

ESTABLISHING THE PROCEDURE FOR DETERMINATION OF THE MOLECULAR SIZE DISTRIBUTION OF PROTEINS IN BIOLOGICAL PRODUCTS CONTAINING HUMAN ALBUMIN- AND HUMAN IMMUNOGLOBULIN BY SIZE-EXCLUSION CHROMATOGRAPHY

Canh Huyen Trang*, Duong Thi Cam Le, Dam Thi Lieu,
Pham Quang Minh, Nguyen Quyet Thang

** The National Institute for Control of Vaccines and Biologicals*

Received 3 February 2023

Accepted 20 March 2023

Abstract: Quality control of human albumin and human immunoglobulin products is critical to ensure the safety and efficacy. This study was conducted to establish a general procedure for determination of the molecular size distribution of proteins in human albumin and human immunoglobulin products in accordance with the actual conditions of the Chemical - Physical Department, NICVB. The study used descriptive experimental method in the laboratory. The procedure for determination of the molecular size distribution of proteins in Human Albumin Baxter 200 g/l and IV Globulin products was performed on a Thermo Scientific HPLC chromatography system, using a TSK G3000SW Column (7.5 mm x 60 cm) and DAD detector with the following optimal parameters: concentration of test sample 1%, concentration of standard 1%, concentration of mobile phase: 40 mM phosphate buffer, 200 mM NaCl, 0.005% sodium azide, flow rate 0,5 ml/min. The procedure validation has been conducted with system suitability, precision, robustness, specificity, and the uncertainty of Monomer + Dimer and Polymer + Aggregate in Human Albumin Baxter 200 g/l are 0,1285% and 0,1285% respectively, in IV Globulin are 0.0463% and 0.0255% respectively (with 95% confidence). The study has successfully provided a general procedure for determination of the molecular size distribution of proteins in human albumin and human immunoglobulin products. The procedure has been validated and is suitable for practical conditions at the Department.

Keywords: molecular size distribution, albumin, immunoglobulins, chromatography, size exclusion-high-performance liquid chromatography.

* Corresponding author
E-mail address: canhhuyentrang@gmail.com
<https://doi.org/10.56086/jcvb.v3i1.82>

XÂY DỰNG QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH SỰ PHÂN BỐ KÍCH THƯỚC PHÂN TỬ CỦA PROTEIN TRONG CÁC SINH PHẨM CHỨA ALBUMIN VÀ GLOBULIN MIỄN DỊCH NGƯỜI BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ RÂY PHÂN TỬ

Cảnh Huyền Trang*, Đường Thị Cẩm Lệ, Đàm Thị Liễu,
Phạm Quang Minh, Nguyễn Quyết Thắng

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

Nhận ngày 3 tháng 2 năm 2023

Chấp nhận đăng ngày 20 tháng 3 năm 2023

Tóm tắt: Kiểm soát chất lượng các sản phẩm albumin và globulin miễn dịch người là rất quan trọng để đảm bảo tính an toàn cũng như hiệu quả của sản phẩm. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm xây dựng quy trình chung xác định sự phân bố kích thước phân tử protein trong các sinh phẩm chứa albumin và globulin miễn dịch người phù hợp với điều kiện thực tế của Khoa Kiểm định Hoá lý. Nghiên cứu sử dụng phương pháp mô tả thực nghiệm trong phòng thí nghiệm. Quy trình xác định sự phân bố kích thước phân tử protein trong sản phẩm Human Albumin Baxter 200 g/l và IV Globulin thực hiện trên hệ thống sắc ký HPLC Thermo Scientific, sử dụng cột Cột TSK G3000SW (7,5 mm x 60 cm) và detector DAD với các thông số được tối ưu: nồng độ mẫu thử 1%, nồng độ mẫu chuẩn 1%, nồng độ pha động: 40 mM đệm phosphate, 200 mM NaCl, 0,005% sodium azide, tốc độ dòng 0,5 ml/phút. Quy trình đã được xác nhận giá trị sử dụng với độ chính xác, độ mạnh, độ đặc hiệu đạt yêu cầu, độ không đảm bảo đo đối với Monomer + Dimer và Polymer + Aggregate trên mẫu Human Albumin Baxter 200 g/l là 0,1285%, đối với mẫu IV Globulin lần lượt là 0,0463% và 0,0255% (với độ tin cậy 95%). Nghiên cứu đã thành công đưa ra quy trình chung xác định sự phân bố kích thước phân tử protein trong các sinh phẩm chứa albumin và globulin miễn dịch người, quy trình đã được xác nhận giá trị sử dụng và phù hợp với điều kiện thực tế tại Khoa.

Từ khoá: *phân bố kích thước phân tử, albumin, globulin miễn dịch, sắc ký, sắc ký rây phân tử.*

1. Đặt vấn đề

Albumin và globulin miễn dịch là những sản phẩm thuộc nhóm sinh phẩm điều trị cho người. Các chế phẩm albumin và globulin miễn dịch được sử dụng trong lâm sàng hiện nay trong thành phần đều chứa protein ở dạng monomer, dimer, một lượng nhỏ các polymer và aggregates (tụ protein). Cấu trúc của albumin là protein ở dạng monomer, globulin miễn dịch chứa chủ yếu là IgG và IgG có cấu trúc là protein ở dạng monomer. Ở điều kiện sinh lý, các phân tử protein thường có dạng cấu trúc sao cho các **đoạn** amino acid kỵ

nước (hydrophobic) được „giấu“ vào bên trong, còn các **đoạn ưa nước** (hydrophilic) thường lộ ra bề mặt của cấu trúc này [1]. Vì một lý do nào đó, cấu trúc protein bị thay đổi, các đoạn kỵ nước bị lộ ra ngoài. Điều này dẫn tới việc các phân tử protein này có xu hướng „aggregate“ (tụ) lại với nhau tạo thành các polymer và aggregate. Các báo cáo gần đây đã bày tỏ lo ngại về tính an toàn của các chế phẩm immunoglobulin (IgG) tiêm tĩnh mạch cho người. Các bằng chứng dường như chỉ ra rằng, các chất kết tụ (aggregates) trong công thức này là nguyên nhân gây ra một số phản ứng bất lợi ở một

số bệnh nhân, bao gồm cả phản vệ và khó thở. Do đó, theo dõi sự phân bố kích thước phân tử của protein trong các sản phẩm này là điều cần thiết để đảm bảo tính an toàn của sản phẩm [2]. Theo Dược Điển Châu Âu, Dược Điển Mỹ thử nghiệm đánh giá sự phân bố kích thước phân tử của protein trong các sản phẩm albumin và globulin miễn dịch là thử nghiệm bắt buộc và là một trong những thử nghiệm quan trọng nhất trong đánh giá chất lượng của các sinh phẩm [3,5]. Dược Điển Châu Âu quy định hàm lượng các chất tạp không mong muốn ở trong chế phẩm albumin như polymer và tụ protein không được vượt quá 5% [3,4].

Hiện nay, các nhà sản xuất chủ yếu sử dụng SEC-HPLC để xác định sự phân bố kích thước phân tử của protein trong các sinh phẩm chứa albumin và globulin miễn dịch [6]. Tuy nhiên mỗi nhà sản xuất sử dụng loại cột khác nhau, thành phần pha động khác nhau, nồng độ mẫu thử và mẫu chuẩn đưa qua cột khác nhau, tốc độ dòng khác nhau. Do đó, để xây dựng một quy trình chung áp dụng cho các loại sinh phẩm chứa albumin và globulin miễn dịch kiểm định tại Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế và cũng 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 [7], chúng tôi tiến hành thực hiện nghiên cứu: “*Nghiên cứu xây dựng quy trình xác định sự phân bố kích thước phân tử của protein trong các sinh phẩm chứa albumin và globulin miễn dịch người bằng phương pháp sắc ký rây phân tử*” với mục tiêu:

1. Xây dựng và tối ưu hóa quy trình xác định sự phân bố kích thước phân tử của protein trong các sinh phẩm chứa albumin

và globulin miễn dịch người bằng phương pháp sắc ký rây phân tử.

2. Thẩm định quy trình thử nghiệm xác định sự phân bố kích thước phân tử của protein trong các sinh phẩm chứa albumin và globulin miễn dịch người bằng phương pháp sắc ký rây phân tử”.

3. Ước lượng độ không đảm bảo đo cho kết quả thử nghiệm xác định sự phân bố kích thước phân tử của protein trong các sinh phẩm chứa albumin và globulin miễn dịch người bằng phương pháp sắc ký rây phân tử trên mẫu Human Albumin Baxter 200 g/l và IV Globulin.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu: Quy trình xác định sự phân bố kích thước phân tử của protein trong các sinh phẩm chứa albumin và globulin miễn dịch người bằng phương pháp sắc ký rây phân tử.

2.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

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

- Thời gian nghiên cứu: Từ tháng 6 năm 2021 đến tháng 6 năm 2022.

2.3. Nguyên vật liệu, thiết bị sử dụng trong nghiên cứu

2.3.1. Mẫu thử

- IV Globulin (đại diện cho nhóm sinh phẩm chứa Globulin miễn dịch người), nhà sản xuất: Green Cross Corporation – Korea, số lượng: 50 ml, Loạt số: 352B12003, hạn dùng: 02/05/2023, số lượng: 01 lọ.

- Human Albumin Baxter 200 g/l (đại diện cho nhóm sinh phẩm chứa Albumin), nhà sản xuất: Baxter AG – Austria, số

lượng: 50 ml, loạt số: A1V410AA, hạn dùng: 31/08/2022, số lượng: 01 lọ.

- Mẫu trắng (PTN tự pha): Dung dịch NaCl 0,9% + nhôm 100 mg/l: 100 ml.

2.3.2. Mẫu chuẩn

- Human Immunoglobulin BRP (Reference Standard), hãng EDQM, mã code: hạn sử dụng: 07/2023

- Human Albumin (độ tinh khiết 99%), hãng Sigma, mã code: hạn sử dụng: 11/2023

2.3.3. Thiết bị, dụng cụ, hoá chất

- Thiết bị: Hệ thống sắc ký Thermo Scientific bao gồm: Bộ bơm mẫu tự động (Model: WPS-3000TSL, seri: 8158528); Bơm phân phối dung môi (pump, model: LPG-3400SD, seri: 8158349); Buồng cột (model: TCC-3000SD, seri: 6022715), Đầu dò DAD (model: DAD-3000, seri: 8158306); Cột phân tích TSK G3000SW/

tiền cột (code: 0005103/005371). Hệ thống đã được đánh giá IQ, OQ, PQ. Các thiết bị khác: cân điện tử, máy lắc, micropipet đã được hiệu chuẩn, bảo dưỡng hàng năm theo tiêu chuẩn ISO/IEC 17025.

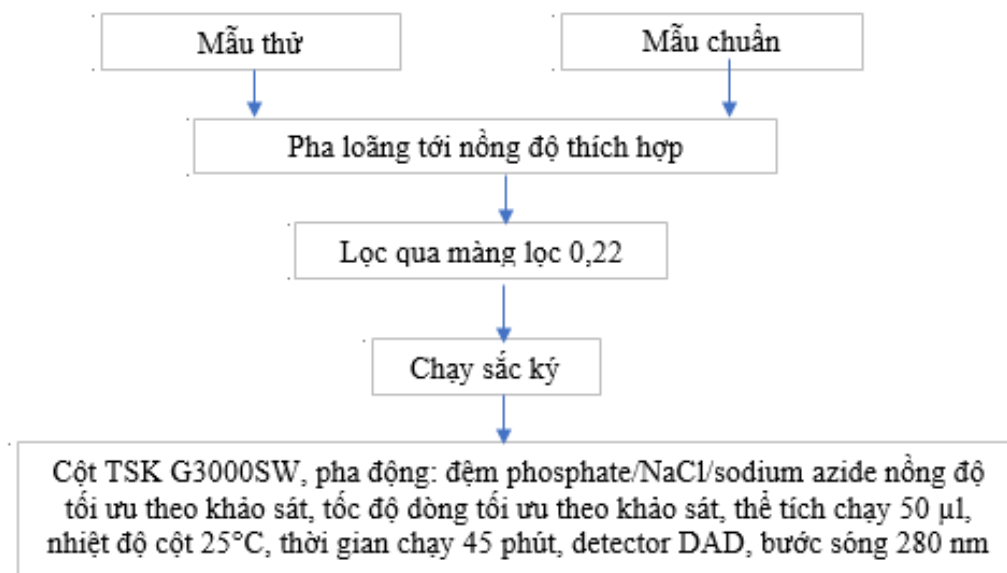
- Hoá chất thương mại: Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4 , hãng Merck, code 1.06586.0500, hạn dùng 31/12/2022); Sodium dihydrogen phosphate monohydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, hãng Sigma, code 71504, hạn dùng 04/2023); Sodium azide (hãng Merck, code 8.22335.0100, hạn dùng 30/6/2023), Sodium chloride (hãng Sigma, code S7652, hạn dùng 17/4/2024).

2.4. Phương pháp nghiên cứu

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

2.5. Nội dung nghiên cứu

2.5.1. Quy trình nghiên cứu



2.5.2. Thiết kế nghiên cứu

a. Khảo sát quy trình

Thực hiện quy trình 2.5.1 để khảo sát các yếu tố ảnh hưởng theo bảng sau:

Bảng 1: Thiết kế khảo sát quy trình

TT	Yếu tố khảo sát	Thông số cố định	Thông số thay đổi
1	Nồng độ đệm phosphate	Nồng độ mẫu chuẩn: 1%, tốc độ dòng 0,5 ml/phút. Pha động: nồng độ NaCl 200 mM, Sodium azide 0,005%.	Nồng độ đệm phosphate: 40 mM, 100 mM, 150 mM, 400 mM, 600 mM.
2	Nồng độ NaCl	Nồng độ mẫu chuẩn: 1%, tốc độ dòng 0,5 ml/phút. Pha động: nồng độ đệm phosphate 40 mM, Sodium azide 0,005%.	Nồng độ NaCl: 0 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 500 mM.
3	Nồng độ mẫu chuẩn	Tốc độ dòng 0,5 ml/phút. Pha động: đệm phosphate 40mM/NaCl 200 mM/ Sodium azide 0,005%.	Nồng độ mẫu chuẩn: 0,2%; 0,5%; 1%; 2%; 5%.
4	Nồng độ mẫu thử	Tốc độ dòng 0,5 ml/phút. Pha động: đệm phosphate 40mM/NaCl 200 mM/ Sodium azide 0,005%.	Nồng độ mẫu thử: 0,2%; 0,5%; 1%; 2%; 5%.
5	Tốc độ dòng	Nồng độ mẫu chuẩn 1%. Pha động: đệm phosphate 40mM/NaCl 200 mM/ Sodium azide 0,005%.	Tốc độ dòng: 0,5 ml/phút; 0,7 ml/phút; 1,0 ml/phút.

Tiêu chuẩn đánh giá:

+ Hệ số kéo đuôi (T_f): Theo FDA: $T_f \leq 2$ [8]

+ Độ phân giải (R_s): $R_s \geq 1,5$ là cần thiết để phân biệt pic của hợp chất mục tiêu và pic liên kề gần nhất [9,10].

+ Số đĩa lý thuyết (N): Lựa chọn giá trị N cao nhất (khi sử dụng cột mới hoàn toàn) [11].

b. Thẩm định quy trình và ước lượng độ không đảm bảo đo

Bảng 2. Thông số thẩm định quy trình và cách bố trí thí nghiệm

TT	Thông số thẩm định	Bố trí thí nghiệm	Tiêu chuẩn chấp thuận
1	Tính thích hợp của hệ thống sắc ký	Bơm mẫu lặp lại 6 lần trên cùng một lần chuẩn bị mẫu chuẩn	- Số đĩa lý thuyết của pic monomer ≥ 2000 - %RSD của diện tích pic $< 2\%$ - %RSD của thời gian lưu $< 1,0\%$ [8,12,13].
2	Độ lặp lại	9 lần lặp/mẫu thử, cùng 1 ngày, người thực hiện, loạt hoá chất, dụng cụ, thiết bị	- Giá trị của từng lần phải nằm trong khoảng giá trị trung bình $\pm 2SD$ tương ứng với mỗi pic. - $RSD \leq 5\%$ [14].
3	Độ chính xác trung gian	2 nhóm, mỗi nhóm thực hiện trên mẫu thử 6 lần/6 ngày khác nhau	- Giá trị của từng lần phải nằm trong khoảng giá trị trung bình $\pm 2SD$ tương ứng với mỗi pic. - $RSD \leq 10\%$ [14].

4	Độ mạnh	1 nhóm thực hiện trên mẫu chuẩn, với sự thay đổi nhẹ các thông số: - Nhiệt độ cột: 20°C; 25°C; 30°C. - pH của pha động: 6,8; 7,0; 7,2.	Không có sự khác biệt giữa thời gian lưu và diện tích pic tương ứng với mỗi pic trên sắc ký đồ: %RSD của diện tích pic < 2% %RSD của thời gian lưu < 1,0% [8,13].
5	Độ đặc hiệu	1 nhóm thực hiện trên mẫu không chứa albumin/globulin miễn dịch: dung dịch đệm phosphate (pha động) và dung dịch 3 g/l NaCl/100 µg/l aluminium, tiến hành song song cùng mẫu thử và mẫu chuẩn.	- Trên các sắc ký đồ thu được, mẫu trắng không cho đáp ứng pic, không xuất hiện pic nào có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic chính trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn. - Mẫu thử cho các pic chính có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic chính trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn [8,13].
6	Ước lượng độ không đảm bảo đo trên 2 mẫu Human Albumin Baxter 200 g/l và IV Globulin. <i>Độ không đảm bảo đo của phép thử được tính theo công thức:</i> $u^2(y) = S_L^2 + S_r^2$ Trong đó S_L^2 : phương sai ước lượng của độ lệch chuẩn tái lập S_r^2 : phương sai ước lượng của độ lệch chuẩn lặp lại <i>Độ không đảm bảo đo mở rộng: $U = k * u(y)$ (k=2 với mức độ tin cậy 95%) [15-17]</i>		

2.6. Phương pháp phân tích số liệu

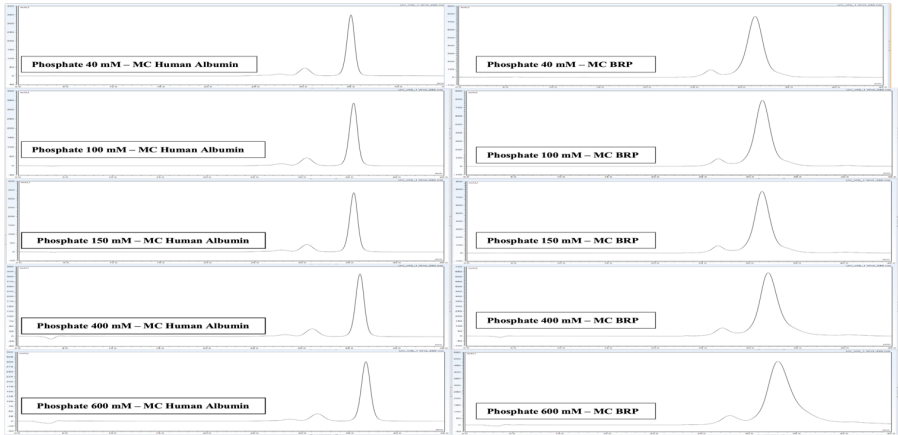
Phân tích thống kê xử lý số liệu bằng phần mềm Microsoft Excel 2023.

3.1. Kết quả tối ưu hóa quy trình

3.1.1. Khảo sát nồng độ pha động

a. Nồng độ đệm phosphate

3. Kết quả



Hình 1: Sắc ký đồ của mẫu chuẩn Human Albumin và Human Immunoglobulin BRP với nồng độ khác nhau của đệm phosphate

Bảng 3: Các thông số sắc ký tương ứng với từng nồng độ đệm phosphate

Thành phần	40 mM	100 mM	150 mM	400 mM	600 mM
Hệ số kéo đuôi pic monomer					
Human Albumin	0,95	0,96	0,96	0,98	1,00
Immunoglobulin BRP	0,98	1,09	1,14	1,19	n.a
Độ phân giải giữa pic monomer và dimer					
Human Albumin	2,53	2,52	2,48	2,39	2,29
Immunoglobulin BRP	1,72	1,66	1,65	1,46	1,19
Số đĩa lý thuyết của pic monomer					
Human Albumin	8011	7775	7477	6898	6337
Immunoglobulin BRP	1763	1677	1663	1260	824

Kết quả cho thấy ở nồng độ đệm phosphate 40 mM, hệ số kéo đuôi (hệ số đối xứng -Tf) đạt yêu cầu <2 và gần giá trị lý tưởng nhất đối với cả 2 mẫu chuẩn, độ phân giải Rs giữa pic monomer và dimer ở cả 2

mẫu chuẩn tốt nhất, và số đĩa lý thuyết của pic monomer đạt cao nhất, do đó chúng tôi lựa chọn nồng độ đệm phosphate 40 mM là nồng độ tối ưu nhất cho quy trình này.

b. Nồng độ NaCl



Hình 2: Sắc ký đồ của mẫu chuẩn Human Albumin và Human Immunoglobulin BRP với nồng độ khác nhau của NaCl

Bảng 4: Các thông số sắc ký tương ứng với từng nồng độ NaCl

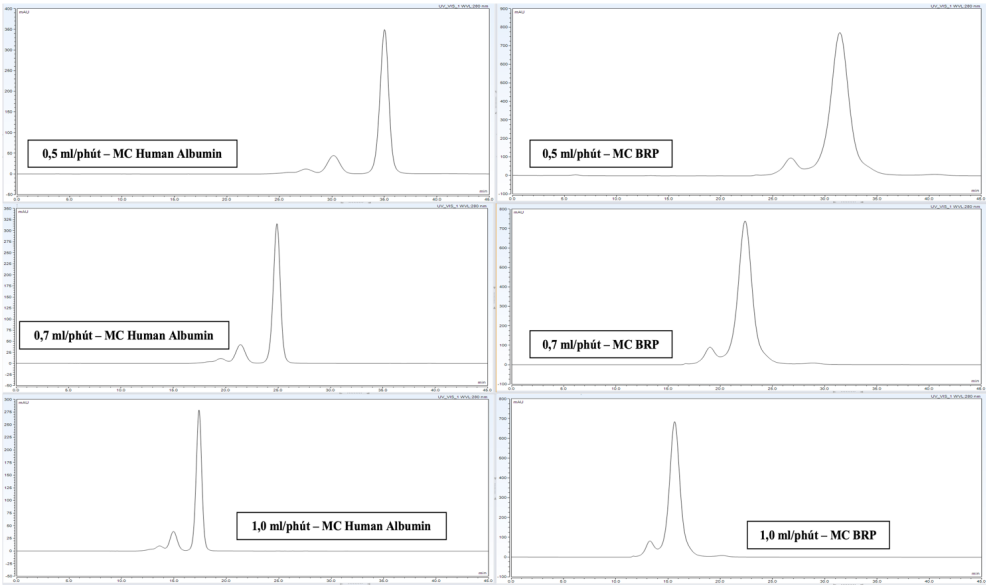
Thành phần	0 mM	50 mM	100 mM	200 mM	500 mM
Hệ số kéo đuôi pic monomer					
Human Albumin	0,91	0,93	0,94	0,95	0,97

Immunoglobulin BRP	n.a	n.a	n.a	0,98	1,10
Độ phân giải giữa pic monomer và dimer					
Human Albumin	2,55	2,58	2,55	2,53	2,50
Immunoglobulin BRP	n.a	1,24	1,44	1,72	1,71
Số đĩa lý thuyết của pic monomer					
Human Albumin	7301	7813	7517	8011	7901
Immunoglobulin BRP	541	914	1118	1763	1740

Kết quả cho thấy ở nồng độ NaCl 200 mM, hệ số kéo đuôi (hệ số đối xứng -Tf) đạt yêu cầu <2 và gần giá trị lý tưởng nhất đối với cả 2 mẫu chuẩn, độ phân giải Rs giữa pic monomer và dimer ở cả 2 mẫu chuẩn tốt

nhất, và số đĩa lý thuyết của pic monomer đạt cao nhất, do đó chúng tôi lựa chọn nồng độ NaCl 40 mM là nồng độ tối ưu nhất cho quy trình này.

c. Khảo sát tốc độ dòng



Hình 3: Sắc ký đồ của mẫu chuẩn Human Albumin và Human Immunoglobulin BRP với tốc độ dòng khác nhau

Bảng 5: Các thông số sắc ký tương ứng với từng tốc độ dòng

Thành phần	0,5 ml/phút	0,7 ml/phút	1,0 ml/phút
Hệ số kéo đuôi pic monomer			
Human Albumin	0,95	0,96	0,98
Immunoglobulin BRP	0,98	n.a	n.a
Độ phân giải giữa pic monomer và dimer			
Human Albumin	2,53 (tăng 20% so với 1,0 ml/phút)	2,34	2,10
Immunoglobulin BRP	1,72 (tăng 18% so với 0,7 ml/phút)	1,45	n.a
Số đĩa lý thuyết của pic monomer			
Human Albumin	8011	6343	4841
Immunoglobulin BRP	1763	1360	1154

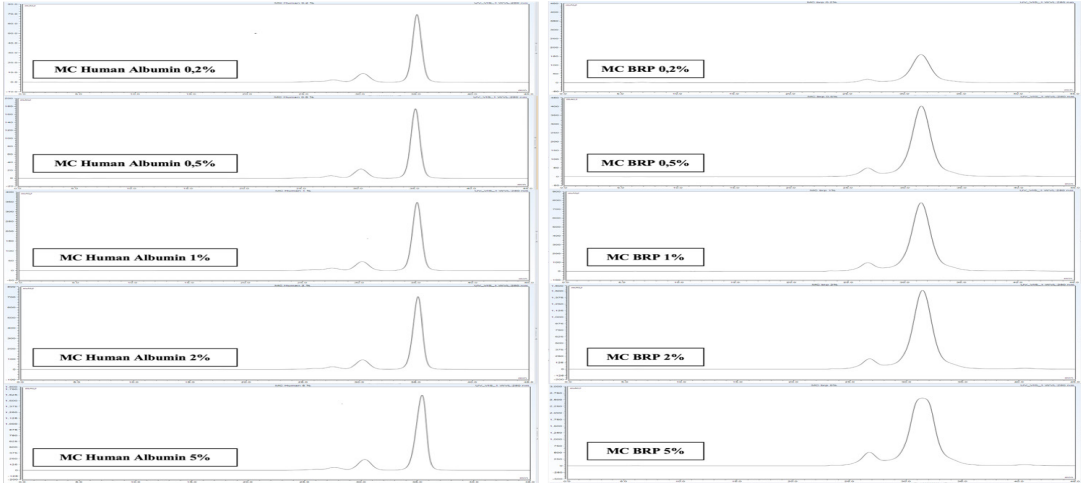
Bảng 6: Kết quả đánh giá sự phân bố kích thước phân tử trên các mẫu chuẩn tương ứng với từng tốc độ dòng

Tốc độ dòng	MC Human Immunoglobulin BRP		MC Human Albumin	
	% Monomer + Dimer	% Polymer + Aggregate	% Monomer + Dimer	% Polymer + Aggregate
0,5 ml/phút	98,99%	0,16%	100%	0%
0,7 ml/phút	98,69%	0,20%	100%	0%
1,0 ml/phút	98,56%	0,21%	100%	0%

Kết quả cho thấy ở tốc độ dòng 0,5 ml/phút, hệ số kéo đuôi (hệ số đối xứng -Tf) đạt yêu cầu <2 và gần giá trị lý tưởng nhất đối với cả 2 mẫu chuẩn, độ phân giải Rs giữa pic monomer và dimer ở cả 2 mẫu chuẩn tốt nhất,

và số đĩa lý thuyết của pic monomer đạt cao nhất, do đó chúng tôi lựa chọn tốc độ dòng 0,5 ml/phút là tốc độ dòng tối ưu nhất cho quy trình này.

d. Khảo sát nồng độ mẫu chuẩn



Hình 4: Sắc ký đồ của mẫu chuẩn Human Albumin và Human Immunoglobulin BRP ở các nồng độ khác nhau

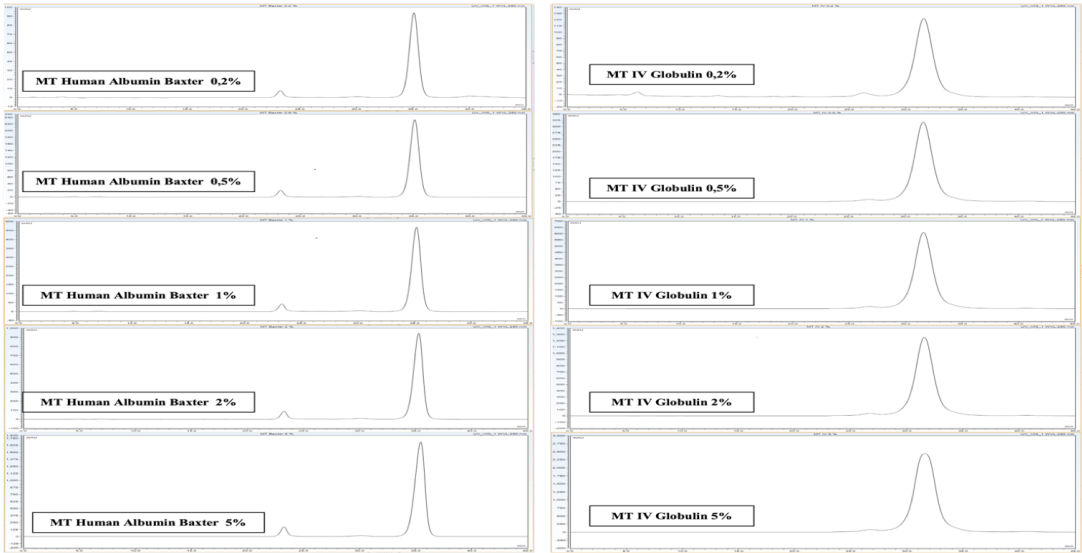
Bảng 7: Các thông số sắc ký tương ứng với từng nồng độ mẫu chuẩn

Thành phần	0,2%	0,5%	1%	2%	5%
Hệ số kéo đuôi pic monomer					
Human Albumin	0,99	0,97	0,97	0,91	0,85
Immunoglobulin BRP	1,00	0,99	0,98	n.a	n.a
Độ phân giải giữa pic monomer và dimer					
Human Albumin	2,55	2,55	2,56	2,58	2,56
Immunoglobulin BRP	1,63	1,62	1,69	1,61	1,39
Số đĩa lý thuyết của pic monomer					
Human Albumin	8325	8268	8146	8051	6821
Immunoglobulin BRP	1560	1564	1763	1527	927
% Polymers & Aggregates tương ứng với từng nồng độ MC BRP					
Immunoglobulin BRP	0,13%	0,18%	0,18%	0,18%	0,22%

Kết quả cho thấy hệ số kéo đuôi Tf, độ phân giải Rs và số đĩa lý thuyết N tốt nhất ở nồng độ 1% đối với cả 2 mẫu chuẩn Human Albumin và Human Immunoglobulin BRP,

do đó chúng tôi lựa chọn nồng độ mẫu chuẩn 1% là nồng độ tối ưu nhất cho quy trình.

e. Khảo sát nồng độ mẫu thử



Hình 5: Sắc ký đồ của mẫu thử Human Albumin Baxter và IV Globulin ở các nồng độ khác nhau

Bảng 8: Các thông số sắc ký tương ứng với từng nồng độ mẫu thử

Thành phần	0,2%	0,5%	1%	2%	5%
Hệ số kéo đuôi pic monomer					
Human Albumin Baxter 200 g/l	0,97	0,95	0,95	0,89	0,84
IV Globulin	1,05	1,06	1,05	n.a	n.a
Độ phân giải giữa pic monomer và dimer					
Human Albumin Baxter 200 g/l	2,52	2,46	2,50	2,51	2,45
IV Globulin	1,64	1,62	1,64	1,60	1,35
Số đĩa lý thuyết của pic monomer					
Human Albumin Baxter 200 g/l	8500	8424	8404	7994	6841
IV Globulin	1780	1778	1780	1760	1274
% Polymers & Aggregates					
Human Albumin Baxter 200 g/l	5,4%	6,2%	6,3%	6,3%	6,8%
IV Globulin	Không phát hiện	0,17%	0,18%	0,18%	0,22%

Kết quả cho thấy hệ số kéo đuôi Tf, độ phân giải Rs và số đĩa lý thuyết N tốt nhất ở nồng độ 1% đối với cả 2 mẫu thử, do đó chúng tôi lựa chọn nồng độ mẫu thử 1% là nồng độ tối ưu nhất cho quy trình.

3.2. Kết quả thẩm định qui trình

3.2.1. Tính thích hợp của hệ thống

Bảng 9: Kết quả kiểm tra tính thích hợp của hệ thống sắc ký trên mẫu thử

Lần TN	Mẫu chuẩn Human Albumin				Mẫu chuẩn Human Immunoglobulin BRP			
	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU*min)	Số đĩa lý thuyết (N)	Độ phân giải (Rs)	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU*min)	Số đĩa lý thuyết (N)	Độ phân giải (Rs)
1	35,003	356,861	8011	2,53	31,427	1755,601	1762	1,72
2	35,013	357,015	8051	2,55	31,423	1751,864	1761	1,70
3	35,003	356,346	8050	2,56	31,450	1757,239	1773	1,73
4	35,037	357,710	8034	2,54	31,447	1755,594	1769	1,69
5	35,030	355,049	8026	2,53	31,440	1760,142	1756	1,71
6	35,003	356,459	8045	2,52	31,437	1764,928	1760	1,72
TB	35,015	356,573			31,437	1757,561		
SD	0,0149	0,8897			0,0106	4,4990		
%RSD	0,042	0,250			0,034	0,256		

Kết quả cho thấy trên cả 2 mẫu chuẩn, %RSD của thời gian lưu đều nhỏ hơn 1%; %RSD của diện tích pic đều nhỏ hơn 2%; số đĩa lý thuyết N của pic monomer của mẫu chuẩn Human Albumin đều lớn hơn 2000, số đĩa lý thuyết của mẫu chuẩn Human

Immunoglobulin BRP ổn định quanh 1700, độ phân giả Rs đều lớn hơn 1,5 chứng tỏ hệ thống sắc ký trên là phù hợp cho quy trình phân tích.

3.2.2. Độ chính xác

a. Độ lặp lại

Bảng 10. Độ lặp lại thực hiện trên mẫu thử

TT	% diện tích pic IV Globulin		% diện tích pic Human Albumin Baxter	
	Monomers + Dimers	Polymers + Aggregates	Monomers + Dimers	Monomers + Dimers
1	99,03	0,44	94,37	5,63
2	99,04	0,46	94,41	5,59
3	99,04	0,44	94,34	5,66
4	99,07	0,42	94,29	5,71
5	99,05	0,45	94,38	5,62
6	99,07	0,42	94,39	5,61
7	99,03	0,45	94,36	5,60
8	99,03	0,45	94,28	5,72
9	99,05	0,43	94,33	5,67
TB	99,05	0,44	94,35	5,65
SD	0,016	0,014	0,044	0,047
TB+2SD	99,08	0,47	94,44	5,74
TB-2SD	99,01	0,41	94,26	5,55
%RSD	0,02	3,21	0,05	0,84

TT	Nhóm 1				Nhóm 2			
	% diện tích pic IV Globulin		% diện tích pic Human Albumin Baxter		% diện tích pic IV Globulin		% diện tích pic Human Albumin Baxter	
	Monomers + Dimers	Polymers + Aggregates	Monomers + Dimers	Polymers + Aggregates	Monomers + Dimers	Polymers + Aggregates	Monomers + Dimers	Polymers + Aggregates
1	99,02	0,46	94,24	5,76	99,07	0,45	94,26	5,74
2	99,05	0,45	94,27	5,73	99,06	0,44	94,30	5,70
3	99,03	0,47	94,37	5,63	99,01	0,45	94,32	5,68
4	99,08	0,44	94,42	5,58	99,03	0,43	94,28	5,72
5	99,04	0,44	94,40	5,60	99,02	0,46	94,21	5,79
6	99,06	0,43	94,38	5,62	99,00	0,45	94,26	5,74
7	99,08	0,43	94,22	5,78	99,06	0,43	94,40	5,60
8	99,07	0,46	94,30	5,70	99,06	0,44	94,36	5,64
9	99,02	0,47	94,35	5,65	99,02	0,45	94,37	5,63
10	99,05	0,46	94,40	5,60	99,03	0,46	94,32	5,68
11	99,06	0,45	94,32	5,68	99,04	0,43	94,26	5,74
12	99,05	0,44	94,28	5,72	99,03	0,44	94,23	5,77
TB	99,05	0,45	94,33	5,67	99,04	0,44	94,30	5,70
SD	0,021	0,014	0,067	0,067	0,022	0,011	0,058	0,058
TB+2SD	99,09	0,48	94,46	5,81	99,08	0,47	94,41	5,82
TB-2SD	99,01	0,42	94,19	5,54	98,99	0,42	94,18	5,59
%RSD	0,02	3,14	0,07	1,19	0,02	2,44	0,06	1,02

Kết quả cho thấy tất cả các giá trị đều nằm trong khoảng giá trị $TB \pm 2SD$, %RSD của các giá trị đều nhỏ hơn 5%. Quy trình đạt yêu cầu về độ lặp lại.

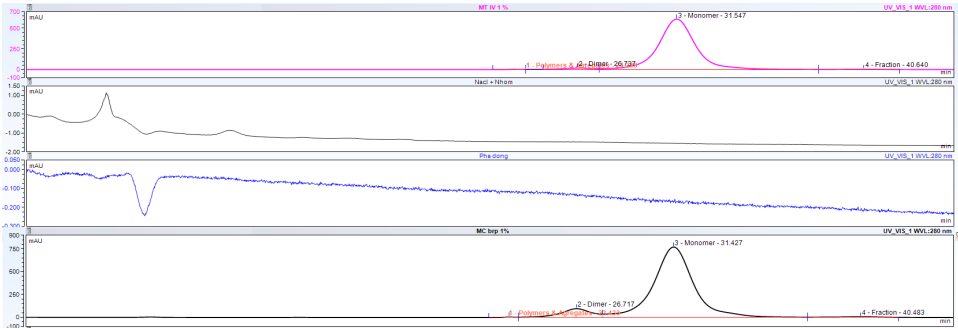
b. Độ chính xác trung gian

Bảng 11. Độ chính xác trung gian thực hiện trên mẫu thử

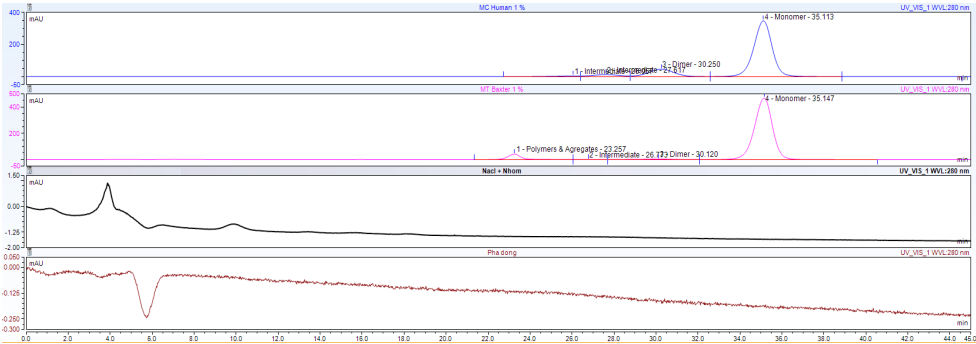
TT	Nhóm 1				Nhóm 2			
	% diện tích pic IV Globulin		% diện tích pic Human Albumin Baxter		% diện tích pic IV Globulin		% diện tích pic Human Albumin Baxter	
	Monomers + Dimers	Polymers + Aggregates	Monomers + Dimers	Polymers + Aggregates	Monomers + Dimers	Polymers + Aggregates	Monomers + Dimers	Polymers + Aggregates
1	99,02	0,46	94,24	5,76	99,07	0,45	94,26	5,74
2	99,05	0,45	94,27	5,73	99,06	0,44	94,30	5,70
3	99,03	0,47	94,37	5,63	99,01	0,45	94,32	5,68
4	99,08	0,44	94,42	5,58	99,03	0,43	94,28	5,72
5	99,04	0,44	94,40	5,60	99,02	0,46	94,21	5,79
6	99,06	0,43	94,38	5,62	99,00	0,45	94,26	5,74
7	99,08	0,43	94,22	5,78	99,06	0,43	94,40	5,60
8	99,07	0,46	94,30	5,70	99,06	0,44	94,36	5,64
9	99,02	0,47	94,35	5,65	99,02	0,45	94,37	5,63
10	99,05	0,46	94,40	5,60	99,03	0,46	94,32	5,68
11	99,06	0,45	94,32	5,68	99,04	0,43	94,26	5,74
12	99,05	0,44	94,28	5,72	99,03	0,44	94,23	5,77
TB	99,05	0,45	94,33	5,67	99,04	0,44	94,30	5,70
SD	0,021	0,014	0,067	0,067	0,022	0,011	0,058	0,058
TB+2SD	99,09	0,48	94,46	5,81	99,08	0,47	94,41	5,82
TB-2SD	99,01	0,42	94,19	5,54	98,99	0,42	94,18	5,59
%RSD	0,02	3,14	0,07	1,19	0,02	2,44	0,06	1,02

Kết quả cho thấy tất cả các giá trị đều nằm trong khoảng giá trị $TB \pm 2SD$, %RSD của các giá trị đều nhỏ hơn 10%. Quy trình đạt yêu cầu về độ chính xác trung gian.

3.2.3. Độ đặc hiệu



Hình 6: Sắc ký đồ của dung dịch đệm phosphate và dung dịch NaCl 3 g/l + Aluminium 100 mg/l chạy cùng dung dịch mẫu thử IV Globulin và mẫu chuẩn Human Immunoglobulin BRP



Hình 7: Sắc ký đồ của dung dịch đệm phosphate và dung dịch NaCl 3 g/l + Aluminium 100 mg/l chạy cùng dung dịch mẫu thử Human Albumin Baxter và mẫu chuẩn Human Albumin

Hình 6 và 7 cho thấy: Trên sắc ký đồ của dung dịch mẫu là dung dịch đệm phosphate và dung dịch NaCl 3 g/l + Aluminium 100 mg/l, không có pic nào xuất hiện ở thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic chính trên sắc ký đồ của dung dịch mẫu chuẩn. lưu tương ứng với thời gian lưu của pic chính trên sắc ký đồ của dung dịch mẫu chuẩn. Khoảng thời gian lưu của pic monomer và dimer trong dung dịch mẫu thử so với pic tương ứng trên sắc ký đồ của dung dịch mẫu chuẩn đều nằm trong khoảng 0,98-1,02. Quy trình đạt yêu cầu về tính đặc hiệu.

Mẫu thử cho các pic chính có thời gian 3.2.4. Độ mạnh

Bảng 12: Độ mạnh đối với sự thay đổi nhiệt độ lò cột

Lần TN		Human Immunoglobulin BRP		Human Albumin	
		Thời gian lưu (phút)	%Diện tích pic (mAU*min)	Thời gian lưu (phút)	%Diện tích pic (mAU*min)
20°C	1	31,320	1756,501	35,030	355,610
	2	31,333	1755,849	35,047	356,049

	3	31,347	1759,233	35,023	356,461
25°C	1	31,450	1753,437	35,147	358,129
	2	31,427	1757,429	35,153	357,987
	3	31,437	1760,424	35,143	357,433
	3	31,437	1760,424	35,143	357,433
30°C	1	31,417	1762,410	35,107	352,037
	2	31,403	1758,577	35,003	353,721
	3	31,423	1764,829	35,013	353,893
	3	31,423	1764,829	35,013	353,893
TB		31,395	1758,743	35,074	355,702
SD		0,0486	3,4796	0,0627	2,1048
% RSD		0,155	0,198	0,179	0,592

Bảng 13: Độ mạnh đối với sự thay đổi pH của pha động

Lần TN		Human Immunoglobulin BRP		Human Albumin	
		Thời gian lưu (phút)	%Diện tích pic (mAU*min)	Thời gian lưu (phút)	%Diện tích pic (mAU*min)
pH 6,8	1	31,437	1754,233	35,003	354,049
	2	31,430	1753,640	35,017	354,877
	3	31,433	1754,537	35,023	355,126
pH 7,0	1	31,363	1755,437	35,040	356,420
	2	31,350	1753,429	35,013	357,187
	3	31,423	1755,430	35,043	357,523
pH 7,2	1	31,427	1758,410	35,117	356,430
	2	31,430	1760,457	35,130	355,761
	3	31,433	1760,433	35,013	355,167
TB		31,414	1756,223	35,044	355,838
SD		0,0330	2,8054	0,0468	1,1421
%RSD		0,105	0,160	0,134	0,321

Kết quả cho thấy ở tất cả các điều kiện, %RSD của diện tích pic đều nhỏ hơn 2%, %RSD của thời gian lưu đều nhỏ hơn 1%. pha động không tác động ảnh hưởng tới quy trình. Quy trình đạt yêu cầu về độ mạnh. Như vậy ở các điều kiện khác biệt nhỏ về nhiệt độ cột, tốc độ dòng, thành phần tỷ lệ

3.3. Kết quả xác định độ không đảm bảo đo**Bảng 14: Ước lượng độ không đảm bảo (KĐB) đo trên mẫu thử**

	IV Globulin		Human Albumin Baxter	
	Monomers + Dimers (%)	Polymers + Aggregates (%)	Monomers + Dimers (%)	Polymers + Aggregates (%)
TB chung	99,04	0,45	94,31	5,69
S^2_{tr} phương sai lặp lại	0,0004629	0,0001587	0,0039598	0,0039598
S^2_{Rj} phương sai tái lập	0,00007393	0,00000379	0,00017140	0,00017140
$u_{(v)}$ độ không đảm bảo đo của phép thử	0,02317	0,01275	0,06427	0,06427
U (độ không đảm bảo đo mở rộng)	0,0463	0,0255	0,1285	0,1285

Độ phân giải Rs là chỉ số đánh giá mức độ phân tách giữa hai pic liền kề trên một điều kiện sắc ký nhất định. Giá trị $R_s \geq 1,5$ cho biết sự phân tách xem như hoàn toàn, qua đó tạo điều kiện phù hợp cho việc định lượng tin cậy [8,9]. Ở nghiên cứu của chúng tôi, khi khảo sát các thông số ảnh hưởng đến quy trình sắc ký, kết quả cho thấy độ phân giải tốt giữa pic monomer và dimer ở mẫu chuẩn Human Albumin và mẫu thử Human Albumin Baxter 200 g/l ở tất cả các điều kiện khảo sát và đều lớn hơn 2. Tuy nhiên đối với mẫu chuẩn Human Immunoglobulin BRP và mẫu thử IV Globulin, độ phân giải kém hơn, ở điều kiện tối ưu nhất: nồng độ đệm phosphate 40 mM ($R_s = 1,72$), nồng độ NaCl 200 mM ($R_s = 1,72$), tốc độ dòng 0,5 ml/phút ($R_s = 1,72$); và ở một số điều kiện khảo sát, độ phân giải rất thấp ($R_s=1,19$ ở nồng độ đệm phosphate 600 mM, R_s không xác định được ở nồng độ NaCl 0 mM và ở tốc độ dòng 1,0 ml/phút). Do đó, khi khảo sát các thông số ảnh hưởng đến quy trình, chúng tôi lựa chọn các điều kiện thỏa mãn giá trị $R_s \geq 1,5$ ở cả mẫu chuẩn Human Albumin và Human Immunoglobulin BRP.

Thông thường, số đĩa lý thuyết là một phần của thử nghiệm xác định tính phù hợp của hệ thống. Tuy nhiên, đối với sắc ký rửa phân tử mà mục tiêu là phân tách nhiều hợp chất dựa trên kích thước, thì thông số độ phân giải Rs cũng được xem như là một phần quan trọng của thử nghiệm xác định tính phù hợp của hệ thống. Do đó, chúng tôi đã tính toán thêm thông số Rs vào bảng 6, và thấy rằng Rs của các lần thực hiện đều $> 1,5$.

Số đĩa lý thuyết là một công cụ đo lường hiệu quả của cột HPLC. Cột có số lượng đĩa lý thuyết cao được coi là hiệu quả

hơn trong việc phân tách so với các cột có số lượng đĩa lý thuyết ít hơn. FDA khuyến cáo “Số đĩa lý thuyết N phụ thuộc vào thời gian rửa giải, nhưng nói chung nên lớn hơn 2000” [2], tuy nhiên việc đặt một giá trị N nhỏ nhất có thể chấp nhận được, như được FDA khuyến cáo $N > 2000$, không có ý nghĩa như một yêu cầu chung. Thay vào đó, chỉ có thể xác định số đĩa lý thuyết chấp nhận được tối thiểu dựa trên giá trị độ phân giải tối thiểu có thể chấp nhận được đối với từng phương pháp. Vì vậy trong nghiên cứu khảo sát các thông số ảnh hưởng tới quy trình, với điều kiện sử dụng cột mới hoàn toàn, chúng tôi lựa chọn các điều kiện là tối ưu nhất mà ở điều kiện đó số đĩa lý thuyết tính toán được là cao nhất tương ứng với độ phân giải Rs tốt nhất (cao nhất).

Số đĩa lý thuyết cũng cung cấp thông tin về mức độ hoạt động của cột so với trường hợp lý tưởng (thử nghiệm của nhà sản xuất). Theo dõi số đĩa lý thuyết có thể giúp xác định khi cột gần hết thời gian sử dụng để có thể đặt hàng thay thế. Ở một số nghiên cứu đã xem xét thay thế cột khi thấy mất khoảng 30% ở N so với giá trị đo được khi cột mới [18]. Các nhà sản xuất sinh phẩm cũng đưa ra tiêu chuẩn đánh giá cho số đĩa lý thuyết N ở mức xác định tính thích hợp của hệ thống sắc ký, thông thường $N \geq 60-70\%$ N đo khi cột mới [6]. Do cột sử dụng khi thực hiện nghiên cứu này là cột mới hoàn toàn, vì vậy chúng tôi xác định số đĩa lý thuyết N lớn nhất của cột, và theo dõi giá trị này qua các lần sử dụng, để đánh giá hiệu suất cột cũng như thời điểm cần phải thay thế cột (khi số đĩa lý thuyết N của cột mất khoảng 40% so với giá trị N ban đầu tính được). Những thay đổi về số đĩa lý thuyết của cột cũng có thể giúp dự đoán các vấn đề về giới hạn phát hiện. Khi số đĩa lý thuyết của cột giảm, chiều rộng

tăng và chiều cao đỉnh giảm, trong khi chiều cao đỉnh là phép đo quan trọng khi nói đến giới hạn phát hiện, phụ thuộc vào tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu, các đỉnh ngắn hơn sẽ có tỷ lệ nhiễu tín hiệu nhỏ hơn và do đó giới hạn phát hiện kém hơn [18].

Mục đích của việc thêm muối vào dung dịch rửa giải là để giảm thiểu các tương tác thứ cấp của các thành phần mẫu với pha tĩnh (nhựa). Sự có mặt hoặc không có NaCl trong dung dịch rửa giải ảnh hưởng tới thể tích rửa giải của protein bằng cách thay đổi bán kính thủy lực của protein. Những thay đổi tuy tương đối nhỏ trong cấu trúc của protein nhưng lại có thể ảnh hưởng đến khả năng hòa tan của protein và tăng các tương tác kỵ nước thứ cấp khiến các protein có kích thước tương tự bị rửa giải vào những thời điểm khác nhau [19]. Chính vì vậy, cần phải tối ưu nồng độ NaCl để sự phân tách chỉ dựa trên kích thước phân tử. Kết quả khảo sát ở hình 2 và bảng 4 cho thấy sự có mặt của NaCl trong thành phần pha động làm cho đỉnh của các pic được xác định rõ hơn và ngăn chặn các tương tác giữa protein với chất nền, dẫn đến việc xác định kích thước phân tử chính xác hơn.

Độ phân giải của sự phân tách dựa trên kích thước bị ảnh hưởng bởi vận tốc tuyến tính. Sử dụng tốc độ dòng chảy thấp hơn dẫn đến thời gian chạy lâu hơn, nhưng độ phân giải tăng lên mang lại độ tin cậy cao hơn trong việc định lượng. Khảo sát ở tốc độ dòng 0,5 ml/phút, 0,7 ml/phút và 1 ml/phút cho thấy không có sự thay đổi đáng kể về % diện tích pic polymer & aggregate (xem bảng 6), tuy nhiên việc giảm tốc độ dòng chảy xuống 0,5 ml/phút đã làm tăng độ phân giải monomer/dimer lên 20% đối với mẫu chuẩn Human Albumin và 20% với mẫu chuẩn Immunoglobulin BRP (xem bảng 5).

Ở nồng độ mẫu chuẩn/mẫu thử thấp (0,2%), lượng mẫu qua cột sắc ký ít, do đó khi rửa giải cho ra tín hiệu cường độ thấp, chiều cao (diện tích pic) quá nhỏ, không thể phát hiện hoặc phát hiện/định lượng không chính xác. Còn khi mẫu ở nồng độ cao (5%), lượng chất nạp vào cột lớn, khi đó xảy ra hiện tượng cột bị quá tải dẫn đến chân pic bị choãi, đỉnh pic bị giãn rộng (không xác định được hệ số Tf), độ phân giải R_s kém và số đĩa lý thuyết N nhỏ) dẫn đến kết quả không chính xác. % diện tích pic polymer & aggregate ổn định và không thay đổi ở các nồng độ 0,5%, 1% và 2% (xem bảng 7 và 8).

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 đề tài này, chúng tôi chỉ công bố độ không đảm bảo đo cho 2 mẫu tham gia là Human Albumin Baxter 200 g/l và IV Globulin. 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.

5. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được và tối ưu hoá quy trình xác định sự phân bố kích thước phân tử của protein trong các sinh phẩm chứa albumin và globulin miễn dịch người bằng phương pháp sắc ký rây phân tử, với các thông số: nồng độ pha động (đệm phosphate 40 mM, NaCl 200 mM,

Sodium azide 0,005%), nồng độ mẫu chuẩn 1%, nồng độ mẫu thử 1%, tốc độ dòng 0,5 ml/phút. Quy trình đã được thẩm định với các tiêu chí: tính thích hợp của hệ thống, độ chính xác, độ mạnh, độ đặc hiệu đạt theo tiêu chuẩn tham chiếu. Độ không đảm bảo đo mở rộng của phép thử trên mẫu thử Human Albumin Baxter 200 g/l: U = 0,1285 % (Monomer + Dimer); U = 0,1285 (Polymer + Aggregate) ; IV Globulin: U = 0,0463% (Monomer + Dimer), U = 0,0255 (Polymer + Aggregate) với độ tin cậy 95%.

Tài liệu tham khảo

- [1] Susanne Moelbert et al. Correlation between sequence hydrophobicity and surface-exposure pattern of database proteins. Protein Science; April 2004.
- [2] J K Lee et al. Determination of the molecular size distribution of immunoglobulin G (IgG) in intravenous IgG-albumin formulations by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr; 1988 Jul 1.
- [3] European Pharmacopoeia 7.0, mục 01/2010.0255. Human Albumin solution.
- [4] European Pharmacopoeia 7.0, mục 01/2010.0918. Human Immunoglobulin for Intravenous administration.
- [5] US Pharmacopoeia. USP Monographs. Albumin Human; 2014.
- [6] Hồ sơ của các nhà sản xuất Kedrion Biopharma, Sanquin Plasma products B.V, Brahat Serum and Vaccine Limited, Biotest AG, CSL Behring GmbH, Reliance Life Science, Baxalta.
- [7] ISO/IEC 17025:2017: Yêu cầu chung về năng lực của phòng thử nghiệm và hiệu chuẩn.
- [8] Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods. FDA.
- [9] Phạm Luận. Phương pháp phân tích sắc ký và chiết tách. Nhà xuất bản Bách Khoa Hà Nội; 2014.
- [10] <https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysisbasics/basic/resol-1.html>.
- [11] Trần Cao Sơn. Thẩm định phương pháp trong phân tích hóa học và vi sinh. Nhà xuất bản Khoa học kỹ thuật Hà Nội; 2010.
- [12] Tạ Thị Thảo. Thống kê trong Hóa phân tích. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội; 2006.
- [13] ICH Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures.
- [14] WHO guide to good manufacturing practice requirement Part 2: Validation
- [15] M.-L. Wang et al. Establishment of a Method for Determination of Molecular-Size Distribution of Human Serum Albumin by Ultra Performance Liquid Chromatography. Chinese Pharmaceutical Journal; 2018.
- [16] 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.
- [17] TCVN 6910 (phần 1 – 6): Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo.
- [18] John W. Dolan. Column Plate Number and System Suitability, LCGC Europe- 03-01-2016, Volume 29, Issue 3, Pages: 130–134.
- [19] Fabian Bicke et al. Reversible NaCl–induced aggregation of a monoclonal antibody at low pH: Characterization of aggregates and factors affecting aggregation. Eur J Pharm Biopharm; Oct 2016.