

การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมและปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระในวัคซีนป้องกันเชื้อฮีโมฟิลุส อินฟลูเอนเซ ชนิดบี โดย HPAEC-PAD

ชลดา เพ็ชรไทย กนกพร โล่หอมรินทร์ชัย กัสมา บุญมาก อภิชัย ศุภสารสาทร และ สุภาพร ภูมิอมร
สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ วัคซีนป้องกันเชื้อฮีโมฟิลุส อินฟลูเอนเซ ชนิดบี (วัคซีนฮิบ) เป็นวัคซีนป้องกันโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบและปอดอักเสบในเด็กเล็ก ผลิตจากส่วนโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ *Haemophilus influenzae* type b การตรวจหาปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมและโพลีแซคคาไรด์อิสระเป็นพารามิเตอร์สำคัญในการควบคุมคุณภาพวัคซีน ซึ่งองค์การอนามัยโลกแนะนำวิธี HPAEC-PAD ในการตรวจวิเคราะห์ เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความถูกต้อง แม่นยำสูง เหมาะสำหรับการตรวจหาสารโพลีแซคคาไรด์ การศึกษานี้ใช้คอลัมน์ชนิดแลกเปลี่ยนไอออนลบ อุณหภูมิคอลัมน์ 30 องศาเซลเซียส สารละลายตัวพาเป็น 580 mM NaOH อัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาณที่ฉีด 50 ไมโครลิตร ตรวจวัดด้วยเครื่อง PAD ผลการศึกษาพบว่ากราฟสารมาตรฐานมีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.15 ถึง 10.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9999 ความเที่ยงเมื่อทดสอบในวันเดียวกันได้ค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมและปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระเท่ากับ 3.38 และ 1.61 ตามลำดับ และต่างวันกันได้ค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมและปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระเท่ากับ 4.47 และ 3.22 ตามลำดับ วิธีมีความแม่นยำสามารถตรวจวัดสารมาตรฐานที่ใส่ในวัคซีนรวม DTP-HB-Hib ได้ค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ระหว่าง 96.74 และ 103.37 ตามลำดับ วิธีมีความจำเพาะ สามารถวิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์ในวัคซีนได้ตั้งแต่ 0.15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่าอุณหภูมิคอลัมน์และระยะเวลาการย่อยด้วยกรดมีผลต่อการวิเคราะห์ สรุปได้ว่าวิธีนี้สามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการของสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้

คำสำคัญ: วัคซีนป้องกันเชื้อฮีโมฟิลุส อินฟลูเอนเซ ชนิดบี, ปริมาณโพลีแซคคาไรด์, HPAEC-PAD, การทดสอบความถูกต้องของวิธี

Corresponding author E-mail: chonlada.p@dmsc.mail.go.th

Received: 2 August 2024

Revised: 18 December 2024

Accepted: 17 January 2025

บทนำ

โรคติดเชื้อฮีโมฟิลุสอินฟลูเอนเซ ชนิดบี (*Haemophilus influenzae* type b) หรือเรียกสั้นๆว่า ฮิบ (Hib) เป็นโรคที่มีความสำคัญในเด็กเล็ก โดยเฉพาะที่อายุต่ำกว่า 2 ปี เชื้อฮิบก่อให้เกิดโรคที่สำคัญ เช่น โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ โรคติดเชื้อในกระแสเลือด โรคปอดอักเสบ โรคข้ออักเสบ และโรคหูชั้นกลางอักเสบ โดยเชื้อจะแพร่กระจายจากคนสู่คนผ่านทางละอองในอากาศ และการสัมผัสโดยตรงกับสารคัดหลั่งของทางเดินหายใจ⁽¹⁾ สำหรับประเทศไทยจากการศึกษาของกรมควบคุมโรคกระทรวงสาธารณสุข ในปี พ.ศ. 2543–2544 พบอุบัติการณ์ของโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบจากเชื้อฮิบ 6.1 รายต่อประชากรเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี แสคนต่อปี ซึ่งถือว่าค่อนข้างต่ำ⁽²⁾ ถึงแม้อุบัติการณ์โรคจะต่ำ แต่หากเกิดการติดเชื้อนี้จะมีอาการรุนแรงได้ ด้วยเหตุนี้การป้องกันโรคทำได้โดยการฉีดวัคซีนป้องกันเชื้อฮีโมฟิลุส อินฟลูเอนเซ ชนิดบี หรือวัคซีนฮิบ (*Haemophilus influenzae* type b vaccine; Hib vaccine) เพื่อสร้างภูมิคุ้มกัน และลดอุบัติการณ์ของการติดเชื้อฮิบลงได้

วัคซีนฮิบ ผลิตจากส่วนโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อฮิบ มีลักษณะโครงสร้างเป็น linear polymer ของ 3-b-D-ribofuranosyl (1→1) D-ribitol-5-phosphate (PRP) นำมา conjugate กับโปรตีนพาหะ ซึ่งอาจเป็น CRM197 toxoid ของเชื้อบาดทะยักหรือคอตีบ วัคซีนฮิบมี 2 ชนิด คือ วัคซีนชนิดเดี่ยวและวัคซีนรวม ซึ่งวัคซีนรวมจะรวมอยู่กับวัคซีนคอตีบ บาดทะยัก ไอกรน ตับบักเสบปี หรือโปลิโอชนิดฉีด ขึ้นอยู่กับบริษัทผู้ผลิต^(1,3,4) ปัจจุบันประเทศไทยได้บรรจุวัคซีนรวมคอตีบ บาดทะยัก ไอกรน ตับบักเสบปี และฮิบอยู่ในแผนงานการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันแห่งชาติตั้งแต่ปี พ.ศ. 2562⁽⁵⁾ ใช้ฉีดเข้ากล้ามเนื้อในเด็กอายุตั้งแต่ 2 เดือนขึ้นไป ทำให้มีการนำวัคซีนรวมที่มีฮิบเป็นส่วนประกอบมาขึ้นทะเบียนตำรับยาในประเทศไทยเพิ่มมากขึ้นเป็นอย่างมาก สำหรับการขึ้นทะเบียนตำรับในประเทศไทยจะต้องมีการตรวจวิเคราะห์คุณภาพ โดยสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เป็นห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพวัคซีนภาครัฐแห่งเดียวของประเทศ เพื่อยืนยันว่าวัคซีนที่นำมาขึ้นทะเบียนมีคุณภาพและมีความปลอดภัย

ตามมาตรฐาน ในการตรวจวิเคราะห์คุณภาพของวัคซีน สามารถตรวจสอบโดยใช้วิธีทางห้องปฏิบัติการ ทั้งทางด้านชีวภาพ กายภาพ และด้านเคมี รายการวิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) หรือปริมาณแอนติเจนรวมและอิสระเป็นพารามิเตอร์หนึ่งที่มีความสำคัญในการตรวจวิเคราะห์คุณภาพวัคซีน⁽⁶⁾ เพื่อยืนยันว่าวัคซีนมีปริมาณโพลีแซคคาไรด์ตรงตามข้อกำหนดผลิตภัณฑ์ที่ระบุในทะเบียนตำรับยาชีววัตถุ ซึ่งข้อกำหนดผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ของปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมอยู่ระหว่างร้อยละ 80 ถึง 120 ของปริมาณที่เติมลงไป (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระจะมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 20 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวม

วิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์ หรือปริมาณแอนติเจนในวัคซีนฮิบ องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้แนะนำหลายวิธี เช่น Colorimetric Method, Immunological Method และ Chromatographic Method เป็นต้น⁽⁶⁾ ซึ่งบางวิธียังมีข้อจำกัดสำหรับห้องปฏิบัติการภาครัฐ เช่น การตรวจด้วยเทคนิค ELISA ถึงแม้จะเป็นวิธีที่มีความจำเพาะ และผู้ผลิตบางรายใช้วิธีนี้ในการตรวจคุณภาพของวัคซีน แต่ต้องใช้สารแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่จำเพาะต่อวัคซีนของแต่ละบริษัท จึงมีความจำเพาะที่จำกัดและอาจมีแนวโน้มที่จะให้ผลบวกหรือผลลบปลอม เนื่องจากข้อผิดพลาดทางเทคนิค การปนเปื้อนของตัวอย่าง การใช้สารเคมีคุณภาพต่ำ ความไม่เสถียรจากการไวต่ออุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลง และอื่นๆ แต่วิธี High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulse Amperometric Detection (HPAEC-PAD) เป็นวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาสารจำพวกคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) โอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) และโพลีแซคคาไรด์ เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความถูกต้อง แม่นยำสูง⁽⁷⁾ และไม่มีความจำเป็นต้องใช้สารจากผู้ผลิต จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการได้ และในปัจจุบันบริษัทผู้ผลิตวัคซีนส่วนใหญ่จะใช้วิธี HPAEC-PAD ในการตรวจวิเคราะห์ โดยวิธีนี้จะอาศัยความแตกต่างของอัตรา

การเคลื่อนที่ของแต่ละองค์ประกอบของสารบนเฟสคงที่ (Stationary Phase) ภายใต้การพาของเฟสเคลื่อนที่ (Mobile Phase) โดยใช้ Anion-exchange Column ที่เป็นเฟสคงที่ มีสารตัวกลาง (Ion Exchanger) เป็นประจุบวก ซึ่งจะจับกับสารละลายที่มีประจุลบด้วยแรง Electrostatic force เมื่อสารถูกปล่อยออกมา จะผ่านเครื่องตรวจวัดสัญญาณชนิด PAD ซึ่งเป็น Electro-chemical detector จากนั้นคำนวณหาปริมาณของสาร โดยอ่านค่าจากกราฟมาตรฐานที่เตรียมจากสารมาตรฐาน ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

การศึกษานี้จึงดำเนินการพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมและปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระในวัคซีนฮิบ โดยวิธี HPAEC-PAD เพื่อนำมาใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ในการตรวจทางห้องปฏิบัติการสำหรับการควบคุมคุณภาพของวัคซีนฮิบในประเทศไทย ซึ่งจะทำให้ผู้บริโภคได้รับวัคซีนที่มีคุณภาพเป็นไปตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์และมาตรฐานสากลในการป้องกันโรคได้

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี: น้ำ HPLC grade; conductivity 18.2 MW CAS No. 7732-18-5 (Ligand Scientific, Thailand), methanol HPLC grade CAS No. 67-56-1 (J.T. Baker, USA), 1N NaOH CAS No. 1310-73-2 (Merck, Germany), NaH_2PO_4 , NaCl, HCl; analytical grade (Sigma-Aldrich, USA) และ $\text{H}_{25}\text{Na}_2\text{O}_{16}\text{P}$ analytical grade (BDH, England)

สารมาตรฐาน: WHO International Standard *Haemophilus influenzae* b polysaccharide poly-ribosyl-ribitol-phosphate (PRP) code 02/208 (National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), UK)⁽⁸⁾ ใช้สำหรับการทดสอบความเหมาะสมของระบบ และ Adonitol (Ribitol) CAS No. 488-81-3 (Sigma-Aldrich, USA)⁽⁹⁾ ใช้สำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน และใช้เป็นสารควบคุมผลบวก (Positive Control)

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง HPLC รุ่น LC-20ADXR (Nexera, Shimadzu, Japan), Software LabSolution (Shimadzu, Japan), Pulse Amperometric Detector รุ่น ED743 (GL Sciences, Japan) โดยใช้คอลัมน์แยกสารชนิด CarboPac MA1 analytical column ขนาด 4×250 มิลลิเมตร (Dionex, USA) และ CarboPac MA1 guard column (Dionex, USA)

เครื่องชั่งความละเอียดทศนิยม 2 และ 5 ตำแหน่ง (Sartorius, Germany), ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส (Sanyo, Japan), ตู้แช่แข็งควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Haier, China), ตู้ทำความร้อน (Memmert, Germany), ตู้ดูดควัน (Kottermann, Germany), เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมความเย็น (Kubota, Japan), เครื่องเขย่าผสม (Scientific Industries, USA), เครื่องดูดสุญญากาศ (Gast, USA), แผ่นกรอง Nylon ขนาด 0.22 ไมครอน (Corning, USA), หลอด cryotube ขนาด 2 มิลลิลิตร (Eppendorf, Germany), หลอดแก้วทนกรด (glass microtube with gasket Teflon plug) ขนาด 4 มิลลิลิตร (Agilent, USA), เครื่องแก้ว และไมโครปิเปต ขนาด 1-1,000 ไมโครลิตร (Finnpipette, Finland)

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

การเตรียมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น: ชั่งสารมาตรฐาน ribitol น้ำหนัก 15 มิลลิกรัม ใส่ในขวดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำที่กำจัดแก๊สละลายให้เข้ากันและปรับปริมาตรด้วยน้ำดังกล่าวให้ครบ 100 มิลลิลิตร แบ่งสารละลายลงในหลอด cryotube ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับใช้งาน: เจือจางสารละลายมาตรฐานเข้มข้น ribitol ด้วยน้ำที่กำจัดแก๊สก่อนการใช้งานให้มีความเข้มข้นของ ribitol เท่ากับ 0.15, 0.75, 1.50, 4.50, 7.50 และ 10.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในหลอดทดลอง เพื่อใช้สร้างกราฟมาตรฐาน กรองด้วยแผ่นกรอง Nylon ขนาด 0.22 ไมครอน

การเตรียมสารควบคุมผลบวก: เตรียมโดยใช้สาร ribitol ต่างรุ่นการผลิตกับที่ใช้เตรียมกราฟมาตรฐาน นำมาซึ่งและละลายด้วยน้ำที่กำจัดแก๊สให้มีความเข้มข้นของสาร ribitol เท่ากับ 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กรองด้วยแผ่นกรอง Nylon ขนาด 0.22 ไมครอน

ตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่าง: วัคซีนรวม คอตีบ บาดทะยัก ไอกรน ตัวยกเสปปี และฮิบ (DTP-HepB-Hib) ที่ขึ้นทะเบียนในประเทศไทย จำนวน 1 รุ่นการผลิต

การเตรียมตัวอย่าง: นำวัคซีนรุ่นการผลิตเดียวกัน เทรวมกันให้มีปริมาตรอย่างน้อย 8 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการเขย่าประมาณ 30 วินาที

การเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวม: ดูดวัคซีนที่เตรียมไว้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดแก้วทนกรด เพื่อนำไปย่อยด้วยกรดต่อไป

การเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระ: เติมวัคซีนที่เตรียมไว้ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตร ขนาด 5 มิลลิลิตร เติม Phosphate Buffer, 5 mM pH 6.8 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน จากนั้นเขย่าอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,300 g เวลา 30 นาที อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ส่วนใสที่ได้ นำไปผ่าน SPE C4 Cartridge เพื่อแยกโพลีแซคคาไรด์อิสระจากโพลีแซคคาไรด์รวม แล้วนำไปย่อยด้วยกรดต่อไป

การย่อยตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานด้วยกรด (acid hydrolysis) เป็นขั้นตอนสลายโพลิเมอร์ (depolymerization) โดยดูดตัวอย่างสารละลายมาตรฐานสำหรับใช้งานที่ความเข้มข้นต่างๆ และสารควบคุมผลบวก ใส่ในหลอดแก้วทนกรด หลอดละ 1 มิลลิลิตร เติม 6 N HCl ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปอบในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 100 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 5 ± 3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ± 2 นาที เติมสารละลาย 1 M NaOH ปริมาตรหลอดละ 400 ไมโครลิตร นำไปกรองด้วยแผ่นกรอง Nylon ขนาด 0.22 ไมครอน ก่อนวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC สำหรับตัวอย่างวัคซีน

เพื่อวิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมที่ย่อยแล้วให้เจือจางด้วยสารละลาย 70 mM NaOH เพื่อให้มีปริมาณโพลีแซคคาไรด์อยู่ในช่วงค่ากราฟมาตรฐาน ผสมให้สารละลายเข้ากัน แล้วนำไปกรองด้วยแผ่นกรอง Nylon ขนาด 0.22 ไมครอน ก่อนวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีตรวจวิเคราะห์

ทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี HPAEC-PAD ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมและปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระในวัคซีนฮิบ เพื่อให้ได้ช่วงความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่จะนำมาใช้เป็นกราฟมาตรฐานที่มีความเป็นเส้นตรง และทดสอบกับตัวอย่างที่ระดับการเจือจางเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ซึ่งสภาวะที่ทำการศึกษา ประกอบด้วย ขั้นตอนการย่อยด้วยกรดเพื่อสลายสายโพลีแซคคาไรด์ให้ได้ส่วน ribitol อิสระก่อนนำมาผ่านคอลัมน์วิเคราะห์ โดยเลือกความเข้มข้นกรด ปริมาตรที่ใช้ อุณหภูมิ และเวลาที่สามารถย่อยโพลีแซคคาไรด์ในตัวอย่างได้ดีและใช้ระยะเวลาในการย่อยเหมาะสม รวมทั้งสามารถแยกพีค (peak) ได้ดี การเลือกช่วงความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ซึ่งช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสม ต้องครอบคลุมกับปริมาณโพลีแซคคาไรด์ในตัวอย่างและมีความเป็นเส้นตรง

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมและปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระในวัคซีนฮิบ โดย HPAEC-PAD

นำสารละลายมาตรฐานสำหรับใช้งาน สารควบคุมผลบวก และสารละลายตัวอย่างที่ย่อยด้วยกรดแล้วข้างต้น มาตรวจวัดด้วยเครื่อง HPAEC-PAD ที่ใช้สภาวะการทำงาน ประกอบด้วย คอลัมน์แยกสารชนิด CarboPac MA1 analytical column ขนาด 4×250 มิลลิเมตร พร้อม CarboPac MA1 guard column ตั้งอุณหภูมิของ column chamber และอุณหภูมิของ auto sampler chamber ไว้ที่ 30 และ 4 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ใช้ working และ reference electrode ชนิด Gold และ AgCl ตามลำดับ ปริมาตรการฉีดตัวอย่างต่อครั้งเท่ากับ 50 ไมโครลิตร ใช้ 580 mM NaOH เป็นสารตัวพา ปรับอัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที

ตัวตรวจวัดสัญญาณชนิด Pulse amperometric ตั้งระยะเวลาการทำงานแต่ละรอบ 40 นาที คำนวณปริมาณ โพลีแซคคาไรด์ โดยอ่านค่าจากกราฟมาตรฐานของ ribitol ที่เครื่องคำนวณให้ นำมาแปลงค่าให้เป็นปริมาณ โพลีแซคคาไรด์ โดยคูณด้วย dilution factor และ conversion factor ที่มีค่าเท่ากับ 2.42 (conversion factor) คำนวณจากน้ำหนักโมเลกุลของ PRP repeating units ทารด้วยน้ำหนักโมเลกุลของสาร ribitol⁽¹⁰⁻¹²⁾

การทดสอบความพร้อมของระบบ (System Suitability)

ฉีดสารมาตรฐาน PRP ที่ระดับความเจือจาง 1:20 และ 1:40 โดยระดับความเจือจางละ 3 ซ้ำ คำนวณส่วน เบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เกณฑ์การยอมรับต้องมี ส่วน เบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของแต่ละระดับความเจือจาง ต้องไม่เกินร้อยละ 5 และผลวิเคราะห์ที่ได้ต้องมีปริมาณ โพลีแซคคาไรด์อยู่ในระหว่างร้อยละ 80 และ 120 ของ ปริมาณโพลีแซคคาไรด์ของสารมาตรฐาน PRP ที่ใช้

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์^(13,14)

ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน และช่วง ค่าของการวิเคราะห์ (Linearity and Range)

วิเคราะห์สารละลายมาตรฐานสำหรับการใช้งาน ที่มีความเข้มข้นของสาร ribitol เท่ากับ 0.15, 0.75, 1.50, 4.50, 7.50 และ 10.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยเครื่อง HPAEC-PAD ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ สร้าง กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสาร ribitol และ พื้นที่ใต้กราฟ คำนวณสมการถดถอยเชิงเส้น (Linear regression Equation) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Coefficient of Correlation; r) เกณฑ์การยอมรับค่า r ต้องไม่น้อยกว่า 0.998

การทดสอบความเที่ยง (Precision)

ทำการศึกษาใน 2 หัวข้อคือ 1) การทำซ้ำในวัน เดียวกัน โดยใช้ตัวอย่างเดียวกัน วิเคราะห์จำนวน 9 ซ้ำ ในวันเดียวกัน โดยนักวิเคราะห์คนเดียวกัน และ 2) การวิเคราะห์ต่างวัน โดยใช้ตัวอย่างเดียวกัน นำมา เติร์ยมและวิเคราะห์ 6 การทดสอบต่างวันกัน วิเคราะห์ วันละ 3 ซ้ำ โดยนักวิเคราะห์คนเดียวกัน คำนวณค่าเฉลี่ย

ปริมาณโพลีแซคคาไรด์ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เกณฑ์การยอมรับต้อง มีส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของปริมาณโพลีแซค คาไรด์รวมไม่เกินร้อยละ 5 และปริมาณโพลีแซคคาไรด์ อิสระไม่เกินร้อยละ 10 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ ต่างวันด้วยสถิติ Independent T-test ซึ่งผลการ วิเคราะห์จะต้องไม่แตกต่างกัน

การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

เติมสารละลายมาตรฐาน จำนวน 3 ความเข้มข้น ที่อยู่ในช่วงกราฟมาตรฐานลงในขวดขึ้นตัวอย่าง วิเคราะห์ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ คำนวณร้อยละการคืนกลับ เกณฑ์ การยอมรับของปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมต้องมีร้อยละ การคืนกลับอยู่ระหว่างร้อยละ 90 และ 110 และปริมาณ โพลีแซคคาไรด์อิสระต้องมีร้อยละการคืนกลับอยู่ระหว่าง ร้อยละ 80 และ 120

การทดสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity)

เปรียบเทียบ Retention Time (RT) ของพีคจาก โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน สารควบคุมผลบวก สำหรับใช้งาน ตัวอย่างสำหรับทดสอบ กับตัวอย่างวัดขึ้น ชนิดอื่น ตัวอย่างสำหรับทดสอบจะต้องปรากฏพีคจาก โครมาโตแกรมที่ RT ใกล้เคียงกับพีคจากโครมาโตแกรม ของสารมาตรฐานและสารควบคุมผลบวกสำหรับใช้งาน

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิง ปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ)

LOD คำนวณจากค่าความเข้มข้นสารที่ให้ค่า สัญญาณเป็น 3 เท่าของสัญญาณรบกวน และ LOQ คำนวณจาก ความเข้มข้นของสารที่ให้ค่าสัญญาณเป็น 10 เท่าของสัญญาณรบกวน

การทดสอบความทนของวิธี (Robustness)

ทำการศึกษาใน 3 ตัวแปร คือ 1) อายุของสารตัวพา 2) อุณหภูมิของคอลัมน์ และ 3) ระยะเวลาการย่อย ด้วยกรด ทำการวิเคราะห์โดยใช้ตัวอย่างเดียวกัน นำมาเติร์ยมและวิเคราะห์จำนวนตัวแปรละ 3 การทดสอบ ต่างวัน ทำการวิเคราะห์ครั้งละ 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบผล การวิเคราะห์ทางสถิติ

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Estimation of Measurement Uncertainty)

ประเมินค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์
เพื่อให้เป็นไปตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017
โดยคำนึงถึงแหล่งความไม่แน่นอนทุกแหล่ง เมื่อรวมค่า
ความไม่แน่นอนทั้งหมด คำนวณค่าความไม่แน่นอนขยาย
ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผล

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีตรวจวิเคราะห์

จากการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของ
วิธี HPAEC-PAD ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ
โพลีแซคคาไรด์รวมและปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระ
ในวัคซีนฮิบ ได้สภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์
ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิธี HPAEC-PAD ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมและ
ปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระในวัคซีนฮิบ

Parameter	Setting
Column and Guard Column	CarboPac MA1
Column Temperature	30°C
Detection	Pulsed Amperometric detection
Gold Electrode	Not disposable
Reference Electrode	AgCl
Elution Conditions/Eluent	Isocratic – 580 mM NaOH
Wash-Regeneration Condition/Equilibration	Before starting an analysis, washing with NaOH 1M for 1h, equilibration with NaOH 580 mM for 1h
Autosampler Temperature	4°C
Injection Volume	50 µL
Flow Rate	0.4 mL/min
Run Time	40 min
Software for Data Acquisition and Processing	LabSolution

การทดสอบความพร้อมของระบบเมื่อฉีดสาร
มาตรฐาน PRP ที่ระดับความเจือจาง 1:20 และ 1:40
โดยฉีดระดับความเจือจางละ 3 ซ้ำ คำนวณส่วนเบี่ยงเบน
มาตรฐานสัมพัทธ์ พบว่าปริมาณโพลีแซคคาไรด์ของสาร
มาตรฐาน PRP ที่ระดับความเจือจาง 1:20 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ
16.83 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าส่วนเบี่ยงเบน
มาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 0.59 ที่ระดับความเจือจาง 1:40
มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 17.98 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ
มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 0.78 ดังแสดง
ในตารางที่ 2

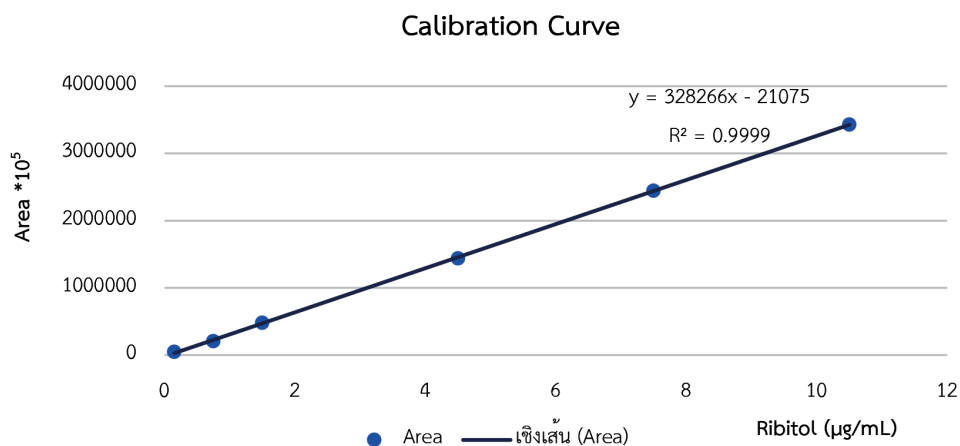
ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน และช่วงค่าของ การวิเคราะห์ (Linearity and Range)

ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน และ
ช่วงค่าของการวิเคราะห์ เมื่อนำค่าพื้นที่ใต้กราฟและ
ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน ribitol ที่มีความ
เข้มข้นระหว่าง 0.15 ถึง 10.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
มาสร้างกราฟ จะได้กราฟที่มีความเป็นเส้นตรง มีค่า
สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9999 โดยมีสมการ
ถดถอยเชิงเส้น $y = 328266x - 21075$ ดังแสดงในภาพที่ 1
การทดสอบความเป็นเส้นตรงด้วย F-test ได้ค่ามากกว่า
ค่า F-critical ที่ alpha 0.05 ผลจากกราฟ Residual Plot

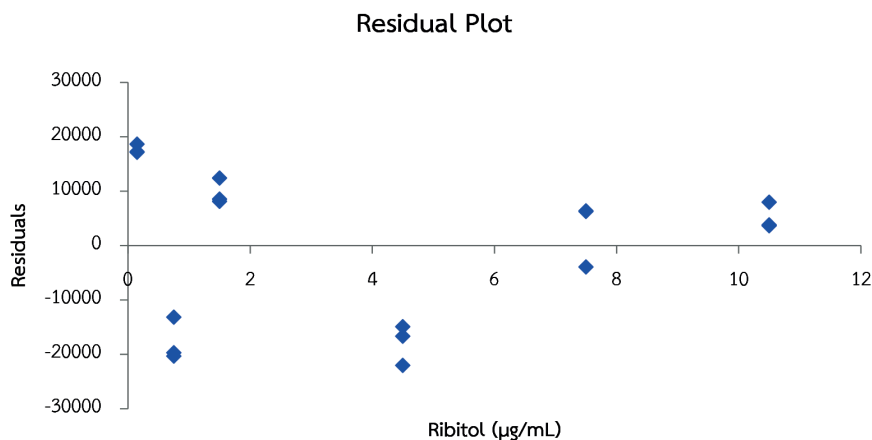
ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความพร้อมของระบบเมื่อวิเคราะห์สารมาตรฐาน PRP ที่ระดับความเจือจาง 1:20 และ 1:40

ครั้งที่	ปริมาณโพลีแซคคาไรด์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	1:20	1:40
1	16.74	17.99
2	16.82	18.12
3	16.93	17.84
ค่าเฉลี่ย	16.83	17.98
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.10	0.14
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์	0.59	0.78

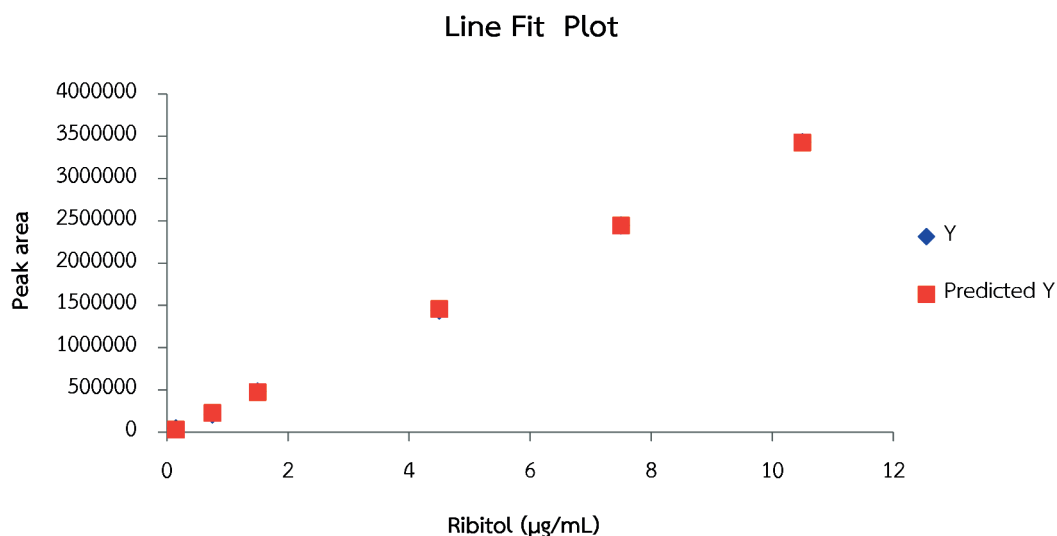
พบว่ามีการกระจายตัวของค่ารอบๆ ของแกน X ดังแสดงในภาพที่ 2 และกราฟ Line Fit Plot พบการเรียงตัวของจุดค่า y ที่ตรวจวัดได้เทียบกับ predicted y มีค่าใกล้เคียงกันเป็นการยืนยันให้เห็นว่ากราฟเป็นเส้นตรง ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าพื้นที่ใต้กราฟ (แกน Y) และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน ribitol ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 0.15 ถึง 10.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (แกน X)



ภาพที่ 2 กราฟ Residual Plot ของการตรวจวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน ribitol ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 0.15 ถึง 10.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 3 กราฟ line fit plot ของการตรวจวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน ribitol ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 0.15 ถึง 10.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การทดสอบความเที่ยง (Precision)

การทดสอบความเที่ยง เมื่อทำซ้ำในวันเดียวกัน ใช้ตัวอย่างเดียวกัน วิเคราะห์จำนวน 9 ซ้ำในวันเดียวกัน พบว่าค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมที่คำนวณได้เท่ากับ 3.38 และ ปริมาณ

โพลีแซคคาไรด์อิสระที่คำนวณได้เท่ากับ 1.61 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมไม่เกินร้อยละ 5 และ ปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระไม่เกินร้อยละ 10 ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการศึกษาความเที่ยงเมื่อทำซ้ำในวันเดียวกัน ใช้ตัวอย่างเดียวกัน วิเคราะห์จำนวน 9 ซ้ำในวันเดียวกัน

ครั้งที่	ปริมาณโพลีแซคคาไรด์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	ปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวม	ปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระ
1	5.42	1.18
2	5.65	1.18
3	6.02	1.19
4	5.93	1.17
5	5.93	1.19
6	5.71	1.14
7	5.54	1.16
8	5.93	1.15
9	5.68	1.20
ค่าเฉลี่ย	5.76	1.17
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.19	0.02
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (ร้อยละ)	3.38	1.61

การทดสอบความเที่ยง เมื่อใช้ตัวอย่างวัคซีนเดียวกัน เตรียมตัวอย่างใหม่ในแต่ละวัน ทำการวิเคราะห์ต่างวัน จำนวน 6 วัน วิเคราะห์วันละ 3 ซ้ำ โดยนักวิเคราะห์คนเดียว พบว่าค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมที่คำนวณได้เท่ากับ 4.47

และปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระที่คำนวณได้เท่ากับ 3.22 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับคือส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมไม่เกินร้อยละ 5 และปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระไม่เกินร้อยละ 10 ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการศึกษาความเที่ยง เมื่อใช้ตัวอย่างวัคซีนเดียวกัน เตรียมตัวอย่างใหม่ในแต่ละวัน ทำการวิเคราะห์ต่างวัน จำนวน 6 วัน วิเคราะห์วันละ 3 ซ้ำ

วันที่	ปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวม (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)				ปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)			
	ฉีดครั้งที่ 1	ฉีดครั้งที่ 2	ฉีดครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	ฉีดครั้งที่ 1	ฉีดครั้งที่ 2	ฉีดครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
1	6.62	6.51	6.96	6.70	1.25	1.15	1.16	1.19
2	6.35	6.44	6.73	6.50	1.21	1.14	1.14	1.16
3	6.39	6.54	6.55	6.49	1.13	1.10	1.12	1.12
4	6.64	6.70	8.02	7.12	1.29	1.14	1.24	1.22
5	5.34	8.73	5.60	6.56	1.18	1.18	1.19	1.18
6	5.90	6.36	6.13	6.13	1.13	1.10	1.12	1.12
	ค่าเฉลี่ย			6.58	ค่าเฉลี่ย			1.16
	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน			0.29	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน			0.04
	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (ร้อยละ)			4.47	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (ร้อยละ)			3.22

การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

การทดสอบความแม่นยำ เมื่อเติมสารละลายมาตรฐาน ribitol จำนวน 3 ความเข้มข้นที่เติมลงในวัคซีนตัวอย่างที่อยู่ในช่วงกราฟมาตรฐานลงในตัวอย่าง วิเคราะห์ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ พบว่าค่าร้อยละการคืนกลับของปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมอยู่ระหว่างร้อยละ 93.75 และ 106.67 และค่าร้อยละการคืนกลับของปริมาณ

โพลีแซคคาไรด์อิสระอยู่ระหว่างร้อยละ 92.11 และ 115.79 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ คือ ปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมต้องมีร้อยละการคืนกลับอยู่ระหว่างร้อยละ 90 และ 110 และปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระต้องมีร้อยละการคืนกลับอยู่ระหว่างร้อยละ 80 และ 120 ดังแสดงในตารางที่ 5

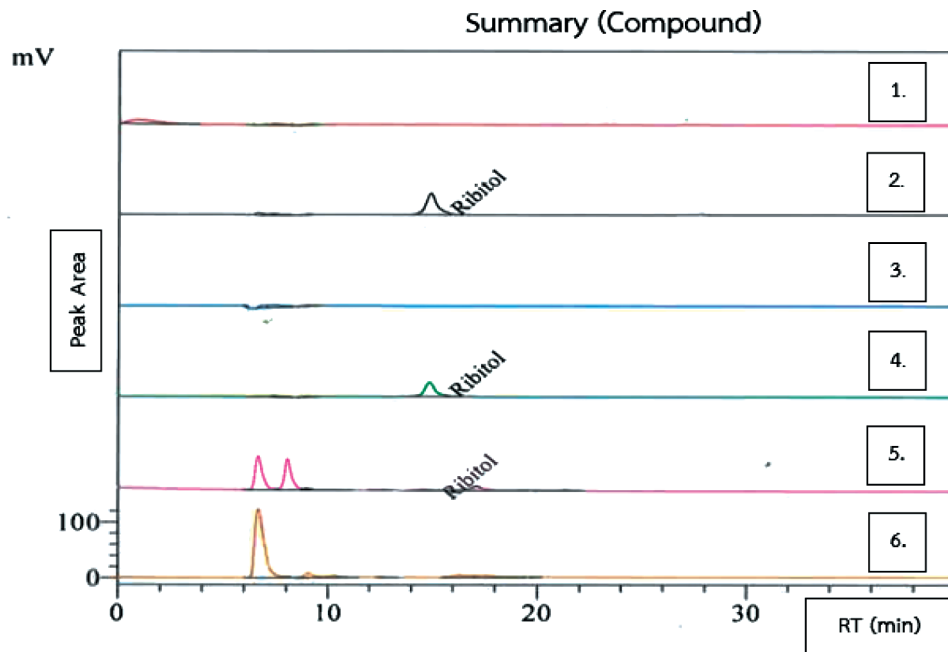
ตารางที่ 5 ร้อยละการคืนกลับของการเติมสารมาตรฐาน ribitol ในตัวอย่าง จำนวน 3 ความเข้มข้น เติมลงในวัคซีนตัวอย่าง

ครั้งที่	ร้อยละการคืนกลับของสารมาตรฐาน ribitol ความเข้มข้นของ ribitol ที่เติมลงในวัคซีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)					
	ปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวม			ปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระ		
	0.75	4.50	7.50	0.75	4.50	7.50
1	105.41	100.00	98.14	115.79	94.67	111.17
2	100.00	99.11	106.67	92.11	97.78	101.87
3	93.75	96.89	98.94	94.59	97.78	97.07

การทดสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity)

การทดสอบความจำเพาะของวิธี แสดงให้เห็น
จาก Retention Time (RT) ของพีคจากโครมาโต
แกรม โดยสารละลาย blank และตัวอย่างวัคซีนชนิดอื่น

ไม่ปรากฏพีครบกวนการวิเคราะห์ ส่วนตัวอย่างสำหรับ
ทดสอบ ปรากฏพีคที่ RT ใกล้เคียงกับพีคสารมาตรฐาน
ribitol และสารควบคุมผลบวกสำหรับใช้งาน ดังแสดง
ในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน สารควบคุมผลลบ สารควบคุมผลบวก ตัวอย่างสำหรับทดสอบกับ
ตัวอย่างวัคซีนชนิดอื่น (1) NaCl (2) สารมาตรฐาน ribitol (3) สารละลาย blank (negative control)
(4) positive control (CP) (5) โพลีแซคคาไรด์รวม (ตัวอย่างสำหรับทดสอบ) และ (6) ตัวอย่าง
วัคซีนชนิดอื่น

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และ ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ)

ขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) อยู่ที่ระดับ
0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และขีดจำกัดของการวัดเชิง
ปริมาณ (LOQ) อยู่ที่ระดับ 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
ซึ่งคำนวณจากค่าความเข้มข้นสารที่ให้ค่าสัญญาณเป็น
3 และ 10 เท่าของสัญญาณรบกวนของกราฟมาตรฐาน
จำนวน 6 ครั้ง ดังแสดงในตารางที่ 6 แต่จากตารางจะ
เห็นว่าค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณที่คำนวณได้มี
ค่าเท่ากับ 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งต่ำกว่าปริมาณ
ความเข้มข้นต่ำสุดของสารมาตรฐานคือ 0.15 ไมโครกรัม

ต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงกำหนดค่าขีดจำกัดของการวัดเชิง
ปริมาณที่ 0.15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นค่าความ
เข้มข้นต่ำสุดของสารมาตรฐาน

การทดสอบความทนของวิธี (Robustness)

การทดสอบความทนของวิธี เมื่อเปลี่ยนอายุ
ของสารตัวพาที่เตรียมไว้อายุ 0, 7 และ 14 วัน ทำการ
วิเคราะห์ตัวอย่าง จำนวน 3 ซ้ำ พบว่าปริมาณโพลีแซค-
คาไรด์รวมมีค่าเฉลี่ย 6.45, 6.64 และ 6.72 ไมโครกรัม
ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และปริมาณโพลีแซคคาไรด์
อิสระมีค่าเฉลี่ย 1.29, 1.29 และ 1.26 ไมโครกรัม
ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 7

เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยสถิติ One-way ANOVA พบว่าปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมมีค่า Sig เท่ากับ 0.862 และปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระมีค่า Sig เท่ากับ 0.838 ซึ่งมากกว่า 0.05 แสดงว่าผลการทดสอบที่ตรวจโดยใช้สารตัวพาที่เตรียมไว้อายุ 0, 7 และ 14 วัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

การทดสอบความทนของวิธี เมื่อเปลี่ยนอุณหภูมิของคอลัมน์จากเดิม 30 องศาเซลเซียส เป็น 25 องศาเซลเซียส ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง จำนวน 3 ซ้ำ พบว่าปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมมีค่าเฉลี่ย 6.45 และ 6.19 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระมีค่าเฉลี่ย 1.29 และ 1.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 6 แสดงค่า LOD และ LOQ ที่คำนวณจากค่าความเข้มข้นสารที่ให้ค่าสัญญาณ (S/N) เป็น 3 และ 10 เท่าของสัญญาณรบกวนของกราฟมาตรฐาน

ครั้งที่	LOD (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	LOQ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	0.01	0.04
2	0.01	0.04
3	0.01	0.05
4	0.02	0.05
5	0.02	0.05
6	0.02	0.05
ค่าเฉลี่ย	0.02	0.05

ตารางที่ 7 ผลการศึกษาความทนของวิธีวิเคราะห์ เมื่อเปลี่ยนอายุของสารตัวพาที่เตรียมไว้อายุ 0, 7 และ 14 วัน

ครั้งที่	ปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวม			ปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระ		
	Day 0	Day 7	Day 14	Day 0	Day 7	Day 14
1	6.37	6.38	6.57	1.29	1.27	1.19
2	6.52	6.49	7.77	1.31	1.23	1.24
3	6.46	7.04	5.81	1.28	1.36	1.36
ค่าเฉลี่ย	6.45	6.64	6.72	1.29	1.29	1.26

ตารางที่ 8 ผลการศึกษาความทนของวิธีวิเคราะห์ เมื่อเปลี่ยนอุณหภูมิของคอลัมน์จากเดิม 30 องศาเซลเซียส เป็น 25 องศาเซลเซียส

ครั้งที่	ปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวม		ปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระ	
	30 องศาเซลเซียส	25 องศาเซลเซียส	30 องศาเซลเซียส	25 องศาเซลเซียส
1	6.37	5.97	1.29	1.39
2	6.52	6.16	1.31	1.36
3	6.46	6.45	1.28	1.42
ค่าเฉลี่ย	6.45	6.19	1.29	1.39

เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยสถิติ Independent Sample T-test พบว่าปริมาณโพสแซคคาไรด์รวมมีค่า Sig เท่ากับ 0.154 ซึ่งมากกว่า 0.05 แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 แต่ปริมาณโพสแซคคาไรด์อิสระมีค่า Sig เท่ากับ 0.008 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

การทดสอบความทนของวิธี เมื่อเปลี่ยนระยะเวลาการย่อยด้วยกรดจากเดิม 2 ชั่วโมง เป็น 1.30 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง จำนวน 3 ซ้ำ พบว่าปริมาณโพสแซคคาไรด์รวมมีค่าเฉลี่ย 6.45 และ 3.54 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และปริมาณโพสแซคคาไรด์อิสระมีค่าเฉลี่ย 1.29 และ 1.27 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ผลการศึกษาความทนของวิธีวิเคราะห์ เมื่อเปลี่ยนระยะเวลาการย่อยด้วยกรดจากเดิม 2 ชั่วโมง เป็น 1.30 ชั่วโมง

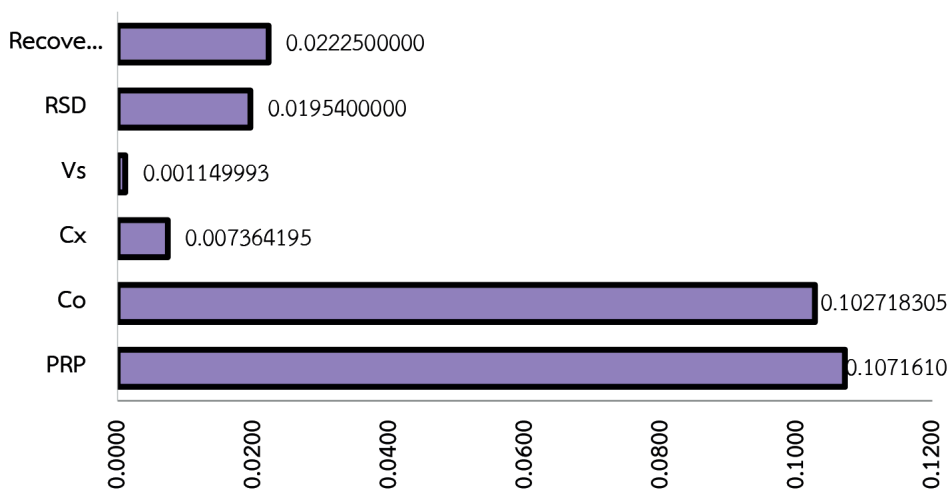
ครั้งที่	ปริมาณโพสแซคคาไรด์รวม		ปริมาณโพสแซคคาไรด์อิสระ	
	2 ชั่วโมง	1.30 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง	1.30 ชั่วโมง
1	6.37	3.71	1.29	1.26
2	6.52	3.51	1.31	1.30
3	6.46	3.40	1.28	1.24
ค่าเฉลี่ย	6.45	3.54	1.29	1.27

เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยสถิติ Independent Sample T-test พบว่าปริมาณโพสแซคคาไรด์รวมมีค่า Sig เท่ากับ 0.000 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 แต่ปริมาณโพสแซคคาไรด์อิสระมีค่า Sig เท่ากับ 0.248 ซึ่งมากกว่า 0.05 แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

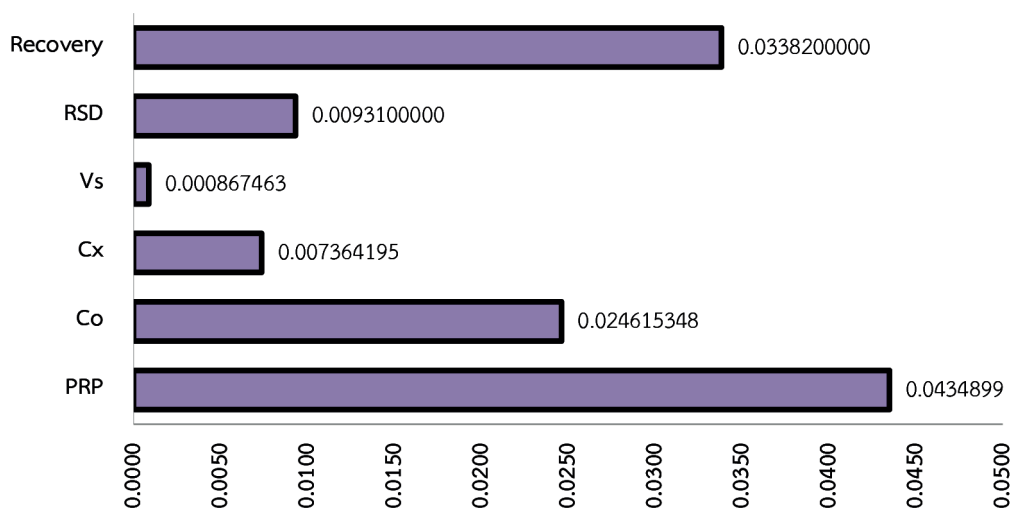
การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Estimation of Measurement Uncertainty)

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์แสดงให้เห็นถึงสายโซ่การสอบกลับได้ของการวัด โดยพิจารณาแหล่งความไม่แน่นอนที่จะมีผลกระทบ

ต่อการตรวจวิเคราะห์ ได้แก่ ความไม่แน่นอนจากความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน การสอบเทียบเครื่องมือ ความเข้มข้นของตัวอย่างที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน ความเที่ยงของวิธีเมื่อทำซ้ำ และค่าร้อยละการคืนกลับของการทดสอบความถูกต้องของวิธี นำมาคำนวณค่าความไม่แน่นอนรวม (Combined Uncertainty; uc) และค่าความไม่แน่นอนขยาย (Expanded Uncertainty; U) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ค่า Coverage Factor (k) เท่ากับ 2 ได้ค่า U ของปริมาณโพสแซคคาไรด์รวมเท่ากับ 2.99 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ U ของปริมาณโพสแซคคาไรด์อิสระเท่ากับ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 5 และ 6



ภาพที่ 5 องค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมที่ตรวจโดยวิธี HPAEC-PAD



ภาพที่ 6 องค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระที่ตรวจโดยวิธี HPAEC-PAD

หมายเหตุ: Recovery = ค่าร้อยละการคืนกลับของการทดสอบความถูกต้องของวิธี
RSD = ความเที่ยงของวิธีเมื่อทำซ้ำ
Vs = ปริมาตรของตัวอย่าง
Cx = ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน
Co = ความเข้มข้นของตัวอย่างที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน
PRP = ความเข้มข้นของตัวอย่างที่รายงาน

วิจารณ์

การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธี HPAEC-PAD ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมและปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระในวัคซีนฮิบเพื่อนำมาใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพ สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สำหรับตรวจสอบคุณภาพวัคซีนที่มีวัคซีนฮิบเป็นส่วนประกอบ ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธี พบว่าเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด แสดงว่าวิธีมีความเหมาะสมถูกต้อง แม่นยำ และเชื่อถือได้ นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบความคงทนของวิธี จำนวน 3 ตัวแปร ประกอบด้วย อายุของสารตัวพา อุณหภูมิของคอลัมน์ และระยะเวลาการย่อยด้วยกรด เพื่อบ่งชี้ว่าเมื่อทั้ง 3 ตัวแปร มีการเปลี่ยนแปลงไปจะส่งผลต่อการตรวจวิเคราะห์หรือไม่ จากผลการทดสอบพบว่าระยะเวลาการย่อยด้วยกรด และอุณหภูมิคอลัมน์มีผลต่อการวิเคราะห์ แสดงว่าทั้ง 2 ตัวแปรเป็นจุดวิกฤติของวิธี ผู้ทำการวิเคราะห์ต้องใส่ใจระมัดระวังและควบคุมการตรวจวิเคราะห์อย่างใกล้ชิด เนื่องจากระยะเวลาการย่อยด้วยกรดมีผลต่อการสลายสายโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ *Haemophilus influenzae* type b ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนของวัคซีนให้แยกส่วน ribitol ที่อยู่ในสายโพลีแซคคาไรด์ให้เป็นอิสระก่อนที่จะนำมาผ่านคอลัมน์เพื่อตรวจวัด หากใช้ระยะเวลาไม่เหมาะสมจะทำให้พีคของโครมาโตแกรมที่แสดงออกมาไม่ปรากฏเป็นพีคเดี่ยว ทำให้ไม่สามารถคำนวณพีคของตัวอย่างเทียบกับพีคของสารมาตรฐานได้ นอกจากนี้เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิคอลัมน์ จะทำให้ผลการวิเคราะห์เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม เนื่องจากอุณหภูมิคอลัมน์มีผลต่อประสิทธิภาพในการแยกสาร ซึ่งจะทำให้การแยกสารไม่มีความเสถียรและสม่ำเสมอ เมื่อเปรียบเทียบวิธี HPAEC-PAD ที่ทำการพัฒนานี้กับวิธีตรวจปริมาณโพลีแซคคาไรด์ในวัคซีนฮิบวิธีอื่น เช่น การตรวจหาปริมาณ ribose ด้วย Bial's reaction หรือ orcinol test⁽¹⁵⁾ หรือตรวจปริมาณฟอสฟอรัสด้วย Chen method⁽¹⁶⁾ แล้วคำนวณเป็นปริมาณโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งเป็นวิธีตรวจทางเคมีที่เคยใช้ทดสอบกับวัคซีนฮิบในอดีต พบว่าวิธีดังกล่าวมักได้ค่าที่เบี่ยงเบนสูงแม้ทำการวิเคราะห์ในตัวอย่างเดียวกันและไม่สามารถตรวจ

กับวัคซีนที่อยู่ในรูปวัคซีนรวมได้ในขณะที่วิธี HPAEC-PAD ให้ผลวิเคราะห์ที่มีความแม่นยำ ถูกต้องสูงกว่าสามารถใช้กับวัคซีนที่เป็นวัคซีนรวมได้^(11,12,17) สำหรับเทคนิคการตรวจแบบ ELISA มีข้อดี คือ ความจำเพาะของการจับระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีสามารถลดการรบกวนจากสารผสมอื่น แต่วิธี ELISA ยังมีข้อจำกัด เนื่องจากต้องใช้สารแอนติเจนและแอนติบอดีหลากหลายที่จำเพาะกับวัคซีนแต่ละบริษัท⁽¹⁷⁾ ดังนั้นวิธี HPAEC-PAD ที่พัฒนาขึ้น และได้ทดสอบความถูกต้องของวิธีแล้ว จึงตอบโจทย์การนำไปใช้ได้ดี นอกจากใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์ของวัคซีนฮิบแล้ว ยังสามารถนำไปเป็นแนวทางปรับใช้การพัฒนาวิธีตรวจหาปริมาณโพลีแซคคาไรด์ในวัคซีนโพลีแซคคาไรด์ชนิดอื่นเพื่อการควบคุมคุณภาพ เช่น วัคซีนไขไทฟอยด์⁽¹⁸⁾ วัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นได้⁽¹⁹⁻²¹⁾ จึงเป็นการเพิ่มศักยภาพของห้องปฏิบัติการสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในการคุ้มครองผู้บริโภคด้านวัคซีนให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตาม ยังมีข้อจำกัดเกี่ยวกับตัวอย่าง คือ หลังจากพัฒนาวิธีแล้วเสร็จ ยังไม่มีตัวอย่างวัคซีนจริง ส่งตรวจวิเคราะห์ ดังนั้นจึงจะรวบรวมตัวอย่าง เพื่อนำมาตรวจวิเคราะห์ต่อไป หากได้ผลตามเกณฑ์จะได้กำหนดเป็นวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการต่อไป

สรุป

สถานะที่ระบุในงานวิจัยครั้งนี้มีความเหมาะสม และผลการทดสอบความถูกต้องของวิธี HPAEC-PAD ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์ในวัคซีนฮิบพบว่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานในทุกหัวข้อ แสดงว่าวิธี HPAEC-PAD มีความเหมาะสม ถูกต้อง แม่นยำ เชื่อถือได้ ทั้งนี้วิธีที่พัฒนาในครั้งนี้ได้เปิดให้บริการตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2566⁽²²⁾ เพื่อจะทำให้ผู้บริโภคได้รับวัคซีนที่มีฮิบเป็นส่วนประกอบที่มีคุณภาพ เป็นไปตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์และมาตรฐานสากลในการป้องกันโรคได้ และวิธีนี้สามารถพัฒนาต่อยอดในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์ของวัคซีนโพลีแซคคาไรด์ชนิดอื่นต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบริษัท ซาโนฟี ปาสเตอร์ จำกัด บริษัท
ไบโอวาเลียส จำกัด และบริษัท มาสุ จำกัด ที่ให้ความ
อนุเคราะห์ตัวอย่างวัคซีน สำหรับนำมาใช้ในการพัฒนา
และทดสอบความถูกต้องของวิธี และขอบคุณองค์การ
อนามัยโลกที่สนับสนุนองค์ความรู้ที่ใช้ในการวิเคราะห์
ปริมาณโพลีแซคคาไรด์ในวัคซีนฮิบ โดย HPAEC-PAD
ครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. อัจฉรา ตั้งสถาพรพงษ์. วัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อฮิบ. [ออนไลน์]. [สืบค้น 4 ก.ค. 2567]; [10 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: http://pidst.or.th/userfiles/33_วัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อฮิบ.pdf
2. Muangchana C, Chunsuttiwat S, Rerks-Ngarm S, Kunasol P. Bacterial meningitis incidence in Thai children estimated by a rapid assessment tool (RAT). *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2009; 40(3): 553-62.
3. World Health Organization. *Haemophilus influenzae* type b (Hib). [online]. [cited 2024 Jul 2]. Available from: URL: <https://www.who.int/teams/health-product-policy-and-standards/standards-and-specifications/norms-and-standards/vaccine-standardization/hib>
4. Zarei AE, Almeshdar HA, Redwan EM. Hib vaccines: past, present, and future perspectives. *J Immunol Res*. [online]. 2016; [cited 2024 Jul 10]; [18 screens]. Available from: URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2016/7203587>
5. กองโรคป้องกันด้วยวัคซีน กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. ตำราวัคซีนและสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรค ปี 2562. [ออนไลน์]. [สืบค้น 4 ก.ค. 2567]. เข้าถึงได้จาก URL: <https://ddc.moph.go.th/uploads/publish/938420191209023015.pdf>
6. World Health Organization. Recommendations for the production and control of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. WHO Technical Report Series No. 897. [online]. 2000; [cited 2024 Jul 9]; [34 screens]. Available from: URL: <https://www.who.int/publications/m/item/hib-conjugate-vaccines-annex-1-trs-no-897>
7. Rohrer JS. Vaccine quality ensured by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *SLAS Technol* 2020; 25(4): 320-8.
8. NIBSC. *Haemophilus Influenzae* polysaccharide polyribosyl ribitol phosphate (PRP) (2nd International Standard). [online]. 2024; [cited 2024 Jul 8]. Available from: URL: https://nibsc.org/products/brm_product_catalogue/detail_page.aspx?catid=12/306
9. Sigma-aldrich. Adonitol. [online]. 2024; [cited 2024 Jul 8]. Available from: URL: <https://www.sigmaaldrich.com/TH/en/product/sigma/a5502>
10. Roskopf U, Daas A, Terao E, von Hunolstein C. Collaborative study on saccharide quantification of the *Haemophilus influenzae* type b component in liquid vaccine presentations. *Pharmeur Bio Sci Notes* 2017; 2017: 44-68.
11. Jing T, Dan Z, Hong L, Ya-nan L, Mao-guang L, Cui-ping C, et al. Determination of polysaccharide and free polysaccharide contents of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine by high performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Chin J Pharm Anal* 2016; 36(10): 1804-9.
12. Bardotti A, Ravenscroft N, Ricci S, D'Ascenzi S, Guarnieri V, Averani G, et.al. Quantitative determination of saccharide in *Haemophilus influenzae* type b glycoconjugate vaccines, alone and in combination with DPT, by use of high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Vaccine* 2000; 18(19): 1982-93.
13. ICH. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). Paper presented at International Conference on Harmonization

- of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Current Step 4 version. [online]. 2005; [cited 2024 Jun 27]; [17 screens]. Available from: URL: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>
14. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว: คุณลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์ การหาและการประเมิน การยอมรับ. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549. หน้า 39-86.
 15. Dische Z, Schwarz K. Microchemical method for the determination of different pentoses in the presence of other pentoses and hexoses. *Mikrochem Acta* 1937; 2: 13-8.
 16. Chen PS, Toribara TY, Warner H. Microdetermination of phosphorus. *Anal Chem* 1956; 28 (11): 1756-8.
 17. วิริยามาตย์ เจริญคุณธรรม, ชลดา เพ็ชรไทย, กนกพร ฤทธิธรรม, สุภาพร ภูมิอมร. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี High performance anion exchange chromatography with pulse amperometric detection ในการวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจนของวัคซีนป้องกันโรคจากเชื้อ *Haemophilus influenzae* type b. ว วิชาการสาธารณสุข 2562; 28(3): 561-72.
 18. Giannelli C, Cappelletti E, Di Benedetto R, Pippi F, Arcuri M, Di Cioccio V, et al. Determination of free polysaccharide in Vi glycoconjugate vaccine against typhoid fever. *J Pharm Biomed Anal* 2017; 139: 143-7.
 19. Gao F, Beresford N, Lockyer K, Burkin K, Rigsby P, Bolgiano B. Saccharide dosage content of meningococcal polysaccharide conjugate vaccines determined using WHO international standards for serogroup A, C, W, Y and X polysaccharides. *Biologicals* 2021; 70: 53-8.
 20. Cook MC, Gibeault S, Filippenko V, Ye Q, Wang J, Kunkel JP. Serogroup quantitation of multivalent polysaccharide and polysaccharide-conjugate meningococcal vaccines from China. *Biologicals* 2013; 41(4): 261-8.
 21. Gudlavalleti SK, Crawford EN, Harder JD, Reddy JR. Quantification of each serogroup polysaccharide of *Neisseria meningitidis* in A/C/Y/W-135-DT conjugate vaccine by high-performance anion-exchange chromatography-pulsed amperometric detection analysis. *Analytical Chem* 2014; 86(11): 5383-90.
 22. ความแรงวัคซีนป้องกันโรคเชื้อหุ้มสมองอักเสบจากเชื้อฮิบ (*Haemophilus influenzae* type B; Hib). ใน: ระเบียบกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ว่าด้วยอัตราค่าบำรุงการตรวจวิเคราะห์และให้บริการ ฉบับใช้พลางก่อน (2 พ.ย. 2566). [ออนไลน์]. 2566; [สืบค้น 26 ก.ย. 2567]. เข้าถึงได้จาก: URL: <https://service.dmsc.moph.go.th/dmscservice>

Method Development and Validation for Determination of Total and Free Polysaccharide Content in *Haemophilus influenzae* Type B Vaccine by HPAEC-PAD

Chonlada Petthai, Kanokphon Loamarintchai, Katsama Boonmak,
Apichai Supasansatorn, and Supaporn Phumiamorn

Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT The *Haemophilus influenzae* type b (Hib) vaccine is used to prevent meningitis and pneumonia in young children. It is produced from the polysaccharide component of *Haemophilus influenzae* type b. In the quality control of the Hib vaccine, determining the total and free polysaccharide contents is a crucial parameter, and the World Health Organization (WHO) recommends using the HPAEC-PAD method for analysis due to its accuracy and precision, which is well-suited for detecting polysaccharides. This study, the method involved using an anion exchange column with a column temperature of 30°C, a mobile phase of 580 mM NaOH, a flow rate of 0.4 mL/min, and an injection volume of 50 µL. Detection was performed using a PAD detector. The results showed that the standard curve was linear in the concentration range from 0.15 to 10.50 µg/mL, with a correlation coefficient of 0.9999. The precision on the same day showed the relative standard deviations for total and free polysaccharide contents of 3.38% and 1.61%, respectively, while intermediate precision showed the relative standard deviations of 4.47% and 3.22%, respectively. The method was accurate, with the recovery of standard substances added to the DTP-HB-Hib combined vaccine ranging between 96.74% and 103.37%. The method demonstrated specificity and capability of analyzing polysaccharide content in the vaccine from 0.15 µg/mL. Additionally, column temperature and acid hydrolysis duration were found to affect the analysis. In conclusion, this method can be used as an analytical method in the laboratory of the Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Thailand for the Hib vaccine quality control purposes.

Keywords: The *Haemophilus influenzae* type b vaccine, Polysaccharide content, HPAEC-PAD, Method validation