

СОГЛАСОВАНО

Руководитель Испытательного
лабораторного центра
ФГУ «РНИИТО им. Р.Р.Вредена
Росмедтехнологий»
д.м.н., профессор



Г.Е. Афиногенов

«24» декабря 2007 г.



УТВЕРЖДАЮ

По поручению фирмы
«Лаборатории АНИОС», Франция

Генеральный директор
ООО «РамТЭК»



Р.Ю. Нажим

«24» декабря 2007 г.

ИНСТРУКЦИЯ №08/07А

по применению средства дезинфицирующего «Аниозим ДД1»

фирмы «Лаборатории АНИОС», Франция

в лечебно-профилактических учреждениях для
дезинфекции и предстерилизационной очистки

Санкт- Петербург
2007 год

ИНСТРУКЦИЯ
по применению средства «АНИОЗИМ ДД1»
(«Лаборатории АНИОС», Франция)
в лечебно-профилактических учреждениях
для дезинфекции и предстерилизационной очистки

Инструкция разработана в Испытательном лабораторном центре
ФГУ «РНИИТО им. Р.Р.Вредена Росмедтехнологий».
Авторы: А.Г. Афиногенова, Т.Я. Богданова, Г.Е. Афиногенов.

Инструкция предназначена для медицинского персонала
лечебно-профилактических учреждений,
работников дезинфекционных станций, других учреждений,
имеющих право заниматься дезинфекционной деятельностью.

1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1. Средство «АНИОЗИМ ДД1» представляет собой концентрат в виде прозрачной жидкости синего цвета с запахом отдушки. Содержит в своем составе в качестве действующих веществ (ДВ): N,N-дидецил-N-метил-поли(оксиэтил)аммоний пропионат /ЧАС/ - 6,3%, полигексаметиленбигуанид гидрохлорид /ПГМГ/ - 0,96%, а также функциональные компоненты – ферментный комплекс (липаза, альфа-амилаза, протеаза), ПАВ, ингибитор коррозии, краситель, отдушка, вода; pH средства – 6,0.

Срок годности средства в упаковке производителя составляет 3 года, рабочих растворов – 3 суток при условии их хранения в закрытых емкостях.

Средство выпускается в дозированных полиэтиленовых пакетах по 25 мл, полиэтиленовых флаконах емкостью 1 л с дозирующей системой, полиэтиленовых канистрах емкостью 5 л с дозирующей помпой.

1.2. Средство обладает антимикробной активностью в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий (включая возбудителей туберкулеза), вирусов (включая вирусы гепатитов, ВИЧ, полиомиелита), грибов рода Кандида и Дерматофитон.

Средство имеет хорошие моющие свойства, не портит обрабатываемые объекты, не фиксирует органические загрязнения, не вызывает коррозии металлов.

1.3. Средство «АНИОЗИМ ДД1» по параметрам острой токсичности DL_{50} при введении в желудок относится к 4 классу малоопасных веществ (ГОСТ 12.1.007-76), к 5 классу практически неопасных веществ при введении в брюшину, к 4 классу малоопасных веществ при нанесении на кожу. При однократном воздействии средство оказывает слабое местно-раздражающее действие на кожу и умеренное раздражающее действие на слизистые оболочки глаз. При ингаляционном воздействии в виде паров по степени летучести (C_{20}) средство малотоксично, не обладает кожно-резорбтивным и сенсибилизирующим эффектом.

Рабочие растворы средства не оказывают раздражающего действия на кожу, обладают слабым раздражающим действием на слизистые оболочки глаз.

ПДК ЧАС в воздухе рабочей зоны для субстанций составляет 1 мг/м^3 – 2 класс опасности (аэрозоль), требуется защита кожи и глаз.

ПДК полигексаметиленгуанидин гидрохлорида в воздухе рабочей зоны – 2 мг/м^3 , аэрозоль.

1.4. Средство «АНИОЗИМ ДД1» предназначено для применения в лечебно-профилактических учреждениях любого профиля, в том числе – в детских отделениях и отделениях неонатологии для:

- дезинфекции и предстерилизационной очистки (в том числе - совмещённых в одном процессе) изделий медицинского назначения (включая хирургические и стоматологические инструменты, в том числе вращающиеся, стоматологические материалы: стоматологические оттиски из альгината, силикона, полиэфирной смолы, зубопротезные заготовки из металлов, керамики, пластмасс и других материалов, артикуляторы из устойчивых к коррозии материалов, слепочные ложки и др.) ручным способом;

- дезинфекции и предстерилизационной очистки (в том числе - совмещённых в одном процессе) гибких и жестких эндоскопов, инструментов к ним;

- предстерилизационной очистки, в том числе - совмещенной с дезинфекцией, медицинских инструментов (включая стоматологические инструменты, в том числе вращающиеся, материалы) механизированным способом с использованием ультразвука в установках типа «УЗО» («Медэл», «Ультразэст», «Кристалл-5», «Серьга» и др.).

2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧИХ РАСТВОРОВ

Рабочие растворы средства готовят в емкости из любого материала, путем смешивания средства с питьевой водой в соответствии с расчетами, приведенными в табл. 1.

Таблица 1. Приготовление рабочих растворов средства «АНИОЗИМ ДД1»

Концентрация рабочего раствора (по препарату), %	Количество средства и воды (мл), необходимое для приготовления рабочего раствора			
	1 л		10 л	
	средство	вода	средство	вода
0,25	2,5	997,5	25	9975
0,5	5,0	995,0	50	9950

3. ПРИМЕНЕНИЕ СРЕДСТВА «АНИОЗИМ ДД1»

3.1. Растворы средства «АНИОЗИМ ДД1» используют для:

- дезинфекции и предстерилизационной очистки, в том числе совмещенных в одном процессе, изделий медицинского назначения из стекла, резин, пластмасс, металлов (включая хирургические и стоматологические инструменты, в том числе вращающиеся, стоматологические материалы, инструменты к эндоскопам) ручным и механизированным способом (с использованием ультразвука в установках типа «УЗО»); жестких и гибких эндоскопов.

Примечание: Фирма «Лаборатории АНИОС» (Франция) гарантирует совместимость средства «Аниозим ДД1» с материалами эндоскопов при соблюдении рекомендуемых условий применения.

3.2. Режимы дезинфекции и предстерилизационной очистки (в т.ч. совмещенных в одном процессе) изделий медицинского назначения (включая хирургические и стоматологические инструменты (в том числе вращающиеся) и материалы, эндоскопы и инструменты к ним) представлены в таблицах 2-8.

3.3. Приспособления наркозно-дыхательной аппаратуры полностью погружают в емкость с рабочим раствором средства. По окончании дезинфекции все приспособления промывают путем погружения в стерильную воду не менее чем на 5 минут, прокачивая воду через трубки и шланги. Приспособления высушивают с помощью стерильных тканевых салфеток.

3.4. Дезинфекцию и предстерилизационную очистку изделий медицинского назначения (в том числе совмещённых в одном процессе) проводят в пластмассовых, эмалированных (без повреждения эмали) емкостях, закрывающихся крышками. Изделия, сразу после использования (не допуская подсушивания загрязнений), полностью погружают в рабочий раствор средства, заполняя им полости и каналы и избегая образования воздушных пробок; разъемные изделия погружают в раствор в разобранном виде; инструменты с замковыми частями замачивают раскрытыми, предварительно сделав ими в растворе несколько рабочих движений для лучшего проникновения раствора в труднодоступные участки в области замка. Толщина слоя раствора над изделиями должна быть не менее 1 см. По окончании обработки изделия промывают проточной водой в течение 3-х минут. Температура рабочих растворов должна быть не менее + 18°C.

3.5. Оттиски, зубопротезные заготовки, другие стоматологические материалы до дезинфекции промывают проточной водой (без применения механических средств), соблюдая при этом противоэпидемиологические меры (используя резиновый фартук, перчатки), затем удаляют с них остатки воды (в соответствии с технологией, принятой в стоматологической практике) и обеззараживают путем погружения в емкость с раствором средства. Емкость закрывают крышкой. По окончании дезинфекции материалы промывают под проточной водой в течение 3 мин или удаляют остатки средства путем последовательного погружения в две емкости по 5 мин в каждую.

Раствор средства может быть использован многократно до изменения его внешнего вида. При этом количество оттисков, погруженных в 2 л раствора, не должно превышать 20 штук.

3.6. Предстерилизационную очистку, в том числе совмещенную с дезинфекцией, хирургических и стоматологических инструментов (в том числе вращающихся) и материалов можно осуществлять механизированным способом в установках типа УЗО («Кристалл-5», УЗО5-01-«МЕДЭЛ», «Ультразэт», «Серьга» и др.).

3.7. Очистку и дезинфекцию эндоскопов и инструментов к ним проводят с учетом требований санитарно-эпидемиологических правил СП 3.1.1275-03 «Профилактика инфекционных заболеваний при эндоскопических манипуляциях».

3.8. Предварительную очистку эндоскопов и инструментов к эндоскопам проводят с использованием 0,25% раствора средства «Аниозим ДД1». Загрязнения с внешней поверхности изделий удаляют с помощью тканевой (марлевой) салфетки, смоченной данным раствором; каналы инструментов к эндоскопам промывают с помощью шприца или иного приспособления. Каналы эндоскопов промывают водой.

3.9. Предстерилизационную очистку эндоскопов и инструментов к ним, а также окончательную очистку эндоскопов средством «Аниозим ДД1» проводят после их предварительной очистки.

3.10. Дезинфекцию, совмещенную с предстерилизационной очисткой, эндоскопов и инструментов к ним после инфекционного больного проводят по режиму, рекомендованному для соответствующей инфекции, с учетом требований противоэпидемического режима для инфекционных стационаров.

3.11. Рабочие растворы средства можно применять для дезинфекции и предстерилизационной очистки изделий (в том числе - совмещенной с дезинфекцией) многократно (в течение срока годности) до появления первых признаков изменения их внешнего вида по сравнению с первоначальным (изменение цвета, помутнение раствора и т.п.)

3.12. Контроль качества предстерилизационной очистки изделий проводят путем постановки азопирамовой или амидопириновой пробы на наличие остаточных количеств крови согласно методикам, изложенным 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 дезинфекции растворами средства «АНИОЗИМ ДД1» при инфекциях бактериальной (включая туберкулез), вирусной (включая вирусные гепатиты, ВИЧ, полиомиелит) и грибковой (включая кандидозы и дерматофитии) этиологии ручным способом

Обрабатываемые объекты		Концентрация рабочего раствора (по препарату), %	Время обеззараживания (мин)						Способ обработки
			Бактериальные (кроме туберкулеза) инфекции	туберкулез	Вирусные инфекции, кроме полиомиелита	Вирусные инфекции, включая полиомиелит	Кандидозы	Дерматофитии	
Изделия медицинского назначения из резин, стекла, пластмасс, металлов	изделия без каналов, полостей и замковых частей	0,25 0,5	10 5	- 15	- 10	- 20	15 5	- 20	Погружение
	изделия с каналами, полостями и замковыми частями	0,25 0,5	20 5	- 20	- 15	- 30	30 5	- 30	
	эндоскопы	0,25 0,5	10 5	- 20	- 15	- 30	15 5	- 30	
	элементы наркозно-дыхательной аппаратуры	0,25 0,5	10 5	- 20	- 15	- 30	15 5	- 30	
	Стоматологические материалы	0,25 0,5	10 5	- 15	- 10	- 20	15 5	- 20	

Таблица 3. Режимы дезинфекции, совмещенной с предстерилизационной очисткой, изделий медицинского назначения (включая хирургические, инструменты к эндоскопам, стоматологические инструменты, в том числе вращающиеся, и материалы) растворами средства «АНИОЗИМ ДД1»

Этапы обработки	Режимы обработки		
	Концентрация рабочего раствора (по препарату), %	Температура рабочего раствора, °С	Время выдержки/обработки, мин
Замачивание * изделий при полном погружении в рабочий раствор и заполнении им полостей и каналов:			
- изделий простой конфигурации (без каналов и полостей), стоматологических материалов	0,5	не менее 18	5* 20***
- изделий, имеющих замковые части, каналы и полости, зеркал с амальгамой	0,5		20** 30***
- инструментов к эндоскопам	0,5		20** 30***
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 замковые части, каналы или полости; • изделий, имеющих замковые части, каналы или полости	0,5	Не регламентируются	1,0 3,0
Ополаскивание проточной питьевой водой (каналы - с помощью шприца или электроотсоса)	Не нормируется		3,0
Ополаскивание дистиллированной водой (каналы - с помощью шприца или электроотсоса)	Не нормируется		1,0

Примечания:

* на этапе замачивания изделий в рабочем растворе обеспечивается их дезинфекция в отношении возбудителей инфекций бактериальной (кроме туберкулеза) и грибковой (кандидозы) этиологии.

** на этапе замачивания изделий в рабочем растворе обеспечивается их дезинфекция в отношении возбудителей инфекций бактериальной (включая туберкулез), вирусной (кроме полиомиелита) и грибковой (кандидозы) этиологии.

*** на этапе замачивания изделий в рабочем растворе обеспечивается их дезинфекция в отношении возбудителей инфекций бактериальной (включая туберкулез), вирусной (включая гепатиты, ВИЧ-инфекцию, полиомиелит) и грибковой (кандидозы и дерматофитии) этиологии.

Таблица 4. Режимы дезинфекции, совмещенной с предстерилизационной (окончательной) очисткой, гибких и жестких эндоскопов раствором средства «АНИОЗИМ ДД1»

Этапы обработки	Режимы обработки		
	Концентрация рабочего раствора (по препарату), %	Температура рабочего раствора, °С	Время выдержки/ обработки, мин
Замачивание * изделий (у не полностью погружаемых эндоскопов – их рабочих частей, разрешенных к погружению) при полном погружении в рабочий раствор средства и заполнении им полостей и каналов	0,5	Не менее 18	5*
	0,5		20 **
	0,5		30 ***
Мойка каждого эндоскопа в том же растворе, в котором проводили замачивание:	В соответствии с концентрацией раствора, использованного на этапе замачивания	То же	
ГИБКИЕ ЭНДОСКОПЫ:			
• инструментальный канал очищают щеткой для очистки инструментального канала;			
• внутренние каналы промывают при помощи шприца или электроотсоса;			
• наружную поверхность моют при помощи марлевой (тканевой) салфетки.			
ЖЕСТКИЕ ЭНДОСКОПЫ:	В соответствии с концентрацией раствора, использованного на этапе замачивания		
• каждую деталь моют при помощи ерша или марлевой (тканевой) салфетки.			
• каналы промывают при помощи шприца.			
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

Примечание:

* на этапе замачивания изделий в рабочем растворе обеспечивается их дезинфекция в отношении возбудителей инфекций бактериальной (кроме туберкулеза) и грибковой (кандидозы) этиологии.

** на этапе замачивания изделий в рабочем растворе обеспечивается их дезинфекция в отношении возбудителей инфекций бактериальной (включая туберкулез), вирусной (кроме полиомиелита) и грибковой (кандидозы) этиологии.

*** на этапе замачивания изделий в рабочем растворе обеспечивается их дезинфекция в отношении возбудителей инфекций бактериальной (включая туберкулез), вирусной (включая гепатиты, ВИЧ-инфекцию, полиомиелит) и грибковой (кандидозы) этиологии.

Таблица 5. Режимы предстерилизационной очистки, не совмещенной с дезинфекцией, изделий медицинского назначения (включая хирургические, стоматологические инструменты, в том числе вращающиеся, и материалы, инструменты к эндоскопам) растворами средства «АНИОЗИМ ДД1»

Этапы при проведении очистки	Режимы очистки		
	Концентрация рабочего раствора (по препарату), %	Температура рабочего раствора, °С	Время выдержки/ обработки, мин
Замачивание изделий при полном погружении их в рабочий раствор средства и заполнении им полостей и каналов изделий:		Не менее 18	
- из металлов, стекла, пластика простой конфигурации	0,5		5
- имеющих замковые части, каналы и полости, инструментов к эндоскопам, стоматологических инструментов и материалов			10
- зеркал с амальгамой			15
Мойка каждого изделия в том же растворе, в котором проводили замачивание, с помощью ерша, щетки ватно-марлевого тампона или тканевой (марлевой) салфетки, каналов изделий - при помощи шприца: • изделий, не имеющих замковых частей, каналов или полостей • изделий, имеющих замковые части, каналы или полости	То же	То же	1,0 3,0
Ополаскивание проточной питьевой водой (каналы - с помощью шприца или электроотсоса)	Не нормируется		3,0
Ополаскивание дистиллированной водой (каналы - с помощью шприца или электроотсоса)	Не нормируется		0,5

Таблица 6. Режимы предстерилизационной (окончательной) очистки, не совмещенной с дезинфекцией, гибких и жестких эндоскопов раствором средства «АНИОЗИМ ДД1»

Этапы при проведении очистки	Режимы очистки		
	Концентрация рабочего раствора (по препарату), %	Температура рабочего раствора, °С	Время выдержки/ обработки, мин
Замачивание изделий (у не полностью погружаемых эндоскопов – их рабочих частей, разрешенных к погружению) при полном погружении в рабочий раствор средства и заполнении им полостей и каналов	0,5	Не менее 18	10
Мойка каждого эндоскопа в том же растворе, в котором проводили замачивание:	0,5	То же	
ГИБКИЕ ЭНДОСКОПЫ:			
• инструментальный канал очищают щеткой для очистки инструментального канала;			2,0
• внутренние каналы промывают при помощи шприца или электроотсоса;			3,0
• наружную поверхность моют при помощи марлевой (тканевой) салфетки.			1,0
ЖЕСТКИЕ ЭНДОСКОПЫ:			
• каждую деталь моют при помощи ерша или марлевой (тканевой) салфетки;			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 7. Режим дезинфекции, совмещенной с предстерилизационной очисткой, хирургических (включая инструменты к эндоскопам), стоматологических инструментов (включая вращающиеся) и материалов раствором средства «АНИОЗИМ ДД1» механизированным способом (с использованием ультразвука в установках типа «УЗО» - «Кристалл-5», УЗО5-01-«МЕДЭЛ», «Ультразст», «Серьга» и др.)

Этапы обработки	Режимы обработки		
	Концентрация рабочего раствора (по препарату), %	Температура рабочего раствора, °С	Время выдержки/обработки, мин
Ультразвуковая обработка* при полном погружении изделий в рабочий раствор и заполнении им полостей и каналов	0,5	Не менее 18	10
Ополаскивание проточной питьевой водой вне установки	Не нормируется		5
Ополаскивание дистиллированной водой вне установки			1

Примечание: * на этапе ультразвуковой обработки изделий в рабочем растворе обеспечивается их дезинфекция при вирусных, бактериальных (включая туберкулез) и грибковых (кандидозы и дерматофитии) инфекциях.

Таблица 8. Режим предстерилизационной очистки хирургических (включая инструменты к эндоскопам), стоматологических инструментов (включая вращающиеся) и материалов раствором средства «АНИОЗИМ ДД1» механизированным способом (с использованием ультразвука в установках типа «УЗО» - «Кристалл-5», УЗО5-01-«МЕДЭЛ», «Ультразст», «Серьга» и др.)

Этапы обработки	Режимы обработки		
	Концентрация рабочего раствора (по препарату), %	Температура рабочего раствора, °С	Время выдержки/ обработки, мин
Ультразвуковая обработка при полном погружении изделий в рабочий раствор и заполнении им полостей и каналов	0,25	Не менее 18	10
	0,5		5
Ополаскивание проточной питьевой водой вне установки	Не нормируется		5
Ополаскивание дистиллированной водой вне установки			1

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Не допускать к работе лиц с повышенной чувствительностью к химическим средствам и аллергическими заболеваниями.

4.2. Избегать попадания концентрата в глаза и на кожу.

4.3. Все работы со средством следует проводить с защитой кожи рук перчатками.

4.4. Емкости со средством, предназначенные для обработки объектов способом погружения, должны быть закрыты.

4.5. Обработку изделий рабочими растворами можно проводить без средств защиты органов дыхания в присутствии людей.

4.6. При случайной утечке средства его следует адсорбировать удерживающим жидкость веществом (песок, опилки), собрать и направить на утилизацию, или разбавить разлившееся средство большим количеством воды.

4.7. При уборке пролившегося средства персоналу следует использовать индивидуальную спецодежду, сапоги, перчатки резиновые или из полиэтилена, защитные очки.

4.8. Не допускать попадания неразбавленного средства в сточные - поверхностные или подземные воды и в канализацию!

5. МЕРЫ ПЕРВОЙ ПОМОЩИ ПРИ СЛУЧАЙНОМ ОТРАВЛЕНИИ

5.1. При несоблюдении мер предосторожности и при попадании концентрата средства в глаза и на кожу возможно проявление местно-раздражающего действия в виде гиперемии и отека слизистой оболочки глаз, слезотечения, эритемы на коже.

5.2. При попадании средства на кожу смыть его большим количеством воды.

5.3. При попадании средства в глаза следует **немедленно** промыть их под струей воды в течение 10-15 минут, при появлении гиперемии - закапать 30% раствор сульфацила натрия. Обязательно обратиться к окулисту.

5.4. При попадании средства в желудок дать выпить пострадавшему несколько стаканов воды с 10-20 измельченными таблетками активированного угля. Рвоту не вызывать! При необходимости обратиться к врачу.

6. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

6.1. Хранить средство при температуре от плюс 5 до плюс 35°C. Средство следует хранить отдельно от лекарственных препаратов в местах, недоступных детям.

6.2. Средство можно транспортировать любым видом транспорта в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на каждом виде транспорта и гарантирующими сохранность средства и тары.

7. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И АНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА СРЕДСТВА «АНИОЗИМ ДД1»

7.1. Дезинфицирующее средство «АНИОЗИМ ДД1» контролируется по следующим показателям качества: внешний вид, цвет, запах, плотность, показатель концентрации водородных ионов (pH), ферментативная активность энзимного комплекса, массовая доля ЧАС (таблица 9).

Таблица 9. Показатели качества дезинфицирующего средства «АНИОЗИМ ДД1»

Показатели	Норма
Внешний вид	прозрачная жидкость
Цвет	синий
Запах	отдушки
рН средства	6,0
Плотность при 20°C, г/см ³	1,098 ± 0,0013
Массовая доля ЧАС, %	6,3 ± 0,63
Ферментативная активность энзимного комплекса (протеаза, липаза, альфа-амилаза)	Определение ферментативной активности

7.2. Определение внешнего вида, цвета и запаха.

Внешний вид и цвет средства «АНИОЗИМ ДД1» определяют визуально. Для этого в пробирку из бесцветного стекла, внутренним диаметром 30-32 мм, вместимостью 50 см наливают средство до половины и просматривают в отраженном или проходящем свете.

Запах оценивают органолептически.

7.3. Определение плотности при 20°C.

Определение плотности при 20°C проводят с использованием одного из двух методов, описанных в Государственной Фармакопее СССР XI издания (выпуск I, с. 24): метода I с помощью пикнометра, либо метода 2 с помощью ареометра.

7.4. Определение показателя концентрации водородных ионов (рН).

рН препарата определяют потенциометрически в соответствии с Государственной Фармакопеей СССР XI издания (выпуск 1, с.113).

7.5. Определение массовой доли N,N-дидецил-N-метил-поли(оксиэтил)аммоний пропионата.

7.5.1. Оборудование и реактивы.

Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104-2001 2 класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г.

Бюретка 1-1-2-25-0,1 по ГОСТ 29251-91.

Колбы мерные 2-100-2 по ГОСТ 1770-74.

Колба Кн-1-250-29/32 по ГОСТ 25336-82 со шлифованной пробкой.

Цилиндры 1-25,1-50,1-100 по ГОСТ 1770-74.

Додецилсульфат натрия по ТУ 6-09-64-75.

Цетилпиридиний хлорид 1-водный с содержанием основного вещества не менее 99%;

0,004 н. водный раствор.

Эозин Н по ТУ 6-09-183-75.

Метиленовый голубой по ТУ 6-09-29-76.

Кислота уксусная по ГОСТ 61-75.

Спирт этиловый ректификованный технический по ГОСТ 18300-87.

Хлороформ по ГОСТ 20015-88.

Кислота серная по ГОСТ 4204-77.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72.

7.5.2. Подготовка к анализу.

7.5.2.1. Приготовление 0.004 н. водного раствора додецилсульфата натрия

0,115 г додецилсульфата натрия (в пересчете на 100% содержания основного вещества) растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 100 см³ с доведением объема до метки водой.

7.5.2.2. Приготовление смешанного индикатора

Раствор 1. В мерном цилиндре 0,11 г эозина Н растворяют в 2 см³ воды, прибавляют 0,5 см³ уксусной кислоты, объем доводят этиловым спиртом до 40 см³ и перемешивают.

Раствор 2. 0,008 г метиленового голубого растворяют в 17 см³ воды и прибавляют небольшими порциями 3,0 см³ концентрированной серной кислоты, перемешивают и охлаждают.

Раствор смешанного индикатора готовят смешиванием раствора 1 и раствора 2 в объемном соотношении 4:1 в количествах, необходимых для использования в течение трехдневного срока. Полученный раствор хранят в склянке из темного стекла не более 3 дней.

7.5.2.3. Определение поправочного коэффициента раствора додецилсульфата натрия

Поправочный коэффициент определяют двухфазным титрованием раствора додецилсульфата натрия 0,004 н. раствором цетилпиридиний хлорида, приготовляемым растворением 0,1439 г цетилпиридиний хлорида 1-водного в 100 см³ дистиллированной воды (раствор готовят в мерной колбе вместимостью 100 см³).

К 10 см³ раствора додецилсульфата натрия в конической колбе или цилиндре с притертой пробкой прибавляют 15 см³ хлороформа, 2 см³ раствора смешанного индикатора и 30 см³ воды. Закрывают пробку и встряхивают. Содержимое колбы титруют раствором цетилпиридиний хлорида 1-водного, интенсивно встряхивая в закрытой колбе, до перехода синей окраски нижнего хлороформного слоя в фиолетово-розовую.

7.5.3. Выполнение анализа.

Навеску анализируемого средства «АНИОЗИМ ДД1» от 0,5 до 0,7 г, взятую с точностью до 0,0002 г, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и объем доводят дистиллированной водой до метки.

В коническую колбу, либо в цилиндр с притертой пробкой вносят 5 см³ раствора додецилсульфата натрия, прибавляют 15 см³ хлороформа, 2 см³ смешанного индикатора и 30 см³ дистиллированной воды. Полученную двухфазную систему титруют приготовленным раствором анализируемой пробы средства «АНИОЗИМ ДД1» при интенсивном встряхивании в закрытой колбе до перехода окраски нижнего хлороформного слоя в фиолетово-розовую.

7.5.4. Обработка результатов.

Массовую долю N,N-дидецил-N-метил-поли(оксиэтил)аммоний пропионата (X) в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{0,00145 \cdot V \cdot K \cdot 100}{m \cdot V_1}$$

где 0,00145 - масса N,N-дидецил-N-метил-поли(оксиэтил)аммоний пропионата, соответствующая 1 см³ раствора додецилсульфата натрия концентрации (точно) С (C₁₂H₂₅SO₄Na) = 0,004 моль/дм³, (0,004 н.); г/см³;

V - объем титруемого раствора додецилсульфата натрия концентрации С (C₁₂H₂₅SO₄Na) =

0,004 моль/дм³, (0,004 н.), г/см³, равный 5 см³;

K - поправочный коэффициент раствора додецилсульфата натрия (C₁₂H₂₅SO₄Na) концентрации С = 0,004 моль/дм³;

100 – объём приготовленного раствора анализируемой пробы, см³;

V₁ - объём раствора средства «АНИОЗИМ ДД1», израсходованный на титрование, см³;

m - масса анализируемой пробы, г.

За результат анализа принимают среднее арифметическое 3-х определений, расхождение между которыми не должно превышать допустимое расхождение, равное 0,2%.

Допускаемая относительная суммарная погрешность результата анализа $\pm 2,5\%$ при доверительной вероятности 0,95.

7.6. 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.

7.6.1. 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.

7.6.1.1. 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 0,25 мм 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%.

7.6.1.2. 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.

7.6.2. 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.

7.6.2.1. Реактивы и растворы.

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

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

Контрольный раствор моноглицеридов: 1-моноглицерин (М 7640 Сигма); раствор в абсолютном этаноле с массовой долей 0,1%.

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

Этанол абсолютный.

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.

7.6.2.2. 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 R_f триолеина и продуктов гидролиза в пробе и R_f триолеина в контрольном растворе.

7.6.3. 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 полиакриловом геле в присутствии додецилсульфата натрия.

7.6.3.1. 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

7.6.3.2. 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 (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.

7.6.3.3. 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%.

7.6.3.4. 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.

7.7. Определение массовой доли полигексанида.

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

7.7.1. 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.

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.

7.7.2. Приготовление градуировочных смесей.

Основную градуировочную 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 градуировочной 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 градуировочной смеси.

7.7.3. 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.

7.7.3. Обработка результатов.

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

$$X = \frac{S_{\text{пр}} * C * a * V}{S_{\text{г.с}} * m_{\text{пр}}}$$

где $S_{\text{пр}}$ и $S_{\text{г.с}}$ - 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;

$m_{\text{пр}}$ - 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%.