

Xác định hàm lượng protein toàn phần trong các sinh phẩm bằng phương pháp biuret

Determination of total protein content in biologicals using biuret method

Cánh Huyền Trang*, Đường Thị Cẩm Lê,
Đàm Thị Liễu, Phạm Quang Minh.

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

Canh Huyen Trang*, Duong Thi Cam Le,
Dam Thi Lieu, Pham Quang Minh.

National Institute for Control of Vaccines and Biologicals

TÓM TẮT

Biuret là một trong những phương pháp định lượng protein có nhiều ưu điểm: nhanh chóng, đơn giản, chính xác, phù hợp với các mẫu có hàm lượng protein và độ tinh khiết cao. Nhằm chuyển đổi phương pháp xác định hàm lượng protein toàn phần trong các sinh phẩm có hàm lượng protein cao từ phương pháp Lowry sang phương pháp Biuret, từ tháng 4 đến tháng 12 năm 2018, tại Khoa Hóa lý – Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu thực nghiệm trong phòng thí nghiệm, với mục đích đánh giá sự phù hợp của quy trình xác định hàm lượng protein toàn phần bằng phương pháp Biuret trên 2 mẫu sinh phẩm IV Globulin và SAR với độ đúng, độ chính xác, độ mạnh, độ đặc hiệu, tính tuyến tính đạt yêu cầu, có giới hạn định lượng LOQ = 0,613 mg; và đánh giá độ không đảm bảo đo (U) của phương pháp theo yêu cầu của ISO/IEC 17025:2017, kết quả đánh giá đối với mẫu IV Globulin: $U = 1,78$ mg và đối với mẫu SAR: $U = 1,85$ mg.

Từ khóa: *biuret, protein toàn phần, sinh phẩm.*

ABSTRACT

Biuret is one of the methods of protein quantification with many advantages: fast, simple, accurate, suitable for samples with high protein content and purity. In order to convert the method of determining total protein content in biological products with high protein content from Lowry to Biuret method, from April to December 2018, at the Department of Physical Chemical – National Institute for Control of Vaccine and Biologicals, we have conducted an experimental laboratory research methods to evaluate the suitability of the procedure for determining total protein content by Biuret method on two biologicals: IV Globulin and SAR with satisfactory accuracy, precision, robustness, specificity, linearity, limit of quantification LOQ = 0,613 mg; and evaluate the uncertainty (U) of method as required by ISO/IEC 17025:2017, the uncertainty of the IV Globulin sample is 1.78 mg and the SAR sample is 1.85 mg.

Key words: *biuret, total protein, biologicals.*

*Tác giả: Cánh Huyền Trang
ĐC: Số 1 Nghiêm Xuân Yên, Đại Kim, Hoàng Mai, Hà Nội
Điện thoại: 0984001848
Email: canhhuyentrang@gmail.com

*Corresponding Investigator: Canh Huyen Trang
Address: No. 1 Nghiem Xuan Yem, Dai Kim,
Hoang Mai, Ha Noi
Phone: 0984001848

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hàm lượng protein toàn phần có trong các sinh phẩm là một trong những chỉ tiêu quan trọng để đánh giá chất lượng của các sinh phẩm đó. Hiện nay, hầu hết các nhà sản xuất trong nước và nước ngoài sử dụng 2 phương pháp là Kjeldahl và Biuret để xác định hàm lượng protein toàn phần trong các sinh phẩm, trong đó phương pháp Kjeldahl mặc dù có ưu điểm chính xác, không bị ảnh hưởng bởi các yếu tố như hàm lượng axit amin, chất lượng và nguồn protein, tuy nhiên lại sử dụng hóa chất độc hại và thời gian tiến hành tương đối dài (khoảng 5-10 tiếng). Phương pháp Biuret nổi lên với ưu điểm vượt trội hơn cả: thời gian tiến hành nhanh (khoảng 2 tiếng), đơn giản, có ít hợp chất phi protein gây ảnh hưởng đến phản ứng biuret, không sử dụng hóa chất độc hại, khoảng làm việc của phương pháp phù hợp với các mẫu có hàm lượng protein cao (cần từ 2-4 mg protein cho một phản ứng biuret), do đó mẫu không cần pha loãng hoặc pha loãng mẫu với tỷ lệ pha loãng thấp, giảm thiểu được sai số cho kết quả phân tích.

Trước đây, NICVB sử dụng phương pháp Lowry để xác định hàm lượng protein toàn phần trong sinh phẩm, tuy nhiên phương pháp này còn nhiều hạn chế đối với các mẫu có hàm lượng protein cao. Do đó, chúng tôi nghiên cứu chuyển đổi phương pháp từ Lowry sang Biuret trên đối tượng sinh phẩm có hàm lượng protein từ 2 mg trở lên, quy trình được xây dựng tham khảo Dược Điển Việt Nam V, Dược Điển Châu Âu. Nhằm đánh giá sự phù hợp của phương pháp Biuret trên đối tượng mẫu sinh phẩm có hàm lượng protein cao và để đáp ứng theo yêu cầu của ISO/IEC 17025:2017, mục 7.6.3 “Phòng thí nghiệm tiến hành thử nghiệm phải đánh giá độ không đảm bảo đo” đối với các phương pháp thử nghiệm, chúng tôi thực hiện nghiên cứu: “Nghiên cứu áp dụng quy trình xác định hàm lượng protein toàn phần trong các sinh phẩm bằng phương pháp Biuret” với các mục tiêu cụ thể sau:

Xác định sự phù hợp của quy trình xác định hàm lượng protein toàn phần trong các sinh phẩm bằng phương pháp Biuret bằng cách xác định độ đúng, độ chính xác, độ mạnh, độ đặc hiệu, tính tuyến tính

I. INTRODUCTION

Total protein content in biologicals is one of the important specific to evaluate the quantitative of these products. At present, all of the domestic and foreign manufactures are using Kjeldahl and Biuret to determine the total protein concentration in biologicals. Even though Kjeldahl is an accurate method, unaffected by these factors such as amino acid concentration, quality, and protein source. However, this method uses harmful reagents and takes a long time to experiment (approximately 5-10 hours). Therefore, Biuret method rose as an advantageous method for the reasons: faster (approximate 2 hours), easier, few non-protein compounds interfere with biuret reaction, non-harmful reagents, and suitable for the sample with a high range of protein concentration (2-4 mg for one reaction). Therefore, the sample does not require dilution or decrease dilution factor, reducing the errors of the result.

In the past, at the National Institute for Control of Vaccine and Biologicals (NICVB) used the Lowry method to determine the total protein content in biologicals. But this method still has many disadvantages with high concentrate protein samples. Therefore, we study to shift from the Lowry to the Biuret method for biologicals which have the protein concentration higher than 2 mg, the procedure is developed based on the Vietnam Pharmacopoeia V, European Pharmacopoeia. To evaluate the suitability of the Biuret method in biologicals which have a high concentrate of the protein and to adapt to ISO/IEC 17025:2017 requirement for testing methods, section 7.6.3 “A laboratory performing testing shall evaluate measurement uncertainty”. Our study “Determination of total protein content in biologicals using biuret method” aim at:

Determine the relevance of the procedure “determine the total protein concentrate inside of biologicals by Biuret method” by identifying the accuracy, precision, robustness, specificity, linearity, and the limit of quantitation of the procedure.

và giới hạn định lượng của quy trình.

Đánh giá độ không đảm bảo đo cho phương pháp xác định hàm lượng protein toàn phần trong các sinh phẩm bằng phương pháp Biuret đối với 2 sinh phẩm IV Globulin và SAR.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu: IV Globulin (sinh phẩm chứa globulin miễn dịch có nguồn gốc từ người) và SAR (sinh phẩm chứa globulin miễn dịch có nguồn gốc từ động vật).

2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu: Khoa Kiểm định Hóa lý, từ tháng 6/2017 đến tháng 12/2018

2.3. Vật liệu phục vụ nghiên cứu

2.3.1. Mẫu thử

- Sinh phẩm IV Globulin, nhà sản xuất GC Pharma, đại diện cho nhóm sinh phẩm có thành phần là các globulin miễn dịch có nguồn gốc từ người, loạt số: 352C17006, hạn dùng: 05/09/2019 và loạt số 352A16262, hạn dùng: 26/11/2018.

- Huyết thanh kháng dại tinh chế SAR, nhà sản xuất Viện Vắc xin và Sinh phẩm y tế (IVAC), đại diện cho nhóm sinh phẩm có thành phần là các globulin miễn dịch có nguồn gốc từ động vật, loạt số: 092-00-18, hạn dùng: 20/10/2019; loạt số 084-00-17, hạn dùng: 14/12/2018; loạt số: 085-00-17, hạn dùng: 05/01/2019

2.3.2. Thiết bị và dụng cụ

Cân phân tích Mettler Toledo, máy đo quang phổ Jasco, máy lắc Labnet, micropipet các loại (đã được hiệu chuẩn theo ISO/IEC 17025).

2.3.3. Hóa chất

Hóa chất tinh khiết dùng cho phân tích bao gồm:

Evaluate the uncertainty of the method for the two biologicals IV Globulin and SAR.

II. METHOD

2.1 Objectives

IV Globulin- Biology product contain immunoglobulin from Human

SAR- Biologicals contain immunoglobulin from animal

2.2 Plan of Implementation

The research is performed at the Department of Physical Chemistry, National Institute for Control of Vaccine and Biologicals, from 6/2017 to 12/2018.

2.3 Materials

2.3.1 Sample

The IV Globulin sample, manufactured GC Pharma, represent for a group of biologicals containing immunoglobulin from human, Lot number: 352C17006, Expiry date: 05/09/2019 and Lot number: 352A16262, Expiry date: 26/11/2018.

The Rabies immune globulin SAR, manufactured Institute of Vaccines and Medical Biologicals (IVAC), represent for a group of biology product containing immunoglobulin from animal, Lot number: 092-00-18, Expiry date: 20/10/2019; Lot number 084-00-17, Expiry date: 14/12/2018; Lot number: 085-00-17, Expiry date: 05/01/2019.

2.3.3 Equipment

Analytical balances: Mettler-Toledo, spectrometer-Jasco, shaker-Labnet, micro pipets (validated follow ISO/IEC 17025)

2.3.3 Reagent

Chemicals for analysis include:

Tên hóa chất	Name	Hãng	Manufacture	Code
Albumin fraction V		Merck		112018
Sodium chloride		Merck		106404
Coopersulfate pentahydrate		Merck		102790
Potassium sodium tartrate tetrahydrate		Merck		108087
Potassium iodide		Merck		105043
Sodium hydroxide		Merck		106498

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

2.4.1. Quy trình thử nghiệm thử nghiệm xác định hàm lượng protein toàn phần bằng phương pháp Biuret

a/Mẫu thử

Lấy lượng mẫu theo các thể tích sau cho vào các tuýp thủy tinh tương ứng: 0,1 ml SAR; 0,1 ml SAR thêm chuẩn; 0,1 ml IV Globulin và 0,1 ml IV Globulin thêm chuẩn (Các mẫu lặp lại 2 lần để lấy giá trị trung bình)

b/ Đường chuẩn

- Cho lần lượt dung dịch BSA 10 mg/ml vào các tuýp thủy tinh theo các thể tích sau: 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 và 1 ml.

c/ Các bước chung tiếp theo

- Thêm dung dịch NaCl 0,9% vào các tuýp để được dung dịch có thể tích 1 ml.

- Thêm 4 ml dung dịch biuret vào các tuýp.

- Lắc đều, giữ ở nhiệt độ phòng 30 phút, đo quang ở bước sóng 545 nm.

2.4.2. Thiết kế nghiên cứu

2.4.2.1. Xác định sự phù hợp của quy trình thử nghiệm xác định hàm lượng protein toàn phần trong các sinh phẩm bằng phương pháp Biuret

a/ Xác định độ đúng

Độ đúng của phương pháp được tiến hành theo phương pháp thêm chuẩn vào mẫu thử tại nồng độ của mẫu thử theo tỷ lệ 1:1

Chuẩn bị mẫu thêm chuẩn: Thêm dung dịch BSA 50 mg/ml vào mẫu IV Globulin theo tỷ lệ 1:1 và thêm dung dịch BSA 40 mg/ml vào mẫu SAR theo tỷ lệ 1:1

Bố trí 1 nhóm thực hiện thử nghiệm 7 lần trong 7 ngày trên mẫu thử và mẫu thử thêm chuẩn theo quy trình ở mục 2.4.1, tính hàm lượng protein thu được, % độ thu hồi.

Tiêu chuẩn cho độ thu hồi (tính theo %) theo AOAC:

+ 97% ≤ R ≤ 103% đối với các chất có nồng độ 1% - 10% [3]

b/ Xác định độ chính xác

Bố trí 3 nhóm tiến hành định lượng protein trên

2.4 Method

2.4.1 Procedure to determine concentrate of total protein by Biuret method.

a/ Sample

Add 0,1 ml SAR; 0,1 ml SAR added spike sample; 0,1 ml IV Globulin and 0,1 ml IV Globulin added spike sample in each glass tube (repeat two times for each sample to get the mean value).

b/ Calibration curve

Take 6 clean and dry glass tube, add 0 ml; 0,2 ml; 0,4 ml; 0,6 ml; 0,8ml and 1 ml of BSA solution (10 mg/ml) in each tube.

c/ General steps

- Add NaCl 0,9 % solution into the tubes to reach 1ml final volume.

- Add 4 ml Biuret solution into the tubes.

- Shake and stay at room temperature in 30 minutes, OD measurement at a wavelength $\lambda=545$ nm.

2.4.2 Research outline

2.4.2.1 Identify the suitability of procedure for determination total protein in biologicals by Biuret method.

a/ Accuracy

The accuracy of the method was performed by adding spike sample into the sample (1:1)

Prepare the spike sample: add BSA 50 mg/ml solution into IV Globulin sample (1:1), add BSA 40mg/ml solution into SAR (1:1).

The same team will carry 7 experiments in 7 days on the sample and the spiked sample follow the procedure at 2.4.1, calculating the amount of protein contained, % of the recovery.

Standard for the recovery (%) by AOAC:

+97% ≤ R ≤ 103% for the analytes concentration from 1% - 10 %

b/ Precision

Setup 3 groups to carry the experiment, each group repeat 7 times (in one day) with same chemicals, distilled water, instruments. Calculate protein concentrate inside of sample, the relative standard deviation RSD (%).

Equation: $RSD (\%) = SD / \bar{X} \times 100$

mẫu thử, mỗi nhóm lặp lại 7 lần (trong 1 ngày) cùng loại hóa chất, nước cất, trang thiết bị. Tính hàm lượng protein trong mẫu thử, hệ số biến thiên RSD (%).

Công thức tính: $RSD (\%) = SD / \bar{X} \times 100$

Trong đó: + SD: độ lệch chuẩn tương đối của mẫu thử trên các lần thực hiện

+ \bar{X} : giá trị trung bình của mẫu thử trên các lần thực hiện

Tiêu chuẩn chấp thuận:

- Hàm lượng Protein toàn phần của từng lần phải nằm trong khoảng giá trị trung bình $\pm 2SD$.

- RSD của từng nhóm $\leq 2,7\%$ (đối với độ lặp lại).

- RSD của 3 nhóm $\leq 4\%$ (đối với độ chính xác trung gian) [3].

c/ Xác định độ mạnh

Bố trí 2 nhóm thực hiện thử nghiệm 7 lần trong 7 ngày khác nhau trên mẫu thử. Tính hàm lượng protein toàn phần trong mẫu thử của từng nhóm, giá trị trung bình, SD, RSD (%) của từng nhóm, hệ số F để so sánh phương sai hai nhóm và giá trị ttest.

Tiêu chuẩn chấp thuận: $t_{test} \leq t_{bảng}$ (bảng tra trong bảng phân phối Student) tại mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$ tức là độ tin cậy 95% [4] [5].

d/ Xác định tính tuyến tính

Sử dụng kết quả thu được do nhóm 1 thực hiện từ thiết kế độ đúng. Xác định sự tương quan giữa hàm lượng BSA và giá trị mật độ quang đo được bằng phương pháp hồi quy tuyến tính.

Tiêu chuẩn chấp thuận:

+ $0,99 \leq R^2 \leq 1,0$

+ Các giá trị đo được của từng điểm trên đường chuẩn phải nằm trong khoảng giá trị trung bình tại điểm đó $\pm 2SD$

+ $RSD \leq 3,7\%$ [3]

+ Độ chệch các điểm nồng độ trong đường chuẩn $\Delta i \leq 15\%$ [4]

e/ Xác định độ đặc hiệu

Bố trí 2 nhóm thực hiện phân tích mẫu không chứa protein (sử dụng dung dịch NaCl 0,9%), mỗi nhóm lặp lại 7 lần trong 7 ngày khác nhau.

Tiêu chuẩn chấp thuận: Không cho hiệu phân tích đối với mẫu không chứa protein (dung dịch NaCl 0,9%) [4].

Where: + SD is the standard deviation of measured values.

+ \bar{X} : the mean of the sample of measured values.

Acceptance criteria:

- The concentration of total protein of each time have to stay within the range of $\pm 2SD$

- RSD of each group $\leq 2,7\%$ (for the repeatability).

- RSD of 3 groups $\leq 4\%$ (for the intermediate precision)

c/ Robustness

Set up 2 groups to carry the experiments in the sample 7 times on a difference days (7 days). Calculate the S_L^2 total protein on the sample of each group, the mean value, SD, RSD (%) of each group, the coefficient F to compare the variance of two groups and t_{test} value.

Acceptance criteria: $t_{test} \leq t_{table}$ (t_{table} check in the student's t distribution) at the significant level $\alpha = 0,05$ or the confidence is 95%.

d/ Linearity

Use the data of the results of the accuracy from group 1. Identify the relative between BSA concentrate and the value of optical density (OD) by the linear regression method.

Accepted value:

+ $0,99 \leq R^2 \leq 1,0$

+ The measuring values of each point of the calibration curve have to stay within the range of mean value at that point $\pm 2SD$.

+ $RSD \leq 3,7\%$ [3]

+ The bias of each point of the calibration curve $\Delta i \leq 15\%$.

e/ Specificity

Setup two groups to carry the experiments with the non-protein sample (use NaCl 0,9%), each group repeat 7 times on a different day (7 days).

Acceptance criteria: There is no signal for the non-protein sample (NaCl 0,9% solution).

f/ the limit of quantitation

Use the data of the results of the calibration

f/ Xác định giới hạn định lượng

Sử dụng kết quả đo quang của đường chuẩn trong 7 ngày trong xác định tính đúng. Giới hạn định lượng được tính bằng công thức: $LOQ = 10 \cdot s/a$ trong đó s là sai số của phương trình đường chuẩn và a là độ dốc của đường chuẩn.

Kiểm tra lại độ đúng và độ chính xác tại LOQ bằng cách phân tích mẫu trắng (NaCl 0,9%) thêm chuẩn để có được dung dịch có nồng độ tại nồng độ LOQ trong 7 ngày khác nhau.

Tiêu chuẩn chấp thuận cho độ đúng và độ chính xác tại LOQ:

+ Độ đúng: $90\% \leq R \leq 107\%$

+ Độ chính xác: $RSD \leq 5,3\%$ [3]

2.4.2.2. Đánh giá độ không đảm bảo đo

Đánh giá độ không đảm bảo đo của của quy trình phân tích đối với 2 mẫu là IV Globulin và SAR.

Sử dụng số liệu thu được trong phần thiết kế xác định tính chính xác để tính phương sai lặp lại S_{rj}^2 , phương sai tái lặp S_L^2 và độ không đảm bảo đo được tính theo công thức: $u^2(y) = S_L^2 + S_r^2$

Trong đó: S_L^2 phương sai ước lượng của độ lệch chuẩn tái lặp

S_r^2 : phương sai ước lượng của độ lệch chuẩn lặp lại

Độ không đảm bảo đo mở rộng $U = k \cdot u(y)$ ($k=2$ với mức độ tin cậy 95%) [6] [7].

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Xác định sự phù hợp của quy trình xác định hàm lượng protein toàn phần trong các sinh phẩm bằng phương pháp Biuret

3.1.1. Độ đúng

Hàm lượng protein của mẫu thử và mẫu thử thêm chuẩn của các ngày đều nằm trong khoảng $TB \pm 2SD$.

Độ thu hồi của dung dịch BSA 50 mg/ml đạt từ 97,83 – 102,55%, độ thu hồi của dung dịch BSA 40 mg/ml đạt từ 97,87 – 102,66% đều nằm trong giới hạn 97-103% đạt yêu cầu theo tiêu chuẩn của AOAC đối với các chất có nồng độ 1% - 10% [3]. Như vậy, phương pháp có độ thu hồi tốt. Quy trình đạt yêu cầu về độ đúng.

curve in 7 days to determine the accuracy. The limit of quantitation was calculated by the equation: $LOQ = 10 \cdot s/a$, where “s” is the error of the calibration curve equation and “a” is the slope of the calibration curve.

Verify accuracy and precision at LOQ by analyzing the white sample (NaCl 0,9%) add spiked to have the solution at the concentrate of LOQ concentrate on a different day (7 days).

The acceptance criteria for accuracy and precision at LOQ:

+ Accuracy: $90\% \leq R \leq 107\%$

+ Precision: $RSD \leq 5,3\%$

Evaluate the uncertainty

Evaluate the uncertainty of the procedure with 2 samples are IV Globulin and SAR.

Use the data measured from the accuracy to calculate the variance of repeatability S_{rj}^2 , variance of reproducibility, and the uncertainty by the equation: $u^2(y) = S_L^2 + S_r^2$

Where:

S_L^2 : The estimated variance of the repeatability standard deviation.

S_r^2 : The estimated variance of the reproducibility standard deviation.

The expanded uncertainty $U = k \cdot u(y)$ ($k=2$ with confidence interval 95%).

III. RESULTS

3.1 Identify the suitability of procedure for determine total protein in biologicals by Biuret method.

3.1.1 Accuracy

The protein concentration of the sample and spike sample on a different day is between the mean $\pm 2SD$.

The recovery of BSA solution 50 mg/ml are within 97,83 to 102,55%, the recovery of BSA solution 40 mg/ml are within 97,87 to 102,66%, they all staying in the range 97-103% acceptable follow the AOAC standard of analytes concentration 1% - 10%. Therefore, the recovery of the method is great. The procedure is acceptable for accuracy.

Bảng 1: Kết quả khảo sát độ đúng của quy trình
Table 1: Results of screening for the accuracy of the procedure

Lần thực hiện Index	Độ thu hồi của dung dịch BSA 50 mg/ml The recovery of BSA solution 50 mg/ml			Độ thu hồi của dung dịch BSA 40 mg/ml The recovery of BSA solution 40 mg/ml		
	Hàm lượng protein trong mẫu (mg/ml) The concentrate of protein inside of the sample (mg/ml)		Độ thu hồi (%) Recovery (%)	Hàm lượng protein trong mẫu (mg/ml) The concentrate of protein inside of the sample (mg/ml)		Độ thu hồi (%) Recovery (%)
	IV Globulin	(IV Globulin thêm chuẩn) IV Globulin spiked		SAR	SAR thêm chuẩn SAR spiked	
1	51,30	50,43	99,13	39,35	39,78	100,54
2	48,94	49,15	98,72	39,79	40,21	101,60
3	50,85	51,06	102,55	40,85	40,00	97,87
4	50,65	49,78	97,83	38,04	39,35	101,63
5	50,85	50,64	100,85	39,36	40,21	102,66
6	51,28	50,21	98,30	40,64	40,43	100,53
7	49,35	50,00	101,30	41,74	40,87	100,00
TB	50,46	50,18	99,81	39,97	40,12	100,69
SD	0,94	0,62	1,76	1,22	0,48	1,53
TB + 2SD Mean + 2SD	52,33	51,42	103,34	42,40	41,09	103,75
TB - 2SD Mean - 2SD	48,59	48,94	96,28	37,54	39,16	97,63

3.1.2. Độ chính xác

3.1.2 Precision

Bảng 2: Kết quả đánh giá độ lặp lại và độ chính xác trung gian
Table 2: Results of the repeatability and the intermediate precision

TT Index	Kết quả hàm lượng protein trong mẫu IV Globulin (mg/ml) Results of protein concentration of IV Globulin sample (mg/ml)			Kết quả hàm lượng protein trong mẫu SAR (mg/ml) Results of protein concentration of SAR sample (mg/ml)		
	Nhóm 1 Group 1	Nhóm 2 Group 2	Nhóm 3 Group 3	Nhóm 1 Group 1	Nhóm 2 Group 2	Nhóm 3 Group 3
	1	50,64	52,61	52,00	38,94	39,13
2	50,00	51,96	51,33	38,94	38,91	40,00
3	49,79	51,09	51,11	39,36	40,43	39,11
4	50,21	50,87	51,56	40,21	40,00	41,56
5	51,06	51,09	51,78	40,64	41,09	40,44
6	49,79	51,52	51,33	39,57	39,78	41,33
7	50,43	50,65	52,44	39,15	40,00	39,78
TB Mean	50,27	51,40	51,65	39,54	39,91	40,51

SD	0,47	0,69	0,46	0,66	0,74	0,93
TB+2SD Mean+2SD	51,22	52,77	52,57	40,85	41,39	42,37
TB-2SD Mean-2SD	49,33	50,03	50,73	38,23	38,42	38,64
RSD (%)	0,94	1,33	0,89	1,66	1,86	2,30
TB 3 nhóm Mean of 3 Group	51,11			39,99		
SD	0,80			0,85		
TB+2SD Mean+2SD	52,72			41,68		
TB-2SD Mean-2SD	49,50			38,29		
RSD (%)	1,57			2,12		

Kết quả cho thấy độ lặp lại (RSD%) trong ngày của các nhóm trên 2 loại mẫu thử đều nhỏ hơn 2,7% và độ lặp lại giữa các nhóm trên 2 loại mẫu thử đều nhỏ hơn 4%, đạt yêu cầu theo tiêu chuẩn của AOAC đối với các chất có nồng độ từ 1-10% [3]. Quy trình đạt yêu cầu về độ chính xác.

3.1.3. Độ mạnh

The results of the repeatability (RSD%) on a day of groups in two samples are smaller than 2,7% and the repeatability among these group in 2 samples are smaller than 4%, acceptable the AOAC of analytes concentration 1% - 10 %. The procedure is acceptable for precision.

3.1.3. Robustness

Bảng 3: Kết quả khảo sát độ mạnh của quy trình
Table 3: Robustness of the procedure

Lần thực hiện Index	Hàm lượng protein trong mẫu IV Globulin (mg/ml) Protein concentration of IV Globulin sample (mg/ml)		Hàm lượng protein trong mẫu SAR (mg/ml) Protein concentration of SAR sample (mg/ml)	
	Nhóm 1 Group 1	Nhóm 2 Group 2	Nhóm 1 Group 1	Nhóm 2 Group 2
1	51,30	48,56	39,35	41,18
2	48,94	50,62	39,79	42,26
3	50,85	51,84	40,85	40,53
4	50,65	49,17	38,04	39,98
5	50,85	50,45	39,36	38,45
6	51,28	52,14	40,64	41,84
7	49,35	49,97	41,74	40,62
TB Mean	50,46	50,39	39,97	40,69
SD	0,94	1,31	1,22	1,26
TB + 2SD Mean + 2SD	52,33	53,01	42,40	43,22
TB - 2SD Mean - 2SD	48,59	47,78	37,54	38,17
RSD (%)	1,86	2,59	3,04	3,11
	$F\alpha = 0,44$ $F_{\text{bảng}} = F(\alpha;6;6) = 4,28$ $F\alpha < F_{\text{bảng}}$ chứng tỏ phương sai của 2 nhóm khác nhau một cách không có ý nghĩa với độ tin cậy 95% ($\alpha = 0,05$) $t = 0,91$ $F\alpha = 0,44$ $F_{\text{table}} = F(\alpha;6;6) = 4,28$ $F\alpha < F_{\text{table}}$ demonstrate that the insignificant of the variance of 2 different groups with the reliability 95% ($\alpha = 0,05$) $t = 0,91$		$F\alpha = 0,93$ $F_{\text{bảng}} = F(\alpha;6;6) = 4,28$ $F\alpha < F_{\text{bảng}}$ chứng tỏ phương sai của 2 nhóm khác nhau một cách không có ý nghĩa với độ tin cậy 95% ($\alpha = 0,05$) $t = 0,29$ $F\alpha = 0,93$ $F_{\text{table}} = F(\alpha;6;6) = 4,28$ $F\alpha < F_{\text{table}}$ demonstrate that the insignificant of the variance of 2 different groups with the reliability 95% ($\alpha = 0,05$) $t = 0,29$	

Kết quả cho thấy 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.

The results show that mean values are insignificant of the 2 groups with the confidence is 95%. The procedure is acceptable for robustness.

3.1.4. Khoảng tuyến tính

3.1.4. Linearity

Bảng 4: Kết quả đo quang của đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Table 4: The results of measuring the optical density of the calibration curve and the linearity

Lần thực hiện Index	Điểm chuẩn (mg)			Calibration points (mg)			R ²
	0	2	4	6	8	10	
1	0,000	0,095	0,189	0,283	0,372	0,462	0,9998
2	0,000	0,098	0,189	0,288	0,379	0,471	0,9998
3	0,000	0,090	0,193	0,284	0,381	0,468	0,9996
4	0,000	0,100	0,190	0,287	0,381	0,468	0,9997
5	0,000	0,097	0,191	0,287	0,379	0,472	0,9999
6	0,000	0,091	0,195	0,288	0,384	0,476	0,9997
7	0,000	0,099	0,187	0,281	0,371	0,465	0,9998
TB Mean		0,096	0,191	0,285	0,378	0,469	
SD		0,004	0,003	0,003	0,005	0,005	
TB + 2SD Mean + 2SD		0,104	0,196	0,291	0,388	0,478	
TB - 2SD Mean - 2SD		0,088	0,185	0,280	0,368	0,460	
RSD (%)		3,08	1,42	0,97	1,28	0,99	

Bảng 5: Độ chệch của từng điểm chuẩn

Table 5: Bias of each point

Lần thực hiện Times	Điểm chuẩn Calibration points									
	2		4		6		8		10	
	Giá trị thực (mg) Measured value (mg)	Δi (%)	Giá trị thực (mg) Measured value (mg)	Δi (%)	Giá trị thực (mg) Measured value (mg)	Δi (%)	Giá trị thực (mg) Measured value (mg)	Δi (%)	Giá trị thực (mg) Measured value (mg)	Δi (%)
1	2,02	1,09	4,07	1,63	6,11	1,81	8,04	0,54	10,00	0
2	2,04	2,13	3,98	0,53	6,09	1,42	8,02	0,27	9,98	0,21
3	1,91	4,26	4,11	2,66	6,04	0,71	8,11	1,33	9,96	0,43
4	2,11	5,43	4,07	1,63	6,17	2,90	8,22	2,72	10,11	1,09
5	2,04	2,13	4,04	1,06	6,09	1,42	8,04	0,53	10,02	0,21
6	1,94	3,19	4,15	3,72	6,13	2,13	8,17	2,13	10,13	1,28
7	2,11	5,43	4,02	0,54	6,07	1,09	8,02	0,27	10,07	0,65

Kết quả phân tích cho thấy hệ số hồi quy tuyến tính (R²) của từng ngày đều nằm trong khoảng 0,99-1,0; tại các điểm chuẩn, giá trị đo quang thu được đều nằm trong khoảng TB±2SD; RSD (%) tại mỗi điểm chuẩn đều nhỏ hơn 3,7% và độ chệch

The result shows that the linear regression analysis (R²) of each day is staying in the range of 0,99-1,0; of the calibration points, the OD values are staying in the range of Mean ±2SD; RSD (%) at each calibration point is smaller than 3,7% and

tại các điểm chuẩn đều nhỏ hơn 15% đáp ứng theo yêu cầu của AOAC [3]. Quy trình đạt yêu cầu về tính tuyến tính với khoảng làm việc xác định là 2-10 mg BSA.

3.1.5. Độ đặc hiệu

Bảng 6: Kết quả OD đo được của dung dịch NaCl 0,9%

Lần thực hiện	Giá trị OD đo được	
	Nhóm 1	Nhóm 2
1	0,001	0,003
2	-0,002	-0,002
3	0,002	0,004
4	0,000	-0,001
5	0,004	0,001
6	-0,003	0,005
7	-0,001	-0,003

Kết quả phân tích cho thấy cả 7 lần phân tích mẫu không chứa protein (NaCl 0,9%) của 2 nhóm đều không cho tín hiệu phân tích. Quy trình đạt yêu cầu về tính đặc hiệu.

3.1.6. Giới hạn định lượng

Bảng 7: Kết quả xác định giá trị LOQ của dung dịch NaCl 0,9%
Table 7: Results of the limit of quantitative (LOQ)

Điểm chuẩn (mg) Calibration points (mg)	Giá trị OD đo được OD values measured							
	1	2	3	4	5	6	7	TB
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2	0,095	0,098	0,090	0,100	0,097	0,091	0,099	0,096
4	0,189	0,189	0,193	0,190	0,191	0,195	0,187	0,191
6	0,283	0,288	0,284	0,287	0,287	0,288	0,281	0,285
8	0,372	0,379	0,381	0,381	0,379	0,384	0,371	0,378
10	0,462	0,471	0,468	0,468	0,472	0,476	0,465	0,469
R2	0,9998	0,9998	0,9996	0,9997	0,9999	0,9997	0,9998	
Slope (a)	0,046	0,047	0,047	0,047	0,047	0,048	0,046	0,047
Y intercept	0,0026	0,0025	0,0040	0,0035	0,0017	0,0033	0,0025	0,0029
LOQ = $10 * s/a = 0,613$ (mg)								

the bias at calibration points are smaller than 15% acceptance of the AOAC standard method. The procedure is acceptable of linearity with the range of concentration is 2-10 mg BSA.

3.1.5. Specificity

Table 6: The result of OD measurement of NaCl 0,9%

Times	OD value measured	
	Group 1	Group 2
1	0,001	0,003
2	-0,002	-0,002
3	0,002	0,004
4	0,000	-0,001
5	0,004	0,001
6	-0,003	0,005
7	-0,001	-0,003

The results of 7 times measuring the non-protein sample (NaCl 0,9 %) of two groups are the same with no signal value. The procedure is acceptable for specificity.

3.1.3. Limit of quantitative

Bảng 8: Kết quả độ đúng và độ chính xác tại LOQ
Table 8: Results of the accuracy and the precision at LOQ

Lần thực hiện Index	Kết quả hàm lượng protein (mg/ml) trong mẫu NaCl 0,9% thêm chuẩn The result of the protein concentration in NaCl 0,9% spiked sample (mg/ml)		Độ thu hồi R% Recovery R%
	OD	HL Concentration	
1	0,028	0,57	92,99
2	0,032	0,62	101,14
3	0,031	0,59	96,25
4	0,031	0,61	99,51
5	0,029	0,60	97,88
6	0,032	0,64	104,40
7	0,030	0,59	96,25
TB Mean	0,030	0,60	
SD	0,002	0,02	
TB+2SD Mean+2SD	0,033	0,65	
TB-2SD Mean-2SD	0,027	0,56	
RSD (%)	4,97	3,80	

Kết quả phân tích cho thấy độ thu hồi của dung dịch NaCl 0,9% thêm chuẩn tại nồng độ LOQ đều nằm trong khoảng 90-107%; độ chính xác trung gian $RSD = 3,8\% < 5,3\%$; kết quả đo quang của mẫu đều nằm trong khoảng giá trị $TB \pm 2SD$ và $RSD = 4,97 < 5,3\%$ đáp ứng theo yêu cầu của AOAC [3]. Quy trình đạt yêu cầu về độ đúng và độ chính xác tại $LOQ = 0,613$ mg.

3.2. Đánh giá độ không đảm bảo đo cho kết quả phân tích

The result shows that recovery of NaCl 0,9% spiked samples at concentration LOQ are staying in the range 90-107%; the intermediate precision $RSD = 3,8\% < 5,3\%$; OD value of the samples are staying in the range of $Mean \pm 2SD$ and $RSD = 4,97 < 5,3\%$ acceptable of the AOAC standard method. The procedure is acceptable for the accuracy and the precision at $LOQ = 0,613$ mg.

3.2. Uncertainty of the analysis result

Bảng 9: Kết quả đánh giá độ không đảm bảo đo với mẫu IV Globulin
Table 9: Results of the uncertainty of IV Globulin sample

Lần TN Times Nhóm Groups	Hàm lượng protein (mg/ml) Protein concentration (mg/ml)							TB (Mean)	SD
	1	2	3	4	5	6	7		
Nhóm 1 Group 1	50,64	50,00	49,79	50,21	51,06	49,79	50,43	50,27	0,47 0,69 0,46
Nhóm 2 Group 2	52,61	51,96	51,09	50,87	51,09	51,52	50,65	51,40	
Nhóm 3 Group 3	52,00	51,33	51,11	51,56	51,78	51,33	52,44	51,65	
TB chung Mean value								51,11	
S _{2rj} phương sai lặp lại Variance of repeatability								0,30	
S _{2Lj} phương sai giữa các điều kiện tái lập Variance of reproducibility								0,50	
u(y) độ không đảm bảo của phép thử Uncertainty of assay								0,89	
U (độ không đảm bảo đo mở rộng) Expanded uncertainty								1,78	

Bảng 10: Kết quả đánh giá độ không đảm bảo đo đối với mẫu SAR
Table 10: Results of the uncertainty of SAR sample

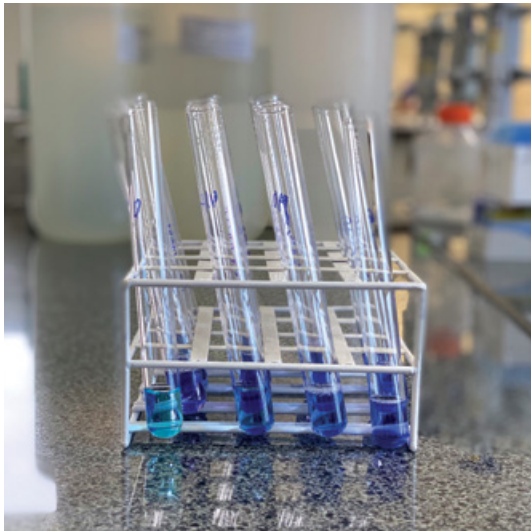
Lần TN Times Nhóm Groups	Hàm lượng protein (mg/ml)				Protein concentration (mg/ml)				
	1	2	3	4	5	6	7	TB (Mean)	SD
Nhóm 1 Group 1	38,94	38,94	39,36	40,21	40,64	39,57	39,15	39,54	0,65
Nhóm 2 Group 2	39,13	38,91	40,43	40,00	41,09	39,78	40,00	39,91	0,74
Nhóm 3 Group 3	41,33	40,00	39,11	41,56	40,44	41,33	39,78	40,51	0,93
TB chung Mean value							39,99		
S2rj phương sai lặp lại Variance of repeatability							0,62		
S2Lj phương sai giữa các điều kiện tái lặp Variance of reproducibility							0,24		
u(y) độ không đảm bảo của phép thử Uncertainty of assay							0,92		
U (độ không đảm bảo đo mở rộng) Expanded uncertainty							1,85		

Kết quả cho thấy độ không đảm bảo đo mở rộng của quy trình đối với mẫu IV Globulin là 1,78 mg.

Kết quả cho thấy độ không đảm bảo đo mở rộng của quy trình đối với mẫu SAR là 1,85 mg.

Results show that the expanded uncertainty of the procedure for IV Globulin is 1,78 mg.

The result shows that the expanded uncertainty of the procedure for SAR is 1,85 mg.



Thực hiện xác định hàm lượng protein



IV. BÀN LUẬN

Khi khảo sát tính tuyến tính của đường chuẩn của phương pháp Biuret, có thể thấy với khoảng làm việc của đường chuẩn là từ 2-10 mg/ml, phù hợp với các sinh phẩm có hàm lượng protein từ 2 mg/ml trở lên. Với các sinh phẩm có hàm lượng protein cao vượt khoảng làm việc của đường chuẩn, cần pha loãng mẫu tới nồng độ thích hợp.

Độ không đảm bảo đo mở rộng công bố được

IV. DISCUSSION

When we screen the linearity of the calibration curve of the Biuret method, it shows the range of the calibration curve is from 2 -10 mg/ml which means the method is suitable for the biologicals that have protein concentration higher than 2 mg/ml. With the biologicals having the concentrate of protein out of range of the calibration curve, dilution is required.

The expanded uncertainty we provide in

tổng hợp từ các độ không đảm bảo đo thành phần bao gồm: thiết bị, hóa chất, con người, điều kiện môi trường, phương pháp, thành phần mẫu... Do đó, phòng thí nghiệm khác nhau, phương pháp khác nhau, các mẫu khác nhau thì độ không đảm bảo đo cũng khác nhau. Vì vậy ở nghiên cứu này, chúng tôi chỉ công bố độ không đảm bảo đo cho 2 mẫu tham gia là IV Globulin và SAR.

Khi kết quả đo ở sát giới hạn trên hoặc sát giới hạn dưới của tiêu chuẩn chấp thuận, thì độ không đảm bảo đo đặc biệt có giá trị khi kết quả đưa đến một quyết định chấp nhận hay loại bỏ lô hàng.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã chứng minh quy trình xác định hàm lượng protein toàn phần trong các sinh phẩm bằng phương pháp Biuret tại phòng thí nghiệm của NICVB là phù hợp và đáng tin cậy. Kết quả nghiên cứu cho thấy quy trình đạt yêu cầu về độ đúng, độ chính xác, độ mạnh, độ đặc hiệu và tính tuyến tính với khoảng làm việc từ 2-10 mg BSA và giới hạn định lượng LOQ = 0,613 mg. Độ không đảm bảo đo mở rộng của phương pháp đối với mẫu IV Globulin là 1,78 mg và đối với mẫu SAR là 1,85 mg.

our study is a summary of the uncertainty of the equipment, chemicals, human, environment condition, method, sample ingredients, etc. Therefore, different laboratories, methods, or samples will show the difference in uncertainty data. Thus, in our research, we provided the uncertainty data for two samples which are IV Globulin and SAR.

When the data nearby the critical point of the acceptable standard, the uncertainty data is very valuable if the result leads to the decision of accepting or rejecting the batch of goods.

V CONCLUSION

This study reveals the procedure to determine the total protein in biologicals using Biuret method at the laboratory of the National Institute for Control of Vaccine and Biologicals is suitable and trusty. Result show that the procedure is qualified in terms of accuracy, precision, robustness, specificity, linearity with the limit concentrate of BSA from 2-10 mg and the limit of qualification LOQ = 0,613 mg. the expanded uncertainty of the method with the IV Globulin sample is 1,78 and SAR sample is 1,85.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế (2017), Dược Điển Việt Nam, Lần xuất bản thứ năm, Nhà xuất bản y học.
2. Tổ chức tiêu chuẩn hóa quốc tế, ISO/IEC 17025:2017: Yêu cầu chung về năng lực của phòng thử nghiệm và hiệu chuẩn.
3. AOAC INTERNATIONAL, AOAC Peer-Verified Methods Program, Manual on Policies and Procedures (1998).
4. Trần Cao Sơn. Thảm định phương pháp trong phân tích hóa học và vi sinh”, Nhà xuất bản Khoa học kỹ thuật Hà Nội.
5. Tạ Thị Thảo, 2006. Thống kê trong Hóa phân tích. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội.
6. Bộ Khoa học và Công nghệ, TCVN 10861:2015 (ISO 21748:2010): Hướng dẫn ước lượng độ lặp lại, độ tái lập và độ đúng trong ước lượng độ không đảm bảo đo.
7. International Organization for Standardization, ISO 21748:2010: Guide for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty in measurement estimation.

REFERENCE

1. Ministry of Health (2017), Vietnam Pharmacopoeia, fifth edition, Medical publishing house.
2. International Organization for Standard, ISO/IEC 17025:2017: General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
3. AOAC International. AOAC Peer-Verified Methods Program, Manual on Policies and Procedures (1998).
4. Trần Cao Sơn, Method validation in chemical and microbiological analysis, Science and Technics Publishing House.
5. Tạ Thị Thảo, 2006. Statistic in analytical chemistry. Vietnam National University, Hanoi Publishing House.
6. Ministry of Science and Technology, TCVN 10861:2015 (ISO 21748:2010): Guide for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty in measurement estimation.
7. International Organization for Standard, ISO 21748:2010: Guide for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty in measurement estimation.