густини (ΔA/хв). Як альтернативний метод можна використовувати кількісне визначення в кінцевій точці припиненням реакції кислотою оцтовою та вимірюванням оптичної густини за довжини хвилі 405 нм.

В обох випадках потрібно обрати таку тривалість розщеплення хромогенного субстрату, що дозволить отримати лінійне збільшення оптичної густини за довжини хвилі 405 нм, перш ніж виснаження субстрату стане значним. Якщо кількісне визначення проводиться в пробірках або кюветах із застосуванням методу спектрофотометрії, об'єми розчинів реактивів змінюються пропорційно.

Оцінка проводиться відніманням значення оптичної густини контрольного розчину (приготованого з буфера для розведення pH 7.5) від значення оптичної густини випробовуваного препарату. ◤Перевіряють придатність методу кількісного визначення та обчислюють активність випробовуваного препарату◢, використовуючи звичайні методи статистичного аналізу (*5.3*).

2.7.30. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ БІЛКА С ЛЮДИНИ

1. ХРОМОГЕННИЙ АНАЛІЗ

Білок С людини – це вітамін К-залежний білок плазми, який після активації до рівня активованого білка С (АРС) може інгібувати згортання крові протеолітичним розщепленням факторів Va та VIIIa. Активність білка С людини визначають двоетапним методом: перший етап – білок С людини в препараті активується специфічним активатором із отрути змії; другий етап – АРС розщеплює специфічний хромогенний субстрат із утворенням хромофора, який можна кількісно визначити методами спектрофотометрії.

Етап 1

Етап 2

Активність білка С людини оцінюють шляхом порівняння здатності випробовуваного лікарського засобу розщеплювати хромогенний субстрат із аналогічною здатністю стандартного зразка 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.

Потрібні реактиви можуть бути придбані окремо або у складі комерційних наборів. ◤Доступні◢ як методи з визначенням кінцевої точки, так і кінетичні методи. Методики та реактиви можуть істотно відрізнятися в різних наборах, тому потрібно точно дотримуватися інструкцій фірми-виробника. Суттєві вимоги методики описані нижче на прикладі опису кінетичного титраційного методу із застосуванням ◤мікропланшета◢ та методу кінцевої точки.

РЕАКТИВИ

Буфер для розведення pH 8.4. 6.055 г *трис(гідроксиметил)амінометану P* та 16.84 г *цезію хлориду P* розчиняють у *воді P* та, якщо потрібно, регулюють значення pH. Доводять об'єм отриманого розчину *водою P* до 1000.0 мл.

Активатор білка С людини. Білок, виділений із отрути *Agkistrodon contortrix contortrix* (Мокасинова змія, рід Щитомордники), який специфічно активує білок С людини. Готують відновлений розчин, який зберігають відповідно до зазначень виробника. Перед тим як розчин буде застосований у випробуванні, доводять концентрацію розчину *водою P* до 0.25 Од/мл.

Хромогенний субстрат активованого білка С. Специфічний хромогенний субстрат для АРС, наприклад L-піроглутаміл-L-проліл-L-аргінін-*p*-нітроаніліну гідрохлорид (pyroGlu-Pro-Arg-pNA.HCl). Готують відновлений розчин за допомогою *води P*, доводячи концентрацію до 4.5 ммоль/л. Перед застосуванням для кількісного визначення концентрацію розчину доводять до 1.1 ммоль/л буфером для розведення pH 8.4.

МЕТОД

Відновлюють або розморожують випробовуваний препарат відповідно до інструкції виробника. Доводять розчин *водою P* для отримання не менше 3 окремих розведень для кожного препарату в інтервалі концентрацій 0.050-0.200 МО/мл, бажано в двох повторностях.

Етап 1. Змішують 0.025 мл кожного розведення з 0.050 мл активатора білка С людини, заздалегідь підігрітих до температури 37 °С, та витримують за температури 37 °С протягом точно 10 хв. Для кожного розведення готують холостий розчин тим самим способом, використовуючи *воду P* замість активатора білка С людини.

Етап 2. У кожну суміш додають 0.150 мл розчину хромогенного субстрату, заздалегідь нагрітого до температури 37 °С, та витримують за температури 37 °С протягом точно 10 хв. За потреби період інкубації коригують так, щоб забезпечувалось лінійне зростання хромофора в часі. Зупиняють реакцію