วารสารวิชาการสาธารณสุข
ปีที่ 28 ฉบับที่ 3 พฤษภาคม - มิถุนายน 2562

Journal of Health Science
Vol. 28 No. 3, May - June 2019

นิพนธ์ต้นฉบับ ***Original article***

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulse Amperometric Detection ในการวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจนของวัคซีนป้องกันโรคจากเชื้อ *Haemophilus influenzae* Type B

วิริยามาตย์ เจริญคุณธรรม,วท.ม. (ชีวเคมี)
ชลดา เพชรไทย, วท.บ. (จุลชีววิทยา)
กนกพร ฤทธิธรรม วท.บ. (ชีววิทยา)
สุภาพร ภูมิอมร วท.ด (ไวรัสวิทยา)
สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

วันรับ:	16 ต.ค. 2561
วันแก้ไข:	22 ก.พ. 2562
วันตอบรับ:	27 ก.พ. 2562

บทคัดย่อ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของวิธี HPAEC-PAD ในการตรวจหาปริมาณแอนติเจนของวัคซีนป้องกัน *Haemophilus influenzae* type B โดยมีการเตรียมความพร้อมทางห้องปฏิบัติการ ตรวจหาสภาวะที่เหมาะสมและตรวจสอบความถูกต้องเหมาะสมของวิธีในรายการ ความเป็นเส้นตรงและช่วงค่าของการวิเคราะห์ ความจำเพาะของวิธี ความเที่ยง ความแม่น ขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ ผลการศึกษาพบว่า กราฟสารมาตรฐาน ribitol มีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.15 และ 10.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีสมการถดถอยเชิงเส้น Y= 2E+06X+5946 และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 1 การทดสอบ F-test ได้ค่ามากกว่าค่า F-critical ที่ alpha 0.05 วิธีมีความจำเพาะสามารถแยกพีคของสาร ribitol ที่ retention time เฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน 16.45±0.30 นาที ร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 1.83 ความเที่ยงเมื่อทดสอบวัคซีนในวันเดียวกันหกครั้งและต่างวันกันหกครั้งได้ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของปริมาณแอนติเจนเท่ากับ 16.94±0.40 และ 16.95±0.79 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 2.38 และ 4.66 ตามลำดับ วิธีมีความแม่นสามารถตรวจวัดสาร ribitol ที่ใส่ในวัคซีนรวมคอตีบ บาดทะยัก ไอกรนทั้งตัว ตับอักเสบบี และฮิบ ทั้ง 3 ยี่ห้อ ได้ค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ระหว่าง 83.56 และ 97.14 มีขีดจำกัดของการตรวจพบสาร ribitol ที่ 0.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณที่ 0.22 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การตรวจสอบวิธีทุกรายการผ่านเกณฑ์การยอมรับที่ตั้งไว้ จึงสรุปได้ว่าวิธี HPAEC-PAD ที่นำมาศึกษานี้มีความถูกต้อง แม่นยำ เชื่อถือได้ สำหรับการตรวจหาปริมาณแอนติเจนในวัคซีนฮิบ ที่ผสมรวมกับ คอตีบ บาดทะยัก ไอกรน และตับอักเสบบี จึงสามารถนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานเพื่อการควบคุมคุณภาพความแรงของวัคซีนฮิบทางห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพภาครัฐได้ ซึ่งจะทำให้ผู้บริโภคได้ใช้วัคซีนที่มีประสิทธิภาพความแรงตรงตามมาตรฐานของผลิตภัณฑ์และมาตรฐานสากล

คำสำคัญ: เชื้อ *Haemophilus influenzae* type B, แอนติเจน, วัคซีน *Haemophilus influenzae* type B, วิธี HPAEC-PAD

บทนำ

เชื้อ *Haemophilus influenzae* type B หรือที่เรียกสั้น ๆ ว่า เชื้อฮิบนั้น เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative coccobacillus) ที่เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบและปอดอักเสบในเด็กเล็กนอกจากนี้ยังทำให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือด โรคหูชั้นกลางอักเสบ โรคข้ออักเสบ เชื้อนี้อยู่ในระบบทางเดินหายใจของมนุษย์ สามารถแพร่กระจายโดยผ่านทางละอองอากาศและการสัมผัสโดยตรงกับสารคัดหลั่งของทางเดินหายใจ ปัจจุบันมีวัคซีนที่สามารถใช้ป้องกันโรคในเด็กเล็กโดยมีทั้งวัคซีนชนิดเดี่ยวและวัคซีนรวม ซึ่งวัคซีนรวมส่วนใหญ่จะรวมอยู่กับวัคซีนคอตีบ บาดทะยัก ไอกรน ตับอักเสบบี หรือโปลิโอชนิดฉีด ขึ้นอยู่กับชนิดผลิตภัณฑ์ของผู้ผลิต[1-4] หลายประเทศได้บรรจุวัคซีนนี้อยู่ในแผนงานสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคของประเทศ ซึ่งภายในปี พ.ศ. 2560 มีจำนวนถึง 191 ประเทศที่ใช้วัคซีนนี้[5]

สำหรับประเทศไทยจากการศึกษาของกรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ในปี พ.ศ. 2543-2544 พบอุบัติการณ์ของโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบจากเชื้อฮิบ 6.1 รายต่อประชากรเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปีแสนคนต่อปี ซึ่งถือว่าค่อนข้างต่ำ[6] วัคซีนจึงยังไม่บรรจุอยู่ในแผนงานสร้างเสริมภูมิคุ้มกันของประเทศในขณะนั้นด้วยราคาวัคซีนยังสูงอยู่มาก วัคซีนฮิบจึงยังเป็นเพียงวัคซีนทางเลือกของประเทศไทยในการสร้างภูมิคุ้มกันโรคให้กับเด็กเล็ก แต่ปัจจุบันสถานการณ์ได้เปลี่ยนแปลงไปข้อมูลการนำเข้าวัคซีนจากหน่วยงานภาครัฐที่ทำหน้าที่ควบคุมให้การรับรองรุ่นการผลิตวัคซีนก่อนจำหน่าย พบว่ามีแนวโน้มนำเข้าวัคซีนฮิบเพิ่มขึ้นทุกปีโดยเฉพาะในรูปของวัคซีนรวม และในปี พ.ศ. 2561 กรมควบคุมโรคมีแผนนำวัคซีนรวม คอตีบ บาดทะยัก ไอกรนทั้งตัว ตับอักเสบบี และฮิบ บรรจุเข้าใช้ในงานสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคของประเทศ[7] จึงส่งผลให้มีจำนวนวัคซีนฮิบในรูปวัคซีนผสมที่นำมาใช้ในประเทศเพิ่มปริมาณขึ้นอย่างมาก และรวมถึงมีแหล่งผลิตมาจากหลากหลายประเทศ ทำให้ห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพภาครัฐต้องทำการตรวจสอบคุณภาพวัคซีนนี้อย่างเข้มงวด ตั้งแต่การขึ้นทะเบียน การควบคุมรุ่นการผลิต และการตรวจสอบกรณีมีปัญหาหลังการใช้ เพื่อการคุ้มครองผู้บริโภคให้ได้รับวัคซีนที่มีคุณภาพและความปลอดภัยตามมาตรฐาน

แม้ที่ผ่านมาห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพภาครัฐของไทยสามารถตรวจสอบคุณภาพและความปลอดภัยของวัคซีนตามรายการที่องค์การอนามัยโลกกำหนด[8] แต่พบว่าการตรวจความแรงหรือปริมาณแอนติเจนของวัคซีนฮิบ ทางห้องปฏิบัติการยังไม่สามารถตรวจได้อย่างมีประสิทธิภาพด้วยมีข้อจำกัดของวิธีกับตัวอย่าง เนื่องจากวัคซีนฮิบมีความหลากหลายของรูปลักษณ์แอนติเจนแม้จะเป็นวัคซีนชนิดเดียวกัน ซึ่งเกิดจากกระบวนการผลิตที่แตกต่างกันของผู้ผลิตแต่ละรายที่พัฒนาผลิตภัณฑ์[9] และผู้ผลิตแต่ละรายก็ใช้วิธีตรวจที่แตกต่างกันจึงเป็นข้อจำกัดประการสำคัญในการพัฒนาวิธีมาตรฐานที่จะนำมาตรวจหาความแรงโดยห้องปฏิบัติการภาครัฐที่ผ่านมาองค์การอนามัยโลกได้ตระหนักถึงปัญหาดังกล่าวและได้ทำการศึกษาและพัฒนาวิธี high performance Anion exchange chromatography with pulse amperometric Detector (HPAEC-PAD) สำหรับนำไปใช้ตรวจปริมาณแอนติเจนของวัคซีนฮิบที่อยู่ในรูปวัคซีนรวมคอตีบ บาดทะยัก ไอกรนทั้งตัว และตับอักเสบบี[10,11] แต่เนื่องจากห้องปฏิบัติการของหน่วยงานยังไม่เคยมีการใช้เทคนิคการตรวจวิเคราะห์แบบ HPAEC-PAD กับผลิตภัณฑ์ใดมาก่อน จึงถือเป็นจุดเริ่มต้นของการพัฒนาเทคนิควิธีใหม่ในห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพวัคซีนภาครัฐของประเทศ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องเหมาะสมของวิธี HPAEC-PAD ในการตรวจปริมาณแอนติเจนของวัคซีนป้องกันโรคจากเชื้อฮิบ เพื่อให้ได้วิธีมาตรฐานที่นำมาใช้ตรวจวิเคราะห์ควบคุมคุณภาพความแรงวัคซีนฮิบของห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพภาครัฐของประเทศไทย ซึ่งจะทำให้ผู้บริโภคได้ใช้วัคซีนที่มีคุณภาพในการป้องกันโรคจากเชื้อฮิบ

วิธีการศึกษา

ขั้นตอนดำเนินการประกอบด้วย การจัดหาและเตรียมความพร้อมของเครื่องมือ วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี สารมาตรฐาน และตัวอย่างวัคซีน ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ แล้วจึงทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีกับตัวอย่างวัคซีน

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี: water HPLC grade; conductivity 18.2 MΩ CAS No. 7732-18-5 ของ Ligand scientific, methanol HPLC grade CAS No. 67-56-1 ของ J.T. Baker, NaH_2PO_4, NaCl, NaOH, HCl; analytical grade ของ Sigma-Aldrich, $H_{25}Na_2O_{16}P$ analytical grade ของ BDH

สารมาตรฐาน: WHO international standard Heamophilus influenzae b polysaccharide poly-ribosyl-ribitol-phosphate (PRP) code 02/208 ของ National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) สหราชอาณาจักร ใช้สำหรับการทดสอบความเหมาะสมของระบบ Adonitol (Ribitol) CAS No. 488-81-3 ของ Sigma-Aldrich ใช้สำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน และใช้เป็นสารควบคุมผลบวก (positive control sample)

การเตรียมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น: ชั่งสารมาตรฐาน ribitol น้ำหนัก 15 มิลลิกรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำที่กำจัดแก๊สแล้วละลายให้เข้ากันและปรับปริมาตรด้วยน้ำดังกล่าวให้ครบ 100 มิลลิลิตร แบ่งสารละลายลงในหลอด cryotube ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20^{o} เซลเซียส

การเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับใช้งาน: เจือจางสารละลายมาตรฐานเข้มข้นด้วยน้ำที่กำจัดแก๊สแล้วก่อนการใช้งาน ให้มีความเข้มข้นของสาร ribitol เท่ากับ 0.15, 0.75, 1.50, 4.50, 7.50 และ 10.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในหลอดทดลองเพื่อใช้สร้างกราฟมาตรฐาน

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

เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์

เครื่อง HPLC รุ่น LC-20AD และ software LC solution ของบริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น Pulse amperometric detector รุ่น ED723 ของบริษัท GL Sciences ประเทศญี่ปุ่น โดยใช้คอลัมป์แยกสารชนิด CarboPac MA1 analytical column ขนาด 4x250 มิลลิเมตร และ CarboPac MA1 guard column ของบริษัท Dionex ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องชั่งความละเอียดทศนิยม 2 และ 5 ตำแหน่ง ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ $2-8^{o}$ เซลเซียส ตู้แช่แข็งควบคุมอุณหภูมิ -20^{o} เซลเซียส ตู้อบความร้อน ตู้ดูดควัน เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมความเย็น เครื่องเขย่าผสม เครื่องดูดสูญญากาศ แผ่นกรอง Nylon ขนาด 0.22 ไมครอน หลอด cryotube ขนาด 2 มิลลิลิตร หลอดแก้วทนกรด (glass microtube with gasket Teflon plug) ขนาด 4 มิลลิลิตร เครื่องแก้ว ไมโครปิเปตขนาด 10-1,000 ไมโครลิตร

ตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่าง: วัคซีนรวม คอตีบ บาดทะยัก ไอกรน ตับอักเสบบี และฮิบ (DTPw-HepB-Hib) ที่ขึ้นทะเบียนในประเทศไทย

การเตรียมตัวอย่าง: นำวัคซีนรุ่นการผลิตเดียวกันมาเทรวมกันให้มีปริมาตรอย่างน้อย 7 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการเขย่าประมาณ 30 วินาที จากนั้นดูดวัคซีนปริมาตร 1 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอด micro tube เพื่อนำไปย่อยด้วยกรดต่อไป

การย่อยตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานด้วยกรด (acid hydrolysis) เป็นขั้นตอนสลายโพลิเมอร์ (depolymerization): ดูดตัวอย่างสารละลายมาตรฐานสำหรับใช้งานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และสารควบคุมผลบวก แบ่งใส่ในหลอดแก้วทนกรด หลอดละ 1 มิลลิลิตร แล้วเติม 6 N HCl ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปอบในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 100±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จาก

นั้นทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 5±3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10±2 นาที แล้วเติมสารละลาย 1 M NaOH ปริมาตรหลอดละ 400 ไมโครลิตร นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5±3 องศาเซลเซียสระหว่างรอการทดสอบด้วย HPAEC-PAD ต่อไป แล้วนำไปกรองด้วยแผ่นกรอง Nylon ขนาด 0.22 ไมครอน ก่อนวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

สำหรับตัวอย่างวัคซีนที่ย่อยแล้วให้เจือจางต่อด้วยสารละลาย 70 mM NaOH ในอัตราส่วน 1:19 เพื่อให้มีปริมาณของสาร PRP อยู่ในช่วงค่ากราฟมาตรฐาน ผสมให้สารละลายเข้ากันด้วย vortex แล้วนำไปกรองด้วยแผ่นกรอง Nylon ขนาด 0.22 ไมครอน ก่อนวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจน(PRP) ด้วยเครื่อง HPAEC-PAD

นำสารละลายมาตรฐานสำหรับใช้งาน สารควบคุมผลบวก และสารละลายตัวอย่างที่ย่อยด้วยกรดแล้วข้างต้นมาตรวจวัดปริมาณสารด้วยเครื่อง HPAEC-PAD ที่ใช้สภาวะการทำงานประกอบด้วยคอลัมป์แยกสารชนิด CarboPac MA1 analytical column ขนาด 4x250 มิลลิเมตร พร้อม CarboPac MA1 guard column ตั้งอุณหภูมิของ column chamber และอุณหภูมิของ auto sampler chamber ไว้ที่ 30 และ 4 องศาเซลเซียสตามลำดับ reference electrode ชนิด AgCl ปริมาตรการฉีดตัวอย่างต่อครั้งเท่ากับ 50 ไมโครลิตร สารตัวพา (eluent): isocratic-580 mM NaOH ปรับอัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที ตัวตรวจวัดสัญญาณชนิด Pulse amperometric detector ตั้งระยะเวลาการทำงานแต่ละรอบ 40 นาที คำนวณค่าปริมาณแอนติเจน PRP โดยอ่านค่าจากกราฟมาตรฐานของ ribitol ที่เครื่องคำนวณให้แล้วนำมาแปลงค่าให้เป็นปริมาณ PRP โดยคูณด้วย dilution factor และ conversion factor ที่มีค่าเท่ากับ 2.42 (conversion factor) คำนวณจากน้ำหนักโมเลกุลของ PRP repeating units: 368.5[12] หารด้วยน้ำหนักโมเลกุลของสาร ribitol: 152.15[13]

การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีตรวจวิเคราะห์

ทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี HPAEC-PAD ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร ribitol เพื่อให้ได้ช่วงความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่จะนำมาใช้เป็น calibration curve ที่มีความเป็นเส้นตรง และการทดสอบกับตัวอย่างหาระดับการเจือจางที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน และช่วงค่าของการวิเคราะห์

วิเคราะห์สารละลายมาตรฐานสำหรับการใช้งานที่มีความเข้มข้นของสาร ribitol เท่ากับ 0.15, 0.75, 1.50, 4.50, 7.50 และ 10.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยเครื่อง HPAEC-PAD ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำต่อรอบการวิเคราะห์ จำนวน 6 การทดสอบที่เป็นอิสระต่อกัน คำนวณสมการถดถอยเชิงเส้น (linear regression equation) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (coefficient of correlation; r) เกณฑ์ยอมรับค่า r ต้องไม่น้อยกว่า 0.995

การทดสอบความจำเพาะของวิธีตรวจวิเคราะห์

ทำการเปรียบเทียบ retention time ของพีคจากโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน ribitol กับตัวอย่างวัคซีน จำนวน 6 การทดสอบ คำนวณค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของ retention time เกณฑ์ยอมรับส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation; RSD) ต้องไม่เกินร้อยละ 5.0

การทดสอบความเที่ยง

ทำการศึกษาใน 2 หัวข้อคือ (1) การทำซ้ำในวันเดียวกัน: ใช้ตัวอย่างวัคซีนเดียวกันจำนวน 6 ขวด ที่นำมาเตรียมแบบอิสระต่อกัน วิเคราะห์ขวดละ 3 ซ้ำ ในวันเดียวกัน และ (2) การวิเคราะห์ต่างวัน: ใช้ตัวอย่างวัคซีนเดียวกัน นำมาเตรียมและวิเคราะห์ 6 การทดสอบต่างวันกัน วิเคราะห์วันละ 3 ซ้ำ คำนวณค่าเฉลี่ย ปริมาณแอนติเจน ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และส่วนเบี่ยงเบน

มาตรฐานสัมพัทธ์ เกณฑ์ยอมรับต้องมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ไม่เกินร้อยละ 5.0

การทดสอบความแม่น

เติมสารละลาย ribitol ที่ทราบค่าลงในวัคซีนแล้วนำไปย่อยด้วยกรด วิเคราะห์หาปริมาณแอนติเจนในวัคซีนที่เติมและไม่ได้เติมสารละลาย ribitol คำนวณค่าร้อยละการคืนกลับ (% recovery) ปริมาณ ribitol เกณฑ์ยอมรับค่าร้อยละการคืนกลับต้องอยู่ในช่วง 80-120

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ)

LOD และ LOQ คำนวณจากค่า slope และ standard deviation of Y intercept ของกราฟมาตรฐาน ribitol จำนวน 6 ค่า ด้วยสมการ LOD = (3xó)/M และ LOQ= (10xó)/M เมื่อ ó = standard deviation of Y intercept, M = mean of slope

ผลการศึกษา

จากการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี HPAEC-PAD ในการตรวจปริมาณ ribitol ได้สภาวะที่เหมาะสมในการตั้งค่าสำหรับใช้งานตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง ประกอบด้วย อุณหภูมิในช่องฉีดสาร และอุณหภูมิของ column ให้ตั้งค่าที่ 4 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ อัตราการไหลของตัวชะ 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อเริ่มการตรวจให้ล้าง column ด้วย 1M NaOH เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วจึงชะต่อด้วย 580 mM NaOH อีก 1ชั่วโมง ปริมาตรการฉีดตัวอย่างครั้งละ 50 ไมโครลิตร ตัวชะ (eluent) ที่ใช้คือ Isocratic-580 mM NaOH โดยตั้งเวลาแต่ละรอบทดสอบไว้ที่ 40 นาที (ตารางที่ 1)

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี HPAEC-PAD

ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน และช่วงค่าของการวิเคราะห์ เมื่อนำค่าพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ribitol ที่ช่วงความเข้มข้นระหว่าง 0.15 และ 10.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาสร้างกราฟ จะได้กราฟที่มีความเป็นเส้นตรงทั้ง 6 การทดสอบที่ทำแบบอิสระต่างวันกัน ดังแสดงในภาพที่ 1 ซึ่งทุกการทดสอบมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 1.00 โดยมีสมการถดถอยเชิงเส้นจากค่าเฉลี่ยของการทดสอบ 6 ครั้งคือ Y=2E+06X+5946 และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 1.00

การทดสอบค่าความเป็นเส้นตรงด้วย F-test ได้ค่า

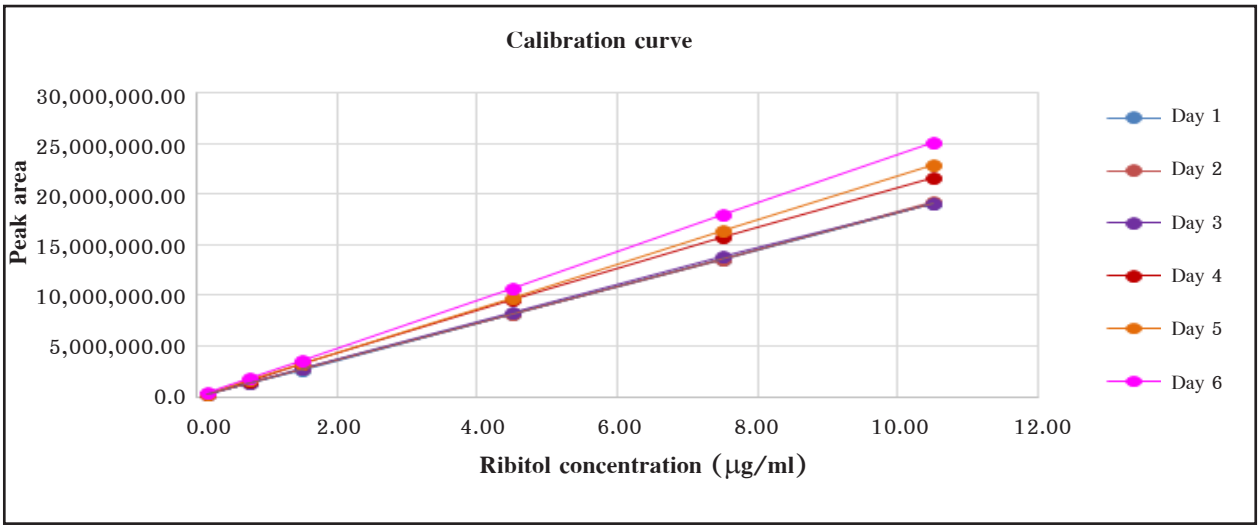
ตารางที่ 1 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สาร ribitol โดยวิธี HPAEC-PAD

Parameter	Setting
Column and guard column	CarboPac MA1
Column Temperature	30°C
Detection	Pulsed Amperometric detection
Reference Electrode	AgCl
Elution conditions/eluent	Isocratic – 580 mM NaOH
Wash-regeneration condition/ equilibration	Before starting an analysis, washing with 1M NaOH for 1h, equilibration with 580 mM NaOH for 1h
Auto sampler temperature	4°C
Injection Volume	50 µL
Flow rate	0.4 mL/min
Run time	40 min
Software for data acquisition and processing	LC solution

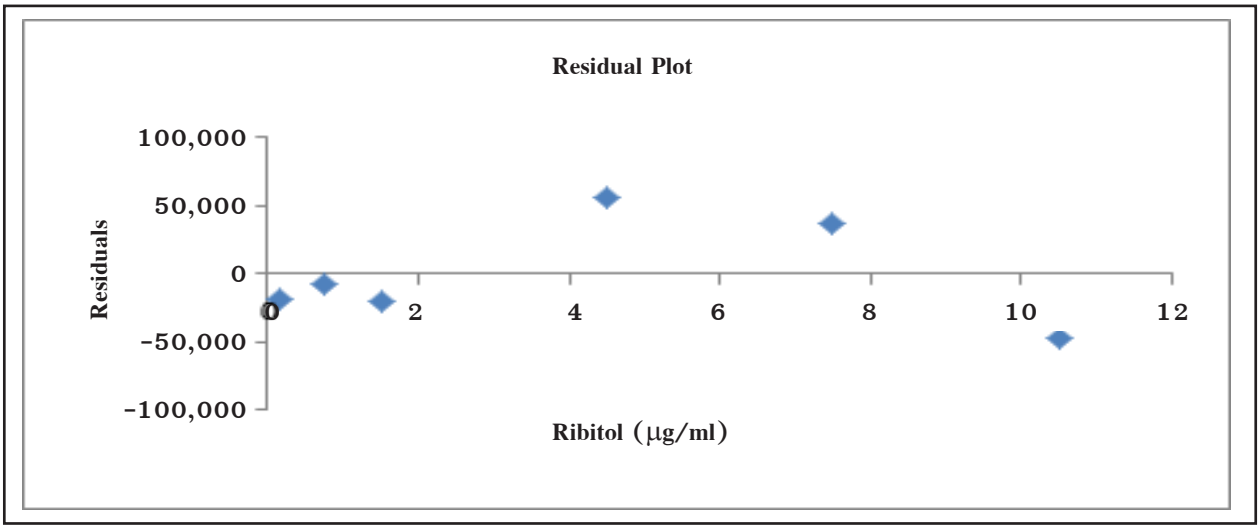
มากกว่า ค่า F-critical value ที่ alpha เท่ากับ 0.05 ทั้ง 6 การทดสอบ ผลจากกราฟ residual plot พบว่ามีการกระจายของค่าทั้งด้านบนและด้านล่างของแกน X แสดงตัวอย่างในภาพที่ 2 และ Line fit plot ค่า Y ที่ตรวจวัดได้มีค่าใกล้เคียงกับค่า Y ที่คำนวณได้ (predicted Y) แสดงตัวอย่างในภาพที่ 3 ซึ่งพบลักษณะคล้ายกันนี้ในทั้ง 6 การทดสอบ

ผลการทดสอบความจำเพาะของวิธี แสดงให้เห็นจาก peak ใน chromatogram ของสารมาตรฐาน ribitol ที่แยกได้จากคอลัมป์ มีค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของ retention time จำนวน 6 การทดสอบ (108 ครั้งของการฉีดสาร) เท่ากับ 16.45±0.30 นาที มีค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 1.83 chromatogram ของสารควบคุมบวก และตัวอย่างวัคซีน DTPw-HepB-Hib A, DTPw-HepB-Hib B และ DTPw-HepB-Hib C ที่ตำแหน่ง peak แสดง retention time อยู่ในช่วงเวลาเดียว

ภาพที่ 1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าพื้นที่ใต้กราฟ (แกน Y) และความเข้มข้นของสาร ribitol 0.15, 0.75, 1.50, 4.50, 7.50 และ 10.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (แกน X) จำนวน 6 การทดสอบ



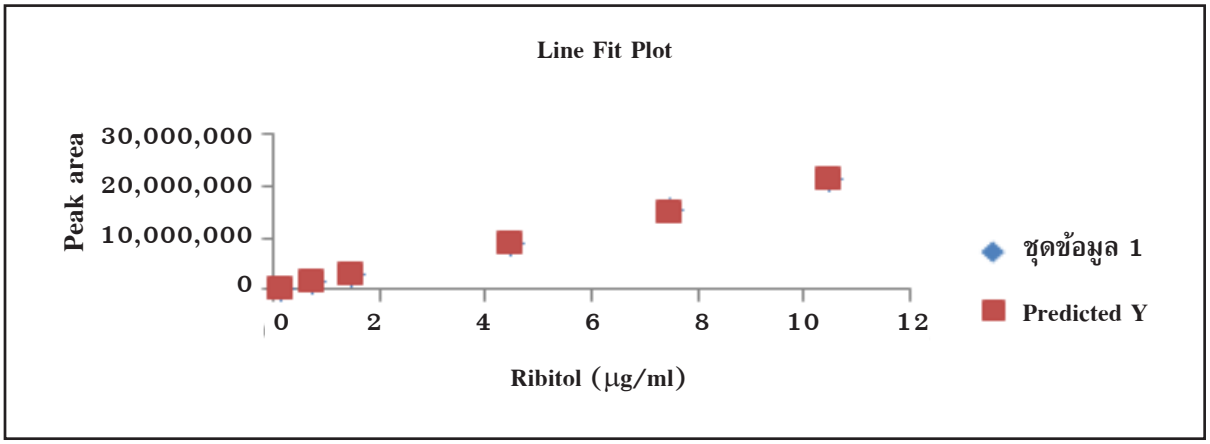
ภาพที่ 2 ตัวอย่างกราฟ Residual plot ของการตรวจวิเคราะห์สาร ribitol ที่ความเข้มข้น 0.15, 0.75, 1.50, 4.50, 7.50 และ 10.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยวิธี HPAEC-PAD



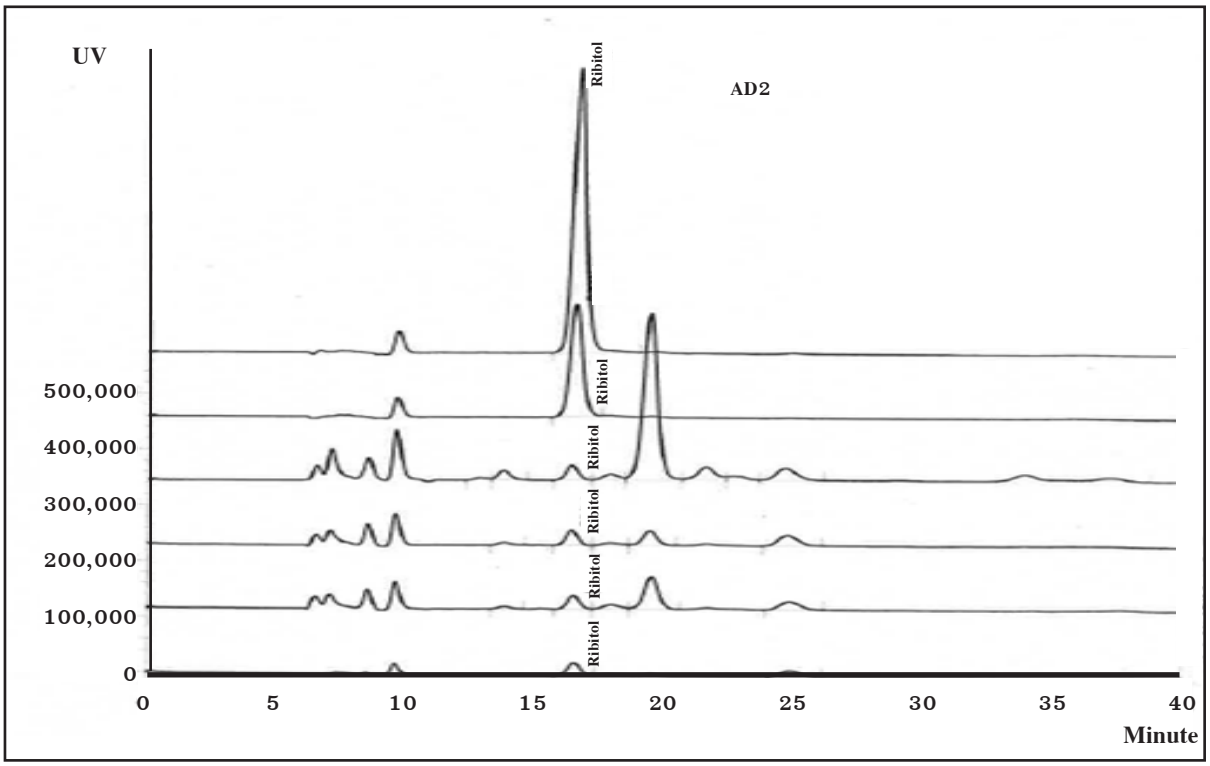
กับสารมาตรฐาน ribitol ดังแสดงในภาพที่ 4

ผลทดสอบความเที่ยง เมื่อทำซ้ำในวันเดียวกันของตัวอย่างวัคซีนเดียวกันจำนวน 6 ครั้ง ได้ค่าเฉลี่ยปริมาณแอนติเจน(PRP)±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 16.94±0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 2.38 และเมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกันจำนวน 6 ครั้งที่ทำต่างวันได้ค่าเฉลี่ยปริมาณแอนติเจน±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ

ภาพที่ 3 ตัวอย่างกราฟ Line fit plot ของการตรวจวิเคราะห์สาร ribitol ที่ความเข้มข้น 0.15, 0.75, 1.50, 4.50, 7.50 และ 10.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยวิธี HPAEC-PAD



ภาพที่ 4 Chromatogram ของสารมาตรฐาน สารควบคุม และวัคซีน DTPw-HepB-Hib จำนวน 3 ยี่ห้อ



หมายเหตุ หมายเลข 1. Standard ribitol หมายเลข 2. Positive control
หมายเลข 3. วัคซีน DTPw-HepB-Hib B หมายเลข 4 วัคซีน DTPw-HepB-Hib C
หมายเลข 5 วัคซีน DTPw-HepB-Hib A หมายเลข 6 PRP

16.95±0.79 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 4.66 (ตารางที่ 2)

ผลการทดสอบความแม่นเมื่อทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ ribitol ใน 3 ระดับความเข้มข้นที่เติมลงไปในตัวอย่างวัคซีน DTPw-HepB-Hib 3 ยี่ห้อ ได้ค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ระหว่าง 83.56 และ 97.14 (ตารางที่ 3)

วิธี HPAEC-PAD มีขีดจำกัดของการตรวจพบปริมาณสาร ribitol อยู่ที่ระดับ 0.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณที่ระดับ 0.22 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งคำนวณมาจากค่า slope และ Y-intercept ของกราฟสารมาตรฐาน ribitol จำนวน 6 การทดสอบ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 2 ผลวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจน (PRP) ในตัวอย่างวัคซีน DTPw-HepB-Hib เดียวกัน เมื่อวิเคราะห์ในวันเดียวกันจำนวน 6 การทดสอบ และต่างวันจำนวน 6 การทดสอบ

ครั้งที่	ปริมาณของแอนติเจน (PRP) (μg/ml)	
	วันเดียว	ต่างวัน
1	16.31	16.31
2	16.62	16.14
3	16.94	16.46
4	17.26	16.94
5	17.26	17.91
6	17.26	17.91
Mean±SD	16.94±0.40	16.95±0.79
%RSD	2.38	4.66

ตารางที่ 3 ร้อยละการคืนกลับของสาร ribitol ความเข้มข้น 2.50, 3.75 และ 5.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่เติมลงไปในตัวอย่างวัคซีน DTPw-HepB-Hib จำนวน 3 ยี่ห้อ

วัคซีนยี่ห้อ	ร้อยละการคืนกลับของสาร ribitol ความเข้มข้นของสาร ribitol ที่เติมลงในวัคซีน (μg/ml)		
	2.25	3.75	5.25
DTPw-HepB-Hib A	83.56	83.47	90.10
DTPw-HepB-Hib B	93.33	95.47	97.14
DTPw-HepB-Hib C	95.56	96.00	94.48

ตารางที่ 4 แสดงค่า LOD และ LOQ ที่คำนวณจาก slope และ Y-intercept ของกราฟมาตรฐานสาร ribitol ที่ความเข้มข้น 0.15, 0.70, 1.50, 4.50, 7.50 และ 10.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร จำนวน 6 การทดสอบ

ครั้งที่	Slope	Y-intercept	LOD	LOQ
1	1810730	7040		
2	1820160	-1353		
3	1833940	16927		
4	2067790	81734		
5	2185720	-22398		
6	2400130	-46276		
Mean	2019745	5946		
SD	241901	43473	0.07	0.22

วิจารณ์

การตรวจวัดปริมาณแอนติเจนของวัคซีนฮิบเป็นรายการตรวจที่สำคัญรายการหนึ่งในการควบคุมคุณภาพวัคซีนฮิบที่ระบุในข้อแนะนำขององค์การอนามัยโลก[8] ซึ่งสื่อถึงความแรงของวัคซีนในการป้องกันโรค ผู้ผลิตจะต้องควบคุมการผลิตให้มีปริมาณแอนติเจนคงที่สม่ำเสมอในวัคซีนทุกรุ่นเช่นเดียวกับรุ่นการผลิตที่ใช้ศึกษาทางคลินิกแล้วได้ผลป้องกันโรคเป็นที่ยอมรับให้จดขึ้นทะเบียนสำหรับจำหน่าย และห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพภาครัฐหากจำเป็นต้องตรวจวิเคราะห์คุณภาพวัคซีนจะต้องใช้วิธีที่มีความถูกต้อง แม่นยำ เชื่อถือได้ตามระบบคุณภาพในการตัดสินผล ซึ่งข้อมูลจากสูตรตำรับวัคซีนฮิบในปัจจุบันทั้งชนิดวัคซีนเดี่ยวและวัคซีนรวมจะมีปริมาณของแอนติเจน (PRP) อยู่ในช่วง 7.5-10 ไมโครกรัมต่อโด๊ส (0.5 มิลลิลิตร) หรือ 15-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร[3] ที่เชื่อมต่ออยู่กับโปรตีนตัวนำ (carrier protein) ชนิดต่าง ๆ ในสัดส่วนที่กำหนดชัดเจนของแต่ละสูตรตำรับ การตรวจหาปริมาณแอนติเจนของวัคซีนฮิบ โดยวิธี HPAEC-PAD ที่ต้องทำการย่อยสารตัวอย่างด้วยกรดก่อนนั้น เนื่องจากส่วนแอนติเจนของ Hib มีโครงสร้างเป็นลักษณะ linear polymer ของ 3-β-D-ribofuranosyl(1→1) D-ribitol-5-phosphate (PRP) จึงต้องการทำสลายโพลิเมอร์ให้แยกส่วน ribitol ให้เป็นอิสระก่อนที่จะนำมาผ่านคอลัมป์ตรวจวัด แล้วจึงคำนวณกลับด้วยค่า conversion factor ให้เป็นค่าแอนติเจน PRR วิธีนี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการแยกสารที่มีประจุและขนาดโมเลกุลที่ต่างกันได้อย่างดีด้วยเทคนิคการแยกของโครมาโตกราฟฟี่แบบเปลี่ยนประจุ และการตรวจจับสัญญาณแบบ elelctrochemical เมื่อพิจารณา peak ของสารมาตรฐาน ribitol สารควบคุม (PRP) และตัวอย่างวัคซีนทั้ง 3 ยี่ห้อ ก็จะพบว่ามีความสามารถแยก peak ที่ให้ retention time ในช่วงเวลาตรงกันกับสาร ribitol แสดงถึงความจำเพาะของวิธีได้ และเมื่อนำมาตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารมาตรฐาน ribitol ก็ให้ผลวิเคราะห์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารกับพื้นที่ใต้กราฟแบบเป็นเส้นตรงทั้งการวิเคราะห์แบบ regression และสหสัมพันธ์ และเมื่อวิเคราะห์แอนติเจนของวัคซีนฮิบที่ผสมรวมอยู่กับวัคซีนคอตีบ บาดทะยัก ไอกรน ตับอักเสบบีนั้นให้ผลการทดสอบของวิธีที่มีความเที่ยงทั้งการทำซ้ำในวันเดียวกันและต่างวันโดยมีค่าเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ไม่เกินร้อยละ 5.0 และมีความแม่นในการวิเคราะห์มากกว่าร้อยละ 90.0 ในวัคซีนต่างผู้ผลิต ยกเว้นวัคซีน DTPw-HepB-Hib A ที่แสดงผลค่าวิเคราะห์ได้ต่ำกว่าร้อยละ 90.0 เมื่อความเข้มข้นของ ribitol ที่เติมลงในวัคซีนน้อยกว่า 5.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สัณนิษฐานว่าอาจมีสารองค์ประกอบที่ผสมในวัคซีนนี้ที่รบกวนการตรวจวัด แต่ค่าที่ได้ยังอยู่ในเกณฑ์ยอมรับที่กำหนดค่าร้อยละการคืนกลับไว้ที่ 80.0-120.0 จึงยังถือว่าเป็นวิธีที่ยอมรับนำมาใช้ได้แต่ยังต้องให้ความสำคัญที่อาจตรวจวัดได้ปริมาณสาร-แอนติเจนต่ำกว่าค่าจริง ดังนั้นควรมีการตรวจวิเคราะห์เพิ่มเติมและเปรียบเทียบผลกับค่าที่ผู้ผลิตตรวจวัดได้ในตัวอย่างเดียวกันเมื่อมีตัวอย่างนำเข้าจำนวนมากขึ้น สำหรับค่าต่ำสุดที่วิธีตรวจวิเคราะห์ได้อย่างมีความเชื่อมั่นแสดงด้วยค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณที่ปริมาณสาร ribitol 0.22 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือเท่ากับปริมาณแอนติเจน PRP 0.53 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งถือว่าอยู่ในระดับที่สามารถนำมาตรวจปริมาณแอนติเจนในวัคซีนฮิบได้อย่างน่าเชื่อถือ แต่ก็ยังมีข้อจำกัดที่ใช้ได้เฉพาะตัวอย่างวัคซีนที่ไม่มีสารจำพวกแลคโต๊ส หรือไรโบส ซึ่งมักใส่เป็นสารคงสภาพในวัคซีนบางชนิด เช่น วัคซีนรวมคอตีบ บาดทะยัก ไอกรนชนิดไร้เซลล์ ตับอักเสบบี และฮิบ ที่สามารถรบกวนการตรวจวัดทำให้ได้ค่าสูงเกินจริงได้ ดังนั้นหากเป็นตัวอย่างใหม่จะต้องทำการทดสอบความแม่นของวิธีกับตัวอย่างเพื่อยืนยันความเหมาะสมของวิธีกับตัวอย่างเสียก่อน เมื่อเปรียบเทียบวิธี HPAEC-PAD กับวิธีตรวจปริมาณ PRP อื่น เช่น วิธีตรวจหาปริมาณ ribose ด้วย Bial reaction[14] หรือ orcinol test[15] หรือตรวจปริมาณฟอสฟอรัสด้วย Chen method[16] แล้วคำนวณปริมาณ PRP ซึ่งเป็นวิธีตรวจทางเคมีที่ห้องปฏิบัติการเคยใช้ทดสอบกับวัคซีนฮิบในอดีตแต่ได้ถูกยกเลิกไป

แล้วด้วยไม่สามารถตรวจได้กับวัคซีนที่มีในปัจจุบัน จากการสังเกตุพบว่าวิธีเดิมมักได้ค่าที่เบี่ยงเบนสูงแม้ทำการวิเคราะห์ในตัวอย่างเดียวกัน และไม่สามารถตรวจกับวัคซีนที่อยู่ในรูปวัคซีนรวมได้ ในขณะที่วิธีใหม่นี้ให้ผลวิเคราะห์ที่มีความแม่นยำ ถูกต้องสูงกว่า สามารถใช้กับวัคซีนที่เป็นวัคซีนรวมได้ดี โดยมีรายงานการศึกษาที่ต่างประเทศสนับสนุน[17-19] สำหรับวิธีตรวจปริมาณ PRP ที่ใช้เทคนิคการตรวจแบบ ELISA มีข้อดีคือความจำเพาะของการจับระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีสามารถลดการรบกวนจากสารผสมอื่น และผู้ผลิตบางรายมีใช้วิธีนี้ในการตรวจคุณภาพของวัคซีนแต่ปัจจุบันได้ปรับมาใช้วิธี HPAEC-PAD เป็นส่วนใหญ่ และมีบทความวิจัยที่ศึกษาพัฒนาวิธีนี้สำหรับตรวจคุณภาพวัคซีนในช่วงของการพัฒนาผลิตภัณฑ์[20] แต่วิธี ELISA ยังเป็นข้อจำกัดสำหรับห้องปฏิบัติการภาครัฐที่ต้องตรวจวัคซีนจากหลายแหล่งผลิต เนื่องจากต้องใช้สารแอนติเจนและแอนติบอดีที่จำเพาะกับวัคซีนแต่ละบริษัททำให้มีความยุ่งยากในการพัฒนาและตรวจสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละวัคซีนที่ต้องขอสารจากผู้ผลิตเป็นครั้งคราวจึงไม่เป็นที่นิยม ดังนั้นวิธี HPAEC-PAD ที่พัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการและตรวจสอบแล้วนี้จึงตอบโจทย์การนำไปใช้ได้ดีกว่า ซึ่งนอกจากใช้ในการตรวจหาปริมาณแอนติเจนในวัคซีนฮิบแล้วหน่วยงานยังสามารถนำไปต่อยอดในการพัฒนาวิธีตรวจหาปริมาณแอนติเจนของวัคซีนโพลีแซคคาไรด์ชนิดอื่นเพื่อการควบคุมคุณภาพ เช่น วัคซีนไข้ไทฟอยด์[21] วัคซีนไข้กาฬหลังแอ่นที่มีหลายซีโรทัยป์[22] ได้อีกต่อไป จึงเป็นการเพิ่มศักยภาพของห้องปฏิบัติการภาครัฐในการคุ้มครองผู้บริโภคด้านวัคซีนให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

สรุป

วิธี HPAEC-PAD ที่ย่อยสารตัวอย่างด้วยกรดนั้นมีความสามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจนของวัคซีนฮิบ ได้อย่างมีความถูกต้อง แม่นยำ เชื่อถือได้ สามารถนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพภาครัฐสำหรับตรวจความแรงวัคซีนฮิบในวัคซีนรวมคอตีบ บาดทะยัก ไอกรนทั้งตัว และตับอักเสบบี ที่ไม่มีสารจำพวกแลคโต๊ส หรือไรโบ๊ส ได้อย่างเหมาะสมเพื่อการควบคุมคุณภาพความแรงของวัคซีนฮิบให้เป็นไปตามมาตรฐานสำหรับวัคซีนที่ตรวจเพื่อการขึ้นทะเบียน และการตรวจยืนยันคุณภาพในการรับรองรุ่นการผลิต และหลังการจำหน่าย ซึ่งจะทำให้ผู้บริโภคได้รับวัคซีนที่มีคุณภาพความแรงตรงตามมาตรฐานของผลิตภัณฑ์และมาตรฐานสากลที่สามารถป้องกันโรคได้ และยังสามารถพัฒนาต่อยอดวิธีนี้ในการตรวจวิเคราะห์ควบคุมความแรงของวัคซีนโพลีแซคคาไรด์ชนิดอื่นได้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวัคซีนแห่งชาติที่ให้การสนับสนุนทุนดำเนินงานในโครงการนี้ ทำให้สามารถพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการตรวจสอบความแรงของวัคซีนฮิบได้เป็นผลสำเร็จ และขอบคุณเจ้าหน้าที่ องค์การอนามัยโลกที่ส่งเสริมสนับสนุนความรู้ทางเทคนิควิชาการของวิธีตรวจวิเคราะห์

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Haemophilus influenzae type b (Hib) [internet]. 2011 [cited 2018 Sep 16]. Available from: http://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/haemophilus/haemophilus_influenzae_typeb_Hib/en/
2. อัจฉรา ตั้งสถาพรพงษ์. วัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อฮิบ [อินเทอร์เน็ต]. [สืบค้นเมื่อ 16 ก.ย. 2561]. แหล่งข้อมูล: http://pidst.or.th/userfiles/33_วัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อฮิบ.pdf
3. สำนักโรคติดต่อทั่วไป กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. วัคซีนป้องกันโรคจากเชื้อฮีโมฟิลุสอินฟลูเอ็นเซ่ทัยป์บี หรือ ฮิบ (*Haemophilus influenzae* type b Vaccine: Hib). ใน: กุลกัญญา โชคไพบูลย์กิจ, เกษวดี ลาภพระ, จุฑารัตน์ เมฆมัลลิกา, ฐิติอร นาคบุญนำ, อัจฉรา ตั้งสถาพรพงษ์, บรรณาธิการ. ตำราวัคซีน และการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรค ปี 2556. กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา; 2556. หน้า 159-64.

4. Chandran A, Watt JP, Santosham M. *Haemophilus influenza* vaccines. In: Plotkin SA, Orensttein WA, Offit PA. Editor. Vaccines 6th edition. Beijing: Elsevier Inc; 2013. p.167-82.
5. World Health Organization. Immunization coverage [internet]. 2018 [cited 2018 Oct 7]. Available from: http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/immunization-coverage
6. Muangchana C, Chunsuttiwat S, Rerks-Ngarm S, Kunasol P. Bacterial meningitis incidence in Thai children estimated by a rapid assessment tool (RAT). Southeast Asian J Trop Med Public Health 2009;40:553-62.
7. นิรนาม. เพิ่มวัคซีน "ฮิบ" ให้เด็กไทย "เข็มเดียว" ป้องกัน 5 โรคเริ่มใช้ปี 62 [อินเทอร์เน็ต]. ไทยโพสต์. 7 ต.ค. 2561 [สืบค้นเมื่อ 7 ต.ค. 2561]. แหล่งข้อมูล: https://www.thaipost.net/main/detail/3188
8. World Health Organization. Annex 1: recommendations for the production and control of Haemophilus influenza type B conjugate vaccines. WHO Technical Report Series No. 897 [Internet]. 2000 [cited 2018 Oct 7]. Available from: http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/influenza/WHO_TRS_897_A1.pdf?ua=1
9. Zarei AE, Almehdar HA, Redwan EM. Hib vaccines: past, present, and future perspectives. J Immunol Res 2016;2016:7203587. doi: 10.1155/2016/7203587. PubMed PMID:26904695:7203587.
10. World Health Organization. Supporting countries in quality assurance for pentavalent vaccines [Internet]. 2018 [cited 2018 Oct 7]. Available from: http://www.who.int/immunization_standards/vaccine_quality/qas_pentavalent/en/
11. World Health Organization. Study report: quantitative determination of the saccharide and unconjugated saccharide content of Haemophilus influenzae type b conjugate component in liquid vaccine presentations [Internet]. 2014 [cited 2018 Oct 7]. Available from: https://www.who.int/immunization_standards/vaccine_quality/Study_Report_Vaccines_May2014.pdf?ua=1
12. D'ambra AJ, Baugher JE, Concannon PE, Pon RA, Michon F. Direct and indirect methods for molar-mass analysis of fragments of the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenza* type b. Anal Biochem 1997;250: 228-36.
13. Sigma-aldrich. Adonitol [internet]. 2018 [cited 2018 Oct 13]. Available from: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a5502?lang=en&region=TH
14. Kabat EA, Mayer MM. Experimental Immunology. 2nd ed. Springfield, IL, Charles C Thomas; 1961.
15. Dische Z, Schwarz K. Microchemical method for the determination of different pentoses in the presence of other pentoses and hexoses. Mikrochemica Acta 1937; 2:13-9.
16. Chen PS, Toribara TY, Warner H. Microdetermination of phosphorus. Anal Chem 1956;28:1756-8.
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.
18. Put RMFVD, Haan PD, Ijssel GMVD, Hamidi A, Beurret M. HPAEC-PAD quantification of *Haemophilus influenzae*type b polysaccharide in upstream and downstream samples. Vaccine 2015;33:6908-13.
19. Jing T, Dan Z, Hong L, Ya-nan L, Mao-guang L, Cuiping C, et al. Determination of polysaccharide and free polysaccharide contents of Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine by high performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis 2016;36: 1804-9.
20. Hamidi A, Kreeftenberg H. Use of immuno assays during the development of a Hemophilus influenzaetype b vaccine for technology transfer to emerging vaccine manufacturers. Hum Vaccin Immunother 2014;10:2697-703.
21. 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;139:143-7.

22. Cook MC, Bliu A, Kunkel JP. Quantitation of serogroups in multivalent polysaccharide-based meningococcal vaccines: optimisation of hydrolysis conditions and chromatographic methods. Vaccine 2013;31:3702-11.

Abstract: Method Validation for Determination of *Haemophilus influenzae* Type B Vaccine's Antigen Content by High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulse Amperometric Detection

Wereyarmarst Jaroenkunathum, M.Sc. (Biochemistry); Chonlada Pethai, B.Sc. (Microbiology); Kanokphon Ritthitham, B.Sc. (Biology); Supaporn Phumiamorn, Ph.D. (Virology)

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

Journal of Health Science 2019;28:561-72.

The objective of this study was to validate the method for determination of Haemophilus influenzae type B vaccine's antigen content by HPAEC-PAD. The validation steps were comprised of laboratory preparedness, method optimization and method validation. Parameters of method validation included linearity and range, specificity, precision, accuracy, limit of detection and limit of quantitation. The results showed that the ribitol standard curve had linearity where the ranges of concentration were between 0.15 and 10.50 μg/ml. The linear regression equation was Y=2E+06X+5946 and value of coefficience of correlation was 1. The F-test value was more than F-critical value at alpha 0.05. The method had specificity for ribitol which showed peak eluted at retention time of mean±standard deviation (SD) of 16.45±0.30 min and the percentage of relative standard (%RSD) was 1.83. The precision presented a mean±SD of antigen content determined by six tests within the first day and then six single daily tests thereafter were 16.94±0.40 and 16.95±0.79 μg/ml, respectively, while %RSD were 2.38 and 4.66, respectively. Accuracy showed percent recovery of ribitol content which was added to 3 brands of diphtheria, tetanus, whole cell pertussis, Hepatitis B and Hib combined vaccine, they were between 83.56 and 97.14. The limit of ribitol detection was 0.07 μg/ml and limit of ribitol quantitation was 0.22 μg/ml. The result of all parameters met the pre-defined acceptance limit. In conclusion, HPAEC-PAD method is precise, accurate and reliable for determination of Hib's antigen when combined in diphtheria, tetanus, whole cell pertussis and Hepatitis B vaccines. It can be used as a standard method for national laboratory quality control of Hib vaccine's potency. Consumers should only get the qualified vaccines which have met both product and international standards.

Keywords: *Haemophilus influenzae* type b, antigen, Hib vaccine, HPAEC-PAD