

Верификация методики испытания вакцины гемофильной тип b конъюгированной по показателю «Капсульный полисахарид»

А.А. Иванова, А.Д. Конон, Е.Л. Салимова, В.П. Трухин

Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов Федерального медико-биологического агентства; Российская Федерация, 198320, Санкт-Петербург, Красное Село, ул. Свободы, д. 52

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Иванова Анастасия Александровна – инженер-технолог цеха «Комбинированные вакцины», Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов (СПбНИИВС). Тел.: +7 (904) 640-26-48. E-mail: an.a.ivanova@spbniivs.ru, ORCID: 0000-0001-6840-0383

Конон Анастасия Дмитриевна – ведущий инженер-технолог цеха «Комбинированные вакцины» СПбНИИВС, кандидат технических наук. Тел.: +7 (812) 660-06-35. E-mail: a.d.konon@spbniivs.ru, ORCID :0000-0002-3311-4771

Салимова Елена Леонидовна – начальник цеха «Комбинированные вакцины» СПбНИИВС, кандидат фармацевтических наук. Тел.: +7 (812)-660-06-35. E-mail: e.l.salimova@spbniivs.ru, ORCID :0000-0002-9883-2619

Трухин Виктор Павлович – директор предприятия СПбНИИВС, кандидат юридических наук. Тел.: +7 (812) 741-19-78. E-mail: v.p.truhin@spbniivs.ru, ORCID: 0000-0003-0282-9421

РЕЗЮМЕ

Введение. Многие развитые страны мира включили в Национальные программы иммунизации вакцину против гемофильной инфекции, вызываемой бактерией *Haemophilus influenzae* тип b. Одним из основных показателей качества вакцин является специфическая активность, определяемая по содержанию капсульного полисахарида полирибозилрибитолфосфата (ПРФ).

Цель исследования – верификация методики спектрофотометрического определения фосфора для контроля вакцины гемофильной тип b конъюгированной по количественному показателю «Капсульный полисахарид» в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи РФ XIV издания (ГФФ XIV).

Материал и методы. Объект исследования – препарат «Вакцина гемофильная тип b конъюгированная, лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения». Верификацию методики ОФС.1.7.2.0017.15 «Спектрофотометрическое определение фосфора в биологических лекарственных препаратах» проводили в соответствии с требованиями ГФФ XIV.

Результаты. При проведении верификации методики оценивали следующие параметры: правильность, повторяемость и внутрилабораторная прецизионность. Выявлена несходимость результатов. Подобраны оптимальные условия проведения методики: для испытуемого и стандартных (калибровочных) образцов рекомендовано использовать единый контрольный образец. Пробоподготовку образцов следует проводить в аналогичных условиях.

Заключение. Оптимизирована методика спектрофотометрического определения фосфора, позволяющая получить достоверные результаты по количественному показателю «Капсульный полисахарид» для вакцины гемофильной тип b конъюгированной, лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения.

Ключевые слова: капсульный полисахарид, полирибозилрибитолфосфат, *Haemophilus influenzae* тип b, спектрофотометрия, верификация

Для цитирования: Иванова А.А., Конон А.Д., Салимова Е.Л., Трухин В.П. Верификация методики испытания вакцины гемофильной тип b конъюгированной по показателю «Капсульный полисахарид». Фармация, 2020; 69 (2): 23–28. <https://doi.org/10.29296/25419218-2020-02-04>

VERIFICATION OF THE TEST PROCEDURE FOR A HAEMOPHILUS TYPE B CONJUGATE VACCINE BY DETERMINATION OF CAPSULAR POLYSACCHARIDE

A.A. Ivanova, A.D. Konon, E.L. Salimova, V.P. Trukhin

Saint Petersburg Research Institute of Vaccines and Serums and Enterprise for the Production of Bacterial Preparations, Federal Biomedical Agency of Russia, 52, Svoboda St., Krasnoe Selo Saint Petersburg 198320, Russian Federation

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ivanova Anastasia Aleksandrovna – Process Engineer of «Combined Vaccines» department the Saint-Petersburg scientific research institute of vaccines and serums and the enterprise for the production of bacterial preparations" (SPbSRIVS). Tel.: +7 (904) 640-26-48. E-mail: an.a.ivanova@spbniivs.ru, ORCID:0000-0001-6840-0383

Konon Anastasia Dmitrievna – Leading Process Engineer of «Combined Vaccines» department SPbSRIVS, PhD. Tel.: +7 (812) 660-06-35. E-mail: a.d.konon@spbniivs.ru, ORCID: 0000-0002-3311-4771

Salimova Elena Leonidovna – Head of «Combined Vaccines» department SPbSRIVS, PhD. Tel.: +7 (812) 660-06-35. E-mail: e.l.salimova@spbniivs.ru, ORCID:0000-0002-9883-2619

Trukhin Viktor Pavlovich – Enterprise director SPbSRIVS, PhD. Tel.: +7 (812) 741-19-78. E-mail: v.p.trukhin@spbniivs.ru, ORCID:0000-0003-0282-9421

SUMMARY

Introduction. Many developed countries in the world have included vaccine against infection caused by *Haemophilus influenzae* type b in their national immunization programs. One of the main quality indicators of vaccine is its specific activity determined by the content of the capsular polysaccharide polyribosylribitol phosphate (PRP).

Objective: to verify the spectrophotometric determination of phosphorus for the control of hemophilus type b capsular polysaccharide conjugate vaccine in accordance with the requirements of the 14th Edition of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation (RF SP-14).

Material and methods. The investigation object was a hemophilus type b conjugate vaccine, lyophilisate for solution for intramuscular injection. The procedure given in GPA 1.7.2.0017.15 «Spectrophotometric Determination of Phosphorus in Biological Agents» was verified in accordance with the requirements of the RF SP-14.

Results. While verifying the procedure, the investigators estimated the following parameters: correctness, reproductibility, and intralaboratory precision. The results were found to be dissimilar. The optimal conditions for the procedure were selected for the subject and standard (calibration) samples; it was recommended to use a single control sample. Samples should be prepared under similar conditions.

Conclusion. The procedure for spectrophotometric determination of phosphorus has been optimized, which makes it possible to obtain reliable results by the quantitative indicator capsular polysaccharide for the hemophilic type b conjugate vaccine, lyophilisate for solution for intramuscular injection.

Key words: capsular polysaccharide, polyribosylribitol phosphate, *Haemophilus influenzae* type b, spectrophotometry, verification.

For citation: Ivanova A.A., Konon A.D., Salimova E.L., Trukhin V.P. Verification of the test procedure for a *Haemophilus* type b conjugate vaccine by determination of capsular polysaccharide. *Farmatsiya (Pharmacy)*, 2020; 69 (2): 23–28. <https://doi.org/10.29296/25419218-2020-02-04>

Введение

Во многих развитых странах мира в Национальные программы иммунизации включена вакцина против гемофильной инфекции, вызываемой бактерией *Haemophilus influenzae* тип b (Hib). Основные признаки Hib-инфекции: тяжелая пневмония, менингит и другие инвазивные заболевания у детей до 5 лет. До введения вакцинации серьезные заболевания были зафиксированы у 8,13 млн детей в возрасте 1–59 мес, смертность составила 371 000 человек. Начиная с 90-х годов XX века, после начала иммунизации Hib-вакциной заболеваемость гемофильной инфекцией снизилась более чем на 90% [1]. Программы вакцинации Hib, как правило, оказываются экономически эффективными для всех географических регионов и уровней национального дохода; их рекомендуется включать во все национальные программы иммунизации. Уровень заболеваемости Hib-инфекцией и ценообразование на вакцину являются важными проблемами для повсеместного ее внедрения [2]. На данный момент в Российской Федерации вакцина против гемофильной инфекции входит в Национальный календарь профилактических прививок, но вакцинация осуществляется только детям из группы риска. Министерство здравоохранения РФ предложило к 2020 г. сделать иммунизацию от гемофильной инфекции обязательной для всех детей.

В настоящее время в РФ зарегистрированы только 2 импортные моновакцины против гемофильной инфекции: «Акт-Хиб» (Франция) и «Хибе-

рикс» (Бельгия). Отечественных вакцин не производят. Поэтому особую актуальность приобретает необходимость внедрения в кратчайшие сроки отечественной технологии производства вакцины против *Haemophilus influenzae* тип b. Ранее сотрудниками Санкт-Петербургского научно-исследовательского института вакцин и сывороток и предприятия по производству бактериальных препаратов (СПбНИИВС) были наработаны образцы вакцины гемофильной тип b конъюгированной, в состав которой входит капсульный полисахарид полирибозилрибитолфосфат (ПРФ), конъюгированный со столбнячным анатоксином.

В ГФ РФ XIV содержатся требования к качеству вакцины гемофильной тип b конъюгированной, лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения. Одним из основных показателей качества вакцин является ее специфическая активность, определяемая по содержанию капсульного полисахарида ПРФ [3]. Определение последнего предлагается проводить путем пересчета содержания фосфора на специфический полисахарид, используя коэффициент пересчета, равный 11,9. Содержание фосфора в вакцине определяется спектрофотометрически, согласно ОФС.1.7.2.0017.15 «Спектрофотометрическое определение фосфора в биологических лекарственных препаратах» ГФ РФ XIV [3].

Кроме того, в ГФ РФ XIV содержатся рекомендации по определению количества капсульного полисахарида с помощью подходящих иммунохимических методов, высокоэффективной

анионообменной жидкостной хроматографии с импульсным амперометрическим детектированием (НРАЕ-РАD) или с помощью количественного определения рибозы. Метод НРАЕ-РАD не требует сложной предварительной обработки исследуемых образцов, обладает высокой чувствительностью [4–6]. Однако при этом требуется дорогостоящее оборудование и наличие квалифицированных специалистов. Поэтому метод НРАЕ-РАD не применяется широко, что и отражено в опубликованных исследованиях. Иммунохимические методы определения количества капсульного полисахарида отличаются дороговизной оборудования, расходных материалов, а также требуют больших временных затрат [7,8].

Количественное определение рибозы проводят в соответствии с ОФС.1.2.3.0019.15 «Определение сахаров спектрофотометрическим методом» ГФ РФ XIV с последующим пересчетом на количество ПРФ [3]. Метод определения с орциновым реактивом достаточно прост в применении к жидким лекарственным формам вакцины гемофильной тип b конъюгированной. Однако в большинстве случаев в состав лиофилизированных лекарственных форм вакцины гемофильной тип b конъюгированной входит такое вспомогательное вещество, как сахароза. Это препятствует реализации данной методики из-за взаимодействия сахаров с орциновым реактивом, что приводит к образованию темно-коричневого осадка и искажения результатов измерения оптической плотности. Поэтому для выполнения данной методики требуется предварительное удаление сахарозы из испытуемого раствора [9]. В связи с необходимостью разработки способа пробоподготовки метод определения рибозы в вакцине гемофильной тип b конъюгированной требует проведения валидации аналитической методики.

В соответствии с ФС.3.3.1.0055.18 ГФ РФ XIV обязательным самостоятельным показателем, определяемым в вакцине гемофильной тип b конъюгированной, является «Фосфор» [3]. Следует учитывать, что и при использовании метода определения капсульного полисахарида по содержанию рибозы также необходимо сначала дополнительно определить фосфор. Поэтому считаем целесообразным определение капсульного полисахарида по содержанию фосфора для снижения трудозатрат и времени контроля.

Метод определения фосфора требует дополнительной пробоподготовки, которая описана в ОФС.1.7.2.0017.15 «Спектрофотометрическое определение фосфора в биологических лекар-

ственных препаратах» ГФ РФ XIV. В связи с этим достаточно провести верификацию методики [3].

Цель настоящей работы – верификация методики спектрофотометрического определения фосфора для контроля вакцины гемофильной тип b конъюгированной по количественному показателю «Капсульный полисахарид» в соответствии с ГФ РФ XIV.

Материал и методы

Объекты исследования: вакцина гемофильная тип b конъюгированная, лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения, серия 161118 (производитель СПБНИИВС ФМБА России); стандартный образец *Haemophilus influenzae* полисахарид ПРФ (производитель NIBSC, Англия) (далее – СО ПРФ).

Для приготовления испытуемого раствора отбирали 2 флакона с препаратом вакцины, содержимое каждого флакона растворяли в 0,5 мл (доза препарата – от 9,5 до 14,3 мкг) воды очищенной и количественно объединяли в одной емкости. Рабочий раствор стандартного образца ПРФ готовили в концентрации 19,616 мкг/мл, что в пересчете на концентрацию фосфора составляло 1,648 мкг/мл.

Подготовку проб для минерализации проводили следующим образом: в стеклянные термостойкие пробирки размером 250×20 мм с помощью стеклянной пипетки и дозатора пипеточного электрического (MidiPlus) отбирали по 0,2 мл испытуемого раствора, по 0,2 мл рабочего раствора стандартного образца. В качестве контрольного образца использовали 0,2 мл воды очищенной. Образцы отбирали в 3 повторностях.

Во все пробирки вносили по 0,15 мл реактива для минерализации, содержащего в равных объемах серную кислоту концентрированную (ГОСТ 4204-77) и 70% хлорную кислоту (Sigma Aldrich, каталожный №244252). Пробирки плотно закрывали алюминиевой фольгой в 2 слоя. Подготовленные пробы помещали в песочную баню (Combiplac-Sand, Selecta), предварительно нагретую до температуры 180°C. Контроль температуры проводили с помощью ртутного термометра, помещенного в песок. После образования темно-коричневой жидкости в образцах испытуемого раствора, температуру бани увеличивали до 250°C. Образцы выдерживали при этой температуре в течение 10 ч. По окончании минерализации образцы извлекали в стеклянные пробирки, объем в пробирках доводили до 2 мл водой очищенной. Перемешивали с помощью орбитального шейкера «Вортекс» (MS 3 basic, IKA).

Цветной реактив готовили непосредственно перед добавлением в образцы путем смешивания реактивов в следующем соотношении: 2 объема воды очищенной, 1 объем 1,5 М раствора серной кислоты, 1 объем 2,5% раствора аммония молибдата (Sigma Aldrich, каталожный № 09878) и 1 объем 10% раствора аскорбиновой кислоты (Sigma Aldrich, каталожный № A92902). Во все пробирки добавляли по 2 мл цветного реактива, после чего растворы хорошо перемешивали с помощью орбитального шейкера «Вортекс». Далее пробирки закрывали алюминиевой фольгой и помещали на 2 ч в предварительно нагретую до температуры 37°C водяную баню (GFL 1003, GFL Company). По истечении времени инкубации образцы должны были остыть до комнатной температуры. Затем с помощью спектрофотометра HITACHI U-2900 измеряли оптическую плотность испытуемых образцов при длине волны 825 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм и сравнивали с контрольной пробой.

Калибровочный график строили по результатам 2 параллельных измерений. Рабочий раствор калия дигидрофосфата (Sigma Aldrich, каталожный № 71505) готовили при концентрации фосфора 2 мкг/мл. В пробирки отбирали 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 мл рабочего раствора калия дигидрофосфата.

В случае, когда образцы для калибровочного графика не помещали в песочную баню с испытуемыми образцами, добавляли по 0,05 мл реактива для минерализации в каждую пробирку, а также готовили контроль, содержащий 1,95 мл воды очищенной и 0,05 мл реактива для минерализации. При проведении минерализации образцов

калибровочной кривой на песочной бане в одних условиях с испытуемыми образцами добавляли по 0,15 мл реактива для минерализации в каждую пробирку.

Доводили объем образцов калибровочной кривой до 2 мл добавлением воды очищенной, добавляли 2 мл цветного реактива и помещали в водяную баню (GFL 1003, GFL Company) на 2 ч при температуре 37°C в одних условиях с испытуемыми образцами. Измеряли оптическую плотность растворов как описано выше. Строили калибровочный график зависимости среднего значения показателя оптической плотности от количества фосфора.

Содержание фосфора (X) в 0,5мл исследуемого образца в микрограммах вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 0,5}{B},$$

где А – количество фосфора, найденное по калибровочному графику, мкг; В – объем исследуемого образца, взятый на анализ, мл.

Верификацию выполняли, согласно требованиям ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» ГФ РФ XIV [3]. Оценивали следующие параметры: правильность, повторяемость и внутрилабораторная прецизионность.

Результаты и обсуждение

Проведена верификация методики количественного определения фосфора с использованием имеющегося в лаборатории оборудования, посуды, вспомогательных материалов, реактивов и растворов, описанная в ОФС.1.7.2.0017.15 «Спектрофотометрическое определение фосфора в биологических лекарственных препаратах» ГФ РФ XIV. Установлено, что результаты не являлись правильными.

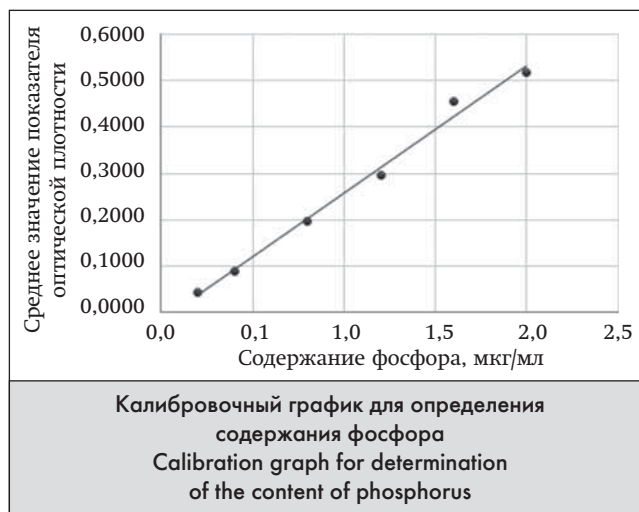
Таблица 1

Данные по результатам построения калибровочного графика для определения содержания фосфора

Table 1

Data on the results of constructing a calibration graph to determine the content of phosphorus

Концентрация фосфора, мкг	Значение оптической плотности (D)		Значение оптической плотности (Dcp)	Среднее квадратическое отклонение
	серия №1	серия №2		
0,2	0,0444	0,0414	0,0429	0,00150
0,4	0,0895	0,0899	0,0897	0,00020
0,8	0,1847	0,2106	0,1976	0,01300
1,2	0,3041	0,2883	0,2962	0,00790
1,6	0,4845	0,4277	0,4561	0,02800
2,0	0,5097	0,5286	0,5192	0,00940



ными, сходимыми и воспроизводимыми. В табл. 1 и на рисунке представлены результаты определения содержания фосфора по калибровочному графику, рассчитано также среднее квадратическое отклонение. Результаты обработки полученных данных по исследуемым образцам представлены в табл. 2.

ГФ РФ XIV предлагает использовать несколько контрольных образцов, подготовленных при разных условиях, однако это может отрицательно повлиять на интерпретацию результатов. При проведении испытаний, возможно, следует использовать единый контрольный образец для испытуемых образцов и образцов калибровочной кривой, а также выдерживать все образцы в одинаковых условиях. Данное предположение подтверждает методика из Европейской Фармакопеи 8.0, содержащая требования для определения фосфора в субстанции ПРФ (статья 01/2008:20518 «Фосфор в полисахаридных вакцинах»). Согласно этой методике, минерализация испытуемых, стандартных (калибровочных) и контрольного образцов должна проводиться в одинаковых условиях путем добавления равного количества раствора серной кислоты, раствора хлорной кислоты и нагрева в масляной бане при температуре 120°C до обесцвечивания раствора [10].

На следующем этапе осуществляли определение фосфора на стандартном образце ПРФ (с проведением минерализации в течение 10 ч) с измерением оптической плотности относительно контрольного образца, подвергнувшегося минерализации, и контрольного образца для калибровки, не подвергнувшегося минерализации. Стандартные (калибровочные) образцы минерализации не подвергали. Сравнение результатов испытаний на образцах СО ПРФ подтвердило, что измерения относительно разных контрольных образцов дают несопоставимые результаты (табл. 3).

На основании полученных значений процедура пробоподготовки была оптимизирована. В образцы с испытуемым раствором, с растворами для построения калибровочного графика, а также в контрольную пробу, содержащую воду очищенную, вносили одинаковое количество реактива для минерализации и выдерживали в одинако-

Таблица 2

Результаты обработки полученных данных при проведении верификации методики «Спектрофотометрическое определение фосфора в биологических лекарственных препаратах»

Table 2

The results of processing the findings when verifying the procedure for spectrophotometric determination of phosphorus in biological agents

Показатель	Образец			
	вакцина гемофильная тип b конъюгированная		стандартный образец ПРФ	
Исполнитель	1	2	1	2
Содержание фосфора в исследуемом образце, мкг/мл	1,33625	1,13707	0,1388	0,1527
	1,19025	0,88545	0,2758	0,1174
	1,07175	0,94725	0,2420	0,1438
Среднее содержание фосфора в исследуемом образце, мкг/мл (найденно)	1,1994	0,9899	0,2189	0,1380
Сходимость результатов, %	11,04	13,25	32,6	13,30
Номинальное содержание фосфора в исследуемом образце, мкг/мл (заложено)	1,0588		0,3296	
Значение правильности (Z), %	13,28	6,51	66,41	41,86
Разница между результатами, %	6,77		24,55	

вых условиях на песочной бане до обесцвечивания реакционной массы.

Результаты сравнения значений содержания фосфора и капсульного полисахарида, полученных спектрофотометрическим методом с оптимизированной пробоподготовкой, со значениями номинального количества фосфора и капсульного полисахарида, установленными для вакцины гемофильной тип b конъюгированной, лиофилизат для

Таблица 3

Сравнение результатов проведения испытаний на стандартном образце ПРФ

Table 3

Comparison of the results of testing on a standard sample of PRP

Показатель	Стандартный образец ПРФ	
	Да	Нет
Проведение минерализации контрольного образца, относительно которого измеряли оптическую плотность, на песочной бане в течение 10 ч		
Среднее значение показателя оптической плотности	0,0326	0,0840
Количество фосфора (заложено), мкг	0,3296	0,3296
Количество фосфора (найденно по калибровочному графику), мкг	0,1835	0,3699

Таблица 4

Содержание фосфора и капсульного полисахарида в исследуемых образцах

Table 4

The content of phosphorus and capsular polysaccharide in the test samples

Показатель	Вакцина гемофильная тип b конъюгированная, мкг/доза	Стандартный образец ПРФ, мкг/мл
Номинальное содержание фосфора, единица измерения	от 0,8 до 1,2	1,648
Содержание фосфора (найденно), единица измерения	0,978±0,064	1,647±0,032
Номинальное содержание капсульного полисахарида, единица измерения	от 9,5 до 14,3	19,616
Содержание капсульного полисахарида (найденно)	11,64±0,76	19,6±0,38

приготовления раствора для внутримышечного введения, в ФС.З.З.1.0055.18 ГФ РФ XIV изд. представлены в табл. 4. Результаты являются правильными и сходимыми, количество фосфора и капсульного полисахарида находится в пределах заложенных норм.

Заключение

В качестве методики испытания вакцины гемофильной тип b конъюгированной по количественному показателю «Капсульный полисахарид» была выбрана методика спектрофотометрического определения фосфора с пересчетом на специфический полисахарид посредством умножения на коэффициент пересчета, равный 11,9.

Выявленные несоответствия методик спектрофотометрического определения фосфора, содержащиеся в ГФ РФ XIV и Европейской фармакопее 8.0, позволили предложить альтернативный вариант выполнения пробоподготовки, который заключается в проведении минерализации не только испытуемых, но и стандартных (калибровочных) и контрольного образцов при аналогичных условиях. Оптимизированный способ пробоподготовки позволяет получить достоверные результаты по количественному показателю «Капсульный полисахарид» для вакцины гемофильной тип b конъюгированной, лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения. В дальнейшем предложенные изменения подлежат валидации аналитической методики, после чего будут внесены в производственный процесс на этапе контроля готовой вакцины.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Литература/References

1. Документ по позиции ВОЗ. Вакцинация против гемофильной инфекции типа b (Hib). Еженедельный эпидемиологический бюллетень, 2013; Т. 88:413–28. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.who.int/immunization/documents/Hib_Refs_Rus.pdf?ua=1 (дата обращения: 14.01.2019) [The document on the position of WHO. Vaccination against Hemophilus influenzae type b infection (Hib). Weekly Epidemiological Bulletin, 2013; T. 88: 413–28. [Electronic resource]. Access mode: https://www.who.int/immunization/documents/Hib_Refs_Rus.pdf?ua=1 (access date: 14.01.2019) (in Russian)].
2. Chongmelaxme B., Hammanee M., Phooaphirak W. et al. Economic evaluations of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) vaccine: asystematic review. Journal of Medical Economics, 2017; 20(10): 1094–1106. DOI:10.1080/13696998.2017.1359181
3. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://femb.ru/feml> [The State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIV-th ed. [Electronic resource]. Access mode: <http://femb.ru/feml> (in Russian)].
4. Tsai C.M. Quantitation of Polysaccharide in Hib Conjugate Vaccines. [Electronic resource]. Accessmode: <http://grantome.com/grant/NIH/Z01-BJ002009-07>
5. Tsai C.M., Gu X.X., Byrd R.A. Quantification of polysaccharide in *Haemophilus influenzae* type b conjugate and polysaccharide vaccines by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. Vaccine, 1994; 12: 700–13.
6. He P.F., Li Y.N., Tang J., Ye Q. Determination of polysaccharide content in *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines by high performance anion exchange chromatography-pulsed amperometric detector. Chinese Journal of Biologicals, 2013; 26: 1002–5. DOI:10.1016/0264-410X(94)90219-4
7. Yoo T.H., Kim H.S., Park S.S., Bang E.Y. et al. Measurement of Free Polysaccharide in Tetanus Toxoid-Conjugate Vaccine Using Antibody/Ammonium Sulfate Precipitation. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2003; 13: 469–72.
8. Hamidi A., Kreeftenberg H. Use of immune assays during the development of *Haemophilus influenzae* type b vaccine for technology transfer to emerging vaccine manufacturer. Human Vaccines & Immunotherapeutics, 2014; 10: 2697–703. DOI:10.4161/hv.29300
9. Белякова О.В. Разработка и валидация методики определения полирибозилрибитола фосфата в конъюгированных вакцинах для профилактики инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* типа b. Биофармацевтический журнал, 2015; 2: 21–4. [Belyakova O.V. Development and validation of the method for determining polyribosylribitol phosphate in conjugated vaccines for the prevention of infection caused by *Haemophilus influenzae* type b. Biofarmatsevticheskii zhurnal, 2015; 2: 21–4. (in Russian)].
10. Европейская фармакопея 8.0, 2015; 1: 212. (издание на русском языке). [The European Pharmacopoeia 8.0 edition in Russian, 2015; 1: 212 (in Russian)].

Поступила 29 сентября 2019 г.

Received September 29 2019

Принята к публикации 18 декабря 2019 г.

Accepted December 18 2019