

15.33 XÁC ĐỊNH pH CỦA VẮC XIN VÀ SINH PHẨM

Nguyên lý

Trị số pH của một dung dịch vắc xin hay sinh phẩm được xác định bằng cách đo thế hiệu giữa điện cực chỉ thị nhạy cảm với ion hydrogen (thường là điện cực thủy tinh) và một điện cực so sánh (ví dụ điện cực calomel bão hòa). pH là một giá trị biểu thị quy ước nồng độ ion hydrogen của một dung dịch. pH của một dung dịch mẫu thử liên quan với pH của dung dịch mẫu chuẩn theo biểu thức sau:

$$pH = pH_s - \frac{(E - E_s)}{k}$$

Trong đó:

E là điện thế, tính bằng von, của pin chứa dung dịch mẫu thử; E_s là điện thế, tính bằng von, của pin chứa dung dịch mẫu chuẩn (đã biết);

pH_s là pH của dung dịch mẫu chuẩn;

k là hệ số có giá trị thay đổi theo nhiệt độ được ghi ở bảng dưới đây:

Nhiệt độ	k (V)
15 °C	0,0572
20 °C	0,0582
25 °C	0,0592
30 °C	0,0601
35 °C	0,0611

Phương pháp tiến hành

pH của một dung dịch vắc xin, sinh phẩm được đo bằng máy đo pH (pH meter). Máy đo pH là một điện thế kế có trở kháng đầu vào gấp ít nhất 100 lần trở kháng của các điện cực sử dụng và thường được phân độ theo đơn vị pH và có độ nhạy để phát hiện được những thay đổi cỡ 0,05 đơn vị pH hoặc ít nhất 0,003 V. Các điện cực thủy tinh là phù hợp và các kiểu máy đo pH, kể cả máy đo pH hiện số, đều phải đáp ứng yêu cầu trên. Vận hành máy đo pH tùy theo loại máy đo pH và tùy theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tất cả các phép đo đều cần phải tiến hành trong cùng một điều kiện nhiệt độ khoảng từ 20 °C đến 25 °C, trừ trường hợp có quy định khác trong chuyên luận riêng. Trước khi đo pH của mẫu thử, cần hiệu chuẩn máy đo pH bằng dung dịch pH chuẩn do nhà sản xuất cung cấp (tối thiểu sử dụng 2 dung dịch pH chuẩn mà pH của dung dịch mẫu thử phải nằm trong khoảng đó). Ví dụ: dung dịch mẫu thử cần đo pH thường nằm trong khoảng pH 4 - 7, cần sử dụng 2 dung dịch pH chuẩn là pH 4 và pH 7 để hiệu chuẩn máy đo pH; hoặc nếu dung dịch mẫu thử cần đo pH thường nằm trong khoảng pH 7 - 10, cần sử dụng 2 dung dịch pH chuẩn là pH 7 và pH 10 để hiệu chuẩn máy đo pH trước khi đo pH của dung dịch mẫu thử.

Tráng đầu điện cực pH bằng nước cất 2 lần, dùng giấy thấm mềm chuyên dụng để thấm khô đầu điện cực và tiến hành đo pH của dung dịch mẫu thử. Số lượng mẫu thử

tối thiểu dùng để kiểm tra pH là 15 ml đến 20 ml và nên để ở nhiệt độ phòng trước khi đo. Lắc đều và rót mẫu thử vào cốc đựng mẫu, nhúng ngập đầu điện cực vào cốc mẫu thử và để cho chỉ số pH hiện trên màn hình ổn định thì xác định pH của mẫu thử. Sau khi đo pH của mẫu thử xong, cần tráng đầu điện cực bằng nước cất 2 lần, dùng giấy thấm mềm chuyên dụng để thấm khô đầu điện cực và nhúng ngập đầu điện cực của máy đo pH vào dung dịch bảo quản điện cực, ngắt điện của máy đo pH.

Tiêu chuẩn chấp thuận

Tiêu chuẩn pH chấp thuận theo yêu cầu đối với từng loại mẫu thử.

15.34 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG PROTEIN TOÀN PHẦN TRONG VẮC XIN VÀ SINH PHẨM

Protein có trong vắc xin và sinh phẩm được xác định theo nhiều phương pháp khác nhau, tùy theo từng loại vắc xin và sinh phẩm.

Phương pháp Lowry

Nguyên lý:

Protein có trong mẫu vắc xin thử bị tủa với acid trichloroacetic nóng. Xác định lượng tủa để tính ra lượng protein có trong vắc xin, sinh phẩm.

Phương pháp tiến hành:

Pha loãng mẫu thử (nếu cần thiết) để chỉnh hàm lượng protein của mẫu thử trong khoảng 20 µg/ml đến 120 µg/ml. Thêm 1 ml dung dịch acid trichloroacetic 10 % vào một ống nghiệm có chứa 1 ml mẫu thử. Đun nóng ở 80 °C trong nồi cách thủy trong 15 min. Làm nguội ở nhiệt độ phòng. Ly tâm ở tốc độ 3500 rpm trong 30 min, loại bỏ phần dung dịch nước.

Thêm vào phần lắng cặn 2 ml dung dịch acid trichloroacetic 5 %. Lắc kỹ trên máy lắc và ly tâm lại một lần nữa ở tốc độ 3500 rpm trong 30 min, loại bỏ phần dung dịch nước.

Thêm 2,5 ml dung dịch Alkaline vào mỗi ống nghiệm nêu trên và ủ ở nhiệt độ phòng (thời gian ủ tùy từng loại mẫu thử) để hòa tan phần lắng cặn.

Thêm 2,5 ml nước cất và 0,5 ml thuốc thử Folin (pha loãng 1/2), ủ ở 37 °C trong 30 min. Ly tâm với tốc độ 3500 rpm đến 6000 rpm trong 30 min (với các chế phẩm chứa chất hấp phụ nhôm). Đo mật độ quang học ở bước sóng 750 nm trên quang phổ kế.

Song song tiến hành thử nghiệm với mẫu trắng: thay vào 1 ml mẫu thử là 1 ml nước cất.

Dụng đường chuẩn: Dụng đường chuẩn với dung dịch protein chuẩn (dung dịch albumin chuẩn ở các nồng độ 25 µg/ml; 50 µg/ml; 100 µg/ml; 150 µg/ml). Dựa vào hàm lượng protein tìm được trên đường chuẩn tính ra hàm lượng protein có trong mẫu thử.

Cách pha dung dịch Alkaline (pha ngay trước khi dùng):

Dung dịch đồng sulfat pentahydrat 2 %: Hòa tan 2 g đồng sulfat pentahydrat vào vừa đủ 100 ml nước cất.

Dung dịch *natri tartrat* 4 %: Hòa tan 4 g *natri tartrat* trong vừa đủ 100 ml *nước cất*.

Trộn lẫn 2 dung dịch trên được dung dịch A.

Hòa tan 0,8 g *natri hydroxyd* và 4 g *natri carbonat* trong vừa đủ 100 ml *nước cất* được dung dịch B.

Trộn 50 ml dung dịch B và 1 ml dung dịch A được dung dịch Alkaline.

Đo độ hấp thụ thực của protein ở bước sóng 280 nm

Nguyên lý:

Protein trong dung dịch hấp thụ tia tử ngoại ở bước sóng 280 nm, do sự có mặt các amino acid dễ thơm, chủ yếu là tyrosin và tryptophan trong cấu trúc protein.

Phương pháp tiến hành:

Dung dịch thử: Pha loãng mẫu thử đến hàm lượng protein trong khoảng 0,2 mg/ml đến 2 mg/ml bằng dung dịch đệm thích hợp.

Dung dịch chuẩn: Pha loãng mẫu chuẩn bằng cùng dung dịch đệm với mẫu thử và có hàm lượng protein tương ứng với mẫu thử.

Giữ dung dịch thử và chuẩn ở nhiệt độ phòng. Đo độ hấp thụ các dung dịch này bằng công thạch anh ở bước sóng 280 nm (Phụ lục 4.1), dùng nước cất làm mẫu trắng.

Hàm lượng protein trong mẫu thử (C_U) được tính bởi công thức:

$$C_U = C_S (A_U/A_S)$$

Trong đó:

C_S là hàm lượng protein trong dung dịch chuẩn;

A_U là độ hấp thụ của mẫu thử;

A_S là độ hấp thụ của dung dịch chuẩn.

Phương pháp Bradford

Nguyên lý:

Dựa trên sự kết hợp giữa thuốc nhuộm Coomassie với protein trong môi trường acid.

Phương pháp tiến hành:

Pha loãng mẫu thử bằng nước cất đến hàm lượng thích hợp trong khoảng đường chuẩn.

Chuẩn bị dung dịch chuẩn BSA (bovine serum albumin) có hàm lượng trong khoảng 0,1 mg/ml đến 1 mg/ml.

Dùng nước cất làm mẫu trắng.

Thêm 2,5 ml thuốc nhuộm Coomassie 20 % vào 0,05 ml mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thử, lắc đều. Để yên 10 min ở nhiệt độ phòng. Đo độ hấp thụ (Phụ lục 4.1) ở bước sóng 595 nm (không dùng công thạch anh do sẽ bị thuốc nhuộm gắn vào).

Hàm lượng protein trong mẫu thử được tính toán dựa vào đường chuẩn.

Phương pháp đồng/acid bicinchoninic

Nguyên lý:

Dựa vào sự khử của ion Cu^{++} thành Cu^+ do protein, dùng acid bicinchoninic (BCA) để xác định Cu^+ .

Phương pháp tiến hành:

Pha loãng mẫu thử bằng *nước cất* đến hàm lượng thích hợp trong khoảng đường chuẩn.

Pha dung dịch chuẩn bằng *nước cất* (không ít hơn 5 nồng độ) có hàm lượng trong khoảng 10 $\mu\text{g/ml}$ đến 1200 $\mu\text{g/ml}$. Dùng *nước cất* làm mẫu trắng.

Thêm 2 ml thuốc thử đồng-BCA vào 0,1 ml mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thử, lắc đều. Ủ trong nồi cách thủy 37 °C trong 30 min. Làm nguội ở nhiệt độ phòng trong 60 min, đo mật độ quang (Phụ lục 4.1) ở bước sóng 562 nm, dùng công thạch anh.

Dựa vào đường chuẩn tính ra hàm lượng protein có trong mẫu thử.

Pha thuốc thử BCA: Hòa tan 10 g *đinatri bicinchoninat*, 20 g *natri carbonat monohydrat*, 1,6 g *natri tartrat*, 4 g *natri hydroxyd* và 9,5 g *natri hydrogen carbonat* vào *nước cất*. Điều chỉnh đến pH 11,25 nếu cần bằng dung dịch *natri hydroxyd* hoặc dung dịch *natri hydrogen carbonat*. Thêm *nước cất* vừa đủ 1000 ml, lắc đều.

Pha thuốc thử đồng-BCA: Trộn 1 ml dung dịch đồng sulfat 40 g/l với 50 ml thuốc thử BCA.

Phương pháp biuret

Nguyên lý:

Dựa vào sự tương tác của ion Cu^{++} với protein trong dung dịch alkaline, sản phẩm thu được có độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 545 nm.

Phương pháp tiến hành:

Pha loãng mẫu thử bằng dung dịch nước muối sinh lý đến hàm lượng thích hợp trong khoảng đường chuẩn.

Pha dung dịch chuẩn bằng dung dịch nước muối sinh lý (không ít hơn 3 nồng độ) có hàm lượng trong khoảng từ 0,5 mg/ml đến 10 mg/ml.

Dùng dung dịch nước muối sinh lý làm mẫu trắng.

Lấy một thể tích dung dịch mẫu thử, thêm đồng lượng dung dịch *natri hydroxyd* 60 g/l, lắc đều. Ngay lập tức cho thuốc thử biuret với lượng bằng 0,4 lần thể tích dung dịch mẫu thử và lắc nhanh. Để yên ở nhiệt độ phòng 15 min.

Trong vòng 90 min sau khi cho thuốc thử biuret, đo mật độ quang (Phụ lục 4.1) của mẫu thử ở bước sóng 545 nm.

Song song tiến hành với mẫu trắng và mẫu chuẩn.

Dựa vào đường chuẩn tính ra hàm lượng protein có trong mẫu thử.

Pha thuốc thử biuret: Hòa tan 3,46 g *đồng sulfat (TT)* trong 10 ml *nước cất* nóng, để nguội (dung dịch A). Hòa tan 34,6 g *natri citrat (TT)* và 20 g *natri carbonat khan (TT)* vào 80 ml *nước cất* nóng, để nguội (dung dịch B). Trộn dung dịch A và B, thêm *nước cất* vừa đủ 200 ml. Dùng trong 6 tháng, không dùng nếu thấy vẩn đục hoặc có tủa.

Phương pháp quang phổ huỳnh quang

Nguyên lý:

Dựa vào dẫn xuất của protein với o-phthaldehyd do chất này phản ứng với các amin chính của protein (N-terminal amino acid và nhóm ϵ -amino của lysin tồn dư).

Phương pháp tiến hành:

Pha loãng mẫu thử bằng *nước muối sinh lý (TT)* đến hàm lượng thích hợp trong khoảng đường chuẩn. Điều chỉnh pH từ 8 đến 10,5 trước khi thêm *thuốc thử phthaldehyd*.

Pha dung dịch chuẩn bằng nước muối sinh lý (TT) (không ít hơn 5 nồng độ) có hàm lượng trong khoảng từ 10 µg/ml đến 200 µg/ml. Điều chỉnh pH từ 8 đến 10,5 trước khi thêm thuốc thử phthaldehyd.

Dùng nước muối sinh lý (TT) làm mẫu trắng.

Trộn 10 µl các dung dịch mẫu thử, mẫu chuẩn, mẫu trắng với 0,1 ml thuốc thử phthaldehyd, để yên ở nhiệt độ phòng trong 15 min. Thêm 3 ml dung dịch natri hydroxyd 0,5 M và lắc đều. Đo cường độ huỳnh quang các dung dịch mẫu chuẩn và mẫu thử ở bước sóng kích thích 340 nm và bước sóng phát xạ giữa 440 nm và 445 nm.

Dựa vào đường chuẩn tính ra hàm lượng protein có trong mẫu thử.

Pha dung dịch đệm borat: Hòa tan 61,83 g acid boric trong nước cất và điều chỉnh pH 10,4 bằng dung dịch kali hydroxyd, thêm nước cất vừa đủ 1000 ml, lắc đều.

Pha dung dịch gốc phthaldehyd: Hòa tan 1,20 g o-phthaldehyd trong 1,5 ml methanol (TT), thêm 100 ml dung dịch đệm borat (TT), lắc đều. Thêm 0,6 ml dung dịch macrogol 23 lauryl ether và lắc đều. Bảo quản ở nhiệt độ phòng sử dụng trong 3 tuần.

Pha thuốc thử phthaldehyd: Thêm 15 µl 2-mercaptoethanol vào 5 ml dung dịch gốc phthaldehyd. Chuẩn bị dung dịch này trước khi dùng 30 min. Sử dụng trong vòng 24 h.

Tiêu chuẩn chấp thuận

Theo quy định trong chuyên luận riêng.

15.35 XÁC ĐỊNH ĐỘ ẨM TỒN DƯ TRONG VẮC XIN, SINH PHẨM ĐÔNG KHÔ

Nguyên lý

Sử dụng phương pháp Karl Fischer để xác định độ ẩm tồn dư trong vắc xin đông khô theo nguyên lý chung là dựa trên phản ứng toàn lượng của nước với lưu huỳnh dioxyd và iod trong sự có mặt của alcohol và một chất base hữu cơ thích hợp.

Hiện nay có nhiều thiết bị để đo độ ẩm tồn dư trong các vắc xin, sinh phẩm đông khô, tuy nhiên nguyên tắc của các thiết bị này đều phải cấu tạo sao cho thao tác thuận tiện và tránh ẩm.

Phương pháp tiến hành

Tùy theo thiết bị của các hãng khác nhau nên thao tác theo hướng dẫn vận hành của hãng đó.

Phương pháp phổ biến hiện nay để đo độ ẩm tồn dư của các vắc xin và sinh phẩm đông khô là phương pháp Karl Fischer. Vận hành máy đo độ ẩm tồn dư theo hướng dẫn sử dụng. Rót dung dịch chuẩn anod và cathod vào khoang tương ứng đến đúng mức quy định. Cần lưu ý qua một thời gian nhất định, methanol trong dung dịch cathod có thể thấm qua màng trao đổi ion bằng cách thẩm thấu. Để giảm bớt tình trạng này không nên rót hóa chất đầy quá mức quy định.

Bật máy và cài đặt phương pháp lựa chọn. Nếu máy đo độ ẩm tồn dư không hoạt động trong vòng 3 tuần thì vẫn nên bật máy vài giờ trong khoảng thời gian này dù không tiến hành kiểm tra mẫu gì để nạp pin và đảm bảo tất cả các thông tin của chương trình vẫn được duy trì. Cần đảm bảo trước khi nạp mẫu thử tỷ lệ % độ ẩm trên màn hình phải ổn định và ở mức độ thấp để đủ đạt được kết quả theo yêu cầu. Cân chính xác khối lượng tổng của cả mẫu thử và vật chứa mẫu.

Nhập khối lượng tổng của cả mẫu thử và vật chứa mẫu vào máy, sau đó nhập khối lượng của vật chứa mẫu. Đưa mẫu vào khoang bên ngoài qua đường bơm mẫu (nếu vận hành trong điều kiện độ ẩm cao và sáng thì nên đóng kín nắp khoang chứa mẫu thử khi vận hành).

Khi thực hiện xong thử nghiệm, máy in sẽ tự động in ra kết quả độ ẩm tồn dư của mẫu thử.

Tiêu chuẩn chấp thuận

Độ ẩm tồn dư trong vắc xin và sinh phẩm đông khô không được vượt quá 3 % (≤ 3 %), trừ khi có quy định trong chuyên luận riêng.

15.36 PHÁT HIỆN MYCOPLASMA BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY

Nguyên vật liệu

Mẫu thử nghiệm: Nước nổi nuôi tế bào, hỗn dịch virus, vắc xin bán thành phẩm và thành phẩm.

Môi trường nuôi cấy: Môi trường lỏng 1: LM1 (pH 7,6 đến 7,8; môi trường có màu đỏ) và môi trường lỏng 2: LM2 (pH 7,2; môi trường có màu vàng cam), dưới dạng 100 ml/chai hoặc 10 ml/ống.

Môi trường rửa lọc: Môi trường PPLO lỏng.

Môi trường đặc: Môi trường thạch PPLO.

Màng lọc 0,1 µm, xy lạnh 10 ml và dụng cụ cần thiết đủ cho tiến hành thử nghiệm.

Các bước tiến hành

Chuẩn bị môi trường

Pha môi trường LM1 (pH 7,6 đến 7,8): 500 ml.

Nước cất pha tiêm: 375 ml.

Môi trường PPLO lỏng: 8 g.

Đỏ phenol 0,4 %: 2,5 ml.

Hấp ở 121 °C trong 15 min, sau đó thêm 75 ml huyết thanh ngựa, 50 ml Yeast Extract 25 %, 6 ml glucose 25 % và 1,25 ml penicilin G. Trộn đều, ra chai 100 ml và ống thử 10 ml.

Pha môi trường LM2 (pH 7,0 đến 7,2): 500 ml.

Nước để pha thuốc tiêm: 375 ml.

Môi trường PPLO lỏng: 8 g.

L-Arginin: 1,5 g.

Đỏ phenol 0,4 %: 2,5 ml.

Hấp ở 121 °C trong 15 min sau đó thêm 75 ml huyết thanh ngựa, 50 ml Yeast Extract 25 %, và 1,25 ml penicilin G, 1 ml acid hydrocloric. Trộn đều, ra chai 100 ml và ống thử 10 ml.