

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา
Food and Drug Administrationวารสารอาหารและยา
ปีที่ 31 ฉบับที่ 2 (2567): พฤษภาคม – สิงหาคม
<https://he01.tci-thaijo.org/index.php/fdajournal/index>THAI FOOD AND DRUG JOURNAL
Vol. 31 No. 2 (2024): May – August

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulse Amperometric Detection (HPAEC-PAD) ในการวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจน ซีโรไทป์ ซี ในวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่น

ชลดา เพ็ชรไทย¹ กัสมา บุญมาก¹ อภิชัย ศุภสารสาทร¹ สุภาพร ภูมิอมร¹¹สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรีที่อยู่ติดต่อ: ชลดา เพ็ชรไทย สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000
chonlada.p@dmsc.mail.go.th

Method Validation of High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulse Amperometric Detection (HPAEC-PAD) for Meningococcal Serotype C Antigen Determination

Chonlada Petthai¹, Katsama Boonmak¹, Apichai Supasarnsathorn¹, Supaporn Phumiamorn¹¹Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Nonthaburi, Thailand**Contact address:** Chonlada Petthai, Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Tiwanon Road, Mueang District, Nonthaburi, 11000, Thailand, chonlada.p@dmsc.mail.go.th**Received:** 23 February 2024, **Revised:** 10 June 2024, **Accepted:** 2 July 2024

Abstract

Background: Quantitative analysis of meningococcal vaccine serotype C antigen is an important test for quality control of vaccine. Vaccine must be confirmed that contains the specific antigen corresponding to the registration dossier. So, the quality, efficacy and safety of vaccine are importance for public confidence in vaccines. HPAEC-PAD is known for its high accuracy and precision, establishing it as the gold standard method recommended by WHO for the analysis of carbohydrates, oligosaccharides, and polysaccharides. However, this method has not yet been used to check meningococcal vaccine quality in Thailand.

Objectives: Optimization and validation of Meningococcal serotype C antigen content were investigated for use as standard methods in the laboratory.

Methods: The optimum conditions and validate the method were studied in various parameters, including linearity and range, precision, accuracy, specificity, limit of detection, limit of quantification and robustness.

Results: The standard curve was linear in the concentration range of 0.47 and 15.00 µg/ml, and the correlation coefficient was 0.9996. The precision of total antigen and free antigen on six times in the same day showed a percentage of standard deviation of 0.55 and 1.90, respectively, whereas the precision of total antigen and free antigen on six different days showed a percentage of standard deviation of 3.71 and 6.83, respectively. The accuracy of measuring the standard substances used in the meningococcal vaccine was investigated, and the results showed that the percentage of recovery of total antigen was between 81.01 and 116.05. The percentage of recovery of free antigen was between 80.78 and 114.25. The limit of detection and quantification were shown as 0.15 and 0.46 µg/ml, respectively. The specificity showed there was no interference from other substances and could separate the target antigen from others. In addition, this method was durable when analysts were changed. Therefore, the results proved that all parameters of the validation method passed the acceptance criteria.

Conclusions: The study revealed that the Meningococcal serotype C antigen content by HPAEC-PAD passed validation and all met the requirements. Therefore, this method is suitable for use as a standard method for determining Meningococcal serotype C antigen content.

Keywords: Neisseria meningitides, Meningococcal vaccine, Serotype C, HPAEC-PAD

บทคัดย่อ

ความสำคัญ: การตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจน ซีโรไทป์ ซี ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่น เป็นรายการทดสอบที่มีความสำคัญในการควบคุมคุณภาพวัคซีน เพื่อยืนยันว่าวัคซีนมีปริมาณแอนติเจน ตรงตามที่ระบุในทะเบียนตำรับยาชีววัตถุและผู้ได้รับวัคซีนมีความมั่นใจในคุณภาพ ประสิทธิภาพ และความปลอดภัย ซึ่งวิธี HPAEC-PAD นั้น เป็นวิธีที่องค์การอนามัยโลกแนะนำ และเป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้ ในการตรวจวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรต โอลิโกแซคคาไรด์และโพลีแซคคาไรด์ โดยวิธีนี้มีความถูกต้อง และ แม่นยำสูง และยังไม่มีมีการนำมาใช้ตรวจสอบคุณภาพวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นในประเทศไทย

วัตถุประสงค์: ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจน ซีโรไทป์ ซี ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่น เพื่อนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ

วิธีการวิจัย: หาสภาวะที่เหมาะสมและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีในพารามิเตอร์ดังนี้ ความเป็น เส้นตรงและช่วงของการวัด ความเที่ยง ความแม่นยำ ขีดจำกัดของการตรวจพบ ขีดจำกัด ของการวัดเชิงปริมาณ และความทนของวิธี

ผลการศึกษา: กราฟมาตรฐานมีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.47 และ 15.00 μg ต่อ ml และ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9996 ความเที่ยงเมื่อทดสอบวัคซีนในวันเดียวกันหกรั้งของปริมาณ แอนติเจนทั้งหมดและปริมาณแอนติเจนอิสระได้ค่าร้อยละเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 0.55 และ 1.90 ความเที่ยงเมื่อทดสอบวัคซีนต่างวันกันหกรั้ง ปริมาณแอนติเจนทั้งหมดและปริมาณแอนติเจนอิสระ ได้ค่าร้อยละเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 3.71 และ 6.83 วิธีมีความแม่นยำสามารถตรวจวัดสาร มาตรฐานที่ใส่ในวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นได้ค่าร้อยละการคืนกลับของปริมาณแอนติเจนทั้งหมด อยู่ระหว่าง 81.01 และ 116.05 และค่าร้อยละการคืนกลับปริมาณแอนติเจนอิสระอยู่ระหว่าง 80.78 และ 114.25 มีขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณที่ 0.15 และ 0.46 ไมโครกรัมต่อml วิธีมีความจำเพาะคือไม่มีการรบกวนจากสารอื่นและสามารถแยกสารที่สนใจออกจาก สารอื่นๆได้ และวิธีนี้มีความทนเมื่อมีการเปลี่ยนนักวิเคราะห์ ดังนั้นการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี ผ่านเกณฑ์การยอมรับในทุกรายการทดสอบ

สรุป: การศึกษานี้พบว่าวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจนของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่น ซีโรไทป์ ซี โดย HPAEC-PAD ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี และเป็นไปตามเกณฑ์กำหนด ดังนั้นวิธีนี้จึงมีความเหมาะสมสำหรับใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจน ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่น ซีโรไทป์ ซี ทางห้องปฏิบัติการ

คำสำคัญ: เชื้อ *Neisseria meningitidis*, วัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่น, ซีโรไทป์ ซี, วิธี HPAEC-PAD

บทนำ

โรคไข้กาฬหลังแอ่นเกิดจากเชื้อ *Neisseria meningitidis* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างกลม คล้ายเม็ดถั่ว อยู่กันเป็นคู่ ๆ สามารถแพร่กระจาย ได้ทางการไอ จาม การสัมผัสกับน้ำมูก น้ำลาย และ มักพบในสถานที่คนอยู่ร่วมกันหนาแน่น และมี สุขภาพสิ่งแวดล้อมไม่ถูกสุขลักษณะ เมื่อติดเชื้อ ทำให้มีอาการไข้สูง ปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน คอแข็ง ชัก มีจุดเลือดออกที่ผิวหนัง จำเริญขนาด ใหญ่หรือผื่นแดง ได้ผิวหนัง พยาธิสภาพที่สำคัญคือ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ และการติดเชื้อในกระแสเลือด อย่างรุนแรง ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ภายใน 6-24 ชั่วโมง เชื้อ *N. meningitidis* ถูกจำแนกตาม โพลีแซคคาไรด์แคปซูลแบ่งเป็น 13 ซีโรไทป์ ได้แก่ A, B, C, E, X, Y, Z, W, H, I, K, L และ 29E โดย ซีโรไทป์สำคัญในการก่อโรคในคนมี 6 ซีโรไทป์ คือ ซีโรไทป์กรุ๊ป A, B, C, W, X และ Y1 วิธีการป้องกัน โรคทำได้โดยการฉีดวัคซีนเพื่อสร้างภูมิคุ้มกัน ต้านทาน ป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่น ซึ่งมีความสำคัญมาก สำหรับผู้ที่ต้องเดินทางไปยังพื้นที่ที่มีการระบาดของ โรค และควรได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคไข้ กาฬหลังแอ่น ก่อนการเดินทาง 7-10 วัน²

วัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่น เป็น วัคซีนผลิตมาจากส่วนโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ แบคทีเรีย *N. meningitidis* โดยวัคซีนป้องกันโรค ไข้กาฬหลังแอ่นมี 2 ชนิด คือ (1) ชนิดโพลีแซคคาไรด์ ที่ไม่มีการเชื่อมกับสารโปรตีน (Non-conjugate polysaccharide) มีคุณสมบัติเป็น T cell independent ซึ่งจะกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน ได้ไม่ดีในเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 2 ปี และไม่สามารถ กระตุ้น immunological memory ในทุกอายุ ระบบภูมิคุ้มกันจะลดลงภายหลังการฉีดวัคซีน ประมาณ 5 ถึง 10 ปี การฉีดซ้ำจะไม่ทำให้ร่างกาย

มีภูมิคุ้มกันสูงขึ้นแบบ boosting effect (memory) และ (2) ชนิดโพลีแซคคาไรด์ที่มีการเชื่อมกับสาร โปรตีน (Conjugate polysaccharide) ซึ่งสามารถ กระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยผ่านระบบ T cell dependent เกิดการตอบสนองได้ดีในเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 2 ปี และเกิดการสร้าง memory B cell ทำให้เกิด booster response เมื่อมีการฉีดซ้ำได้³

ปัจจุบันวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่น ที่มีจำหน่ายในประเทศไทยมีองค์ประกอบของ แอนติเจนจากเชื้อ *N. meningitidis* จำนวน 4 ซีโรไทป์ คือ A, C, Y และ W135 และเพื่อให้ผู้ได้รับ วัคซีนมีความมั่นใจในคุณภาพ จึงมีความจำเป็น ต้องตรวจสอบคุณภาพวัคซีนให้มีประสิทธิภาพ ในการป้องกันโรค การตรวจสอบคุณภาพของวัคซีน สามารถตรวจสอบโดยใช้วิธีทางห้องปฏิบัติการ ทั้งทางด้านชีวภาพ กายภาพ และด้านเคมี ซึ่ง รายการวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจนหรือความแรง เป็นพารามิเตอร์หนึ่งที่มีความสำคัญในการควบคุม คุณภาพวัคซีน³ เพื่อยืนยันว่าวัคซีนมีปริมาณ แอนติเจนตรงตามที่ระบุในทะเบียนตำรับยาชีววัตถุ

ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจน หรือความแรงในวัคซีนแบคทีเรียชนิดโพลีแซคคาไรด์ องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้แนะนำหลายวิธี เช่น colorimetric method, chromatographic method (HPLC), serological method และ High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulse Amperometric Detection (HPAEC-PAD) เป็นต้น³ ซึ่งบางวิธียังมี ข้อจำกัดสำหรับห้องปฏิบัติการภาครัฐซึ่งมีความ จำเป็นที่ต้องใช้สารจากผู้ผลิต จึงไม่เป็นที่นิยม ส่วนวิธี HPAEC-PAD เป็นวิธีที่มีความถูกต้อง แม่นยำสูง และไม่มี ความจำเป็นต้องใช้สารจากผู้ผลิต จึงเหมาะสมนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานของห้อง

ปฏิบัติการได้ และในปัจจุบันบริษัทผู้ผลิตวัคซีนส่วนใหญ่จะใช้วิธี HPAEC-PAD ในการตรวจวิเคราะห์ เนื่องจากเป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้ในการตรวจหาสารจำพวกคาร์โบไฮเดรต และเหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์และโพลีแซคคาไรด์ และเป็นวิธีที่มีความถูกต้อง แม่นยำสูง⁴ ซึ่งอาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของแต่ละองค์ประกอบของสารบนเฟสคงที่ (stationary phase) ภายใต้การพาของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยใช้ anion-exchange column ที่เป็นเฟสคงที่มีสารตัวกลาง (ion exchanger) เป็นประจุบวกซึ่งจะจับกับสารละลายที่มีประจุลบด้วยแรง electrostatic force จากนั้นใช้เฟสเคลื่อนที่เพิ่ม pH หรือเพิ่ม ionic strength เพื่อไปปรับ pH ให้ตรงกับ pI ของสารที่จับกับสารตัวกลางทำให้มีประจุเป็นศูนย์และสารจะถูกปล่อยออกมา ผ่านเครื่องตรวจวัดสัญญาณชนิด PAD ซึ่งเป็น electrochemical detector จากนั้นคำนวณหาปริมาณของสารโดยอ่านค่าจากกราฟมาตรฐานที่เตรียมจากสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

การศึกษาครั้งนี้จึงดำเนินการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจน ซีโรไทป์ C ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่น ด้วยวิธี HPAEC-PAD เพื่อนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจทางห้องปฏิบัติการสำหรับการควบคุมคุณภาพของวัคซีน ซึ่งจากเดิมยังไม่มีวิธีที่นำมาใช้ตรวจสอบคุณภาพวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นในประเทศไทย

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสม และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจน ซีโรไทป์ ซี ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่น

ด้วยวิธี HPAEC-PAD

2. เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการในการวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจน ซีโรไทป์ ซี ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่น ด้วยวิธี HPAEC-PAD

ระเบียบวิธีการวิจัย

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง HPLC รุ่น LC-20ADXR (Nexera) และ Software LabSolution ของบริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น Pulse amperometric detector รุ่น ED743 ของบริษัท GL Sciences ประเทศญี่ปุ่น โดยใช้คอลัมน์แยกสารชนิด CarboPac PA1 analytical column ขนาด 4 x 250 mm และ CarboPac PA1 guard column ของบริษัท Dionex ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องชั่งความละเอียดทศนิยม 2 และ 5 ตำแหน่ง ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ 2-8 °C ตู้แช่แข็งควบคุมอุณหภูมิ -30 °C ตู้อบความร้อน ตู้ดูดควัน เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมความเย็น เครื่องเขย่าผสม เครื่องดูดสุญญากาศ แผ่นกรอง Nylon ขนาด 0.22 ไมครอน หลอด cryotube ขนาด 2 ml หลอดแก้วทนกรด (glass microtube with gasket Teflon plug) ขนาด 4 ml เครื่องแก้ว ไมโครปิเปตขนาด 10-1,000 ไมโครลิตร

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ water HPLC grade; conductivity 18.2 MΩ CAS No. 7732-18-5 ของ Ligand scientific, 1N NaOH solution CAS No. 1310-73-2 ของ Merck, methanol HPLC grade CAS No. 67-56-1 ของ J.T. Baker, Sodium Deoxycholate CAS No. 302-95-4 ของ Sigma-Aldrich, NaOAc CAS

No. 127-09-3 analytical grade ของ Merck, HCl CAS No. 7647-01-0 analytical grade ของ Merck, NaCl CAS No. 7647-14-5 analytical grade ของ Merck, KCl CAS No. 7447-40-7 analytical grade ของ Merck, Na_2HPO_4 CAS No. 7558-79-4 analytical grade ของ Merck, KH_2PO_4 CAS No. 7758-11-4 analytical grade ของ Merck

สารมาตรฐานและการเตรียมสารมาตรฐาน

WHO International standard for Meningococcal serogroup C polysaccharide code 08/214 ของ National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC)⁵ ใช้สำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน และ N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) CAS No. 131-48-6 ของ Sigma-Aldrich ใช้เป็นสารควบคุมผลบวก

การเตรียมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น โดยเติมน้ำที่กำจัดแก๊สแล้วปริมาตร 1 ml ลงในขวดที่บรรจุสารมาตรฐาน ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน อย่างน้อย 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นแบ่งบรรจุลงใน cryotube ปริมาตร 2 ml เก็บที่อุณหภูมิ -20°C โดยจะได้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเข้มข้นเท่ากับ 1.192 ± 0.192 mg ต่อ ml

การเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับใช้งาน โดยเจือจางสารละลายมาตรฐานเข้มข้น ปริมาตร 840 ไมโครลิตร ด้วยน้ำที่กำจัดแก๊สลงในแล้วลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำดังกล่าวให้ครบ 10 ml ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นแบ่งบรรจุลงใน cryotube ปริมาตร 2 ml เก็บที่อุณหภูมิ -20°C โดยจะได้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานสำหรับใช้งานเท่ากับ 100 ไมโครกรัม (μg)ต่อ ml

การเตรียมกราฟมาตรฐาน โดยเจือจาง

สารละลายมาตรฐานสำหรับใช้งานด้วยน้ำที่กำจัดแก๊สแล้ว ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.50 และ 15.00 μg ต่อ ml ในหลอดทดลอง ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน กรองด้วยแผ่นกรอง Nylon ขนาด 0.22 ไมครอน

การเตรียมสารควบคุมผลบวกเข้มข้น โดยชั่ง Neu5Ac น้ำหนัก 10 มิลลิกรัม ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 ml แล้วเติมน้ำที่กำจัดแก๊สแล้วละลายให้เข้ากัน และปรับปริมาตรด้วยน้ำดังกล่าวให้ครบ 100 ml ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นแบ่งบรรจุลงใน cryotube ปริมาตร 2 ml เก็บที่อุณหภูมิ -20°C

การเตรียมสารควบคุมผลบวกสำหรับใช้งาน โดยเจือจางสารควบคุมผลบวกเข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในขวดขนาด 2 ml ที่บรรจุน้ำที่กำจัดแก๊สแล้วปริมาตร 900 ไมโครลิตร (μL) ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน กรองด้วยแผ่นกรอง Nylon ขนาด 0.22 ไมครอน โดยจะได้ความเข้มข้นของสารควบคุมผลบวกสำหรับใช้งานเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อ ml

ตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง

วัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกต (Meningococcal polysaccharide serogroup A, C, Y and W135 Conjugate Vaccine) จำนวน 1 รุ่นการผลิต ที่ขึ้นทะเบียนในประเทศไทย

การเตรียมตัวอย่างสำหรับทดสอบ โดยนำวัคซีนมาผสมกันให้มีปริมาตรอย่างน้อย 2.5 ml ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการเขย่าประมาณ 30 วินาที

การเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ในการทดสอบหาปริมาณแอนติเจนทั้งหมด โดยดูดวัคซีนที่เตรียมไว้ ปริมาตร 1 ml ลงในหลอดแก้วทนกรด เพื่อนำไป

ย่อยด้วยกรดต่อไป

การเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ในการทดสอบหาปริมาณแอนติเจนอิสระ โดยดูดวัคซีนที่เตรียมไว้ปริมาตร 950 ไมโครลิตร ลงในหลอด microtube จากนั้นเติม 10X PBS ปริมาตร 50 μ l ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เติม DOC ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 μ l ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม HCl ความเข้มข้น 1N ปริมาตร 50 μ l ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันอีกครั้งก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,300 g อุณหภูมิ 10 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดส่วนใสปริมาตร 1 ml ลงในหลอดแก้วทนกรด เพื่อนำไปย่อยด้วยกรดต่อไป

การย่อยตัวอย่างและสารมาตรฐานด้วยกรด (acid hydrolysis)⁶⁻⁹ เป็นขั้นตอนสลายโพลิเมอร์ (depolymerization) โดยการดูดสารละลายสำหรับกราฟมาตรฐาน ตัวอย่างเพื่อใช้ในการทดสอบหาปริมาณแอนติเจนทั้งหมด และตัวอย่างเพื่อใช้ในการทดสอบหาปริมาณแอนติเจนอิสระ ปริมาตรหลอดละ 1 ml แล้วเติม HCl ความเข้มข้น 1N ปริมาตร 100 μ l นำไปอบในตู้บรอนที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน กรองด้วยแผ่นกรอง Nylon ขนาด 0.22 ไมครอน สำหรับสารควบคุมผลบวกสำหรับใช้งานไม่ต้องผ่านขั้นตอนย่อยด้วยกรด

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจน ซีโรไทป์ ซีของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นด้วยวิธี HPAEC-PAD

นำสารละลายสำหรับกราฟมาตรฐาน สารควบคุมผลบวกสำหรับใช้งาน ตัวอย่างเพื่อใช้ในการทดสอบหาปริมาณแอนติเจนทั้งหมด และ

ตัวอย่างเพื่อใช้ในการทดสอบหาปริมาณแอนติเจนอิสระที่ย่อยด้วยกรดแล้วมาตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่อง HPAEC-PAD⁶⁻⁹ ที่ใช้สภาวะการทำงาน ประกอบด้วยคอลัมน์ CarboPac PA1 analytical column ขนาด 4 x 250 mm และ CarboPac PA1 guard column ตั้งอุณหภูมิของ column oven chamber และ auto sampler chamber ไว้ที่ 30 และ 4 °C ตามลำดับ reference electrode ชนิด AgCl ปริมาตรการฉีดต่อครั้งเท่ากับ 10 μ l ใช้ 100 mM NaOH with 80 mM NaOAc เป็นสารตัวพา ปรับอัตราการไหล 1.0 ml ต่อนาที ตัวตรวจวัดสัญญาณชนิด Pulse Amperometric Detector ตั้งระยะเวลาการทำงานแต่ละรอบ 12 นาที คำนวณค่าปริมาณแอนติเจน โดยอ่านจากกราฟมาตรฐานที่เครื่องคำนวณ

การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีตรวจวิเคราะห์

ทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี HPAEC-PAD ในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณแอนติเจน ซีโรไทป์ ซี เพื่อให้ได้ช่วงความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่จะนำมาใช้เป็นกราฟมาตรฐานที่มีความเป็นเส้นตรง และทดสอบกับตัวอย่างที่ระดับการเจือจางเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี¹⁰⁻¹¹

1. ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน และช่วงของการวัด วิเคราะห์สารละลายสำหรับกราฟมาตรฐานที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.50 และ 15.00 μ g ต่อ ml ด้วยเครื่อง HPAEC-PAD ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำต่อรอบการวิเคราะห์ คำนวณสมการถดถอยเชิงเส้น (linear regression equation) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (coefficient of correlation: r) เกณฑ์การยอมรับค่า r เท่ากับ 0.998

2. การทดสอบความเที่ยง โดยทำการศึกษาใน 2 หัวข้อคือ (1) การทำซ้ำในวันเดียวกัน โดยใช้ตัวอย่างเดียวกัน วิเคราะห์จำนวน 6 ซ้ำ ในวันเดียวกัน และ (2) การวิเคราะห์ต่างวัน โดยใช้ตัวอย่างเดียวกัน นำมาเตรียมและวิเคราะห์ 6 การทดสอบต่างวันกัน วิเคราะห์วันละ 3 ซ้ำ คำนวณค่าเฉลี่ยปริมาณแอนติเจน ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เกณฑ์การยอมรับต้องมีส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของการทำซ้ำในวันเดียวกันไม่เกินร้อยละ 5 และการวิเคราะห์ต่างวันไม่เกินร้อยละ 10

3. การทดสอบความแม่นยำ โดยเติมสารละลายมาตรฐานจำนวน 3 ความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงกราฟมาตรฐานลงในตัวอย่าง วิเคราะห์ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ คำนวณร้อยละการคืนกลับ เกณฑ์การยอมรับต้องมีร้อยละการคืนกลับอยู่ในระหว่างร้อยละ 80 และ 120

4. การทดสอบความจำเพาะของวิธี ทำโดยเปรียบเทียบ retention time ของพีคจากโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน สารควบคุมผลบวกสำหรับใช้งาน ตัวอย่างสำหรับทดสอบ กับตัวอย่างวัคซีนชนิดอื่น จำนวน 3 ซ้ำ ตัวอย่างสำหรับทดสอบจะต้องปรากฏพีคจากโครมาโตแกรมที่ retention time ใกล้เคียงกับพีคจากโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานและสารควบคุมผลบวกสำหรับใช้งาน

5. การหาขีดจำกัดของการตรวจพบคำนวณจากค่าความเข้มข้นสารที่ให้ค่าสัญญาณเป็น 3 เท่าของสัญญาณรบกวนและขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณคำนวณจาก ความเข้มข้นของสารที่ให้ค่าสัญญาณเป็น 10 เท่าของสัญญาณรบกวน

6. การทดสอบความทนของวิธี โดยการเปลี่ยนนักวิเคราะห์ ทำการทดสอบโดยใช้ตัวอย่างเดียวกัน นำมาเตรียมและวิเคราะห์จำนวน 3 การทดสอบ ต่างวัน ต่างนักวิเคราะห์ วิเคราะห์ครั้งละ 3 ซ้ำ ทำการเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ที่ตรวจโดยนักวิเคราะห์คนที่ 1 และนักวิเคราะห์คนที่ 2 ด้วยสถิติ Independent sample T-test

ผลการศึกษา

ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจน ชิโรไทป์ ซี ด้วยวิธี HPAEC-PAD ได้สภาวะที่เหมาะสมในการตั้งค่าการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง ประกอบด้วย ใช้คอลัมน์ CarboPac PA1 analytical column ขนาด 4 x 250 mm และ CarboPac PA1 guard column ตั้งอุณหภูมิของ column oven chamber และ auto sampler chamber ไว้ที่ 30 และ 4 °C ตามลำดับ ปริมาตรการฉีดต่อครั้งเท่ากับ 10 µl ใช้ 100 mM NaOH with 80 mM NaOAc เป็นสารตัวพา ปรับอัตราการไหล 1.0 ml ต่อนาที ตั้งระยะเวลาการทำงานแต่ละรอบ 12 นาที ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจน ชิโรไทป์ ซี โดยวิธี HPAEC-PAD

Parameter	Setting
Column and guard column	CarboPac PA1
Column Temperature	30°C
Detection	Pulsed Amperometric detection
Gold Electrode	Not disposable

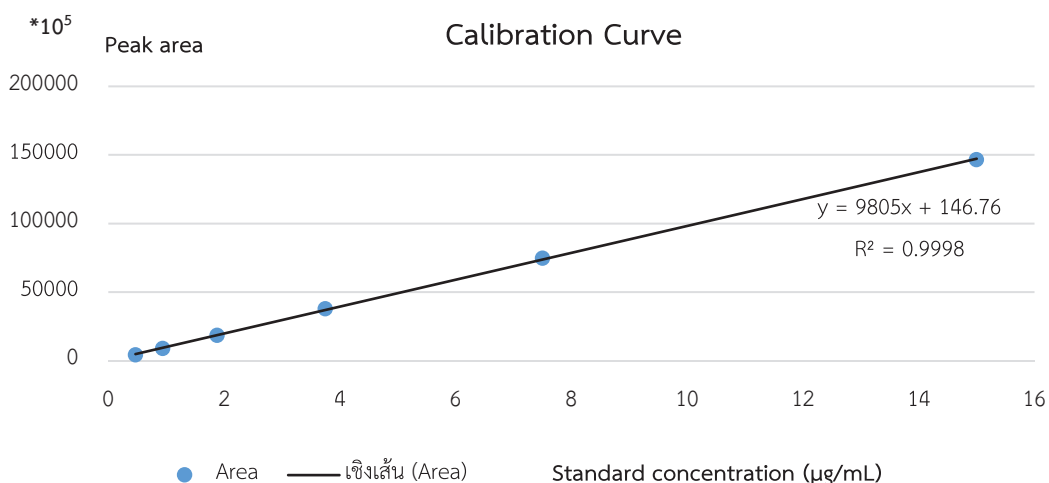
ตารางที่ 1 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจน ซีโรไพบี ซี โดยวิธี HPAEC-PAD (ต่อ)

Parameter	Setting
Reference Electrode	AgCl
Elution conditions/eluent	Isocratic – 100 mM NaOH with 80 mM NaOAc
Autosampler temperature	4°C
Injection Volume	10 µl
Flow rate	1.0 ml/min
Run time	12 min
Software for data acquisition and processing	LabSolution

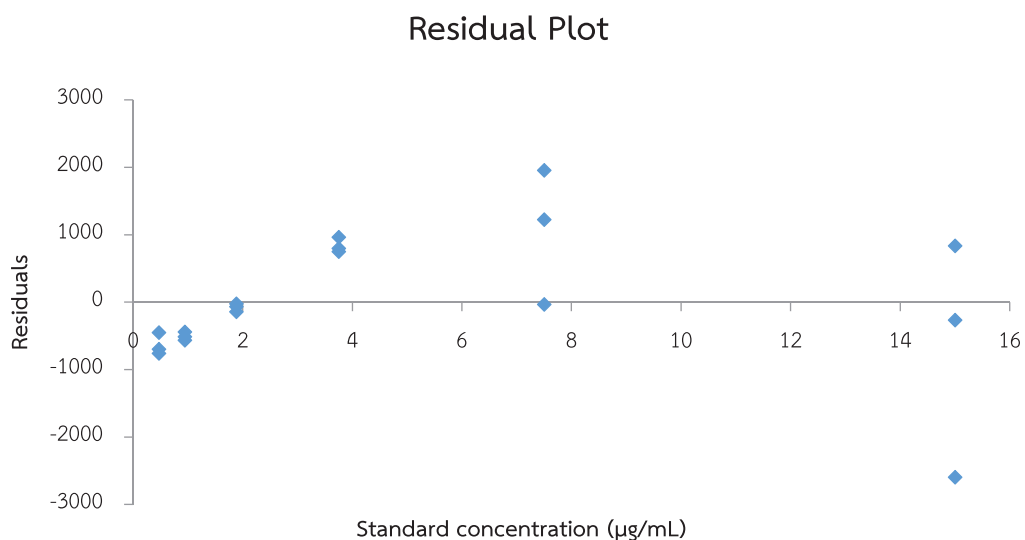
ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน และช่วงของการวัด เมื่อนำค่าพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นระหว่าง 0.47 และ 15.00 µg ต่อ ml มาสร้างกราฟ จะได้กราฟที่มีความเป็นเส้นตรง ดังแสดงในรูปที่ 1 มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9996 โดยมีสมการถดถอยเชิงเส้น $y = 9805x + 146.76$ การทดสอบความเป็นเส้นตรงด้วย F-test ได้ค่า

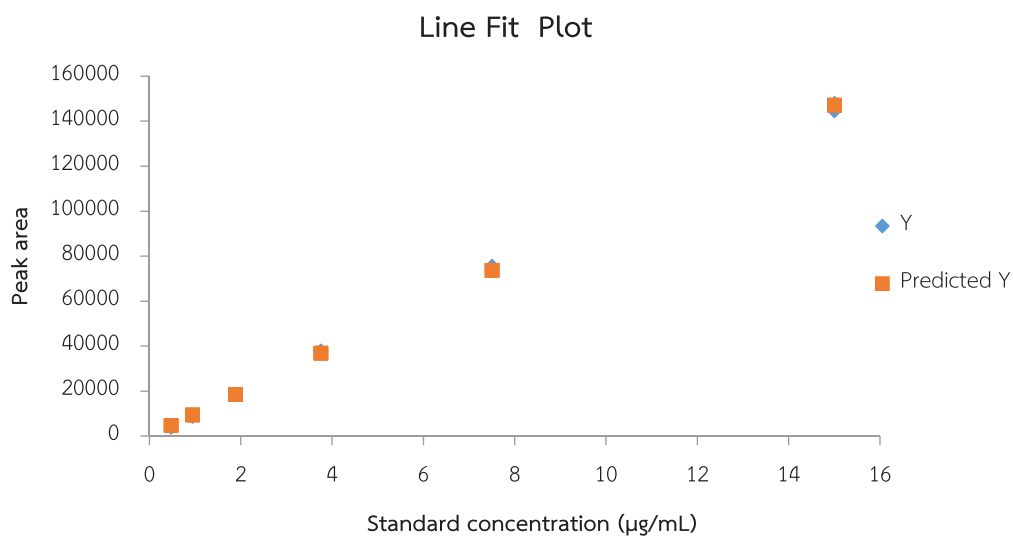
มากกว่าค่า F-critical ที่ alpha 0.05 ผลจากกราฟ residual plot พบว่ามีการกระจายของจุดเพิ่มขึ้น ที่ความเข้มข้นสูงของแกน X รอบ ๆ ค่าศูนย์แสดงว่า กราฟมีความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรง แต่มีความแปรปรวนสูง ดังแสดงในภาพที่ 2 และกราฟ line fit plot พบการเรียงตัวของจุดค่า y ที่ตรวจวัด ได้เทียบกับ predicted y มีค่าใกล้เคียงกันเป็นการยืนยันให้เห็นว่ากราฟเป็นเส้นตรง ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าพื้นที่ใต้กราฟ (แกน Y) และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.50 และ 15.00 µg ต่อ ml (แกน X)



รูปที่ 2 Residual plot ของการตรวจวิเคราะห์สารมาตรฐานความเข้มข้นที่ 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.50 และ 15.00 µg ต่อ ml ด้วยวิธี HPAEC-PAD



รูปที่ 3 Line fit plot ของการตรวจวิเคราะห์สารมาตรฐานความเข้มข้นที่ 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.50 และ 15.00 µg ต่อ ml ด้วยวิธี HPAEC-PAD

ผลการทดสอบความเที่ยง เมื่อทำซ้ำในวันเดียวกัน ใช้ตัวอย่างเดียวกัน วิเคราะห์จำนวน 6 ซ้ำในวันเดียวกัน พบว่าค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของ Total polysaccharide ที่คำนวณ

ได้เท่ากับ 0.55 และ Free polysaccharide ที่คำนวณได้เท่ากับ 1.90 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือไม่เกินร้อยละ 5 ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการศึกษาความเที่ยงเมื่อทำซ้ำในวันเดียวกัน ใช้ตัวอย่างเดียวกัน วิเคราะห์จำนวน 6 ซ้ำ ในวันเดียวกัน

ครั้งที่	ปริมาณ Polysaccharide (µg/ml)	
	Total polysaccharide	Free polysaccharide
1	7.13	1.49
2	7.24	1.50
3	7.25	1.45
4	7.22	1.47
5	7.20	1.43
6	7.20	1.43
Mean	7.21	1.46
SD	0.04	0.03
%RSD	0.55	1.90

ผลการทดสอบความเที่ยง เมื่อใช้ตัวอย่าง
 วัคซีนเดียวกัน เตรียมตัวอย่างใหม่ในแต่ละวัน ทำการ
 วิเคราะห์ต่างวันจำนวน 6 วัน วิเคราะห์วันละ 3 ซ้ำ
 โดยนักวิเคราะห์คนเดียวกัน พบว่าส่วนเบี่ยงเบน
 มาตรฐานสัมพัทธ์ของ Total polysaccharide
 ที่คำนวณได้เท่ากับ 3.71 และ Free polysaccharide
 ที่คำนวณได้เท่ากับ 6.83 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ
 ได้คือไม่เกินร้อยละ 10 ดังแสดงในตารางที่ 3
 ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ผลการศึกษาความเที่ยง เมื่อใช้ตัวอย่างวัคซีนเดียวกัน เตรียมตัวอย่างใหม่ในแต่ละวัน
 ทำการวิเคราะห์ต่างวันจำนวน 6 วัน วิเคราะห์วันละ 3 ซ้ำ

วันที่	ปริมาณ Total polysaccharide (µg/ml)				ปริมาณ Free polysaccharide (µg/ml)			
	ฉีดครั้งที่ 1	ฉีดครั้งที่ 2	ฉีดครั้งที่ 3	Mean	ฉีดครั้งที่ 1	ฉีดครั้งที่ 2	ฉีดครั้งที่ 3	Mean
1	7.13	7.24	7.25	7.21	1.49	1.50	1.45	1.48
2	7.41	7.43	7.42	7.42	1.33	1.29	1.30	1.31
3	7.30	7.25	7.21	7.25	1.31	1.22	1.23	1.25
4	7.37	7.33	7.31	7.34	1.38	1.29	1.30	1.32
5	8.05	7.99	7.93	7.99	1.49	1.53	1.52	1.51
6	7.71	7.78	7.66	7.72	1.45	1.34	1.30	1.36
	Mean			7.49	Mean			1.37
	SD			0.28	SD			0.09
	%RSD			3.71	%RSD			6.83

ผลการทดสอบความแม่นยำ เมื่อเติมสารละลายมาตรฐานจำนวน 3 ความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงกราฟมาตรฐานลงในตัวอย่าง วิเคราะห์ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ พบว่าค่าร้อยละการคืนกลับของ Total polysaccharide อยู่ระหว่าง 81.01 และ

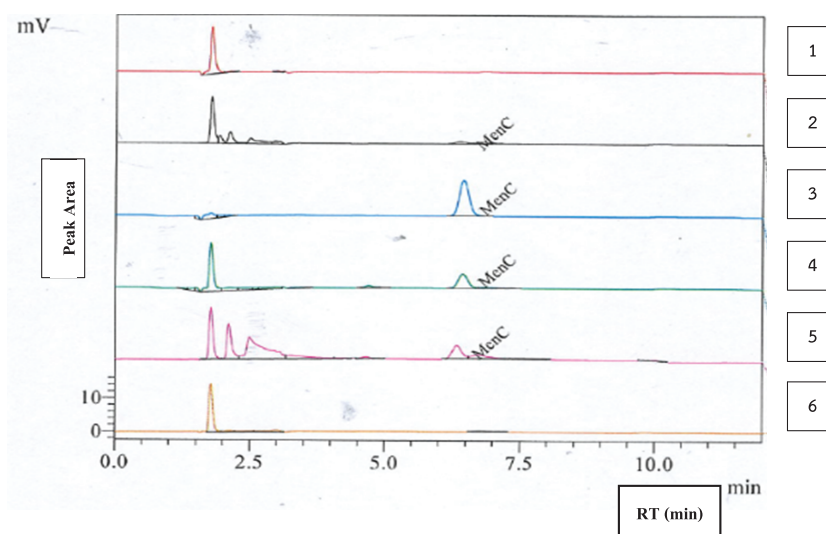
116.05 และค่าร้อยละการคืนกลับของ Free polysaccharide อยู่ระหว่าง 80.78 และ 114.25 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ คือ ต้องมีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ระหว่างร้อยละ 80 และ 120 ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ร้อยละการคืนกลับของการเติมสารมาตรฐานในตัวอย่าง จำนวน 3 ความเข้มข้น

ครั้งที่	ร้อยละการคืนกลับของสารมาตรฐาน					
	ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงในวัคซีน (µg/ml)					
	Total polysaccharide			Free polysaccharide		
	1.88	3.75	7.50	0.47	1.88	3.75
1	98.20	116.05	101.89	100.92	92.40	92.79
2	97.62	81.01	100.82	94.51	114.25	92.90
3	86.31	93.35	92.15	80.78	89.74	100.54

ผลการทดสอบความจำเพาะของวิธีแสดงให้เห็นจาก retention time (RT) ของพีคจากโครมาโตแกรม โดยสารละลาย blank และตัวอย่างวัคซีนชนิดอื่น ไม่ปรากฏพีคบริเวณการวิเคราะห์

ส่วนตัวอย่างสำหรับทดสอบ ปรากฏพีคที่ RT ใกล้เคียงกับพีคสารมาตรฐาน MenC และสารควบคุมผลบวกสำหรับใช้งาน ดังแสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน สารควบคุมผลลบ สารควบคุมผลบวก ตัวอย่างสำหรับทดสอบกับตัวอย่างวัคซีนชนิดอื่น

หมายเหตุ: (1) สารละลาย Blank (Negative control) (2) Free polysaccharide (ตัวอย่างสำหรับทดสอบ) (3) Internal control (N-acetylneuraminic acid) (Positive control) (4) สารมาตรฐาน MenC WHO 1st International Standard (5) Total polysaccharide (ตัวอย่างสำหรับทดสอบ) (6) ตัวอย่างวัคซีนชนิดอื่น

ขีดจำกัดของการตรวจพบอยู่ที่ระดับ 0.15 μg ต่อ ml และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ อยู่ที่ระดับ 0.46 μg ต่อ ml ซึ่งคำนวณจากค่า

ความเข้มข้นสารที่ให้ค่าสัญญาณเป็น 3 และ 10 เท่าของสัญญาณรบกวนของกราฟมาตรฐาน ตามลำดับ จำนวน 6 ครั้ง ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงค่า LOD และ LOQ ที่คำนวณจากค่าความเข้มข้นสารที่ให้ค่าสัญญาณ (S/N) เป็น 3 และ 10 เท่าของสัญญาณรบกวนของกราฟมาตรฐาน

ครั้งที่	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)
1	0.15	0.46
2	0.15	0.45
3	0.17	0.53
4	0.12	0.37
5	0.18	0.53
6	0.14	0.42
Mean	0.15	0.46

ผลการทดสอบความทนของวิธี เมื่อเปลี่ยน นักวิเคราะห์ ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ พบว่าปริมาณ Total polysaccharide ที่ตรวจ โดยนักวิเคราะห์คนที่ 1 มีค่าเฉลี่ย 9.16 μg ต่อ ml ส่วนนักวิเคราะห์คนที่ 2 มีค่าเฉลี่ย 9.23 μg ต่อ ml

และปริมาณ Free polysaccharide ที่ตรวจโดย นักวิเคราะห์คนที่ 1 มีค่าเฉลี่ย 1.43 μg ต่อ ml ส่วนนักวิเคราะห์คนที่ 2 มีค่าเฉลี่ย 1.55 μg ต่อ ml ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการศึกษาความทนของวิธีวิเคราะห์ เมื่อเปลี่ยนนักวิเคราะห์

ครั้งที่	ปริมาณ Total polysaccharide ($\mu\text{g/ml}$)		ปริมาณ Free polysaccharide ($\mu\text{g/ml}$)	
	นักวิเคราะห์คนที่ 1	นักวิเคราะห์คนที่ 2	นักวิเคราะห์คนที่ 1	นักวิเคราะห์คนที่ 2
1	9.17	9.12	1.48	1.50
2	9.04	9.16	1.31	1.42
3	9.26	9.41	1.51	1.73
Mean	9.16	9.23	1.43	1.55
SD	0.09	0.13	0.09	0.13
%RSD	0.99	1.37	6.37	8.49

ผลการเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ total polysaccharide และ Free polysaccharide ที่ตรวจโดยนักวิเคราะห์คนที่ 1 และนักวิเคราะห์ คนที่ 2 ด้วยสถิติ Independent ample T-test

พบว่ามีค่า Sig. (2-tailed) มากกว่า 0.05 แสดงว่า ผลการทดสอบที่ตรวจโดยนักวิเคราะห์คนที่ 1 และ นักวิเคราะห์คนที่ 2 ไม่มีความแตกต่างกันอย่าง มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

อภิปรายผล

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจน ซีโรไทป์ ซี ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่น เป็นรายการทดสอบที่สำคัญรายการหนึ่งในการควบคุมคุณภาพวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่น ที่ระบุในข้อแนะนำขององค์การอนามัยโลก³ ซึ่งแสดงถึงความแรงของวัคซีนในการป้องกันโรค ในกระบวนการผลิตวัคซีน ผู้ผลิตจะต้องควบคุมการผลิตให้มีปริมาณแอนติเจนคงที่และสม่ำเสมอ ในทุกรอบการผลิตตรงตามที่ระบุในทะเบียนตำรับยา อีกทั้งห้องปฏิบัติการภาครัฐที่มีหน้าที่ในการควบคุมคุณภาพ จะต้องใช้วิธีตรวจวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องแม่นยำ และเชื่อถือได้ วิธี HPAEC-PAD เป็นหนึ่งในวิธีที่แนะนำ ซึ่ง HPAEC มีความสามารถในการแยกคาร์โบไฮเดรตได้ทุกประเภทของ ออดีทอล อะมิโนซูการ์ โมโนแซคคาไรด์ โอลิโกแซคคาไรด์ และโพลีแซคคาไรด์ ตามลักษณะโครงสร้าง อีกทั้งคาร์โบไฮเดรตยังมีความเป็นกรดอ่อน จะสามารถแยกได้โดยใช้ highly efficient anion-exchange column ส่วน PAD เป็น electrochemical detector ใช้ในการแยกสารที่มีส่วนประกอบของ electroactive groups โดยอาศัยกลไก electrocatalytic oxidation ซึ่งจะสามารถแยกด้วย high resolution ดังนั้น HPAEC-PAD จึงเป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้ในการตรวจหาคาร์โบไฮเดรตและเป็นวิธีที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ และโพลีแซคคาไรด์⁴

วัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่น เป็นวัคซีนแบบที่เรียกชนิดโพลีแซคคาไรด์ ผลิตมาจากส่วนโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อแบคทีเรีย *N. meningitidis*

ซึ่งในปัจจุบันวัคซีนมีหลายซีโรไทป์ เช่น A, C, Y และ W135 โดยในแต่ละซีโรไทป์จะแตกต่างกัน ที่ชนิดน้ำตาลในสายโพลีแซคคาไรด์ การศึกษาครั้งนี้ได้พัฒนาวิธี HPAEC-PAD มาใช้เพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจน ซีโรไทป์ ซี ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่น ซึ่งในการตรวจหาปริมาณแอนติเจนของซีโรไทป์ ซี จะทำการวัดปริมาณของ N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) ที่เป็นส่วนหนึ่งในลักษณะโครงสร้างแอนติเจนของไข้กาฬหลังแอ่น ซีโรไทป์ ซี ที่เป็น Poly- α 2, 9-N-acetylneuraminic acid (variable C7 and C8 O-acetylation) และก่อนนำไปวิเคราะห์ จะต้องทำการย่อยสลายโครงสร้างแอนติเจนด้วยกรดก่อนเพื่อให้ได้ Neu5Ac อิสระ^{4,7} แล้วนำมาผ่านคอลัมน์ที่ใช้ในการทดสอบที่สามารถแยกสารที่มีประจุและขนาดโมเลกุลที่ต่างกันได้อย่างดีด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ และตรวจวัดสัญญาณแบบ electrochemical นอกจากนี้วิธีที่จะใช้ในการควบคุมคุณภาพวัคซีนในห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี เพื่อให้มั่นใจว่าผลวิเคราะห์ที่ตรวจได้ด้วยวิธีดังกล่าวมีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ โดยวิธีวิเคราะห์นี้จะใช้คอลัมน์แยกสารชนิด CarboPac PA1 analytical column ขนาด 4 x 250 mm และ CarboPac PA1 guard column ที่อุณหภูมิ 30 °C ปริมาณการฉีดต่อครั้งเท่ากับ 10 μ l ใช้ 100 mM NaOH with 80 mM NaOAc เป็นสารตัวพา ปรับอัตราการไหล 1.0 ml ต่อนาที ตัวตรวจวัดสัญญาณชนิด PAD ตั้งระยะเวลาการทำงานแต่ละรอบ 12 นาที ผลการตรวจสอบความถูกต้อง

ของวิธีเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด ซึ่งพบว่ากราฟมาตรฐานมีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.47 และ 15.00 μg ต่อ ml และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9996 ความเที่ยงเมื่อทดสอบวัคซีนในวันเดียวกันหกรั้งของปริมาณแอนติเจนทั้งหมดและปริมาณแอนติเจนอิสระได้ค่าร้อยละเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 0.55 และ 1.90 ความเที่ยงเมื่อทดสอบวัคซีนต่างวันกันหกรั้ง ปริมาณแอนติเจนทั้งหมดและปริมาณแอนติเจนอิสระได้ค่าร้อยละเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 3.71 และ 6.83 วิธีมีความแม่นยำสามารถตรวจวัดสารมาตรฐานที่ใส่ในวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นได้ค่าร้อยละการคืนกลับของปริมาณแอนติเจนทั้งหมดอยู่ระหว่าง 81.01 และ 116.05 และค่าร้อยละการคืนกลับปริมาณแอนติเจนอิสระอยู่ระหว่าง 80.78 และ 114.25 มีขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณที่ 0.15 และ 0.46 μg ต่อ ml นอกจากนี้วิธีมีความจำเพาะคือไม่มีการรบกวนจากสารอื่นและสามารถแยกสารที่สนใจออกจากสารอื่น ๆ ได้ และมีความทนเมื่อมีการเปลี่ยนนักวิเคราะห์ จากผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีแสดงให้เห็นว่าสามารถนำวิธีดังกล่าวมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับตรวจคุณภาพวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่น ซีโรไทป์ ซี ได้ อีกทั้งในปัจจุบันส่วนใหญ่ได้ใช้วิธี HPAEC-PAD ในการตรวจวัดปริมาณแอนติเจน⁸⁻⁹

ดังนั้นวิธี HPAEC-PAD ที่พัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการ และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีนี้ จึงตอบโจทย์การนำไปใช้ได้ดี นอกจากใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจน ซีโรไทป์ ซี ของ

วัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นแล้ว หน่วยงานยังสามารถนำไปเป็นแนวทางปรับใช้เพื่อการพัฒนาวิธีตรวจหาปริมาณแอนติเจนของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นในซีโรไทป์อื่น และวัคซีนโพลีแซคคาไรด์ชนิดอื่นเพื่อการควบคุมคุณภาพ เช่น วัคซีนไข้ไทฟอยด์¹² วัคซีนฮิบ¹³⁻¹⁴ ได้ จึงเป็นการเพิ่มศักยภาพของห้องปฏิบัติการภาครัฐในการคุ้มครองผู้บริโภคด้านวัคซีนให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

สรุปผล

สถานะที่แนะนำของงานวิจัยนี้มีความเหมาะสม และได้ทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี HPAEC-PAD ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจน ซีโรไทป์ ซี ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นแล้วพบว่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานในทุกหัวข้อ แสดงว่าวิธี HPAEC-PAD มีความเหมาะสม และเป็นหนึ่งในวิธีที่แนะนำในการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจน ซีโรไทป์ ซี ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่น ซึ่งจะทำให้ผู้บริโภคได้รับวัคซีนที่มีคุณภาพ มีปริมาณแอนติเจนตรงตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์และมาตรฐานสากลที่สามารถป้องกันโรคได้

ข้อเสนอแนะ

ปัจจุบันวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นที่มีจำหน่ายในประเทศไทยมีองค์ประกอบของแอนติเจนจากเชื้อ *N. meningitidis* จำนวน 4 ซีโรกรุ๊ป คือ A, C, Y และ W135 และเพื่อให้ผู้ได้รับวัคซีนมีความมั่นใจในคุณภาพ จึงมีความจำเป็นต้องตรวจสอบคุณภาพวัคซีนให้มีความปลอดภัย

และมีประสิทธิภาพในการป้องกันโรค รายการวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจนหรือความแรง เป็นพารามิเตอร์หนึ่งที่มีความสำคัญในการตรวจสอบคุณภาพวัคซีน เพื่อยืนยันว่าวัคซีนมีปริมาณแอนติเจนตรงตามที่ระบุในทะเบียนตำรับยาชีววัตถุ

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจนของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นในครั้งนี้ได้ทำการพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีเฉพาะซีโรไทป์ ซี เทานั้น และเมื่อนำไปตรวจวิเคราะห์ในวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นยี่ห้ออื่นต้องดำเนินการทวนสอบความเหมาะสมของวิธีในหัวข้อความแม่นยำเพิ่มเติม การเก็บรักษาสารมาตรฐานต้องเก็บรักษาในอุณหภูมิที่กำหนดไว้และแบ่งสาร (aliquot) ใส่หลอดทดลอง ปริมาตรให้เพียงพอสำหรับการนำมาใช้ครั้งเดียวแล้วทิ้งเพื่อลดการแช่แข็งละลายหลายครั้ง (freeze-thaw cycle) นอกจากนี้การทดสอบในแต่ละครั้งควรเตรียมสารเคมีใหม่ทุกครั้ง ทั้งนี้องค์ความรู้ที่ได้สามารถพัฒนาต่อยอดพัฒนาวิธีในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจนของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นในซีโรไทป์อื่นและวัคซีนโพลีแซคคาไรด์ชนิดอื่นได้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ที่มอบทุนสนับสนุนการพัฒนาภายใต้โครงการพัฒนานวัตกรรมควบคุมคุณภาพวัคซีนแบคทีเรียชนิดโพลีแซคคาไรด์ และสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในการสนับสนุนการดำเนินงานในทุกด้าน

เอกสารอ้างอิง

1. กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. ตำราวัคซีนและการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรค: วัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่น. กรุงเทพฯ: เวิร์คพรีนซ์; 2562. หน้า 227-241.
2. Centers for Disease Control and Prevention. Meningococcal disease [Internet]. 2024 [cited 2023 Aug 21]. Available from: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2024/infections-diseases/meningococcal-disease>
3. World Health Organization. Annex 2 Recommendations for the production and control of meningococcal group C conjugate vaccines. In: Technical Report Series No. 924, Geneva; WHO; 2004.
4. Rohrer JS. Vaccine quality ensured by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. SLAS Technology. 2019 [cited 2023 Aug 21];25(4):320-8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31771418/> doi: 10.1177/2472630319890309. Epub 2019 Nov 26. PMID: 31771418
5. National Institute for Biological Standards and Control. 1st International standard for meningococcal serogroup C polysaccharide [Internet]. NIBSC; 2021 [cited 2023 Nov 13]. Available from: <https://nibsc.org/documents/ifu/08-214.pdf>

6. Cook MC, Bliu A, Kunkel JP. Quantitation of serogroups in multivalent polysaccharide-based meningococcal vaccines: optimization of hydrolysis conditions and chromatographic methods. *Vaccine*. 2013 [cited 2023 Nov 7]; 12;31(36):3702–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23764533/> doi: 10.1016/j.vaccine.2013.05.098. Epub 2013 Jun 10. PMID: 23764533
7. 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 [cited 2024 Jan 9];70:53-8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33518432/> doi: 10.1016/j.biologicals.2021.01.001. Epub 2021 Jan 29. PMID: 33518432.
8. 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 [cited 2024 Jan 9];41(4):261-8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23665303/> doi: 10.1016/j.biologicals.2013.03.003. Epub 2013 May 9. PMID: 23665303
9. 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 [cited 2024 Jan 8];86(11):5383-90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24810004/> doi: 10.1021/ac5003933. Epub 2014 May 20. PMID: 24810004
10. 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; 2005. p.1-17.
11. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว: คุณลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์ การหาและการประเมิน การยอมรับ. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549 หน้า 39-86.
12. Giannelli C, E.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 [cited 2023 Oct 12];139:143-7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28282600/> doi: 10.1016/

- j.jpba.2017.02.042. Epub 2017 Feb 24. PMID: 28282600
13. Bardotti A, Ravenscroft N, Ricci S, Ascenzi SD, Guar-nieri V, Averani G, et.al. Quantitative determination of saccharide in Haemophilus influenzae type b glycocon-jugate vaccines, alone and in combination with DPT, by use of high-performance anion-exchange chromatography with pulsed ampero metric detection. Vaccine. 2000 [cited 2024 Jan 16];18(19):1982-93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10706959/> doi: 10.1016/s0264-410x(99)00535-6. PMID: 10706959
14. 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 perfor mance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis 2016 [cited 2024 Jan 16];36: 1804-9. Available from: <https://www.ingentaconnect.com/content/jpa/cjpa/2016/00000036/00000010/art00014>