

додаванням 0.050 мл 50 % (об/об) розчину кислоти льодяної оцтової Р.

Розщеплення хромогенного субстрату активованим білком С (АРС) обумовлює виділення хромофора рНА в кількості, пропорційній вмісту білка С людини в препараті. Вимірюють оптичну густина за довжини хвилі 405 нм. Віднімають оптичну густина холостого розчину від оптичної густини випробовуваного зразка. Перевіряють ▽ придатність кількісного визначення та обчислюють активність випробовуваного препарату ▲, використовуючи звичайні методи статистичного аналізу (5.3).

## 2. ВИЗНАЧЕННЯ ЗГОРТАННЯ

Активність білка С людини оцінюють після розщеплення до АРС за допомогою активатора, виділеного з отрути *Agkistrodon contortrix contortrix*. ▽ Отриманий ▲ АРС інактивує фактори Va та VIIIa і, таким чином, пролонгує АРТТ-активованій частковий тромбoplastиновий час системи, в якій наявні всі фактори згортання, постійно та в надлишку, крім білка С людини, який отримують із випробовуваного препарату. Пролонгація часу згортання пропорційна концентрації білка С людини в препараті.

Активність білка С людини визначають порівнянням здатності випробовуваного препарату подовжувати час згортання з такою самою здатністю стандартного препарату білка С людини, каліброваного в Міжнародних одиницях (МО). МО — це активність зазначеної кількості міжнародного стандарту білка С людини. Еквівалент МО міжнародного стандартного препарату встановлює Всесвітня організація охорони здоров'я.

Реактиви можуть бути придбані окремо у різних виробників або у складі комерційних наборів. Методики та реактиви можуть істотно відрізнятися залежно від виробника, тому потрібно точно дотримуватися інструкції фірми-виробника. Основні вимоги випробування наведені в прикладі, представленому нижче.

### РЕАКТИВИ

*Буфер для розведення рН 7.4.* Ізотонічний нехелатуючий буфер.

*Плазма, дефіцитна за білком С людини.* Цитратна плазма людини, що не містить кількості білка С людини, що піддається вимірюванню. Відновлюють та зберігають відповідно до інструкції виробника.

*Активатор білка С людини.* Білок, виділений з отрути *Agkistrodon contortrix contortrix*, є специфічним активатором білка С людини. Відновлюють та зберігають відповідно до інструкції виробника.

*Активатор згортання.* Можна використовувати підходящий АРТТ-реактив, що містить фосфоліпиди та

контактний активатор. Його можна комбінувати з активатором білка С людини.

### МЕТОД

Відновлюють або розморожують випробовуваний препарат відповідно до інструкції виробника. Додають розчин буфером для розведення з рН 7.4 для отримання не менше 3 окремих розведень для кожного препарату в інтервалі концентрацій 0.010-0.150 МО/мл, бажано в двох повторностях.

Змішують 1 об'єм кожного розведення з 1 об'ємом плазми, дефіцитної за білком С людини, та з 1 об'ємом активатора білка С людини (якщо доцільно, в поєднанні з АРТТ-реактивом). Усі змішувані компоненти заздалегідь нагрівають до температури 37 °С. Додають 1 об'єм 0.025 М розчину кальцію хлориду Р, заздалегідь нагрітого до 37 °С, та реєструють час згортання.

Час згортання пропорційний концентрації білка С людини в кожному розведенні. Перевіряють ▽ придатність кількісного визначення та обчислюють активність випробовуваного препарату ▲, використовуючи звичайні методи статистичного аналізу (5.3).

### 2.7.32. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ІНГІБІТОРА $\alpha$ -1-ПРОТЕЇНАЗИ ЛЮДИНИ

Вміст інгібітора  $\alpha$ -1-протеїнази людини (також відомого як  $\alpha$ -1-антитрипсин або  $\alpha$ -1-антипротеїназа) визначають порівнянням здатності випробовуваного препарату інактивувати серин-протеазу-еластазу (панкреатичну еластазу свині або нейтрофіл-еластазу людини) із аналогічною здатністю стандартного зразка інгібітора  $\alpha$ -1-протеїнази людини, який калібрують у міліграмах активного (функціонального) інгібітора  $\alpha$ -1-протеїнази. Змінні кількості випробовуваного препарату змішують із заданою кількістю еластази та визначають залишкову активність еластази за допомогою придатного хромогенного субстрату. Метод, що описується нижче, наводиться як приклад.

### РЕАКТИВИ

*Трис-альбумін буферний розчин.* 24.23 г трометамолу Р розчиняють у воді Р, доводять до значення рН  $8.0 \pm 0.3$  кислотою хлористоводневою Р1 та доводять до 1000 мл водою Р. До 100 мл цього розчину додають 0.5 мл 20 % розчину альбуміну людини Р або альбуміну бика Р.

Буферний розчин, що містить альбумін людини або альбумін бика, має бути свіжоприготованим, тобто його готують в день, коли передбачається використання; в іншому випадку його консервують