

### 2.7.5. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ГЕПАРИНУ

Антикоагулянтну активність гепарину визначають методом *in vitro* за його здатністю підсилювати інгібування антитромбіном тромбіну (фактора Іа) (кількісне визначення антифактор Іа 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 у 2 методах кількісного визначення, що наведені нижче.

Кількісне визначення антифактор Ха активності виконують визначенням рівня антифактор Ха активності відносно антифактор Іа активності.

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

▼ За умови демонстрації еквівалентності з наведеними нижче методами наведені нижче об'єми можна налаштувати для використання автоматизованих методів. ▲

#### АНТИФАКТОР Іа 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 рН 8.4 РІ*; 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 Р5 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 °С, та додають у кожен пробірку 25 мкл тромбіну людини розчину Р2. Інку-

бують точно 1 хв та додають 50 мкл специфічного хромогенного субстрату для фактору Іа в придатній концентрації для кількісного визначення (наприклад, D-фенілаланіл-L-піпеколіл-L-аргінін-4-нітроаніліду дигідрохлорид, розчинений у воді Р для отримання 1.25 мМ розчину).

Для кінетичного методу переносять суміші до напівмікрокувет 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 Р. Оцінюють, чи дає саме інкубація з хромогенним субстратом протягом 4 хв оптимальне зчитування оптичної густини, та, за потреби, доводять час інкубації до результатів, що дають найкращу криву «доза-відповідь». Потім переносять суміш до напівмікрокувет 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 рН 8.4 РІ*; 2 одержаних значення не мають значно відрізнятись.

Обчислюють лінійну залежність оптичної густини від  $\log$  концентрацій розчинів випробовуваного зразка та *БСП гепарину натрію*, обчислюють активність випробовуваного зразка в МО/мл звичайними статистичними методами аналізу з використанням моделі паралельних ліній (5.3).

#### АНТИФАКТОР Ха 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 рН 8.4 РІ*; 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 Р6 та 50 мкл придатного роз-