

2.1.11.23. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФАКТОРА СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА II

В настоящей общей фармакопейной статье представлена методика количественного определения фактора свертывания крови человека II (протромбина) хромогенным методом.

Количественное определение содержания фактора свертывания крови человека II (фактор II) основано на его способности после активации до фактора IIa 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 II в определенном количестве международного стандартного образца, устанавливаемую Всемирной организацией здравоохранения. Международный стандартный образец представляет собой лиофилизированный концентрат фактора II.

Активность фактора II определяют с помощью двухстадийного метода:

- на первой стадии фактор II в образце активируют специфическим активатором, выделенным из яда змеи;
- на второй стадии фактор IIa 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 свертывания крови IIa и скоростью расщепления хромогенного субстрата.

РЕАКТИВЫ

Буферный раствор для разведения с pH 8,4. Раствор, содержащий 6,06 г/л *трис(гидроксиметил)аминометана* *P*, 17,53 г/л *натрия хлорида* *P*, 1 г/л *альбумина бычьего* *P* или *альбумина человека* *P*, при необходимости доводят pH *хлороводородной кислотой* *P* (2.1.2.3).

Активатор фактора II (экарин). Белок, который специфично активирует фактор II, выделяют из яда песчаной эфы *Echis carinatus*. Восстанавливают в соответствии с инструкцией производителя. Восстановленный реактив хранят при температуре 4 °C и используют в течение 1 мес.

Хромогенный субстрат для фактора IIa. Специфический хромогенный субстрат для фактора IIa, например: *хромогенный субстрат P2*, 4-толуолсульфонилглицил-пролил-L-аргинин-4-нитроанилид; H-D-циклогексилглицил- α -аминобутирил-L-аргинин-4-нитроанилид; D-циклогексилглицил-L-аланил-L-аргинин-4-нитроанилида диацетат. Восстанавливают в соответствии с инструкцией производителя.

МЕТОДИКА

Испытуемый образец разводят буферным раствором для разведения с pH 8,4 до получения концентрации 0,015 МЕ/мл фактора II. 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 0,015 МЕ/мл фактора свертывания крови II. 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 °C.

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 25 мкл каждого из разведений испытуемого или стандартного образцов, к которым прибавляют по 125 мкл буферного раствора для разведения с рН 8,4, по 25 мкл экарина и инкубируют при температуре 37 °С точно 2 мин. По окончании инкубации прибавляют по 25 мкл восстановленного раствора хромогенного субстрата для фактора Па.

Измерение скорости изменения поглощения (оптической плотности) (2.1.2.24) проводят непрерывно в течение 3 мин при длине волны 405 нм и рассчитывают среднюю скорость изменения поглощения (оптической плотности) ($\Delta A/\text{мин}$). 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 $\Delta A/\text{мин}$ как угол наклона прямой.

Исходя из значений $\Delta A/\text{мин}$ для каждого разведения испытуемого образца и стандартного образца рассчитывают активность испытуемого образца и проверяют достоверность результатов испытания с использованием общепринятых статистических методов (2.3.12.0).