**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
| ОФС.0.0.0000 |
| **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНГИБИТОРА α-1-ПРОТЕИНАЗЫ ЧЕЛОВЕКА** |

В общей фармакопейной статье приведена методика количественного определения ингибитора α-1-протеиназы человека (ингибитор
α-1-протеиназы), известного как α-1-антитрипсин или α-1-антипротеиназа, хромогенным методом.

Методика основана на сравнении испытуемого образца со стандартным образцом ингибитора α-1-протеиназы человека, калиброванного в миллиграммах активного (функционального) ингибитора α-1-протеиназы, по способности инактивировать сериновую протеазу – эластазу (свиную панкреатическую эластазу или эластазу нейтрофилов человека). Различные количества образца смешивают с заданным количеством эластазы, остаточную активность эластазы измеряют с использованием подходящего хромогенного субстрата.

ХРОМОГЕННЫЙ МЕТОД

*РЕАКТИВЫ*

*Трис-альбуминовый буферный раствор.* Растворяют 24,23 г *трис(гидроксиметил)аминометана* в *воде*, доводят рН до значения 8,0±0,3 *(ОФС «Ионометрия», метод 3)* раствором 250 г/л *хлористоводородной кислоты*,и доводят *водой* до объёма 1000 мл. К 100 мл полученного раствора прибавляют 0,5 мл раствора 200 г/л *альбумина человека* или *альбумина бычьего*.

Буферный раствор, содержащий альбумин человека или альбумин бычий, должен быть приготовлен в день его использования; в противном случае, раствор стерилизуют фильтрацией (0,2 мкм) и хранят при температуре от 2 °C до 8 °C в течение двух недель.

*МЕТОДИКА*

Готовят в двух повторностях четыре или пять разведений испытуемого образца и стандартного образца в подходящем диапазоне концентраций ингибитора α-1-протеиназы, используя трис-альбуминовый буферный раствор.

В лунки микропланшета помещают по 50 мкл разведений стандартного образца или разведений испытуемого образца, затем в каждую лунку прибавляют по 150 мкл раствора свиной панкреатической эластазы (эластаза), разведённой до необходимой концентрации трис-альбуминовым буферным раствором. Инкубируют в течение определённого промежутка времени (3–10 мин) при комнатной температуре. Поскольку активность различных эластаз может варьировать, для получения подходящих изменений оптической плотности при длине волны 405 нм в данных конкретных условиях проведения испытания, концентрация эластазы может быть уточнена путём оценки активности в контрольных лунках, содержащих эластазу без ингибитора α-1-протеиназы.

В каждую лунку прибавляют по 100 мкл раствора хромогенного субстрата *N-Сукцинил-L-аланил-L-аланил-L-аланила-4-нитроанилида* (Suc-Ala-Ala-Ala-*p*NA) (раствор 4,5 мг/мл хромогенного субстрата в *диметилсульфоксиде*, разведённый трис-альбуминовым буферным раствором до рабочей концентрации 0,45 мг/мл). Измерение оптической плотности *(ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»)* начинают сразу же и проводят в течение 5 мин и более при длине волны 405 нм, используя спектрофотометр микропланшетный. Рассчитывают скорость изменения оптической плотности (Δ*А*/мин).

В качестве альтернативы возможно определение в конечной точке, останавливая реакцию уксусной кислотой и измеряя оптическую плотность при длине волны 405 нм. Если испытание выполняют в пробирках и для измерения оптической плотности используют спектрофотометр, пропорционально изменяют объёмы растворов реактивов.

Скорость изменения оптической плотности (Δ*А*/мин) обратно пропорциональна активности ингибитора α-1-протеиназы.

Проверяют достоверность результатов испытания и рассчитывают активность ингибитора α-1-протеиназы в испытуемом образце общепринятыми статистическими методами *(ОФС «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами»)*.