2.1.11.27. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФАКТОРА СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА X

В настоящей общей фармакопейной статье представлена методика количественного определения фактора свертывания крови человека X хромогенным методом.

Количественное определение фактора свертывания крови человека X (фактор X) основано на его способности после активации до фактора Xa расщеплять специфический хромогенный субстрат с образованием окрашенного продукта, и оценивается путем сравнения активности испытуемого образца с такой же активностью международного стандартного образца или другого подходящего стандартного образца, калиброванного в международных единицах.

За международную единицу принимают активность фактора X в определенном количестве международного стандартного образца, устанавливаемую Всемирной организацией здравоохранения. Международный стандартный образец представляет собой лиофилизированный концентрат фактора X.

Активность фактора X определяют с помощью двухстадийного метода:

– на первой стадии фактор X в образце активируют специфическим активатором, выделенным из яда змеи;

– на второй стадии фактор Xa расщепляет специфический хромогенный субстрат с образованием окрашенного продукта, который может быть количественно определен методом спектрофотометрии.

В подходящих условиях испытания должна наблюдаться линейная зависимость между активностью фактора Xa и скоростью расщепления хромогенного субстрата.

РЕАКТИВЫ

Буферный раствор для разведения с pH 8,4. Раствор, содержащий 3,7 г/л *трис(гидроксиметил)аминометана P,* 18,0 г/л *натрия хлорида P,* 2,1 г/л *имидазола P*, 0,02 г/л *гексадиметрина бромида P* и 1 г/л *альбумина бычьего P* или *альбумина человека P*, при необходимости доводят pH *хлороводородной кислотой P* (*2.1.2.3*).

Активатор фактора X. Белок, который специфично активирует фактор X, выделяют из яда гадюки Рассела *Vipera russelli*. Восстанавливают в соответствии с инструкцией производителя. Восстановленный реактив хранят при температуре 4 ºC и используют в течение 1 мес.

Хромогенный субстрат для фактора Xa. Специфический хромогенный субстрат для фактора Xa, например: *хромогенный субстрат P1*, N-бензоил-L-изолейцил-L-глутамил-глицил-L-аргинин-4-нитроанилида гидрохлорид, метансульфонил-D-лейцил-

глицил-L-аргинин-4-нитроанилид, метоксикарбонил-D-циклогексилаланил-глицил-L-аргинин-4-нитроанилида ацетат. Восстанавливают в соответствии с инструкцией производителя.

МЕТОДИКА

Испытуемый образец разводят буферным раствором для разведения с pH 8,4, до получения концентрации 0,18 МЕ/мл фактора X. Готовят не менее трех подходящих разведений с использованием буферного раствора для разведения с pH 8,4.

Стандартный образец разводят буферным раствором для разведения с pH 8,4, до получения концентрации 0,18 МЕ/мл фактора X. Готовят не менее трех подходящих разведений с использованием буферного раствора для разведения с pH 8,4.

Непосредственно перед использованием растворы нагревают на водяной бане до температуры 37 ºС

Приведенные ниже условия применимы к испытаниям, проводимым с использованием микропланшетов. Если испытание выполняют в пробирках, пропорционально изменяют объемы реактивов, разведений стандартного образца и разведений испытуемого образца.

В лунки микропланшета помещают по 12,5 мкл каждого из разведений испытуемого или стандартного образцов, к которым прибавляют по 25 мкл активатора фактора X и инкубируют при температуре 37 °С точно 90 с. По окончании инкубации во все лунки прибавляют по 150 мкл раствора хромогенного субстрата для фактора свертывания крови Xa, разведенного буферным раствором для разведения с pH 8,4, в соотношении 1:6.

Измерение скорости изменения поглощения (оптической плотности) *(2.1.2.24)* проводят непрерывно в течение 3 мин при длине волны 405 нм и температуре 37 °С, рассчитывают среднюю скорость изменения поглощения (оптической плотности) (ΔA/мин). При невозможности непрерывной регистрации, измеряют поглощение (оптическую плотность) через подходящие интервалы (например, 40 с) при длине волны 405 нм, строят график линейной зависимости поглощения (оптической плотности) от времени и рассчитывают ΔA/мин как угол наклона прямой.

Исходя из значений ΔA/мин для каждого разведения испытуемого и стандартного образцов рассчитывают активность испытуемого образца и проверяют достоверность результатов испытания с использованием общепринятых статистических методов *(2.3.12.0)*.