# 2.1.11.30. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИТРОМБИНА III ЧЕЛОВЕКА

В общей фармакопейной статье приведена методика количественного определения антитромбина III хромогенным методом.

Активность антитромбина III в испытуемом образце определяют путем сравнения его способности инактивировать тромбин в присутствии избытка гепарина с такой же способностью стандартного образца антитромбина III человека (концентрат), калиброванного в международных единицах.

За международную единицу принимают активность антитромбина III в определенном количестве международного стандартного образца, устанавливаемую Всемирной организацией здравоохранения. Международный стандартный образец представляет собой концентрат антитромбина III человека. Различные количества испытуемого образца смешивают с определенным количеством тромбина и определяют остаточную активность тромбина с использованием подходящего хромогенного субстрата.

МЕТОДИКА

*Испытуемый раствор*. Испытуемый образец разводят *трис–EDTA–BSA буферным раствором с pH 8,4 P*, содержащим гепарин в концентрации 15 МЕ/мл, до концентрации антитромбина III 1 МЕ/мл.

*Раствор сравнения*. Стандартный образец антитромбина III разводят *трис–EDTA–BSA буферным раствором с pH 8,4 P*, содержащим гепарин в концентрации 15 МЕ/мл, до концентрации антитромбина III 1 МЕ/мл.

*Хромогенный субстрат для тромбина*. Специфический хромогенный субстрат для тромбина (например, D-фенилаланил-L-пипеколил-L-аргинин-4-нитроанилида) восстанавливают *водой P* до концентрации 4 ммоль/л, затем полученный раствор разводят *трис–EDTA–BSA буферным раствором с pH 8,4 P*, не содержащим альбумин бычий, до концентрации, подходящей для проведения испытания.

Готовят в двух повторностях три или четыре разведения в диапазоне от 1:75 до 1:200 испытуемого раствора и раствора сравнения с помощью *трис–EDTA–BSA буферного раствора с pH 8,4 P*, содержащего гепарин в концентрации 15 МЕ/мл.

Нагревают по 200 мкл каждого разведения при температуре 37 °C в течение 1-2 мин. К каждому разведению прибавляют по 200 мкл раствора *тромбина бычьего* Р с концентрацией 2 МЕ/мл в *трис–EDTA–BSA буферном растворе с pH 8,4 Р*, перемешивают и выдерживают при температуре 37 °C ровно одну минуту. Затем прибавляют по 500 мкл раствора хромогенного субстрата для тромбина и немедленно начинают измерение изменений оптической плотности (*2.1.2.24*) при 405 нм не менее 30 с. Рассчитывают скорость изменения поглощения (оптической плотности) (ΔA/мин), которая обратно пропорциональна активности антитромбина III.

Может быть использован метод определения в конечной точке. Реакцию останавливают добавлением уксусной кислоты через промежуток времени, подходящий для достижения линейной зависимости «доза-ответ», и измеряют поглощение (оптическую плотность) (*2.1.2.24*) при 405 нм.

Проверяют достоверность результатов испытания и рассчитывают активность испытуемого образца с использованием общепринятых статистических методов (*2.3.12.0*).