**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
| ОФС.0.0.0000 |
| **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОРМАЛЬДЕГИДА В ВАКЦИНАХ И АНАТОКСИНАХ** |

В общей фармакопейной статье приведены методики количественного определения формальдегида в вакцинах и анатоксинах с использованием ацетилацетонового реактива (метод 1), железа(III) хлорида и сульфаминовой кислоты реактива (метод 2), фуксинсернистой кислоты (метод 3).

МЕТОД 1

К 1 мл испытуемого образца, разведённого подходящим растворителем в 10 раз, прибавляют 4 мл *воды* и 5 мл *ацетилацетонового реактива*. Пробирку нагревают на водяной бане при температуре 40 °С в течение 40 мин. Образцы просматривают вдоль вертикальной оси пробирок. Интенсивность окраски полученного раствора не должна превышать интенсивность окраски раствора сравнения, приготовленного аналогично испытуемому образцу, с использованием вместо разведённого испытуемого образца 1 мл раствора 20 мкг/мл формальдегида, полученного разведением формальдегида раствора 35 %.

МЕТОД 2

*Испытуемый раствор*. Испытуемый образец разводят *водой* в соотношении 1:200. Если испытуемый образец представляет собой эмульсию, готовят разведения в соотношении 1:20, используя водную фазу, отделённую с помощью одной из следующих методик:

1) К 1,0 мл испытуемого образца прибавляют   
1,0 мл *изопропилмиристата* и перемешивают. Прибавляют 1,3 мл раствора 103 г/л *хлористоводородной кислоты*, 2,0 мл *хлороформа* и   
2,7 мл раствора 9 г/л *натрия хлорида*, тщательно перемешивают. Центрифугируют при 15 000 g в течение 60 мин. После отделения водную фазу доводят *водой* до объёма 10,0 мл.

Если данная процедура не позволила отделить водную фазу, то используют раствор 9 г/л *натрия хлорида*, содержащий   
100 г/л *полисорбата 20*, и повторяют процедуру, но центрифугируют   
при 22 500 g.

2) К 1,0 мл испытуемого образца прибавляют 1,0 мл раствора 100 г/л *натрия хлорида* и перемешивают. Центрифугируют при 1000 g в течение 15 мин. После отделения водную фазу доводят *водой* до объёма 10,0 мл.

3) К 1,0 мл испытуемого образца прибавляют 2,0 мл раствора 100 г/л *натрия хлорида*, 3,0 мл *хлороформа* и перемешивают. Центрифугируют при 1000 g в течение 5мин. После отделения водную фазу доводят *водой* до объёма 10,0 мл.

*Растворы сравнения.* Готовят разведения *формальдегида раствора 35 % водой* до концентраций формальдегида 0,25 мг/мл, 0,5 мг/мл, 1,00 мг/мл и 2,00 мг/мл. Затем готовят разведения каждого из полученных растворов *водой* в соотношении 1:200.

К 0,5 мл испытуемого раствора и каждого раствора сравнения прибавляют по 5,0 мл свежеприготовленного раствора 0,5 г/л *метилбензотиазолонгидразона гидрохлорида*, закрывают пробирки, встряхивают и выдерживают 60 мин. Затем в каждую пробирку прибавляют 1 мл *железа(III) хлорида и сульфаминовой кислоты реактива* и выдерживают 15 мин. Измеряют оптическую плотность (*ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»*) полученных растворов при длине волны 628 нм. Содержание формальдегида в испытуемом образце определяют по калибровочной кривой, построенной с помощью растворов сравнения. Результаты испытания считают достоверными, если коэффициент детерминации калибровочной кривой составляет не менее 0,97.

МЕТОД 3

*Испытуемый раствор.* В пробирку помещают объём испытуемого образца, содержащий от 30 мкг до 70 мкг формальдегида. Если испытуемый образец представляет собой сорбированную вакцину или анатоксин, используют надосадочную жидкость, полученную при центрифугировании при 2000 g в течение 20 мин.

*Раствор сравнения*. Готовят разведение *формальдегида раствора 35 % водой* до концентрации формальдегида 4,0 мг/мл (основной раствор). Непосредственно перед использованием из основного раствора готовят рабочее разведение до концентрации формальдегида 20 мкг/мл. В семь пробирок помещают 1,0 мл, 1,5 мл, 2,0 мл, 2,5 мл, 3,0 мл, 3,5 мл и 4,0 мл рабочего разведения.

*Компенсационный раствор.* Готовят, используя 5,0 мл *воды*.

*Раствор фуксинсернистой кислоты*. 1 г *фуксина основного* растворяют в 500 мл *воды* на водяной бане. Полученный раствор охлаждают до температуры 18–20 °С, фильтруют и прибавляют 30 мл раствора 200 г/л *калия метабисульфита* или25 млраствора 200 г/л *натрия метабисульфита*. Через 20 мин к полученной смеси прибавляют 10 мл *хлористоводородной кислоты*, доводят *водой* до объёма 1000 мл, перемешивают и используют не ранее чем через сутки после приготовления. Раствор хранят в защищённом от света месте, при комнатной температуре не более 1 г.

Перед каждым использованием раствор фуксинсернистой кислоты титруют *0,05 М раствором йода* (индикатор: *крахмала раствор 0,5 %*) до появления устойчивого синего окрашивания. На титрование 3 мл раствора фуксинсернистой кислоты должно расходоваться от 3 до 4 мл *0,05 М раствора йода*. Если объём *0,05 М раствора йода*, израсходованного на титрование, меньше 3 мл, то к 100 мл раствора фуксинсернистой кислоты прибавляют *калия метабисульфит* или *натрия метабисульфит* из расчёта 200 мг на каждый миллилитр разницы между 3 мл и израсходованным объёмом *0,05 М раствора йода*. Если объём *0,05 М раствора йода*, израсходованный на титрование, больше 4 мл, то к 100 мл раствора фуксинсернистой кислоты прибавляют раствор *фуксина основного* (*V*) в мл в количестве, рассчитанном по формуле:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где: | *V1* | − | объём *0,05 М раствора йода*, израсходованный на титрование 3 мл раствора фуксинсернистой кислоты, мл. |

Объём испытуемого раствора и каждого раствора сравнения доводят *водой* до 5,0 мл и перемешивают. В пробирки прибавляют по 1 мл раствора фуксинсернистой кислоты и вновь перемешивают. Пробирки закрывают пробками и выдерживают 1 ч. Измеряют оптическую плотность   
*(ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»)* полученных растворов при длине волны 590 нм.

Строят калибровочный график зависимости значений оптической плотности семи растворов сравнения от содержания формальдегида и с его помощью определяют концентрацию формальдегида в испытуемом растворе.

Концентрацию формальдегида (*X*) в мкг/мл вычисляют по формуле:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где: | *а* | − | содержание формальдегида, найденное по калибровочному графику, мкг; |
|  | *А* | − | объём испытуемого раствора, мл. |