



VALIDATION OF Hib POTENCY TESTING PROCEDURE (TOTAL AND FREE PRP CONTENT) USING ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY METHOD

**Canh Huyen Trang*, Duong Thi Cam Le, Dam Thi Lieu, Pham Quang Minh,
Nguyen Quyet Thang, Bui Thanh Tung**

National Institute for control of Vaccines and Biologicals

Received 15 December 2023

Accepted 28 December 2023

Abstract

Validation of analytical procedure is one of the important steps to evaluate the suitability and confirm the validity of the method corresponding to the specific conditions of each laboratory in order to ensure the reliability of the testing results. The potency of Hib component in vaccines (total and free PRP content) could be determined by three different methods including: ribose, phosphorus and ion exchange chromatography. This study was conducted to confirm whether the procedure for determining PRP content in Hib-containing vaccines using ion exchange chromatography method is compatible with the actual conditions of the Physicochemical Department's laboratory. The research uses the experimental descriptive method in the laboratory. Since this procedure has not been described in the Vietnamese Pharmacopoeia so far, it was fully validated with the parameters of accuracy, precision, robustness, specificity and linearity meeting the requirements and with a limit of quantification of 0,066 µg/ml.

Keywords: total polysaccharide, free polysaccharide, Hib, potency, chromatography, ion exchange chromatography

* Corresponding author

E-mail address: canhhuyentrang@gmail.com

<https://doi.org/10.56086/jcvb.v3i4.123>

THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH KIỂM TRA CÔNG HIỆU HIB (HÀM LƯỢNG PRP TỔNG SỐ VÀ TỰ DO) BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ TRAO ĐỔI ION

Cảnh Huyền Trang*, Đường Thị Cẩm Lệ, Đàm Thị Liễu, Phạm Quang Minh, Nguyễn Quyết Thắng, Bùi Thanh Tùng

Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế

Nhận ngày 15 tháng 12 năm 2023

Chấp nhận đăng ngày 28 tháng 12 năm 2023

Tóm tắt

Thẩm định quy trình phân tích là một trong những bước quan trọng để đánh giá sự phù hợp cũng như xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp tương ứng với điều kiện của từng phòng thí nghiệm cụ thể, nhằm đảm bảo độ tin cậy cho kết quả thử nghiệm. Vắc xin chứa thành phần Hib được đánh giá công hiệu (hàm lượng PRP tổng số và tự do) bằng 3 phương pháp khác nhau, bao gồm: ribose, phosphorus và sắc ký trao đổi ion. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm xác nhận quy trình xác định hàm lượng PRP trong vắc xin chứa thành phần Hib bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion phù hợp với điều kiện thực tế của phòng thí nghiệm khoa Kiểm định Hoá lý. Nghiên cứu sử dụng phương pháp mô tả thực nghiệm trong phòng thí nghiệm. Đây là quy trình chưa có trong Dược Điển, do đó đã được thẩm định toàn phần với các thông số độ đúng, độ chính xác, độ mạnh, độ đặc hiệu, tính tuyến tính đạt yêu cầu và có giới hạn định lượng là 0,066 $\mu\text{g/ml}$.

Từ khóa: polysaccharide tổng số, tự do, Hib, công hiệu, sắc ký, sắc ký trao đổi ion.

1. Đặt vấn đề

Haemophilus influenzae là một loại coccobacillus gram âm thường lây nhiễm vào đường hô hấp trên của trẻ em thông qua việc tiết dịch mũi. Trong khi các chủng trực khuẩn không có vỏ tương đối lành tính thì các chủng có vỏ hoặc vỏ polysaccharide lại gây bệnh nghiêm trọng hơn. Polysaccharide là yếu tố chính liên quan đến độc lực của virus. Trong số 6 tuýp *Haemophilus influenzae*, tuýp b (Hib) gây ra hơn 90% các trường hợp nhiễm trùng toàn thân. Vi khuẩn này chủ yếu gây viêm phổi và viêm màng não ở trẻ nhỏ và là mối lo ngại lớn về sức khỏe cộng đồng ở nhiều nơi trên thế giới, với khoảng 3 triệu trường hợp mắc bệnh nghiêm trọng xảy ra mỗi năm. Sự đề kháng ngày càng tăng của Hib với các tác nhân kháng sinh đã được báo cáo ở nhiều nơi trên thế giới và tiêm chủng là công cụ y tế công cộng duy nhất có thể nhanh chóng làm giảm tỷ lệ mắc bệnh Hib trên toàn cầu [1].

Vắc xin đầu tiên chống lại bệnh Hib là vắc xin chỉ có duy nhất một thành phần polysaccharide vỏ. Vắc xin polysaccharide đơn thuần cho đáp ứng miễn dịch không phụ thuộc vào tế bào lympho T. Vắc xin này không có được hiệu quả sinh đáp ứng miễn dịch ở nhóm trẻ dưới 24 tháng tuổi, nhóm có nguy cơ mắc bệnh, tử vong cao nhất và không tạo được miễn dịch trí nhớ nên đáp ứng có được không kéo dài. Do đó, các nhà khoa học đã cải tiến và tìm ra loại vắc xin Hib mới - vắc xin cộng hợp. Vắc

xin Hib cộng hợp là chế phẩm dạng lỏng hoặc đông khô của polyribosylribitol phosphate (PRP) tinh khiết của Hib, được liên kết hóa học với protein vận chuyển, bao gồm dải độc tố bạch hầu CRM 197, dải độc tố uốn ván TT hoặc protein màng ngoài não mô cầu. Vắc xin Hib có sẵn trên thị trường dưới dạng chế phẩm đơn trị, cũng như vắc xin kết hợp có chứa DTP, hoặc cùng với viêm gan B và/hoặc IPV [1]. Vắc xin cộng hợp polysaccharide đầu tiên đã có mặt trên thế giới vào đầu những năm 90. Hiện trên thế giới có 4 loại vắc xin Hib cộng hợp chính đã được cấp phép sử dụng tại nhiều nước khác nhau. Tất cả các vắc xin Hib cộng hợp được sản xuất hiện nay đều gây được đáp ứng miễn dịch tốt. Kháng thể sinh ra sau khi tiêm vắc xin cộng hợp có khả năng tiêu diệt vi khuẩn mạnh hơn so với kháng thể có được sau khi tiêm vắc xin chỉ có polysaccharide không cộng hợp.

Kiểm soát chất lượng các vắc xin Hib là rất quan trọng để đảm bảo tính an toàn cũng như hiệu quả của sản phẩm. Theo WHO TRS 897, Dược Điển Việt Nam và Dược Điển các nước, để đảm bảo hiệu quả bảo vệ của vắc xin, kiểm tra công hiệu là một trong những thử nghiệm bắt buộc [2] [3] [4]. Các khuyến nghị của WHO về sản xuất và kiểm soát chất lượng vắc xin cộng hợp Hib đã được Ủy ban Chuyên gia về Tiêu chuẩn Sinh học thông qua năm 1990 đã được sửa đổi vào năm 1998 do mối

tương quan kém được tìm thấy giữa xét nghiệm sinh học về hiệu lực của vắc xin và hiệu quả lâm sàng ở trẻ sơ sinh. Các thử nghiệm trên động vật để kiểm tra công hiệu đã được thay thế bằng các thử nghiệm hóa lý [1], bằng cách đánh giá hàm lượng PRP tổng số và hàm lượng PRP tự do (không cộng hợp được với protein). Hiện nay có 3 phương pháp để xác định hàm lượng PRP bao gồm: ribose, phosphorus và sắc ký trao đổi ion, trong đó phương pháp sắc ký có độ nhạy cao và ít bị ảnh hưởng bởi các nền mẫu phức tạp. Đây là phương pháp chưa có trong Dược Điển, quy trình được nghiên cứu áp dụng từ quy trình của nhà sản xuất [5], do đó để đáp ứng yêu cầu của ISO 17025:2017 [6] đảm bảo chất lượng kết quả thử nghiệm, chúng tôi tiến hành thẩm định quy trình với mục đích xác nhận quy trình phù hợp sử dụng tại NICVB với các tiêu chí đánh giá độ đúng, độ chính xác, độ đặc hiệu, độ mạnh, tính tuyến tính và xác định giới hạn định lượng (LOQ).

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu: Quy trình xác định hàm lượng PRP tổng số và tự do trong vắc xin chứa thành phần Hib bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion.

2.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

- Địa điểm nghiên cứu: Khoa Hóa lý, Viện kiểm định Quốc gia Vắc xin và sinh phẩm Y tế.
- Thời gian nghiên cứu: Từ tháng 7 năm 2018 đến tháng 5 năm 2019

2.3. Nguyên vật liệu, thiết bị sử dụng trong nghiên cứu

2.3.1. Mẫu thử

- Vắc xin Quinvaxem, nhà sản xuất Berna Biotech Korea Corporation
- Vắc xin Quimi-Hib, nhà sản xuất Heberbiotech SA, Cuba
- Mẫu trắng (không chứa PRP): + Vắc xin DPT, nhà sản xuất IVAC
+ Vắc xin Gene-Hbvax, nhà sản xuất Vabiotech

2.3.2. Mẫu chuẩn

- WHO 2nd International Standard for Haemophilus influenzae polysaccharide Polyribosyl Ribitol Phosphate (PRP), code: 12/306
Hàm lượng: 4,904 mg/ml, số lượng: 01 ống
- Chuẩn bị mẫu chuẩn: Hoàn nguyên 01 ống mẫu chuẩn vào bình định mức 250 ml, chia ra các ống 5 ml, bảo quản -20°C.
Nồng độ mẫu chuẩn sau pha loãng theo COA: 19,616 µg/ml

2.3.3. Thiết bị, dụng cụ, hoá chất

- Thiết bị: Hệ thống sắc ký trao đổi ion hãng Dionex bao gồm: Bộ bơm mẫu tự động (Model:ICS 5000+); Bơm phân phối dung môi (pump, model: SP5, seri: 17100862); Bùng cột (model: DIONEX IC5-5000, seri: 17101055); Bộ phận bơm mẫu tự động (model AS-DV, seri: 170912739); Đầu dò điện hoá ED (model: DIONEX IC5-5000, seri: 17091134); Cột phân tích Dionex CarboPac MA1 IC (code: 044066). Hệ

thông đã được đánh giá IQ, OQ, PQ. Các thiết bị khác: cân điện tử, máy lắc, máy đo pH, máy khuấy từ, máy ly tâm, tủ hút, bể ổn nhiệt, micropipét các loại đã được hiệu chuẩn, bảo dưỡng hàng năm theo tiêu chuẩn ISO/IEC 17025.

- Hoá chất thương mại: Sodium dihydrogen phosphate monohydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, hãng Sigma, code 71504); Sodium hydroxide 50% (hãng Sigma, code 415413), Hydrochloric acid 37% (hãng Merck, code 100317), Sodium chloride (hãng Sigma, code S7653), Methanol (hãng Sigma, code 34860).

2.4. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp nghiên cứu mô tả thực nghiệm trong phòng thí nghiệm.

2.5. Nội dung nghiên cứu

2.5.1. Tóm tắt quy trình nghiên cứu

Mẫu thử chia 2 ống bao gồm mẫu tổng số (Total polysaccharide - TS) và mẫu tự do (Free polysaccharide – FS). Xử lý mẫu FS: Lấy 4,5 ml mẫu vắc xin, thêm 50 μl dung dịch đệm phosphate 1M (pH 6,8) và 450 μl dung dịch NaCl 0,9%, lắc ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Ly tâm 2300g ở 10°C trong 30 phút. Lấy nước nổi, lọc qua màng lọc 0,22 μm (1). Thêm 3 ml

methanol vào cột chiết pha rắn SPE C4 để hoạt hóa cột, loại methanol. Rửa cột bằng 3 ml nước deion, loại nước, bước này lặp lại 3 lần. Lên cột 2 ml dịch nước nổi đã thu ở bước (1), thu dung dịch vào ống falcon 15 ml. Rửa cột bằng 2 ml dung dịch NaCl 0,9%, thu dung dịch vào ống falcon trên.

Chuẩn bị dãy đường chuẩn ribitol bao gồm các nồng độ: 0,075 $\mu\text{g/ml}$; 0,15 $\mu\text{g/ml}$; 0,45 $\mu\text{g/ml}$; 0,75 $\mu\text{g/ml}$.

Hút 2 ml mẫu TS, mẫu FS sau xử lý, mẫu chuẩn PRP và các điểm chuẩn, thuỷ phân bằng 100 μl HCl 6N ở 100°C trong 2 giờ, sau đó trung hoà bằng 800 μl NaOH 1M. Pha loãng mẫu TS và mẫu chuẩn PRP 20 lần bằng NaOH 70 mM. Lọc tất cả các mẫu qua màng lọc 0,22 μm , hút các mẫu vào ống sắc ký tương ứng và đưa vào máy.

Thông số phương pháp: Pha động: kênh A (NaOH 1M) – 58%, kênh B (nước deion) – 42%. Tốc độ dòng 0,4 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 250 μl , thời gian chạy 1 mẫu 35 phút.

2.5.2. Thiết kế nghiên cứu

Phương pháp không tiêu chuẩn, thẩm định toàn phần, các tiêu chí thẩm định và thiết kế thí nghiệm được liệt kê như bảng dưới:

Bảng 1. Thông số thẩm định quy trình và cách bố trí thí nghiệm

| TT | Thông số thẩm định | Bố trí thí nghiệm | Tiêu chuẩn chấp thuận |
|----|------------------------------------|--|---|
| 1 | Tính thích hợp của hệ thống sắc ký | Bom mẫu lặp lại 6 lần trên cùng một lần chuẩn bị mẫu chuẩn | - Số đĩa lý thuyết của pic ribitol ≥ 2000 - %RSD của diện tích pic $< 2\%$ - %RSD của thời gian lưu $< 1,0\%$ [7,8,9]. |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 2 | Độ chính xác | 3 nhóm, mỗi nhóm thực hiện trên mẫu thử lặp lại 10 lần trong các ngày khác nhau | <p>Đối với độ lặp lại:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Giá trị của từng lần phải nằm trong khoảng giá trị trung bình $\pm 2SD$. - %RSD từng nhóm $\leq 7,3\%$ [10]. |
| | | | <p>Đối với độ chính xác trung gian</p> <ul style="list-style-type: none"> - Giá trị của từng lần phải nằm trong khoảng giá trị trung bình $\pm 2SD$. - %RSD $\leq 11\%$ [10] |
| 3 | Độ đúng | 3 nhóm, mỗi nhóm thực hiện trên mẫu chuẩn trong 3 ngày khác nhau | - $t < t_{\alpha} = 1,860$ [11] [12] |
| 4 | Độ mạnh | 2 nhóm, mỗi nhóm thực hiện trên mẫu thử 10 lần trong các ngày khác nhau, khác loại hoá chất, dụng cụ | - $t_{test} \leq t_{bảng} = 1,833$ ($t_{bảng}$ tra trong bảng phân phối Student) tại mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$ tức là độ tin cậy 95% [11] [12] |
| 5 | Tính tuyến tính | 3 nhóm, mỗi nhóm thực hiện trên mẫu thử 3 lần trong 3 ngày khác nhau | <ul style="list-style-type: none"> - $0,99 \leq R^2 \leq 1,0$ - Các giá trị đo được của từng điểm trên đường chuẩn phải nằm trong khoảng giá trị trung bình tại điểm đó $\pm 2SD$ - Độ chính xác ở từng điểm trên đường chuẩn: %RSD của mỗi điểm chuẩn $\leq 20\%$ - Độ đúng ở từng điểm trên đường chuẩn: độ chệch các điểm nồng độ trong đường chuẩn $\Delta i \leq 15\%$ [11] [12] |
| 6 | Độ đặc hiệu | 3 nhóm, mỗi nhóm thực hiện trên mẫu không chứa PRP (vắc xin DPT và Gene-Hbvax) trong 3 ngày khác nhau, tiến hành song song cùng mẫu thử và mẫu chuẩn. | <ul style="list-style-type: none"> - Trên các sắc ký đồ thu được, mẫu trắng không cho đáp ứng pic, không xuất hiện pic nào có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic chính trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn. - Mẫu thử cho các pic chính có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic chính trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn [7,9]. |
| 7 | <p>Giới hạn định lượng</p> <p>Sử dụng phần mềm Excel tính:</p> <p style="text-align: center;">$+ LOQ = 10*s/a$</p> | | |

| |
|--|
| <p>Trong đó:</p> <p>s: sai số chuẩn của phương trình đường chuẩn $y = ax + b$</p> <p>a: độ dốc của đường chuẩn</p> <p>* Kiểm tra lại độ đúng và độ chính xác tại LOQ bằng cách phân tích mẫu chuẩn được pha loãng tại nồng độ LOQ trong 5 ngày khác nhau.</p> <p>Tiêu chuẩn chấp thuận cho độ đúng và độ chính xác tại LOQ:</p> <p>+ Độ đúng: $t < t_{\alpha} = 2,132$ [11] [12]</p> <p>+ Độ chính xác: $RSD \leq 21\%$ [10]</p> |
|--|

3. KẾT QUẢ

2.6. Phương pháp phân tích số liệu

Phân tích thống kê xử lý số liệu bằng phần mềm Microsoft Excel.

3.1. Tính thích hợp của hệ thống

Bảng 2: Kết quả kiểm tra tính thích hợp của hệ thống sắc ký trên mẫu thử

| Lần TN | Thời gian lưu (phút) | Diện tích pic (nC*min) | Số đĩa lý thuyết (N) |
|-------------|----------------------|------------------------|----------------------|
| 1 | 16.609 | 1.4881 | 10667 |
| 2 | 16.609 | 1.4638 | 10663 |
| 3 | 16.626 | 1.4508 | 10648 |
| 4 | 16.626 | 1.4861 | 10655 |
| 5 | 16.643 | 1.4902 | 10660 |
| 6 | 16.651 | 1.4923 | 10657 |
| TB | 16.627 | 1.4796 | |
| SD | 0.017 | 0.017 | |
| %RSD | 0.10 | 1.16 | |

Kết quả cho thấy, %RSD của thời gian lưu nhỏ hơn 1%; %RSD của diện tích pic nhỏ hơn 2%; số đĩa lý thuyết N của pic Ribitol đều lớn hơn

2000, chứng tỏ hệ thống sắc ký trên là phù hợp cho quy trình phân tích.

3.2. Độ chính xác

Bảng 3. Kết quả độ chính xác thực hiện trên mẫu Quinvaxem

| TT | Hàm lượng PRP tổng số | | | Hàm lượng PRP tự do | | |
|----|-----------------------|---------|---------|---------------------|--------|--------|
| | Nhóm 1 | Nhóm 2 | Nhóm 3 | Nhóm 1 | Nhóm 2 | Nhóm 3 |
| 1 | 21,1082 | 21,0800 | 20,4302 | 1,2674 | 1,2944 | 1,4398 |
| 2 | 21,4600 | 20,8278 | 20,6370 | 1,2415 | 1,3737 | 1,4123 |
| 3 | 20,2652 | 20,3809 | 20,0830 | 1,1877 | 1,3110 | 1,4363 |
| 4 | 21,2811 | 21,3652 | 21,1448 | 1,2894 | 1,3365 | 1,3709 |

| | | | | | | |
|-------------------|----------------|----------------|----------------|---------------|---------------|---------------|
| 5 | 20,8051 | 19,5077 | 19,3021 | 1,2062 | 1,3277 | 1,3947 |
| 6 | 20,5685 | 19,2730 | 19,7056 | 1,2114 | 1,2643 | 1,4148 |
| 7 | 21,0659 | 20,1189 | 20,7503 | 1,2431 | 1,3477 | 1,4289 |
| 8 | 20,0642 | 18,9460 | 19,1706 | 1,2048 | 1,3107 | 1,3317 |
| 9 | 20,6783 | 19,2713 | 19,3839 | 1,2432 | 1,2605 | 1,3583 |
| 10 | 20,5416 | 19,6355 | 20,0492 | 1,1778 | 1,2921 | 1,3544 |
| TB | 20,7838 | 20,0406 | 20,0657 | 1,2273 | 1,3119 | 1,3942 |
| SD | 0,4234 | 0,8002 | 0,6381 | 0,0338 | 0,0340 | 0,0362 |
| TB + 2SD | 21,6306 | 21,6411 | 21,3419 | 1,2948 | 1,3799 | 1,4667 |
| TB – 2SD | 19,9370 | 18,4402 | 18,7895 | 1,1597 | 1,2438 | 1,3217 |
| CV(%RSD) | 2,0372 | 3,9931 | 3,1801 | 2,7501 | 2,5922 | 2,5990 |
| TB 3 nhóm | 20,2967 | | | 1,3111 | | |
| SD 3 nhóm | 0,7388 | | | 0,0778 | | |
| TB + 2SD | 21,7744 | | | 1,4667 | | |
| TB – 2SD | 18,8190 | | | 1,1555 | | |
| CV% 3 nhóm | 3,6402 | | | 5,9329 | | |

Bảng 4. Kết quả độ chính xác thực hiện trên mẫu Quimi-Hib

| TT | Hàm lượng PRP tổng số | | | Hàm lượng PRP tự do | | |
|-------------------|-----------------------|----------------|----------------|---------------------|---------------|---------------|
| | Nhóm 1 | Nhóm 2 | Nhóm 3 | Nhóm 1 | Nhóm 2 | Nhóm 3 |
| 1 | 17,7327 | 19,0730 | 17,3779 | 1,6084 | 1,8856 | 1,8547 |
| 2 | 18,6901 | 18,7304 | 18,0216 | 1,7089 | 1,8237 | 1,8019 |
| 3 | 18,8857 | 18,3530 | 17,9435 | 1,6406 | 1,8409 | 1,8781 |
| 4 | 18,6234 | 18,5930 | 17,6224 | 1,5740 | 1,7998 | 1,7806 |
| 5 | 17,9169 | 18,3195 | 18,9931 | 1,6111 | 1,6563 | 1,7294 |
| 6 | 18,1811 | 17,9397 | 18,8579 | 1,6446 | 1,6677 | 1,8566 |
| 7 | 18,3060 | 18,2739 | 19,0201 | 1,6988 | 1,7267 | 1,7981 |
| 8 | 17,7666 | 17,8220 | 17,7359 | 1,6603 | 1,7103 | 1,6912 |
| 9 | 18,3332 | 17,2689 | 17,9201 | 1,6164 | 1,6605 | 1,7430 |
| 10 | 18,0482 | 17,4817 | 17,9952 | 1,5777 | 1,6752 | 1,7564 |
| TB | 18,2484 | 18,1855 | 18,1488 | 1,6341 | 1,7447 | 1,7890 |
| SD | 0,3748 | 0,5322 | 0,5613 | 0,0435 | 0,0810 | 0,0578 |
| TB + 2SD | 18,9980 | 19,2499 | 19,2714 | 1,7211 | 1,9066 | 1,9047 |
| TB – 2SD | 17,4987 | 17,1211 | 17,0261 | 1,5471 | 1,5827 | 1,6733 |
| CV(%RSD) | 2,0540 | 2,9266 | 3,0929 | 2,6616 | 4,6408 | 3,2324 |
| TB 3 nhóm | 18,1942 | | | 1,7226 | | |
| SD 3 nhóm | 0,5065 | | | 0,0920 | | |
| TB + 2SD | 19,2072 | | | 1,9065 | | |
| TB – 2SD | 17,1813 | | | 1,5387 | | |
| CV% 3 nhóm | 2,7837 | | | 5,3384 | | |

Kết quả cho thấy tất cả các giá trị đều nằm trong khoảng giá trị $TB \pm 2SD$, %RSD của từng nhóm trên các mẫu thử (cùng người thực hiện, cùng loại hoá chất, dụng cụ, thiết bị và thực hiện trong một khoảng thời gian ngắn) đều nhỏ hơn 7,3%, quy trình đạt yêu cầu về độ lặp

lại. %RSD giữa 3 nhóm (thực hiện trong các ngày khác nhau, khác nhau về loại hóa chất, dụng cụ và người thực hiện) đều nhỏ hơn 11%, quy trình đạt yêu cầu về độ chính xác trung gian.

3.3. Độ đúng

Bảng 4. Kết quả độ đúng thực hiện trên mẫu chuẩn

| Lần TN | Hàm lượng PRP ($\mu\text{g/ml}$) | | |
|-------------------|------------------------------------|---------|---------|
| | Nhóm 1 | Nhóm 2 | Nhóm 3 |
| 1 | 18,7092 | 19,8192 | 20,0085 |
| 2 | 19,2063 | 19,2551 | 19,9258 |
| 3 | 19,4287 | 19,4287 | 19,6833 |
| Giá trị TB | 19,4545 | | |
| SD | 0,4376 | | |
| t | 1,11 | | |

Kết quả cho thấy giá trị $t = 1,11$ nhỏ hơn giá trị $t_{\alpha} = 1,860$, chứng tỏ giá trị trung bình mẫu chuẩn thu được so với giá trị thực của mẫu

chuẩn khác nhau một cách không có ý nghĩa với độ tin cậy 95%, quy trình đạt yêu cầu về độ đúng.

3.4. Độ mạnh

Bảng 5. Kết quả độ mạnh thực hiện trên mẫu thử

| Lần TN | Quinvaxem | | | | Quimi-Hib | | | |
|-----------------|--|----------------|--|---------------|--|----------------|--|---------------|
| | Hàm lượng PRP tổng số ($\mu\text{g/ml}$) | | Hàm lượng PRP tự do ($\mu\text{g/ml}$) | | Hàm lượng PRP tổng số ($\mu\text{g/ml}$) | | Hàm lượng PRP tự do ($\mu\text{g/ml}$) | |
| | Nhóm 1 | Nhóm 2 | Nhóm 1 | Nhóm 2 | Nhóm 1 | Nhóm 2 | Nhóm 1 | Nhóm 2 |
| 1 | 21,1082 | 21,0800 | 1,2674 | 1,2944 | 17,7327 | 19,0730 | 1,6084 | 1,8856 |
| 2 | 21,4600 | 20,8278 | 1,2415 | 1,3737 | 18,6901 | 18,7304 | 1,7089 | 1,8237 |
| 3 | 20,2652 | 20,3809 | 1,1877 | 1,3110 | 18,8857 | 18,3530 | 1,6406 | 1,8409 |
| 4 | 21,2811 | 21,3652 | 1,2894 | 1,3365 | 18,6234 | 18,5930 | 1,5740 | 1,7998 |
| 5 | 20,8051 | 19,5077 | 1,2062 | 1,3277 | 17,9169 | 18,3195 | 1,6111 | 1,6563 |
| 6 | 20,5685 | 19,2730 | 1,2114 | 1,2643 | 18,1811 | 17,9397 | 1,6446 | 1,6677 |
| 7 | 21,0659 | 20,1189 | 1,2431 | 1,3477 | 18,3060 | 18,2739 | 1,6988 | 1,7267 |
| 8 | 20,0642 | 18,9460 | 1,2048 | 1,3107 | 17,7666 | 17,8220 | 1,6603 | 1,7103 |
| 9 | 20,6783 | 19,2713 | 1,2432 | 1,2605 | 18,3332 | 17,2689 | 1,6164 | 1,6605 |
| 10 | 20,5416 | 19,6355 | 1,1778 | 1,2921 | 18,0482 | 17,4817 | 1,5777 | 1,6752 |
| TB | 20,7838 | 20,0406 | 1,2273 | 1,3119 | 18,2484 | 18,1855 | 1,6341 | 1,7447 |
| SD | 0,4234 | 0,8002 | 0,0338 | 0,0340 | 0,3748 | 0,5322 | 0,0435 | 0,0810 |
| TB + 2SD | 21,6306 | 21,6411 | 1,2948 | 1,3799 | 18,9980 | 19,2499 | 1,7211 | 1,9066 |

| | | | | | | | | |
|-----------------|---|----------------|---|---------------|---|----------------|---|---------------|
| TB – 2SD | 19,9370 | 18,4402 | 1,1597 | 1,2438 | 17,4987 | 17,1211 | 1,5471 | 1,5827 |
| %RSD | 2,0372 | 3,9931 | 2,7501 | 2,5922 | 2,0540 | 2,9266 | 2,6616 | 4,6408 |
| | $F_{\alpha} = 0,072$ $F_{\text{bảng}} = F(\alpha;9;9) = 3,179$ $F_{\alpha} < F_{\text{bảng}}$ chứng tỏ phương sai của 2 nhóm khác nhau một cách không có ý nghĩa với độ tin cậy 95% t = 0,024 | | $F_{\alpha} = 0,98$ $F_{\text{bảng}} = F(\alpha;9;9) = 3,179$ $F_{\alpha} < F_{\text{bảng}}$ chứng tỏ phương sai của 2 nhóm khác nhau một cách không có ý nghĩa với độ tin cậy 95% t = 4,89.10⁻⁵ | | $F_{\alpha} = 0,311$ $F_{\text{bảng}} = F(\alpha;9;9) = 3,179$ $F_{\alpha} < F_{\text{bảng}}$ chứng tỏ phương sai của 2 nhóm khác nhau một cách không có ý nghĩa với độ tin cậy 95% t = 0,775 | | $F_{\alpha} = 0,078$ $F_{\text{bảng}} = F(\alpha;9;9) = 3,179$ $F_{\alpha} < F_{\text{bảng}}$ chứng tỏ phương sai của 2 nhóm khác nhau một cách không có ý nghĩa với độ tin cậy 95% t = 0,002 | |

Kết quả cho thấy các giá trị t_{test} đều nhỏ hơn $t_{\text{bảng}} = 1,833$ chứng tỏ giá trị trung bình mẫu thu được của 2 nhóm khác nhau

một cách không có ý nghĩa với độ tin cậy 95%, quy trình đạt yêu cầu về độ mạnh.

3.5. Tính tuyến tính

Bảng 5: Tính tuyến tính và độ chính xác ở từng điểm trên đường chuẩn

| Lần thử nghiệm | Điểm chuẩn (µg/ml) | | | | R ² |
|------------------|--------------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| | 0,075 | 0,15 | 0,45 | 0,75 | |
| 1 | 0,3125 | 0,6265 | 1,8142 | 3,0576 | 0,9999 |
| 2 | 0,3703 | 0,7319 | 2,0689 | 3,2900 | 0,9990 |
| 3 | 0,2740 | 0,6019 | 1,8449 | 3,1003 | 0,9999 |
| 4 | 0,1997 | 0,4328 | 1,2850 | 2,0811 | 0,9994 |
| 5 | 0,2320 | 0,5412 | 1,3321 | 2,2607 | 0,9987 |
| 6 | 0,2316 | 0,4589 | 1,4060 | 2,4265 | 0,9996 |
| 7 | 0,2542 | 0,5183 | 1,5103 | 2,5191 | 0,9999 |
| 8 | 0,1965 | 0,4266 | 1,1451 | 1,9084 | 0,9994 |
| 9 | 0,1512 | 0,4224 | 1,2379 | 2,0914 | 0,9992 |
| TB | 0,2469 | 0,5289 | 1,5160 | 2,5261 | |
| SD | 0,0659 | 0,1074 | 0,3196 | 0,5056 | |
| TB+2SD | 0,3786 | 0,7437 | 2,1552 | 3,5372 | |
| TB-2SD | 0,1152 | 0,3142 | 0,8769 | 1,5150 | |
| CV (%RSD) | 18,59 | 18,41 | 18,44 | 18,04 | |

Bảng 6: Độ đúng ở từng điểm trên đường chuẩn

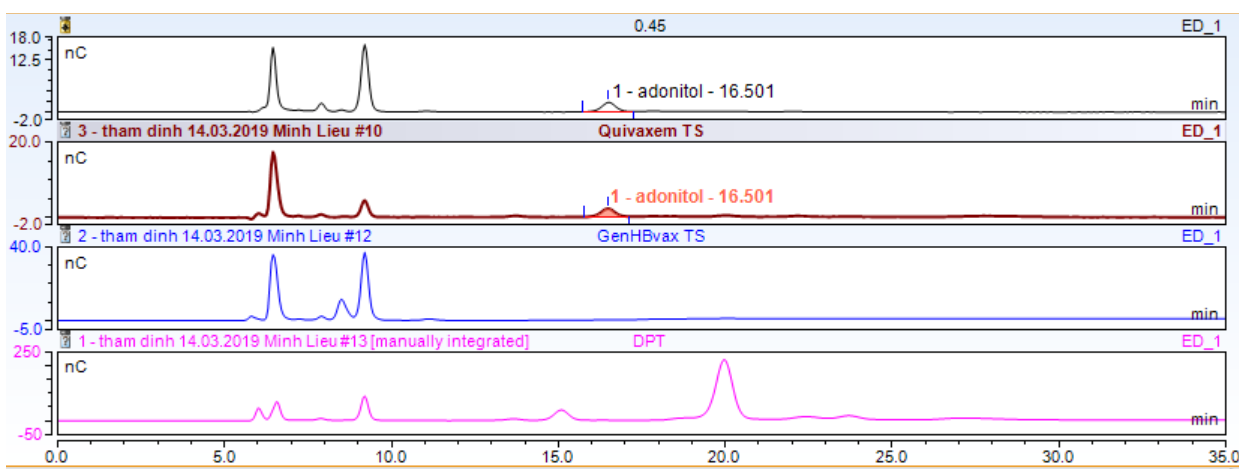
| Lần thử nghiệm | Điểm chuẩn (µg/ml) | | | | | | | |
|----------------|--------------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|--------------|--------------|
| | 0,075 | | 0,15 | | 0,45 | | 0,75 | |
| | Giá trị thực | Δi (%) | Giá trị thực | Δi (%) | Giá trị thực | Δi (%) | Giá trị thực | Δi (%) |
| 1 | 0,076 | 0,91 | 0,153 | 2,02 | 0,446 | 0,97 | 0,752 | 0,26 |
| 2 | 0,074 | 0,70 | 0,157 | 4,70 | 0,462 | 2,75 | 0,741 | 1,17 |
| 3 | 0,073 | 2,68 | 0,152 | 0,99 | 0,449 | 0,21 | 0,750 | 0,057 |
| 4 | 0,069 | 8,25 | 0,153 | 1,71 | 0,459 | 1,95 | 0,745 | 0,69 |

| | | | | | | | | |
|---|-------|--------------|-------|--------------|-------|-------------|-------|-------------|
| 5 | 0,069 | 7,91 | 0,172 | 14,66 | 0,440 | 2,33 | 0,752 | 0,30 |
| 6 | 0,077 | 2,11 | 0,147 | 2,02 | 0,440 | 2,17 | 0,756 | 0,83 |
| 7 | 0,073 | 2,09 | 0,152 | 1,58 | 0,449 | 0,25 | 0,750 | 0,05 |
| 8 | 0,068 | 9,41 | 0,160 | 6,50 | 0,446 | 0,80 | 0,751 | 0,12 |
| 9 | 0,066 | 12,49 | 0,161 | 7,48 | 0,449 | 0,29 | 0,749 | 0,06 |

Kết quả cho thấy: Hệ số đường hồi quy tuyến tính của từng ngày đều nằm trong khoảng 0,99 – 1,0; các giá trị đo quang thu được tại mỗi điểm chuẩn đều nằm trong khoảng $TB \pm 2SD$; Độ chính xác ở từng điểm trên đường chuẩn:

%RSD tại mỗi điểm chuẩn đều nhỏ hơn 20%; Độ đúng ở từng điểm trên đường chuẩn: độ chệch Δ_i (%) của từng điểm trong đường chuẩn đều nhỏ hơn 15%. Quy trình đạt yêu cầu về tính tuyến tính với khoảng làm việc 0,075 – 0,75 $\mu\text{g/ml}$ ribitol

3.6. Độ đặc hiệu



Hình 1: Sắc ký đồ của Gene-Hbvax và DPT chạy cùng mẫu thử Quinvaxem và mẫu chuẩn (điểm chuẩn 0,45 $\mu\text{g/ml}$)

Hình 1 cho thấy: Trên sắc ký đồ của dung dịch mẫu thử Gene-Hbvax và DPT (không chứa PRP), không có pic nào xuất hiện ở thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic chính trên sắc ký đồ của dung dịch mẫu

chuẩn. Mẫu thử cho pic chính có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic chính trên sắc ký đồ của dung dịch mẫu chuẩn. Quy trình đạt yêu cầu về tính đặc hiệu.

3.7. Giới hạn định lượng

Bảng 7: LOQ

| | Điểm chuẩn ($\mu\text{g/ml}$) | Slope |
|--|---------------------------------|-------|
|--|---------------------------------|-------|

| Lần thử nghiệm | 0,075 | 0,15 | 0,45 | 0,75 | (a) | Y intercept |
|---------------------------------------|--------|--------|--------|--------|---------------|---------------|
| 1 | 0,3125 | 0,6265 | 1,8142 | 3,0576 | 4,0592 | 0,0053 |
| 2 | 0,3703 | 0,7319 | 2,0689 | 3,2900 | 4,3789 | 0,0442 |
| 3 | 0,2740 | 0,6019 | 1,8449 | 3,1003 | 4,1773 | 0,0309 |
| 4 | 0,1997 | 0,4328 | 1,2850 | 2,0811 | 2,7830 | 0,0082 |
| 5 | 0,2320 | 0,5412 | 1,3321 | 2,2607 | 2,9696 | 0,0269 |
| 6 | 0,2316 | 0,4589 | 1,4060 | 2,4265 | 3,2293 | 0,0157 |
| 7 | 0,2542 | 0,5183 | 1,5103 | 2,5191 | 3,3458 | 0,0085 |
| 8 | 0,1965 | 0,4266 | 1,1451 | 1,9084 | 2,5065 | 0,0262 |
| 9 | 0,1512 | 0,4224 | 1,2379 | 2,0914 | 2,8370 | 0,0350 |
| Trung bình | | | | | 3,3652 | 0,0223 |
| LOQ = 10 * s/a = 0,066 (µg/ml) | | | | | | |

Bảng 8: Kết quả độ đúng và độ chính xác tại LOQ

| Lần thử nghiệm | Kết quả hàm lượng PRP (µg/ml) trong mẫu chuẩn pha loãng tại nồng độ LOQ |
|----------------|---|
| 1 | 0,0689 |
| 2 | 0,0638 |
| 3 | 0,0652 |
| 4 | 0,0634 |
| 5 | 0,0648 |
| TB | 0,0652 |
| SD | 0,00218 |
| TB+2SD | 0,0696 |
| TB-2SD | 0,0609 |
| %RSD | 3,35 |
| t | 0,80 |

Kết quả cho thấy tại nồng độ LOQ, hàm lượng PRP của mẫu chuẩn đều trong khoảng giá trị TB±2SD, RSD% = 3,35% < 21% và t =

0,80 < t_α = 2,132. Quy trình đạt yêu cầu về độ đúng và độ chính xác tại LOQ = 0,066 µg/ml.

4. Bàn luận

Trong nghiên cứu tính thích hợp của hệ thống sắc ký, chúng tôi có đánh giá số đĩa lý thuyết N. Số đĩa lý thuyết là một công cụ đo lường hiệu quả của cột HPLC. Cột có số lượng đĩa lý thuyết cao được coi là hiệu quả hơn trong

việc phân tách so với các cột có số lượng đĩa lý thuyết ít hơn. FDA khuyến cáo “Số đĩa lý thuyết N phụ thuộc vào thời gian rửa giải, nhưng nói chung nên lớn hơn 2000” [7], tuy nhiên việc đặt một giá trị N nhỏ nhất có thể chấp nhận được, như được FDA khuyến cáo N

> 2000, không có ý nghĩa như một yêu cầu chung. Thay vào đó, chỉ có thể xác định số đĩa lý thuyết chấp nhận được tối thiểu dựa trên giá trị độ phân giải tối thiểu có thể chấp nhận được đối với từng phương pháp. Số đĩa lý thuyết cũng cung cấp thông tin về mức độ hoạt động của cột so với trường hợp lý tưởng (thử nghiệm của nhà sản xuất). Theo dõi số đĩa lý thuyết có thể giúp xác định khi cột gần hết thời gian sử dụng để có thể đặt hàng thay thế. Ở một số nghiên cứu đã xem xét thay thế cột khi thấy mất khoảng 30% ở N so với giá trị đo được khi cột mới [13]. Một số nhà sản xuất sinh phẩm cũng đưa ra tiêu chuẩn đánh giá cho số đĩa lý thuyết N ở mức xác định tính thích hợp của hệ thống sắc ký, thông thường $N \geq 60-70\% N$ đo khi cột mới [14]. Hồi cứu dữ liệu khi mới sử dụng cột, chúng tôi xác định giá trị N ban đầu của cột, và theo dõi giá trị này qua các lần sử dụng, để đánh giá hiệu suất cột cũng như thời điểm cần phải thay thế cột (khi số đĩa lý thuyết N của cột mất khoảng 40% so với giá trị N ban đầu tính được). Những thay đổi về số đĩa lý thuyết của cột cũng có thể giúp dự đoán các vấn đề về giới hạn phát hiện. Khi số đĩa lý thuyết của cột giảm, chiều rộng tăng và chiều cao đỉnh giảm, trong khi chiều cao đỉnh là phép đo quan trọng khi nói đến giới hạn phát hiện, phụ thuộc vào tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu, các đỉnh ngắn hơn sẽ có tỷ lệ nhiễu tín hiệu nhỏ hơn và do đó giới hạn phát hiện kém hơn [13].

Kết quả đánh giá độ chính xác cho thấy, CV% của mẫu tổng số (TS) luôn thấp hơn

CV% mẫu tự do (FS) khi đánh giá các lần thực hiện của từng nhóm và của cả 3 nhóm, chứng tỏ có sự tương đồng về biến thiên số liệu giữa các nhóm trên mẫu FS. Có thể giải thích rằng, quá trình xử lý mẫu FS phức tạp hơn mẫu TS rất nhiều, qua 2 bước để loại bỏ 2 thành phần bao gồm polysaccharide-cộng hợp protein-hấp phụ nhôm, và polysaccharide-cộng hợp protein để thu được trong dung dịch chỉ có polysaccharide tự do, do đó độ biến thiên về số liệu lớn hơn cũng là điều dễ hiểu. Tuy nhiên độ biến thiên này vẫn nằm trong tiêu chuẩn cho phép theo AOAC, do đó quy trình đạt yêu cầu về độ chính xác.

Kết quả đánh giá tính tuyến tính cho thấy, 8/9 lần thực hiện, hệ số hồi quy tuyến tính R^2 đạt 0,999. Đây là giá trị R^2 rất cao. R^2 là thước đo sự phù hợp của một mô hình tuyến tính, giá trị R^2 càng cao thì chứng tỏ mối quan hệ giữa biến độc lập (hàm lượng PRP) và biến phụ thuộc (diện tích pic) càng chặt chẽ.

Polyribosyl ribitol phosphate (PRP) (bao gồm các đơn vị lặp lại của 5-d-ribitol-(1→1)- β -d-ribose-3-phosphate) liên kết cộng hóa trị với protein, bao gồm 3 thành phần chính là đường ribose, đường ribitol và gốc phosphate. Do đó xác định hàm lượng PRP cũng có 3 phương pháp: ribose (xác định thông qua hàm lượng ribose), phosphorus (xác định thông qua hàm lượng gốc phosphate) và sắc ký trao đổi ion (thông qua hàm lượng ribitol). Phương pháp sắc ký trao đổi ion sử dụng cơ chế trao đổi ion trong mẫu thử với pha tĩnh (là một loại nhựa

trao đổi ion) để phân tách các chất dựa trên tương tác điện tích của chúng. Phương pháp chúng tôi sử dụng là sắc ký trao đổi anion, cột MA1 là pha tĩnh chứa các hạt tích điện dương, các thành phần trong mẫu thử tích điện âm khi đi qua cột sẽ bị giữ lại bởi các ion tích điện dương trên cột, sử dụng dung dịch rửa giải là NaOH để đẩy các thành phần trong mẫu ra khỏi cột, chất nào có lực tương tác tĩnh điện yếu sẽ bị đẩy ra trước, chất nào có lực tương tác tĩnh điện mạnh hơn sẽ bị đẩy ra sau, nhờ đó phân tách được các chất trong mẫu thử. Sắc ký đồ ở hình 1 - phần đánh giá độ đặc hiệu cho thấy, các chất được phân tách rất rõ ràng, không bị ảnh hưởng bởi các yếu tố gây nhiễu trong nền mẫu, đó là ưu điểm của phương pháp này so với các phương pháp đo quang truyền thống (ribose và phosphorus).

5. Kết luận

Quy trình xác định hàm lượng PRP trong các vắc xin chứa thành phần Hib đã được thẩm định với các tiêu chí: tính thích hợp của hệ thống, độ đúng, độ chính xác, độ mạnh, độ đặc hiệu đạt theo AOAC và có giới hạn định lượng LOQ = 0,066 µg/ml.

Tài liệu tham khảo

- [1] WHO. Haemophilus influenzae type b (Hib) < <https://www.who.int/teams/health-product-policy-and-standards/standards-and-specifications/vaccine-standardization/hib>>, accessed at 12/12/2023.
- [2] WHO Technical Report Series, No. 897, 2000. Annex 1. *Recommendations for the*

production and control of Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines.

- [3] European Pharmacopoeia 7.0 (2010), volume 1, monographs Vaccine for human use, mục 01/2008.2067. *Diphtheria, tetanus, pertusis (acellular, component), Hepatitis B (rDNA), poliomyelitis (inactivated) and haemophilus type b conjugate vaccine (adsorbed).*
- [4] Dược Điển Việt Nam V (2017), tập 2, chuyên luận Huyết thanh, sinh phẩm và vắc xin. *Vắc xin bạch hầu, uốn ván, ho gà, viêm gan B và Hib (DTwP-HeB-Hib)*, 1007-1013.
- [5] Hồ sơ của nhà sản xuất Berna Biotech Corporation.
- [6] ISO/IEC 17025:2017: *Yêu cầu chung về năng lực của phòng thử nghiệm và hiệu chuẩn*, xuất bản lần thứ 3.
- [7] Reviewer Guidance: *Validation of Chromatographic Methods* (1994). Centre for Drug Evaluation and Research (CDER).
- [8] Tạ Thị Thảo (2006). *Thống kê trong Hóa phân tích*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội.
- [9] ICH Q2 (R1) (1995): *Validation of Analytical Procedures*, European Medicines Agency.
- [10] AOAC Official methods of Analysis (2016). *Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements.*
- [11] Trần Cao Sơn (2010). *Thẩm định phương pháp trong phân tích hóa học và vi sinh*, Nhà xuất bản Khoa học kỹ thuật Hà Nội.

[12] SOP KĐQG-34: *Quy trình chuẩn thẩm định quy trình*, lần ban hành 7, Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế, Bộ Y tế.

[13] John W. Dolan (2016). *Column Plate Number and System Suitability*, LCGC Europe-03-01-2016, Volume 29, Issue 3, Pages: 130–134.

[14] Hồ sơ của các nhà sản xuất Kedrion Biopharma, Sanquin Plasma products B.V, Brahat Serum and Vaccine Limited, Biotest AG, CSL Behring GmbH, Reliance Life Science, Baxalta.