

Dung dịch bảo quản ở nhiệt độ 2 °C đến 8 °C sử dụng được trong 1 tuần.

Cách pha dung dịch đệm acetat (pH = 5,55 - 5,75):

Dung dịch A: Hòa tan 69,05 g *natri acetat* (TT) vào 500 ml *nước cất*.

Dung dịch B: Hòa 5,72 ml *acid acetic* (TT) trong vừa đủ 100 ml *nước cất*.

Trộn dung dịch A vào dung dịch B theo tỷ lệ 9 : 1. Đo pH.

Tiêu chuẩn chấp thuận

Hàm lượng Al^{+++} trong vắc xin không được vượt quá 1,25 mg Al^{+++} /liều tiêm cho người.

15.28 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG PHENOL TRONG VẮC XIN VÀ SINH PHẨM

Phương pháp 1

Nguyên lý

Phương pháp dựa vào phản ứng tạo màu của thuốc thử Folin với phenol.

Phương pháp tiến hành

Vắc xin mẫu thử được ly tâm với vận tốc 3000 rpm trong 15 min. Bỏ cặn, lấy 1 ml phần nước ở phía trên cho vào bình định mức 100 ml và cho *nước cất* vừa đủ 100 ml, lắc đều.

Lấy 0,5 ml dung dịch trên, thêm 9 ml *nước cất*, 0,5 ml *thuốc thử Folin* (TT) pha loãng 2 lần, 2 ml *dung dịch natri carbonat* 20 % (TT). Lắc đều. Đun cách thủy cho sôi trong 1 min. Làm nguội ở nhiệt độ phòng.

Song song tiến hành xây dựng đường chuẩn.

Cách dựng đường chuẩn:

Hút *dung dịch phenol chuẩn* 1 : 1000 (TT) vào các ống nghiệm với lượng như sau: 0,1 ml; 0,2 ml; 0,3 ml; 0,4 ml; 0,5 ml; 0,6 ml; 0,7 ml; 0,8 ml; 0,9 ml; 1,0 ml. Thêm vào các ống nghiệm trên mỗi ống một lượng *nước cất* vừa đủ 9,5 ml; 0,5 ml *thuốc thử Folin* pha loãng 2 lần; 2 ml *dung dịch natri carbonat* 20 % (TT). Lắc đều. Đun cách thủy cho sôi trong 1 min. Làm nguội ở nhiệt độ phòng.

Song song tiến hành làm mẫu trắng (dùng *nước cất* thay cho mẫu vắc xin thử nghiệm).

Đem so màu trên máy quang phổ với bước sóng 310 nm (cả với mẫu thử và mẫu chuẩn).

Cách tính kết quả:

$$X = \frac{a \times 2 \times 100 \times 100}{1.000.000} (\%)$$

Trong đó:

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

$a \times 2$ là hàm lượng phenol có trong 1 ml mẫu đã pha loãng tìm được trên đường chuẩn;

100 là độ pha loãng của mẫu thử.

Tiêu chuẩn chấp thuận:

Hàm lượng phenol trong vắc xin thành phẩm nói chung không được vượt quá 0,12 g/L, trừ những quy định cụ thể khác. Theo nguyên tắc chung, hàm lượng phenol trong vắc xin thành phẩm không được thấp hơn so với hàm lượng cho thấy có khả năng kháng khuẩn và không được cao hơn 115 % hàm lượng đăng ký trên nhãn.

Pha dung dịch phenol chuẩn:

Cân chính xác 1 g *phenol* (TT) hòa tan trong vừa đủ 100 ml *nước cất*. Trước khi dùng pha loãng 1000 lần bằng *nước cất*.

Pha dung dịch natri carbonat 20 %.

Cân 20 g *natri carbonat* (TT) hòa tan trong vừa đủ 100 ml *nước cất*. Lọc vào chai đựng.

Phương pháp 2

Mẫu thử được trộn đều để làm thử nghiệm. Pha loãng mẫu thử bằng *nước cất* (nếu cần thiết) để có nồng độ phenol khoảng 15 µg/ml.

Chuẩn bị mẫu phenol chuẩn theo các nồng độ 5 µg; 10 µg; 15 µg; 20 µg và 30 µg/ml.

Lấy 5 ml các dung dịch mẫu thử và mẫu chuẩn vào ống nghiệm, thêm 5 ml *dung dịch đệm borat pH 9,0*; 5 ml *dung dịch aminopyrazolon* và 5 ml *dung dịch kali fericyanid*. Lắc đều, để yên 10 min, đo độ hấp thụ (Phụ lục 4.1) ở bước sóng 546 nm. Dựa vào đường chuẩn để tính ra hàm lượng phenol có trong mẫu thử.

Cách pha dung dịch đệm borat pH 9,0:

Dung dịch A: Hòa tan 6,18 g *acid boric* (TT) trong vừa đủ 1000 ml *dung dịch kali clorid* 0,1 M.

Dung dịch B: *Dung dịch natri hydroxyd* 0,1 M (TT).

Trộn 1000 ml dung dịch A với 420 ml dung dịch B thu được dung dịch đệm pH 9,0.

Cách pha dung dịch aminopyrazolon:

Hòa tan 1 g 4-aminophenazon trong vừa đủ 100 ml dung dịch đệm borat pH 9,0.

15.29 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG THIMEROSAL TRONG VẮC XIN VÀ SINH PHẨM

Có nhiều phương pháp để xác định hàm lượng thimerosal trong vắc xin và sinh phẩm. Tùy theo khả năng hiện có về thiết bị và hóa chất tại cơ sở để chọn 1 trong 2 phương pháp thử nghiệm sau đây: Phương pháp hóa lý và phương pháp vi sinh vật.

Phương pháp hóa lý

Nguyên lý:

Dựa vào phản ứng giải phóng ion thủy ngân tự do từ thimerosal, kết hợp với dithizon thành dithizon-thủy ngân, xác định bằng cách đo quang.

Cách tiến hành:

Làm song song 2 mẫu (mẫu vắc xin thử và mẫu chứng *nước cất*), lấy 0,2 ml mỗi mẫu cho vào từng bình nút mài riêng biệt có dung tích 100 ml.

Cho vào mỗi bình 1,2 ml *acid sulfuric* (TT) đã pha loãng 2

lần bằng nước cất 2 lần tính theo thể tích và đun nhẹ bình số 1 (chứa mẫu vắc xin thử) trong cách thủy cho đến khi tan hết. Thêm vào mỗi bình 5 ml *dung dịch kali permanganat 5 % (TT)*, lắc đều và để yên trong 1 h.

Loại bỏ *kali permanganat* thừa bằng cách thêm 1,5 ml *dung dịch hydroxylamin clorid 10 % (TT)*, thêm 35 ml nước cất 2 lần, 5 ml *dung dịch acid acetic 6 M (TT)* và trộn đều. Dùng buret thêm chính xác vào mỗi bình 10 ml *dung dịch dithizon 0,001 %* và lắc 30 s.

Chuyển toàn bộ dung dịch thử của từng bình vào mỗi bình lắng gạn riêng biệt, tách lớp cloroform qua một lớp bông đã hấp và sấy khô vào các ống nghiệm. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 620 nm (Phụ lục 4.1).

Hàm lượng thimerosal (X %) có trong vắc xin thử được tính theo công thức:

$$X(\%) = \frac{a \times 100 \times 100}{0,2 \times 49,55 \times 1.000.000} = a \times 0,00101$$

Trong đó:

a là lượng thủy ngân (µg) xác định được theo đường chuẩn;

0,2 là số ml dung dịch vắc xin thử;

49,55 là hàm lượng thủy ngân có trong 100 phần của thimerosal;

100 là 100 phần thimerosal;

100 là đổi ra phần trăm;

1.000.000 là hệ số chuyển đổi từ µg sang g.

Cách dựng đường chuẩn:

Cân chính xác 0,5 g thủy ngân, hòa vào 15 ml *acid nitric (TT)* và thêm nước cất vừa đủ 500 ml, được dung dịch thủy ngân có hàm lượng 1 mg/ml (DD*). Xác định hàm lượng thủy ngân như sau: Lấy 10 ml DD*, cho thêm 10 giọt *dung dịch phenyl sắt amoni 10 %* và chuẩn độ từ từ với *dung dịch amoni sulfocyanid 0,01 N (CĐ)* cho đến khi xuất hiện màu da cam.

1 ml *dung dịch amoni sulfocyanid 0,01 N (CĐ)* tương đương với 0,001003 g thủy ngân.

Lấy 5 bình nút mài có dung tích 100 ml để tiến hành song song 5 thí nghiệm với 5 mẫu: 0,4 ml, 0,6 ml, 0,8 ml, 1,0 ml, 1,2 ml dung dịch thủy ngân chuẩn trên. Thêm vào mỗi bình 1,2 ml *acid sulfuric (TT)* đã pha loãng 2 lần bằng nước cất 2 lần và 30 ml nước cất 2 lần. Nếu không có nước cất 2 lần thì sử dụng nước xử lý dithizon như sau: Cho vào mỗi bình gạn 10 ml *dung dịch dithizon (TT)* (0,01 g/L), sau đó tách phần cloroform ra. Nếu màu của dithizon thay đổi thì làm đi làm lại vài lần cho đến khi màu của dithizon không thay đổi. Thêm 5 ml *dung dịch natri clorid 0,9 % (TT)* và 5 ml *dung dịch acid acetic 6 M (TT)* và tiến hành tiếp tục như đối với mẫu kiểm tra ghi ở phần trên. Các kết quả thu được cho phép lập một đường chuẩn về thủy ngân.

Cách pha dung dịch dithizon 0,001 %:

Cân chính xác 10 mg *dithizon (TT)* hòa tan vào *cloroform (TT)* và thêm vừa đủ 100 ml với cùng dung môi.

Bảo quản dung dịch ở chỗ tối 4 °C đến 8 °C trong vòng 1 tháng. Trước khi dùng pha loãng 10 lần.

Phương pháp vi sinh vật

Nguyên lý:

Phương pháp thực hiện dựa trên sự hình thành vòng ức chế sự phát triển của vi sinh vật được tạo bởi dung dịch thimerosal chuẩn và thimerosal có trong mẫu thử; so sánh đường kính vòng ức chế vô khuẩn.

Cách tiến hành:

Pha thạch thường, đun nóng chảy hoàn toàn và đổ thạch dày 4 mm lên một phiến kính hình chữ nhật phẳng. Để thạch nguội hoàn toàn, đục lỗ thạch (đường kính 8 mm) sao cho khoảng cách giữa các lỗ thạch ít nhất là 30 mm. Cấy chủng *Staphylococcus aureus* trên thạch nghiêng, ủ ở 37 °C trong 18 h đến 24 h. Gặt và pha vi khuẩn bằng nước muối sinh lý vô khuẩn thành huyền dịch 10^9 vi khuẩn/ml. Lắng đều huyền dịch vi khuẩn (0,5 ml/đĩa thạch) trên đĩa thạch đã đục lỗ. Nhỏ vào mỗi lỗ 100 µl dung dịch thimerosal chuẩn nồng độ 1 g/L ở các độ pha loãng 1/2,5, 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160. Ủ ở 37 °C trong 24 h.

Đọc kết quả:

Đo đường kính các vùng ức chế vi khuẩn mọc của các đậm độ thimerosal chuẩn, xây dựng đường chuẩn. Dựa vào đường chuẩn và đường kính vùng ức chế của vắc xin mẫu thử để tính ra hàm lượng thimerosal có trong vắc xin mẫu thử.

Tiêu chuẩn chấp thuận

Hàm lượng thimerosal trong mỗi vắc xin và sinh phẩm có thể khác nhau tùy theo yêu cầu cụ thể, nhưng không được thấp hơn hàm lượng cho thấy có khả năng kháng khuẩn và không cao hơn 115 % hàm lượng thimerosal ghi trên nhãn. Yêu cầu chung cho hàm lượng thimerosal trong các vắc xin và sinh phẩm có sử dụng thimerosal làm chất bảo quản đều không được vượt quá 0,02 % trừ khi có chỉ dẫn khác.

15.31 XÁC ĐỊNH HIỆU LỰC VẮC XIN DẠI THEO PHƯƠNG PHÁP NIH

Nguyên lý

Thử nghiệm NIH (National Institute of Health - USA) được Tổ chức Y tế Thế giới chính thức công nhận để kiểm tra công hiệu vắc xin dại bất hoạt. Công hiệu vắc xin dại được xác định bằng cách so sánh liều hữu hiệu bảo vệ chuột chống lại liều gây chết của virus dại với một vắc xin dại mẫu chuẩn đã biết trước công hiệu (IU/ml). Thử nghiệm được tiến hành song song 2 vắc xin (mẫu thử và mẫu chuẩn), sau 14 ngày thử thách với cùng 1 liều chủng virus thử thách CVS.

Phương pháp tiến hành

Pha vắc xin và gây miễn dịch:

Pha vắc xin mẫu chuẩn bằng nước vô khuẩn để tiêm (hoặc PBS pH 7,2 - 7,4) để có được độ pha có chứa khoảng 2 IU/ml. Phân chia vào các ống một lượng vắc xin đủ dùng cho một lần pha tiêm miễn dịch. Bảo quản ở -20 °C.