

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 % ( $\leq 3\%$ ), 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.