Номер. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВАТОРА ПРЕКАЛЛИКРЕИНА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

В настоящей общей фармакопейной статье представлена методика количественного определения активатора прекалликреина хромогенным кинетическим методом.

Определение содержания активатора прекалликреина основано на его способности активировать прекалликреин в калликреин, концентрацию которого оценивают по скорости отщепления хромофора от синтетического пептидного субстрата спектрофотометрическим методом. Содержание активатора прекалликреина рассчитывают, сравнивая испытуемый образец со стандартным образцом активатора прекалликреина, калиброванного в международных единицах.

За международную единицу принимают активность определенного количества международного стандартного образца активатора прекалликреина, устанавливаемую Всемирной организацией здравоохранения.

В качестве стандартного образца может быть использован *СО ФЕАЭС активатора прекалликреина*, калиброванный в международных единицах.

Реактивы для испытания могут быть приобретены по отдельности или в составе коммерческих наборов. Методики и реактивы могут отличаться в разных наборах, поэтому следует придерживаться инструкции производителя набора.

РЕАКТИВЫ

Буферный раствор А. Растворяют 6,055 г *трис(гидроксиметил)аминометана Р*, 1,17 г *натрия хлорида Р*, 50 мг *гексаметрина бромиды Р* и 0,100 г *натрия азиды Р* в *воде Р*, доводят рН 2 М *хлороводородной кислотой Р* до 8,0 и доводят объем раствора *водой Р* до 1000 мл.

Буферный раствор Б. Растворяют 6,055 г *трис(гидроксиметил)аминометана Р* и 8,77 г *натрия хлорида Р* в *воде Р*, доводят рН 2 М *хлороводородной кислотой Р* до 8,0 и доводят объем раствора *водой Р* до 1000 мл.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРЕКАЛЛИКРЕИНА

Для предотвращения активации коагуляции, кровь или плазма, используемые для приготовления прекалликреина, должны контактировать только с пластмассовыми или обработанными силиконом стеклянными поверхностями.

Приготовление прекалликреина от начала хроматографирования до замораживания порциями должно проводиться в течение 8 ч.

К 1 объему раствора подходящего антикоагулянта (например, раствор 38 г/л

натрия цитрата Р) с 1 мг/мл *гексадиметрина бромида Р*, добавляют 9 объемов крови человека и центрифугируют при 3600g в течение 5 мин. Отделяют плазму и повторно центрифугируют при 6000g в течение 20 мин для осаждения тромбоцитов. Аликвоту плазмы крови, обедненную тромбоцитами, подвергают диализу с использованием 10 объемов буферного раствора А в течение 20 ч. Диализированную плазму вносят в хроматографическую колонку, содержащую *агарозу-ДЭАЭ* для *ионообменной хроматографии Р*, уравновешенную буферным раствором А, объем которой в 2 раза превышает объем плазмы. Элюируют из колонки буферным раствором А со скоростью 20 мл/см²/ч. Собирают элюат по фракциям и измеряют их поглощение (оптическую плотность) при 280 нм (2.1.2.24). Объединяют фракции первого белкового пика, так, чтобы полученный объем в 1,2 раза превышал объем плазмы, обедненной тромбоцитами. Полученный пул прекалликреина проверяют на отсутствие активности калликреина, смешивая 1 часть пула с 20 частями предварительно нагретого раствора хромогенного субстрата, который будет использоваться в испытании, и инкубируют при температуре 37 °С в течение 2 мин. Скорость изменения поглощения (оптической плотности) ($\Delta A/\text{мин}$) должна составлять менее 0,001 в мин. К полученному пулу добавляют *натрия хлорид Р* до концентрации 7 г/л и фильтруют с помощью мембранного фильтра (размер пор 0,45 мкм). Фильтрат порционно замораживают и хранят при температуре –25 °С; перед хранением прекалликреин может быть подвергнут сублимационному высушиванию.

Допускается использование коммерческого реактива прекалликреина в соответствии с инструкцией производителя.

МЕТОДИКА

Испытание проводят с использованием автоматического анализатора или подходящего микропланшетного спектрофотометра, позволяющего проводить кинетические измерения скорости образования хромофора, с соответствующим программным обеспечением для расчета результатов. Испытуемые образцы и прекалликреин при необходимости могут быть разведены буферным раствором Б. Стандартный образец разводят буферным раствором Б в подходящем диапазоне концентраций активатора прекалликреина. Смешивают стандартные образцы и испытуемые образцы с прекалликреином так, чтобы объем неразбавленного испытуемого образца не превышал 1/10 части от общего объема смеси, чтобы избежать ошибок, вызванных изменением ионной силы и рН в инкубационной смеси, и инкубируют в течение 10 мин при подходящей температуре. Для каждого раствора стандартного образца и раствора испытуемого образца используя буферный раствор Б вместо прекалликреина готовят раствор С, в котором не будет образовываться калликреин. По окончании

инкубации прибавляют раствор подходящего синтетического хромогенного субстрата, специфичного к калликреину (например, *N*-бензоил-*L*-пролил-*L*-фенилаланил-*L*-аргинин 4-нитроанилида ацетат *P* или *D*-пролил-*L*-фенилаланил-*L*-аргинин 4-нитроанилида дигидрохлорид *P*), разведенного в буферном растворе Б, в количестве равном объему смеси образца с прекалликреином или буферным раствором Б.

Вновь инкубируют при подходящей температуре и проводят измерение скорости изменения поглощения (оптической плотности) (2.1.2.24) со второй минуты по десятую минуту при длине волны, характерной для применяемого субстрата. Рассчитывают скорость изменения поглощения (оптической плотности) в минуту ($\Delta A/\text{мин}$).

Из значений изменения поглощения (оптической плотности) раствора стандартного образца и раствора испытуемого образца вычитают значения изменения поглощения (оптической плотности) соответствующих растворов С. Строят калибровочный график зависимости скорости изменения поглощения (оптической плотности) от концентрации активатора прекалликреина в стандартном образце. Содержание активатора прекалликреина может быть рассчитано с использованием метода стандартной кривой, модели параллельных прямых, модели угловых коэффициентов или с использованием другого подходящего статистического метода.

При валидации методики должно быть установлено влияние испытуемого образца на результаты определения поглощения (оптической плотности), так как высокие значения поглощения (оптической плотности) для раствора С могут повлиять на достоверность результатов испытания.

Допустимо количественное определение активатора прекалликреина по измерению интенсивности окраски образовавшегося хромофора методикой с использованием стоп-реагента.