

15.40 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG LIPID TRONG VẮC XIN VÀ SINH PHẨM

Nguyên lý

Dựa trên phản ứng của lipid với vanilin trong môi trường acid sulfuric và acid phosphoric tạo thành hợp chất màu. Đo hợp chất màu này ở bước sóng 540 nm, từ đó xác định hàm lượng lipid trong mẫu thử.

Tiến hành

Mẫu thử được điều chỉnh bằng *nước cất* để có nồng độ protein khoảng 200 µg/ml.

Hút dung dịch dầu ô liu (olive oil) chuẩn 500 µg/ml vào các ống nghiệm lần lượt 0,1 ml; 0,2 ml; 0,3 ml; 0,4 ml; thêm *nước cất* vừa đủ 1 ml.

Hút 1 ml mẫu thử vào ống nghiệm, 1 ml *nước cất* vào mẫu trắng. Thêm 3 ml *acid sulfuric* 95 % vào mỗi ống nghiệm, lắc mạnh bằng máy lắc. Đun cách thủy 100 °C trong 10 min, làm lạnh bằng nước đá trong 5 min. Thêm 13 ml *dung dịch phosphovanilin* (TT) vào mỗi ống nghiệm, lắc kỹ. Đun cách thủy 37 °C ± 2 °C trong 30 min, làm lạnh, để yên ở nhiệt độ phòng 30 min.

Đo độ hấp thụ (Phụ lục 4.1) ở bước sóng 540 nm, dựng đường chuẩn, từ đó tính ra hàm lượng lipid trong mẫu thử. Đơn vị tính: µg/100 µg protein.

Cách pha các dung dịch:

Dung dịch dầu ô liu (olive oil) chuẩn 5000 µg/ml: Cân 0,25 g olive oil vào bình định mức 50 ml, thêm *ethanol* (TT) vừa đủ, lắc kỹ. Bảo quản dung dịch ở 4 °C đến 7 °C, dùng trong 1 tháng. Trước khi dùng, pha loãng 10 lần bằng *nước cất*.

Dung dịch vanilin 0,6 %: Hòa tan 6,0 g *vanilin* (TT) trong 6 ml đến 7 ml *ethanol* (TT), chuyển vào bình định mức 1 L, thêm *nước cất* đến định mức.

Dung dịch phosphovanilin: Cho 350 ml *dung dịch vanilin* 0,6 % và 50 ml *nước cất* vào cốc thủy tinh, khuấy đều. Thêm 600 ml *acid phosphoric* 85 % (TT) trong khi đang khuấy từ.

Tiêu chuẩn chấp thuận

Tùy từng loại vắc xin và sinh phẩm.

Đối với bán thành phẩm viêm gan B, hàm lượng lipid không lớn hơn 100 µg/100 µg protein.

15.41 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG CESI TRONG VẮC XIN VÀ SINH PHẨM

Nguyên lý

Cesi tồn dư trong quá trình tinh khiết HBsAg được xác định bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion.

Tiến hành

Mẫu chuẩn: Hút 1 ml *nước khử ion* vào 3 ống nghiệm, thêm lần lượt 0,2 ml; 0,4 ml; 0,6 ml dung dịch cesi chuẩn 0,001 %.

Mẫu thử: Hút 1 ml mẫu đã pha loãng 5 lần bằng *nước khử ion* vào ống nghiệm, thêm 0,4 ml dung dịch chuẩn. Lọc các dung dịch mẫu chuẩn và mẫu thử qua màng lọc 0,22 µm.

Điều kiện vận hành máy sắc ký ion: Cột IonPac Cs-12, detector đo độ dẫn điện 5 mS đến 10 mS, tốc độ dòng 1,0 ml/min, thể tích mẫu thử: 100 µl, nhiệt độ phòng.

Dựa vào diện tích pic để tính ra hàm lượng cesi trong mẫu thử. Đơn vị tính: µg/20 µg protein.

Cách pha các dung dịch

Dung dịch acid hydrocloric 0,04 M (dung dịch rửa giải): Lọc 1,5 L *nước khử ion* qua màng lọc 0,45 µm, hút 3,3 ml *acid hydrocloric* (TT) pha trong vừa đủ 1 L *nước khử ion* vừa lọc trên.

Dung dịch tetrabutyl amoni hydroxyd (TBAOH) (dung dịch tái sinh): Hút 66,67 ml TBAOH vào ống đong 2 L, thêm *nước khử ion* vừa đủ 2 L, khuấy đều.

Dung dịch cesi chuẩn 0,01 %: Cân chính xác khoảng 10 mg (a) *cesi clorid*, chuyển vào bình định mức 100 ml, thêm *nước khử ion* vừa đủ, lắc đều.

Pha loãng 10 lần dung dịch cesi chuẩn 0,01 % bằng *nước khử ion* trước khi dùng. Hàm lượng cesi thực có trong dung dịch thu được (X) được tính bằng công thức:

$$X (\mu\text{g/ml}) = \frac{132,9}{168,4} \times \frac{a}{100} \times \frac{1}{10} \times 1000$$

Trong đó:

132,9 là phân tử lượng của Cs;

168,4 là phân tử lượng của CsCl;

10 là hệ số pha loãng dung dịch chuẩn;

1000 là hệ số chuyển từ mg sang µg.

Tiêu chuẩn chấp thuận

Không lớn hơn 5 µg/20 µg protein.

15.42 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG PRP TỔNG SỐ VÀ PRP TỰ DO TRONG VẮC XIN Hib LÔNG ĐƠN BẰNG PHƯƠNG PHÁP ORCINOL

Nguyên tắc

Phương pháp cho phép định lượng polyribosylribitol phosphat (PRP), polysaccharid này được xem là thành phần hoạt động chính của vắc xin *Haemophilus influenza typ b*. Phương pháp dựa trên sự hình thành phức hợp màu xanh và hòa tan trong nước.

Chuẩn bị dung dịch

Các dung dịch sau đây được pha ngay trước khi thử nghiệm. *Dung dịch chuẩn ribose*: Hòa tan 5,0 mg ribose chuẩn trong bình định mức 10 ml bằng *nước cất*, thêm *nước cất* đến vạch. Lắc đều.

Dung dịch sắt (III) clorid trong acid hydrocloric: Cân 1 g *sắt (III) clorid* (TT) và hòa tan trong 10 ml *nước cất*. Pha 0,25 ml dung dịch thu được với 50 ml *acid hydrocloric* (TT).

Dung dịch orcinol: Cân 230 mg *orcinol* (TT) và hòa tan trong 5 ml *ethanol* (TT), chuẩn bị xong phải chứa dung dịch trong chai thủy tinh màu.

Dung dịch natri azid 0,02 %: Cân 0,02 g *natri azid* (TT) và pha loãng với 100 ml *nước cất*.

Chuẩn bị dung dịch để lập đường chuẩn: Từ dung dịch chuẩn ribose pha về các nồng độ 1 µg/ml, 4 µg/ml, 12 µg/ml và 20 µg/ml.

Chuẩn bị mẫu kiểm tra:

Đối với mẫu cộng hợp (ARM): 50 µl mẫu pha loãng với 450 µl *nước cất*.

Nếu mẫu là sản phẩm cuối cùng thì không cần pha loãng.

Tiến hành

Xác định hàm lượng PRP tổng số

Lấy vào mỗi ống 500 µl dung dịch chuẩn ribose đã pha (nồng độ 1, 4, 12, 20 µg/ml).

Lấy 500 µl mẫu vắc xin cần kiểm tra vào một ống khác.

Thêm *nước* vào tất cả các ống để được 2000 µl.

Thêm 1000 µl *dung dịch sắt (III) clorid trong acid hydrocloric* vào các ống.

Thêm 80 µl *dung dịch orcinol* vào các ống.

Giữ 80 °C trong 15 min.

Để nguội, đo mật độ quang của các dung dịch ở 670 nm (OD 670 nm) và ở 580 nm (OD 580 nm) và tính kết quả.

Xác định hàm lượng PRP tự do

Chú ý: Trước khi sử dụng ống ly tâm Centricon với màng lọc Ultracel YM-30, phải rửa ống ly tâm lại với *nước* và sau đó thêm 500 µl *nước cất* và ly tâm trong 5 min.

Thêm 500 µl mẫu vào phần trên của ống ly tâm Centricon. Ly tâm ở 3500 rpm trong 20 min.

Sử dụng phần dịch được lọc ra (phần dịch nằm bên dưới) và tiến hành các bước theo phần xác định hàm lượng saccharid tổng số.

Rửa hệ thống ống ly tâm Centricon với màng lọc Ultracel YM-30 bằng *nước* và thêm *dung dịch natri azid 0,02 %*. Bảo quản ở 4 °C cho đến khi dùng trở lại.

Tính hàm lượng saccharid cuối cùng của mẫu thử (C_r) theo công thức sau:

$$C_r = C_m \times 10^{-3} \times 2,45$$

Trong đó:

C_m là giá trị trung bình của hàm lượng ribose trong mẫu thử; 2,45 là hệ số biểu hiện mối tương quan về khối lượng phân tử của polymer (saccharid) và D-ribose;

10^{-3} là hệ số chuyển đổi từ đơn vị µg/ml thành mg/ml.

Kết quả được tính theo đơn vị mg/ml (mg carbonhydrat/ml mẫu cần kiểm tra).

15.43 KIỂM TRA CÔNG HIỆU (IN VIVO) CỦA VẮC XIN VIÊM GAN B TÁI TỔ HỢP

Nguyên lý thử nghiệm: Công hiệu *in vivo* vắc xin viêm gan B tái tổ hợp được xác định qua số chuột tạo đáp ứng miễn dịch bảo vệ (kháng thể kháng HBsAg) sau khi tiêm vắc xin bằng bộ sinh phẩm chẩn đoán HBsAg. Tính kết quả công hiệu tương quan theo chương trình Probit Analysis (WHO) thông qua số chuột tạo đáp ứng miễn dịch trên tổng số chuột gây miễn dịch ở từng độ pha.

Nguyên vật liệu

Chuột nhắt trắng đạt yêu cầu 4 đến 6 tuần tuổi, cân nặng tối thiểu 16 g, vận chuyển và chăm sóc trong điều kiện cách ly. Dùng 12 - 15 con/độ pha.

Vắc xin viêm gan B tái tổ hợp chuẩn quốc gia hoặc mẫu chuẩn nội bộ nhà sản xuất.

Vắc xin viêm gan B tái tổ hợp mẫu thử.

Bộ sinh phẩm chẩn đoán HBsAg 96 giếng.

Tiến hành

Dung dịch pha loãng: Hòa tan *nhôm hydroxyd* (Sigma hoặc Merck hoặc hãng tương đương) trong *dung dịch natri clorid 0,9 %* theo tỷ lệ từ 1/4 - 1/5 (tỷ lệ này có thể thay đổi theo từng loại vắc xin). Hấp diệt trùng dung dịch đã pha ở 121 °C trong 30 min. Bảo quản ở 4 °C.

Pha loãng của vắc xin:

Tiến hành trong hốt vô trùng.

Vắc xin mẫu thử và vắc xin mẫu chuẩn (hàm lượng khoảng 20 µg kháng nguyên/ml) được pha loãng bậc 2 bằng *Dung dịch pha loãng* thành các độ pha phù hợp (tính theo tỷ lệ giữa thể tích vắc xin nguyên mẫu trên tổng thể tích của vắc xin nguyên mẫu và thể tích dung dịch pha loãng), ví dụ như bảng 15.43. Tùy từng loại vắc xin viêm gan B tái tổ hợp, độ pha có thể thay đổi để tạo được đường chuẩn phù hợp.

Bảng 15.43 - Pha loãng của vắc xin (ví dụ)

Mẫu vắc xin (ml)	Dung dịch pha loãng (ml)	Tỷ lệ pha loãng (độ pha)	HBsAg (µg/ml)
10 (vắc xin nguyên mẫu)	30	1/4	5
20 (vắc xin 1/4)	20	1/8	2,5
20 (vắc xin 1/8)	20	1/16	1,25
20 (vắc xin 1/16)	20	1/32	0,0625
20 (vắc xin 1/32)	20	1/64	0,0312
20 (vắc xin 1/64)	20	1/128	0,0156

Gây nhiễm trên động vật:

Với mỗi độ pha của vắc xin gây nhiễm trên ít nhất 12 chuột nhắt (1 ml/con) bằng đường tiêm ổ bụng (phức mạc). Sau khi tiêm theo dõi trong vòng 28 - 35 ngày (tùy vắc xin).

Lấy máu: Lấy máu riêng từng chuột vào ống eppendorf, dán nhãn ghi số lô và độ pha. Để máu ở nhiệt độ phòng thí nghiệm trong 2 h, sau đó để ở 4 °C trong 2 h hoặc qua đêm.