



Генеральный Директор ООО «НОРДКЕА»

УТВЕРЖДАЮ

А. И. Петрова

«21» марта 2023 г.

**ИНСТРУКЦИЯ № 03/23
по применению средства
«ЭНЗИМЕКС ЛД» («ENZYMEX LD»)
производства фирмы «Франклаб» (Франция)
для предстерилизационной очистки**

2023 год

ИНСТРУКЦИЯ № 03/23

по применению средства «ЭНЗИМЕКС ЛД» («Франклаб», Франция) в лечебно-профилактических учреждениях для предстерилизационной очистки

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

1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1. Средство «ЭНЗИМЕКС ЛД» (ENZYMEX LD) (далее – средство) представляет собой прозрачную, не пенящуюся жидкость желтого 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 биodeградируемые хелатные агенты, краситель и воду.

Средство не содержит летучих органических веществ.

pH средства: $7,3 \pm 1$

Срок годности средства – 3 года в невскрытой упаковке производителя и 6 месяцев после ее вскрытия.

Срок годности рабочих растворов средства – 14 суток.

Средство выпускают в полимерных емкостях вместимостью 1 л с дозатором, в пластиковых канистрах вместимостью 5 и 10 л.

1.1.1. 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.

1.1.2. 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.

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

1.2. Средство «ЭНЗИМЕКС ЛД» предназначено для использования в лечебно-профилактических учреждениях любого 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» и др.), а также в моечно-дезинфицирующих машинах с функцией дезинфекции и/или термической дезинфекции;
- предварительной, предстерилизационной (окончательной) очистки эндоскопов ручным и механизированным (с использованием установок типа «КРОНТ-УДЭ», «Модульных систем для очистки, дезинфекции, ДВУ и стерилизации эндоскопов» и др.) способами;
- предварительной и предстерилизационной очистки инструментов к эндоскопам ручным и механизированным способом с применением ультразвука в ультразвуковых установках, зарегистрированных в установленном порядке (установки типа «УЗВ-10/150-ТН-«РЭЛТЕК», «Elmasonic S120H», «Кристалл- 5» и др.);
- окончательной (перед ДВУ) очистки эндоскопов, включая ультразвуковые эндоскопы, механизированным (автоматизированным) способом в установках для обработки эндоскопов (МДМ/репроцессоры) типа «CYW-100 N», «OER-A», «OER-AW», «ENDOCLENS-NSX», «DSD 201», «AORT ENDOCLEANER», «DETROWASH», «MT-5000L/L1/S» а также в установках других марок при условии обеспечения ими режима обработки, предусмотренного настоящей инструкцией.

2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧИХ РАСТВОРОВ «ЭНЗИМЕКС ЛД»

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 (**таблица 1**).

2.2. При механизированном способе обработки эндоскопов в установках для обработки эндоскопов (МДМ/репроцессоры) типа «CYW-100 N», «OER-A», «OER-AW», «ENDOCLENS-NSX», «DSD 201», «AORT ENDOCLEANER», «DETROWASH», «MT-5000L/L1/S» и в установках других марок необходимое количество средства добавляют в резервуар установки (в соответствии с «Руководством по эксплуатации» производителя машины), или канистру со средством «ЭНЗИМЕКС ЛД» подсоединяют к МДМ/репроцессору с помощью дозирующего насоса или через центральную дозирующую станцию. Приготовление рабочих растворов средства осуществляется машиной автоматически.

2.3. При механизированном способе обработки медицинских изделий в моющих и моюще-дезинфицирующих машинах с функцией дезинфекции и/или термической дезинфекции приготовление растворов производится автоматически (в соответствии с Руководством по эксплуатации машины) дозирующей системой используемой установки в концентрациях 0,3 % – 0,5 % (по препарату).

2.4. Рабочие растворы средства для установок «УДЭ-1 «КРОНТ», «Модульных систем», «УЗВ 10/150-ТН-«РЭЛТЕК», «Elmasonic S120H», «Кристалл-5» готовят

непосредственно в ваннах установок путем добавления соответствующих количеств средства к питьевой воде (таблица 1).

Таблица 1. Приготовление рабочих растворов средства «ЭНЗИМЕКС ЛД»

Концентрация рабочего раствора (по препарату), %	Количества средства «ЭНЗИМЕКС ЛД» и воды, необходимые для приготовления рабочего раствора объемом:			
	1л		10л	
	Средство, мл	Вода, мл	Средство, мл	Вода, мл
0,3	3,0	997,0	30,0	9970,0
0,4	4,0	996,0	40,0	9960,0
0,5	5,0	995,0	50,0	9950,0
1,0	10,0	990,0	100,0	9900,0

3. ПРИМЕНЕНИЕ «ЭНЗИМЕКС ЛД» ДЛЯ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ, ПРЕДСТЕРИЛИЗАЦИОННОЙ (ОКОНЧАТЕЛЬНОЙ ПЕРЕД ДВУ) ОЧИСТКИ ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ, ВКЛЮЧАЯ ЭНДОСКОПЫ И ИНСТРУМЕНТЫ К НИМ

3.1. Предстерилизационную очистку медицинских изделий проводят после их дезинфекции любым зарегистрированным на территории ЕАЭС 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 в соответствии с Инструкцией (методическими указаниями) по применению конкретного средства.

3.2. Очистку эндоскопов и инструментов к ним проводят с учетом требований санитарно-эпидемиологических правил или другой действующей нормативной документации.

3.3. 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 им всех каналов и полостей и 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 в растворе несколько рабочих движений для лучшего проникновения его в труднодоступные участки изделий в области замка.

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

3.5. Предварительную очистку эндоскопов осуществляют согласно требованиям санитарно-эпидемиологических правил или другой действующей нормативной документации, используя 0,3% (по препарату) раствор средства.

3.6. Окончательную очистку (перед ДВУ) эндоскопов ручным способом проводят в соответствии с режимами, указанными в **таблице 3**.

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

3.8. Предстерилизационную (окончательную – перед ДВУ) очистку эндоскопов механизированным (автоматизированным) способом проводят в установках для дезинфекции гибких эндоскопов типа «CYW-100 N», «OER-A», «OER-AW», «ENDOCLENS-NSX», «DSD 201», «AORT ENDOCLEANER», «DETROWASH», «MT-5000L/L1/S», а также в установках других марок в соответствии с инструкцией по эксплуатации используемого оборудования по режимам, указанным в **таблице 5**.

3.9. Предстерилизационную (окончательную – перед ДВУ) очистку гибких эндоскопов в установках «УДЭ-1 «КРОНТ», «Модульных системах», проводят в соответствии с 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 режимами, указанными в **таблице 6**.

3.11. Предстерилизационную очистку медицинских изделий (в том числе – микрохирургических), стоматологических (в том числе – вращающихся) инструментов, а также очистку принадлежностей анестезиологической аппаратуры, лабораторной посуды, изделий из стекла, хирургической обуви, бутылочек для детского питания и др. в моечно-дезинфицирующих машинах с функцией дезинфекции и/или термической дезинфекции проводят в концентрации не менее 0,3%.

3.11.1. Средство «ЭНЗИМЕКС ЛД» применяют для предстерилизационной очистки перечисленных в п. 3.11. изделий медицинского назначения и объектов в моющих и моюще-дезинфицирующих машинах в диапазоне температур от 40°C до 60°C при экспозиции в соответствии с Инструкцией по эксплуатации соответствующей машины.

3.11.2. Обрабатываемые предметы в моющих и моюще-дезинфицирующих машинах должны быть расположены таким образом, чтобы все поверхности могли омываться водой. Обрабатываемые предметы не должны укладываться вплотную и взаимно перекрываться. Для этой цели используются специальные поддоны, стойки, кассеты и сетчатые корзины, входящие в комплект машины.

Разъемные медицинские металлические инструменты укладывают в корзины в разобранном виде; инструменты, имеющие замковые части размещают раскрытыми. Пустотелые сосуды (лабораторная посуда, бутылочки для детского питания и т. п.) должны быть установлены в соответствующие приспособления, отсеки или вставки отверстиями вниз таким образом, чтобы вода могла беспрепятственно поступать и вытекать через отверстия.

3.11.3. Программу, необходимую для обработки изделий определенных видов выбирают, руководствуясь Инструкцией по эксплуатации соответствующей машины. Предстерилизационную очистку хирургических, стоматологических инструментов,

принадлежностей анестезиологической аппаратуры, лабораторной посуды и изделий из стекла проводят в режиме до 60°C.

3.11.4. Предстерилизационную очистку хирургической обуви, медицинских инструментов, детских бутылочек и лабораторной посуды из термолабильных материалов, инструментов, сильно загрязненных кровью, проводят в моечных и моечно-дезинфицирующих машинах по стандартным (универсальным) программам для этих изделий, указанным в Инструкциях по эксплуатации машин в режимах обработки до 60°C.

3.11.5. Отмыв обрабатываемых изделий и объектов от остаточных количеств средства «ЭНЗИМЕКС ЛД» производится в автоматическом режиме работы машины на этапе ополаскивания. Достаточным для удаления до безопасного уровня остаточных количеств средства является ополаскивание в течение не менее 3 минут.

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

3.13. Контроль качества предстерилизационной очистки проводят путем постановки азопирамовой или амидопириновой пробы на наличие остаточных количеств крови согласно методикам, изложенным в соответствующей нормативной документации. 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) раствором средства «ЭНЗИМЕКС ЛД» ручным способом

Этапы очистки	Режим очистки		
	Концентрация раствора (по препарату), %	Температура раствора, °С	Время выдержки/обработки, мин.
Замачивание изделий при полном погружении их в рабочий раствор и заполнении им полостей и каналов изделий	0,3	20±2	15,0
	0,4		10,0
	0,5		5,0
	1,0		3,0
Мойка каждого изделия в том же растворе, в котором проводили замачивание, с помощью ерша, щетки, ватно-марлевого тампона или тканевой (марлевой) салфетки, каналов – с помощью шприца: <ul style="list-style-type: none"> • изделия, не имеющие замковых частей, каналов или полостей, в том числе вращающиеся • изделия, имеющие 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	20±2	0,5
			1,0
			1,5
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 3. Режимы предстерилизационной (окончательной – перед ДВУ) очистки гибких и жестких эндоскопов растворами средства «ЭНЗИМЕКС ЛД» ручным способом

Этапы очистки	Режим очистки		
	Концентрация раствора (по препарату), %	Температура раствора, °С	Время выдержки/ обработки, мин.
<p>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</p> <ul style="list-style-type: none"> гибкие эндоскопы жесткие эндоскопы 	<p>0,4 0,5 0,5</p>	<p>20±2</p>	<p>15,0 10,0 5,0</p>
<p>Мойка каждого эндоскопа в том же растворе, в котором проводили замачивание:</p> <p> ГИБКИЕ ЭНДОСКОПЫ:</p> <ul style="list-style-type: none"> инструментальный канал очищают щеткой для очистки инструментального канала внутренние каналы промывают при помощи шприца или электроотсоса наружную поверхность моют при помощи тканевой (марлевой) салфетки <p> ЖЕСТКИЕ ЭНДОСКОПЫ:</p> <ul style="list-style-type: none"> каждую деталь моют при помощи ерша или тканевой (марлевой) салфетки каналы промывают при помощи шприца 	<p>В соответствии с концентрацией раствора, использованного на этапе замачивания</p>	<p>20±2</p>	<p>2,0 3,0 1,0 2,0 2,0</p>
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

Таблица 4. Режимы предстерилизационной очистки инструментов к эндоскопам растворами средства «ЭНЗИМЕКС ЛД» ручным способом

Этапы очистки	Режим очистки		
	Концентрация раствора (по препарату), %	Температура раствора, °С	Время выдержки/обработки, мин.
Замачивание инструментов при полном погружении их в раствор средства и заполнении им полостей и каналов изделий при помощи шприца	0,3	20±2	15,0
	0,4		10,0
	0,5		5,0
	0,1		3,0
Мойка каждого инструмента в том же растворе, в котором проводили замачивание: <ul style="list-style-type: none"> • наружную поверхность моют при помощи щетки или тканевой (марлевой) салфетки; • внутренние открытые каналы промывают с помощью шприца 	В соответствии с концентрацией раствора, использованного на этапе замачивания	20±2	2,0 1,5
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

Таблица 5. Режимы окончательной очистки гибких эндоскопов раствором средства «ЭНЗИМЕКС ЛД» механизированным способом в моечно-дезинфицирующих машинах (МДМ/репроцессорах) «CYW-100 N», «OER-A», «OER-AW», «ENDOCLENS-NSX», «DSD 201», «AORT ENDOCLEANER», «DETROWASH», «MT-5000L/L1/S», а также в установках других марок

Этапы очистки	Режим очистки		
	Концентрация раствора (по препарату), %	Температура раствора, °С	Время выдержки/обработки, мин.
Мойка всех каналов гибкого эндоскопа	Не менее 0,1*	Не менее 18	Не менее 1,0*
Ополаскивание проточной питьевой водой в установке	Не нормируется		

Примечание*: средство, по желанию пользователя, чтобы не проводить перенастройку МДМ, может быть использовано в той концентрации и при том времени обработки, на которые настроена машина (но не менее 0,1% и менее 1,0 минуты).

Таблица 6. Режимы предстерилизационной очистки хирургических и стоматологических инструментов из металлов растворами средства «ЭНЗИМЕКС ЛД» механизированным способом с использованием ультразвука в УЗ установках (типа «УЗВ-10/150-ТН-«РЭЛТЕК», «Elmasonic S120H», «Кристалл-5»)

Этапы очистки	Режим очистки		
	Концентрация раствора (по препарату), %	Температура раствора, °С	Время выдержки/ обработки, мин.
Ультразвуковая обработка в установке хирургических и стоматологических инструментов из металлов	0,3	Не менее 18	10,0
	0,4		5,0
Ополаскивание проточной питьевой водой вне установки	Не нормируется		3,0
Ополаскивание дистиллированной водой вне установки	Не нормируется		0,5

Таблица 7. Режимы предстерилизационной (окончательной – перед ДВУ) очистки гибких эндоскопов растворами средства «ЭНЗИМЕКС ЛД» в установках «УДЭ-1 КРОНТ», «Модуль эндоскопический»

Этапы очистки	Режим очистки		
	Концентрация раствора (по препарату), %	Температура раствора, °С	Время выдержки/ обработки, мин.
Замачивание в установке гибких эндоскопов	04	Не менее 18	10,0
	0,5		5,0
Ополаскивание проточной питьевой водой в установке	Не нормируется		3,0
Ополаскивание дистиллированной водой в установке	Не нормируется		1,0

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.** Во время работы запрещается пить, принимать пищу и курить.
- 4.3.** Избегать попадания концентрата в глаза и на кожу.
- 4.4.** Все работы со средством следует проводить с защитой кожи рук резиновыми перчатками.
- 4.5.** При случайной утечке средства его следует адсорбировать удерживающим жидкость веществом (песок, опилки), собрать и направить на утилизацию, или разбавить разлившееся средство большим количеством воды.
- 4.6.** При уборке пролившегося средства персоналу следует использовать индивидуальную спецодежду, сапоги, перчатки (резиновые или из полиэтилена), защитные очки.
- 4.7.** Не допускать попадания неразбавленного средства в сточные (поверхностные или подземные) воды и в канализацию.
- 4.8.** Средство необходимо хранить отдельно от лекарственных препаратов в местах, недоступных детям.
- 4.9.** Не использовать по истечении срока годности.

5. МЕРЫ ПЕРВОЙ ПОМОЩИ

- 5.1.** При попадании средства в глаза необходимо обильно промыть их 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 ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

- 6.1.** Средство «ЭНЗИМЕКС ЛД» должно быть упаковано в оригинальную тару предприятия-изготовителя.
- 6.2.** Средство транспортируют всеми видами транспорта в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на данном виде транспорта, в крытых транспортных средствах и в условиях, обеспечивающих сохранность средства и упаковки, при температуре от плюс +5°C до +35°C.
- 6.3.** Средство хранят в вертикальном положении в упаковке изготовителя в крытом вентилируемом складском помещении при температуре от плюс +5°C до +35°C, отдельно от лекарственных препаратов, продуктов питания, вдали от источников тепла, в защищенном от прямых солнечных лучей и в недоступном для детей месте.

7. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И АНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА СРЕДСТВА

7.1. Средство «ЭНЗИМЕКС ЛД» контролируется по показателям качества, указанным в таблице 18.

Таблица 18. Показатели качества дезинфицирующего средства «ЭНЗИМЕКС ЛД»

№ п/п	Наименование показателей	Нормы
1	Внешний вид	прозрачная жидкость
2	Цвет	желтый
3	Запах	характерный запах
4	Плотность при 20°C, г/см ³	1,045-1,085
5	Пенообразование	отсутствие пены
6	Показатель активности водородных ионов (рН)	7,3 ±1
7	Ферментативная активность ферментативного комплекса	определение ферментативной активности

7.1.1. Определение внешнего вида.

Внешний вид средства оценивают визуально. Для этого около 25 см³ средства наливают через воронку В-36-80ХС ГОСТ 25336 в сухую пробирку П2Т-31-115ХС ГОСТ 25336 и рассматривают в проходящем свете.

7.1.2. Определение плотности при 20°C, г/см³.

Определение плотности проводят по ГОСТ 18995.1.-73 гравиметрическим методом с помощью ареометра по ГОСТ 18995.1-73 «Продукты химические жидкие. Методы определения плотности».

7.1.3. Определение способности к пенообразованию.

Определение способности к пенообразованию производится путем визуального контроля жидкого средства (или его раствора) на наличие пены после его встряхивания. При тесте на «отсутствие пенообразования» на поверхности жидкости (или в самой жидкости) должна отсутствовать стабильная пена. При малом количестве пены (или при наличии пузырьков воздуха в растворе) проводится дегазация. Для этого проба фильтруется или в течение 5-10 минут обрабатывается ультразвуком. Если при этом пена остается, тест на «отсутствие пенообразования» считается отрицательным. При показателе «пенится»: после встряхивания проба сохраняет стабильную пену. В сомнительных случаях проба сравнивается с эталонным образцом. При оценке способности к пенообразованию температура пробы не учитывается, кроме тех случаев, когда этого требует спецификация на данное средство.

7.1.4. Определение показателя, концентрации водородных ионов (рН). Показатель концентрации водородных ионов (рН) определяют потенциометрическим методом по ГОСТ Р 50550 «Товары бытовой химии. Метод определения показателей активности водородных ионов (рН)».

7.1.5. 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.

7.1.5.1. 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.

7.1.5.1.1. 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%.

7.1.5.1.2. 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.

7.1.5.2. Определение активности липазы.

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

Обнаружение триглицеридов и продуктов гидролиза проводят с помощью тонкослойной хроматографии.

7.1.5.2.1. Реактивы и растворы.

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

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

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

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

7.1.5.2.2. 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.

7.1.5.3. 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.

7.1.5.3.1. 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) /1610772 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, methyl-ethylenediamine) (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

7.1.5.3.2. 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 додецилсульфата	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.

7.1.5.3.3. 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%.

7.1.5.3.4. 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.