

VALIDATION OF THE RIBOSE METHOD FOR DETERMINATION OF TOTAL PRP CONTENT IN MONOVALENT HIB VACCINES

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

The National Institute for Control of Vaccines and Biologicals

Received 09 February 2026

Accepted 31 March 2026

Abstract: Polyribosylribitol phosphate (PRP) is an essential polysaccharide antigen in vaccines against *Haemophilus influenzae* type b (Hib). The Ribose method is a chemical assay described in the pharmacopoeia for the determination of PRP content in Hib vaccines. Since the method has been previously standardized, this study aimed to perform a partial validation of the Ribose method to assess its suitability for routine quality control testing. The validation parameters evaluated included repeatability, intermediate precision, limit of quantification (LOQ), and method stability under minor variations in analytical conditions. The results demonstrated that the method exhibited good repeatability and intermediate precision, with %RSD values meeting the acceptance criteria. The LOQ was determined to be 1.68 µg/mL, which is appropriate for the PRP content levels present in Hib vaccines. Statistical comparison between analysts showed no statistically significant difference ($p > 0.05$). Based on these findings, the Ribose method was considered suitable for routine determination of PRP content in Hib vaccines in quality control laboratories, contributing to the reliability of analytical results and ensuring vaccine quality.

Keywords: Total polysaccharide, PRP, *Haemophilus influenzae* type b (Hib), ribose method, spectrophotometry.

* Corresponding author:

E-mail address: canhhuyentrang@gmail.com

<https://doi.org/10.56086/jcvb.v6i1.248>

THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG PRP TỔNG SỐ TRONG VẮC XIN HIB ĐƠN BẰNG PHƯƠNG PHÁP RIBOSE

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

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

Nhận ngày 09 tháng 02 năm 2026

Chấp nhận đăng ngày 31 tháng 03 năm 2026

Tóm tắt: Polyribosylribitol phosphate (PRP) là kháng nguyên polysaccharide quan trọng trong vắc xin phòng bệnh do *Haemophilus influenzae* type b (Hib). Phương pháp Ribose là phương pháp hóa học được Dược điển quy định để định lượng hàm lượng PRP trong vắc xin Hib. Do phương pháp đã được tiêu chuẩn hóa, nghiên cứu này được thực hiện nhằm thẩm định một phần phương pháp Ribose để đánh giá khả năng áp dụng trong kiểm nghiệm thường quy tại phòng kiểm định. Các chỉ tiêu thẩm định bao gồm độ lặp lại, độ chính xác trung gian, giới hạn định lượng và độ ổn định của phương pháp trước các thay đổi nhỏ trong điều kiện phân tích. Kết quả cho thấy phương pháp có độ lặp lại và độ chính xác trung gian tốt với giá trị RSD% đáp ứng yêu cầu chấp thuận. Giới hạn định lượng của phương pháp được xác định là 1,68 $\mu\text{g/mL}$, phù hợp với mức hàm lượng PRP trong vắc xin Hib. Kết quả so sánh thống kê giữa các kỹ thuật viên phân tích cho thấy sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Từ các kết quả thu được, phương pháp Ribose được đánh giá là phù hợp để áp dụng trong kiểm nghiệm thường quy hàm lượng PRP trong vắc xin Hib tại phòng kiểm định, góp phần bảo đảm chất lượng và an toàn vắc xin.

Từ khóa: polysaccharide tổng số, PRP, *Haemophilus influenzae* type b (Hib), phương pháp ribose, đo quang phổ

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 vi khuẩn. 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 [2-4]. Các khuyến nghị của WHO về sản xuất và kiểm soát chất lượng vắc xin cộng hợp Hib, 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 kháng nguyên vỏ - PRP. Hiện nay có 3 phương pháp để xác định hàm lượng PRP bao gồm: ribose, phosphorus và sắc ký trao đổi ion. Phương pháp ribose là phương pháp đã có trong Dược điển [5-6], tuy nhiên do mỗi phòng thí nghiệm khác nhau đều có sự khác biệt về cơ sở vật chất (bao gồm thiết bị, hóa chất, dụng cụ, môi trường) và con người, do đó vẫn cần phải được thẩm định theo yêu cầu của ISO 17025:2017 nhằm chứng minh quy trình đáp ứng được các yêu cầu đặt ra, đảm bảo được chất

lượng kết quả của thử nghiệm [7]. Do đó, 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 và xác định giới hạn định lượng (LOQ).

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là quy trình xác định hàm lượng PRP tổng số trong vắc xin Hib đơn bằng phương pháp quang phổ hấp thụ UV-VIS

2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 5 năm 2024 đến tháng 8 năm 2024 tại Khoa Kiểm định Hóa lý, Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế.

2.3. Vật liệu, hoá chất

Mẫu thử là Vắc xin Quimi-Hib, nhà sản xuất Heberbiotech SA - Cuba được sử dụng để đánh giá khả năng áp dụng của quy trình phân tích. Mẫu vắc xin được lựa chọn từ lô sản phẩm đạt tiêu chuẩn chất lượng, còn hạn sử dụng và được bảo quản đúng theo điều kiện quy định trước khi tiến hành phân tích.

Mẫu chuẩn sử dụng trong nghiên cứu là chuẩn quốc tế của WHO: WHO 2nd International Standard for *Haemophilus influenzae* polysaccharide Polyribosyl Ribitol Phosphate (PRP), code: 12/306, với hàm lượng được công bố: $4,904 \pm 0,185$ mg/ống (độ không đảm bảo đo mở rộng được tính toán bằng hệ số bao phủ 2,23 tương ứng với mức độ tin cậy 95%). Chuẩn được hoàn nguyên bằng nước cất vừa đủ 250 ml, sau đó chia thành các ống nhỏ và bảo quản ở -20°C . Nồng độ mẫu chuẩn sau pha loãng theo COA: $19,616$ $\mu\text{g/ml}$.

Thuốc thử orcinol, axit hydrochloric (HCl) và các hoá chất khác đạt tiêu chuẩn hoá chất phân tích sử dụng trong phòng thí nghiệm. Cụ thể, chúng tôi sử dụng các hoá chất với thông tin nhà sản xuất và mã code như sau: D-(-)Ribose (hãng Sigma, code R7500), Orcinol monohydrate (hãng Sigma, code O1875), Ethanol (hãng Merck, code 100983), Iron (III) chloride hexahydrate (hãng Merck, code 103943), Hydrochloric acid 37% (hãng Merck, code H/1200/PC15).

Phép đo quang được thực hiện trên thiết bị quang phổ UV-VIS (hãng Jasco, model V730), cùng các thiết bị phụ trợ bao gồm bể ổn nhiệt, cân điện tử, máy lắc, micropipét và các dụng cụ thủy tinh đạt tiêu chuẩn phòng thí nghiệm theo ISO/IEC 17025.

2.4. Thiết kế nghiên cứu

2.4.1. Nguyên lý phương pháp

Phương pháp định lượng PRP tổng số trong vắc xin Hib được thực hiện dựa trên phản ứng tạo màu giữa ribose và thuốc thử orcinol trong môi trường axit mạnh. Trong điều kiện gia nhiệt, ribose bị phân huỷ thành tạo furfural. Furfural sau đó phản ứng với orcinol trong sự hiện diện của ion sắt (III) tạo thành phức màu xanh lục có khả năng hấp thụ ánh sáng trong vùng khả kiến. Cường độ màu tạo thành tỷ lệ thuận với hàm lượng ribose, từ đó phản ánh hàm lượng PRP có trong mẫu.

Phương trình phản ứng có thể được biểu diễn tóm tắt như sau:

Ribose \rightarrow (axít, nhiệt) \rightarrow furfural

Furfural + Orcinol \rightarrow phức màu xanh lục

2.4.2. Tóm tắt quy trình thực hiện

Dãy dung dịch chuẩn được chuẩn bị từ dung dịch ribose ở các nồng độ: 2,5 $\mu\text{g/ml}$; 5,0 $\mu\text{g/ml}$; 10,0 $\mu\text{g/ml}$ và 20,0 $\mu\text{g/ml}$.

Lấy 1 ml mẫu thử, mẫu chuẩn PRP, các dung dịch chuẩn cho vào ống nghiệm, bổ sung 5,0 ml dung dịch $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,1% và 0,4 ml dung dịch orcinol 10%. Hỗn hợp được gia nhiệt trong bể ỏn nhiệt (ở 80°C) trong 15 phút, sau đó làm nguội đến nhiệt độ phòng.

Độ hấp thụ của dung dịch được đo bằng phương pháp quang phổ tại bước sóng 670 nm.

2.4.3. Thiết kế nghiên cứu

Phương pháp ribose là phương pháp tiêu chuẩn đã được chuẩn hoá trong Dược điển, do đó nghiên cứu chỉ thẩm định một phần với các tiêu chí sau:

Độ chính xác (precision): bao gồm độ lặp lại (repeatability) và độ chính xác trung gian (intermediate precision).

Độ lặp lại được đánh giá bằng cách bố trí một kỹ thuật viên thực hiện phân tích mẫu thử lặp lại 9 lần trong cùng một ngày, sử dụng cùng thiết bị, dụng cụ và loạt hoá chất. Tiêu chuẩn chấp thuận: giá trị của từng lần phải nằm trong khoảng giá trị trung bình $\pm 2\text{SD}$, và $\% \text{RSD} \leq 7,3\%$ [8-10].

Độ chính xác trung gian được đánh giá bằng cách bố trí hai kỹ thuật viên khác nhau thực hiện phân tích độc lập trên cùng mẫu thử trong 6 ngày khác nhau, sử dụng các bộ micripipet khác nhau và loạt hoá chất khác nhau. Tiêu chuẩn chấp thuận: các giá trị nằm trong khoảng giá trị trung bình $\pm 2\text{SD}$, $\% \text{RSD} \leq 11\%$, và sự khác biệt giữa hai kỹ thuật viên không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$ tại mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$) [8,9,11,12].

Độ đúng (accuracy): được đánh giá bằng cách bố trí một kỹ thuật viên thực hiện phân tích mẫu chuẩn trong 6 ngày khác nhau. Tiêu chuẩn chấp thuận: $t < t_\alpha = 2,015$ [8,9,11,12].

Giới hạn định lượng (LOQ): được xác định theo công thức $LOQ = 10*s/a$, trong đó s là độ lệch chuẩn của hồi quy và a là độ dốc của đường chuẩn. Độ đúng và độ chính xác tại mức LOQ được kiểm tra bằng cách phân tích mẫu thử pha loãng ở nồng độ LOQ trong 6 ngày khác nhau. Tiêu chuẩn chấp thuận: $80\% \leq R \leq 110\%$ (độ đúng) và $RSD\% \leq 16\%$ (độ chính xác) [8-12].

2.5. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu được thiết kế dưới dạng mô tả thực nghiệm trong phòng thí nghiệm nhằm thẩm định phương pháp phân tích định lượng PRP.

Dữ liệu thu được được xử lý bằng phương pháp thống kê mô tả, bao gồm tính giá trị trung bình, độ lệch chuẩn (SD) và độ lệch chuẩn tương đối (RSD%). Kiểm định F-test được sử dụng để so sánh phương sai, trong khi kiểm định t-Student được áp dụng để so sánh giá trị trung bình giữa các nhóm và so sánh giữa giá trị thực nghiệm với giá trị danh định trong đánh giá độ đúng của phương pháp. Các phép kiểm định được thực hiện với mức ý nghĩa thống kê $\alpha = 0,05$.

3. Kết quả

3.1. Độ chính xác

Bảng 1. Kết quả độ lặp lại

Lần thử nghiệm	Hàm lượng PRP ($\mu\text{g/ml}$)
1	17,12
2	17,30
3	16,94
4	16,67
5	17,66
6	16,85
7	17,03
8	17,30
9	16,85
TB	17,08
SD	0,3008
TB+2SD	17,68
TB-2SD	16,48
RSD%	1,76

Bảng 2. Kết quả độ chính xác trung gian

Lần thử nghiệm	Hàm lượng PRP ($\mu\text{g/ml}$)	
	Nhóm 1	Nhóm 2
1	16,77	17,39
2	16,90	16,74

3	17,39	17,22
4	17,04	17,13
5	17,58	17,35
6	16,84	17,80
TB	17,09	17,27
SD	0,3267	0,3478
TB+2SD	17,74	17,97
TB-2SD	16,43	16,58
RSD%	1,91	2,01
TB chung	17,18	
SD chung	0,3359	
TB+2SD chung	17,85	
TB-2SD chung	16,51	
RSD% (2 nhóm)	1,96	

Bảng 3. So sánh phương sai giữa 2 kỹ thuật viên (sử dụng F-test)

F-Test Two-Sample for Variances		
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Mean	17,08666667	17,27166667
Variance	0,106706667	0,120936667
Observations	6	6
df	5	5
F	0,882335107	
P(F<=f) one-tail	0,447043413	
F Critical one-tail	0,1980069	

Bảng 4. So sánh giá trị trung bình giữa 2 kỹ thuật viên (sử dụng t-Test)

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Mean	17,08666667	17,27166667
Variance	0,106706667	0,120936667
Observations	6	6
Hypothesized Mean Difference	0	
df	10	
t Stat	0,949773145	
P(T<=t) one-tail	0,18230826	
t Critical one-tail	1,812461123	

P(T<=t) two-tail	0,36461652	
t Critical two-tail	2,228138852	

Kết quả cho thấy tất cả các giá trị đều nằm trong khoảng giá trị $TB \pm 2SD$, RSD% của cùng kỹ thuật viên thực hiện, cùng loại hoá chất, dụng cụ, thiết bị nhỏ hơn 7,3%, quy trình đạt yêu cầu về độ lặp lại. RSD% của từng kỹ thuật viên (thực hiện trong các ngày khác nhau, khác nhau về loại hóa chất, dụng cụ) và RSD% của 2 kỹ thuật viên đều nhỏ hơn 11%, P two tail > 0,05 tại mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$ tức là độ tin cậy 95% chứng tỏ kết quả giữa 2 kỹ thuật viên không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, quy trình đạt yêu cầu về độ chính xác trung gian.

3.2. Độ đúng

Bảng 5. Kết quả độ đúng thực hiện trên mẫu chuẩn

Lần thử nghiệm	Hàm lượng PRP chuẩn ($\mu\text{g/ml}$)
Lần 1	20,23
Lần 2	19,82
Lần 3	19,92
Lần 4	19,65
Lần 5	19,81
Lần 6	19,22
TB	19,78
SD	0,3332
Xmc	19,616
n	6
TB-Xmc	0,1590
Căn bậc 2 của n	2,449489743
SD/căn bậc 2 n	0,136008578
t	1,169

Kết quả cho thấy giá trị $t = 1,169$ nhỏ hơn giá trị $t_{\alpha} = 2,015$, 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.

3.3. Giới hạn định lượng

Bảng 6. Kết quả LOQ

Lần thử nghiệm	Điểm chuẩn ($\mu\text{g/ml}$)					Slope (a)	Y intercept (SD)
	0	2,5	5,0	10,0	20,0		
1	0,000	0,078	0,151	0,291	0,573	0,0285	0,0025
2	0,000	0,083	0,158	0,303	0,602	0,0299	0,0027

3	0,000	0,080	0,155	0,285	0,583	0,0289	0,0044
4	0,000	0,072	0,147	0,266	0,568	0,0282	0,0066
5	0,000	0,078	0,168	0,295	0,594	0,0294	0,0064
6	0,000	0,075	0,157	0,302	0,576	0,0288	0,0052
7	0,000	0,087	0,169	0,311	0,593	0,0293	0,0067
8	0,000	0,079	0,158	0,294	0,602	0,0299	0,0038
9	0,000	0,074	0,161	0,299	0,572	0,0285	0,0062
10	0,000	0,073	0,154	0,295	0,576	0,0288	0,0035
11	0,000	0,072	0,157	0,271	0,565	0,0280	0,0071
12	0,000	0,081	0,165	0,321	0,623	0,0311	0,0036
Trung bình						0,0291	0,0049
LOQ (µg/ml) = 10 * s/a = 1,68 (µg/ml)							

Bảng 7. Kết quả độ đúng và độ chính xác tại LOQ

Lần thử nghiệm	Kết quả hàm lượng PRP (µg/ml) trong mẫu Quimi-Hib pha loãng tại nồng độ LOQ	
	Hàm lượng (µg/ml)	Độ thu hồi (R%)
1	1,57	93,73
2	1,80	107,39
3	1,47	87,49
4	1,54	91,50
5	1,75	104,35
6	1,45	86,17
TB	1,60	
SD	0,1482	
TB+2SD	1,89	
TB-2SD	1,30	
RSD%	9,28	

Kết quả hàm lượng PRP kiểm tra tại nồng độ LOQ đều nằm trong khoảng giá trị TB±2SD. Độ chính xác trung gian tại nồng độ LOQ bằng 9,28 % và nhỏ hơn 16%. Độ thu hồi trong 6 lần thực hiện tại nồng độ LOQ đều nằm trong khoảng 80-110%. Quy trình đạt yêu cầu về độ đúng và độ chính xác tại LOQ = 1,68 µg/ml.

4. Bàn luận

Trong nghiên cứu này, quy trình xác định hàm lượng PRP tổng số trong vắc xin Hib đơn bằng phương pháp ribose đã được thẩm định một phần theo yêu cầu của ISO/IEC 17025:2017, phù hợp với bản chất của phương pháp đã được quy định trong Dược điển. Các thông số thẩm định bao gồm độ chính xác, độ đúng, và giới hạn định lượng đều đạt tiêu chuẩn chấp thuận theo AOAC và các tài liệu tham khảo liên quan, cho thấy quy trình có độ tin cậy cao khi áp dụng trong điều kiện thực tế của phòng thí nghiệm kiểm định.

Kết quả đánh giá độ chính xác cho thấy phương pháp có độ lặp lại và độ chính xác trung gian rất tốt. Ở điều kiện độ lặp lại, RSD% thu được là 1,76%, thấp hơn đáng kể so với giới hạn cho phép ($\leq 7,3\%$), chứng tỏ phương pháp có độ ổn định cao khi thực hiện trong cùng điều kiện phân tích. Điều này phản ánh sự kiểm soát tốt các yếu tố ảnh hưởng như thao tác pipet, điều kiện phản ứng màu ribose–orcinol, thời gian ủ nhiệt và độ ổn định của thiết bị đo quang. Đối với độ chính xác trung gian, kết quả cho thấy giá trị hàm lượng PRP thu được giữa các kỹ thuật viên phân tích có sự phân bố tương đối đồng đều, với độ biến thiên nằm trong giới hạn chấp nhận. Giá trị RSD% của các kỹ thuật viên đều đáp ứng yêu cầu (nhỏ hơn 11%), chứng tỏ phương pháp có độ chính xác trung gian tốt. Kết quả kiểm định thống kê bằng t-test cho thấy sự khác biệt giữa các giá trị trung bình không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Những kết quả này cho thấy phương pháp Ribose duy trì được độ tin cậy của kết quả phân tích khi có sự thay đổi về ngày phân tích, người thực hiện và loạt hoá chất. Đây là yếu tố đặc biệt quan trọng đối với các phòng kiểm định, bởi việc phân tích thường được tiến hành trong thời gian dài và bởi nhiều kỹ thuật viên khác nhau.

Độ đúng của phương pháp được đánh giá thông qua việc phân tích mẫu chuẩn quốc tế WHO 2nd International Standard. Giá trị trung bình thu được (19,78 $\mu\text{g/ml}$) rất gần với giá trị chứng nhận của mẫu chuẩn (19,616 $\mu\text{g/ml}$), và kiểm định thống kê t-test cho thấy sự sai khác này không có ý nghĩa thống kê ở mức tin cậy 95%. Kết quả này khẳng định phương pháp ribose có khả năng phản ánh chính xác hàm lượng PRP trong mẫu, đồng thời cho thấy quy trình chuẩn bị mẫu, pha loãng và đo quang không gây ra sai lệch hệ thống đáng kể. Việc đạt được độ đúng khi so sánh với chuẩn quốc tế là cơ sở quan trọng để khẳng định tính phù hợp của phương pháp trong kiểm soát chất lượng vắc xin Hib.

Giới hạn định lượng của phương pháp được xác định là 1,68 $\mu\text{g/ml}$. Tại nồng độ này, phương pháp vẫn đáp ứng yêu cầu về độ đúng với độ thu hồi nằm trong khoảng 80–110% và độ chính xác với RSD% nhỏ hơn 16%. Điều này cho thấy phương pháp ribose đủ nhạy để định

lượng PRP ở nồng độ thấp, đáp ứng yêu cầu kiểm soát chất lượng vắc xin Hib. Mặc dù giới hạn định lượng của phương pháp ribose cao hơn so với giá trị được báo cáo đối với phương pháp sắc ký trao đổi ion trong nghiên cứu chúng tôi đã thực hiện trước đó (LOQ đạt 0,066 $\mu\text{g/ml}$ [13]), song ưu điểm về quy trình đơn giản, chi phí thấp và khả năng triển khai dễ dàng khiến phương pháp này vẫn rất phù hợp cho mục đích kiểm nghiệm thường quy.

Nhìn chung, phương pháp ribose là phương pháp hóa học cổ điển đã được quy định trong Dược điển, tuy nhiên kết quả nghiên cứu cho thấy khi được thẩm định và kiểm soát chặt chẽ theo yêu cầu của ISO/IEC 17025, phương pháp vẫn cho kết quả đáng tin cậy trong điều kiện thực tế của phòng thí nghiệm kiểm định. Phương pháp có thể được sử dụng như một công cụ hiệu quả trong kiểm tra công hiệu vắc xin Hib, đồng thời có thể đóng vai trò bổ trợ hoặc đối chiếu với các phương pháp khác như phosphorus hoặc sắc ký trao đổi ion.

Tuy nhiên, nghiên cứu này mới chỉ được thực hiện trên vắc xin Hib đơn và chưa đánh giá ảnh hưởng của các tá dược hấp phụ hoặc nền vắc xin phối hợp phức tạp. Do đó, các nghiên cứu tiếp theo có thể được mở rộng nhằm thẩm định phương pháp trên các dạng vắc xin phối hợp và so sánh trực tiếp với các phương pháp sắc ký hiện đại, từ đó hoàn thiện hơn cơ sở khoa học cho việc áp dụng phương pháp ribose trong kiểm soát chất lượng vắc xin.

5. Kết luận

Nghiên cứu đã thực hiện thẩm định một phần phương pháp Ribose dùng để định lượng polyribosylribitol phosphate (PRP) trong vắc xin Hib đơn theo hướng dẫn của Dược điển. Các kết quả cho thấy phương pháp có độ lặp lại và độ chính xác trung gian đạt yêu cầu, đồng thời thể hiện sự ổn định trước các thay đổi nhỏ trong điều kiện phân tích. Giới hạn định lượng của phương pháp được xác định là 1,68 $\mu\text{g/mL}$, đáp ứng yêu cầu cho mục đích kiểm nghiệm thường quy vắc xin Hib đơn. Trên cơ sở các kết quả thu được, phương pháp Ribose được đánh giá là phù hợp để áp dụng trong thực hành kiểm định chất lượng vắc xin Hib đơn, góp phần bảo đảm độ tin cậy của kết quả phân tích và phục vụ công tác quản lý chất lượng vắc xin.

Tài liệu tham khảo

[1] World Health Organization. *Haemophilus influenzae* type b (Hib) [Internet]. Geneva: WHO; 2023 [cited 2023 Dec 12]. Available from: <https://www.who.int/teams/health-product-policy-and-standards/standards-and-specifications/vaccine-standardization/hib>

- [2] World Health Organization. Annex 1: Recommendations for the production and control of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. *WHO Technical Report Series*, No. 897. Geneva: WHO; 2000.
- [3] European Pharmacopoeia Commission. Diphtheria, tetanus, pertussis (acellular, component), hepatitis B (rDNA), poliomyelitis (inactivated) and *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine (adsorbed). *European Pharmacopoeia*. 11th ed. Vol 1, Monograph 01/2008. Strasbourg: EDQM; 2023.
- [4] Bộ Y tế. 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). *Dược điển Việt Nam V*. Tập 2. Hà Nội: Nhà xuất bản y học; 2017.tr.1007-1013.
- [5] European Pharmacopoeia Commission. Ribose in polysaccharide vaccines. *European Pharmacopoeia*. 11th ed. Chapter 2.5.31. Strasbourg: EDQM; 2023. tr. 765-768.
- [6] Bộ Y tế. Xác định hàm lượng saccharide tổng số bằng phương pháp Orcinol. *Dược điển Việt Nam V*. Tập 2, Phụ lục 15.42. Hà Nội: Nhà xuất bản Y học; 2017. Tr. PL-397.
- [7] International Organization for Standardization. *ISO/IEC 17025:2017: General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*. Geneva: ISO; 2017.
- [8] European Medicines Agency. *Validation of Analytical Procedures – Text and Methodology* (CPMP/ICH/381/95). ICH Q2(R1). London: EMA; 1995.
- [9] Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế, Bộ Y tế. SOP KĐQG-34: *Quy trình chuẩn thẩm định quy trình*. Lần ban hành 7. Hà Nội: Bộ Y tế; 2017.
- [10] AOAC International. Guidelines for Standard Method Performance Requirements. In: *Official Methods of Analysis*. Appendix F. Rockville: AOAC; 2016.
- [11] Trần Cao Sơn. *Thẩm định phương pháp trong phân tích hóa học và vi sinh*. Hà Nội: Nhà xuất bản Khoa học kỹ thuật; 2010.
- [12] Tạ Thị Thảo. *Thống kê trong Hóa phân tích*. Hà Nội: Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội; 2006.
- [13] Cảnh Huyền Trang, Đường Thị Cẩm Lệ, Đàm Thị Liễu, Phạm Quang Minh, Nguyễn Quyết Thắng, Bùi Thanh Tùng. 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. *Tạp chí Khoa học Kiểm định Vắc xin và Sinh phẩm y tế*. 2023; 3(4):75–86