

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Определение О - ацетильных групп
в полисахаридных вакцинах

ОФС.1.7.2.0019.15
Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья предназначена для определения О-ацетильных групп в полисахаридных вакцинах. Принцип метода заключается в способности О-ацетильных групп образовывать с гидроксиламином в щелочной среде гидроксамовую кислоту, которая в кислой среде дает цветную реакцию с ионами железа(III). Определение О - ацетильных групп проводится колориметрическим методом.

Колориметрический метод

К 1 мл испытуемого раствора прибавляют 2 мл свежеприготовленного реактива № 1, перемешивают и оставляют на 4 мин при температуре от 18 до 20 °С. К полученному раствору приливают 1 мл разведенной хлористоводородной кислоты, перемешивают, прибавляют 1 мл 0,37 М раствора железа (III) хлорида, вновь перемешивают и оставляют на 15 мин при температуре, указанной выше.

По окончании инкубирования измеряют оптическую плотность испытуемого и калибровочных растворов при 540 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм по сравнению с контрольным раствором, содержащим 1 мл воды очищенной и реактивы, указанные выше и добавленные в той же последовательности.

Содержание О-ацетильных групп (X) в мкмоль/мл вычисляют по формуле:

$$X = A / B,$$

где: A – содержание О-ацетильных групп, найденное по калибровочному графику, мкмоль;

B – объем испытуемого раствора, мл.

Содержание О-ацетильных групп в 1 мл испытуемого раствора должно быть от 1,5 до 2,5 мкмоль/мл с учетом содержания влаги в лекарственном препарате.

Построение калибровочного графика. К 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 мл стандартного раствора ацетилхолина иодистого (5 мкмоль О-ацетильных групп) прибавляют воду очищенную до 1 мл (конечная концентрация О-ацетильных групп 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 мкмоль/мл соответственно). Далее анализ проводят, как указано выше.

Строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс концентрацию стандартного раствора ацетилхолина иодистого в мкмольях О-ацетильных групп, а по оси ординат – показания оптической плотности стандартных растворов при 540 нм.

Калибровочный график воспроизводят при каждом анализе.

Примечания.

1. Испытуемый раствор. 1 мл испытуемого раствора (0,1 % раствор испытуемого образца в воде очищенной), содержащий 1,5–2,5 мкмоль О-ацетильных групп. Приготовление испытуемого раствора указывается в фармакопейной статье или нормативной документации.

2. Стандартный раствор ацетилхолина йодистого 5 мкмоль О-ацетильных групп в 1 мл. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,1360 г (точная навеска) ацетилхолина йодистого, прибавляют около 80 мл 0,001 М раствора натрия ацетата, перемешивают, доводят общий объем раствора тем же растворителем до метки и вновь перемешивают. Раствор хранят при температуре 4 – 8 °С в течение 3 мес.

3. 2 М раствор гидроксиламина. В мерной колбе вместимостью 500 мл растворяют 69,5 г гидроксиламина гидрохлорида в воде очищенной, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре 4–8 °С в течение 1 мес.

4. 3,5 М раствор натрия гидроксида. В мерной колбе вместимостью 500 мл растворяют 70,0 г натрия гидроксида в воде очищенной, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 3 мес.

5. Реактив 1. Смешивают равные объемы 1 М раствора гидроксилamina и 3,5 М раствора натрия гидроксида. Реактив готовят в день проведения анализа.

6. Хлористоводородная кислота разведенная. Смешивают 1 объем хлористоводородной кислоты концентрированной с 2 объемами воды очищенной. Раствор хранят в вытяжном шкафу при комнатной температуре в течение 6 мес.

7. 0,37 М раствор железа (III) хлорида. Растворяют 50,0 г железа (III) хлорида 6-водного в 0,1М растворе хлористоводородной кислоты в мерной колбе вместимостью 500 мл, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре 4 – 8 °С в течение 3 мес.

8. 0,001 М раствор натрия ацетата. Растворяют 0,0680 г натрия ацетата тригидрата в воде очищенной в мерной колбе вместимостью 500 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Устанавливают в растворе рН 4,5 с помощью 1 М раствора уксусной кислоты. Раствор хранят при температуре 4 – 8 °С в течение 3 мес.

9. 1 М раствор хлористоводородной кислоты. В мерную колбу вместимостью 500 мл, содержащую 200–300 мл воды очищенной, помещают 4,13 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, доводят объем тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор хранят в вытяжном шкафу при комнатной температуре в течение 6 мес.