

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ปริมาณแอนติเจนรวมและปริมาณแอนติเจนอิสระ ในวัคซีนป้องกันโรคไขก้างหลังแอ่น (Meningococcal vaccine) ซีโรไทป์ เอ โดยวิธี High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulse Amperometric Detection (HPAEC-PAD)

กัสม่า บุญมาก ชลดา เพ็ชรไทย ญัฐินี แซ่ฉั่ว อภิชัย ศุภสารสาทร และ สายวรุฬ จตุรจิตตินันท์
สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ วัคซีนป้องกันโรคไขก้างหลังแอ่น ผลิตจากส่วนโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อแบคทีเรีย *Neisseria meningitidis* การตรวจหาปริมาณแอนติเจนเป็นการวิเคราะห์ที่สำคัญในการควบคุมคุณภาพวัคซีน เพื่อให้มั่นใจว่ามีปริมาณที่เหมาะสมในการป้องกันโรค จึงได้ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี HPAEC-PAD โดยใช้คอลัมน์ชนิดแลกเปลี่ยนไอออนลบ อุณหภูมิคอลัมน์ 20 องศาเซลเซียส สารละลายตัวพาเป็น 44 mM NaOH with 280 mM NaOAc อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาณที่ฉีด 20 ไมโครลิตร ตรวจวัดด้วยเครื่องชนิด Pulse Amperometric (PAD) ผลการศึกษาพบว่ากราฟสารมาตรฐานมีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.47 ถึง 15.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.9983 ความเที่ยงเมื่อทดสอบในวันเดียวกันได้ค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของปริมาณแอนติเจนรวมและปริมาณแอนติเจนอิสระ เท่ากับ 0.22 และ 3.61 ทดสอบต่างวันกันได้ค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของปริมาณแอนติเจนรวมและปริมาณแอนติเจนอิสระ เท่ากับ 1.31 และ 2.93 ตามลำดับ เมื่อเปลี่ยนนักวิเคราะห์กับเครื่องมือในการวิเคราะห์ไม่มีผลต่อการวิเคราะห์ วิธีมีความแม่นยำสามารถตรวจวัดสารมาตรฐานที่ใส่ในวัคซีนป้องกันโรคไขก้างหลังแอ่นได้ ค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ระหว่าง 82.09 ถึง 104.87 แสดงว่าวิธีมีความจำเพาะและสามารถวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจนในวัคซีนได้ตั้งแต่ 0.97 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สรุปได้ว่าวิธี HPAEC-PAD มีความแม่นยำ ความเที่ยง น่าเชื่อถือสามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานได้เพื่อผู้บริโภครับวัคซีนป้องกันโรคไขก้างหลังแอ่นที่มีคุณภาพและเป็นไปตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์

คำสำคัญ: การวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจน ซีโรไทป์ เอ, วัคซีนป้องกันโรคไขก้างหลังแอ่น, การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี, HPAEC-PAD

Corresponding author E-mail: Katsama.b@dmsc.mail.go.th

Received: 25 August 2025

Revised: 3 April 2026

Accepted: 7 April 2026

บทนำ

โรคไขกาทหลังแอ่น (Meningococcal Disease) เกิดจากแบคทีเรียทำให้เกิดเยื่อหุ้มสมองอักเสบและการติดเชื้อในกระแสเลือด แม้จะพบไม่บ่อยในประเทศไทย แต่หากติดเชื้อจะมีอัตราการเสียชีวิตสูงหรือทำให้พิการได้ โดยเชื้อนี้เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ทรงกลม อยู่รวมกันเป็นคู่คล้ายเมล็ดถั่ว ติดต่อกันจากคนสู่คนผ่านการหายใจ เอละอองเสมหะ น้ำมูก หรือน้ำลายของผู้ป่วยเข้าไป หรือสัมผัสสิ่งคัดหลั่งแล้วนำมาสัมผัส ตา จมูก ปาก มักระบาดในพื้นที่แออัด ผู้ติดเชื้อมักมีไข้สูง ปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน คอแข็ง ชัก หรือมีผื่นและจุดเลือดออกใต้ผิวหนัง^(1,2) เชื้อ *Neisseria meningitidis* (*N. Meningitidis*) จำแนกตามโพลีแซคคาไรด์แคปซูล มีทั้งหมด 13 ซีโรไทป์ ซึ่งซีโรไทป์ที่สามารถก่อโรคในคนมี 6 ซีโรไทป์ ได้แก่ ซีโรไทป์ A, B, C, W, X และ Y การป้องกันโรคที่มีประสิทธิภาพสูงสุด คือ การฉีดวัคซีนเพื่อสร้างภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะผู้ที่มีความเสี่ยงสูง เช่น ผู้ที่ต้องเดินทางไปยังประเทศที่มีการระบาด ควรได้รับวัคซีนป้องกันโรคไขกาทหลังแอ่นอย่างน้อย 7–10 วันก่อนการเดินทาง^(1,2)

วัคซีนป้องกันโรคไขกาทหลังแอ่น ผลิตมาจากส่วนของโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อแบคทีเรีย *N. meningitidis* โดยวัคซีนป้องกันโรคไขกาทหลังแอ่นมี 2 ชนิด ได้แก่ ชนิดโพลีแซคคาไรด์ที่ไม่มีการเชื่อมกับโปรตีนพาหะ (Non-conjugate polysaccharide) จะกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันแบบตอบสนองต่อแอนติเจนชนิด T-cell independent ทำให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีได้ในระยะสั้น แต่ไม่สามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันระยะยาวหรือการสร้าง immunological memory ได้ และมีประสิทธิภาพต่ำในเด็กอายุต่ำกว่า 2 ปี ส่วนชนิดโพลีแซคคาไรด์ที่มีการเชื่อมกับโปรตีนพาหะ (Conjugate polysaccharide) มีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบ T-cell dependent ทำให้ร่างกายสามารถสร้างแอนติบอดีได้อย่างมีประสิทธิภาพและยาวนาน รวมทั้งสามารถกระตุ้นการสร้าง immunological memory ส่งผลให้เกิดภูมิคุ้มกันระยะยาวและตอบสนองได้ดีเมื่อได้รับวัคซีนกระตุ้น⁽³⁾ ปัจจุบันวัคซีนป้องกันโรคไขกาทหลังแอ่นที่จำหน่ายในประเทศไทยเป็นชนิด

โพลีแซคคาไรด์ที่มีการเชื่อมกับโปรตีนพาหะ โดยมีส่วนประกอบแอนติเจนของเชื้อ *N. meningitidis* จำนวน 4 ซีโรไทป์ คือ A, C, Y และ W-135 และเพื่อให้ผู้รับวัคซีนมีความมั่นใจในคุณภาพ ความปลอดภัย และประสิทธิภาพในการป้องกันโรคตามมาตรฐาน จึงจำเป็นต้องมีการตรวจสอบคุณภาพของวัคซีน เพื่อยืนยันว่าวัคซีนมีปริมาณแอนติเจนตรงตามที่ระบุไว้ในทะเบียนตำรับยาชีววัตถุ ซึ่งในการตรวจวิเคราะห์คุณภาพของวัคซีนจะทำการตรวจวิเคราะห์ทั้งทางด้านชีวภาพ กายภาพ และด้านเคมี โดยรายการวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจนเป็นพารามิเตอร์หนึ่งที่มีความสำคัญในการตรวจวิเคราะห์คุณภาพวัคซีนด้านชีวภาพ⁽⁴⁾

ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจนหรือความแรงในวัคซีนแบคทีเรียชนิดโพลีแซคคาไรด์ องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้แนะนำไว้หลายวิธี เช่น colorimetric method, immunological method และ chromatographic method เป็นต้น⁽⁴⁾ ซึ่งบางวิธียังมีข้อจำกัดสำหรับห้องปฏิบัติการภาครัฐ โดยมีความจำเป็นต้องใช้สารจากผู้ผลิตจึงไม่เป็นที่นิยม สำหรับวิธี High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulse Amperometric Detection (HPAEC-PAD) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรต โอลิโกแซคคาไรด์ และโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งเป็นวิธีที่มีความถูกต้อง มีความแม่นยำสูง⁽⁵⁾ และมีความจำเป็นต้องใช้สารจากผู้ผลิตจึงเหมาะสมนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการ ซึ่งบริษัทผู้ผลิตวัคซีนส่วนใหญ่ใช้วิธี HPAEC-PAD ในการตรวจวิเคราะห์ โดยวิธีนี้อาศัยหลักการแยกสารด้วยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุภายใต้สภาวะที่เป็นด่างสูง ทำให้น้ำตาลเกิดการแตกตัวและมีประจุลบ ซึ่งสามารถถูกแยกออกจากกันโดยใช้ anion-exchange column หลังจากการแยกสารแล้วจะทำการตรวจวัดด้วยเทคนิค Pulsed Amperometric Detection ซึ่งเป็นการตรวจวัดทางไฟฟ้าเคมี โดยน้ำตาลจะถูกออกซิไดซ์ที่ผิวอิเล็กโทรดและก่อให้เกิดกระแสไฟฟ้าที่แปรผันตรงกับความเข้มข้นของสาร คำนวณหาปริมาณของสารโดยอ่านค่าจากกราฟมาตรฐานที่เตรียมจากสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ⁽⁵⁾

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและปรับปรุงแนวทางการทดสอบ โดยประยุกต์จากวิธีตรวจหาปริมาณแอนติเจนในวัคซีนโพลีแซคคาไรด์ชนิดอื่นๆ เช่น วัคซีนไข้ไทฟอยด์ วัคซีนฮิบ และวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่น ซีโรไทป์ ซี โดยวิธี HPAEC-PAD ทั้งนี้ การศึกษาวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจนรวมและปริมาณแอนติเจนอิสระในวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่น ซีโรไทป์ เอ ได้มีการปรับเปลี่ยนในส่วนของการเตรียมตัวอย่าง ชนิดและสัดส่วนของสารตัวพา สภาวะที่ใช้ในการทดสอบให้เหมาะสมกับสารที่สนใจในการศึกษา พร้อมดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี เพื่อพัฒนาเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการด้านการควบคุมคุณภาพวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นในประเทศไทย ซึ่งจะช่วยให้ผู้บริโภคได้รับวัคซีนที่มีคุณภาพเป็นไปตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์และมาตรฐานสากล

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี: น้ำ HPLC grade (Ligand scientific, Thailand), methanol HPLC grade (J.T. Baker, USA), 2M NaOH solution (Fisher Scientific, USA), NaOAc analytical grade (Fisher Scientific, USA), NaCl, Trifluoroacetic acid (TFA), HCl, KCl, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 ; analytical grade (Merck, Germany), Sodium deoxycholate (DOC) analytical grade (Sigma-Aldrich, USA)

สารมาตรฐาน: WHO International standard for Meningococcal serogroup A polysaccharide code 13/246 (National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), UK)⁽⁶⁾ ใช้สำหรับการสร้างกราฟมาตรฐาน และ D-Glucosamine-6-phosphate CAS no. 3616-42-0 (Sigma-Aldrich, USA)⁽⁷⁾ ใช้เป็นสารควบคุม (Internal Control)

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง HPLC รุ่น LC-20ADXR (Nexera, Shimadzu, Japan), Software LabSolution

(Shimadzu, Japan), Pulse Amperometric Detector รุ่น ED743 (GL Sciences, Japan) โดยใช้คอลัมน์แยกสารชนิด CarboPac PA1 analytical column Particle size 10 μm ขนาด 4 x 250 มิลลิเมตร (Dionex, USA) และ CarboPac PA1 guard column (Dionex, USA) และเครื่อง HPLC รุ่น Agilent 1260 Infinity II Bio-inert LC system และ Software OpenLab ChemStation (Agilent, USA) Pulse amperometric detector รุ่น DECADE II, Elite, Lite and ROXY (Antec Scientific, Netherlands)

เครื่องชั่งความละเอียดทศนิยม 2 และ 5 ตำแหน่ง (Sartorius, Germany), ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส (Sanyo, Japan), ตู้แช่แข็งควบคุมอุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส (Haier, China), ตู้อบความร้อน (Mettler, 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

การเตรียมสารละลายมาตรฐานเข้มข้นจาก WHO International standard for Meningococcal serogroup A polysaccharide (MenA) code 13/246 (NIBSC): โดยเติมน้ำที่กำจัดแก๊สแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในขวดที่บรรจุสารมาตรฐาน เขย่าเบาๆ ให้ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกันอย่างน้อย 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นแบ่งบรรจุลงใน cryotube ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยจะได้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเข้มข้นเท่ากับ 0.845 ± 0.043 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร⁽⁶⁾

การเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับใช้งาน โดยเจือจางสารละลายมาตรฐานเข้มข้น ปริมาตร 591.5

ไมโครลิตร ด้วยน้ำที่กำจัดแก๊สลงในขวดวัดปริมาตร
ขนาด 5 มิลลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำที่กำจัดแก๊สให้
ครบ 5 มิลลิตร แล้วผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้น
แบ่งบรรจุลงใน cryotube ปริมาตร 2 มิลลิตร เก็บที่
อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยจะได้ความเข้มข้นของ
สารละลายมาตรฐานสำหรับใช้งาน เท่ากับ 100 ไมโครกรัม
ต่อมิลลิตร

การเตรียมกราฟมาตรฐาน โดยเจือจางสารละลาย
มาตรฐานสำหรับใช้งานด้วยน้ำที่กำจัดแก๊สแล้วให้มี
ความเข้มข้น เท่ากับ 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.50 และ
15.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ในหลอดทดลอง ผสม
จนเป็นเนื้อเดียวกัน กรองด้วยแผ่นกรอง Nylon ขนาด
0.22 ไมครอน

การเตรียมสารควบคุมเข้มข้น โดยชั่ง D-
Glucosamine-6-phosphate (D-GlcN-6-P)⁽⁷⁾
น้ำหนัก 0.01 กรัม ลงในขวดปรับปริมาตร ขนาด 10
มิลลิตร แล้วเติมน้ำที่กำจัดแก๊สแล้วละลายให้เข้ากัน และ
ปรับปริมาตรด้วยน้ำดังกล่าวให้ครบ 10 มิลลิตร ผสมจน
เป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งมีความเข้มข้น 1 mg/mL จากนั้น
แบ่งบรรจุลงใน cryotube ปริมาตร 2 มิลลิตร เก็บที่
อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารควบคุมสำหรับใช้งาน โดยเจือจาง
สารควบคุมความเข้มข้น 1 mg/mL ปริมาตร 10 ไมโครลิตร
ลงในขวด ขนาด 2 มิลลิตร ที่บรรจุน้ำที่กำจัดแก๊ส
แล้วปริมาตร 990 ไมโครลิตร ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน
กรองด้วยแผ่นกรอง Nylon ขนาด 0.22 ไมครอน
โดยจะได้ความเข้มข้นของสารควบคุมสำหรับใช้งาน
เท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร

ตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่าง: วัคซีนป้องกันโรคไขก้างหลังแอ่น
(Meningococcal conjugate vaccine serotype A,
C, W-135, Y) จำนวน 1 รุ่นการผลิต ของบริษัท ซาโนฟี
ปาสเตอร์ จำกัด สหรัฐอเมริกา

การเตรียมตัวอย่าง: นำวัคซีนรุ่นการผลิตเดียวกัน
เทรวมกันให้มีปริมาตรอย่างน้อย 2.5 มิลลิตร ผสมให้
เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการเขย่าประมาณ 30 วินาที

การเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ
แอนติเจนรวม โดยดูดวัคซีนที่เตรียมไว้ ปริมาตร 1
มิลลิตร ลงในหลอดแก้วทนกรดเพื่อนำไปย่อยด้วย
กรดต่อไป

การเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ
แอนติเจนอิสระ โดยดูดวัคซีนที่เตรียมไว้ ปริมาตร 900
ไมโครลิตร ลงใน microtube จากนั้นเติม 10X PBS
ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน
เติม 1% DOC ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เป็น
เนื้อเดียวกัน นำไปแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที
จากนั้นเติม 1N HCl ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้
เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที
ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันอีกครั้งก่อนนำไปปั่นเหวี่ยง
ที่ความเร็ว 2,300 g อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา
30 นาที แล้วดูดส่วนใส ปริมาตร 1 มิลลิตร ลงในหลอดแก้ว
ทนกรด เพื่อนำไปย่อยด้วยกรดต่อไป

การย่อยตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานด้วยกรด
(acid hydrolysis) เป็นขั้นตอนสลายโพลิเมอร์
(depolymerization) โดยดูดตัวอย่างเพื่อใช้ในการ
ทดสอบหาปริมาณแอนติเจนทั้งหมด ตัวอย่างเพื่อใช้ในการ
ทดสอบหาปริมาณแอนติเจนอิสระ Blank (water)
สารละลายสำหรับกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ
และสารควบคุมใส่ในหลอดแก้วทนกรด ปริมาตร
หลอดละ 1 มิลลิตร แล้วเติม 4M TFA⁽⁵⁾ ปริมาตร
หลอดละ 100 ไมโครลิตร นำไปอบในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ
100±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นทำให้
เย็นที่อุณหภูมิ 5±3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10±2 นาที
แล้วเติมสารละลาย 1M NaOH ปริมาตรหลอดละ 500
ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปกรองด้วย
แผ่นกรอง Nylon ขนาด 0.22 ไมครอน ก่อนวิเคราะห์
ด้วยเครื่อง HPLC

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีตรวจวิเคราะห์

ทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี
HPAEC-PAD ในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ
แอนติเจนรวมและปริมาณแอนติเจนอิสระ ซีโรไทป์ เอ
เพื่อให้ได้ช่วงความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่จะนำมาใช้

เป็นกราฟมาตรฐานที่มีความเป็นเส้นตรง และทดสอบกับตัวอย่างที่ระดับการเจือจางเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ ซึ่งสภาวะที่ทำการศึกษา ประกอบด้วย ขั้นตอนการย่อยด้วยกรดเพื่อสลายสายโพลีแซคคาไรด์ก่อนนำมาผ่านคอลัมน์วิเคราะห์ โดยเลือกความเข้มข้นกรด ปริมาตรที่ใช้ อุณหภูมิ และเวลาที่สามารถย่อยโพลีแซคคาไรด์ในตัวอย่างได้ดีและใช้ระยะเวลาในการย่อยเหมาะสม รวมทั้งสามารถแยกพีค (peak) ได้ดี การเลือกช่วงความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ซึ่งช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมต้องครอบคลุมกับปริมาณแอนติเจนในตัวอย่างและมีความเป็นเส้นตรง

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจนรวมและปริมาณแอนติเจนอิสระ ในวัคซีนป้องกันโรคไขก้างหลังแอ่น ซีโรไทป์ เอ โดยวิธี HPAEC-PAD

นำสารละลายสำหรับกราฟมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ สารควบคุม และสารละลายตัวอย่างที่ย่อยด้วยกรดแล้วข้างต้น มาตรวจวัดด้วยเครื่อง HPAEC-PAD ที่ใช้สภาวะการทำงาน ประกอบด้วย คอลัมน์แยกสารชนิด CarboPac PA1 analytical column Particle size 10 μm ขนาด 4×250 มิลลิเมตร และ CarboPac PA1 guard column ตั้งอุณหภูมิของ column chamber และอุณหภูมิของ auto sampler chamber ไว้ที่ 20 และ 4 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ใช้ working และ reference electrode ชนิด Gold และ AgCl ตามลำดับ ปริมาตรการฉีดตัวอย่างต่อครั้ง เท่ากับ 20 ไมโครลิตร ใช้ 44 mM NaOH with 280 mM NaOAc เป็นสารตัวพา ปรับอัตราการไหล 1.0 มิลลิเมตรต่อนาที ตัวตรวจวัดสัญญาณชนิด Pulse amperometric ตั้งระยะเวลาการทำงานแต่ละรอบ 10 นาที คำนวณค่าปริมาณแอนติเจนโดยอ่านจากกราฟมาตรฐานที่เครื่องคำนวณ

การทดสอบความพร้อมของระบบ (System Suitability)

ฉีดสารควบคุมความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร โดยฉีดซ้ำ จำนวน 6 ซ้ำ คำนวณส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เกณฑ์การยอมรับต้องมีส่วนเบี่ยงเบน

มาตรฐานสัมพัทธ์ไม่เกินร้อยละ 2 และผลวิเคราะห์ที่ได้จะต้องมีปริมาณแอนติเจนอยู่ในระหว่างร้อยละ 80 ถึง 120 ของปริมาณแอนติเจนตาม Theoretical value

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์⁽⁸⁻¹⁰⁾

การทดสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity)

เปรียบเทียบ retention time ของพีคจากโครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน สารควบคุมสำหรับใช้งาน ตัวอย่างสำหรับทดสอบ Blank (water) และตัวอย่างวัคซีนชนิดอื่น ตัวอย่างสำหรับทดสอบจะต้องปรากฏพีคจากโครมาโทแกรมที่ retention time ใกล้เคียงกับพีคจากโครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน และสารควบคุมสำหรับใช้งาน และสารละลาย Blank (water) และตัวอย่างวัคซีนชนิดอื่นจะต้องไม่ปรากฏพีครบกวนการวิเคราะห์

ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานและช่วงค่าของการวิเคราะห์ (Linearity and Range)

วิเคราะห์สารละลายสำหรับกราฟมาตรฐานที่มีความเข้มข้น เท่ากับ 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.50 และ 15.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ด้วยเครื่อง HPAEC-PAD ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำต่อรอบการวิเคราะห์ สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานและพื้นที่ใต้กราฟ คำนวณสมการถดถอยเชิงเส้น (Linear Regression Equation) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Coefficient of Correlation; r) เกณฑ์การยอมรับค่า r ต้องไม่น้อยกว่า 0.995

การทดสอบความเที่ยง (Precision)

ทำการศึกษาใน 4 หัวข้อ คือ 1) การทำซ้ำในวันเดียวกัน โดยใช้ตัวอย่างเดียวกัน วิเคราะห์ จำนวน 6 ซ้ำ ในวันเดียวกัน คำนวณค่าเฉลี่ยปริมาณแอนติเจน ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เกณฑ์การยอมรับต้องมีส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ไม่เกินร้อยละ 5 2) การวิเคราะห์ต่างวัน โดยใช้ตัวอย่างเดียวกัน นำมาเตรียมและวิเคราะห์ 3 การทดสอบต่างวันกัน วิเคราะห์วันละ 3 ซ้ำ คำนวณค่าเฉลี่ยปริมาณแอนติเจน ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เกณฑ์การยอมรับต้อง

มีส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ไม่เกินร้อยละ 10 และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างวันด้วยสถิติ One-Way ANOVA 3) การวิเคราะห์เมื่อเปลี่ยนนักวิเคราะห์ โดยใช้ตัวอย่างวัคซีนเดียวกัน ซึ่งเตรียมตัวอย่างใหม่ในแต่ละวัน ทำการวิเคราะห์ต่างวัน จำนวน 3 วัน วันละ 3 ซ้ำ โดยนักวิเคราะห์ 2 คน และ 4) การวิเคราะห์โดยเปลี่ยนเครื่องมือสำหรับวิเคราะห์โดยใช้ตัวอย่างเดียวกัน วิเคราะห์จำนวน 3 ครั้ง คำนวณค่าเฉลี่ย ปริมาณแอนติเจน ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยสถิติ Independent t-test ของการวิเคราะห์เมื่อเปลี่ยนนักวิเคราะห์และเปลี่ยนเครื่องมือสำหรับวิเคราะห์

การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

เติมสารละลายมาตรฐาน จำนวน 3 ความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงกราฟมาตรฐานลงในตัวอย่าง โดยปริมาณแอนติเจนรวมทำการทดสอบที่ความเข้มข้น 3.75, 7.50 และ 15.00 ส่วนปริมาณแอนติเจนอิสระทำการทดสอบที่ความเข้มข้น 0.94, 3.75 และ 7.50 วิเคราะห์ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ คำนวณร้อยละการคืนกลับ เกณฑ์การยอมรับต้องมีร้อยละการคืนกลับอยู่ระหว่างร้อยละ 80 ถึง 120

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ)

LOD คำนวณจากค่าความเข้มข้นสารที่ให้ค่าสัญญาณเป็น 3 เท่าของสัญญาณรบกวน และ LOQ คำนวณจากค่าความเข้มข้นของสารที่ให้ค่าสัญญาณเป็น 10 เท่าของสัญญาณรบกวน

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Estimation of Measurement Uncertainty)

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์นั้น ดำเนินการตามข้อกำหนดของมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 โดยคำนึงถึงแหล่งที่มาของความไม่แน่นอนที่อาจส่งผลต่อผลการวิเคราะห์ เมื่อนำค่าความไม่แน่นอนจากแต่ละแหล่งมารวมจะได้ค่าความไม่แน่นอนรวม และต่อมาถูกคำนวณเป็นค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

การคำนวณหาปริมาณแอนติเจนรวมและปริมาณแอนติเจนอิสระ

การหาปริมาณแอนติเจนรวมและปริมาณแอนติเจนอิสระ โดยอ่านค่าจากกราฟมาตรฐานที่เตรียมจากสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ นำค่าที่ได้มาคำนวณโดยใช้สมการ ดังนี้

1) การหาปริมาณแอนติเจนรวม ($\mu\text{g/mL}$)

$$\text{ปริมาณแอนติเจนรวม} = \text{MenA conc.} \times \text{dilution factor}$$

โดย MenA conc. คือ ปริมาณแอนติเจนรวมของ Meningococcal vaccine serotype A

2) การหาปริมาณแอนติเจนอิสระ (% of Free PS)

$$\% \text{ แอนติเจนอิสระ} = (\text{Free MenA} / \text{Total MenA}) \times 100$$

โดย Free MenA คือ ปริมาณแอนติเจนอิสระของ Meningococcal vaccine serotype A

Total MenA คือ ปริมาณแอนติเจนรวมของ Meningococcal vaccine serotype A

ผล

จากการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจนรวมและปริมาณแอนติเจนอิสระ ในวัคซีนป้องกันโรคไขก้างหลังแอ่น ซีโรไทป์ เอ

โดยวิธี HPAEC-PAD ได้สภาวะที่เหมาะสมในการตั้งค่าดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจนรวมและปริมาณแอนติเจนอิสระ ในวัคซีนป้องกันโรคไขก้างหลังแอ่น ซีโรไทป์ เอ โดยวิธี HPAEC-PAD

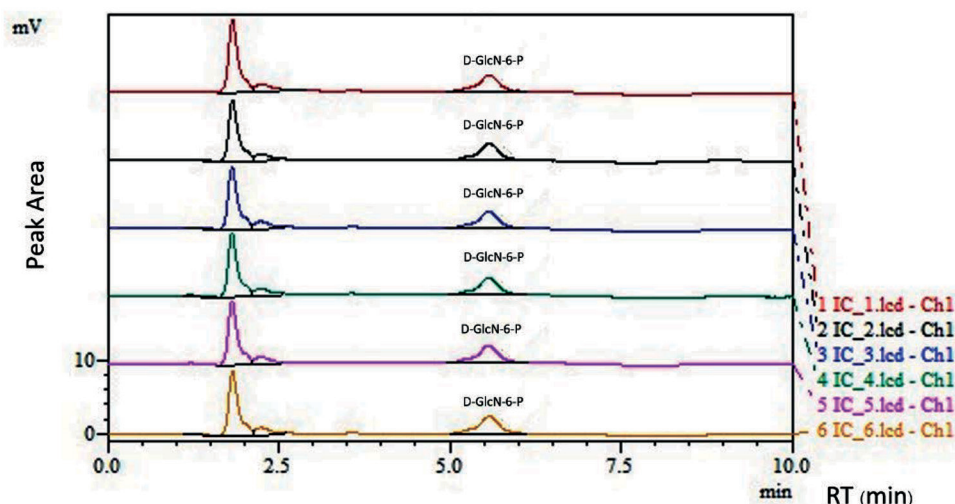
Parameter	Setting
Column and guard column	CarboPac PA1
Column Temperature	20°C
Detection	Pulsed Amperometric detection
Gold Electrode	Not disposable
Reference Electrode	AgCl
Elution conditions/eluent	Isocratic: 44 mM NaOH with 280 mM NaOAc
Autosampler temperature	4°C
Injection Volume	20 µL
Flow rate	1.0 mL/min
Run time	10 min
Software for data acquisition and processing	LabSolution

การทดสอบความพร้อมของระบบ (system suitability) เมื่อทำการฉีดสารควบคุมความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยฉีดซ้ำ จำนวน 6 ซ้ำ คำนวณส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ พบว่าปริมาณแอนติเจนของสารควบคุมมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 9.29 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 0.73 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือ ปริมาณ

แอนติเจนมีค่าอยู่ในระหว่างร้อยละ 80 ถึง 120 ของปริมาณแอนติเจนตาม Theoretical value (8-12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ไม่เกินร้อยละ 2 ดังแสดงในตารางที่ 2 และลักษณะโครมาโทแกรมของสารควบคุม โดยสารที่ทำการทดสอบจะปรากฏพีคที่ Retention Time (RT) ที่ 5.1 ดังแสดงในภาพที่ 1

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความพร้อมของระบบเมื่อวิเคราะห์สารควบคุมความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 6 ซ้ำ

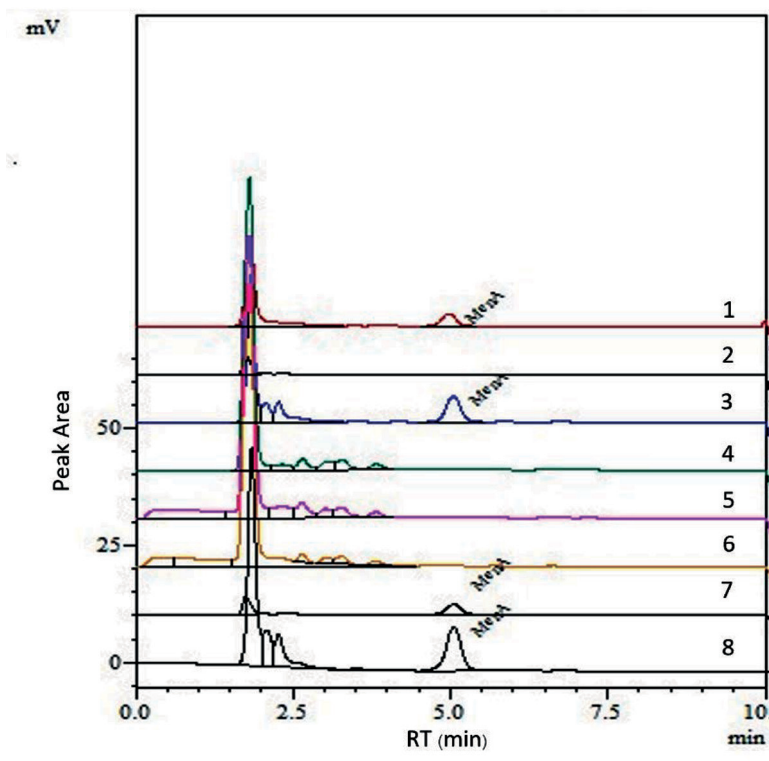
ครั้งที่	ปริมาณแอนติเจน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	9.38
2	9.33
3	9.28
4	9.32
5	9.18
6	9.27
ค่าเฉลี่ย	9.29
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.07
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์	0.73



ภาพที่ 1 โครมาโทแกรมของสารควบคุมความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 6 ซ้ำ

การทดสอบความจำเพาะของวิธีแสดงให้เห็น
จาก retention time (RT) ของพีคจากโครมาโทแกรม
โดยสารละลาย Blank และตัวอย่างวัคซีนชนิดอื่น
ไม่ปรากฏพีคบริเวณการวิเคราะห์ ส่วนตัวอย่างสำหรับ

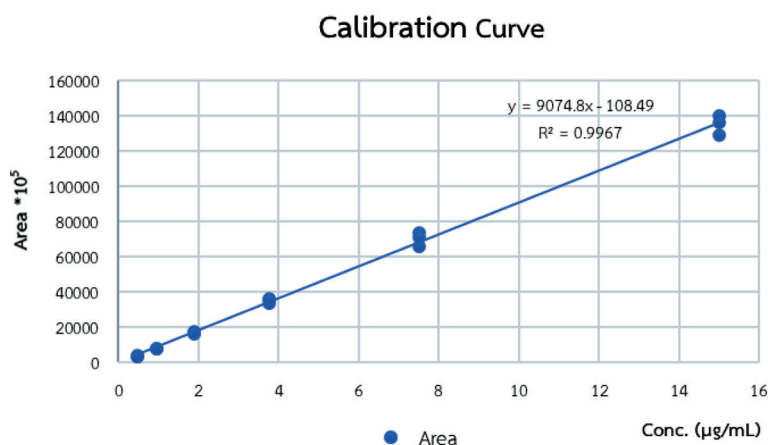
ทดสอบ ปรากฏพีคที่ RT ใกล้เคียงกับพีคสารมาตรฐาน
Meningococcal serogroup A polysaccharide
(MenA) และสารควบคุมสำหรับใช้งาน ดังแสดง
ในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน, สารละลาย, Blank, สารควบคุม, ตัวอย่างทดสอบ, ตัวอย่างวัคซีนอื่น
ประกอบด้วย 1) แอนติเจนอิสระ (ตัวอย่างสำหรับทดสอบ), 2) สารละลาย Blank, 3) สารควบคุม
D-Glucosamine-6-phosphate (D-GlcN-6-P), 4-6) ตัวอย่าง Pneumococcal Vaccines, 7)
สารมาตรฐาน MenA WHO 1st International Standard และ 8) แอนติเจนรวม (ตัวอย่างสำหรับ
ทดสอบ)

ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานและช่วงค่าของการวิเคราะห์ เมื่อนำค่าพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นระหว่าง 0.47 ถึง 15.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร มาสร้างกราฟจะได้กราฟ

ที่มีความเป็นเส้นตรง มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9983 โดยมีสมการถดถอยเชิงเส้น $y = 9074.8x - 108.49$ ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟ (แกน Y) กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน

การทดสอบความเที่ยง เมื่อทำซ้ำในวันเดียวกัน ใช้ตัวอย่างเดียวกัน วิเคราะห์ จำนวน 6 ซ้ำ ในวันเดียวกัน พบว่าค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของปริมาณ

แอนติเจนรวมที่คำนวณได้ เท่ากับ 0.22 และปริมาณแอนติเจนอิสระที่คำนวณได้ เท่ากับ 3.61 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ คือ ไม่เกินร้อยละ 5 ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการศึกษาความเที่ยง เมื่อทำซ้ำในวันเดียวกัน ใช้ตัวอย่างเดียวกัน วิเคราะห์ จำนวน 6 ซ้ำ ในวันเดียวกัน

ครั้งที่	ปริมาณแอนติเจน (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)	
	ปริมาณแอนติเจนรวม	ปริมาณแอนติเจนอิสระ
1	16.47	3.72
2	16.41	3.49
3	16.49	3.52
4	16.41	3.63
5	16.44	3.84
6	16.41	3.64
ค่าเฉลี่ย	16.44	3.64
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.04	0.13
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์	0.22	3.61

การทดสอบความเที่ยงเมื่อใช้ตัวอย่างวัคซีนเดียวกัน ซึ่งเตรียมตัวอย่างใหม่ในแต่ละวัน ทำการวิเคราะห์ต่างวัน จำนวน 3 วัน วิเคราะห์วันละ 3 ซ้ำ โดยนักวิเคราะห์คนเดียวกัน พบว่าค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

สัมพัทธ์ของปริมาณแอนติเจนรวมที่คำนวณได้ เท่ากับ 1.31 และปริมาณแอนติเจนอิสระที่คำนวณได้ เท่ากับ 2.93 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ไม่เกินร้อยละ 10 ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการศึกษาความเที่ยงเมื่อใช้ตัวอย่างวัคซีนเดียวกัน ซึ่งเตรียมตัวอย่างใหม่ในแต่ละวัน ทำการวิเคราะห์ต่างวันจำนวน 3 วัน วิเคราะห์วันละ 3 ซ้ำ

วันที่	ปริมาณแอนติเจนรวม (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)				ปริมาณแอนติเจนอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)			
	ฉีดครั้งที่ 1	ฉีดครั้งที่ 2	ฉีดครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	ฉีดครั้งที่ 1	ฉีดครั้งที่ 2	ฉีดครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
1	17.57	17.11	16.94	17.21	3.33	3.34	3.57	3.41
2	17.27	17.21	17.18	17.22	3.27	3.49	3.52	3.43
3	17.30	17.44	16.85	17.20	3.35	3.39	3.39	3.38
	ค่าเฉลี่ย			17.21	ค่าเฉลี่ย			3.41
	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน			0.23	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน			0.10
	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์			1.31	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์			2.93

เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างวัน โดยใช้สถิติ One-Way ANOVA พบว่าปริมาณแอนติเจนรวมมีค่า F ที่คำนวณได้เท่ากับ 0.005 ซึ่งน้อยกว่า F crit เท่ากับ 5.143 ที่ค่า p -value เท่ากับ 0.995 ซึ่งมากกว่า 0.05 ($p > 0.05$) และปริมาณแอนติเจนอิสระมีค่า F ที่คำนวณได้เท่ากับ 0.178 ซึ่งน้อยกว่า F crit เท่ากับ 5.143 ที่ค่า p -value เท่ากับ 0.841 ซึ่งมากกว่า 0.05 ($p > 0.05$) แสดงว่าผลการทดสอบของการวิเคราะห์ระหว่างวันไม่แตกต่างกัน

การทดสอบความเที่ยง เมื่อเปลี่ยนนักวิเคราะห์ โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง จำนวน 3 ซ้ำ พบว่าปริมาณแอนติเจนรวมที่ตรวจโดยนักวิเคราะห์คนที่ 1 มีค่าเฉลี่ย 16.85 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนนักวิเคราะห์คนที่ 2 มีค่าเฉลี่ย 17.36 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณแอนติเจนอิสระที่ตรวจโดยนักวิเคราะห์คนที่ 1 มีค่าเฉลี่ย 3.51 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนนักวิเคราะห์คนที่ 2 มีค่าเฉลี่ย 3.28 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการศึกษาความเที่ยงของวิธีเมื่อเปลี่ยนนักวิเคราะห์ โดยใช้ตัวอย่างวัคซีนเดียวกัน เตรียมตัวอย่างใหม่ในแต่ละวัน ทำการวิเคราะห์ต่างวัน จำนวน 3 วัน วันละ 3 ซ้ำ

ครั้งที่	ปริมาณแอนติเจนรวม (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		ปริมาณแอนติเจนอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	นักวิเคราะห์คนที่ 1	นักวิเคราะห์คนที่ 2	นักวิเคราะห์คนที่ 1	นักวิเคราะห์คนที่ 2
1	16.86	17.21	3.42	3.21
2	17.22	17.20	3.42	3.25
3	16.46	17.67	3.70	3.37
Mean	16.85	17.36	3.51	3.28
SD	0.38	0.27	0.16	0.09
%RSD	2.26	1.54	4.65	2.65

เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างนักวิเคราะห์ 2 คน โดยใช้สถิติ Independent Sample T-test พบว่าปริมาณแอนติเจนรวมมีค่า t ที่คำนวณได้ (t stat) เท่ากับ 1.909 ซึ่งน้อยกว่า t จากตาราง (t critical two-tail) เท่ากับ 2.776 ที่ p -value เท่ากับ 0.129

และปริมาณแอนติเจนอิสระมีค่า t ที่คำนวณได้ (t stat) เท่ากับ 2.233 ซึ่งน้อยกว่า t จากตาราง (t critical two-tail) เท่ากับ 2.776 ที่ p -value เท่ากับ 0.089 แสดงว่าผลการทดสอบของนักวิเคราะห์ 2 คน ไม่มีความแตกต่างกัน

การทดสอบความเที่ยง เมื่อเปลี่ยนเครื่อง HPAEC-PAD ที่ใช้ในการวิเคราะห์จาก Shimadzu เป็น Agilent โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง จำนวน 3 ซ้ำ พบว่า ปริมาณแอนติเจนรวมที่ตรวจโดยเครื่อง HPAEC-PAD จาก Shimadzu มีค่าเฉลี่ย 18.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนที่ตรวจโดยเครื่อง HPAEC-PAD จาก Agilent

มีค่าเฉลี่ย 17.76 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณ แอนติเจนอิสระที่ตรวจโดยเครื่อง HPAEC-PAD จาก Shimadzu มีค่าเฉลี่ย 3.51 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร ส่วนที่ตรวจโดยเครื่อง HPAEC-PAD จาก Agilent มีค่าเฉลี่ย 3.57 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดง ในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการศึกษาความเที่ยงของวิธี เมื่อเปลี่ยนเครื่อง HPAEC-PAD จาก Shimadzu เป็นเครื่อง Agilent โดยใช้ตัวอย่างเดียวกัน วิเคราะห์ จำนวน 3 ครั้ง

ครั้งที่	ปริมาณแอนติเจนรวม (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		ปริมาณแอนติเจนอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	Shimadzu	Agilent	Shimadzu	Agilent
1	18.20	18.75	3.42	3.64
2	17.93	16.54	3.42	3.35
3	18.09	17.99	3.70	3.72
Mean	18.07	17.76	3.51	3.57
SD	0.14	1.12	0.16	0.19
%RSD	0.75	6.33	4.65	5.42

เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างเครื่อง HPAEC-PAD ของ Shimadzu และของ Agilent โดยใช้สถิติ Independent Sample T-test พบว่าปริมาณ แอนติเจนรวมมีค่า t ที่คำนวณได้ (t stat) เท่ากับ 0.541 ซึ่งมีค่าน้อยกว่า t จากตาราง (t critical two-tail) เท่ากับ 4.306 ที่ p-value เท่ากับ 0.642 และปริมาณ แอนติเจนอิสระมีค่า t ที่คำนวณได้ (t stat) เท่ากับ 0.621 ซึ่งมีค่าน้อยกว่า t จากตาราง (t critical two-tail) เท่ากับ 4.303 ที่ p-value เท่ากับ 0.598 แสดงว่า

ผลการทดสอบของเครื่อง HPAEC-PAD ทั้งของ Shimadzu และของ Agilent ไม่มีความแตกต่างกัน

การทดสอบความแม่นยำ เมื่อเติมสารละลาย มาตรฐาน จำนวน 3 ความเข้มข้น ที่อยู่ในช่วงกราฟ มาตรฐานลงในตัวอย่าง วิเคราะห์ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ พบว่าค่าร้อยละการคืนกลับของปริมาณแอนติเจนรวม อยู่ระหว่าง 86.32 ถึง 96.93 และค่าร้อยละการคืนกลับ ของปริมาณแอนติเจนอิสระอยู่ระหว่าง 82.09 ถึง 104.87 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ คือ ต้องมีค่าร้อยละการคืนกลับ อยู่ระหว่างร้อยละ 80 ถึง 120 ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ร้อยละการคืนกลับของการเติมสารมาตรฐานในตัวอย่าง จำนวน 3 ความเข้มข้น

ครั้งที่	ร้อยละการคืนกลับของสารมาตรฐาน					
	ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงในวัคซีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)					
	ปริมาณแอนติเจนรวม			ปริมาณแอนติเจนอิสระ		
	3.75	7.50	15.00	0.94	3.75	7.50
1	86.32	89.73	94.24	90.24	94.98	91.76
2	88.71	96.93	93.78	104.87	91.34	96.95
3	93.04	90.67	96.89	82.09	92.45	100.56

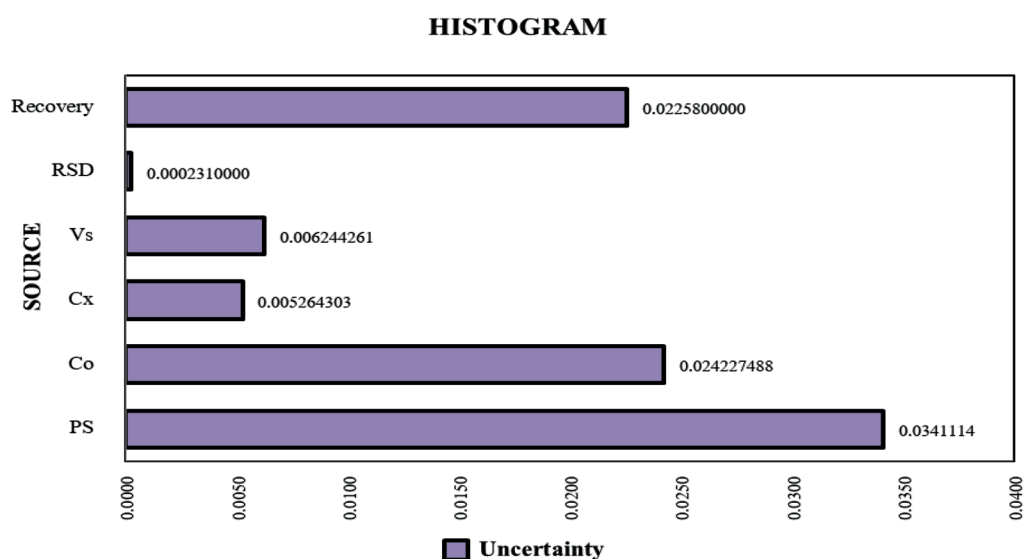
ขีดจำกัดของการตรวจพบอยู่ที่ระดับ 0.32 ซึ่งคำนวณจากค่าความเข้มข้นสารที่ให้ค่าสัญญาณ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และขีดจำกัดของการวัดเชิง เป็น 3 และ 10 เท่าของสัญญาณรบกวนของกราฟ ปริมาณอยู่ที่ระดับ 0.97 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาตรฐาน จำนวน 6 ครั้ง ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงค่า LOD และ LOQ ที่คำนวณจากค่าความเข้มข้นสารที่ให้ค่าสัญญาณ (S/N) เป็น 3 และ 10 เท่า ของสัญญาณรบกวนของกราฟมาตรฐาน

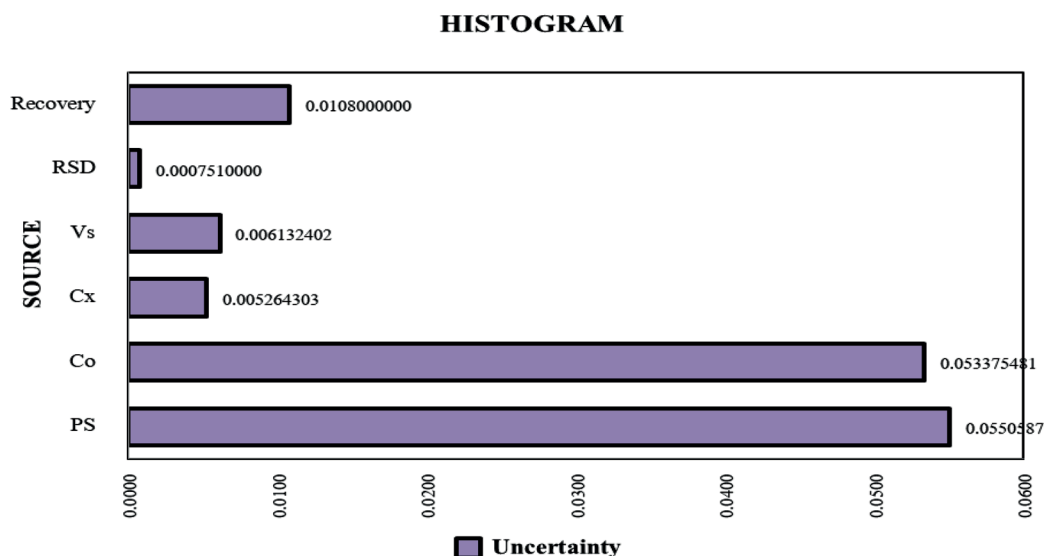
ครั้งที่	LOD (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	LOQ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	0.35	1.05
2	0.25	0.77
3	0.38	1.16
4	0.34	1.03
5	0.23	0.70
6	0.36	1.08
ค่าเฉลี่ย	0.32	0.97

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์ เป็นการประเมินระดับของความไม่แน่นอนหรือความคลาดเคลื่อนที่อาจเกิดขึ้นได้จากผลการวิเคราะห์ โดยพิจารณาแหล่งความไม่แน่นอนที่จะมีผลกระทบต่อ การตรวจวิเคราะห์ ได้แก่ ความไม่แน่นอนจากความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน การสอบเทียบเครื่องมือ ความเข้มข้นของตัวอย่างที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน ความเที่ยงของวิธีเมื่อทำซ้ำ และค่าร้อยละการคืนกลับของ

การทดสอบความถูกต้องของวิธี นำมาคำนวณค่าความไม่แน่นอนรวม (combined uncertainty; uc) และค่าความไม่แน่นอนขยาย (expanded uncertainty; U) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ค่า coverage factor (k) เท่ากับ 2 ได้ค่า U ของปริมาณแอนติเจนรวม เท่ากับ 1.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ U ของปริมาณแอนติเจนอิสระ เท่ากับ 0.40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 4 และ 5



ภาพที่ 4 องค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจนรวมที่ตรวจโดยวิธี HPAEC-PAD



ภาพที่ 5 องค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจนอิสระที่ตรวจโดยวิธี HPAEC-PAD

หมายเหตุ: Recovery = ค่าร้อยละการคืนกลับของการทดสอบความถูกต้องของวิธี

RSD = ความเที่ยงของวิธีเมื่อทำซ้ำ

Vs = ปริมาตรของตัวอย่าง

Cx = ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน

Co = ความเข้มข้นของตัวอย่างที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน

PS = ความเข้มข้นของตัวอย่างที่รายงาน

วิจารณ์

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจนรวมและปริมาณแอนติเจนอิสระ ในวัคซีนป้องกันโรคไขกาทหลังแอ่น (Meningococcal vaccine) ซีโรไทป์ เอ เป็นรายการตรวจวิเคราะห์ที่สำคัญรายการหนึ่งที่ระบุในข้อแนะนำขององค์การอนามัยโลก⁽⁴⁾ ซึ่งแสดงถึงความแรงของวัคซีนในการป้องกันโรค ในกระบวนการผลิตวัคซีน ผู้ผลิตจะต้องควบคุมการผลิตให้มีปริมาณแอนติเจนให้คงที่สม่ำเสมอในทุกขั้นตอนการผลิตตามที่ระบุไว้ในตำราอีกทั้งห้องปฏิบัติการภาครัฐที่มีหน้าที่ในการควบคุมคุณภาพ จะต้องใช้วิธีตรวจวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง มีความแม่นยำและเชื่อถือได้⁽⁴⁾ วิธี HPAEC-PAD เป็นวิธีที่บริษัทผู้ผลิตส่วนใหญ่นำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ และเป็นหนึ่งในหลายวิธีที่องค์การอนามัยโลกแนะนำเนื่องจาก HPAEC มีความสามารถในการแยกคาร์โบไฮเดรตได้ ทั้งโมโนแซคคาไรด์ โอลิโกแซคคาไรด์ และโพลีแซคคาไรด์ตามลักษณะโครงสร้าง ซึ่งสามารถ

แยกได้โดยใช้ highly efficient anion-exchange column ส่วน PAD เป็น electrochemical detector ใช้ในการแยกสารที่มีส่วนประกอบของ electroactive groups โดยอาศัยกลไก electrocatalytic oxidation ดังนั้น HPAEC-PAD จึงเป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้ในการตรวจหาคาร์โบไฮเดรต และเป็นวิธีที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์สารจำพวกโอลิโกแซคคาไรด์และโพลีแซคคาไรด์^(5,11,12)

การศึกษาค้นคว้านี้ได้ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี HPAEC-PAD เพื่อตรวจหาปริมาณแอนติเจน ในวัคซีนป้องกันโรคไขกาทหลังแอ่น ซีโรไทป์ เอ เพื่อให้มั่นใจว่าผลการวิเคราะห์ที่ตรวจได้ด้วยวิธีดังกล่าวมีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ ในการตรวจวิเคราะห์จะทำกรย่อยแอนติเจนด้วยกรด (acid hydrolysis) ซึ่งเป็นขั้นตอนสลายโพลิเมอร์ (depolymerization) โดยการเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์จะมีการเติมกรดเพื่อช่วยในการย่อยโพลีแซคคาไรด์ แล้วนำไปสลายพันธะโดยการให้ความร้อนและเวลาตามสภาวะ

ที่เหมาะสม เพื่อให้เปลี่ยนเป็นโมโนแซคคาไรด์ จากนั้นทำการเติม NaOH ลงไปเพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย HPAEC-PAD ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการแยกสารที่มีประจุและขนาดโมเลกุลที่ต่างกันได้อย่างดี^(13,14) โดยการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์นี้จะใช้คอลัมน์แยกสารชนิด CarboPac PA1 analytical column Particle size 10 μm ขนาด $4 \times 250 \text{ mm}$ และ CarboPac PA1 guard column ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ปริมาตรการฉีดต่อครั้ง เท่ากับ 20 ไมโครลิตร ใช้ 44 mM NaOH with 280 mM NaOAc เป็นสารตัวพา ปรับอัตราการไหล 1.0 มิลลิเมตรต่อนาที ตัวตรวจวัดสัญญาณชนิด PAD ตั้งระยะเวลาการทำงานแต่ละรอบ 10 นาที ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด พบว่ากราฟมาตรฐานมีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.47 ถึง 15.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.9983 ความเที่ยงเมื่อทดสอบวัคซีนในวันเดียวกันของปริมาณแอนติเจนรวมและปริมาณแอนติเจนอิสระได้ค่าร้อยละเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ 0.22 และ 3.61 ความเที่ยงเมื่อทดสอบวัคซีนต่างวันกันของปริมาณแอนติเจนรวมและปริมาณแอนติเจนอิสระได้ค่าร้อยละเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ 1.31 และ 2.93 วิธีมีความแม่นยำสามารถตรวจวัดสารมาตรฐานที่ใส่ในวัคซีนป้องกันโรคไขกาทหลังแอ่น ได้ค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ระหว่าง 82.09 ถึง 104.87 วิธีมีความจำเพาะคือไม่มีการรบกวนจากสารอื่นและสามารถแยกสารที่สนใจออกจากสารอื่นๆ ได้ สามารถวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจนในวัคซีนได้ตั้งแต่ 0.97 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร นอกจากนี้ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีพบว่าการเปลี่ยนนักวิเคราะห์กับเครื่องมือในการวิเคราะห์ไม่มีผลต่อการวิเคราะห์ ซึ่งผลการทดสอบและเกณฑ์ที่อ้างอิงสอดคล้องกับการวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจน ซีโรไทป์ ซี ในวัคซีนป้องกันโรคไขกาทหลังแอ่นที่ได้ทำการศึกษาไว้ ดังนั้นวิธี HPAEC-PAD ที่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี สามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจสอบคุณภาพปริมาณแอนติเจนรวมและปริมาณแอนติเจนอิสระ ในวัคซีนป้องกันโรคไขกาทหลังแอ่น ซีโรไทป์ เอ ได้ดี นอกจากนี้

หน่วยงานยังสามารถนำไปเป็นแนวทางปรับใช้เพื่อการพัฒนาวิธีตรวจหาปริมาณแอนติเจนในวัคซีนโพลีแซคคาไรด์ชนิดอื่น เช่น วัคซีนไข้ไทฟอยด์⁽¹⁵⁾ และวัคซีนอีบี^(16,17) เพื่อการควบคุมคุณภาพได้ จึงเป็นการเพิ่มศักยภาพของห้องปฏิบัติการภาครัฐในการคุ้มครองผู้บริโภคด้านวัคซีนให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

สรุป

จากงานวิจัยในครั้งนี้ ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี HPAEC-PAD ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจนรวมและปริมาณแอนติเจนอิสระ ในวัคซีนป้องกันโรคไขกาทหลังแอ่น (Meningococcal vaccine) ซีโรไทป์ เอ พบว่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานในทุกหัวข้อ แสดงว่าวิธี HPAEC-PAD มีความเหมาะสม มีความแม่นยำ ความเที่ยง และเชื่อถือได้ สามารถนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพภาครัฐสำหรับตรวจสอบคุณภาพวัคซีนป้องกันโรคไขกาทหลังแอ่นที่มี ซีโรไทป์ เอ เป็นส่วนประกอบ เพื่อทำให้ผู้บริโภคได้รับวัคซีนที่มีคุณภาพเป็นไปตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์และมาตรฐานสากลในการป้องกันโรคได้ อีกทั้งวิธีนี้สามารถพัฒนาต่อยอดในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจนของวัคซีนป้องกันโรคไขกาทหลังแอ่นที่มีซีโรไทป์ชนิดอื่นต่อไปได้

การเปิดเผยการใช้ปัญญาประดิษฐ์

มีการใช้โปรแกรม ChatGPT (OpenAI, USA) ในการตรวจสอบคำและไวยากรณ์ภาษาอังกฤษในการเขียน ABSTRACT

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ บริษัท ชานีพี ปาสเตอร์ จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างวัคซีนสำหรับนำมาใช้ในการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี และสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในการสนับสนุนการดำเนินงานในทุกด้านจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. ตำราวัคซีนและการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรค: วัคซีนป้องกันโรคไขกัฟหลังแอ่น. กรุงเทพฯ: บริษัท เวิร์คพรีนธ์ จำกัด; 2562. หน้า 227-241.
2. สุภาภรณ์ ชุมพล, สุกัลยาณี ไชยมี, อภิชัย ศุภสารสาทร, สุภาพร ภูมิอมร. การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไขกัฟหลังแอ่นชนิดคอนจูเกตด้วยเทคนิค Indirect ELISA. ว อาหารและยา. [ออนไลน์]. 2567; [สืบค้น 8 ส.ค. 2568]; 31(1): 79-97. เข้าถึงได้จาก: URL: <https://he01.tci-thaijo.org/index.php/fdajournal/article/view/270694/182116>.
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Meningococcal disease. [online]. 2025; [cited 2025 Aug 2]. Available from: URL: <https://www.cdc.gov/yellow-book/hcp/travel-associated-infections-diseases/meningococcal-disease.html>.
4. World Health Organization. Annex 2 Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of group A meningococcal conjugate vaccines. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Technical report series No. 962, Geneva: WHO; 2011. p. 117-171.
5. Rohrer JS. Vaccine quality ensured by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. SLAS Technol 2019; 25(4): 320-8.
6. National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC). Meningococcal serogroup A polysaccharide (1st WHO International Standard). [online]. 2025; [cited 2025 Aug 4]. Available from: URL: https://nibsc.org/products/brm_product_catalogue/detail_page.aspx?catid=13%2f246.
7. Sigma-Aldrich. Adonitol. [online]. 2025; [cited 2025 Aug 4]. Available from: URL: <https://www.sigmaaldrich.com/TH/th/product/sigma/g5509>.
8. International Council for Harmonisation (ICH). Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). [online]. 2005; [cited 2025 Aug 5]; [17 screens]. Available from: URL: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>.
9. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. คุณลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์การหาและการประเมิน การยอมรับ. ใน: แนวปฏิบัติ การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมี โดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549. หน้า 39-86.
10. ชลดา เพ็ชรไทย, กัสมา บุญมาก, อภิชัย ศุภสารสาทร, สุภาพร ภูมิอมร. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี High performance anion exchange chromatography with pulse amperometric detection (HPAEC-PAD) ในการวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจน ซีโรไทป์ ซี ในวัคซีนป้องกันโรคไขกัฟหลังแอ่น. ว อาหารและยา. [ออนไลน์]. 2567; [สืบค้น 8 ส.ค. 2568]; 31(2): 46-63. เข้าถึงได้จาก: URL: <https://he01.tci-thaijo.org/index.php/fdajournal/article/view/273122/183639>.
11. 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.
12. 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.
13. Cook MC, Bliu A, Kunkel JP. Quantitation of serogroups in multivalent polysaccharide-based meningococcal vaccines: optimisation of hydrolysis conditions and chromatographic methods. Vaccine 2013; 31(36): 3702-11.
14. 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. *Anal Chem.* [serial online]. 2014; [cited 2025 Aug 9]; 86(11): 5383-90. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24810004/>.
15. 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.* [serial online] 2017; [cited 2024 Aug 17]; 139: 143-7. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28282600/>.
16. 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.* [serial online]. 2017; [cited 2024 Aug 17]; 2017: 44-68. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29017702/>.
17. Bardotti A, Ravenscroft N, Ricci S, Ascenzi SD, 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: 1982-93.

Method Validation for Determination of Total and Free Antigen Content in Meningococcal Vaccine Serotype A by HPAEC-PAD

**Katsama Boonmak, Chonlada Petthai, Nattinee Saechua, Apichai Supasansatorn,
and Saiwarul Jadoonkittinan**

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

ABSTRACT The meningococcal vaccine is produced from the polysaccharide component of *Neisseria meningitidis*. Quantitative analysis of meningococcal vaccine serotype A antigen is an important test for quality control of vaccine to ensure adequate antigen content for effective immunization. This study was validated a method using High-Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAEC-PAD). The method involved an anion-exchange column at 20°C, a mobile phase consisting of 44 mM NaOH and 280 mM sodium acetate, a flow rate of 1.0 mL/min, and an injection volume of 20 µL. Detection was performed using a PAD detector. The standard curve was linearity in the concentration range of 0.47 to 15.00 µg/mL, with a correlation coefficient (R) of 0.9983. The precision on the same day showed the relative standard deviation (RSD), was 0.22% for total antigen and 3.61% for free antigen, while intermediate precision showed the relative standard deviation of 1.31% and 2.93%, respectively. Furthermore, variations in analysts and instruments had no significant impact on the results, indicating the method's robustness and reproducibility. The accuracy of measuring the standard substances used in the meningococcal vaccine was investigated, and the results showed that the percentage of recovery between 82.09% to 104.87%, indicating good accuracy. The method demonstrated specificity and was capable of quantifying antigen concentrations as low as 0.97 µg/mL in the vaccine. In conclusion, the HPAEC-PAD method is accurate, precise, and reliable, and is suitable for use as a standard method in the laboratory to ensure the production of high-quality meningococcal vaccines that meet standards.

Keywords: Serotype A antigen content, Meningococcal vaccine, Method validation, HPAEC-PAD