.

Раствор акриламида 40% /161-0146 BIO-RAD/.

Буферный раствор для электрофореза TSG: (Tris/glycine/SDS Buffer) /161-0772 BIO-RAD/; готовят раствор в дистиллированной воде с массовой долей 10%.

Разделяющий буфер (Лаемнли буфер) /161-0730 BIO-RAD/.

Натрий додецилсульфат (SDS) /161-0300 BIO-RAD/; водный раствор с массовой долей 10%.

Персульфат аммония (161-0710 BIO-RAD); водный раствор с массовой долей 10%.

Раствор меркаптоэтанола (161-0710 BIO-RAD).

TEMED (N,N,N,N, tetra-metyl-ethylenediamin) (161-0800 BIO-RAD).

Подвижная фаза: готовят раствор TSG в дистиллированной воде с массовой долей 10%.

Проявляющий раствор следующего состава:

Кумасси синий 2 г

Дистиллированная вода 225 мл

Уксусная кислота 225 мл

Метанол 225 мл

Обесцвечивающий раствор следующего состава:

Этанол 600 мл

Дистиллированная вода 1250 мл

Уксусная кислота 150 мл

6.6.3.2 Приготовление полиакрилового геля. Концентрирующий и разделяющий полиакриловый гель следующего состава:

Компонент	Разделяющий гель	Концентрирующий гель
Акрилоамид 40 %	3,5 мл	3,5 мл
Буфер	2,5 мл (рН 8,8)	2,5 мл (рН 6,8)
10 % раствор натрий додецил сульфата	0,1 мл	0,1 мл
Дистиллированная вода	3,9 мл	3,9 мл

Каждый приготовленный гель обрабатывают в течение 2 мин. в ультразвуковой ванне.

В разделяющий полиакриловый гель добавляют 50 мкл 10% раствора персульфата аммония и 5 мкл TEMED, после чего заполняют гелем объем между двумя вертикально закрепленными пластинами на 3/4 высоты.15

В концентрирующий полиакриловый гель добавляют 50 мкл 10% раствора персульфата аммония и 10 мкл TEMED, и после перемешивания наливают его между пластинами на разделяющий гель до заполнения объема, закрывают гребенкой и оставляют на 30 мин. для полимеризации геля.

6.6.3.3. Подготовка к анализу.

Для проведения анализа готовят следующие растворы:

- раствор А - в пробирку вносят 500 мкл 0,1% раствора средства и добавляют 500 мкл 0,3% раствора альбумина;

- контрольный раствор готовят смешиванием 500 мкл воды и 500 мкл 0,3% раствора альбумина;

- раствор Б: смешивают 500 мкл разделяющего буфера и 50 мкл меркаптоэтанола;

- раствор средства в дистиллированной воде с массовой долей 1%.

6.6.3.4. Проведение анализа.

Гидролиз альбумина проводят в тест-пробирке, в которую вносят 50 мкл раствора А и добавляют 100 мкл раствора Б, выдерживают смесь на кипящей водяной бане в течение 5 мин. и охлаждают до комнатной температуры. В полученном гидролизате проводят обнаружение продуктов расщепления

альбумина с помощью электрофореза.

Для проведения электрофореза в каналы, образованные в геле с помощью гребенки, вносят параллельно по 5 мкл гидролизата, а также по 5 мкл контрольного раствора альбумина.

В прибор для электрофореза наливают 10% раствор TSG и устанавливают пластины с гелем между электродами, электрофорез проводят при 25 тА до образования отдельных зон в распределяющем геле. Затем гель снимают с пластины и опускают в окрашивающий раствор на 15 мин., после чего отмывают гель в обесцвечивающем растворе до удаления красителя, не связанного с пептидами.

Обнаружение продуктов ферментативного расщепления альбумина проводят путем сравнения разделенных зон продуктов гидролиза альбумина с контрольным раствором альбумина, не содержащим фермента.

6.7. Определение массовой доли полигексанида.

Определение проводят методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с применением диодноматричного УФ-детектора, градиентного режима хроматографирования и использованием абсолютной градуировки.

6.7.1. Приборы, реактивы, растворы.

Жидкостный хроматограф «Альянс» (Waters), снабженный градиентной системой 2690, диодноматричным детектором 996, инжектором с дозирующей петлей на 20 мкл, программой сбора и обработки хроматографических данных на базе персонального компьютера.

Хроматографическая колонка Хтерра RP8 (Waters) C18, 5 мкм, длина 150 мм, внутренний диаметр 3 мм.

Микрошприц типа Гамильтон вместимостью 100 мкл.16

Весы лабораторные 2 класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г.

Колбы мерные вместимостью 25, 50 мл. Пипетки вместимостью 10 мл. Фильтры мембранные, 0,45 мкм.

Полигексанид - аналитический стандарт или продукт с установленным содержанием основного вещества. Кислота трифторуксусная х.ч. Ацетонитрил градации для ВЭЖХ. Вода деионизированная или бидистиллированная. Подвижная фаза: элюент А - водный раствор трифторуксусной кислоты с массовой долей

0,1%;

элюент Б - раствор трифторуксусной кислоты в ацетонитриле с массовой долей 0,08%.

Элюенты дегазируют перед применением любым известным способом. 6.7.2. Приготовление градиентовочных смесей.

Основную градиентовочную смесь с массовой концентрацией 0,5 мг/мл готовят в мерной колбе вместимостью 100 мл, растворяют в воде 0,05 г полигексанида, взвешенного с точностью до четвертого знака, добавляют воду до калибровочной метки и перемешивают.

Для приготовления рабочей градиентовочной смеси в мерную колбу вместимостью 25 мл вносят 5 мл основной градуировочной смеси, добавляют воду до калибровочной метки и после перемешивания хроматографируют. Из полученных хроматограмм определяют время удерживания и площадь хроматографического пика полигексанида в рабочей градиентовочной смеси.

6.7.3. Условия хроматографирования.

Скорость элюента 1,0 мл/мин.

Градиент, программа по элюенту Б: 5% Б в течение 2 мин.- до 95% Б за 1 мин. - 95% Б в течение 2 мин.- до 5% Б за 1 мин.

Длина волны 220 нм

Температура колонки 30°C

Объем вводимой пробы 20 мкл

Время удерживания полигексанидина около 4 мин.

В условия проведения анализа могут быть внесены изменения с целью достижения оптимального разделения компонентов в зависимости от конструктивных особенностей применяемого хроматографа и разделительной способности используемой колонки. 6.7.4. Проведение анализа.

В мерной колбе вместимостью 25 мл взвешивают 5 мл средства, результат взвешивания в граммах записывают с точностью до четвёртого десятичного знака, добавляют воду до калибровочной метки, тщательно перемешивают и вводят в хроматограф. Из полученных хроматограмм определяют площадь хроматографического пика полигексанида в анализируемой пробе.

6.7.5. Обработка результатов.17

Массовую долю полигексанида (X , %) в средстве вычисляют по формуле:

$$\frac{S_{np} \cdot C^* - a \cdot V}{\gamma C} =$$

$S_{r.c} \cdot \Gamma_{Ппр}$

где S_{np} и $S_{r.c}$, - площадь хроматографического пика определяемого вещества в анализируемой пробе и рабочей градуировочной смеси;

C - массовая концентрация определяемого вещества в рабочей градуировочной смеси, мг/мл;

a - массовая доля основного вещества в аналитическом стандарте полигексанида, %;

V - объем раствора анализируемой пробы, мл;

$\Gamma_{Ппр}$ - масса средства, взятая на анализ, г.

За результат анализа принимают среднее арифметическое значение результатов двух определений, абсолютное расхождение между которыми не превышает значения допускаемого расхождения, равного 0,004%.