СОГЛАСОВАНО
Директор ФБУН
НИИДезинфектологии
Роспотребнадзора
д.м.н., профессор

_____ Н.В. Шестопалов
«25» сентября 2015 г.

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
ООО «РАМТЭК»
_____ А.Г. Нажим
«25» сентября 2015 г.

ИНСТРУКЦИЯ № 2/15

по применению средства «АНИОЗИМ СИНЕРЖИ 5»
(ANIOSYME SYNERGY 5)
для предстерилизационной очистки медицинских изделий

Москва, 2015

Инструкция

по применению средства
«АНИОЗИМ СИНЕРЖИ 5» (ANIOSYME SYNERGY 5)
для предстерилизационной очистки медицинских изделий

Инструкция разработана:
ФБУН НИИДезинфектологии Роспотребнадзора: Федорова Л.С., Серов А.А., Потапова Т.Н., Андреев С.В.
ООО «РАМТЭК»: Нажим А.Г., Нажим Р.Р., Дахук Б.Р.

1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1 Средство «АНИОЗИМ СИНЕРЖИ 5» (ANIOSYME SYNERGY 5) (далее по тексту - средство) представляет собой прозрачную жидкость синего цвета с характерным запахом. В качестве действующих веществ содержит комплекс из пяти ферментов: протеаза бактериальная (субтилизин), липаза, амилаза, маннаназа и целлюлаза, а также неионные и анионные ПАВ, легко биодеградируемые хелатные агенты, краситель, воду.

Средство не содержит летучих органических веществ.

Показатель активности водородных ионов (pH) средства - 7,0 - 9,0.

Срок годности средства при условии его хранения в невскрытой упаковке при температуре от плюс 5ºС до плюс 35ºС составляет 3 года.

Срок годности рабочих растворов - 24 часа.

Средство выпускают в полимерных емкостях вместимостью 1 л с дозатором, пластиковых канистрах вместимостью 5 л с помпой (1 помпа на 4 канистры), канистрах вместимостью 5 л для моющих машин, канистрах вместимостью 10 л, 25 л, бочках вместимостью 200 л.

1.2 Средство обладает хорошими моющими свойствами при концентрации растворов от 0,1% (по препарату) и малым пенообразованием при высоких концентрациях, хорошо растворимо в воде, сохраняет очищающие свойства в воде любой жесткости и обеспечивает высокую степень очистки медицинских изделий от белковых, жировых и других загрязнений.

1.2.1 Комплекс ферментов способствует гидролизу белков, жиров и углеводов до аминокислот, глицерола и глюкозы, хорошо растворимых в воде, что позволяет легко удалять органические загрязнения, включая биопленку (эффективность на разрушение биопленки продемонстрирована производителем в соответствии с ISO/TS 15883-5: 2005).

1.2.2 Средство не обладает корродирующим действием на изделия из нержавеющей стали, алюминия, латуни, титана, олова; не повреждает изделия из стекла, тефлона, полимерных материалов, в том числе резин.

1.3 Средство по параметрам острой токсичности при введении в желудок и нанесении на кожу относится к 4 классу малоопасных веществ согласно ГОСТ 12.1.007-76; при введении в брюшную полость - к 4 классу малотоксичных ве-

ществ по классификации химических веществ К.К.Сидорова; по степени летучести средство относится к 4 классу малоопасных веществ, не обладает сенсибилизирующим эффектом, не вызывает раздражения кожи и обладает умеренным раздражающим действием на слизистые оболочки глаз.

Рабочие растворы вызывают слабое раздражение слизистых оболочек глаз; при однократных аппликациях не оказывают раздражающего действия на кожу и могут вызывать сухость кожи при многократных повторных воздействиях.

1.4 Средство предназначено для использования в медицинских организациях различного профиля, включая отделения детские и неонатологии для:

предстерилизационной очистки медицинских изделий из различных материалов (металлов, стекла, пластика, резин), включая хирургические (в том числе микрохирургические, офтальмологические) и стоматологические (в том числе вращающиеся) инструменты ручным способом;

предстерилизационной очистки медицинских изделий из различных материалов (металлов, стекла, пластика), включая хирургические (в том числе микрохирургические, офтальмологические) и стоматологические (в том числе вращающиеся) инструменты, механизированным способом с применением ультразвука в ультразвуковых установках, зарегистрированных в установленном порядке (установки «УЗВ-10/150-ТН-«РЭЛТЕК», «Elmasonic S120H», «Кристалл-5»);

предварительной очистки эндоскопов и инструментов к ним ручным способом;

предстерилизационной очистки гибких и жестких эндоскопов, окончательной очистки перед дезинфекцией высокого уровня (далее - ДВУ) эндоскопов ручным способом;

предстерилизационной очистки инструментов к эндоскопам из различных материалов ручным способом;

окончательной очистки (перед ДВУ) эндоскопов, включая ультразвуковые эндоскопы механизированным способом в установках для дезинфекции гибких эндоскопов Bandeq CYW-100 N, OER-A, а также в установках других марок при условии обеспечения ими режима обработки, предусмотренного настоящей инструкцией;

окончательной очистки (перед ДВУ) эндоскопов, включая ультразвуковые эндоскопы механическим способом в установке **УДЭ-1 «КРОНТ»** и в **«*Модуле для очистки, дезинфекции, ДВУ и стерилизации эндоскопов*»,** производства «Лабораторий АНИОС», Франция, - далее **«*Модуль эндоскопический*»** - (№ ФСЗ 2009 / 03534 от 30.07.2012г.)

2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧИХ РАСТВОРОВ

2.1 Рабочие растворы средства для ручного способа обработки готовят в эмалированных (без повреждения эмали), стеклянных или пластмассовых емкостях путем добавления соответствующих количеств средства к питьевой воде или воде, прошедшей фильтрацию через специальные фильтры типа «ФИЛЬТРАНИОС» (FILTRANIOS) производства «Лабораторий АНИОС», Франция, (№ФСЗ

2011 / 09666 от 27.04.2011г). Для приготовления растворов комнатной температуры используют воду с температурой не ниже 18ºС (таблица 1).

2.2 При ***механизированном способе обработки эндоскопов*** в установках для дезинфекции гибких эндоскопов Bandeq CYW-100 N, OER-A и установках других марок необходимое количество средства добавляют в резервуар установки (в соответствии с «Руководством по эксплуатации» производителя машины) или канистру со средством **«Аниозим Синерджи 5»** подсоединяют к МДМ с помощью дозирующего насоса или через центральную дозирующую станцию. Приготовление растворов средства осуществляется машиной автоматически.

2.3 Рабочие растворы средства в установках УДЭ-1 «КРОНТ», «Модуль эндоскопический», «УЗВ-10/150-ТН-«РЭЛТЕК», «Elmasonic S120H», «Кристалл-5» готовят непосредственно в ваннах установок путем добавления соответствующих количеств средства к питьевой воде или воде, прошедшей фильтрацию через специальные фильтры типа «ФИЛЬТРАНИОС». Для приготовления растворов комнатной температуры используют воду с температурой не ниже 18ºС (таблица 1).

Таблица 1

Приготовление рабочих растворов средства

Концентрация рабочего раствора (по препарату), %	Количество ингредиента (мл), необходимое для приготовления 1 л рабочего раствора	
	Средство	Вода
0,1	1,0	999,0
0,3	3,0	997,0
0,4	4,0	996,0
0,5	5,0	995,0

3. ПРИМЕНЕНИЕ СРЕДСТВА

3.1 Средство применяют для предстерилизационной очистки медицинских изделий из различных материалов, в том числе жестких и гибких эндоскопов и инструментов к ним ручным и механизированным способами в соответствии с п.1.4.

3.2 *Предстерилизационную* очистку медицинских изделий проводят после их дезинфекции любым, зарегистрированным в Российской Федерации и разрешенным к применению в медицинских организациях для этой цели средством, не содержащим фиксирующих соединений (альдегидов, спиртов), и ополаскивания от остатков этого средства питьевой водой или водой, прошедшей фильтрацию через специальные фильтры типа «ФИЛЬТРАНИОС», 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 3.1.3263-15 «Профилактика инфекционных заболеваний при эндоскопических вмешательствах», СанПиН 2.1.3.2630-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к

организациям, осуществляющим медицинскую деятельность», методических указаний МУ 3.5.1937-04 от 04.03.2004г. «Очистка, дезинфекция и стерилизация эндоскопов и инструментов к ним».

3.4 *Предстерилизационную* очистку изделий, а также *окончательную* очистку эндоскопов (перед ДВУ) раствором средства ***ручным способом*** проводят в пластмассовых, стеклянных или 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.

3.5 *Предстерилизационную* очистку медицинских изделий, включая хирургические (в том числе - микрохирургические) и стоматологические (в том числе - вращающиеся) инструменты ***ручным способом*** проводят в соответствии с этапами и режимами, указанными в ***таблице 2***.

3.6 *Предварительную* очистку эндоскопов осуществляют согласно нормативной документации (п. 3.3. настоящей инструкции), используя **0,3%** (по препарату) раствор средства.

3.7 *Окончательную* очистку (перед ДВУ) гибких и жестких эндоскопов ***ручным способом*** проводят в соответствии с этапами и режимами, указанными в ***таблице 3***.

3.8 *Предстерилизационную* очистку инструментов к гибким эндоскопам ***ручным способом*** проводят в соответствии с этапами и режимами, указанными в ***таблице 4***.

3.9 *Предстерилизационную (окончательную - перед ДВУ)* очистку эндоскопов механизированным способом проводят в установках для дезинфекции гибких эндоскопов **Bandeq CYW-100 N, OER-A и установках других марок** в соответствии с инструкцией по эксплуатации используемого оборудования. Рекомендованный минимальный режим обработки средством: концентрация - от 0,1% раствора, время обработки - от 1 минуты.

3.9.1 *Предстерилизационную (окончательную - перед ДВУ)* очистку гибких эндоскопов в установках **УДЭ-1 «КРОНТ», «Модуль эндоскопический»**, проводят в соответствии с этапами и режимами, указанными в **таблице 7**.

3.10 *Предстерилизационную* очистку медицинских изделий, включая хирургические (в том числе - микрохирургические) и стоматологические (в том числе - вращающиеся) инструменты ***механизированным способом*** **в ультразвуковых установках** проводят в соответствии с этапами и режимами, указанными в ***таблицах 5-6***.

3.11 Растворы средства для предстерилизационной очистки медицинских изделий ***ручным*** и ***механизированным способом*** используют ***однократно***.

3.12 Контроль качества предстерилизационной очистки проводят путем постановки азопирамовой или амидопириновой пробы на наличие остаточных количеств крови согласно методикам, изложенным, соответственно, в методических

указаниях «Контроль качества предстерилизационной очистки изделий медицинского назначения с помощью реактива азопирам» (№ 28-6/13 от 25.05.88г.) и в «Методических указаниях по предстерилизационной очистке изделий медицинского назначения» (№ 28-6/13 от 08.06.82г.).

Контролю подлежит 1% одновременно обработанных изделий одного наименования (но не менее трех изделий).

При выявлении остатков крови (положительная проба) вся группа изделий, от которой отбирали изделия для контроля, подлежит повторной обработке до получения отрицательного результата.

Таблица 2

Режимы предстерилизационной очистки медицинских изделий (кроме эндоскопов и инструментов к ним) растворами средства «АНИОЗИМ СИНЕРЖИ 5» **ручным способом**

Этапы очистки	Режимы очистки		
	Концентрация раствора средства (по препарату), %	Температура раствора средства, ^{O}C	Время выдержки/обработки, мин.
Замачивание изделий при полном погружении их в рабочий раствор и заполнении им полостей и каналов изделий	0,5 0,4 0,3	20±2	5,0 10,0 15,0
Мойка каждого изделия в том же растворе, в котором проводили замачивание, с помощью ерша, ватно-марлевого тампона или тканевой (марлевой) салфетки, каналов - с помощью шприца: • изделий, не имеющих замковых частей, каналов или полостей в том числе вращающихся; • изделий, имеющих замковые части, каналы или полости; • зеркала стоматологические, трубки из резины на основе натурального и синтетического каучука.	В соответствии с концентрацией раствора, использованного на этапе замачивания	То же	0,5 1,0 1,5
Ополаскивание проточной питьевой водой (каналы - с помощью шприца или электроотсоса)	Не нормируется		5,0[1]
Ополаскивание дистиллированной водой (каналы - с помощью шприца или электроотсоса)	Не нормируется		0,5
Примечание–Знак ([1]) означает, что для изделий из натуральных резин время ополаскивания проточной питьевой водой составляет 20 минут.			

Таблица 3

Режимы предстерилизационной (окончательной - перед ДВУ) очистки гибких и жестких эндоскопов раствором средства «АНИОЗИМ СИНЕРЖИ 5» **ручным способом**

Этапы очистки	Режим очистки		
	Концентрация раствора средства (по препарату),%	Температура раствора средства, ^{O}C	Время выдержки / обработки, мин.
Замачивание эндоскопов (у не полностью погружаемых эндоскопов – их рабочих частей, разрешенных к погружению) при полном погружении в раствор средства и заполнении им полостей и каналов			
• гибкие эндоскопы	0,5 0,4	20±2	10,0 15,0
• жесткие эндоскопы	0,5		5,0
Мойка каждого эндоскопа в том же растворе, в котором проводили замачивание			
ГИБКИЕ ЭНДОСКОПЫ:			
• инструментальный канал очищают щеткой для очистки инструментального канала;	0,5 0,4	То же	2,0
• внутренние каналы промывают при помощи шприца или электроотсоса;			3,0
• наружную поверхность моют при помощи тканевой (марлевой) салфетки			1,0
ЖЕСТКИЕ ЭНДОСКОПЫ:			
• каждую деталь моют при помощи ерша или тканевой (марлевой) салфетки;	0,5		2,0
• каналы промывают при помощи шприца			2,0
Ополаскивание проточной питьевой водой (каналы - с помощью шприца или электроотсоса)	Не нормируется		5,0
Ополаскивание дистиллированной водой (каналы - с помощью шприца или электроотсоса)	Не нормируется		1,0

Таблица 4

Режимы предстерилизационной очистки инструментов к эндоскопам растворами средства «АНИОЗИМ СИНЕРЖИ 5» **ручным способом**

Этапы очистки	Режим очистки		
	Концентрация раствора средства (по препарату), %	Температура раствора средства, ^{O}C	Время выдержки/ обработки на этапе, мин.
Замачивание инструментов при полном погружении их в раствор средства и заполнении им полостей и каналов изделий	0,5 0,4 0,3	20±2	5,0 10,0 15,0
Мойка каждого инструмента в том же растворе, в котором проводили замачивание: • наружную поверхность моют при помощи щетки или тканевой (марлевой) салфетки; • внутренние открытые каналы промывают с помощью шприца	0,5 0,4 0,3	То же	2,0 2,0
Ополаскивание проточной питьевой водой (каналы – с помощью шприца или электроотсоса	Не нормируется		5,0
Ополаскивание дистиллированной водой (каналы - с помощью шприца или электроотсоса)	Не нормируется		0,5

Таблица 5

Режимы предстерилизационной очистки хирургических и стоматологических инструментов из металлов раствором средства «АНИОЗИМ СИНЕРЖИ 5» в ультразвуковой установке «Elmasonic S120H» **механизированным способом**

Этапы очистки	Режим очистки		
	Концентрация раствора средства (по препарату), %	Температура раствора средства, ^{0}С	Время обработки, мин
Ультразвуковая обработка в установке хирургических и стоматологических инструментов из металлов	0,3 0,4	35[1]	3,0 1,0
Ополаскивание проточной питьевой водой вне установки	Не нормируется		5,0
Ополаскивание дистиллированной водой вне установки	Не нормируется		0,5
Примечание: знак ([1]) означает, что температура в процессе обработки поддерживается ультразвуковой установкой.			

Таблица 6

Режимы предстерилизационной очистки хирургических и стоматологических инструментов из металлов раствором средства «АНИОЗИМ СИНЕРЖИ 5» в ультразвуковой установке «УЗВ-10/150-ТН-«РЭЛТЕК» **механизированным способом**

Этапы очистки	Режим очистки		
	Концентрация раствора средства (по препарату), %	Температура раствора средства, ^{0}С	Время обработки, мин
Ультразвуковая обработка в установке хирургических и стоматологических инструментов из металлов	0,3 0,4	40[1]	10,0 5,0
Ополаскивание проточной питьевой водой вне установки	Не нормируется		5,0
Ополаскивание дистиллированной водой вне установки	Не нормируется		0,5
Примечание: знак ([1]) означает, что температура в процессе обработки поддерживается ультразвуковой установкой.			

Таблица 7

Режимы предстерилизационной (окончательной - перед ДВУ) очистки гибких эндоскопов раствором средства «АНИОЗИМ СИНЕРЖИ 5» в установках **УДЭ-1 «КРОНТ», «Модуль эндоскопический»**

Этапы очистки	Режим очистки		
	Концентрация раствора средства (по препарату), %	Температура раствора средства, ^{0}С	Время обработки, мин
Замачивание в установке гибких эндоскопов	0,5 0,4	20±2	5,0 10,0
Ополаскивание проточной питьевой водой в установке	Не нормируется		5,0
Ополаскивание дистиллированной водой в установке	Не нормируется		0,5

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1 Все работы проводить с защитой кожи рук резиновыми перчатками.

4.2 Избегать контакта средства и рабочих растворов с кожей и слизистыми оболочками глаз.

4.3 Не допускать к работе лиц, с повышенной чувствительностью к химическим веществам и с хроническими аллергическими заболеваниями.

4.4 При случайном (аварийном) разливе средства его следует адсорбировать удерживающим жидкость веществом (ветошь, опилки, песок, силикагель) и направить на утилизацию. Остатки средства смыть большим количеством воды. При этом необходимо использовать защитную одежду и средства индивидуальной защиты: резиновый фартук, резиновые сапоги, резиновые перчатки, защитные очки.

4.5 Не допускать попадания неразбавленного продукта в сточные поверхностные или подземные воды и в канализацию.

5. МЕРЫ ПЕРВОЙ ПОМОЩИ

5.1 При попадании средства в глаза необходимо обильно промыть под струёй воды в течение 10-15 минут. Снять контактные линзы, если это легко сделать, и продолжить промывание. При необходимости обратиться к врачу.

5.2 При попадании средства на кожу смыть его под струёй воды.

5.3 При попадании в желудок необходимо дать выпить несколько стаканов чистой воды или с добавлением адсорбента (10 таблеток активированного угля

на стакан воды или любого другого заменяющего его адсорбента). При необходимости обратиться к врачу.

6. УПАКОВКА, УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

6.1 Средство необходимо хранить в упаковке производителя в сухих складских помещениях, вдали от источников тепла при температуре от плюс 5ºС до плюс 35ºС, исключая воздействие прямых солнечных лучей.

6.2 Средство пожаро- и взрывобезопасно.

6.3 Средство транспортируют всеми видами наземного транспорта в упаковке производителя, в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на каждом виде транспорта и гарантирующими сохранность продукции и тары.

7. ХИМИЧЕСКИЕ И АНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА СРЕДСТВА «АНИОЗИМ СИНЕРЖИ

7.1 По физико-химическим показателям средство должно соответствовать требованиям и нормам, указанным в таблице 8.

Таблица 8

Физико-химические характеристики и нормы средства «АНИОЗИМ СИНЕРЖИ 5»

№ п/п	Определяемые показатели, единицы измерения	Норма	НД на методы исследований	Метод исследования
Внешний вид и запах	Прозрачная жидкость синего цвета с характерным запахом		НД фирмы-изготовителя	Визуальный Органолептический
Ферментативная активность	Определение активности протеазы	Обнаружение продуктов гидролиза		Электрофорез в полиакриловом геле
Ферментативная активность	Определение активности липазы и амилазы, целлюлазы и маннаназы	Обнаружение продуктов гидролиза		Тонкослойная хроматография
1	pH концентрата	7,0-9,0		Потенциометрический
2	Плотность (при 20^0С), г/см^3	1,09-1,14		Ареометрический
3	Показатель преломления(20	1,36-1,41		Оптический
4	Массовая доля глицерина, %	18,7-21,1		Газожидкостная хроматография

7.2 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.

7.2.1 ***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.

7.2.1.1 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%.

7.2.1.2 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°С. 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.

7.2.2 ***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.

7.2.2.1 Реактивы и растворы.

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

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

Контрольный раствор моноглицеридов: 1-монолинолеоилглицерол (М 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.

7.2.2.2 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°С. Зоны локализации продуктов гидролиза липидов проявляются в виде темных пятен в средней и верхней части хроматограммы.

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

7.2.3 ***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 полиакриловом геле в присутствии додецилсульфата натрия.

7.2.3.1 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

7.2.3.2 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 (pH 8,8)	2,5 мл (pH 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.

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.

7.2.3.3 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%.

7.2.3.4 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.