

Bạc nitrat thừa sẽ được chuẩn độ bằng dung dịch amoni sulfocyanid với chỉ thị màu phen sắt amoni.

Protein trong mẫu thử được oxy hóa bằng kali permanganat trong môi trường acid trước khi tiến hành định lượng natri clorid.

Phương pháp tiến hành

Hút chính xác một thể tích (V ml) mẫu thử tương ứng với khoảng 0,2 mg hoạt chất cho vào một bình nón dung tích 50 ml.

Thêm 5 ml *dung dịch bạc nitrat 0,01 N*.

Thêm 1 ml *acid nitric đậm đặc (TT)*.

Thận trọng đun trên bếp cho đến khi sôi.

Thêm từng giọt *dung dịch bão hòa kali permanganat* cho đến khi có màu tím.

Tiếp tục đun sôi trong 5 min.

Thêm một ít đường glucose bột để khử màu.

Trên đáy bình xuất hiện tủa trắng như bông.

Làm nguội.

Thêm 0,5 ml *dung dịch phen sắt amoni bão hòa*.

Chuẩn độ bằng *dung dịch amoni sulfocyanid 0,01 N (CĐ)* cho đến khi có màu hồng.

Song song tiến hành làm mẫu trắng (thay mẫu thử bằng nước cất).

Lượng natri clorid có trong mẫu thử tính bằng mg % theo công thức:

$$X = \frac{(A - B) \times K \times 0,585 \times 100}{V}$$

Trong đó:

A là thể tích *dung dịch amoni sulfocyanid 0,01 N (CĐ)* dùng để chuẩn độ mẫu trắng (ml);

B là thể tích *dung dịch amoni sulfocyanid 0,01 N (CĐ)* dùng để chuẩn độ mẫu thử (ml);

K là hệ số điều chỉnh của *dung dịch amoni sulfocyanid 0,01 N*; 0,585 là lượng natri clorid tương ứng với 1 ml *dung dịch amoni sulfocyanid 0,01 N (mg)*;

V là số ml *dung dịch* mẫu thử đem kiểm tra;

100 là hệ số để chuyển thành %.

15.27 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG NHÔM (Al⁺⁺⁺) TRONG VẮC XIN VÀ SINH PHẨM

Phương pháp 1

Nguyên lý:

Phương pháp dựa trên phản ứng tạo thành phức chất của một lượng thừa *dung dịch muối natri của acid ethylen diamin tetra acetic (EDTA)* với ion nhôm (Al⁺⁺⁺) và sau đó chuẩn độ lượng thừa EDTA bằng *dung dịch đồng sulfat 0,01 M*.

Phương pháp tiến hành:

Lấy 1 ml *acid sulfuric (TT)*, 6 giọt *acid nitric (TT)* và 3 ml mẫu thử cho vào bình nón đun nóng cho đến khi thấy khói trắng dày đặc thoát ra.

Tiếp tục đun nóng và cho thêm vài giọt *acid nitric (TT)*

cho đến khi *dung dịch* trong bình mất màu. Để nguội bình. Thận trọng thêm 10 ml *nước cất*. Nếu *dung dịch* còn đục, đun tiếp cho đến khi trong.

Thêm *dung dịch natri hydroxyd 50 %* vào bình cho đến khi *dung dịch* có màu đỏ vàng [*dùng dung dịch da cam methyl (TT)* làm chất chỉ thị].

Nếu *dung dịch* đục, hòa tan tủa bằng cách thêm *dung dịch acid sulfuric 1 M*, cho thêm chính xác vào bình 25 ml *dung dịch dinatri diethylen diamin tetraacetat 0,01 M (CĐ)* và 10 ml *dung dịch đệm acetat pH 4,4* [có chứa 68 g *natri acetat (TT)*; 38,5 g *amoni acetat (TT)*; 125 ml *acid acetic (TT)* và *nước* vừa đủ 500 ml]. Đun sôi nhẹ trong 3 min.

Thêm 1 ml *dung dịch chỉ thị màu pyridylazonaphтол 0,1 % trong ethanol 95 %*. Khi còn nóng chuẩn độ ngay *dung dịch dinatri diethylen diamin tetraacetat* thừa bằng *dung dịch đồng sulfat 0,01 M (CĐ)* cho đến khi xuất hiện màu nâu tía, ta được A ml *dung dịch đồng sulfat 0,01 M*. Song song tiến hành làm mẫu trắng (thay mẫu thử bằng nước cất) được B ml *dung dịch đồng sulfat 0,01 M*.

1,0 ml *dung dịch dinatri diethylen diamin tetraacetat 0,01 M (CĐ)* tương đương với 0,2698 mg Al⁺⁺⁺.

Lượng nhôm X (Al⁺⁺⁺ mg/ml) trong mẫu thử được tính theo công thức sau:

$$X = \frac{B - A}{\text{Thể tích mẫu thử}} \times 0,2689$$

Phương pháp 2

Nguyên lý:

Hàm lượng nhôm (Al⁺⁺⁺) có trong mẫu thử được xác định bằng cách so màu do phản ứng của nhôm với stilbazo. Nhôm hydroxyd có trong mẫu thử dưới tác dụng của acid nitric và nhiệt độ chuyển thành Al⁺⁺⁺.

Phương pháp tiến hành:

Trước khi kiểm tra, mẫu thử được lắc đều thành hỗn dịch đồng nhất. Thêm 0,2 ml *acid nitric (TT)* vào 1 ml mẫu thử. Đun sôi cách thủy trong khoảng 1 h. Pha loãng bằng *nước cất* đến nồng độ thích hợp (thường pha loãng 25 và 50 lần). Lấy 1 ml mẫu thử vào bình nón, thêm *nước cất* vừa đủ 5 ml. Thêm 10 ml *dung dịch đệm acetat (pH = 5,55 - 5,75)*, 5 ml *dung dịch stilbazo*, 5 ml *nước cất*. Để ở nhiệt độ phòng 20 min, đo quang ở bước sóng 510 nm.

Song song tiến hành dựng đường chuẩn với các *dung dịch nhôm chuẩn* 2, 4, 6, 8, 10 µg/ml, tương đương với 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml nhôm chuẩn 2 µg/ml. Dựa vào đường chuẩn tính ra hàm lượng nhôm có trong mẫu thử.

Song song tiến hành làm mẫu trắng: Thay mẫu thử bằng 1 ml *nước cất*.

Cách pha *dung dịch nhôm chuẩn 0,1 %*: Cân chính xác 0,895 g *nhôm clorid (AlCl₃.6H₂O)* hòa tan vào 100 ml *nước cất* 2 lần. Trước khi dùng pha loãng *dung dịch nhôm chuẩn 0,1 %* 500 lần bằng *nước cất*, thu được *dung dịch nhôm chuẩn 2 microgam/ml*.

Cách pha *dung dịch stilbazo 0,035 %*: Hòa tan 0,035 g *stilbazo* trong vừa đủ 100 ml *nước cất*. Lọc qua giấy lọc.

Dung dịch bảo quản ở nhiệt độ 2 °C đến 8 °C sử dụng được trong 1 tuần.

Cách pha dung dịch đệm acetat (pH = 5,55 - 5,75):

Dung dịch A: Hòa tan 69,05 g *natri acetat* (TT) vào 500 ml *nước cất*.

Dung dịch B: Hòa 5,72 ml *acid acetic* (TT) trong vừa đủ 100 ml *nước cất*.

Trộn dung dịch A vào dung dịch B theo tỷ lệ 9 : 1. Đo pH.

Tiêu chuẩn chấp thuận

Hàm lượng Al^{+++} trong vắc xin không được vượt quá 1,25 mg Al^{+++} /liều tiêm cho người.

15.28 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG PHENOL TRONG VẮC XIN VÀ SINH PHẨM

Phương pháp 1

Nguyên lý

Phương pháp dựa vào phản ứng tạo màu của thuốc thử Folin với phenol.

Phương pháp tiến hành

Vắc xin mẫu thử được ly tâm với vận tốc 3000 rpm trong 15 min. Bỏ cặn, lấy 1 ml phần nước ở phía trên cho vào bình định mức 100 ml và cho *nước cất* vừa đủ 100 ml, lắc đều.

Lấy 0,5 ml dung dịch trên, thêm 9 ml *nước cất*, 0,5 ml *thuốc thử Folin* (TT) pha loãng 2 lần, 2 ml *dung dịch natri carbonat* 20 % (TT). Lắc đều. Đun cách thủy cho sôi trong 1 min. Làm nguội ở nhiệt độ phòng.

Song song tiến hành xây dựng đường chuẩn.

Cách dựng đường chuẩn:

Hút *dung dịch phenol chuẩn* 1 : 1000 (TT) vào các ống nghiệm với lượng như sau: 0,1 ml; 0,2 ml; 0,3 ml; 0,4 ml; 0,5 ml; 0,6 ml; 0,7 ml; 0,8 ml; 0,9 ml; 1,0 ml. Thêm vào các ống nghiệm trên mỗi ống một lượng *nước cất* vừa đủ 9,5 ml; 0,5 ml *thuốc thử Folin* pha loãng 2 lần; 2 ml *dung dịch natri carbonat* 20 % (TT). Lắc đều. Đun cách thủy cho sôi trong 1 min. Làm nguội ở nhiệt độ phòng.

Song song tiến hành làm mẫu trắng (dùng *nước cất* thay cho mẫu vắc xin thử nghiệm).

Đem so màu trên máy quang phổ với bước sóng 310 nm (cả với mẫu thử và mẫu chuẩn).

Cách tính kết quả:

$$X = \frac{a \times 2 \times 100 \times 100}{1.000.000} (\%)$$

Trong đó:

X là hàm lượng phenol có trong mẫu thử (%);

$a \times 2$ là hàm lượng phenol có trong 1 ml mẫu đã pha loãng tìm được trên đường chuẩn;

100 là độ pha loãng của mẫu thử.

Tiêu chuẩn chấp thuận:

Hàm lượng phenol trong vắc xin thành phẩm nói chung không được vượt quá 0,12 g/L, trừ những quy định cụ thể khác. Theo nguyên tắc chung, hàm lượng phenol trong vắc xin thành phẩm không được thấp hơn so với hàm lượng cho thấy có khả năng kháng khuẩn và không được cao hơn 115 % hàm lượng đăng ký trên nhãn.

Pha dung dịch phenol chuẩn:

Cân chính xác 1 g *phenol* (TT) hòa tan trong vừa đủ 100 ml *nước cất*. Trước khi dùng pha loãng 1000 lần bằng *nước cất*.

Pha dung dịch *natri carbonat* 20 %.

Cân 20 g *natri carbonat* (TT) hòa tan trong vừa đủ 100 ml *nước cất*. Lọc vào chai đựng.

Phương pháp 2

Mẫu thử được trộn đều để làm thử nghiệm. Pha loãng mẫu thử bằng *nước cất* (nếu cần thiết) để có nồng độ phenol khoảng 15 µg/ml.

Chuẩn bị mẫu phenol chuẩn theo các nồng độ 5 µg; 10 µg; 15 µg; 20 µg và 30 µg/ml.

Lấy 5 ml các dung dịch mẫu thử và mẫu chuẩn vào ống nghiệm, thêm 5 ml *dung dịch đệm borat pH 9,0*; 5 ml *dung dịch aminopyrazolon* và 5 ml *dung dịch kali fericyanid*. Lắc đều, để yên 10 min, đo độ hấp thụ (Phụ lục 4.1) ở bước sóng 546 nm. Dựa vào đường chuẩn để tính ra hàm lượng phenol có trong mẫu thử.

Cách pha dung dịch đệm borat pH 9,0:

Dung dịch A: Hòa tan 6,18 g *acid boric* (TT) trong vừa đủ 1000 ml *dung dịch kali clorid* 0,1 M.

Dung dịch B: *Dung dịch natri hydroxyd* 0,1 M (TT).

Trộn 1000 ml dung dịch A với 420 ml dung dịch B thu được dung dịch đệm pH 9,0.

Cách pha dung dịch aminopyrazolon:

Hòa tan 1 g 4-aminophenazon trong vừa đủ 100 ml dung dịch đệm borat pH 9,0.

15.29 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG THIMEROSAL TRONG VẮC XIN VÀ SINH PHẨM

Có nhiều phương pháp để xác định hàm lượng thimerosal trong vắc xin và sinh phẩm. Tùy theo khả năng hiện có về thiết bị và hóa chất tại cơ sở để chọn 1 trong 2 phương pháp thử nghiệm sau đây: Phương pháp hóa lý và phương pháp vi sinh vật.

Phương pháp hóa lý

Nguyên lý:

Dựa vào phản ứng giải phóng ion thủy ngân tự do từ thimerosal, kết hợp với dithizon thành dithizon-thủy ngân, xác định bằng cách đo quang.

Cách tiến hành:

Làm song song 2 mẫu (mẫu vắc xin thử và mẫu chứng *nước cất*), lấy 0,2 ml mỗi mẫu cho vào từng bình nút mài riêng biệt có dung tích 100 ml.

Cho vào mỗi bình 1,2 ml *acid sulfuric* (TT) đã pha loãng 2