



วารสารอาหารและยา
ปีที่ 28 ฉบับที่ 2 (2564): พฤษภาคม - สิงหาคม
<https://he01.tci-thaijo.org/index.php/fdajournal/index>

THAI FOOD AND DRUG JOURNAL
Vol. 28 No. 2 (2021): May - August



การหาค่าปัจจัยที่สำคัญของการทำแห้งแบบเยือกแข็งสำหรับวัคซีนไวรัส อ้างอิงมาตรฐานด้วยกล้องจุลทรรศน์ควมคมอุณหภูมิต่ำ

อัศจรรย์ อาเมน¹ ปัทมา บุนนาค¹ กรณิกา กุลบุตร¹ กนิษฐา ภูวนานทรานูบาล¹

¹สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ถนนพหลโยธิน

ที่อยู่ติดต่อ: อัศจรรย์ อาเมน สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี
11000 assajun.a@dmcs.mail.go.th

Optimization on Critical Parameters for Lyophilization of Reference Standard Viral Vaccines by Using Freeze-Drying Microscopy

Assajun Amen¹, Pattama Bunnag¹, Kornnika Kullabutr¹, Kanitta Phuwanartnaranubarn¹

¹Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Nonthaburi, Thailand

Contact address: Assajun Amen, Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Tiwanon Road, Mueang District, Nonthaburi, 11000, Thailand, assajun.a@dmcs.mail.go.th

Received: 23 September 2020, **Revised:** 29 December 2020, **Accepted:** 24 February 2021

Abstract

Background: Freeze-drying or lyophilization is a process that preserves a suitable qualified for standard reference viral vaccine to control a viral vaccine quality. The exploration on real lyophilization state need the use of lots of vaccine samples and spent approximately 1-5 days a time, also it tested several times to get a suitable state.

Objectives: The aim of this research was to develop a providing standard reference viral vaccine by using a freeze-drying microscopy that observed a changing of the samples while simulation, temperature, and pressure of lyophilization to verify a collapse temperature.

Methodology: The study set four formulas to test the collapse temperature that under freeze drying microscopy, and took the temperature average that subsidence to calculate a primary freeze-drying temperature to set the state of lyophilization machine. Then, it trailed the real lyophilization and took these samples to test an appearance, potency, and stability.

Results: The primary drying temperatures of four formulas, that calculated, were -27.8, -28.8, -29.0, and -28.8 °C, respectively. The difference of all four formulas was not statistically significant. After taking the standards reference viral vaccines from the lyophilization to test an appearance; moisture content; reconstitution time; and percentage of potency lost (before and after lyophilization), it is found that four formulas had good characteristic and were on criteria of each testing. It excepted the test of stability at 37 °C in seven days that discovered the highest level of virus potency lost by 1.54 log PFU/0.5 ml.

Conclusions: The lyophilization method of standard reference viral vaccine by using freeze-drying microscopy was suitable for setting primary drying temperature. It was able to control temperature that was not too high until the samples collapsed and was not too low that caused

using more time for lyophilization. It used the test time only 0.5-2 hours and used less samples at microliter level. Consequently, this method is suitable and able to use the country standard of freeze-drying parameter finding.

Keywords: freeze-drying, lyophilization, standard reference viral vaccine, freeze-drying microscopy

บทคัดย่อ

ความสำคัญ: การทำแห้งแบบเยือกแข็งเป็นวิธีคงคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับวัคซีนไวรัสอ้างอิงมาตรฐานที่ใช้ในการควบคุมคุณภาพวัคซีน การหาสถานะในการทำแห้งแบบเยือกแข็งในสถานะจริง ต้องใช้ปริมาณตัวอย่างมาก ใช้เวลานาน 1-5 วัน และต้องทดสอบหลายครั้งเพื่อปรับสถานะให้เหมาะสม

วัตถุประสงค์: เพื่อพัฒนาการจัดเตรียมวัคซีนไวรัสอ้างอิงมาตรฐานโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ควบคุมอุณหภูมิ โดยสังเกตความเปลี่ยนแปลงของตัวอย่างขณะจำลองสถานะ อุณหภูมิ และความดันในการทำแห้งแบบเยือกแข็ง เพื่อตรวจสอบอุณหภูมิที่เกิดการยุบตัว

วิธีการวิจัย: เตรียมสูตรตำรับ 4 สูตร มาตรวจสอบอุณหภูมิที่เกิดการยุบตัวภายใต้กล้อง นำค่าอุณหภูมิเฉลี่ยที่เกิดการยุบตัวมาคำนวณหาอุณหภูมิทำแห้งขั้นต้นเพื่อกำหนดสถานะเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง ทำการทดลองทำแห้งในสถานะจริง และนำตัวอย่างที่ได้มาทดสอบลักษณะทางกายภาพ ค่าความแรง และความคงตัว

ผลการศึกษา: อุณหภูมิทำแห้งขั้นต้นที่คำนวณได้ของสูตรตำรับที่ 1, 2, 3 และ 4 คือ -27.8, -28.8, -29.0 และ -28.8 °C ตามลำดับ โดยทั้ง 4 สูตรมีความใกล้เคียงกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อนำวัคซีนไวรัสอ้างอิงมาตรฐานจากการทำแห้งมาทดสอบลักษณะทางกายภาพ ปริมาณน้ำ ระยะเวลาในการละลาย ความคงตัว และร้อยละของการสูญเสียไวรัส พบว่าผลการทดสอบทั้ง 4 สูตร มีลักษณะที่ดีและมีค่าอยู่ในเกณฑ์กำหนดของแต่ละรายการทดสอบ ยกเว้นการทดสอบความคงตัวที่เก็บที่ 37 °C เป็นเวลา 7 วัน พบว่าสูญเสียค่าความแรงของไวรัสในระดับสูงสุด 1.54 log PFU/0.5 ml

สรุป: จากงานวิจัยนี้จะเห็นได้ว่าวิธีดังกล่าวมีความเหมาะสมในการกำหนดอุณหภูมิทำแห้งขั้นต้น คืออุณหภูมิไม่สูงเกินจนตัวอย่างเกิดการยุบตัว และไม่ต่ำเกินไปที่ทำให้ระยะเวลาในการทำแห้งแบบเยือกแข็งเพิ่มขึ้น ตลอดจนใช้ในการหาสูตรตำรับและสถานะที่เหมาะสม โดยลดเวลาเหลือ 0.5-2 ชั่วโมง และใช้ปริมาณตัวอย่างน้อยมากถึงระดับไมโครลิตร ซึ่งเป็นไปตามวัตถุประสงค์ของงานวิจัย และมีความเหมาะสมที่กำหนดเป็นมาตรฐานของวิธีการหาค่าปัจจัยที่สำคัญของการทำแห้งแบบเยือกแข็งสำหรับวัคซีนไวรัสอ้างอิงมาตรฐานด้วยกล้องจุลทรรศน์ควบคุมอุณหภูมิ

คำสำคัญ: ทำแห้งแบบเยือกแข็ง วัคซีนไวรัสอ้างอิงมาตรฐาน กล้องจุลทรรศน์ควบคุมอุณหภูมิ

บทนำ

การทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilization) เป็นวิธีการทำแห้งที่สามารถคงคุณลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของผลิตภัณฑ์ได้ดี จึงมีการนำวิธีการทำแห้งมาใช้กับงานหลายประเภท ไม่ว่าจะเป็นด้านเภสัชกรรม อาหาร เครื่องสำอาง เกษษกรรม และการแพทย์¹⁻⁶ และนอกจากการรักษาคุณลักษณะ

ของไกลโคโปรตีนแอนติเจนไม่ให้เสื่อมสลายง่ายแล้วยังมีประโยชน์ต่อการเก็บรักษาง่าย สะดวกต่อการขนส่ง และมีความคงตัว (stable) สามารถเก็บได้นาน¹ ซึ่งในการจัดเตรียมวัคซีนที่นำมาใช้เป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานจำเป็นต้องมีการจัดเก็บที่นานกว่านั้นและมีปริมาณที่มากพอที่จะใช้ในระยะเวลาหลายปี โดยที่ยังคงความคงตัวสูงกว่าวัคซีนทั่วไป^{1,6}

การทดลองการทำแห้งแบบเยือกแข็งในสภาวะจริงต่อหนึ่งสภาวะ ใช้ปริมาณตัวอย่างมากถึง 5-30 ml ใช้ระยะเวลาสั้น 1-5 วัน และต้องทำหลายครั้งเพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสม ดังนั้น เพื่อลดเวลาและปริมาณตัวอย่างที่ใช้ในการหาสูตรตำรับและสภาวะที่เหมาะสม⁷ จึงจำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่ช่วยในการหาปัจจัยที่ส่งผลต่อความสำเร็จในการทำแห้งแบบเยือกแข็งรวมถึงอัตราเร็วในการทำแห้งของตัวอย่าง คืออุณหภูมิที่เกิดการยุบตัวของโครงสร้างตัวอย่าง (collapse temperature) โดยหากเกิดการยุบตัวอย่างมีผลต่อตัวอย่าง เช่น ทำให้การระเหิดออกของไอน้ำเป็นไปโดยยาก ทำให้อัตราการทำแห้งลดลง ส่งผลให้ใช้ระยะเวลาในการทำแห้งที่นาน และมีความชื้นหลังจากสิ้นสุดการทำแห้งแบบเยือกแข็งสูง มีผลต่อความคงตัวในระยะยาว รวมถึงอาจส่งผลต่อระยะเวลาในการละลายกับตัวทำละลายเนื่องจากการยุบตัวของโครงสร้างทำให้รูพรุนที่เกิดในโครงสร้างลดลง⁸⁻⁹ สำหรับอุณหภูมิหลอมเหลวของสารผสมในสูตรตัวอย่างหากสามารถหาปัจจัยที่ส่งผลต่อความสำเร็จในการทำแห้งแบบเยือกแข็งได้ จะสามารถกำหนดอุณหภูมิที่เหมาะสม คืออุณหภูมิไม่สูงเกินไปจนตัวอย่างเกิดการยุบตัว และไม่ต่ำเกินไปที่ทำให้ระยะเวลาในการทำแห้งแบบเยือกแข็งเพิ่มขึ้น ทำให้ลดเวลาในขั้นตอน primary drying ลงได้¹⁰⁻¹¹

กล้องจุลทรรศน์ควมคุมอุณหภูมิ (freeze drying microscopy) เป็นเครื่องมือที่ประกอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ แทนวางตัวอย่างที่ควบคุมอุณหภูมิและความดัน ใช้สำหรับสังเกตความเปลี่ยนแปลงของตัวอย่างทำแห้งแบบเยือกแข็งโดยกระบวนการแช่แข็งและละลายตัวอย่าง ซึ่งสามารถบันทึกภาพการเปลี่ยนแปลงของตัวอย่างขณะทำแห้งแบบเยือกแข็งภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำให้ได้ข้อมูลของปัจจัยต่าง ๆ ที่จำเป็นสำหรับการกำหนดสภาวะการทำแห้งที่เหมาะสม เช่น collapse temperature, eutectic temperature อัตราการแห้งของตัวอย่าง ลักษณะของโครงสร้าง และพื้นผิวของตัวอย่าง^{8-9,11-12} นอกจากนี้ เครื่องมือดังกล่าวยังสามารถใช้ในการหาผลจากกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมความร้อน

และความเย็นเพื่อส่งเสริมให้เกิดผลึก (annealing) โดยเป็นการเพิ่มการให้ความร้อนกับตัวอย่างที่เยือกแข็งแล้วทำการลดอุณหภูมิให้ต่ำลงเพื่อทำให้เกิดผลึกเพิ่มขึ้น มีผลทำให้ collapse temperature ต่ำลง ทำให้สามารถกำหนดอุณหภูมิการทำแห้งขั้นต้น (primary drying) ให้สูงขึ้น ส่งผลให้อัตราเร็วในการทำแห้งสูงขึ้น และลดระยะเวลาในการทำแห้งแบบเยือกแข็งได้¹³⁻¹⁴ อีกทั้งปริมาณตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบโดยกล้องจุลทรรศน์ใช้ปริมาณน้อยมากถึงระดับไมโครลิตรเท่านั้น ใช้เวลาการทดสอบประมาณ 30 นาทีถึง 2 ชั่วโมง และต้นทุนต่อหนึ่งการทดสอบต่ำกว่าการทดสอบในสภาวะจริงถึง 7 เท่า

วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาการจัดเตรียมวัคซีนไวรัสอ้างอิงมาตรฐานโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ควบคุมอุณหภูมิในการใช้เป็นเครื่องมือสำหรับสังเกตความเปลี่ยนแปลงของตัวอย่างขณะจำลองสภาวะ อุณหภูมิ และความดันมากำหนดสภาวะที่ใช้ในการทำแห้งแบบเยือกแข็ง
2. เพื่อใช้เป็นแนวทางในการจัดเตรียมวัคซีนไวรัสอ้างอิงมาตรฐานแบบแห้งแบบเยือกแข็งของประเทศ

ระเบียบวิธีการวิจัย

1. เตรียมสูตรตำรับ

1.1 การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง โดยนำเซลล์เพาะเลี้ยง Vero (African Green Monkey Kidney cell) ที่ได้รับจากบริษัทองค์การเภสัชกรรม-เมอร์ริเออร์ชีววัตถุ จำกัด มาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการโดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Cat. No. 31600-026, GIBCO USA) ที่มีซีรัม (inactivated fetal bovine serum (FBS), Cat. No. 26140-079, GIBCO USA) 5% และ 7.5% NaHCO₃ (Cat. No. S-5716, Sigma) 1.8% เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C ในสภาวะที่มี CO₂ 5%

1.2 การเตรียมวัคซีนไวรัส ดำเนินการจัดเตรียมดังรูปที่ 1

เพิ่มปริมาณไวรัสไข้สมองอักเสบเจอี (วัคซีนเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์) ในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero (4-5 วัน)

↓
เก็บเซลล์เพาะเลี้ยงที่ติดเชื้อไวรัส (cytopathic effect: CPE) ที่ -70 °C

↓
ทำให้เซลล์แตกโดยการละลายและแช่แข็ง 3 ครั้ง

↓
ปั่นเหวี่ยง 3,000 รอบต่อนาที 15 นาที ที่ 4 °C
เก็บส่วนใสแบ่งบรรจุ 10 ml/vial และเก็บที่ -70 °C

รูปที่ 1 ผังการเตรียมวัคซีนไวรัส

1.3 การเตรียมสูตรตำรับวัคซีนไวรัสอ้างอิงมาตรฐาน โดยใช้เดกซ์แทรนซึ่งเป็นสารป้องกันการเสียสภาพของวัคซีนไวรัสอ้างอิงมาตรฐานจากสภาวะในการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyoprotectant) ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า เดกซ์แทรนทำให้เกิดผลิตภัณฑ์มีลักษณะทางกายภาพที่ดี และอุณหภูมิ

ที่เกิดการยุบตัวที่สูง ทำให้ลดระยะเวลาในการทำแห้งแบบเยือกแข็ง แต่การใช้เดกซ์แทรนเพียงอย่างเดียวจะทำให้ตัวอย่างมีปัญหาด้านความคงตัว จึงต้องใช้สารจำพวกน้ำตาลเพื่อเพิ่มความคงตัว¹⁵ ซึ่งในการวิจัยนี้ใช้น้ำตาลแลคโตสในความเข้มข้นที่แตกต่างกันจำนวน 4 สูตร ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงสูตรตำรับการเตรียมวัคซีนไวรัสอ้างอิงมาตรฐาน

ส่วนประกอบ	สูตรตำรับที่ 1	สูตรตำรับที่ 2	สูตรตำรับที่ 3	สูตรตำรับที่ 4
Lactose (% W/V)	2.5	5	7.5	10
Dextran (% W/V)	5	5	5	5
Human albumin (25%) (% V/V)	0.5	0.5	0.5	0.5
ไวรัสไข้สมองอักเสบเจอี (% V/V)	50	50	50	50

2. การทดสอบสภาวะทำแห้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์ควมคุมอุณหภูมิ

2.1 การทดสอบสภาวะการทำแห้งเบื้องต้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยนำสูตรตำรับวัคซีนไวรัสอ้างอิงมาตรฐานแต่ละสูตร บรรจุบนแท่นควบคุมอุณหภูมิและความดัน ทำการลดอุณหภูมิแท่นบรรจุเพื่อหาอุณหภูมิก่อนนิวเคลียสฟลิก (nucleation

temperature) โดยลดอุณหภูมิถึง -50 °C จากนั้นปรับความดันที่ 100 mTorr และเพิ่มอุณหภูมิเพื่อให้เกิดการระเหิดของน้ำออกจากตัวอย่างจนกระทั่งถึงอุณหภูมิที่เกิดการยุบตัว โดยเครื่องจะทำการบันทึกภาพตลอดกระบวนการพร้อมข้อมูลอุณหภูมิและความดัน ดังตารางที่ 2

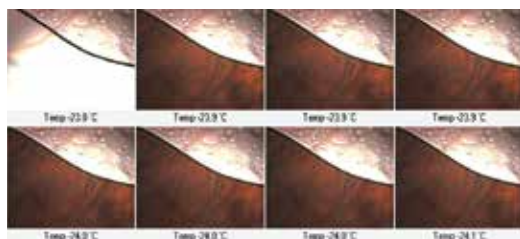
ตารางที่ 2 แสดงรูปแบบการปรับอุณหภูมิของกล้องจุลทรรศน์ควบคุมอุณหภูมิ

อัตราการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ต่อนาที (°C)	อุณหภูมิเป้าหมาย (°C)	เวลาคงอุณหภูมิหลังถึง อุณหภูมิเป้าหมาย (นาที)	หมายเหตุ
20	- 15	1	ช่วงอุณหภูมิก่อนนิวเคลียสฟลิก
2	- 30	0	
20	- 50	2	
4	- 30	0	
2	20	0	ช่วงอุณหภูมิที่เกิดการยุบตัว

ทำการวิเคราะห์ภาพพร้อมข้อมูลอุณหภูมิและความดัน เพื่อหาอุณหภูมิก่อนนิวเคลียสฟลิก สังเกตได้โดยเมื่อเกิดการเปลี่ยนสถานะ ณ อุณหภูมิก่อนนิวเคลียสฟลิกสารละลายที่เปลี่ยนสถานะจะเกิดการทึบแสงจาก

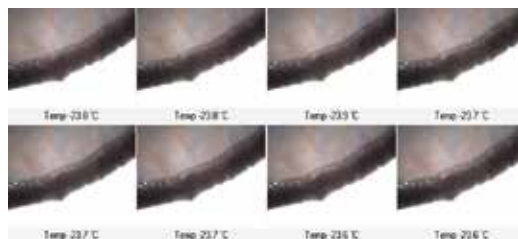
การจับตัวเป็นผลึกลักษณะคล้ายแก้วใสมีสี ดังรูปที่ 2 และอุณหภูมิที่เกิดการยุบตัว สังเกตได้โดยสารละลายที่เป็นของแข็ง เมื่อถูกระเหิดน้ำออกทำให้แห้งแบบเยือกแข็งจะมีลักษณะเป็นสีดำทึบแสง โดยส่วนสีดำ

ดังกล่าวจะขยายตัวขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของตัวอย่างที่ถูกทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง แต่เมื่ออุณหภูมิถึงจุดยุบตัว จะเกิดการยุบตัวก่อนที่จะแห้งแบบเยือกแข็ง สังเกตได้ว่า จะเกิดรูโปร่งแสงขึ้นขณะที่เกิดการยุบตัวจึงบันทึกจุดนั้นว่าเป็นอุณหภูมิที่เกิดการยุบตัว ดังรูปที่ 3 โดยทำการหาอุณหภูมิดังกล่าวอย่างน้อยสุทธิตำรับละ 3 ครั้ง นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณค่าทางสถิติดังนี้ ค่าเฉลี่ยเลขคณิต (average) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) และค่าร้อยละสัมประสิทธิ์



รูปที่ 2 การสังเกตหาอุณหภูมิก่อนนิวเคลียสผลึกภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ของความแปรปรวน (coefficient of variation) โดยร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของอุณหภูมิที่เกิดการยุบตัวในแต่ละสุทธิตำรับ ต้องไม่มากกว่า 10 นำค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิที่เกิดการยุบตัวที่ได้ มาคำนวณหาอุณหภูมิสำหรับกำหนดสถานะในการทำแห้ง โดยหาอุณหภูมิการทำแห้งขั้นต้น primary drying จากการนำค่าเฉลี่ยอุณหภูมิที่เกิดการยุบตัว หักลบอุณหภูมิลง 5 °C เพื่อให้ครอบคลุมปัจจัยจากเครื่องทำแห้ง ปริมาณตัวอย่างและภาวะบรรยากาศ



รูปที่ 3 การสังเกตหาอุณหภูมิที่เกิดการยุบตัวผลึกภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.2 การศึกษากระบวนการทำแห้งวัคซีนไวรัสอ้างอิงมาตรฐาน

2.2.1 ศึกษากระบวนการทำแห้งวัคซีนไวรัสอ้างอิงมาตรฐานเบื้องต้น โดยนำสุทธิตำรับทั้ง 4 สุทธ มาแบ่งบรรจุปริมาณ 0.5 ml ในขวดแก้ว Borosilicate glass type I ขนาด 3 ml จำนวน 20 ขวด จากนั้นปิดขวดด้วยจุกยางในระดับครึ่งจุกยาง (half stoppering) เพื่อให้มีช่องสำหรับการระเหิดน้ำ นำเข้าเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง รุ่น Lyolab, LT ซึ่งได้ปรับสภาวะการทำแห้งมาจากการทำแห้งวัคซีนไวรัสคางทูม⁷ เพื่อการทดสอบอุณหภูมิการทำแห้งขั้นต้นที่เหมาะสม โดยกำหนดให้อุณหภูมิแช่แข็งเท่ากับ -50 °C นาน 300 นาที จากนั้นปรับเพิ่มอุณหภูมิเป็นอุณหภูมิการทำแห้งขั้นต้นที่คำนวณได้จากการทดสอบสภาวะทำแห้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ควบคุมอุณหภูมิ ปรับความดัน 200 mTorr เป็นเวลา 2,000 นาที เพื่อระเหิดน้ำออกจากวัคซีน จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิอย่างช้า ๆ ในอัตรา 0.05 °C ต่อนาที เพื่อป้องกันไม่ให้น้ำจากด้านล่างของขวดออกมาอย่างรวดเร็วซึ่งอาจทำให้ส่วนด้านบนของวัคซีนที่

แห้งแล้วแตก เนื่องจากวัคซีนจะเริ่มแห้งจากส่วนบนลงในส่วนล่าง ให้เพิ่มอุณหภูมิจนถึง 30 °C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่กำหนดให้เป็นการทำแห้งขั้นสุดท้ายของอุณหภูมิไว้ ในช่วงดังกล่าวเป็นเวลา 600 นาที จากนั้นเติมก๊าซไนโตรเจน 99.999 % จนกระทั่งความดันเพิ่มเป็น 450,000 mTorr เพื่อลดความแตกต่างของความดันภายนอกกับความดันสุญญากาศภายในขวด ลดการซึมของอากาศภายนอกเข้ามาในขวด และป้องกันการเกิดออกซิเดชัน จากนั้นปิดจุกยาง และผนึกขวดด้วยฝาอะลูมิเนียม เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 °C จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้จากการทำแห้งมาตรวจสอบคุณภาพ โดยมีเกณฑ์กำหนดดังนี้ มีลักษณะทางกายภาพที่ดี โดยมีลักษณะเป็นเค้กที่จับตัวเป็นก้อน ไม่มีการยุบตัวอย่างเห็นได้ชัดเจน มีค่าปริมาณน้ำไม่เกิน 3 % และมีระยะเวลาในการละลายไม่เกิน 180 วินาที เพื่อคัดเลือกสุทธิตำรับที่เหมาะสม

2.2.2 ศึกษากระบวนการทำแห้งวัคซีนไวรัสอ้างอิงมาตรฐานจากสุทธิตำรับที่ผ่านเกณฑ์ ให้เลือกเฉพาะสุทธิตำรับที่ผ่านเกณฑ์กำหนดในข้อ 2.2.1 มาผลิตตามสุทธิตำรับที่คัดเลือกจำนวน 50 ขวด

เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 °C และศึกษาสภาวะที่ได้จากการศึกษาเบื้องต้นและยืนยันประสิทธิภาพของวัคซีนไวรัสอ้างอิงมาตรฐาน ดังนี้ ลักษณะทางกายภาพ ปริมาณน้ำ ระยะเวลาในการละลาย และค่าความแรงของไวรัสก่อนและหลังการทำแห้งแบบเยือกแข็ง เพื่อคำนวณการสูญเสียความแรงระหว่างขั้นตอนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง และการศึกษาความคงตัวที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 7 วัน

2.3 วิธีที่ใช้ในการยืนยันประสิทธิภาพของวัคซีนไวรัสอ้างอิงมาตรฐาน

การตรวจลักษณะทางกายภาพ เป็นการตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติด้วยตาเปล่า (Visual inspection) ภายใต้ Viewing station ที่มีความเข้มแสงอยู่ในช่วง 2,000-3,750 ลักซ์ โดยต้องมีลักษณะเป็นผงแห้งจับตัวเป็นก้อนไม่ยุบตัว

การตรวจปริมาณน้ำ เป็นการตรวจโดยวิธี Volumetric Karl - Fischer โดยต้องมีค่าไม่เกิน 3%

การตรวจระยะเวลาการละลาย บันทึกเวลาที่ใช้ในการละลายด้วยตัวทำละลาย โดยต้องใช้ระยะเวลาการละลายไม่เกิน 180 วินาที

การตรวจวิเคราะห์ความแรงวัคซีนไวรัสอ้างอิงมาตรฐานด้วยวิธี Plaque forming titration เพื่อคำนวณหาความแรงในหน่วย PFU/0.5 ml เพื่อใช้ประกอบในการพิจารณาคัดเลือกสูตรที่เหมาะสม

ผลการศึกษา

1. การทำการทดสอบสภาวะทำแห้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์ควมคุมอุณหภูมิ

ทำการวิเคราะห์ภาพพร้อมข้อมูลอุณหภูมิและความดัน เพื่อหาอุณหภูมิก่อนนิวเคลียสผลึก และอุณหภูมิที่เกิดการยุบตัว และคำนวณหาค่าเฉลี่ยจากการทดสอบ 3 ครั้ง ค่าร้อยละความแปรปรวน และอุณหภูมิทำแห้งขั้นต้น ซึ่งสรุปปัจจัยที่สำคัญในการทำแห้งแบบเยือกแข็งดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สรุปการหาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการทำแห้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบควบคุมอุณหภูมิ

สูตรตำรับที่	อุณหภูมิก่อนนิวเคลียสผลึก (%CV)	อุณหภูมิที่เกิดการยุบตัว (%CV)	อุณหภูมิทำแห้งขั้นต้น
1	-22.2 (11.9)	-22.8 (3.3)	-27.8
2	-21.0 (11.8)	-23.8 (2.7)	-28.8
3	-21.4 (11.3)	-24.0 (3.9)	-29.0
4	-25.1 (3.8)	-23.8 (1.9)	-28.8

จากการศึกษาหาสูตรตำรับและสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ควบคุมอุณหภูมิ ทำให้ได้สภาวะของทั้ง 4 สูตร ดังนี้

อุณหภูมิก่อนนิวเคลียสผลึกของสูตรตำรับที่ 4 มีอุณหภูมิลดลงต่ำที่สุด และสูตรตำรับที่ 2 มีอุณหภูมิที่เฉลี่ยที่สูงที่สุด โดยร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนสูตรตำรับที่ 4 เพียงสูตรเดียวที่ไม่มากกว่า 10 สำหรับสูตรตำรับที่ 1, 2 และ 3 มีค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนมากกว่า 10

อุณหภูมิที่เกิดการยุบของสูตรตำรับที่ 3 มีอุณหภูมิต่ำที่สุด และสูตรตำรับที่ 1 มีอุณหภูมิที่เกิดการยุบตัวที่สูงที่สุด โดยร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน ไม่มากกว่า 10 ซึ่งนำมากำหนดค่าอุณหภูมิการทำแห้งขั้นต้นของสูตรตำรับที่ 1, 2, 3

และ 4 ได้เท่ากับ -27.8, -28.8, -29.0 และ -28.8 °C ตามลำดับ

อุณหภูมิที่เกิดการยุบเมื่อนำมาคำนวณลดอุณหภูมิลง 5 °C เพื่อให้ครอบคลุมความแปรปรวนของเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง ทั้งนี้อุณหภูมิทำแห้งขั้นต้นของทั้ง 4 สูตรมีความใกล้เคียงกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จึงเลือกอุณหภูมิที่ต่ำที่สุดใช้เป็นอุณหภูมิทำแห้งขั้นต้นของ 4 สูตรพร้อมกัน เพื่อป้องกันการเกิดการยุบตัวของสูตรตำรับที่มีอุณหภูมิที่เกิดการยุบที่ต่ำที่สุด โดยกำหนดให้อุณหภูมิการทำแห้งขั้นต้นที่คำนวณได้จากการทดสอบสภาวะทำแห้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์ควบคุมอุณหภูมิ คือ -29 °C และสภาวะตามขั้นตอนที่ระบุในส่วนวิธีการกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

2. การศึกษากระบวนการทำแห้งวัคซีนไวรัสอ้างอิงมาตรฐาน

2.1 ศึกษากระบวนการทำแห้งวัคซีนไวรัสอ้างอิงมาตรฐานเบื้องต้น โดยระบุรุ่นการผลิตเป็น JE260118 มาวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ พบว่าสูตรตำรับที่ 1-4 มีลักษณะเป็นผงแห้งจับตัวเป็นก้อนไม่ยุบตัว มีสีชมพูอ่อน แสดงดังรูปที่ 4



สูตรตำรับที่ 1

สูตรตำรับที่ 2

สูตรตำรับที่ 3

สูตรตำรับที่ 4

รูปที่ 4 ลักษณะทางกายภาพของวัคซีนไวรัสอ้างอิงมาตรฐานสูตรตำรับที่ 1-4 ในการทดสอบทำแห้งเบื้องต้น

จากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำต่อน้ำหนัก สูตรละ 3 ครั้ง ได้ค่าเฉลี่ยของสูตรตำรับที่ 1-4 เท่ากับ 0.04, 0.41, 0.35 และ 0.56% ตามลำดับ ซึ่งทุกสูตร ตำรับเป็นไปตามเกณฑ์กำหนดคือ ไม่มากกว่า 3% และ ผลการทดสอบระยะเวลาการละลายสูตรตำรับละ 3 ครั้ง ได้ค่าเฉลี่ยของสูตรตำรับที่ 1-4 เท่ากับ 122.67, 130.33, 124.33 และ 127.67 วินาที ตามลำดับ ซึ่งทุกสูตรตำรับ เป็นไปตามเกณฑ์กำหนดคือ ไม่มากกว่า 180 วินาที

2.2 ศึกษากระบวนการทำแห้งวัคซีนไวรัส อ้างอิงมาตรฐานจากสูตรตำรับที่ผ่านเกณฑ์ในข้อ 2.1 พบว่าทั้ง 4 สูตร ผ่านเกณฑ์ข้อกำหนดทั้งหมด จึงนำมาทำการศึกษาทั้ง 4 สูตร โดยเตรียมสูตรตำรับละ 50 ขวด และระบุรุ่นการผลิตเป็น JE010318 ซึ่งผลการทดสอบลักษณะทางกายภาพด้วยตาเปล่า พบว่า สูตรตำรับที่ 1-4 มีลักษณะเป็นผงแห้งจับตัวเป็นก้อน ไม่ยุบตัว มีสีชมพูอ่อนแสดงดังรูปที่ 5



สูตรตำรับที่ 1

สูตรตำรับที่ 2

สูตรตำรับที่ 3

สูตรตำรับที่ 4

รูปที่ 5 ลักษณะทางกายภาพของวัคซีนไวรัสอ้างอิงมาตรฐาน สูตรตำรับที่ 1-4 ในการทดสอบการทำแห้ง

จากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำต่อน้ำหนัก สูตรตำรับละ 3 ครั้ง ได้ค่าเฉลี่ยของสูตรตำรับที่ 1-4 เท่ากับ 1.10, 0.50, 0.77 และ 0.51% ตามลำดับ ซึ่งทุกสูตรตำรับเป็นไปตามเกณฑ์กำหนดคือ ไม่มากกว่า

3% และผลการทดสอบระยะเวลาการละลาย สูตรตำรับละ 3 ครั้ง ได้ค่าเฉลี่ยของสูตรตำรับที่ 1-4 เท่ากับ 122.67, 93.67, 127.67 และ 150.33 วินาที ตามลำดับ ซึ่งทุกสูตรตำรับเป็นไปตามเกณฑ์กำหนด

คือ ไม่มากกว่า 180 วินาที และผลการตรวจค่าความแรงของวัคซีนไวรัสอ้างอิงมาตรฐานก่อนและหลังการทำแห้งแบบเยือกแข็ง เพื่อคำนวณร้อยละ

ของการสูญเสียไวรัสระหว่างขั้นตอนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง และการศึกษาความคงตัวของอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 7 วัน ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการตรวจค่าความแรงของวัคซีนไวรัสอ้างอิงมาตรฐาน

ขั้นตอน	ค่าความแรง log PFU/0.5 ml			
	สูตรตำรับที่ 1	สูตรตำรับที่ 2	สูตรตำรับที่ 3	สูตรตำรับที่ 4
ก่อนทำแห้ง	6.19	6.23	6.30	6.28
หลังทำแห้ง (ลดลง)	6.17 (0.02)	6.21 (0.02)	6.12 (0.18)	6.11 (0.17)
ความคงตัว (ลดลง)	4.63 (1.54)	4.72 (1.49)	4.75 (1.37)	4.76 (1.35)

ค่าความแรงก่อนการทำแห้ง สูตรตำรับที่ 3 มีค่าความแรงสูงที่สุด 6.30 log PFU/0.5 ml แต่หลังจากผ่านกระบวนการทำแห้งแล้ว พบว่า ค่าความแรงของสูตรตำรับที่ 3 มีค่าความแรงลดลงมากที่สุด 0.18 log PFU/0.5 ml และพบว่าสูตรตำรับ 1 และสูตรตำรับ 2 มีค่าความแรงลดลงน้อยที่สุด 0.02 log PFU/0.5 ml อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการเก็บวัคซีนหลังการทำแห้งทุกสูตรที่ 37 °C เป็นเวลา 7 วัน พบว่า สูตรตำรับที่ 4 มีค่าความแรงลดลงน้อยที่สุด คือ 1.35 log PFU/0.5 ml

อภิปรายผล

อุณหภูมิก่อนนิวเคลียสฝัก มีร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนสูงคืออยู่ในช่วง 3.8-11.9% แต่อุณหภูมิที่เกิดการยุบตัว มีร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนต่ำกว่าคืออยู่ในช่วง 1.9-3.9% เมื่อทำการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ซึ่งรายงานว่า ไม่สามารถควบคุมอุณหภูมิก่อนนิวเคลียสฝัก และไม่มีความสัมพันธ์ที่ชัดเจนระหว่างอุณหภูมิก่อนนิวเคลียสฝักและอุณหภูมิที่เกิดการยุบตัว ตัวอย่างเช่น bovine serum albumin (BSA)/ซูโครส (20/80) อุณหภูมิก่อนนิวเคลียสฝักมีความแตกต่าง 6 °C ระหว่างการวัดที่เหมือนกันสองครั้ง แต่อุณหภูมิที่เกิดการยุบตัวที่ -29.2 และ -29.5 °C ตามลำดับ ในทางตรงกันข้าม ส่วนผสมของ Human serum albumin (HSA)/ทรีฮาโลส (50/50) อุณหภูมิก่อนนิวเคลียสฝักเกือบเท่ากันสำหรับการทดลองซ้ำ แต่อุณหภูมิที่เกิดการยุบตัวกลับแตกต่างกันมากกว่า 2 °C¹⁶ อย่างไรก็ตาม

ในการทำแห้งแบบเยือกแข็งจะต้องทำให้ตัวอย่างอยู่ในสถานะของแข็งอย่างสมบูรณ์¹ โดยผู้วิจัยกำหนดอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนทำให้เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -50 °C ซึ่งต่ำกว่าอุณหภูมิก่อนนิวเคลียสฝักของทุกสูตรตำรับเพื่อให้วัคซีนไวรัสอ้างอิงมาตรฐานมีสถานะของแข็งอย่างสมบูรณ์ทุกขวด การทดสอบวัคซีนทั้งสองรุ่นการผลิตพบว่าลักษณะทางกายภาพเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่ามีลักษณะที่ดี ไม่เกิดการยุบตัว มีปริมาณน้ำต่อน้ำหนัก และมีระยะเวลาการละลายอยู่ในเกณฑ์กำหนด เนื่องได้กำหนดให้อุณหภูมิทำแห้งขั้นต่ำต่ำกว่าอุณหภูมิที่เกิดการยุบตัว สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้คืออุณหภูมิของผลิตภัณฑ์ในขั้นตอนการทำแห้งแบบเยือกแข็งขึ้นต้นส่งผลต่อลักษณะและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ หากอุณหภูมิสูงเกินกว่าอุณหภูมิที่เกิดการยุบตัว ทำให้เกิดการหดตัวหรือยุบตัวของผลิตภัณฑ์อย่างรุนแรง และพบว่ามีระดับปริมาณน้ำต่อน้ำหนักสูงขึ้น รวมถึงระยะเวลาในการละลายเพิ่มขึ้นและมีผลิตภัณฑ์บางส่วนที่จะไม่ละลายอยู่ในสารละลาย¹⁷⁻¹⁸ การทดสอบความแรงที่ลดลงจากการทำแห้งแบบเยือกแข็งคือมากที่สุด 0.18 log PFU/0.5 ml อยู่ในระดับใกล้เคียงกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้การทำแห้งไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดียว สำหรับการประเมินความคงตัวของไวรัสที่แข็งแรง พบว่ามีการสูญเสียความแรงสูงสุดเท่ากับ 1.54 log PFU/0.5 ml ซึ่งเป็นผลจากการเก็บไว้ที่อุณหภูมิสูงที่ไม่ใช่อุณหภูมิจัดเก็บ (-20 °C) โดยปัจจุบันยังไม่มีเกณฑ์กำหนดนี้จากองค์การอนามัยโลก¹⁹⁻²⁰ สำหรับการผลิตวัคซีนไวรัสอ้างอิงมาตรฐาน ความคงตัวเป็นปัจจัยที่สำคัญใน

การพิจารณาเนื่องจากความใช้ได้ของวัคซีนไวรัส
อ้างอิงมาตรฐานจะขึ้นอยู่กับค่าความแรงอยู่ในเกณฑ์
กำหนดตลอดอายุการใช้งาน ซึ่งจากผลการทดสอบ
ความคงตัวพบว่าความแรงที่ลดลงจากการเก็บที่
อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 7 วัน แปรผกผันกับปริมาณ
น้ำตาลแลคโตสในสูตรตำรับ กล่าวคือมีปริมาณน้ำตาล
แลคโตสมากทำให้ความคงตัวสูง ดังนั้นสูตรตำรับที่ 4
จึงเป็นสูตรตำรับที่เหมาะสมในการจัดเตรียมวัคซีน
ไวรัสอ้างอิงมาตรฐานต่อไป

สรุปผล

วิธีการหาค่าปัจจัยที่สำคัญของการทำแห้ง
แบบเยือกแข็ง สำหรับวัคซีนไวรัสอ้างอิงมาตรฐานด้วย
กล้องจุลทรรศน์ควมคมอุณหภูมิ มีความเหมาะสม
ในกำหนดอุณหภูมิทำแห้งขั้นต้น คืออุณหภูมิไม่สูงเกิน
จนกระทั่งตัวอย่างเกิดการยุบตัว และไม่ต่ำเกินไป
ที่ทำให้ระยะเวลาในการทำแห้งแบบเยือกแข็งเพิ่มขึ้น
ช่วยลดเวลาและปริมาณตัวอย่างที่ใช้ในการหาสูตรตำรับ
และสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งเป็นการตอบวัตถุประสงค์
ของงานวิจัย และมีความเหมาะสมที่กำหนดเป็น
มาตรฐานวิธีการหาค่าปัจจัยที่สำคัญของการทำแห้ง
แบบเยือกแข็ง สำหรับวัคซีนไวรัสอ้างอิงมาตรฐาน
ด้วยกล้องจุลทรรศน์ควมคมอุณหภูมิ

ข้อเสนอแนะ

สูตรตำรับของวัคซีนป้องกันโรคไวรัสไข้สมอง
อักเสบที่เป็นตัวอย่างของการศึกษานี้ อาจต้องพิจารณา
ทำการศึกษาวิจัยเพื่อปรับสูตรตำรับให้มีความคงตัว
สำหรับใช้กรณีการขนส่งที่อุณหภูมิที่สูงกว่าอุณหภูมิ
ที่ใช้ในการจัดเก็บ

เอกสารอ้างอิง

1. Rey L, May JC. Freeze-drying/ lyophilization of pharmaceutical and biological products, 2nd ed. NewYork: Marcel Dekker; 2004.
2. Singh SK, Upadhyay RC, Yadav MC, Tiwari M. Development of a novel lyophilization protocol for preservation of mushroom

mycelial cultures, Curr Sci [Internet]. 2004 [cited 2021 Apr 23]; 87(5):568-70. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Dr-Mahesh-Yadav/publication/282819934_Development_of_a_novel_lyophilization_protocol_for_preservation_of_mushroom_mycelial_cultures/links/5697300308ae34f3cf1e1022/Development-of-a-novel-lyophilization-protocol-for-preservation-of-mushroom-mycelial-cultures.pdf

3. ปิณณธร ภัทรสถาพรกุล. เทคโนโลยีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (ตอนที่ 3). วารสารสมาคมเครื่องทำความเย็นไทย [อินเทอร์เน็ต]. 2548 [เข้าถึงเมื่อ 23 เม.ย. 2564];15:7-9. เข้าถึงได้จาก: <https://tra.or.th/wp-content/uploads/2017/05/keep-kool-15.pdf>
4. Ohtomo T, Yamada T, Yoshida K. Outermost-cell-surface changes in an encapsulated strain of Staphylococcus aureus after preservation by freeze-drying. Appl Environ Microbiol [Internet]. 1988 [cited 2021 Apr 23]; 54(10):2486-91. Available from: <https://aem.asm.org/content/aem/54/10/2486.full.pdf>
5. Naddafi K, Moosavi GH, Mesdaghinia AR. Evaluation of lyophilization effects on operational parameters and characteristics of activated sludge. Iranian J Env Health Sci Eng [Internet]. 2004 [cited 2021 Apr 23]; 1(1):20-5. Available from: <https://www.sid.ir/FileServer/JE/102620040109.pdf>
6. Jennings TA. Lyophilization: introduction and basic principles. NewYork: Informa Healthcare USA; 2008.
7. อัครธรรย์ อาเมน, จิรเดช ปัจฉิม, พรหมฉัตร เจริญพัฒน์, ณัฐกานต์ มิ่งงามทรัพย์, สุภาพร ภูมิอมร. การศึกษาหาสูตรตำรับที่เหมาะสมในการทำแห้งวัคซีนคางทูมอ้างอิงมาตรฐาน. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2554;53(2):97-112.

8. Zhai S, Taylor R, Sanches R, Slater NKH. Measurement of lyophilisation primary drying rates by freeze-drying microscopy. *Chem Eng Sci* 2003;58(11):2313–23.
9. Kevin R. Advanced uses of freeze drying microscopy (fdm) for product formulation and lyo-cycle development [Internet]. 2007 [cited 2019 Sep 1]. Available from: <http://docplayer.net/39803625-Advanced-uses-of-freeze-drying-microscopy-fdm-for-product-formulation-and-lyo-cycle-development.html>
10. Barresi AA, Ghio S, Fissore D, Pisano R. Freeze-drying of pharmaceutical excipients close to collapse temperature: influence of the process conditions on process time and product quality. *Drying Technology* 2009;27(6):805-16.
11. Ross C, Gaster T, Ward K. The Importance of Critical Temperatures in the Freeze Drying of Pharmaceutical Products [Internet]. 2011 [cited 2019 Sep 1]. Available from: http://biopharma.co.uk/intelligent-freeze-drying/wp-content/uploads/sites/2/2011/07/Importance_critical_temps_Resize-v1.pdf
12. Kasraian K, Spitznagelb TM, Juneau J, Yim K. Characterization of the Sucrose/Glycine/Water System by Differential Scanning Calorimetry and Freeze-Drying Microscopy, *Pharmaceut Dev Tech* 1998;3(2):233-9.
13. Tang X, Pikal MJ. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. *Pharmaceut Res* 2004;21:191–200.
14. Lu, X, Pikal M. Freeze-drying of mannitol-trehalose-sodium chloride-based formulations: The impact of annealing on dry layer resistance to mass transfer and cake structure. *Pharmaceut Dev Tech* 2004;9:85–95.
15. Haeusera C, Goldbach P, Huwyler J, Friess W, Allmendinger A. Impact of dextran on thermal properties, product quality attributes, and monoclonal antibody stability in freeze-dried formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm* 2020;24(147):45-56.
16. Meister E, Gieseler H. Freeze-Dry Microscopy of Protein/Sugar Mixtures: Drying Behavior, Interpretation of Collapse Temperatures and a Comparison to Corresponding Glass Transition Data. *J Pharmaceut Sci* 2009; 98(9):3072-87.
17. Pikal MJ, Shah S. The collapse temperature in freeze drying: Dependence on measurement methodology and rate of water removal from the glassy phase. *Int J Pharm* 1990;62:165-86.
18. Rambhatla S, Obert JP, Luthra S, Bhugra C, Pikal MJ. Cake shrinkage during freeze drying: A combined experimental and theoretical study. *Pharmaceut Dev Tech* 2005;10(1):33-40.
19. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Annex 7: Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of Japanese encephalitis vaccines (live, attenuated) for human use [Internet]. 2014 [cited 2019 Sep 1]. Available from: https://www.who.int/biologicals/vaccines/JE-Recommendations_TRS_980_Annex_7.pdf?ua=1
20. ญัฐกานต์ มิ่งงามทรัพย์, อัครรย์ อาเมน, สุภาพร ภูมิอมร. การทำแห้งไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวเชื้อเป็น เพื่อใช้เป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานของประเทศ. *วารสารวิชาการสาธารณสุข* 2559; 25(5):897-907.