

STUDYING VALIDATION OF THE PROCEDURE FOR DETERMINING TOTAL PROTEIN CONTENT IN TETANUS ANTITOXIN SERUM (SAT) USING THE MODIFIED LOWRY METHOD

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

National Institute for control of Vaccine and Biologicals

Received 13 April 2026

Accepted 18 June 2026

Abstract: The Modified Lowry method is an improved variant of the Lowry protein assay developed by Oliver H. Lowry, designed to overcome several limitations of the classical method in protein quantification. The Modified Lowry method has been adjusted in terms of reagent composition and reaction conditions to improve color stability and reduce the influence of interfering substances, making it more suitable for complex samples such as biologicals, vaccines, or cell extracts. This study was conducted to validate the procedure for “Determining the total protein content in tetanus antitoxin serum (SAT) using the Modified Lowry method”. The research employed a descriptive experimental method in the laboratory. The test samples included Tetanus Antitoxin Serum (SAT) produced by the Institute of Vaccines and Medical Biologicals (IVAC) and SAT samples spiked with standard protein at concentrations close to those of the test samples. The validation results met specifications for accuracy, precision (repeatability and intermediate reproducibility), specificity, linearity, and system suitability. The method achieved a limit of quantitation (LOQ) of 8.132 μg and an extended measurement uncertainty of 1.031 mg/ml.

Keywords: *Modified Lowry, SAT, validation, total protein.*

* Corresponding author:

E-mail address: Damthilieunicvb@gmail.com

<https://doi.org/10.56086/jcvb.v6i2.257>

NGHIÊN CỨU THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG PROTEIN TOÀN PHẦN TRONG HUYẾT THANH KHÁNG ĐỘ TỔ UỐN VÁN (SAT) BẰNG PHƯƠNG PHÁP LOWRY CẢI TIẾN

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

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

Nhận ngày 13 tháng 04 năm 2026

Chấp nhận đăng ngày 18 tháng 06 năm 2026

Tóm tắt: Phương pháp Lowry cải tiến là biến thể của phương pháp Lowry protein do Oliver H. Lowry phát triển nhằm khắc phục một số hạn chế của phương pháp Lowry cổ điển trong quá trình định lượng protein. Phương pháp Lowry cải tiến đã được điều chỉnh về thành phần thuốc thử và điều kiện phản ứng nhằm cải thiện độ ổn định của màu và giảm ảnh hưởng của các chất gây nhiễu và phù hợp hơn với các mẫu phức tạp như chế phẩm sinh học, vắc xin hoặc dịch chiết tế bào. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm thẩm định quy trình “Xác định hàm lượng protein toàn phần trong huyết thanh kháng độ tổ uồn ván (SAT) bằng phương pháp Lowry cải tiến”. Phương pháp sử dụng trong nghiên cứu là phương pháp mô tả thực nghiệm trong phòng thí nghiệm. Mẫu thử sử dụng trong nghiên cứu là mẫu huyết thanh kháng độ tổ uồn ván (SAT) do Viện Vắc xin và Sinh phẩm y tế (IVAC) sản xuất và mẫu thêm chuẩn ở tại nồng độ tiệm cận nồng độ mẫu thử. Kết quả thẩm định đạt về độ đúng, độ chính xác (độ lặp lại & độ tái lặp trung gian), độ đặc hiệu, tính tuyến tính, tính thích hợp của hệ thống, với LOQ (Limit of quantitation) là 8,132 µg, và độ KĐB đo mở rộng là 1,031 mg/ml.

Từ khóa: *Lowry cải tiến, Huyết thanh kháng độ tổ uồn ván, thẩm định, protein toàn phần.*

1. Đặt vấn đề

Phương pháp Lowry cải tiến là biến thể của phương pháp protein Lowry do Oliver H. Lowry phát triển nhằm khắc phục một số hạn chế của phương pháp Lowry cổ điển trong quá trình định lượng protein. Hai phương pháp đều dựa trên cùng một nguyên lý cơ bản. Tuy nhiên, phương pháp Lowry cải tiến đã được điều chỉnh về thành phần thuốc thử và điều kiện phản ứng nhằm cải thiện độ ổn định của màu và giảm ảnh hưởng của các chất gây nhiễu. Trong phương pháp Lowry cổ điển, phản ứng khá nhạy với nhiều thành phần có trong mẫu sinh học như chất tẩy rửa, chất khử, muối đệm hoặc lipid, dẫn đến sai

lệch kết quả định lượng. Ngược lại, Lowry cải tiến sử dụng các điều chỉnh về nồng độ thuốc thử, thành phần đệm hoặc bổ sung các bước xử lý mẫu nhằm giảm sự can thiệp của các tạp chất này, do đó phù hợp hơn với các mẫu phức tạp như chế phẩm sinh học, vắc xin hoặc dịch chiết tế bào.

Các sinh phẩm của IVAC, trong đó có sản phẩm Huyết thanh kháng độ tổ uồn ván (SAT) được nhà sản xuất sử dụng phương pháp Lowry cải tiến để xác định hàm lượng protein toàn phần, để bước dần tới việc thống nhất hoàn toàn phương pháp kiểm định giữa NICVB và IVAC, chúng tôi

triển khai phương pháp Lowry cải tiến với biến thể tối ưu cho từng sản phẩm đặc thù.

Quy trình xác định hàm lượng protein toàn phần trong các sinh phẩm của IVAC bằng phương pháp Lowry cải tiến, là phương pháp nội bộ phòng thí nghiệm (phương pháp không tiêu chuẩn), do đó cần phải được thẩm định theo yêu cầu của ISO/IEC 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. Kết quả của thẩm định quy trình được sử dụng để đánh giá chất lượng, độ tin cậy của kết quả phân tích. Cũng theo yêu cầu của ISO/IEC 17025:2017, phòng thí nghiệm tiến hành thử nghiệm phải nhận biết các thành phần độ không đảm bảo đo và đánh giá độ không đảm bảo đo. Việc đánh giá độ không đảm bảo đo có ý nghĩa thực tiễn quan trọng trong việc chấp nhận hay loại bỏ lô mẫu thử khi kết quả của mẫu thử ở giới hạn trên hoặc giới hạn dưới của tiêu chuẩn chấp thuận. Vì những lý do trên chúng tôi tiến hành nghiên cứu: Thẩm định quy trình “Xác định hàm lượng protein toàn phần trong Huyết thanh kháng độc tố uốn ván (SAT) bằng phương pháp Lowry cải tiến” với các mục tiêu xác nhận quy trình phù hợp sử dụng tại NICVB với các tiêu chí đánh giá độ chính xác, độ đúng, tính tuyến tính, tính thích hợp của hệ thống, độ đặc hiệu, LOQ và ước lượng độ không đảm bảo đo.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng, thời gian và địa điểm nghiên cứu

Đối tượng: “Quy trình xác định hàm lượng protein toàn phần trong Huyết thanh kháng độc tố uốn ván (SAT) bằng phương pháp Lowry cải tiến”.

Thời gian nghiên cứu: nghiên cứu

được tiến hành từ tháng 07/2025 đến tháng 10/2025.

Địa điểm nghiên cứu: nghiên cứu được tiến hành tại Khoa Kiểm định Hoá lý - Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế.

2.2. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện bằng phương pháp mô tả thực nghiệm trong phòng thí nghiệm.

2.3. Vật liệu phục vụ nghiên cứu

2.3.1. Mẫu thử và mẫu kiểm soát

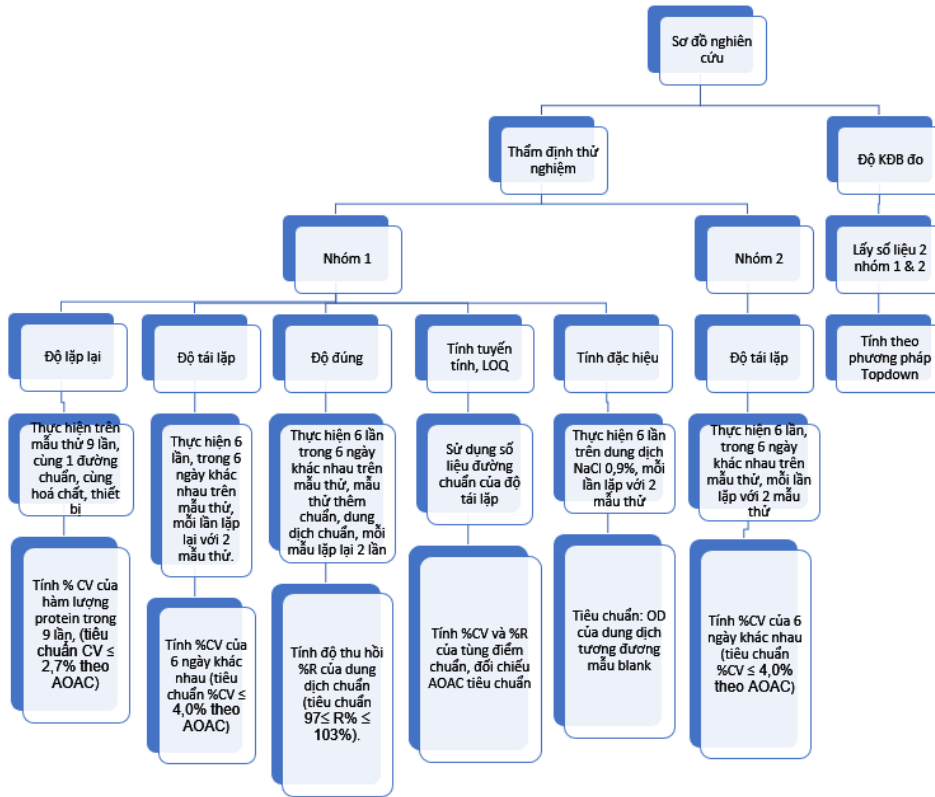
Chúng tôi sử dụng mẫu thử là mẫu Huyết thanh kháng độc tố uốn ván (SAT), nhà sản xuất IVAC, số lượng: 15 ml và mẫu SAT thêm chuẩn là dung dịch BSA 30 mg/ml, số lượng 5 ml, mẫu kiểm soát là dung dịch BSA chuẩn 4 mg/ml pha tại Khoa Hoá lý, số lượng 12 ml.

2.3.2. Thiết bị, hoá chất

Thiết bị: máy đo quang phổ hãng Jasco, hạn hiệu chuẩn 31/12/2025, máy ly tâm hãng Eppendorf, mã CF 27-HL, hạn hiệu chuẩn 31/12/2025...

Hoá chất: Trichloroacetic acid, hãng Sigma, hạn dùng 31/03/2026. Albumin Fraction V, hãng Sigma, hạn dùng 04/2029. Copper (II) sulfate pentahydrate, hãng Merck, hạn dùng 28/02/2026. Potassium sodium tartrate tetrahydrate, hãng Merck, hạn dùng 30/04/2028. Sodium hydroxide, hãng Merck, hạn dùng 30/09/2027. Sodium carbonate hãng Merck, hạn dùng 31/05/2026. Sodium dodecyl sulfate, hãng Merck, hạn dùng 31/05/2027. Folin-Ciocalteu's phenol reagent, hãng Merck, hạn dùng 30/04/2026.

2.3.3. Sơ đồ nghiên cứu [1-8]



Hình 1. Sơ đồ nghiên cứu

2.4. Quy trình thử nghiệm [1]

2.4.1. Chuẩn bị mẫu thử

Hút 200,0 µl mẫu cho vào tuýp thủy tinh nút vặn (mẫu thử lặp lại 2 lần để lấy giá trị trung bình), thêm 3,0 ml TCA 20% vào các tuýp trên, lắc đều, ủ ở 4°C trong vòng 16 - 24h. Ly tâm 5000 vòng/phút

trong 18 phút. Loại dịch nổi. Dùng dung dịch Sodium hydroxide 8% để hoà tan tủa. Pha loãng mẫu 100 lần.

2.4.2. Chuẩn bị mẫu kiểm soát

Mẫu kiểm soát (mẫu QC) pha loãng 200 lần bằng nước cất.

2.4.3. Các bước chung

Thành phần cho vào	Đường chuẩn						Mẫu QC	Mẫu thử	
	0,0	100,0	200,0	300,0	400,0	500,0		d	d
Dd BSA 0,1 mg/ml (µl)	0,0	100,0	200,0	300,0	400,0	500,0			
Mẫu QC sau pha loãng (µl)							1000,0		
Mẫu thử sau xử lý (µl)								d	d
Nước PTN (ml)	3,0	2,90	2,80	2,70	2,60	2,50	2,0	3-d	3-d

Thuốc thử Lowry 5.0 (μ l)	1000,0	1000,0	1000,0	1000,0	1000,0	1000,0	1000,0	1000,0	1000,0
Lắc đều, để nhiệt độ phòng 20 phút									
Thuốc thử Folin 2.0 (μ l)	500,0	500,0	500,0	500,0	500,0	500,0	500,0	500,0	500,0
Lắc đều, để nhiệt độ phòng 30 phút.									
Đo quang $\lambda = 735$ nm									

2.4.4. Cách tính kết quả và xử lý số liệu

- Sử dụng phần mềm Microsoft Excel để tính kết quả và xử lý số liệu.

- Dựng phương trình đường chuẩn $y = ax+b$ và hệ số hồi quy tuyến tính R^2 .

- Tính khối lượng protein có trong d μ l mẫu thử tham gia phản ứng dựa trên đường chuẩn (E): sử dụng hàm FORECAST.

- Hàm lượng protein toàn phần trong mẫu được tính theo công thức:

Hàm lượng Protein toàn phần (mg/ml)

$$= \frac{E \times k \times p \times 100 \times a \times 1000}{d \times 200}$$

Trong đó:

E : khối lượng protein có trong d μ l mẫu thử tìm được trên đường chuẩn (μ g)

k : tỷ số giữa khối lượng cân thực tế của Albumin Fraction V so với khối lượng cân lý thuyết khi pha dung dịch chuẩn BSA 0,1 mg/ml

p : độ tinh khiết của hoá chất Albumin Fraction V/Protein standard 200 mg/ml theo COA của nhà sản xuất (%)

a : Thể tích dung dịch Sodium hydroxide 8% dùng để hoà tan tủa (ml)

100: thể tích bình định mức dùng để pha loãng mẫu sau khi hoàn tan tủa (ml)

1000: quy đổi μ l sang ml

d : thể tích mẫu tham gia phản ứng (μ l)

200: thể tích mẫu thử đem tủa ban đầu (μ l).

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Độ đúng

Bảng 1. Kết quả độ thu hồi dung dịch BSA 30 mg/ml

Ngày thực hiện	R^2	Hàm lượng protein toàn phần (mg/ml)				Độ thu hồi (R%)
		Mẫu QC	SAT	SAT thêm chuẩn	BSA 30 mg/ml	
16/9/25	0,9980	4,03	31,32	30,74	30,15	100,00
17/9/25	0,9991	4,05	30,81	30,24	29,86	99,36
18/9/25	0,9987	3,96	30,80	30,42	29,85	100,64
19/9/25	0,9988	4,00	31,01	31,01	31,20	99,39
22/9/25	0,9971	4,08	30,42	30,86	31,05	100,80
23/9/25	0,9947	3,94	30,40	30,20	30,20	99,35
TB		4,01	30,79	30,58	30,39	
SD		0,0537	0,3518	0,3390	0,5929	
TB+2SD		4,12	31,50	31,26	31,57	
TB-2SD		3,90	30,09	29,90	29,20	
%RSD		1,34	1,14	1,11	1,95	

Hệ số tương quan tuyến tính (R^2) của 6 ngày nằm trong khoảng 0,9947 - 0,9991 thoả mãn giới hạn cho phép ($0,99 \leq R^2 \leq 1,0$). Giá trị mẫu kiểm soát của 6 ngày nằm trong khoảng 3,94 mg/ml - 4,08 mg/ml thoả mãn giới hạn cho phép (3,61 mg/ml - 4,42 mg/ml). Các giá trị đo được của mỗi mẫu thử (SAT), mẫu thử thêm chuẩn (SAT thêm chuẩn), dung dịch BSA 30 mg/ml

chuẩn đều nằm trong khoảng giá trị trung bình mẫu đo $\pm 2SD$. Độ thu hồi (R%) của dung dịch BSA 30 mg/ml của 6 ngày nằm trong khoảng 99,35% -100,80%, thoả mãn tiêu chuẩn cho phép ($97\% \leq R\% \leq 103\%$). Thử nghiệm đạt về độ đúng đối với mẫu SAT [2,3].

3.2. Độ chính xác trung gian

3.2.1. Độ lặp lại

Bảng 2. Bảng kết quả độ lặp lại trên mẫu SAT

Lần lặp	Hàm lượng Protein (mg/ml)	TB	SD	%CV	TB-2SD	TB+2SD
1	30,95	30,61	0,3000	0,98	30,01	31,21
2	30,95					
3	30,57					
4	30,18					
5	30,57					
6	30,95					
7	30,18					
8	30,57					
9	30,57					

Các giá trị hàm lượng protein toàn phần trong mẫu thử SAT của 9 lần lặp lại đều nằm trong khoảng giá trị $TB \pm 2SD$ (30,01 mg/ml - 31,21 mg/ml) với giá trị nhỏ nhất là 30,18 mg/ml và giá trị lớn nhất là 30,95

mg/ml. Giá trị CV % là 0,98% thoả mãn tiêu chuẩn độ lặp lại ($\leq 2,7\%$ theo AOAC). Thử nghiệm đạt về độ lặp lại trên mẫu SAT [1,2].

3.2.2. Độ tái lập trung gian

Bảng 3. Bảng thống kê kết quả kiểm định hai nhóm trên mẫu SAT

Nhóm 1					Nhóm 2				
Lần thử nghiệm	Hàm lượng Protein (mg/ml)	TB	SD	% CV	Lần thử nghiệm	Hàm lượng Protein (mg/ml)	TB	SD	% CV
1	31,13	31,32	0,2687	0,86	1	31,07	30,88	0,2758	0,89
	31,51					30,68			
2	30,81	30,81	0,0000	0,00	2	30,95	30,76	0,2758	0,90
	30,81					30,56			

3	30,61	30,80	0,2687	0,87	3	31,19	31,39	0,2828	0,90
	30,99					31,59			
4	30,82	31,01	0,2687	0,87	4	31,12	30,93	0,2758	0,89
	31,20					30,73			
5	30,29	30,43	0,1909	0,63	5	30,17	30,37	0,2758	0,91
	30,56					30,56			
6	30,20	30,40	0,2758	0,91	6	30,47	30,28	0,2758	0,91
	30,59					30,08			
TB		30,79			TB		30,76		
SD		0,3774			SD		0,4387		
%CV		1,23			%CV		1,43		
TB-2SD		30,04			TB-2SD		29,89		
TB+2SD		31,55			TB+2SD		31,64		
TB chung					30,78				
SD chung					0,4005				
%CV chung					1,30				
TB-2SD chung					29,98				
TB+2SD chung					31,58				

Tất cả các kết quả hàm lượng protein của hai nhóm trong cùng một ngày và trong các ngày khác nhau đều nằm trong khoảng TB±2SD. Giá trị %CV trong cùng ngày đều < 1%, giá trị %CV trong các ngày khác nhau và khác nhóm đều < 2,0% trong đó giá trị nhỏ nhất là 0,00% và lớn nhất là 1,43%,

nằm trong giới hạn cho phép ($\%CV \leq 2,7\%$ trong cùng ngày, $\leq 4\%$ trong các ngày khác nhau theo AOAC).

Thử nghiệm đạt về độ chính xác trung gian trên mẫu SAT [2, 3].

3.3. Tính tuyến tính

Bảng 4. Bảng thống kê OD của các ngày khác nhau

Đường chuẩn (µg)	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5	Ngày 6	TB	TB-2SD	TB+2SD	CV%
10	0,044	0,040	0,043	0,041	0,041	0,039	0,041	0,038	0,045	4,50
20	0,073	0,071	0,074	0,07	0,08	0,079	0,075	0,066	0,083	5,55
30	0,109	0,109	0,109	0,107	0,117	0,117	0,111	0,102	0,120	4,00
40	0,143	0,141	0,145	0,143	0,148	0,145	0,144	0,139	0,149	1,67
50	0,180	0,179	0,182	0,180	0,181	0,175	0,180	0,175	0,184	1,35
R²	0,9980	0,9991	0,9987	0,9988	0,9971	0,9947				

Bảng 5. Bảng thống kê giá trị thực (GTT) và độ thu hồi của các điểm chuẩn các ngày khác nhau

Đường chuẩn (µg)	Ngày 1		Ngày 2		Ngày 3		Ngày 4		Ngày 5		Ngày 6	
	GTT	R%	GTT	R%	GTT	R%	GTT	R%	GTT	R%	GTT	R%
10	10,79	107,90	10,48	104,82	10,65	106,51	10,89	108,9	9,24	92,41	8,83	88,31
20	19,26	96,28	19,38	96,90	19,52	97,62	19,14	95,68	20,42	102,12	20,59	102,96
30	29,77	99,22	30,29	100,96	29,54	98,47	29,66	98,86	31,03	103,44	31,76	105,88
40	39,69	99,23	39,47	98,68	39,85	99,62	39,90	99,74	39,92	99,80	40,00	99,99
50	50,49	100,99	50,38	100,76	50,44	100,87	50,42	100,84	49,38	98,76	48,82	97,63

R^2 của các đường chuẩn có giá trị từ 0,9947 đến 0,9991 nằm trong tiêu chuẩn cho phép ($0,99 \leq R^2 \leq 1,0$). Tất cả các giá trị OD đo quang của các điểm thuộc đường chuẩn đều nằm trong giới hạn $TB \pm 2SD$ của điểm chuẩn tương ứng. CV% của các điểm chuẩn qua các ngày khác nhau có giá trị từ 1,35% đến 5,55% nằm trong tiêu chuẩn cho phép ($CV\% \leq 16\%$). Độ thu hồi R% của các điểm chuẩn qua các ngày khác nhau có

giá trị từ 88,31% - 108,90%, nằm trong tiêu chuẩn cho phép ($80\% \leq R\% \leq 110\%$). Thử nghiệm đạt về tính tuyến tính [5].

3.4. Tính đặc hiệu

Không có tín hiệu phân tích trên mẫu dung dịch NaCl 0,9% ở tất cả 6 lần lặp trong 6 ngày khác nhau [5].

3.5. Tính thích hợp của hệ thống

Bảng 6. Bảng thống kê kết quả hàm độ lặp lại, độ tái lặp, độ thu hồi thực hiện bởi nhóm 1 trên dung dịch BSA 30 mg/ml

Ngày	Lần 1	Lần 2	TB	CV%	R%
16/9/25	30,35	29,96	30,15	0,91	100,00
17/9/25	30,05	29,67	29,86	0,91	99,36
18/9/25	29,85	29,85	29,85	0,00	100,64
19/9/25	31,58	30,82	31,20	1,72	99,30
22/9/25	30,67	31,44	31,05	1,74	100,8
23/9/25	29,81	30,59	30,20	1,84	99,35

Độ thu hồi R% từ 99,30% đến 100,64% nằm trong giới hạn cho phép ($97\% \leq R \leq 103\%$ theo AOAC). CV% trong cùng ngày và khác ngày từ 0,91% đến 1,84% nằm trong giới hạn cho phép (CV% của cùng một ngày $\leq 2,7\%$; của các ngày khác nhau: $\leq 4,0\%$ theo AOAC). Quy trình đạt về tính thích hợp của hệ thống [2,3].

3.6. Giới hạn định lượng

3.6.1. Ước lượng giới hạn định lượng [1,4]

- Sử dụng phần mềm Excel tính:

$$LOQ = \frac{10 \times s}{a} = \frac{10 \times 0,0029}{0,0036} = 8,132 \mu\text{g}$$

Trong đó:

$s = 0,0029$: sai số chuẩn trung bình của phương trình đường chuẩn $y = ax + b$

$a = 0,0036$: độ dốc trung bình của đường chuẩn

3.6.2. Kiểm tra lại giá trị LOQ

Bảng 7. Kết quả xác nhận lại độ lặp lại và độ tái lập LOQ của mẫu

Hàm lượng protein trong SAT pha loãng tại nồng độ LOQ (μg)					
Lần thử nghiệm	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5
1	7,585	7,646	7,792	8,032	7,585
2	7,298	7,926	7,516	8,310	7,301
TB	7,442	7,786	7,654	8,171	7,443
SD	0,2029	0,1980	0,1952	0,1966	0,2008
CV (%)	2,73	2,54	2,55	2,41	2,70
TB chung	7,699				
SD chung	0,3207				
RSD (%) chung	4,17				

Bảng 8. Kết quả xác nhận lại độ thu hồi tại LOQ của mẫu

Hàm lượng protein trong SAT pha loãng tại nồng độ LOQ (μg)					
Lần thử nghiệm	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5
Lần 1	7,585	7,646	7,792	8,032	7,585
Lần 2	7,298	7,926	7,516	8,310	7,301
TB	7,442	7,786	7,654	8,171	7,443
GTTC	8,123	8,123	8,123	8,123	8,123
Độ thu hồi (%)	91,61	95,85	94,23	100,59	91,63

Tại giá trị LOQ = 8,123 μg , độ lặp lại của các nhóm nằm trong khoảng từ 2,41 đến 2,73% < 11%, đạt yêu cầu theo AOAC. Độ tái lập giữa các nhóm là 4,17% < 16%, đạt yêu cầu theo AOAC. Các giá trị độ đúng

nằm trong khoảng từ 91,61 % đến 100,59 %, nằm trong khoảng 80-110%, đạt theo tiêu chuẩn AOAC. Như vậy giá trị LOQ của quy trình là 8,123 μg .

3.7. Độ KĐB đo [6-8]

Bảng 9. Bảng ước lượng độ KĐB đo trên mẫu SAT

Lần lặp Nhóm	Hàm lượng protein trong mẫu SAT (mg/ml)							
	1	2	3	4	5	6	TB	SD
1	31,32	30,81	30,80	31,01	30,42	30,40	30,79	0,3518
2	30,87	30,76	31,39	30,93	30,37	30,27	30,77	0,4074
TB chung							30,78	
S^2_{li} phương sai lặp lại							0,14	
S^2_{Ri} phương sai tái lập							0,12	
$u_{(v)}$ độ không đảm bảo đo của phép thử							0,516	
U (độ không đảm bảo đo mở rộng) (mg/ml)							1,031	

4. Bàn luận

Quy trình xác định hàm lượng protein toàn phần trong sinh phẩm IVAC bằng

phương pháp Lowry cải tiến đạt yêu cầu về độ lặp lại (CV = 0,98%), độ chính xác trung gian (CV = 1,43%), độ đúng (độ thu hồi R từ

98,10% đến 100,97%), độ đặc hiệu, tính thích hợp của hệ thống, tính tuyến tính (8,123 μg – 50 μg), giới hạn định lượng (LOQ = 8,123 μg trong 3,0 ml dung dịch). Xác định được độ KĐB đo mở rộng cho phương pháp trên mẫu SAT: $U = 1,031$ (mg/ml), với độ tin cậy 95%, phù hợp để áp dụng trong kiểm định protein của sản phẩm SAT tại Khoa Hoá lý hiện nay.

Phương pháp Lowry cải tiến có những điểm khác biệt so với phương pháp Lowry ở thành phần thuốc thử như sử dụng dung dịch TCA 20%, ở 2-8°C/ 16-24h giúp kết tủa protein mạnh hơn, triệt để hơn và không gây biến tính protein, ngoài ra thuốc thử Lowry có bổ sung thành phần Sodium dodecyl sulfate giúp phá vỡ cấu trúc bậc 2 của protein, tạo phức SDS-Protein mang điện tích âm đồng nhất giúp cho các protein khác nhau phản ứng với Cu^{2+} đồng đều hơn, giảm sự phụ thuộc vào cấu trúc tự nhiên của phân tử protein [9].

Giá trị độ lặp lại ($CV = 0,98\%$) nhỏ hơn giá trị độ tái lặp ($CV = 1,43\%$) phù hợp với điều kiện thử nghiệm, giá trị độ lặp lại nhỏ là do điều kiện thử nghiệm của 9 lần lặp là giống nhau (cùng một thử nghiệm viên, cùng mẫu thử, cùng loạt hoá chất, cùng thiết bị, cùng đường chuẩn), độ tái lặp có mức giao động kết quả mạnh hơn do thay đổi điều kiện thử nghiệm (thử nghiệm viên, ngày thực hiện, loạt hoá chất thuốc thử). So với tiêu chuẩn cho phép của AOAC (độ lặp lại: $CV\% \leq 2,7\%$; độ tái lặp $CV\% \leq 4,0\%$) thì giá trị độ lặp lại và độ tái lặp của thử nghiệm là rất nhỏ, điều này chứng tỏ thử nghiệm có độ tin cậy cao.

Độ đặc hiệu, chúng tôi sử dụng dung dịch NaCl 0,9% làm dung dịch mẫu thử vì trong quá trình sản xuất sinh phẩm SAT, nhà sản xuất đã bổ sung muối NaCl hàm lượng 0,85% - 0,9% làm chất đệm do đó trong môi trường mẫu thử luôn luôn có mặt

của muối NaCl 0,9%, cần thiết phải chứng minh sự có mặt của muối NaCl 0,9% không gây ảnh hưởng tới kết quả hàm lượng protein toàn phần của mẫu thử.

Về giá trị protein 8,123 μg trong 3,0 ml dung dịch là giá trị nhỏ hơn so với điểm thấp nhất của đường chuẩn (10 μg), phương pháp có thể áp dụng với số mẫu có hàm lượng protein từ 8,123 μg đến 50 μg . LOQ là tiêu chí bắt buộc phải có do phương pháp là phương pháp xác định hàm lượng thành phần có trong sinh phẩm, không cần xác định giá trị LOD vì LOD chỉ dành cho xác định tạp chất và chất tồn dư [3].

Độ KĐB đo mở rộng, $U = 1,031$ mg/ml, chiếm khoảng 3,4% hàm lượng protein trong mẫu thử, không có tiêu chuẩn cụ thể cho độ KĐB đo, tuy nhiên giá trị này càng nhỏ thì kết quả thử nghiệm càng có độ tin cậy cao. Độ không đảm bảo đo là một phần quan trọng của kết quả được báo cáo, là một số đi cùng kết quả, đứng sau dấu \pm , gắn với kết quả đo/phân tích mà không thuộc về bản chất của phương pháp. Độ không đảm bảo đo mở rộng công bố được 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 mẫu SAT. 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.

Về sản phẩm huyết thanh của nhà sản xuất IVAC có các sản phẩm sau: SAT (huyết thanh kháng độc tố uốn ván), IVACRIG (huyết thanh kháng dại); SAV – Naja

(huyết thanh kháng nọc rắn hổ đất), SAV-Tri (huyết thanh kháng nọc rắn lục tre), phương pháp kiểm định Lowry cải tiến có thể áp dụng được cho tất cả các sản phẩm trên với giới hạn định lượng như được công bố, đảm bảo sự thống nhất phương pháp giữa NICVB với nhà sản xuất, tuy nhiên độ KĐB đo thì không thể áp dụng cho mẫu khác ngoài SAT, nếu có điều kiện phòng thử nghiệm sẽ tiến hành xác nhận độ KĐB đo riêng đối với các mẫu trên [1].

5. Kết luận và khuyến nghị

Nghiên cứu đã hoàn thành hai mục tiêu lớn đã đặt ra: xác định được các thông số của một thẩm định quy trình theo yêu cầu của ISO/IEC 17025:2017 và xác định được độ KĐB đo mở rộng trên mẫu SAT ($U = 1,031$ (mg/ml)) với độ tin cậy 95%, phù hợp để áp dụng trong kiểm định protein của sinh phẩm IVAC tại Khoa Kiểm định Hoá lý, NICVB hiện nay.

Khuyến nghị đưa quy trình vào kiểm định mẫu thường quy tại Khoa Kiểm định Hoá lý với tất cả các sinh phẩm của nhà sản xuất IVAC có hàm lượng protein từ 8,123 μg trở lên, đồng thời công bố độ không đảm bảo cho của phép thử đối với mẫu SAT khi trả lời kết quả phân tích. Nếu có điều kiện nên xác định và công bố độ không đảm bảo đo của phép thử cho các mẫu khác theo yêu cầu bắt buộc của ISO/IEC 17025:2017.

Tài liệu tham khảo

- [1] Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế. *SOP HT-KA/055 25/08: Quy trình chuẩn xác định hàm lượng protein bằng phương pháp đo quang*. Nha Trang: IVAC; 2025
- [2] Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế. *SOP KĐQG-34: Quy trình chuẩn thẩm định quy trình*. Hà Nội: NICVB; 2025.
- [3] AOAC International. *Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements*. Gaithersburg (MD): AOAC International; 2016.
- [4] World Health Organization. *WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements: Part 2, validation*. Geneva: WHO; 1997.
- [5] Trần Cao Sơn. *Thẩm định phương pháp trong phân tích hóa học và vi sinh vật*. Hà Nội: Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật; 2010.
- [6] World Health Organization. *Guidelines on validation. Appendix 4: Analytical method validation*. Geneva: WHO; 2016.
- [7] 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 đánh giá độ không đảm bảo đo*. Hà Nội: BKHCN; 2015.
- [8] International Organization for Standardization. *ISO 21748:2010. Guide for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation*. Geneva: ISO; 2010.
- [9] Kazlou AY. Determination of protein concentration by the Lowry method in the Peterson modification [Internet]. ResearchGate; 2019 Oct [cited 2025 July 10]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/336835980_Determination_of_protein_concentration_by_the_Lowry_method_in_the_Peterson_modification