

VALIDATING THE PROCEDURE FOR DETERMINATION OF THE PARTITION CONSTANT K_d OF MENINGES CONJUGATE IN MENACTRA VACCINE BY SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAPHY METHOD

Dam Thi Lieu*, Doan Huu Thien, Duong Thi Cam Le, Pham Quang Minh, Canh Huyen Trang, Bui Thanh Tung, Nguyen Quyet Thang

The National Institute for Control of Vaccines and Biologicals

Received 24 April 2023

Accepted 22 May 2023

Abstract: Size exclusion chromatography is a method where separation of different compounds in a solution occurs according to their size. This method is mainly applied in desalting, purification & fractionation, concentration of diluted solutions and determination of molecular weight. In size exclusion chromatography, the molecular size is closely involved in the retention time. The retention time of a particular molecule (with known size) can be used to calculate the partition constant K_d , estimate the molecular size to be tested and confirm if this molecule is intact or not. This study was conducted to validate the procedure for determining the partition constant (K_d) of Meninges conjugate in Menactra vaccine and to estimate the uncertainty of measurement in the test sample. The method used in the study was descriptive experimental method in the laboratory. The evaluation results confirmed the suitability of the system, precision (repeatability and intermediate reproducibility) and specificity that meets ICH (International Council for Harmonisation) and WHO (World Health Organization) standards. The expanded uncertainty on the Menactra sample is 0,0128. The testing was valid and in accordance with the laboratory conditions of the Department. The uncertainty of the test sample was consistent with the K_d result of meninges conjugate in the sample.

Keywords: *size exclusion chromatography, partition constant, K_d , Menactra, Meninges conjugate.*

* Corresponding author
E-mail address: damthilieunicvb@gmail.com
<https://doi.org/10.56086/jcvb.v3i2.91>

THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH HỆ SỐ PHÂN BỐ KD CỦA MENINGES CONJUGATE TRONG VẮC XIN MENACTRA BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ RÂY PHÂN TỬ

**Đàm Thị Liễu*, Đoàn Hữu Thiển, Đường Thị Cẩm Lệ, Phạm Quang Minh,
Cảnh Huyền Trang, Bùi Thanh Tùng, Nguyễn Quyết Thắng**

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

Nhận ngày 24 tháng 4 năm 2023

Chấp nhận đăng ngày 22 tháng 5 năm 2023

Tóm tắt: Sắc ký rây phân tử là phương pháp chia tách các phân tử trong dung dịch dựa trên kích thước của chúng. Ứng dụng của sắc ký rây phân tử chủ yếu trong khử muối, phân đoạn tinh chế, làm đặc dung dịch loãng và xác định trọng lượng phân tử.

Trong sắc ký rây phân tử, kích thước phân tử có mối quan hệ chặt chẽ với thời gian lưu, có thể sử dụng thời gian lưu của phân tử đã biết trước kích thước để tính hệ số phân bố và ước lượng kích thước phân tử cần kiểm tra, khẳng định phân tử này có nguyên vẹn không. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm thẩm định quy trình xác định hệ số phân bố Kd của Meninges conjugate trong vắc xin Menactra và ước lượng độ không đảm bảo đo trên mẫu thử. Phương pháp sử dụng trong nghiên cứu là phương pháp mô tả thực nghiệm trong phòng thí nghiệm.

Kết quả thẩm định về tính thích hợp của hệ thống, tính chính xác (độ lặp lại và độ tái lặp trung gian), độ mạnh, độ đặc hiệu đạt theo tiêu chuẩn ICH (Hội đồng hài hoà quốc tế), WHO (Tổ chức Y tế thế giới). Độ không đảm bảo đo mở rộng trên mẫu menactra là 0,0128. Thử nghiệm có giá trị và phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm của Khoa. Độ không đảm bảo đo của mẫu thử phù hợp với kết quả Kd của meninges conjugate trong mẫu.

Từ khoá: sắc ký rây phân tử, hệ số phân bố, Kd, Menactra, Meninges conjugate.

1. Đặt vấn đề

Sắc ký rây phân tử là phương pháp chia tách các phân tử trong dung dịch dựa trên kích thước của chúng. Dựa vào bản chất pha động người ta chia sắc ký rây phân tử thành 2 loại: sắc ký thẩm qua gel (pha động là dung môi hữu cơ) và sắc ký lọc gel (SEC – pha động là nước) [1].

Sắc ký rây phân tử được sử dụng rộng rãi trong phân tích peptides, protein và vector vi rút với công đoạn khử muối, trao đổi chất

đệm, phân tách, xác định kích thước phân tử, xác định sự phân bố các polymer theo kích thước phân tử [1].

Kích thước phân tử có mối quan hệ chặt chẽ với thời gian lưu, có thể sử dụng thời gian lưu của phân tử đã biết trước kích thước để tính hệ số phân bố và ước lượng kích thước phân tử cần kiểm tra, khẳng định phân tử này có nguyên vẹn không. Hệ số phân bố Kd đặc trưng cho mỗi kích thước tại một điều kiện xác định [1], [2].

Vắc xin Menactra là vắc xin phòng bệnh viêm màng não do não mô cầu, kháng nguyên (meninges conjugate) có bản chất là polysaccharide liên kết với một protein mang để tăng khả năng sinh miễn dịch. Phân tử polysaccharide khi liên kết với protein sẽ tăng kích thước phân tử, để phần nào khẳng định được khả năng liên kết polysaccharide với protein, kiểm tra tính toàn vẹn của phân tử sau liên kết người ta tiến hành xác định hệ số Kd của phân tử đó bằng phương pháp sắc ký rây phân tử, sắc ký sử dụng pha động đệm phosphate 100 mM, pH=7,0; cột TSK 7,5 x 300 mm G6000PW; tiền cột TSK 7,5 x 75 mm; tốc độ dòng 0,7 ml/phút; detector DAD; bước sóng phát hiện 214 nm [2].

Để đảm bảo chất lượng kết quả kiểm định và theo yêu cầu của ISO/IEC 17025:2005, NRA, GLP, chúng tôi tiến hành thẩm định quy trình xác định hệ số phân bố Kd của phân tử meninges conjugate trong vắc xin Menactra và tính độ không đảm bảo đo cho mẫu thử với mục tiêu cụ thể như sau:

1. *Thẩm định toàn phần các tiêu chí: tính thích hợp của hệ thống, độ lặp lại, độ tái lập trung gian, độ mạnh, độ đặc hiệu.*

2. *Ước lượng độ không đảm bảo đo trên mẫu thử menactra theo phương pháp “Top down” [3].*

2. Phương pháp nghiên cứu

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

Đối tượng nghiên cứu là quy trình xác định hệ số phân bố Kd của phân tử meninges conjugate bằng phương pháp sắc ký rây phân tử. Nghiên cứu được tiến hành tại Khoa Kiểm định Hoá lý, Viện Kiểm

định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế trong thời gian từ tháng 04 năm 2021 đến tháng 09 năm 2021.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu sử dụng phương pháp mô tả thực nghiệm trong phòng thí nghiệm.

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

2.3.1. Thiết bị

Hệ thống sắc ký lỏng cao áp (HPLC) (Thermo), Detector DAD, cột TSK 7,5 x 300 mm G6000PW, tiền cột TSK 7,5 x 75 mm; máy hút chân không, cân điện tử, máy đo pH, máy khuấy từ, máy lắc, các loại micropipet (10 ml, 1 ml, 100 μ l).

2.3.2. Hoá chất, dụng cụ

Deoxyribonucleic acid sodium (DNA) (Sigma-Aldrich), adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate (ATP) (Sigma-Aldrich), thyroglobulin from bovine thyroid powder, $\geq 90\%$ (Sigma-Aldrich), sodium azide (Merck), potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) (Merck), di-potassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4) (Merck); pH 4,01; pH 7,00; pH 10,01 (Thermo), nước deion. Bộ lọc 0,22 μ m thể tích lọc 1000 ml (Corning), lọc syring 0,22 μ m (Corning).

2.3.3. Mẫu thử

Vắc xin Menactra; nhà sản xuất: Sanofi Pasteur.

2.4. Quy trình tóm tắt

Dung dịch chuẩn DNA 0,8 g/l đại diện phân tử có kích thước to cho thể tích V_0 , ATP stock solution (0,048 g/l) đại diện cho phân tử có kích thước nhỏ cho thể tích V_1 ,

thyroglobulin 0,12 g/l (mẫu chuẩn) (được phân tích lặp lại hai lần), dung dịch pha động (đệm phosphate 100 mM, pH=7,0) được sử dụng làm mẫu trắng. Mẫu thử pha loãng 10 lần bằng pha động. Sử dụng 1 ml các loại dung dịch trên cho vào lọ chạy sắc ký đã được đánh dấu tương ứng. Tiến hành chạy sắc ký với các thông số: pha động đệm phosphate 100 mM, pH=7,0; tốc độ dòng 0,7 ml/phút; thể tích tiêm 50 μ L, nhiệt độ cột 25 °C, thời gian chạy 25 phút, bước sóng phát hiện 214 nm. Kd mẫu thử tính theo công thức: $K_d = (RT_e - RT_o) / (RT_t - RT_o)$ với K_d :

Hệ số phân bố của mẫu hoặc Thyroglobulin, RT_o : Thời gian lưu của DNA, RT_t : Thời gian lưu của ATP, RT_e : là thời gian lưu trung bình của mẫu hoặc Thyroglobulin.

2.5. Thiết kế nghiên cứu

Phương pháp không tiêu chuẩn, phương pháp sắc ký không dùng đường chuẩn để tính kết quả. Thẩm định toàn phần, các tiêu chí thẩm định bao gồm: tính thích hợp của hệ thống, tính chính xác (độ lặp lại và độ chính xác trung gian), độ mạnh, độ đặc hiệu [4], [5], [6].

Chi tiết thiết kế như bảng dưới:

Bảng 1: Thiết kế nghiên cứu

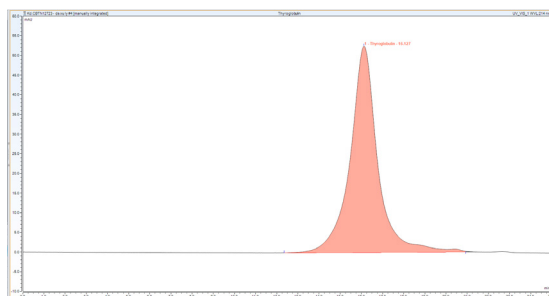
Tiêu chí	Thiết kế	Tiêu chí đánh giá	Tiêu chuẩn
Tính thích hợp của hệ thống	Bố trí 1 nhóm thực hiện xác định K_d của dung dịch Thyroglobulin 0,12 g/l, mẫu thử lặp lại 9 lần, trong cùng một ngày, cùng lô hóa chất.	Thời gian lưu trong 9 lần lặp mẫu, % RSD (độ lệch chuẩn tương đối) của thời gian lưu.	RSD (%) $\leq$ 2% [5], [7].
Độ lặp lại	Sử dụng kết quả thu được từ thiết kế mục tính thích hợp của hệ thống và bố trí 1 nhóm thực hiện xác định K_d của Meninge Conjugates trong vắc xin Menactra theo quy trình mục 2.4, mẫu thử lặp lại 9 lần, trong cùng một ngày, cùng lô hóa chất, thiết bị.	Kd mẫu chuẩn, Kd của 9 lần lặp mẫu, Kd trung bình, SD (độ lệch chuẩn), % RSD của 9 lần lặp.	K_d của Thyroglobulin nằm trong khoảng từ 0,56 - 0,68. K_d của mẫu thử nằm trong khoảng giá trị trung bình $\pm$ 2SD. RSD (%) $\leq$ 5% [4], [6], [8].
Độ tái lặp trung gian	Bố trí 2 nhóm thực hiện xác định K_d của Meninge Conjugates trong vắc xin Menactra, mỗi nhóm thực hiện lặp lại 6 lần, mỗi lần lặp lại với 2 mẫu thử trong 6 ngày khác nhau.	Kd mẫu chuẩn, mẫu thử của 2 nhóm, Kd trung bình, SD, % RSD của từng nhóm và của 2 nhóm.	K_d của Thyroglobulin nằm trong khoảng từ 0,56 - 0,68. K_d của Meninge conjugates trong mẫu thử nằm trong khoảng giá trị trung bình $\pm$ 2SD. RSD (%) $\leq$ 10% [4], [6], [8].

Độ mạnh	Sử dụng kết quả K_d của Meninge conjugates trên mẫu Menactra của 2 nhóm thu được từ thiết kế mục độ chính xác trung gian.	t_{test} so sánh hai giá trị trung bình của hai nhóm.	$t_{\text{test}} \leq t_{\text{bảng}}$ ($t_{\text{bảng}}$ tra trong bảng phân phối student) tại mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$ tức là độ tin cậy 95 %) [4], [8], [9].
Độ đặc hiệu	Bố trí 2 nhóm thực hiện quy trình trên mẫu thử là dung dịch BSA. Mỗi nhóm thực hiện lặp lại 6 lần, mỗi lần lặp lại với 2 mẫu thử trong 6 ngày khác nhau.	Sự xuất hiện Peak sắc ký.	Không cho peak trùng với peak Thyroglobulin [4], [5].
Độ không đảm bảo (KĐB) đo	Sử dụng kết quả K_d của Meninge conjugates trên mẫu Menactra của 2 nhóm thu được từ thiết kế mục độ chính xác trung gian.	Độ KĐB đo	Độ KĐB đo phù hợp khi giá trị này $\leq 10\%$ giá trị K_d mẫu thử.

3. Kết quả

3.1. Tính thích hợp của hệ thống

Sau khi phân tích dung dịch Thyroglobulin chuẩn 0,12 g/l lặp lại 9 lần thu được kết quả thời gian lưu trung bình là: 16,202 phút, các giá trị nằm trong khoảng trung bình $\pm 2SD$, RSD (%) = 0,63 % nằm trong khoảng cho phép của giới hạn chấp thuận ($RSD \leq 2\%$), thử nghiệm đạt yêu cầu về tính thích hợp của hệ thống.

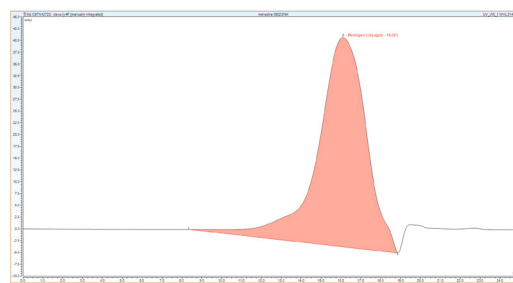


Hình 1: Hình ảnh peak Thyroglobulin

3.2. Tính chính xác

3.2.1. Độ lặp lại

Sau khi phân tích mẫu Menactra lặp lại 9 lần trong cùng một ngày, một kiểm nghiệm viên, một lô hoá chất, một thiết bị thu được giá trị K_d trung bình là: 0,638; các giá trị K_d thu được của 9 lần đều nằm trong khoảng giá trị trung bình $\pm 2SD$. RSD (%) = 0,1 % đạt tiêu chuẩn cho phép ($RSD \leq 5\%$), pha động (mẫu trắng) không xuất hiện peak trong thời gian 10,5 phút đến 18,5 phút. K_d của Thyroglobulin = 0,638 nằm trong khoảng từ 0,56 - 0,68. Thử nghiệm đạt yêu cầu về độ lặp lại.



Hình 2: Hình ảnh peak Meninges conjugate trong vắc xin Menactra

3.2.2. Độ tái lập trung gian

2 nhóm thực hiện phân tích mẫu Menactra trong 6 ngày khác nhau thu được kết quả sau: pha động (mẫu trắng) không xuất hiện peak trong thời gian 10,5 phút đến 18,5 phút. K_d trung bình của Thyroglobulin là 0,641, các giá trị K_d của Thyroglobulin nằm trong khoảng từ 0,56 - 0,68. K_d trung bình của Menactra là 0,638. Các giá trị K_d trên mẫu Menactra đều nằm trong khoảng giá trị trung bình $\pm 2SD$. RSD (%) thu được của 2 nhóm trên mẫu Menactra lần lượt là: 0,99%; 0,70%. RSD (%) chung của 2 nhóm trên mẫu Menactra là: 0,87%. Các giá trị %RSD trên đều $< 1\%$, nhỏ hơn giới hạn chấp thuận ($RSD \leq 10\%$), thử nghiệm đạt yêu cầu về độ tái lập.

3.3. Độ mạnh

Giá trị $F = 2,35 < F$ Critical one - tail = 6,39, không có sự khác biệt giữa phương sai của hai nhóm. Giá trị $|T \text{ Stat}| = 0 < t$

4. Ước lượng độ không đảm bảo đo

Bảng 2: Ước lượng độ không đảm bảo đo với mẫu Menactra

Lần TN Nhóm	Kd							Trung bình	SD
	1	2	3	4	5	6			
1	0,640	0,645	0,637	0,641	0,632	0,642		0,640	0,0045
2	0,635	0,629	0,626	0,632	0,639	0,644		0,634	0,0066
TB chung					0,637				
$S^2_{\text{phương sai lặp lại}}$					0,0000320				
$S^2_{\text{phương sai tái lập}}$					0,0000409				
$u_{(y)}$ độ không đảm bảo của phép thử					0,0064				
U (độ không đảm bảo đo mở rộng)					0,0128				

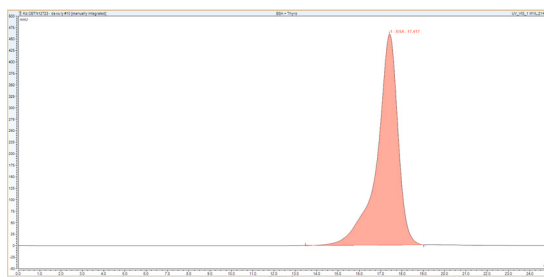
5. Bàn luận

Các thành phần khác nhau trong một mẫu được phân tách giữa pha tĩnh và pha

Critical two-tail = 1,86; giá trị trung bình của hai nhóm khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $P = 0,23 (> 0,05)$. Thử nghiệm đạt về độ mạnh.

3.4. Độ đặc hiệu

2 nhóm thực hiện 6 lần trên dung dịch BSA 300 $\mu\text{g/ml}$ kết quả xuất hiện 1 peak duy nhất với thời gian lưu trung bình của 2 nhóm lần lượt là: 17,634 phút; 17,161 phút. Thời gian lưu này không trùng với peak của Thyroglobulin hay phân tử Meninges conjugate. Quy trình đạt yêu cầu về tính đặc hiệu.



Hình 3: Hình ảnh peak BSA

động. Hệ số phân bố (K_d), được định nghĩa là tỷ lệ nồng độ của hợp chất trong hai pha ở trạng thái cân bằng. Đối với hai pha cố

định giá trị K_d là một hằng số ở nhiệt độ đã cho và được tính theo công thức:

$K_d = [\text{Nồng độ chất trong pha A}]/[\text{Nồng độ chất trong pha B}]$

Sắc ký lọc gel, phân tách các phân tử trên cơ sở kích thước, các phân tử lớn hơn được rửa giải sớm hơn các phân tử có kích thước nhỏ. Mỗi quan hệ của K_d với khối lượng rửa giải (V_e) được đưa ra như sau:

$$V_e = V_0 + K_d V_i \quad (1)$$

Trong đó: V_e là thể tích của pha di động cần thiết để rửa giải hợp chất từ cột; V_0 là thể tích của pha động bên ngoài các hạt gel; V_i là thể tích của pha động có bên trong các hạt gel và $V_i = a \cdot W_r$ trong đó: a : khối lượng khô của gel và W_r khối lượng nước lấy lại của gel.

Từ công thức (1) tính được:

$$K_d = (V_e - V_0)/V_i \quad (2)$$

Do rất khó có thể tính được V_i và K_d nên người ta tính hệ số K_{av} theo công thức sau:

$$K_{av} = (V_e - V_0)/(V_t - V_0) \quad (3)$$

Trong đó: V_e là thể tích của pha di động cần thiết để rửa giải mẫu từ cột; V_0 là thể tích của pha động bên ngoài các hạt gel; V_t là thể tích của pha động để rửa giải phân tử nhỏ có thể đi qua tất cả các lỗ gel.

Do các chất được chạy ở cùng tốc độ dòng nên công thức (3) sẽ được rút gọn thành công thức sau: $K_d = (RT_e - RT_0)/(RT_t - RT_0)$ (4)

Trong đó K_d : Hệ số phân bố của mẫu, RT_0 : thời gian lưu của chất có kích thước lớn được rửa giải hoàn toàn sau khi qua cột cho thể tích V_0 , RT_t : Thời gian lưu của chất có kích thước nhỏ có thể khuếch tán tự do

cho thể tích rửa giải V_e , RT_e : là thời gian lưu trung bình của mẫu hoặc Thyroglobulin. Như vậy thuật ngữ K_d của quy trình là chúng ta ngầm hiểu đồng nhất với K_{av} .

Do DNA có kích thước phân tử là 8580 kDa là đại phân tử nên được sử dụng làm phân tử đại diện cho thể tích V_0 , ATP có kích thước phân tử là 551,14 Da là phân tử nhỏ nên được sử dụng làm phân tử đại diện cho thể tích rửa giải V_e , phân tử Thyroglobulin có kích thước phân tử là 670 kDa tương đương với kích thước của phân tử Meninges conjugate của Menactra nên được sử dụng làm mẫu đối chứng trong quy trình.

Các đại phân tử không thể đi qua các lỗ gel nên sẽ được rửa giải sớm và có giá trị K_d bằng 0, các phân tử rất nhỏ có thể di chuyển qua được tất cả các lỗ rỗng trên gel có giá trị K_d bằng 1.

Đối với các phân tử có kích thước trung gian, giá trị K_d khác nhau trong khoảng (0-1). Sự khác biệt về giá trị K_d của các hợp chất khác nhau trong các mẫu cho sự tách biệt của chúng trong quá trình lọc gel.

Tiêu chuẩn K_d của phân tử Meniges conjugate trong vắc xin Menactra $\leq 0,8$. Trong trường hợp K_d lớn hơn 0,8 ta có thể khẳng định phân tử này có thể bị đứt gãy hoặc đã không liên kết hoàn toàn với phân tử protein mang việc này gây ảnh hưởng tới khả năng sinh kháng thể, hiệu quả bảo vệ của vắc xin hay còn được gọi là hiệu giá của vắc xin.

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 mẫu Menactra. 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.

6. Kết luận

Quy trình xác định hệ số phân bố Kd của Meninges conjugate trong vắc xin Menactra bằng phương pháp sắc ký rây phân tử có giá trị và phù hợp với mục đích sử dụng tại Khoa Kiểm định Hóa lý. Độ không đảm bảo đo mở rộng công bố đối với mẫu: U = **0,0128** với độ tin cậy 95 %.

Tài liệu tham khảo

- [1]. Chemistry/Paper No.16 Bioorganic and biophysical chemistry/Module No.10 Gel permeation Chromatography.
- [2]. Hồ sơ nhà sản xuất vắc xin Menactra
- [3]. ISO/IEC 17025:2005: Yêu cầu chung về năng lực của phòng thử nghiệm và hiệu chuẩn.
- [4]. SOP KĐQG 34: Hướng dẫn thẩm định phương pháp.
- [5]. Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2 (R1), International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human. Geneva, Switzerland, 2005.
- [6]. WHO guide to good manufacturing practice requirement Part 2: Validation.
- [7]. FDA, Reviewer Guidance' Validation of Chromatographic Method.
- [8]. Trần Cao Sơn. Thẩm định phương pháp trong phân tích hóa học và vi sinh". Nhà xuất bản Khoa học kỹ thuật Hà Nội.
- [9]. Tạ Thị Thảo, 2006. Thông kê trong Hóa phân tích. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội.
- [10]. AGL 18: Hướng dẫn đánh giá và diễn đạt độ không đảm bảo đo trong phân tích hóa học định lượng.
- [11]. AOAC Peer-Verified Methods Program, Manual on Policies and Procedures (1998), AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD. Phụ lục F.
- [12]. TCVN 9595-3:2013: Độ không đảm bảo đo – Phần 3: Hướng dẫn trình bày độ không đảm bảo đo.