

2.1.11.22. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕПАРИНА В ФАКТОРАХ СВЁРТЫВАНИЯ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

В настоящей общей фармакопейной статье приведена методика количественного определения гепарина в факторах свёртывания крови человека хромогенным методом.

Гепарин определяют в виде комплекса с антитромбином III (АТIII) по его способности ингибировать фактор свёртывания крови Ха (анти-Ха активность). В реакционной смеси поддерживают избыток АТIII с целью обеспечения постоянной концентрации комплекса гепарина с АТIII. Фактор Ха нейтрализуется комплексом гепарина с АТIII, а избыточное количество фактора Ха гидролизуется Ха-специфичным хромофорным пептидным субстратом с высвобождением хромофора. Количество хромофора обратно пропорционально активности гепарина.

РЕАКТИВЫ

Хромогенный субстрат для фактора свертывания крови Ха. Специфический хромогенный субстрат для фактора свертывания крови Ха, например *N*-бензоил-L-изолейцил-L-глутамил-глицил-L-аргинин-4-нитроанилида гидрохлорид. Восстанавливают в соответствии с инструкциями производителей.

Буферный раствор для разведения с рН 8,4. Раствор, содержащий 6,05 г/л *трис(гидроксиметил)аминометана Р*, при необходимости доводят рН *хлороводородной кислотой Р1 (2.1.2.3)*.

МЕТОДИКА

Испытуемый образец разводят *буферным раствором для разведения с рН 8,4*, до получения концентрации гепарина 0,1 МЕ/мл. Аналогичным образом готовят разведения подходящего стандартного образца гепарина.

Растворы нагревают на водяной бане при температуре 37 °С непосредственно перед использованием.

Условия, приведенные ниже, относятся к испытаниям проводимым с использованием микропланшетов. Если испытание выполняют в пробирках, пропорционально изменяют объемы реактивов и образцов.

В лунки микропланшета вносят 20 мкл нормальной плазмы человека и по 20 мкл *антитромбина III раствор Р1*, прибавляют 20, 60, 100 и 140 мкл испытуемого или стандартного раствора и доводят объём раствора в каждой лунке буферным раствором до 200 мкл (содержание гепарина в конечном растворе – 0,02–0,08 МЕ/мл).

Метод конечной точки. По 40 мкл содержимого каждой из лунок переносят в другой ряд лунок, прибавляют по 20 мкл фактора Ха раствора (2) и инкубируют при температуре 37 °С в течение 30 с. Прибавляют по 40 мкл 1 ммоль/л раствора

хромогенного субстрата фактора Ха и инкубируют при температуре 37 °С в течении 3 мин. Реакцию останавливают, снижая значение рН путём прибавления подходящего реактива, например уксусной кислоты ледяной, и измеряют оптическую плотность (2.1.2.24) при длине волны 405 нм. В большинстве случаев, реакция протекает в течение 3–15 мин, но допускаются отклонения от этого интервала при условии получения улучшенной линейной зависимости «доза–ответ».

Кинетический метод. По 40 мкл содержимого каждой из лунок переносят в другой ряд лунок, прибавляют по 20 мкл фактора Ха раствора (2) и инкубируют при температуре 37 °С в течение 30 с. Прибавляют по 40 мкл 2 ммоль/л раствора хромогенного субстрата фактора Ха, инкубируют при температуре 37 °С и измеряют скорость расщепления субстрата путём постоянного измерения оптической плотности (2.1.2.24) при длине волны 405 нм, определяя таким образом начальную скорость расщепления субстрата. Полученное значение должно находиться в линейной зависимости от конечной концентрации фактора Ха.

Проверяют достоверность результатов испытания и рассчитывают активность гепарина в испытуемом образце (2.3.12.0).