

OVERVIEW OF METHODS FOR DETERMINING CITRATE CONTENT AND APPLICATION DIRECTIONS FOR BIOLOGICAL PRODUCTS

Dam Thi Lieu*, Ngo Phi Phuong, Duong Thi Cam Le

The National Institute for Control of Vaccines and Biologicals

Received 28 April 2025

Accepted 26 June 2025

Abstract: Citrate is an important metabolite involved in the Krebs cycle and is commonly used as a biological indicator or anticoagulant in biomedical, biochemical and pharmaceutical applications. Many analytical methods have been developed to quantify citrate in biological samples, including enzymatic photometric methods, non-enzymatic photometric methods, chromatography, and classical chemical methods. This article summarizes and analyzes the advantages and disadvantages of the most common methods, thereby proposing appropriate technical choices depending on the research objectives and sample characteristics. The method used in the study is the method of statistical collection and synthesis analysis.

Keywords: *citrate, enzymatic method, spectrophotometric method, ion chromatography, biologicals.*

* Corresponding author:

E-mail address: Damthilieunicvb@gmail.com

<https://doi.org/10.56086/jcvb.v2i5.211>

TỔNG QUAN CÁC PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG CITRATE VÀ ĐỊNH HƯỚNG ỨNG DỤNG ĐỐI VỚI CÁC SINH PHẨM Y TẾ

Đàm Thị Liễu*, Ngô Phi Phương, Đường Thị Cẩm Lệ

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

Nhận ngày 28 tháng 04 năm 2025

Chấp nhận đăng ngày 26 tháng 06 năm 2025

Tóm tắt: Citrate là một hợp chất chuyển hóa quan trọng tham gia chu trình Krebs và thường được sử dụng như một chỉ thị sinh học hoặc chất chống đông trong nghiên cứu ứng dụng y sinh học, hóa sinh và dược phẩm. Nhiều phương pháp phân tích đã được phát triển nhằm định lượng citrate trong các mẫu sinh học, bao gồm phương pháp đo quang enzyme, đo quang không enzyme, sắc ký, và phương pháp hóa học cổ điển. Bài báo này tổng hợp và phân tích ưu nhược điểm của các phương pháp phổ biến nhất, qua đó đề xuất hướng lựa chọn kỹ thuật phù hợp tùy thuộc vào mục tiêu nghiên cứu và đặc tính mẫu. Bài báo được thực hiện dựa trên phương pháp tổng hợp và phân tích các tài liệu khoa học đã công bố.

Từ khoá: citrate; phương pháp enzyme; phương pháp quang phổ; sắc ký ion; sinh phẩm.

1. Đặt vấn đề

Citrate là chất chống đông được sử dụng trong quá trình thu gom máu. Trong quá trình truyền máu & các sản phẩm từ máu ở 4°C, khả năng thanh thải citrate của gan có thể bị vượt quá. Citrate tạo thành phức hợp với canxi, dẫn đến giảm canxi ion hóa, gây ra tình trạng hạ canxi máu và chứng dị cảm quanh miệng hoặc ở chi. Hạ canxi máu nghiêm trọng có thể gây co cơ liên tục và nếu không được điều chỉnh, có thể tiến triển thành co giật với co thắt ở nhiều nhóm cơ [1]. Theo quy định của Ủy ban quốc tế về huyết khối và cầm máu, Tiểu ban về tiêu cầu (the International Committee of Thrombosis and Hemostasis, Subcommittee on Platelets), công thức phối trộn citrate ở mức 109 mmol/l (tương đương 3,2%) và tương ứng tỷ lệ 9 thể tích máu toàn phần 1 thể tích citrate [1-2].

Hàng năm có rất nhiều các sản phẩm có nguồn gốc máu người được nhập vào thị trường Việt Nam. Có tổng 18 sản phẩm đang được kiểm định tại Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế có kiểm soát hàm lượng citrate.

Nhiều phương pháp phân tích citrate đã được phát triển trong suốt hơn nửa thế kỷ, mỗi phương pháp có đặc điểm riêng về độ nhạy, tính đặc hiệu, thiết bị yêu cầu và khả năng ứng

dụng. Bài viết này nhằm tổng quan các nhóm kỹ thuật chính thường được áp dụng trong phân tích citrate và gợi ý định hướng ứng dụng đối với kiểm định chất lượng các sinh phẩm có nguồn gốc máu toàn phần.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng, thời gian nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là các bài báo của các tác giả được công bố trên các tạp chí tin cậy, uy tín trên toàn thế giới và hồ sơ kiểm định chất lượng các sinh phẩm có mặt trên thị trường Việt Nam được kiểm định hàm lượng citrate. Đối với việc lựa chọn tài liệu, ưu tiên tài liệu công bố sau và cập nhật hơn, đối với các tài liệu có cùng thời gian công bố ưu tiên lựa chọn các tài liệu của các nhà sản xuất sinh phẩm trên toàn thế giới do phạm vi áp dụng gần sát với mục tiêu của bài báo.

Phương pháp tìm kiếm tài liệu: trang web sử dụng tìm kiếm dữ liệu Pubmed và Google Scholar và một số hồ sơ từ các nhà sản xuất như: hồ sơ kiểm định chất lượng sinh phẩm Feiba, Human Albumin Baxter của nhà sản xuất Takeda Manufacturing Austria, Albutein của nhà sản xuất Grifols Biological LLC, Human Albumin Grifols của nhà sản xuất Institute Grifols S.A Spain, Haemoctin SDH của nhà sản xuất Biotest Pharma GMBH – Đức...

Nghiên cứu được tiến hành trong thời gian từ tháng 02/2025 đến tháng 04/2025.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu sử dụng phương pháp thu thập, tổng hợp phân tích tài liệu, bài báo đã được công bố trên các tạp chí khoa học và các hồ sơ kiểm định chất lượng của nhà sản xuất. Cụ thể các bước tiến hành: đọc hiểu các tài liệu, tóm tắt các ý chính của tài liệu, nắm bắt các tiêu chí quan trọng của phương pháp (nguyên lý, thiết bị, hoá chất, cách thức tiến hành, độ nhạy, độ đặc hiệu, độ thu hồi, phạm vi áp dụng, ưu nhược điểm...), so sánh các phương pháp, đối chiếu tiêu chuẩn của các sinh phẩm sau đó căn cứ vào đặc điểm của phương pháp để lựa chọn phương pháp tối ưu cho các sản phẩm.

3. Kết quả

3.1. Phương pháp đo quang enzyme

Mẫu thử được khử nhiễu protein bằng acid perchloric 0.6 M, tiếp theo sử dụng citrate lyase để thủy phân citrate thành oxaloacetate và acetate, sau đó sử dụng malate dehydrogenase và lactate dehydrogenase để chuyển hóa oxaloacetate, đồng thời đo mức tiêu thụ NADH tại bước sóng 340 nm (Moellering & Gruber, 1966; Holden et al., 1996) [2].

Một điểm quan trọng của nghiên cứu là phát hiện ra rằng enzyme citrate lyase có hoạt tính ổn định hơn khi có mặt ion Zn^{2+} so với ion Mg^{2+} . Trong điều kiện tối ưu với tỉ lệ mol

Zn^{2+} : citrate từ 1:1 đến 4:1, enzyme chỉ mất 30-50% hoạt tính sau 10 phút. Ngược lại, trong các điều kiện có Mg^{2+} , enzyme bị mất hơn 95% hoạt tính rất nhanh chóng, bất kể tỉ lệ mol.

Điều này được giải thích là do phức Zn^{2+} –oxaloacetate ít ức chế enzyme hơn so với phức Mg^{2+} –oxaloacetate. Sự khác biệt này còn được củng cố bởi sự dịch chuyển quang phổ khác nhau của oxaloacetate khi tương tác với hai loại ion.

- Ưu điểm: độ nhạy và tính đặc hiệu cao, thích hợp với mẫu huyết thanh, huyết tương, và các mẫu có nồng độ citrate nằm trong thấp tới 0,02 μmol ($\sim 0,004$ mg) trong 3 ml thể tích cuối cùng (tương đương 0,0067 mmol/l hay 0,00197 mg/ml) với sai số $\pm 5\%$. Phương pháp này phù hợp cho sinh phẩm y tế, mẫu huyết thanh người, gan thỏ, rượu vang, nước ép chanh, xúc xích, ứng dụng rộng rãi trong thực phẩm, y học, sinh học.
- Hạn chế: enzyme dễ mất hoạt tính và có hạn sử dụng ngắn, cần xử lý loại protein trước khi thực hiện.

3.2. Phương pháp đo quang không enzyme

Mẫu thử được khử nhiễu protein bằng cách tủa mẫu với Trichloroacetic acid (TCA), sau đó citrate phản ứng với acetic anhydride trong môi trường có pyridine ở 30 °C cho màu vàng, có độ hấp thụ quang cực đại ở bước sóng 425 nm. Nồng độ Citrate trong mẫu thử tỷ lệ thuận với đậm độ màu, sử dụng đường chuẩn biết trước nồng độ để tính hàm lượng citrate trong mẫu thử (phản ứng Furth-Herrmann (Saffran & Denstedt, 1948)). Đây là phương pháp đơn giản, dễ triển khai [3].

- Ưu điểm: thao tác đơn giản, không yêu cầu thiết bị cao cấp, thích hợp với mẫu có nồng độ citrate nằm trong khoảng từ 0,015-0,294 mg/ml (0,05-1,0 mmol/l) như dịch sinh học, huyết thanh, sinh phẩm y tế.
- Hạn chế: độ nhạy trung bình, có thể bị ảnh hưởng bởi các chất nhiễu trong mẫu nước tiểu, chỉ xử lý loại protein bằng TCA và độ thu hồi thấp 75-80%, có thể khắc phục bằng pha loãng huyết thanh bằng dung dịch Ringer trước khi khử protein, giúp cải thiện độ thu hồi lên tới 100%.

3.3. Phản ứng Fujiwara-coupled (PBA + pyridine + TEAH + benzidine)

Phương pháp dựa trên việc chuyển hóa citrate thành pentabromoacetone (PBA), sau đó trải qua các bước tiếp theo:

- Tạo phức màu với PBA: PBA tạo ra từ citrate phản ứng với natri sulfide, thiourea (màu vàng, $\lambda = 400 - 450$ nm, $\epsilon \approx 1900 - 2300$) hoặc pyridine và kiềm (màu đỏ, $\lambda = 530$ nm).
- Phản ứng Fujiwara: PBA hòa tan trong heptan, sau đó tiếp xúc với pyridine và KOH đậm đặc tạo ra sản phẩm màu đỏ ($\epsilon = 15,900$ - Ettinger et al.) [4].

- Biến thể cải tiến:
 - o Friedman và Cooper, Mantel et al. dùng bước gia nhiệt kéo dài để tăng độ nhạy ($\lambda = 366$ nm, $\varepsilon = 28,000$).
 - o Liebman và Hindman sử dụng liên hợp với benzidine ($\lambda = 530$ nm, $\varepsilon = 35,000$).
- Ưu điểm: độ nhạy cực cao ($\varepsilon \sim 70,000$), phù hợp xác định citrate ở dạng vết (0,02 - 4 μg) trong 3,0 ml thể tích cuối cùng (tương đương 0,0067– 1,33 $\mu\text{g/ml}$ hay 0,0067 mg $\cdot 10^{-3}$ mg/ml - 1,33 $\cdot 10^{-3}$ mg/ml) đối với mẫu như nước tiểu, huyết tương, mô gan, thận.
- Hạn chế: phản ứng diễn ra trong hệ ba pha (heptan - pyridine - KOH), phức tạp và khó tái lập, yêu cầu điều kiện không nước (anhydrous), không sử dụng TCA để loại bỏ protein (vì phản ứng Fujiwara dương tính mạnh gây nhiễu).

3.4. Sắc ký ion sử dụng detector DAD

Citrate được xác định bằng cách sử dụng cột trao đổi ion được đóng gói bằng chất mang heavy sulphonated polyvinyl, với pha động là sulfuric acid 0,005M, detector DAD, bước sóng phát hiện UV 215 nm. Sử dụng đường chuẩn đã biết trước nồng độ để xác định nồng độ citrate trong mẫu. Đây là phương pháp hiện đại, chính xác.

- Ưu điểm: phù hợp mẫu thuốc, độ chính xác cao, thời gian phân tích ngắn, phù hợp các mẫu có nồng độ citrate trong khoảng 0,29 - 11,76 mg/ml (1 - 40 mmol/l).
- Hạn chế: cần thiết bị đắt tiền Hệ thống HPLC, đầu dò DAD, cột Aminex HPX-87H/Rezex ROA-Organic Acid H⁺ (8%) [5,6].

3.5. Sắc ký ion sử dụng detector CD

Trong môi trường kiềm mạnh citrate tích điện âm, khi đi qua cột trao đổi ion các anion có ái lực cao được giữ lại sau đó được rửa giải và được phát hiện bằng đầu dò điện dẫn (CD). Sử dụng đường chuẩn đã biết trước nồng độ để xác định nồng độ.

- Ưu điểm: Độ nhạy rất cao, phù hợp với các mẫu có nồng độ citrate rất nhỏ 0,2-100 $\mu\text{g/ml}$ (0,68 -340 $\mu\text{mol/l}$).
- Hạn chế: cần thiết bị đắt tiền hệ thống sắc ký ion, đầu dò CD, cột IonPac AS5 [4,7].

3.6. Phương pháp loại bỏ protein trong mẫu thử

Trong phân tích mẫu sinh học có chứa protein, bước khử protein là bắt buộc. Jones & Belling (1970) đánh giá các chất kết tủa protein (TCA, HClO₄, PTA, v.v.) và khuyến nghị sử dụng TCA hoặc HClO₄ để thu hồi citrate tốt nhất. Đặc biệt, họ sử dụng citrate đánh dấu phóng xạ (14C) để kiểm tra hiệu suất. Nhiều chất kết tủa protein có thể làm mất citrate do hấp phụ lên cặn protein. TCA và HClO₄ là hai chất kết tủa protein hiệu quả và phù hợp nhất để loại bỏ protein khỏi mẫu sinh học trước khi định lượng citrate. Việc lựa chọn chất kết tủa nên cân

nhắc thêm theo phương pháp định lượng được sử dụng sau đó. TCA không thích hợp với phương pháp dùng pyridine hoặc pentabromoacetone do gây nhiễu. HClO_4 không nên dùng với muối kali (KBr , KBrO_3) vì tạo kết tủa potassium perchlorate — nên thay bằng muối natri [8].

3.7. So sánh các phương pháp

Phương pháp	Độ nhạy	Thiết bị	Thích hợp mẫu
Đo quang enzyme [2, 9-12]	Cao (0,00197 mg/ml)	Đơn giản	Huyết thanh, huyết tương, sinh phẩm y tế
Đo quang không enzyme [3]	Trung bình (0,015 mg/ml)	Đơn giản	Huyết thanh
Fujiwara + benzidine [5]	Rất cao (0,0067 $\mu\text{g/ml}$)	Trung bình	Nghiên cứu sâu, định lượng citrate vết.
Sắc ký ion, detector DAD [6, 14]	Trung bình (0,29 mg/ml)	Đắt tiền	Thuốc, huyết thanh
Sắc ký ion, detector CD [7]	Rất cao (0,2 $\mu\text{g/ml}$)	Đắt tiền	Thuốc, huyết thanh

3.8. Gợi ý ứng dụng đối với các sinh phẩm tại Việt Nam với tiêu chí đơn giản, dễ thực hiện

Stt	Tên sinh phẩm	Nhà sản xuất	Tiêu chuẩn hàm lượng	Phương pháp khuyến nghị	Hoá chất rửa protein khuyến nghị
1	Albiomin 20% [10]	Biotest Pharma GmbH, Đức	$\leq 0,024 \text{ mg/ml}$	Đo quang enzyme có mặt ion Zn^{2+}	HClO_4 /TCA
2	Albutein 5% [3]	Grifols Biological LLC	$\leq 0,029 \text{ mg/ml}$	Đo quang enzyme có mặt ion Zn^{2+}	HClO_4 /TCA
3	Albutein 20% [3]	Grifols Biological LLC	$\leq 0,029 \text{ mg/ml}$	Đo quang enzyme có mặt ion Zn^{2+}	HClO_4 /TCA
4	Albutein 25% [3]	Grifols Biological LLC	$\leq 0,029 \text{ mg/ml}$	Đo quang enzyme có mặt ion Zn^{2+}	HClO_4 /TCA
5	Feiba 25 U/ml [11]	Takeda	3,25 - 4,75	Đo quang enzyme có mặt ion Zn^{2+}	HClO_4 /TCA

		Manufacturing Austria	mg/ml		
6	Feiba 50 U/ml [11]	Takeda Manufacturing Austria	3,25 - 4,75 mg/ml	Đo quang enzyme có mặt ion Zn^{2+}	HClO ₄ /TCA
7	Feiba 100 U/ml [11]	Takeda Manufacturing Austria	6,50 - 9,50 mg/ml	Đo quang enzyme có mặt ion Zn^{2+}	HClO ₄ /TCA
8	Human Albumin Baxter 50 g/l [12]	Takeda Manufacturing Austria AG	≤ 0,044 mg/ml	Đo quang enzyme có mặt ion Zn^{2+}	HClO ₄ /TCA
9	Human Albumin Baxter 200 g/l [12]	Takeda Manufacturing Austria AG	≤ 0,044 mg/ml	Đo quang enzyme có mặt ion Zn^{2+}	HClO ₄ /TCA
10	Human Albumin Baxter 250 g/l [12]	Takeda Manufacturing Austria AG	≤ 0,044 mg/ml	Đo quang enzyme có mặt ion Zn^{2+}	HClO ₄ /TCA
11	Human Albumin Grifols 20% [7]	Institute Grifols S.A Spain	≤ 0,029 mg/ml	Đo quang enzyme có mặt ion Zn^{2+}	HClO ₄ /TCA
12	Octanate 250 IU [6,14]	Octapharma AB Thụy Điển	2,35 - 4,41 mg/ml	Đo quang enzyme có mặt ion Zn^{2+}	HClO ₄ /TCA
13	Octanate 500 IU [6,14]	Octapharma AB Thụy Điển	2,35 - 4,41 mg/ml	Đo quang enzyme có mặt ion Zn^{2+}	HClO ₄ /TCA
14	Octanate 1000 IU [6,14]	Octapharma Thụy Điển	2,35 - 4,41 mg/ml	Đo quang enzyme có mặt ion Zn^{2+}	HClO ₄ /TCA
15	Haemoctin SDH 250 [13]	Biotest Pharma GMBH- Đức	2,65 - 5,00 mg/ml	Đo quang enzyme có mặt ion Zn^{2+}	HClO ₄ /TCA

16	Haemoctin SHD 500 [13]	Biotest Pharma GMBH - Đức	2,65 - 5,00 mg/ml	Đo quang enzyme có mặt ion Zn^{2+}	HClO ₄ /TCA
17	Immunine 600 [9]	Takeda Manufacturing Austria AG	3,2 - 4,8 mg/ml	Đo quang enzyme có mặt ion Zn^{2+}	HClO ₄ /TCA
18	Human Coagulation FIX Octapharma (250 IU) [6,14]	Octapharma Pharmazeutika Produktionsges. m.b.h - Áo	$\leq 11,76$ mg/ml	Đo quang enzyme có mặt ion Zn^{2+}	HClO ₄ /TCA

4. Kết luận

Việc lựa chọn phương pháp xác định citrate nên dựa trên loại mẫu, độ nhạy mong muốn và thiết bị sẵn có. Các phương pháp enzyme vẫn là lựa chọn tiêu chuẩn cho mẫu sinh học, trong khi sắc ký ion thích hợp hơn với mẫu phức tạp như thuốc. Phương pháp hóa học như phản ứng Furth-Herrmann hay Fujiwara tuy ít được dùng hơn nhưng vẫn hữu ích trong điều kiện không có thiết bị chuyên dụng. Nghiên cứu tương lai nên tập trung vào cải tiến độ ổn định của enzyme và tự động hóa các quy trình phân tích.

Tài liệu tham khảo

- [1] Nancy Heddle, Kathryn E. Webert, in Blood Banking and Transfusion Medicine (Second Edition), 2007.
- [2] Moellering, H., & Gruber, W. (1966). Determination of citrate with citrate lyase. Analytical Biochemistry, 17, 369–376.
- [3] Quy trình xác định hàm lượng citrate trong Albutein của nhà sản xuất Grifols Biological LLC số C-6270-056 version 8.0, ngày có hiệu lực 12/12/2017.
- [4] Jones, G. B. (1967). Estimation of microgram quantities of citrate in biological fluids. Analytical Biochemistry, 21, 286–292.
- [5] Sylwester Krukowski*, Mateusz Karasiewicz, Wacław Kolodziejewski: “Convenient UV-spectrophotometric determination of citrates in aqueous solutions with applications in the pharmaceutical analysis of oral electrolyte formulations”.
- [6] Quy trình xác định hàm lượng citrate trong sinh phẩm Octanate của nhà sản xuất Octapharma AB –Thụy Điển, số 130SOP032/05, ngày có hiệu lực 30/10/2014.

- [7] Quy trình xác định hàm lượng citrate trong Human Albumin Grifols 20% của nhà sản xuất Instituto Grifols S.A Spain số IG-MA-000750-ING, version 3.0, ngày có hiệu lực 27/05/2016.
- [8] G.B. Jones and G.B. Belling: “Comparison of protein precipitants use prior to determination of citrate in biologicals materials” ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 37, 105-111(1970).
- [9] Quy trình xác định hàm lượng citrate trong Immunine 600 của nhà sản xuất Baxter AG số VN 1104038TB-CTP00.04 – Sodium citrate.
- [10] Quy trình xác định hàm lượng citrate trong Albiomin 20% của nhà sản xuất Biotest Pharma GmbH – Germany số SOP-Q-00220-enV 3.0, ngày có hiệu lực 18/11/2017.
- [11] Quy trình xác định hàm lượng citrate trong sinh phẩm Feiba của nhà sản xuất Takeda Manufacturing Austria số VN1104038 TB-CTP 00-07 Ngày hiệu lực 09.06.2020.
- [12] Quy trình xác định hàm lượng citrate trong sinh phẩm Human Albumin Baxter của nhà sản xuất Takeda Manufacturing Austria AG, số VN-11-04059T-CTP00.04, ngày có hiệu lực.
- [13] Quy trình xác định hàm lượng citrate trong sinh phẩm Heamoctin SHD của nhà sản xuất Biotest Pharma GMBH – Đức, ngày có hiệu lực 27/06/2019.
- [14] Quy trình xác định hàm lượng citrate trong sinh phẩm Human Coagulation FIX Octapharma (250 IU) của nhà sản xuất Octapharma Pharmazeutika Produktionsges.m.b.h – Áo số 130SOP032/06, ngày có hiệu lực 09/12/2016.