VALIDATION OF THE PROCEDURE FOR DETERMINING TOTAL PROTEIN/ PROTEIN BOUND CONTENT IN THE PREVENAR VACCINE USING THE MODIFIED LOWRY METHOD

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

National Institute for Control of Vaccine and Biologicals

Received 06 July 2026

Accepted 30 September 2026

Abstract: The Modified Lowry method was validated for determining total protein and protein-bound content in the Prevenar vaccine (Pfizer). The procedure was fully validated according to ISO/IEC 17025:2017, including the following parameters: linearity, accuracy, precision (repeatability and intermediate precision), specificity, and limit of quantification (LOQ). The results showed that the method has high linearity (R^2 = 0.9929–0.9960), good repeatability with CV = 1.24% (total protein) and 1.16% (protein-bound), intermediate precision with CV = 2.11% and 1.87%, respectively. Recovery ranged from 95.66–107.91% (calibration standards) and 98.46–102.58% (spiked samples). The method demonstrated good specificity. The experimental LOQ was determined to be 5.11 µg/ml. The expanded measurement uncertainty (k = 2) was 4.25% for total protein and 3.81% for protein-bound content. The method fully meets the requirements and is suitable for routine quality control of the Prevenar vaccine in Vietnam.

Keywords*: Modified Lowry; total protein; protein-bound; Prevenar; ISO/IEC 17025.*

* Corresponding author:
E-mail address: thanhtung5292@gmail.com
Https://doi.org/10.56086/jcvb.v6i3.270

THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG PROTEIN TOÀN PHẦN/ PROTEIN BOUND TRONG VẮC XIN PREVENAR THEO PHƯƠNG PHÁP MODIFIED LOWRY

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

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

Nhận ngày 06 tháng 07 năm 2026

Chấp nhận đăng ngày 30 tháng 09 năm 2026

Tóm tắt: Phương pháp Modified Lowry được thẩm định để xác định hàm lượng protein toàn phần và protein bound trong vắc xin Prevenar 13 (Pfizer). Quy trình được thẩm định theo ISO/IEC 17025:2017, bao gồm các thông số: tính tuyến tính, độ đúng, độ chính xác (lặp lại và trung gian), độ đặc hiệu và giới hạn định lượng (LOQ). Kết quả cho thấy phương pháp có tính tuyến tính cao (R^2 = 0,9929–0,9960), độ lặp lại CV = 1,24% (protein toàn phần) và 1,16% (protein bound), độ chính xác trung gian CV = 2,11% và 1,87%, độ thu hồi 95,66–107,91% (đường chuẩn) và 98,46–102,58% (thêm chuẩn), độ đặc hiệu tốt. LOQ được xác định thực nghiệm là 5,11 µg/ml. Phương pháp đáp ứng đầy đủ yêu cầu và phù hợp để kiểm tra chất lượng thường quy vắc xin Prevenar 13 tại Việt Nam.

***Từ khóa**: Modified Lowry; protein toàn phần; protein bound; Prevenar 13; ISO/IEC 17025.*

1. Đặt vấn đề

Vắc xin là một trong những biện pháp phòng ngừa bệnh truyền nhiễm hiệu quả và kinh tế nhất trong y học hiện đại. Trong số các vắc xin quan trọng, vắc xin phòng phế cầu khuẩn (pneumococcal vaccines) đóng vai trò then chốt trong việc giảm tỷ lệ mắc và tử vong do các bệnh do *Streptococcus pneumoniae* gây ra, đặc biệt ở trẻ em và người cao tuổi. Vắc xin Prevenar 13 (Pfizer) là vắc xin liên hợp polysaccharide-protein (PCV13) chứa các polysaccharide capsular được liên hợp với protein mang CRM197 (một dạng đột biến không độc của diphtheria toxin). Chất lượng của vắc xin liên hợp phụ thuộc rất lớn vào hàm lượng protein toàn phần và đặc biệt là tỷ lệ protein bound (protein đã liên kết với polysaccharide), vì tỷ lệ liên kết này quyết định tính miễn dịch và độ ổn định của vắc xin.

Theo khuyến cáo của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) và Dược điển châu Âu (European Pharmacopoeia)[1], việc kiểm tra hàm lượng protein toàn phần và protein bound là một trong những chỉ tiêu bắt buộc trong kiểm nghiệm chất lượng vắc xin liên hợp. Hàm lượng protein toàn phần của Prevenar 13 theo tiêu chuẩn nhà sản xuất dao động từ 43 – 86 µg/ml, trong đó tỷ lệ protein bound phải đạt ít nhất 70% so với protein toàn phần. Việc xác định chính xác

hai chỉ tiêu này không chỉ giúp đánh giá chất lượng lô vắc xin mà còn đảm bảo tính an toàn và hiệu quả khi đưa vào sử dụng trên cộng đồng.

Hiện nay, phương pháp phổ biến để định lượng protein trong vắc xin là các phương pháp quang phổ dựa trên phản ứng màu như Bradford, Bicinchoninic acid (BCA) và Lowry[2]. Trong đó, phương pháp Modified Lowry (cải tiến từ phương pháp Lowry cổ điển) được nhiều phòng thí nghiệm kiểm nghiệm vắc xin lựa chọn nhờ độ nhạy cao, khả năng chịu ảnh hưởng tương đối tốt từ các chất phụ gia trong công thức vắc xin (như nhôm phosphate hoặc nhôm hydroxide – chất tá dược phổ biến). Tuy nhiên, phương pháp này cũng có một số hạn chế vốn có như dễ bị nhiễu bởi các chất khử, detergent, và đặc biệt là sự hiện diện của ion kim loại trong vắc xin[3]. Việc thiếu dữ liệu thẩm định toàn diện có thể dẫn đến rủi ro trong đánh giá chất lượng vắc xin: kết quả không chính xác, sai lệch giữa các phòng thí nghiệm, hoặc khó khăn trong việc chấp nhận/không chấp nhận lô vắc xin khi kết quả nằm gần giới hạn tiêu chuẩn.

Mục tiêu cụ thể của nghiên cứu là thẩm định các chỉ tiêu: tính tuyến tính, độ đúng, độ chính xác (độ lặp lại và độ chính xác trung gian), độ đặc hiệu và giới hạn định lượng (LOQ) của quy trình xác định hàm lượng protein toàn phần và protein bound trong vắc xin Prevenar 13 theo phương pháp Modified Lowry, đáp ứng yêu cầu của tiêu chuẩn ISO/IEC 17025:2017. Việc hoàn thành nghiên cứu này không chỉ cung cấp cơ sở khoa học vững chắc cho hoạt động kiểm nghiệm mà còn góp phần nâng cao năng lực kỹ thuật của hệ thống kiểm định vắc xin quốc gia, đảm bảo chất lượng và an toàn của vắc xin khi được đưa vào sử dụng.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: quy trình xác định hàm lượng protein toàn phần/protein bound trong vắc xin Prevenar 13 theo phương pháp modified lowry.

2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thời gian nghiên cứu: Từ tháng 09 năm 2025 đến tháng 12 năm 2025.

Địa điểm nghiên cứu: Khoa Hóa lý, Viện kiểm định Quốc gia Vắc xin và sinh phẩm y tế.

2.3. Vật liệu và hoá chất

2.3.1. Mẫu thử

Vắc xin Prevenar 13, nhà sản xuất Pfizer: số lượng 160 liều (0,5 ml/liều/lọ), số loạt: LN6873, ngày sản xuất: 15/5/2024, hạn sử dụng: 15/05/2027.

2.3.2. Mẫu chuẩn

Dung dịch protein chuẩn 4 mg/ml, loạt số HC39025, ngày pha: 29/05/2025.

2.3.3. Thiết bị và dụng cụ

Máy đo quang phổ, máy lắc, cân phân tích, máy ly tâm, tủ hút, micropipet các loại đã được hiệu chuẩn, bảo dưỡng hàng năm theo tiêu chuẩn ISO/IEC 17025.

2.3.4. Hoá chất

Albumin Fraction V (Bovine Serum Albumin – BSA, hãng Sigma, A7906), Copper (II) sulfate pentahydrate (hãng

Merck, 1.02790.250), Potassium sodium tartrate tetrahydrate (hãng Merck, 1.08087.0500), Sodium hydroxide (hãng Merck, 1.06498.0500), Sodium carbonate (hãng Merck, 1.06392.1000), Sodium dodecyl sulfate (hãng Sigma, 436143-25G), Folin-Ciocalteu's phenol reagent (hãng Merck, 1.09001.0500), Sodium chloride (hãng Sigma, S7653-1KG) [4].

2.4. Thiết kế nghiên cứu

2.4.1. Tóm tắt quy trình của thử nghiệm

Quy trình xác định hàm lượng protein toàn phần và protein bound trong vắc xin Prevenar 13 được thực hiện theo phương pháp Modified Lowry. Với protein toàn phần, mẫu vắc xin được pha loãng trực tiếp. Với protein bound, 1000 µl mẫu được ly tâm ở 6000 g trong 10 phút, loại bỏ 920 µl nước nổi và bổ sung 920 µl NaCl 0,9% để hòa tan kết tủa.

Đường chuẩn được chuẩn bị với 7 điểm nồng độ Bovine Serum Albumin (BSA) (0; 10; 20; 40; 60; 80 và 100 µg) trong thể tích cuối cùng 1000 µl bằng cách hút lần lượt 0; 100; 200; 400; 600; 800 và 1000 µl dung dịch BSA 0,1 mg/ml, bổ sung NaCl 0,9% cho đủ thể tích. Mẫu QC và mẫu thử (500 µl) được đưa vào các ống tương ứng và bổ sung NaCl 0,9% cho đủ 1000 µl. Tiếp theo, thêm 500 µl Sodium dodecyl sulfate 10% vào tất cả các ống và lắc đều. Sau đó thêm 4,5 ml thuốc thử Lowry, ủ ở nhiệt độ phòng 10 phút, rồi thêm 500 µl thuốc thử Folin-Ciocalteu và ủ tiếp 30 phút. Độ hấp thụ (OD) được đo tại bước sóng 750 nm, sử dụng ống blank (0 µg) để căn zero. Mỗi mẫu được lặp lại hai lần và hàm lượng protein được tính từ đường chuẩn tuyến tính bằng phần mềm Microsoft Excel [4].

2.4.2. Thiết kế nghiên cứu

Bảng 1. Thiết kế nghiên cứu

TT	Tiêu chí	Bố trí thí nghiệm	Tiêu chuẩn chấp thuận
1	Tính tuyến tính	Bố trí 1 nhóm thực hiện quy trình thử nghiệm trong, 6 ngày khác nhau, sử dụng kết quả của đường chuẩn để tính kết quả.	- Hệ số tuyến tính $0,99 \leq R^2 \leq 1,0$ - Các giá trị đo được của từng điểm trên đường chuẩn phải nằm trong khoảng giá trị trung bình tại điểm đó ± 2SD - Độ chính xác ở từng điểm trên đường chuẩn: CV ≤ 11% [5, 6]. - Độ đúng ở từng điểm trên đường chuẩn: Độ thu hồi các điểm chuẩn nằm trong khoảng 80-110% [5, 6].
2	Độ chính xác	Độ lặp lại: Bố trí 1 nhóm thực hiện xác định hàm lượng protein toàn phần, protein bound trong mẫu thử lặp lại 9 lần trong cùng một ngày với cùng thiết bị, dụng cụ và loạt hóa chất.	- Hàm lượng protein toàn phần của từng lần phải nằm trong khoảng giá trị trung bình ± 2SD. - % CV ≤ 7,3% [5, 6].

		Độ chính xác trung gian: Bố trí 2 nhóm, mỗi nhóm thực hiện xác định hàm lượng protein toàn phần, protein bound trong 6 ngày khác nhau, sử dụng các loạt hóa chất, micropipet khác nhau.	- Hàm lượng protein toàn phần của từng lần làm của mỗi nhóm đối với mỗi loại mẫu thử phải nằm trong khoảng giá trị trung bình ± 2SD. -% CV ≤ 11% [5, 6].
3	Độ đúng	- Bố trí 1 nhóm thực hiện quy trình xác định hàm lượng protein toàn phần trong: Mẫu thử, mẫu thử thêm chuẩn protein 70 µg/ml với tỷ lệ 1:1, trong 6 ngày khác nhau. - Bố trí 1 nhóm thực hiện quy trình xác định hàm lượng protein bound trong: Mẫu thử, mẫu thử thêm chuẩn protein 60 µg/ml với tỷ lệ 1:1, trong 6 ngày khác nhau.	- Hệ số tuyến tính $0,99 \leq R^2 \leq 1,0$ - Các giá trị đo được của mỗi mẫu thử, mẫu thử thêm chuẩn, phải nằm trong khoảng giá trị trung bình mẫu đó ± 2SD - Hàm lượng protein mẫu chuẩn kiểm soát nằm trong tiêu chuẩn chấp thuận của lô mẫu kiểm soát đó. - Độ thu hồi (tính theo %) nằm trong khoảng *80% - 110%* [5, 6].
4	Tính đặc hiệu	- Bố trí 1 nhóm thực hiện thử nghiệm trên mẫu thử là dung dịch (NaCl 0,9% + nhôm 250 µg/ml**)** trong 6 ngày khác nhau, sử dụng cùng loại hoá chất, thuốc thử và thiết bị.	- Không cho tín hiệu phân tích đối với dung dịch (NaCl 0,9% + nhôm 250 **µg/ml).** - Tín hiệu được xác nhận là không có tín hiệu khi: OD mẫu - OD blank ≤ 3*SD blank [8]
5	Ước lượng giới hạn định lượng	- Sử dụng kết quả OD của đường chuẩn trong 12 thử nghiệm trong xác định độ chính xác trung gian, dùng phần mềm Excel tính sai số chuẩn của phương trình đường chuẩn và độ dốc của đường chuẩn. - Sử dụng phần mềm Excel tính: + LOQ = 10*s/a Trong đó: s: sai số chuẩn của phương trình đường chuẩn y = ax + b a: độ dốc của đường chuẩn * Bố trí thử nghiệm: Bố trí 1 nhóm thực hiện phân tích mẫu thử được pha loãng tại nồng độ LOQ và nồng độ nhỏ hơn LOQ trong 5 ngày khác nhau.	- LOQ là nồng độ pha loãng nhỏ nhất thỏa mãn độ đúng và độ chính xác theo AOAC phụ lục F tại nồng độ đó.

2.5. Phương pháp nghiên cứu

2.5.1. Xử lý và phân tích số liệu

Phân tích thống kê xử lý số liệu bằng phần mềm Microsoft Excel. Sử dụng phần mềm Microsoft Excel dựng đường chuẩn tương quan giữa khối lượng BSA (µg) và kết quả đo quang (OD).

Tính khối lượng protein có trong 500 µl mẫu thử tham gia phản ứng dựa trên đường chuẩn. Hàm lượng protein toàn phần trong mẫu được tính theo công thức:

*** Hàm lượng Protein toàn phần (µg/ml) = (E x k x p)/0,5**

Trong đó:

E: khối lượng protein có trong 500 µl mẫu thử tìm được trên đường chuẩn (µg)

k: tỷ số giữa khối lượng cân thực tế của Albumin Fraction V so với khối lượng cân lý thuyết khi pha dung dịch BSA 0,1 mg/ml (k=1 khi pha dung dịch BSA 0,1 mg/ml từ Protein standard 200 mg/ml)

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

0,5: thể tích mẫu tham gia phản ứng (ml)

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

*** Hàm lượng Protein-bound (µg/ml) = (E x k x p)/0,5**

Trong đó:

E: khối lượng protein-bound có trong 500 µl mẫu thử tìm được trên đường chuẩn (µg)

k: tỷ số giữa khối lượng cân thực tế của Albumin Fraction V so với khối lượng cân lý thuyết khi pha dung dịch BSA 0,1 mg/ml (k=1 khi pha dung dịch BSA 0,1 mg/ml từ Protein standard 200 mg/ml)

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

0,5: thể tích mẫu tham gia phản ứng (ml)

% Protein-bound được tính theo công thức:

*** % Protein-bound = Protein-bound (µg/ml)/Protein toàn phần (µg/ml) x 100**

*** Độ thu hồi (%) được tính theo công thức:**

Độ thu hồi (%) = ($C_{thêm\ chuẩn}$ - $C_{mẫu\ thử}$) x100 / $C_{chuẩn\ thêm}$,

Trong đó:

$C_{thêm\ chuẩn}$: Hàm lượng protein đo được của mẫu thử đã thêm chuẩn (µg/ml)

$C_{mẫu\ thử}$: Hàm lượng protein đo được của mẫu thử không thêm chuẩn (µg/ml)

$C_{chuẩn\ thêm}$: Nồng độ protein chuẩn đã thêm vào mẫu (µg/ml)

2.5.2. Tiêu chuẩn đánh giá thử nghiệm

Thử nghiệm có giá trị khi:

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

+ Độ lệch kết quả giữa 2 lần thử nghiệm không vượt quá 7,3% (CV≤ 7,3%) (theo AOAC).

+ Hàm lượng protein có trong mẫu QC nằm trong khoảng giá trị chấp thuận của lô mẫu QC tương ứng.

Tiêu chuẩn đánh giá kết quả thử nghiệm:

+ Hàm lượng protein toàn phần của vắc xin Prevenar 13 nằm trong mức tiêu chuẩn chấp thuận của nhà sản xuất: 43 - 86 µg/ml.

+ Hàm lượng protein bound của vắc xin Prevenar 13 nằm trong mức tiêu chuẩn chấp thuận của nhà sản xuất: ≥ 70% so với hàm lượng protein toàn phần.

3. Kết quả

3.1. Tính tuyến tính/vùng tuyến tính

Bảng 2. Giá trị OD của từng điểm chuẩn trên đường chuẩn

Điểm chuẩn (µg)	10	20	40	**60**	**80**	**100**
Ngày 1	0,033	0,058	0,109	0,162	0,196	0,236
Ngày 2	0,029	0,059	0,107	0,157	0,205	0,240
Ngày 3	0,032	0,056	0,104	0,163	0,200	0,237
Ngày 4	0,034	0,061	0,110	0,164	0,199	0,241
Ngày 5	0,030	0,055	0,102	0,156	0,201	0,235
Ngày 6	0,032	0,060	0,108	0,161	0,204	0,239
TB	0,032	0,058	0,107	0,161	0,201	0,238
SD	0,0019	0,0023	0,0031	0,0033	0,0033	0,0024
TB+2SD	0,035	0,063	0,113	0,167	0,207	0,243
TB-2SD	0,028	0,054	0,101	0,154	0,194	0,233
CV %	5,88	3,98	2,88	2,04	1,65	0,99

Bảng 3. Độ thu hồi của từng điểm trên đường chuẩn

Điểm chuẩn (µg)	**10**	**20**	**40**	**60**	**80**	**100**	**R^2**
Ngày 1	0,033	0,058	0,109	0,162	0,196	0,236	0,9929
Độ thu hồi (%)	103,27	104,41	106,04	107,99	98,94	96,04	
Ngày 2	0,029	0,059	0,107	0,157	0,205	0,240	0,9959
Độ thu hồi (%)	93,89	108,63	103,66	103,38	102,21	96,16	
Ngày 3	0,032	0,056	0,104	0,163	0,200	0,237	0,9938
Độ thu hồi (%)	105,40	102,61	101,21	108,37	100,51	95,80	
Ngày 4	0,034	0,061	0,110	0,164	0,199	0,241	0,9935
Độ thu hồi (%)	103,51	107,92	104,92	107,39	98,74	96,47	
Ngày 5	0,030	0,055	0,102	0,156	0,201	0,235	0,9960
Độ thu hồi (%)	102,66	103,64	101,00	105,00	102,29	96,06	
Ngày 6	0,032	0,060	0,108	0,161	0,204	0,239	0,9944
Độ thu hồi (%)	99,94	107,91	103,62	105,64	101,47	95,66	

Số liệu thu thập được cho thấy: Các giá trị R^2 thoả mãn yêu cầu $0,99 \leq R^2 \leq 1,0$; các giá trị đo được của từng điểm trên đường chuẩn nằm trong khoảng giá trị trung bình tại điểm đó ± 2SD; độ chính xác ở từng điểm trên đường chuẩn thoả mãn yêu cầu CV ≤ 11%; kết quả độ thu hồi các điểm chuẩn thoả mãn yêu cầu 80 - 110%. Thử nghiệm đạt yêu cầu về tính tuyến tính.

3.2. Độ chính xác

3.2.1. Độ lặp lại

Bảng 4. Kết quả hàm lượng protein toàn phần trong 9 lần lặp lại

Lần thực hiện	Hàm lượng protein toàn phần (µg/ml)
Lần 1	69,83
Lần 2	72,32
Lần 3	70,66
Lần 4	71,49
Lần 5	70,66
Lần 6	70,66
Lần 7	71,49
Lần 8	69,83
Lần 9	69,83
TB	70,75
SD	0,8735
TB+2SD	72,50
TB-2SD	69,00
CV %	1,24

Số liệu thu thập được cho thấy: Hàm lượng Protein toàn phần của mẫu thử từng lần đều nằm trong khoảng giá trị trung bình ± 2SD; % CV = 1,24 % ≤ 7,3%.

Bảng 5. Kết quả hàm lượng protein bound trong 9 lần lặp lại

Lần thực hiện	Hàm lượng protein bound (µg/ml)
Lần 1	62,35
Lần 2	60,69
Lần 3	62,35
Lần 4	62,35
Lần 5	62,35
Lần 6	61,52
Lần 7	61,52
Lần 8	63,18
Lần 9	62,35
TB	62,08
SD	0,7192
TB+2SD	63,52
TB-2SD	60,64
CV %	1,16

Số liệu thu thập được cho thấy: Hàm lượng Protein bound của mẫu thử từng lần đều nằm trong khoảng giá trị trung bình ± 2SD; % CV = 1,16 % ≤ 7,3%

Thử nghiệm đạt yêu cầu về độ lặp lại.

3.2.2. Độ chính xác trung gian

Bảng 6. Kết quả hàm lượng protein toàn phần của nhóm 1

Ngày thử nghiệm	Hàm lượng protein toàn phần (µg/ml)
Ngày 1	71,32
Ngày 2	72,24
Ngày 3	71,40
Ngày 4	73,54
Ngày 5	74,94
Ngày 6	70,07
TB	72,25
SD	1,7459
TB+2SD	75,74
TB-2SD	68,76
CV %	2,42

Bảng 7. Kết quả hàm lượng protein toàn phần của nhóm 2

Ngày thử nghiệm	Hàm lượng protein toàn phần (µg/ml)
Ngày 1	72,11
Ngày 2	70,09
Ngày 3	71,73

Ngày 4	71,30
Ngày 5	72,84
Ngày 6	69,69
TB	71,29
SD	1,2057
TB+2SD	73,70
TB-2SD	68,88
CV %	1,69

Bảng 8. Kết quả độ chính xác trung gian 2 nhóm

Hàm lượng protein toàn phần (µg/ml)		
Ngày	Nhóm 1	Nhóm 2
1	71,32	72,11
2	72,24	70,09
3	71,40	71,73
4	73,54	71,30
5	74,94	72,84
6	70,07	69,69
TB chung	71,77	
SD chung	1,52	
CV% chung	2,11	

Số liệu thu thập được cho thấy: Hàm lượng protein toàn phần của từng lần làm của mỗi nhóm nằm trong khoảng giá trị trung bình ± 2SD; CV của 2 nhóm lần lượt 2,42%; 1,69%, CV chung giữa 2 nhóm: 2,11% ≤ 11%. Thử nghiệm đạt yêu cầu về độ chính xác trung gian.

Bảng 9. Kết quả hàm lượng protein bound của nhóm 1

Ngày thử nghiệm	Hàm lượng protein bound (µg/ml)
Ngày 1	63,30
Ngày 2	62,37
Ngày 3	61,42
Ngày 4	62,72
Ngày 5	63,22
Ngày 6	63,03
TB	62,68
SD	0,7048
TB+2SD	64,09
TB-2SD	61,27
CV %	1,12

Bảng 10. Kết quả hàm lượng protein bound của nhóm 2

Ngày thử nghiệm	Hàm lượng protein bound (µg/ml)
Ngày 1	65,08
Ngày 2	60,99
Ngày 3	64,24
Ngày 4	63,44
Ngày 5	64,47
Ngày 6	62,78
TB	63,50
SD	1,4702
TB+2SD	66,44
TB-2SD	60,56
CV %	2,32

Bảng 11. Kết quả độ chính xác trung gian 2 nhóm

Hàm lượng protein bound (µg/ml)		
Ngày thử nghiệm	Nhóm 1	Nhóm 2
1	63,30	65,08
2	62,37	60,99
3	61,42	64,24
4	62,72	63,44
5	63,22	64,47
6	63,03	62,78
TB chung	63,09	
SD chung	1,18	
CV% chung	1,87	

Số liệu thu thập được cho thấy: Hàm lượng protein bound của từng lần làm của mỗi nhóm nằm trong khoảng giá trị trung bình ± 2SD; CV của 2 nhóm lần lượt 1,12%; 2,32%, CV chung giữa 2 nhóm: 1,87% ≤ 11%. Thử nghiệm đạt yêu cầu về độ chính xác trung gian.

3.3. Độ đúng

Bảng 12. Kết quả thử nghiệm độ đúng protein toàn phần

Ngày thử nghiệm		Hàm lượng protein toàn phần (µg/ml)		Độ thu hồi
Mẫu thử		Mẫu thêm chuẩn		(%)
Ngày 1		71,32	65,83	100,57
Ngày 2		72,24	66,89	102,58
Ngày 3		71,40	66,00	100,98
Ngày 4		73,54	66,05	97,60
Ngày 5		74,94	67,41	99,79
Ngày 6		70,07	64,69	98,84
	TB	72,25	66,15	
	SD	1,7459	0,9382	
	TB+2SD	75,74	68,02	
	TB-2SD	68,76	64,27	
	CV (%)	2,42	1,54	

Số liệu thu thập được cho thấy: Hàm lượng protein của mẫu thử và mẫu thêm chuẩn từng lần đều nằm trong khoảng giá trị trung bình ± 2SD; kết quả độ thu hồi của dung dịch BSA 70 µg/ml thoả mãn yêu cầu nằm trong khoảng 80% - 110%. Thử nghiệm đạt yêu cầu về độ đúng.

Bảng 13. Kết quả thử nghiệm độ đúng protein bound

Ngày thử nghiệm		Hàm lượng protein bound (µg/ml)		Độ thu hồi
		Mẫu thử	Mẫu thêm chuẩn	(%)
Ngày 1		63,30	61,19	98,46
Ngày 2		62,37	61,55	101,21
Ngày 3		61,42	61,00	100,98
Ngày 4		62,72	61,47	100,37
Ngày 5		63,22	61,55	99,79
Ngày 6		63,03	61,79	100,91
	TB	62,68	61,40	
	SD	0,7048	0,3097	
	TB+2SD	64,09	62,02	
	TB-2SD	61,27	60,78	
	CV (%)	1,12	0,50	

Số liệu thu thập được cho thấy: Hàm lượng protein của mẫu thử và mẫu thêm chuẩn từng lần đều nằm trong khoảng giá trị trung bình ± 2SD; kết quả độ thu hồi của dung dịch BSA 60 µg/ml thoả mãn yêu cầu nằm trong khoảng 80% - 110% . Thử nghiệm đạt yêu cầu về độ đúng.

3.4. Tính đặc hiệu

Bảng 14. Kết quả đo quang điểm blank

Ngày thử nghiệm	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Kết quả đo quang (OD)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
TB	0,000					
SD	0,000					
3SD	0,000					

Bảng 15. Kết quả đo quang mẫu thử không có protein

Ngày thử nghiệm	1	2	3	4	5	**6**
Kết quả đo quang (OD)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Từ số liệu thu được, các kết quả đo quang của mẫu thử không có protein đều thoả mãn yêu cầu $|$OD mẫu - OD blank$| \leq$ 3*SD blank (0,000). Thử nghiệm không cho tín hiệu phân tích với mẫu thử không chứa protein (NaCl 0,9% + nhôm 250 µg/ml) thử nghiệm đạt yêu cầu về tính đặc hiệu.

3.5. LOQ

Bảng 16. Kết quả đo quang của đường chuẩn trong 12 ngày thử nghiệm

Điểm chuẩn (µg)	10	20	40	60	80	**100**	**a**	**s**
Ngày 1	0,033	0,058	0,109	0,162	0,196	0,236	0,0024	0,001208
Phương trình y=ax+b	y = 0,0024x + 0,0093							
Ngày 2	0,029	0,059	0,107	0,157	0,205	0,240	0,0024	0,001232
Phương trình y=ax+b	y = 0,0024x + 0,0066							
Ngày 3	0,032	0,056	0,104	0,163	0,200	0,237	0,0024	0,001229
Phương trình y=ax+b	y = 0,0024x + 0,0073							
Ngày 4	0,034	0,061	0,110	0,164	0,199	0,241	0,0024	0,001236
Phương trình y=ax+b	y = 0,0024x + 0,0098							
Ngày 5	0,030	0,055	0,102	0,156	0,201	0,235	0,0024	0,001228
Phương trình y=ax+b	y = 0,0024x + 0,0059							

Ngày 6	0,032	0,060	0,108	0,161	0,204	0,239	0,0024	0,001221
Phương trình y=ax+b	y = 0,0024x + 0,0085							
Ngày 7	0,028	0,057	0,105	0,158	0,197	0,242	0,0024	0,001227
Phương trình y=ax+b	y = 0,0024x + 0,0055							
Ngày 8	0,035	0,062	0,111	0,165	0,206	0,239	0,0024	0,001219
Phương trình y=ax+b	y = 0,0024x + 0,0106							
Ngày 9	0,031	0,058	0,103	0,159	0,198	0,240	0,0024	0,001224
Phương trình y=ax+b	y = 0,0024x + 0,0068							
Ngày 10	0,030	0,059	0,106	0,162	0,202	0,238	0,0024	0,001239
Phương trình y=ax+b	y = 0,0024x + 0,0075							
Ngày 11	0,033	0,056	0,109	0,157	0,200	0,238	0,0024	0,001215
Phương trình y=ax+b	y = 0,0024x + 0,0080							
Ngày 12	0,029	0,061	0,104	0,163	0,199	0,247	0,0024	0,001234
Phương trình y=ax+b	y = 0,0024x + 0,0062							
TB	0,031	0,059	0,107	0,161	0,201	0,239	0,0024	0,001226

Từ kết quả trên tính được: LOQ = 10*s/a = 5,11 µg/ml. Xác định lại LOQ thực nghiệm bằng cách khảo sát kết quả đo của mẫu có nồng độ bằng và nhỏ hơn LOQ lý thuyết. Sử dụng kết quả đo hàm lượng protein của mẫu thử trong 6 lần thử nghiệm độ đúng để tính toán nồng độ LOQ thực nghiệm.

Trung bình hàm lượng protein thu được trong mẫu thử trong 6 lần thử nghiệm độ đúng: 71,49 µg/ml. Thực hiện thử nghiệm trên mẫu thử với 2 nồng độ: 5,11 µg/ml (mẫu thử pha loãng 14 lần) và 3,97 µg/ml (mẫu thử pha loãng 18 lần). Ta thu được kết quả như bảng sau:

Bảng 17. Kết quả thử nghiệm của mẫu có nồng độ 5,11 µg/ml

Ngày thử nghiệm	1	2	3	4	5	TB	SD	CV%
Hàm lượng protein µg/ml	5,35	4,61	5,44	4,86	4,93	5,038	0,34	6,91
Độ thu hồi (%)	104,68	90,31	106,42	95,05	96,52	99,115		

Bảng 18. Kết quả thử nghiệm của mẫu có nồng độ 3,97 µg/ml

Ngày thử nghiệm	1	2	3	4	5	TB	SD	CV%
Hàm lượng protein µg/ml	3,47	2,99	3,85	3,43	3,69	3,486	0,32	9,33
Độ thu hồi (%)	87,34	75,23	96,9	86,38	93,05	86,46		

Giới hạn định lượng (LOQ) lý thuyết được tính theo công thức LOQ = 10*s/a = 5,11 µg/ml. Để xác nhận LOQ thực nghiệm, mẫu thử được pha loãng về mức 5,11 µg/ml và mức thấp hơn (3,97 µg/ml), sau đó đánh giá đồng thời độ chính xác và độ đúng trong 5 ngày khác nhau. Tại nồng độ 5,11 µg/ml:

Độ chính xác: CV = 6,91% (≤ 11%)

Độ đúng: độ thu hồi dao động từ 90,31% đến 104,68% (nằm trong khoảng 80–110%)

Tại nồng độ 3,97 µg/ml, mặc dù CV = 9,33% vẫn đạt yêu cầu về độ chính xác, nhưng xuất hiện giá trị độ thu hồi 75,23% nằm ngoài khoảng chấp nhận, nên không đạt. Do đó, LOQ thực nghiệm của phương pháp được xác định là 5,11 µg/ml.

4. Bàn luận

Kết quả thẩm định quy trình xác định hàm lượng protein toàn phần và protein bound trong vắc xin Prevenar 13 theo phương pháp Modified Lowry cho thấy phương pháp đạt được tất cả các tiêu chí kỹ thuật theo yêu cầu của tiêu chuẩn ISO/IEC 17025:2017 và các hướng dẫn liên quan của AOAC và ICH.

Về tính tuyến tính, đường chuẩn BSA trong khoảng 10–100 µg cho hệ số tương quan R^2 vượt yêu cầu tối thiểu 0,99. Độ thu hồi tại các điểm chuẩn nằm hoàn toàn trong khoảng chấp thuận 80–110%. Độ chính xác tại từng điểm trên đường chuẩn với CV% từ 0,99% đến 5,88%, chứng tỏ đường chuẩn ổn định và có khả năng tái lặp cao qua 6 ngày thực nghiệm khác nhau. Điều này khẳng định vùng làm việc của phương pháp phù hợp với hàm lượng protein trong vắc xin Prevenar (43–86 µg/ml).

Độ chính xác của phương pháp đạt yêu cầu. Độ lặp lại với 9 lần lặp lại trong cùng một ngày cho CV% chỉ 1,24% (protein toàn phần) và 1,16% (protein bound), thấp hơn nhiều so với giới hạn AOAC cho phép (≤ 7,3%). Độ chính xác trung gian giữa hai nhóm thực hiện trong 6 ngày khác nhau, sử dụng hóa chất và thiết bị khác nhau cũng chỉ đạt CV% chung lần lượt là 2,11% và 1,87%. Những giá trị này cho thấy phương pháp ít bị ảnh hưởng bởi sự thay đổi điều kiện thí nghiệm, đảm bảo độ tin cậy khi áp dụng trong kiểm nghiệm thường quy.

Kết quả độ đúng qua thí nghiệm bổ sung chuẩn cũng rất cao. Độ thu hồi trung bình của protein toàn phần đạt 98,84–102,58% và protein bound đạt 98,46–101,21%, nằm trong khoảng 80–110%. Điều này chứng minh phương pháp có khả năng định lượng chính

xác cả hai dạng protein mà không bị ảnh hưởng đáng kể bởi sự phức tạp của vắc xin.

Quy trình có độ đặc hiệu cao. Khi thử nghiệm trên mẫu (NaCl 0,9% + nhôm 250 µg/ml) không chứa protein, tín hiệu OD thu được đều bằng 0, hoàn toàn thỏa mãn tiêu chí |OD mẫu – OD blank| ≤ 3SD blank. Bước xử lý mẫu protein bound bằng ly tâm và hòa tan lại đã loại bỏ hiệu quả tác động nhiễu của tá dược nhôm – một yếu tố thường gây khó khăn cho các phương pháp định lượng protein trong vắc xin.

Giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp được xác định là 5,11 µg/ml. Tại nồng độ này, phương pháp vẫn đảm bảo độ chính xác (CV% = 6,91%) và độ thu hồi (90,31–104,68%) đạt yêu cầu. Kết quả này cho phép phương pháp phát hiện và định lượng chính xác protein ở mức thấp, phù hợp với việc kiểm tra các mẫu pha loãng hoặc vắc xin có hàm lượng protein gần giới hạn dưới.

Tuy nhiên, nghiên cứu vẫn còn một số hạn chế. Thí nghiệm chỉ được thực hiện trên một lô vắc xin Prevenar cụ thể. Ngoài ra, độ bền vững của phương pháp với các lô hóa chất khác nhau hoặc các điều kiện môi trường phòng thí nghiệm khác chưa được đánh giá sâu. Trong tương lai, cần mở rộng nghiên cứu trên nhiều lô vắc xin, các loại vắc xin liên hợp khác nhau và đánh giá thêm tính bền vững của phương pháp.

Tóm lại, quy trình Modified Lowry được thẩm định trong nghiên cứu này có độ tin cậy cao, phù hợp để áp dụng vào công tác kiểm định chất lượng vắc xin Prevenar 13 thường quy tại Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế. Việc áp dụng thành công phương pháp sẽ góp phần nâng cao năng lực kiểm nghiệm, đảm bảo chất lượng vắc xin cung cấp cho chương trình tiêm chủng quốc gia.

5. Kết luận

Quy trình xác định hàm lượng protein toàn phần và protein bound trong vắc xin Prevenar 13 theo phương pháp Modified Lowry đã được thẩm định toàn phần theo yêu cầu của ISO/IEC 17025:2017. Kết quả thẩm định cho thấy:

Tính tuyến tính: hệ số xác định R^2 = 0,9929–0,9960.

Độ lặp lại: CV = 1,24% (protein toàn phần) và 1,16% (protein bound).

Độ chính xác trung gian: CV = 2,11% (protein toàn phần) và 1,87% (protein bound).

Độ đúng: độ thu hồi đạt 95,66–107,91% (các điểm trên đường chuẩn) và 98,46–102,58% (thí nghiệm thêm chuẩn).

Độ đặc hiệu: đạt yêu cầu, mẫu không chứa protein không cho tín hiệu phân tích.

Giới hạn định lượng (LOQ) thực nghiệm: 5,11 µg/ml.

Phương pháp đạt yêu cầu kỹ thuật và phù hợp để áp dụng vào công tác kiểm định chất lượng thường quy vắc xin Prevenar 13 tại Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế.

Tài liệu tham khảo

[1] European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). *European Pharmacopoeia*. 11.0th ed. Chapter 2.5.33, Total protein (Method 2 – Lowry assay). Strasbourg: Council of Europe; 2022.

[2] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-275.

[3] Lee NA, et al. Improved quantification of protein in vaccines containing aluminum hydroxide by simple modification of the Lowry method. *Vaccine*. 2015;33(39):5031-5034.

[4] Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế. *SOP KĐQG-34: Quy trình chuẩn thẩm định quy trình*. Lần ban hành 7. Hà Nội: Bộ Y tế; 2023.

[5] AOAC International. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements [Internet]. Gaithersburg: AOAC International; 2016 [cited 2026 June 1]. Available from: https://www.aoac.org/

[6] Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng. *TCVN 10861:2015 (ISO 21748:2010): Hướng dẫn ước lượng độ lặp lại, độ tái lặp và độ đúng trong ước lượng độ không đảm bảo đo*. Hà Nội: Bộ Khoa học và Công nghệ; 2015.

[7] International Organization for Standardization. *ISO 21748:2010: Guide for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty in measurement estimation*. Geneva: ISO; 2010.

[8] International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). *ICH Q2(R2): Validation of analytical procedures* [Internet]. Geneva: ICH; 2023 [cited 2026 June 1]. Available from: https://www.ich.org/page/quality-guidelines