

Номер. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕПАРИНА В ФАКТОРАХ СВЁРТЫВАНИЯ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

В настоящей общей фармакопейной статье представлена методика количественного определения гепарина хромогенным методом в лекарственных средствах факторов свёртывания крови человека.

Количественное определение гепарина основано на способности комплекса гепарина с антитромбином III ингибировать фактор свёртывания крови человека Ха (анти-Ха активность) и последующем расщеплении специфического хромогенного субстрата избыточным количеством фактора свертывания крови человека Ха (фактор Ха) с образованием окрашенного продукта (хромофора). Количество хромофора обратно пропорционально активности гепарина.

В реакционной смеси поддерживают избыток антитромбина III с целью обеспечения постоянной концентрации комплекса гепарина с антитромбином III.

РЕАКТИВЫ

Хромогенный субстрат для фактора Ха. Специфический хромогенный субстрат для фактора Ха, например, *N*-бензоил-L-изолейцил-L-глутамил-глицил-L-аргинин-4-нитроанилида гидрохлорид, восстанавливают в соответствии с инструкцией производителя.

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

МЕТОДИКА

Испытуемый раствор. Испытуемый образец разводят буферным раствором для разведения с рН 8,4 до концентрации гепарина 0,1 МЕ/мл.

Раствор сравнения. Стандартный образец гепарина разводят буферным раствором для разведения с рН 8,4 до концентрации гепарина 0,1 МЕ/мл.

Непосредственно перед использованием растворы нагревают на водяной бане до температуры 37 °С.

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

В серию лунок микропланшета помещают по 20 мкл нормальной плазмы человека и по 20 мкл *антитромбина III раствора Р1*. Распределяют по отдельным лункам 20 мкл, 60 мкл, 100 мкл и 140 мкл испытуемого раствора или раствора сравнения и доводят объём

раствора в каждой лунке буферным раствором для разведения с рН 8,4 до 200 мкл (концентрация гепарина в реакционной смеси в лунке 0,02–0,08 МЕ/мл). Далее используют один из методов измерений.

Метод определения в конечной точке. По 40 мкл реакционной смеси из каждой лунки переносят во вторую серию лунок, прибавляют по 20 мкл *раствора фактора Ха бычьего Р* и инкубируют при температуре 37 °С в течение 30 с. Прибавляют по 40 мкл раствора 1 ммоль/л хромогенного субстрата для фактора Ха и инкубируют при температуре 37 °С в течение 3 мин. Реакцию останавливают, снижая значение рН реакционной смеси добавлением подходящего реактива, например 20 % (об/об) раствора *уксусной кислоты ледяной Р*, и измеряют поглощение (оптическую плотность) при длине волны 405 нм (2.1.2.24). Как правило время реакции составляет от 3 до 15 мин, допустимы отклонения от данного интервала при условии получения более приемлемой линейной зависимости «доза–ответ».

Кинетический метод. По 40 мкл реакционной смеси из каждой лунки переносят во вторую серию лунок, прибавляют по 20 мкл *раствора фактора Ха бычьего Р* и инкубируют при температуре 37 °С в течение 30 с. Прибавляют по 40 мкл раствора 2 ммоль/л хромогенного субстрата для фактора Ха и при температуре 37 °С определяют скорость расщепления хромогенного субстрата путём постоянного измерения поглощения (оптической плотности) при длине волны 405 нм (2.1.2.24). Скорость расщепления хромогенного субстрата должна быть в линейной зависимости от остаточной после ингибирования концентрации фактора Ха в реакционной смеси.

Проверяют достоверность результатов испытания и рассчитывают активность гепарина в испытуемом образце общепринятыми статистическими методами с помощью модели угловых коэффициентов (например, 2.3.12.0).