

Tiêu chuẩn chấp thuận

Vắc xin đạt yêu cầu nếu công hiệu không ít hơn 4 IU trong một liều đơn vắc xin cho người và giới hạn dưới của 95 % khoảng tin cậy của công hiệu tìm được không ít hơn 2 IU trong một liều đơn vắc xin cho người.

Nếu thử nghiệm lần 1 có giá trị (valid) và đạt tiêu chuẩn chấp thuận thì vắc xin đó coi như đạt yêu cầu về công hiệu. Nhưng nếu không đạt tiêu chuẩn chấp thuận thì thử nghiệm đó phải được làm nhắc lại. Công hiệu vắc xin đạt tiêu chuẩn chấp thuận khi kết quả trung bình nhân của các lần thử nghiệm có giá trị không thấp hơn tiêu chuẩn chấp thuận cho phép.

Nếu lần 1 không đạt yêu cầu và thử nghiệm không có giá trị (invalid) thì phải làm lại thử nghiệm. Kết quả lần thử nghiệm đầu sẽ không được dùng để xem xét. Nếu kết quả lần thử nghiệm nhắc lại có giá trị và đạt tiêu chuẩn chấp thuận thì loạt vắc xin đó coi như đạt yêu cầu về công hiệu. Nếu không đạt yêu cầu thì phải làm lại như ở trên.

15.25 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG FORMALDEHYD TỒN DƯ TRONG VẮC XIN VÀ SINH PHẨM**Nguyên lý**

Có hai phương pháp xác định hàm lượng formaldehyd tồn dư trong vắc xin và sinh phẩm như sau:

Phương pháp 1: Dựa vào phản ứng tạo chất màu chinol dưới tác dụng của thuốc thử fuchsin và aldehyd hòa tan trong nước.
 Phương pháp 2: Định lượng formaldehyd bằng cách so màu của 3,5-diacetyl-1,4-dihydrolutidin ở bước sóng 415 nm. Phức hợp tạo thành có màu vàng chanh do phản ứng của formaldehyd tự do trong mẫu thử với acetylaceton và amoni trong môi trường acid nhẹ.

Cách tiến hành**Phương pháp 1**

Lấy 1 ml mẫu thử, cho nước cất vừa đủ 5 ml, thêm vào 1 ml thuốc thử fuchsin acid, trộn đều; đặt ống nghiệm bằng nút cao su và đợi 1 h. Đo mật độ quang học của dung dịch bằng kính lọc màu tím than (bước sóng 400 nm $\pm$ 5 nm).

Tiến hành làm song song trên mẫu trắng theo trình tự như trên nhưng thay 1 ml mẫu thử bằng 1 ml nước cất.

Kết quả xác định được bằng cách so màu của mẫu vắc xin thử với dung dịch chuẩn có mật độ quang học gần nhau nhất.

Dụng cụ chuẩn:

Lấy 1 ml dung dịch formaldehyd chuẩn 0,4 % thêm nước cất vừa đủ 100 ml vào (dung dịch 0,004 %).

Lấy 0,5 ml, 1,0 ml, 2,0 ml, 3,0 ml, 4,0 ml, 5,0 ml dung dịch chuẩn formaldehyd 0,004 % cho vào các ống nghiệm và cho nước cất vừa đủ 5,0 ml, thêm 1,0 ml dung dịch thuốc thử. Đợi 1 h sau đó tiến hành phân tích như đã mô tả ở trên.

Cách pha dung dịch formaldehyd chuẩn 0,4 %: Trước khi pha tiến hành xác định sơ bộ hàm lượng formaldehyd có trong dung dịch formaldehyd (dung dịch phải chứa không ít hơn 37 % formaldehyd). Cân 1 g dung dịch formaldehyd 40 % (cân chính xác, trong trường hợp dung dịch chứa ít

hơn 40 % thì phải tính toán lại cho thích hợp) cho vào một bình định mức 100 ml, cho nước cất vừa đủ tới vạch (dung dịch 0,4 %). Trước khi dùng pha loãng 100 lần.

Cách pha thuốc thử fuchsin: Hòa tan 2 g fuchsin kiềm vào 120 ml nước cất đã đun sôi, để nguội. Hòa 2 g natri sulfat (TT) vào 20 ml nước cất và trộn vào dung dịch trên, thêm 2 ml acid hydrocloric (TT). Cho nước cất vừa đủ 200 ml và chờ ít nhất 1 h mới đem sử dụng. Dung dịch này phải luôn luôn mới.

Phương pháp 2

Lấy khoảng 3 ml đến 4 ml mẫu thử ly tâm 4000 rpm trong 10 min, lấy phần nước (nếu mẫu thử trong thì không cần ly tâm). Pha loãng mẫu thử nếu cần thiết.

Lấy chính xác 3 ml mẫu thử cho vào ống nghiệm.

Dụng cụ chuẩn: Pha loãng 10 lần dung dịch formaldehyd chuẩn 0,04 %, từ đó pha các dung dịch formaldehyd chuẩn 0,0002 %; 0,0004 %; 0,0008 %; 0,0012 %.

Lấy chính xác 3 ml các dung dịch chuẩn đã pha loãng vào các ống nghiệm.

Mẫu trắng dùng 3 ml nước cất.

Thêm 3 ml dung dịch acetylaceton vào mỗi ống nghiệm đựng mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thử.

Lắc đều, đun cách thủy 100 °C trong 15 min.

Để nguội ở nhiệt độ phòng.

Tiến hành đo mật độ quang ở bước sóng 415 nm.

Cách tính kết quả:

$$X = n \times a$$

Trong đó:

X là hàm lượng formaldehyd có trong mẫu thử (%);

a là hàm lượng formaldehyd có trong mẫu thử tìm được trên đường chuẩn (%);

n là độ pha loãng mẫu.

Cách pha dung dịch formaldehyd chuẩn 0,04 %: Cân 311 mg hexamethylentetramin hòa tan trong vừa đủ 1000 ml nước cất, dung dịch có chứa 0,04 % formaldehyd, bảo quản dung dịch ở nhiệt độ phòng dùng trong 6 tháng.

Cách pha dung dịch acetylaceton: Cân 150 g amoni acetat (TT), hòa tan trong khoảng 500 ml nước cất. Thêm 3 ml acid acetic đậm đặc (TT), 2 ml acetylaceton (TT), khuấy đều, thêm nước cất vừa đủ 1000 ml. Bảo quản dung dịch ở 2 °C đến 8 °C, dùng trong 2 tháng.

Tiêu chuẩn chấp thuận

Mỗi loại vắc xin, sinh phẩm có tiêu chuẩn khác nhau. Các tiêu chuẩn này dựa theo quy định của WHO cho từng loại vắc xin và sinh phẩm. Tuy nhiên, lượng formaldehyd tồn dư trong vắc xin, sinh phẩm không được vượt quá 0,02 %.

15.26 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG NATRI CLORID VỚI SỰ CÓ MẶT CỦA PROTEIN BẰNG PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG GIÁN TIẾP (PHƯƠNG PHÁP CHARPENTIER-VOLHARD)**Nguyên lý**

Phương pháp dựa trên phản ứng của ion Cl⁻ với một lượng bạc nitrat thừa.

Bạc nitrat thừa sẽ được chuẩn độ bằng dung dịch amoni sulfocyanid với chỉ thị màu phen sắt amoni.

Protein trong mẫu thử được oxy hóa bằng kali permanganat trong môi trường acid trước khi tiến hành định lượng natri clorid.

Phương pháp tiến hành

Hút chính xác một thể tích (V ml) mẫu thử tương ứng với khoảng 0,2 mg hoạt chất cho vào một bình nón dung tích 50 ml.

Thêm 5 ml *dung dịch bạc nitrat 0,01 N*.

Thêm 1 ml *acid nitric đậm đặc (TT)*.

Thận trọng đun trên bếp cho đến khi sôi.

Thêm từng giọt *dung dịch bão hòa kali permanganat* cho đến khi có màu tím.

Tiếp tục đun sôi trong 5 min.

Thêm một ít đường glucose bột để khử màu.

Trên đáy bình xuất hiện tủa trắng như bông.

Làm nguội.

Thêm 0,5 ml *dung dịch phen sắt amoni bão hòa*.

Chuẩn độ bằng *dung dịch amoni sulfocyanid 0,01 N (CĐ)* cho đến khi có màu hồng.

Song song tiến hành làm mẫu trắng (thay mẫu thử bằng nước cất).

Lượng natri clorid có trong mẫu thử tính bằng mg % theo công thức:

$$X = \frac{(A - B) \times K \times 0,585 \times 100}{V}$$

Trong đó:

A là thể tích *dung dịch amoni sulfocyanid 0,01 N (CĐ)* dùng để chuẩn độ mẫu trắng (ml);

B là thể tích *dung dịch amoni sulfocyanid 0,01 N (CĐ)* dùng để chuẩn độ mẫu thử (ml);

K là hệ số điều chỉnh của *dung dịch amoni sulfocyanid 0,01 N*; 0,585 là lượng natri clorid tương ứng với 1 ml *dung dịch amoni sulfocyanid 0,01 N (mg)*;

V là số ml *dung dịch* mẫu thử đem kiểm tra;

100 là hệ số để chuyển thành %.

15.27 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG NHÔM (Al⁺⁺⁺) TRONG VẮC XIN VÀ SINH PHẨM

Phương pháp 1

Nguyên lý:

Phương pháp dựa trên phản ứng tạo thành phức chất của một lượng thừa *dung dịch muối natri của acid ethylen diamin tetra acetic (EDTA)* với ion nhôm (Al⁺⁺⁺) và sau đó chuẩn độ lượng thừa EDTA bằng *dung dịch đồng sulfat 0,01 M*.

Phương pháp tiến hành:

Lấy 1 ml *acid sulfuric (TT)*, 6 giọt *acid nitric (TT)* và 3 ml mẫu thử cho vào bình nón đun nóng cho đến khi thấy khói trắng dày đặc thoát ra.

Tiếp tục đun nóng và cho thêm vài giọt *acid nitric (TT)*

cho đến khi *dung dịch* trong bình mất màu. Để nguội bình. Thận trọng thêm 10 ml *nước cất*. Nếu *dung dịch* còn đục, đun tiếp cho đến khi trong.

Thêm *dung dịch natri hydroxyd 50 %* vào bình cho đến khi *dung dịch* có màu đỏ vàng [*dùng dung dịch da cam methyl (TT)* làm chất chỉ thị].

Nếu *dung dịch* đục, hòa tan tủa bằng cách thêm *dung dịch acid sulfuric 1 M*, cho thêm chính xác vào bình 25 ml *dung dịch dinatri diethylen diamin tetraacetat 0,01 M (CĐ)* và 10 ml *dung dịch đệm acetat pH 4,4* [có chứa 68 g *natri acetat (TT)*; 38,5 g *amoni acetat (TT)*; 125 ml *acid acetic (TT)* và *nước* vừa đủ 500 ml]. Đun sôi nhẹ trong 3 min.

Thêm 1 ml *dung dịch chỉ thị màu pyridylazonaphтол 0,1 % trong ethanol 95 %*. Khi còn nóng chuẩn độ ngay *dung dịch dinatri diethylen diamin tetraacetat* thừa bằng *dung dịch đồng sulfat 0,01 M (CĐ)* cho đến khi xuất hiện màu nâu tía, ta được A ml *dung dịch đồng sulfat 0,01 M*. Song song tiến hành làm mẫu trắng (thay mẫu thử bằng nước cất) được B ml *dung dịch đồng sulfat 0,01 M*.

1,0 ml *dung dịch dinatri diethylen diamin tetraacetat 0,01 M (CĐ)* tương đương với 0,2698 mg Al⁺⁺⁺.

Lượng nhôm X (Al⁺⁺⁺ mg/ml) trong mẫu thử được tính theo công thức sau:

$$X = \frac{B - A}{\text{Thể tích mẫu thử}} \times 0,2689$$

Phương pháp 2

Nguyên lý:

Hàm lượng nhôm (Al⁺⁺⁺) có trong mẫu thử được xác định bằng cách so màu do phản ứng của nhôm với stilbazo. Nhôm hydroxyd có trong mẫu thử dưới tác dụng của acid nitric và nhiệt độ chuyển thành Al⁺⁺⁺.

Phương pháp tiến hành:

Trước khi kiểm tra, mẫu thử được lắc đều thành hỗn dịch đồng nhất. Thêm 0,2 ml *acid nitric (TT)* vào 1 ml mẫu thử. Đun sôi cách thủy trong khoảng 1 h. Pha loãng bằng *nước cất* đến nồng độ thích hợp (thường pha loãng 25 và 50 lần). Lấy 1 ml mẫu thử vào bình nón, thêm *nước cất* vừa đủ 5 ml. Thêm 10 ml *dung dịch đệm acetat (pH = 5,55 - 5,75)*, 5 ml *dung dịch stilbazo*, 5 ml *nước cất*. Để ở nhiệt độ phòng 20 min, đo quang ở bước sóng 510 nm.

Song song tiến hành dựng đường chuẩn với các *dung dịch nhôm chuẩn 2, 4, 6, 8, 10 µg/ml*, tương đương với 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml nhôm chuẩn 2 µg/ml. Dựa vào đường chuẩn tính ra hàm lượng nhôm có trong mẫu thử.

Song song tiến hành làm mẫu trắng: Thay mẫu thử bằng 1 ml *nước cất*.

Cách pha *dung dịch nhôm chuẩn 0,1 %*: Cân chính xác 0,895 g *nhôm clorid (AlCl₃.6H₂O)* hòa tan vào 100 ml *nước cất* 2 lần. Trước khi dùng pha loãng *dung dịch nhôm chuẩn 0,1 %* 500 lần bằng *nước cất*, thu được *dung dịch nhôm chuẩn 2 microgam/ml*.

Cách pha *dung dịch stilbazo 0,035 %*: Hòa tan 0,035 g *stilbazo* trong vừa đủ 100 ml *nước cất*. Lọc qua giấy lọc.