2.7.5. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ГЕПАРИНУ

Антикоагулянтну активність гепарину визначають методом *in vitro* за його здатністю підсилювати інгібування антитромбіном тромбіну (фактора IIa) (кількісне визначення антифактор IIa активності). Міжнародна Одиниця (МО) — активність, що міститься в зазначеній кількості міжнародного стандарту нефракційного гепарину. *БСП гепарину натрію* (*Heparin sodium BRP*), калібрований у МО відносно міжнародного стандарту та придатний для використання, як стандартний препарат в 2 методах кількісного визначення, що наведені нижче.

Кількісне визначення антифактор Xa активності виконують визначенням рівня антифактор Xa активності відносно антифактор IIa активності.

Кількісне визначення антифактор IIa активності та антифактор Xa активності виконують визначенням оптичної густини (метод кінцевої точки) або на підставі зміни оптичної густини за хвилину (кінетичний метод).

АНТИФАКТОР IIa АКТИВНІСТЬ

Стандартний та випробовуваний розчини

Готують 4 незалежних серії 4 розведень кожного випробовуваного зразка та *БСП гепарину натрію* у *трис(гідроксиметил)амінометан-ЕДТА буферному розчині pH 8.4 P1*; у придатному діапазоні концентрацій у межах від 0.005 МО/мл до 0.03 МО/мл. Обрані розведення у разі графічного відображення результатів мають давати лінійну залежність на графіку залежності оптичної густини від log концентрації.

Процедура

Маркують 16 пробірок для розведень випробовуваного зразка та 16 пробірок для розведень стандартного препарату: T_1, T_2, T_3, T_4 для кожної з 4 серій розведень випробовуваного зразка та S_1, S_2, S_3, S_4 для кожної з 4 серій розведень стандартного препарату. До кожної з 32 пробірок додають 100 мкл *антитромбіну III розчину P5* та 50 мкл придатного розведення випробовуваного зразка або стандартного препарату. Після кожного додавання перемішують, не допускаючи утворення бульбашок. Обробляють пробірки у 2 послідовних серіях у такому порядку: S_1, S_2, S_3, S_4, T_1, T_2, T_3, T_4, T_1, T_2, T_3, T_4, S_1, S_2, S_3, S_4. Витримують протягом не менше 1 хв на водяній бані або в нагрівальному пристрої до встановлення температури 37 °C, та додають у кожну пробірку 25 мкл *тромбіну людини розчину P2*. Інкубують точно 1 хв та додають 50 мкл специфічного хромогенного субстрату для фактору IIa в придатній концентрації для кількісного визначення (наприклад, D-фенілаланіл-L-піпеколіл-L-аргінін-4-нітроаніліду дигідрохлорид, розчинений у *воді P* для отримання 1.25 мМ розчину).

Для кінетичного методу переносять суміші до напівмікрокювет та вимірюють зміну оптичної густини за хвилину (*2.2.25*) за довжини хвилі 405 нм із використанням придатного зчитувального пристрою.

За умови використання методу кінцевої точки реакцію зупиняють чітко через 4 хв додаванням ◤50 мкл◢ 20 % (*об/об*) розчину *оцтової кислоти льодяної P*. Оцінюють, чи дає саме інкубація з хромогенним субстратом протягом 4 хв оптимальне зчитування оптичної густини, та, за необхідності, доводять час інкубації до результатів, що дають найкращу криву «доза-відповідь». Потім переносять суміш до напівмікрокювет та вимірюють оптичну густину (*2.2.25*) за довжини хвилі 405 нм із використанням придатного зчитувального пристрою.

За тих самих умов проводять контрольний дослід (холосту пробу) із визначенням амідолітичної активності на початку та наприкінці випробування, використовуючи замість стандартних та випробовуваних розчинів *трис(гідроксиметил)амінометан-ЕДТА буферний розчин pH 8.4 P1*; 2 одержаних значення не мають значно відрізнятися.

Обчислюють лінійну залежність оптичної густини від log концентрацій розчинів випробовуваного зразка та *БСП гепарину натрію,* обчислюють активність випробовуваного зразка в МО/мл, використовуючи звичайні статистичні методи аналізу з використанням моделі паралельних ліній (*5.3*).

АНТИФАКТОР Xa АКТИВНІСТЬ

Стандартний та випробовуваний розчини

Готують 4 незалежних серії 4 розведень кожного випробовуваного зразка та *БСП гепарину натрію* у *трис(гідроксиметил)амінометан-ЕДТА буферному розчині pH 8.4 P1*; у придатному діапазоні концентрацій у межах від 0.03 МО/мл до 0.375 МО/мл. Обрані розведення в разі графічного відображення результатів мають давати лінійну залежність на графіку залежності оптичної густини від log концентрації.

Процедура

Маркують 16 пробірок для розведень випробовуваного зразка та 16 пробірок для розведень стандартного препарату: T_1, T_2, T_3, T_4 для кожної з 4 серій розведень випробовуваного зразка та S_1, S_2, S_3, S_4 для кожної з 4 серій розведень стандартного препарату. До кожної з 32 пробірок додають 50 мкл *антитромбіну III розчину P6* та 50 мкл придатного розведення випробовуваного зразка або стандартного препарату. Після кожного додавання перемішують, не допускаючи утворення бульбашок. Обробляють