**Капсульный антиген ФС**

***Salmonella typhi*,**

**субстанция-порошок Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на капсульный антиген *Salmonella typhi*, субстанция-порошок.

Активным компонентом субстанции является капсульный полисахарид *S.typhi.*

Субстанция предназначена для производства готовых лекарственных средств.

В состав субстанции входят вспомогательные вещества.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство субстанции должно осуществляться в соответствии с требованиями правил надлежащей производственной практики и контроля качества биологических лекарственных препаратов и с соблюдением требований, указанных в ОФС «Биологические лекарственные препараты»

Производственный штамм~~ы~~ должен иметь паспорт, в котором указаны: история его выделения, морфологические, тинкториальные, культуральные и биохимические свойства, видовая идентификация. Штамм должен иметь стабильные генетические и биологические свойства, и регулярно контролироваться.

ИСПЫТАНИЯ

**Описание.** Белый аморфный порошок.

**Растворимость.** Растворим в воде.

**Подлинность.** Оценивается в реакции преципитации в геле по Оухтерлони с монорецепторной Ви-сывороткой. Линия преципитации 0,01 % раствора субстанции должна быть идентичной линии преципитации стандартного образца (СО).

**Прозрачность.** 0,01 % раствор субстанции должен быть прозрачным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

**Цветность.** Окраска 0,01 % раствора субстанции должен быть бесцветным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

**рН.** От 3,0 до 6,5. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

**Белок.** Не более 1,0 %. Определение проводят по методу Лоури без предварительного осаждения белка в соответствии с ОФС «Определение белка колориметрическим методом (метод Лоури) в биологических лекарственных препаратах». Субстанцию предварительно растворяют в воде очищенной до концентрации 5,0 мг/мл.

**Нуклеиновые кислоты.** Не более 2,0 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение нуклеиновых кислот по методу Спирина в биологических лекарственных препаратах». Субстанцию предварительно растворяют в воде очищенной до концентрации 1,0 мг/мл.

**О-ацетильные группы.** Не менее 2,0 мкмоль/мг. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение О-ацетильных групп в полисахаридных вакцинах». Субстанцию предварительно растворяют в воде очищенной до концентрации 1,0 мг/мл.

**Молекулярные параметры.** Не менее 50 % полисахарида должно элюироваться в объеме до коэффициента распределения Kd = 0,25. Определение проводят методом гель-фильтрации с использованием сефарозы. Через колонку длиной около 0,4 м, с внутренним диаметром 9 мм, уравновешенную 0,2 М раствором натрия хлорида пропускают около 0,9 мг полисахарида в объеме 0,5 мл и элюируют со скоростью около 14 мл/ч. Фракции регистрируют с помощью ультрафиолетового детектора при длине волны 206 нм. Выход полисахарида оценивают по площади пиков до и после Кd = 0,25.

*Калибрование колонки*. Определяют полный (*V*t) и свободный (*V*o) объемы колонки с помощью калибровочных растворов голубого декстрана и натрия азида в условиях, описанных выше.

Вычисляют объем выхода фракций в мл (*V*е), соответствующий Кd = 0,25 по формуле:

$$V\_{e}=V\_{0}+0,25\left(V\_{t}-V\_{0}\right),$$

где:*V*0 – свободный объем колонки (объем выхода голубого декстрана), мл;

*V*t – общий объем колонки (объем выхода натрия азида), мл;

0,25 – коэффициент распределения вещества (Кd).

Рассчитывают значение объема выхода (*V*е ) в мм по формуле и находят на хроматограмме:

$$V\_{e}=\frac{V\_{e}\left(мл\right)∙V\_{t}\left(мм\right)}{V\_{t}\left(мл\right)}.$$

Пики, элюирующиеся до и после Kd = 0,25 (значение *V*е нахроматограмме, мм), интегрируют вручную.

Содержание полисахарида (А) в процентах в субстанции вакцины, элюированного до Kd = 0,25, вычисляют по формуле:

$$A=\frac{S\_{1}}{\left(S\_{1}+S\_{2}\right)}∙100 \%,$$

где: *S*1 – площадь пика, элюировавшегося до Кd = 0,25;

*S*2 – суммарная площадь пиков, элюировавшихся до и после Кd = 0,25.

Определение молекулярных параметров можно проводить с помощью валидированного метода эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография» раздел «Эксклюзионная хроматография».

Примечания

1. Приготовление испытуемого раствора*.* Растворяют 0,9 ± 0,050 мг полисахарида в 0,5 мл 0,2 М раствора натрия хлорида. Полученный раствор перемешивают на шейкере в течение 2 мин. Раствор готовят непосредственно перед использованием.
2. Приготовление 0,1 % раствора натрия азида. Растворяют 1 мг натрия азида в 1мл 0,2 М раствора натрия хлорида. Раствор перемешивают на шейкере в течение 1 мин. Раствор готовят непосредственно перед использованием.
3. Приготовление 0,5 % раствора голубого декстрана. Растворяют 0,5 мг голубого декстрана в 0,5 мл 0,2 М раствора натрия хлорида, перемешивают на шейкере в течение 1 мин, прибавляют 40 мкл 0,1 % раствора натрия азида и снова перемешивают на шейкере.

Растворы для калибрования хроматографической колонки готовят непосредственно перед использованием.

1. Приготовление 0,2 М раствора натрия хлорида*.* В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 500 мл воды очищенной, прибавляют 11,7 г натрия хлорида, доводят объём раствора водой до метки. Раствор перемешивают на магнитной мешалке в течение 5 мин и хранят при температуре 4 – 8 °С в течение 1 мес.

**Специфическая активность.** Содержание Ви-антигена в субстанции должно быть от 70 до 130 %. Испытания проводят методом ракетного иммуноэлектрофореза.

**Аномальная токсичность.** Субстанция должна быть нетоксичной. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

Готовят раствор субстанции в концентрации 100,0 мкг в 1,0 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Тест-доза для морских свинок − 1,0 мл испытуемого раствора подкожно, для мышей – 0,5 мл испытуемого раствора внутрибрюшинно.

**Транспортирование.** При температуре от 2 до 25 °С, допускается транспортирование при температуре 35 °С не более 14 сут.

**Хранение.** При температуре от 2 до 8 °С.