วารสารวิชาการสาธารณสุข
ปีที่ ๑๙ ฉบับที่ ๑ มกราคม - กุมภาพันธ์ ๒๕๕๓

Journal of Health Science
Vol. 19 No. 1 January - February 2010

Original Article

นิพนธ์ต้นฉบับ

ชุดทดสอบอิมมูโนโครมาโทกราฟีสำหรับเดกซ์ซาเมธาโซนและเพร็ดนิโซโลนในผลิตภัณฑ์สมุนไพร

วลัยลักษณ์ เมธาภัทร
มาศวลัย ลิขิตธนเศรษฐ์
สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

บทคัดย่อ การปนปลอมยาสเตียรอยด์ในผลิตภัณฑ์สมุนไพร อาจทำให้เกิดผลข้างเคียงต่อผู้บริโภคจนถึงขั้นเสียชีวิต การพัฒนาชุดทดสอบที่ใช้ง่าย สะดวกและให้ผลรวดเร็ว โดยไม่ต้องใช้ความชำนาญหรือเครื่องมือเป็นพิเศษ ด้วยเทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟี สามารถนำไปใช้ตรวจสอบเบื้องต้นในเชิงคุณภาพของการปนปลอมยาสเตียรอยด์ เดกซ์ซาเมธาโซนและเพร็ดนิโซโลนในผลิตภัณฑ์สมุนไพรได้ทุกรูปแบบยา เช่น ยาลูกกลอน ยาเม็ด ยาน้ำและยากวน เป็นต้น ชุดทดสอบนี้ใช้เดกซ์ซาเมธาโซนแอนติบอดีติดฉลากด้วยอนุภาคทองคำเป็นตัวตรวจติดตามการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเดกซ์ซาเมธาโซนและ/หรือเพร็ดนิโซโลน กับ แอนติบอดี โดยสามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่าจากสีม่วงแดงที่ปรากฏบนเมมเบรน ด้วยค่าความไวของการทดสอบเท่ากับ 1.0 และ 50.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของเดกซ์ซาเมธาโซนและเพร็ดนิโซโลน ตามลำดับ ความถูกต้องแม่นยำของชุดทดสอบเทียบเท่ากับเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง องค์ความรู้ที่ได้จากการวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อประชาชนในการตรวจสอบการปนปลอมยาสเตียรอยด์ดังกล่าวในผลิตภัณฑ์สมุนไพร เพื่อความปลอดภัยต่อการบริโภค และเป็นแนวทางในการพัฒนาชุดทดสอบสำหรับสารอื่น ๆ ด้วยเทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟีต่อไป

คำสำคัญ: **เดกซ์ซาเมธาโซน, เพร็ดนิโซโลน, ผลิตภัณฑ์สมุนไพร, อิมมูโนโครมาโทกราฟี**

ปัจจุบันผลิตภัณฑ์สมุนไพรกำลังเป็นที่นิยมของประชาชนโดยทั่วไป และเป็นที่รู้จักกันแพร่หลายใน 3 รูปแบบ คือ ผลิตภัณฑ์ยา ผลิตภัณฑ์อาหารเสริม และผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ปัญหาของการที่ผู้บริโภคถูกหลอกลวงจากผู้ผลิตและจำหน่ายผลิตภัณฑ์สมุนไพรก็มีเกิดมากขึ้นตามมาเป็นเงาตามตัว ยังผลทำให้ผู้บริโภคเกิดความเข้าใจผิด จึงไม่ได้ก่อให้เกิดผลดีทางสุขภาพตามความเป็นจริงนั้นและยังอาจก่อให้เกิดโทษต่อร่างกายได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผลิตภัณฑ์ยาหรือยาแผนโบราณซึ่งพบว่าปัญหาในปัจจุบันคือมีการลักลอบผลิตและวางจำหน่ายโดยไม่ถูกต้องตามกฎหมาย การผลิตขาดสุขลักษณะที่ดี ส่งผลให้ยาแผนโบราณพบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์สูง การติดฉลากโฆษณาโอ้อวดเกินจริง นอกจากนี้ยังนำตัวยาแผนปัจจุบันมาผสม โดยเฉพาะยากลุ่มสเตียรอยด์ (steroids) ซึ่งมีความเป็นพิษสูงและจัดเป็นยาควบคุมพิเศษ[1]

ยาในกลุ่มสเตียรอยด์ที่พบมีการปนปลอมในผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพร ได้แก่ เดกซ์ซาเมธาโซน (dexamethasone) และเพร็ดนิโซโลน (prednisolone) พิษของยาสเตียรอยด์ที่เกิดขึ้นมีดังนี้ กดภูมิคุ้มกันทำให้ติดเชื้อโรคได้ง่าย ระคายเคืองต่อกระเพาะอาหารทำให้กระเพาะอาหารเป็นแผลหรือถึงขั้นทะลุได้ เกิดการสะสมของไขมันในอวัยวะบางส่วน ทำให้หน้ากลมผิดปรกติ เรียกว่าหน้าพระจันทร์ และหลังเป็นหนอก เกิดการคั่งของเกลือ มีอาการบวมเป็นอันตรายมากต่อผู้เป็นโรคความดันโลหิตสูง โรคหัวใจ การใช้ยาในกลุ่มสเตียรอยด์นาน ๆ ทำให้กล้ามเนื้อลีบ กระดูกผุ น้ำตาลในเลือดสูง[1-3] ซึ่งในปัจจุบันได้มีมาตรการเพื่อควบคุมดูแลผลิตภัณฑ์สมุนไพรมากขึ้น โดยการตรวจสอบหาการปนเปื้อนของยาแผนปัจจุบัน โดยเฉพาะยาในกลุ่มสเตียรอยด์ และกลุ่มอื่น ๆ ที่อาจเติมลงในยาสมุนไพร

เดกซ์ซาเมธาโซน และเพร็ดนิโซโลน เป็นยาในกลุ่มคอร์ติโคสเตียรอยด์ (glucocorticoids) ที่ใช้เป็นยาต้านการอักเสบ (anti-inflammatory drugs) การตรวจสอบเดกซ์ซาเมธาโซน และเพร็ดนิโซโลน สามารถทำได้หลายวิธี[4-6] เช่น ด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC), ultraviolet spectrophotometry (UV), high performance liquid chromatography (HPLC) และ gas chromatography/mass spectrophotometry (GC/MS) ซึ่งวิธีการตรวจสอบดังกล่าวต้องใช้ผู้ชำนาญการในการตรวจสอบ ทั้งมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างหลายขั้นตอน ทำให้ยุ่งยาก เสียเวลาและมีค่าใช้จ่ายที่มากขึ้น มีรายงานว่าตรวจพบยาทั้งสองชนิดในยาแผนโบราณเพิ่มขึ้นตามการขยายตลาดผลิตภัณฑ์ จึงส่งผลให้ต้องมีภาระงานของการตรวจสอบมากขึ้นไปด้วย

อิมมูโนแอสเสย์เป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีการนำมาใช้ในการตรวจสอบเดกซ์ซาเมธาโซน และเพร็ดนิโซโลน เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะของการตรวจสอบสูง อีกทั้งยังสามารถตรวจสอบตัวอย่างได้คราวละจำนวนมาก และยังสามารถลดขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่างลงได้ จึงเป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนามาใช้ในการตรวจสอบเดกซ์ซาเมธาโซน และเพร็ดนิโซโลนในเลือด ปัสสาวะ และตัวอย่างเนื้อเยื่อได้ในระดับความเข้มข้นเป็นนาโนกรัมต่อมิลลิลิตร[7,8] แต่เทคนิคของอิมมูโนแอสเสย์ไม่ว่าจะเป็นเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนแอสเสย์หรือเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ ยังคงต้องใช้เครื่องมือพิเศษและผู้ชำนาญการในการทดสอบและอ่านผล แต่สำหรับเทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟีเป็นเทคนิคที่ไม่ต้องใช้เครื่องมือและผู้ชำนาญการในการทดสอบ โดยแอนติเจนและแอนติบอดีจะเกิดปฏิกิริยาบนเมมเบรนสามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า เนื่องจากใช้สารติดฉลากเป็นอนุภาคทองคำที่มีสีแดง[9-13] และส่วนใหญ่จะใช้เวลาในการทดสอบประมาณ 10-15 นาทีเท่านั้น[11-13]

ดังนั้น เพื่อให้ประชาชนโดยทั่วไปสามารถตรวจสอบการปนปลอมของเดกซ์ซาเมธาโซนและเพร็ดนิโซโลนในผลิตภัณฑ์สมุนไพรได้ด้วยตัวเองอย่างมีประสิทธิภาพในเวลาอันรวดเร็ว โดยไม่ต้องใช้ความชำนาญการหรือเครื่องมือพิเศษ จึงศึกษาและพัฒนาชุดตรวจสอบเดกซ์-ซาเมธาโซนและเพร็ดนิโซโลนในผลิตภัณฑ์สมุนไพรด้วยเทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟีนี้เพื่อตรวจสอบเบื้องต้นสำหรับผลิตภัณฑ์สมุนไพรยา และยังสามารถนำการพัฒนานี้ไปประยุกต์ใช้ตรวจสอบเดกซ์ซาเมธาโซน และเพร็ดนิโซโลนในผลิตภัณฑ์ประเภทอื่น ๆ ได้อีกด้วย นอกจากนี้องค์ความรู้ที่ได้รับในการพัฒนาวิธีตรวจสอบด้วย เทคนิคอิมมูโนโครมาโทรกราฟีนี้จะเป็นแนวทางที่สำคัญในการพัฒนาชุดทดสอบชนิดรวดเร็วของสารอื่น ๆ ได้ต่อไป

วิธีการศึกษา

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Microplate reader (Model ELX 808, Bio-Tex Instrument Inc., USA.)
2. Dispensing (XYZ3200, Biodot, USA.)
3. Guillotine Cutter (CM4000, Biodot, USA.)
4. High Speed Refrigerate Centrifuge (Model

3K30, Sartorius (Sigma), Germany.)

5. Incubator (Model 800, Memmert, Germany.)

6. Rota-evaporator (EYELA, TOKYO RIKAKIKAT, Japan.)

7. Water bath

8. Micropipettes (Socorex, Switzerland.)

วัสดุ

1. สารเคมีและสารมาตรฐาน

1.1 สารมาตรฐานจากสำนักยาและวัตถุเสพติด คือ เดกซ์ซาเมธาโซน และ เพร็ดนิโซโลน

1.2 สารเคมี : 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDCI), dicyclocarbodiimide (DCC), bovine serum albumin (BSA), ovalbumin (OVA), O-phenylenediamine (OPD), succinic anhydride, pyridine, goat-anti-rabbit-HRP, goat-anti-rabbit (whole molecule), 35% hydrogen peroxide (Sigma, St Louis, MO, USA)

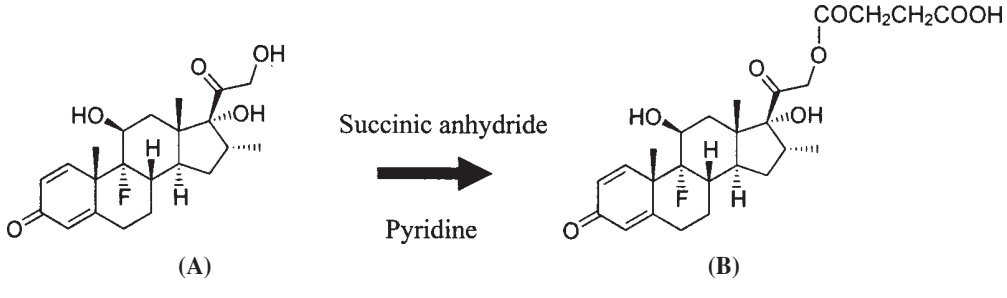
2. ชนิดของเมมเบรนที่ใช้ ได้แก่ AE 98 membrane, Glass fiber 33, 900 membrane, Standard 17 membrane, backing card (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany)

3. เดกซ์ซาเมธาโซนโพลีโคลนอลแอนติบอดีของบริษัท abcam สหรัฐอเมริกา

4. Microplate 96 well ของ NUNC, Denmark.

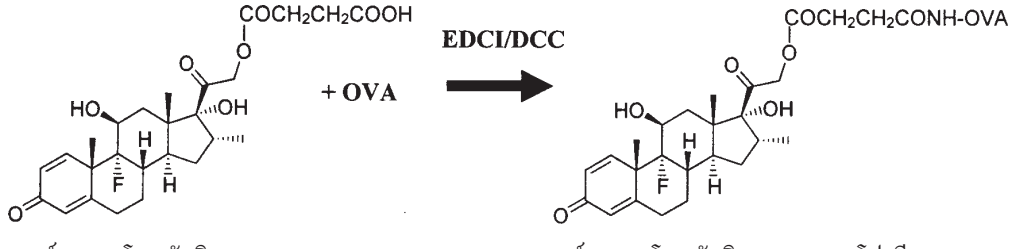
5. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพรยาที่ไม่มีเลขทะเบียน ซึ่งส่งตรวจโดยประชาชนทั่วไปตามปรกติ ที่สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในปีงบประมาณ 2550-2552 ในรูปแบบต่าง ๆ ได้แก่ ยาลูกกลอน ยาเม็ด ยาแคปซูล ยาน้ำ และ ยากวน ซึ่งตรวจสอบแล้วด้วยเทคนิค Thin layer chromatography โดยสำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จำนวน 200 ตัวอย่าง

ขั้นตอนของการศึกษา



(A) (B)

รูปที่ 1 โครงสร้างของเดกซ์ซาเมธาโซน (A) และการสังเคราะห์เดกซ์ซาเมธาโซนซัคซิเนต (B)



เดกซ์ซาเมธาโซนซัคซิเนต เดกซ์ซาเมธาโซนซัคซิเนตคอนจูเกตโปรตีน

รูปที่ 2 การคอนจูเกตเดกซ์ซาเมธาโซนซัคซิเนตกับ ovalbumin

1. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเดกซ์ซาเมธาโซน (รูปที่ 1) โดยใช้ succinic anhydride ทำปฏิกิริยาแบบ reflux กับเดกซ์ซาเมธาโซน ใน anhydrous pyridine จากนั้นทำการแยกผลึกที่บริสุทธิ์ของเดกซ์ซาเมธาโซนซัคซิเนต ด้วยการตกตะกอนซ้ำใน ethyl acetate[14]

2. การเตรียมคอนจูเกตโปรตีนของสารเคลือบเพลตด้วยวิธี carbodiimide method ดังแสดงในรูปที่ 2 โดยใช้ 1-ethyl-3-(3-dimethylamino propyl) carbodiimide hydrochloride เป็นตัวเชื่อมเดกซ์ซาเมธาโซนซัคซิเนตกับ ovalbumin[15-17]

3. การตรวจสอบคุณสมบัติของแอนติบอดี เป็นการตรวจสอบค่า titer ของเดกซ์ซาเมธาโซนโพลีโคลนอลแอนติบอดีของ abcam ด้วยวิธี non-competitive indirect ELISA[18-19] และหาค่า titer ของแอนติบอดีที่ 50% binding ได้

4. การเตรียมชุดตรวจสอบเดกซ์ซาเมธาโซนและเพร็ดนิโซโลนด้วยเทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟี[22-25]

4.1 การเตรียมคอนจูเกตของอนุภาคทองคำกับเดกซ์ซาเมธาโซนโพลีโคลนอลแอนติบอดี

โดยเตรียมเดกซ์ซาเมธาโซนแอนติบอดีที่ความเข้มข้นประมาณ 2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของคอลลอยด์ของอนุภาคทองคำให้มีค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ 540 นาโนเมตร ประมาณ 10.0

4.2 การเตรียมคอนจูเกตเดกซ์ซาเมธาโซนซัคซิเนตกับโปรตีน[15-17]

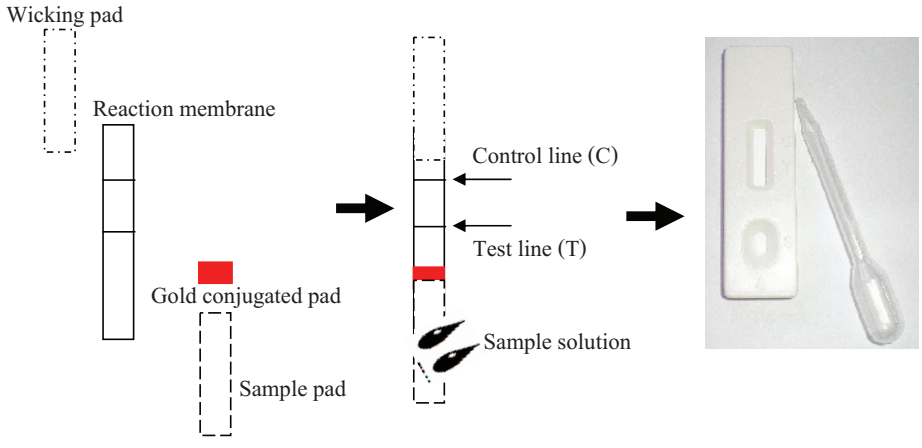
โดยการนำเดกซ์ซาเมธาโซนซัคซิเนต (รูปที่ 1) ไปคอนจูเกตกับโปรตีน ovalbumin โดยใช้ carbodiimide method ดังรูปที่ 2 ขั้นตอนการเตรียมเหมือนกับข้อ 2 แต่ใช้ DCC แทน EDCI ในอัตราส่วนจำนวนโมลของเดกซ์ซาเมธาโซนซัคซิเนตต่อโปรตีนเท่ากับ 10:1-20:1 คอนจูเกตโปรตีนที่เตรียมได้จะเก็บในรูปสารละลายที่ 4 องศาเซลเซียส

4.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมชุดทดสอบ ได้แก่ ปริมาตรของตัวอย่าง ความเข้มข้นของแอนติบอดี และความเข้มข้นของโปรตีนคอนจูเกตที่ใช้ปริมาตรของเดกซ์ซาเมธาโซนโพลีโคลนอลแอนติบอดีคอนจูเกตกับอนุภาคทองคำ และปริมาตรของคอนจูเกตของอนุพันธ์ของเดกซ์ซาเมธาโซนและโปรตีนที่เหมาะสม ดังแสดงในตารางที่ 1

4.4 การเตรียมชุดทดสอบเดกซ์ซาเมธาโซนและเพร็ดนิโซโลน ซึ่งจะประกอบด้วย sample pad (standard 17 membrane), conjugate pad (Glass fiber 33), wicking pad (900 membrane) และ reaction pad (AE98 fast membrane) โดยใช้เดกซ์ซาเมธาโซนคอนจูเกตกับ ovalbumin เป็นส่วนของ test line ที่เตรียมได้จากข้อ 4.2 และ anti-rabbit-IgG เป็นส่วนของ control line ซึ่งจะถูกฉีดลงบน reaction membrane ส่วนคอนจูเกตของอนุภาคทองคำกับเดกซ์ซาเมธาโซนโพลีโคลนอลแอนติบอดีจะถูกฉีดลงบน conjugate pad โดยทั้ง test line, control line และ conjugate pad จะใช้เครื่องฉีดอัตโนมัติลงบนเมมเบรนที่

ตารางที่ 1 สภาวะที่ศึกษาเพื่อหาความเหมาะสมของการเตรียมชุดทดสอบ

No.	Sample volume (ไมโครลิตร)	ปริมาตรต่อเซนติเมตรของเมมเบรน (ไมโครลิตร)		
		Test line (0.5 - 3.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	Conjugated pad (OD540 10.0 - 15.0)	Control line (0.5 -1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
1	100	1.0	10	2.0
2	100	1.0	10	1.0
3	150	2.0	10	1.0



รูปที่ 3 ส่วนประกอบของชุดทดสอบด้วยเทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟี

เหมาะสม ทำให้แห้งโดยการอบในตู้อบอุณหภูมิประมาณ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง นำมาตัดให้ได้ขนาดที่เหมาะสมกับตลับบรรจุชุดทดสอบและนำมาประกอบเป็นชุดทดสอบ ดังรูปที่ 3

5. การเตรียมตัวอย่างยาสมุนไพรและสารมาตรฐานของเดกซ์ซาเมธาโซนและเพร็ดนิโซโลน โดยการใช้ตัวทำละลายผสมของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ pH 7.4 และเอทานอล (3:1 โดยปริมาตร) และศึกษาหาปริมาตรที่เหมาะสมของตัวทำละลายที่จะใช้ในการละลายตัวอย่างในช่วงปริมาตร 1.0 - 3.0 มิลลิลิตร

6. การทดสอบความถูกต้องของชุดทดสอบเดกซ์-ซาเมธาโซนและเพร็ดนิโซโลน[25-26]

6.1 ความไว (sensitivity) ของชุดทดสอบ โดยทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานของเดกซ์ซาเมธาโซนและเพร็ดนิโซโลนในตัวทำละลายผสมของฟอสเฟต-บัฟเฟอร์ซาไลน์ pH 7.4 และเอทานอล (3:1 โดยปริมาตร) ที่ความเข้มข้น 0, 500, 750, 1000, 1250 และ 1500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0, 12.5, 25.0, 50.0, 62.5 และ 75.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยใช้ชุดทดสอบจำนวน 30 ชุด ทดสอบกับทุกความเข้มข้นของสารมาตรฐานทั้งสองชนิด ความเข้นข้นของเดกซ์ซาเมธาโซน และเพร็ดนิโซโลนที่ให้ผลบวกกับชุดทดสอบทั้ง 30 ชุดจะเป็นค่าความไวของชุดทดสอบ

6.2 ความถูกต้อง (accuracy) โดยทดสอบตัวอย่างยาสมุนไพรทั้งรูปแบบยาเม็ด ยาลูกกลอน ยาน้ำ ยากวน และยาผง จำนวน 200 ตัวอย่าง ที่ได้ตรวจสอบและทราบผลด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (TLC) แล้ว โดยเป็นตัวอย่างที่ตรวจพบเดกซ์ซาเมธาโซนและ/หรือเพร็ดนิโซโลน (ผลบวก) จำนวน 50 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่ตรวจไม่พบเดกซ์ซาเมธาโซนและเพร็ดนิ-โซโลน (ผลลบ) จำนวน 150 ตัวอย่าง นำมาตรวจสอบด้วยชุดทดสอบอิมมูโนโครมาโทกราฟี และคำนวณการเกิดผลบวกลวงและลบลวงได้ดังนี้

อัตราการเกิดผลบวกลวง (false-positive rate) = (false positive/true negative + false positive)*100

อัตราการเกิดผลลบลวง (false-negative rate) = (false negative/true positive + false negative)*100

6.3 การตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) กับสารสเตียรอยด์ที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกับเดกซ์ซาเมธาโซน และยาแผนปัจจุบันอื่น ๆ ที่มักพบว่ามีการปนปลอมในผลิตภัณฑ์สมุนไพร รวม 16 สาร ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในตัวทำละลายผสมของเอทานอลและฟอส-เฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ pH 7.4 (3:1 โดยปริมาตร) ได้แก่ เพร็ดนิโซโลน เบต้าเมธาโซน ฟลูโอซิโนโลน อะซีโทไนด์ ไตรแอมซิโนโลน พาราเซตามอล อะม็อกซิซิลลิน

ไวตามินซี แอสไพริน คลอแรมเฟนิคอล คลอร์เฟนิรามีน มาลีเอต ไดอาซีแพม เดกซ์โตรเมทอร์แฟน ไฮโดรโบรไมด์ อินโดเมทาซิน เพนิซิลลิน จี เฟนิลบิวตาโซน และ สูโดเอฟิดรีน โดยคำนวณร้อยละของการเกิดปฏิกิริยาข้ามได้ดังสมการ

$$\text{percent cross-reactivity} = \frac{\text{ความเข้มข้นของสารเดกซ์ซาเมธาโซนที่ให้ผลบวก}}{\text{ความเข้มข้นของสารที่คาดว่าจะเกิดปฏิกิริยาข้ามที่ให้ผลบวก}} \times 100$$

7. การศึกษาความคงตัวของชุดทดสอบ โดยทำการตรวจสอบชุดทดสอบที่เก็บไว้ที่ 4, 25, 37, 45, 60 องศาเซลเซียสและที่สภาวะเปิดไม่บรรจุในซองอลูมิเนียมด้วยสารละลายมาตรฐานของเดกซ์ซาเมธาโซนและเพร็ดนิโซโลนที่ความเข้มข้น 1.0 และ 50.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และทำการทดสอบกับตัวอย่างที่ให้ผลบวกและผลลบ ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ ตั้งแต่ 1 วันถึง 4 เดือน

8. ขั้นตอนการตรวจสอบตัวอย่างยาสมุนไพรด้วยชุดทดสอบเดกซาซ์เมธาโซนและเพร็ดนิโซโลนด้วยเทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟี ทั้งรูปแบบยาเม็ด ยาลูกกลอน ยาน้ำ ยากวน และยาผง ด้วยเทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟี มีดังนี้คือ ถ้าตัวอย่างเป็นเม็ดให้บดให้แตกละเอียดหรือใช้กรรไกรสะอาดตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ตักตัวอย่างด้วยหลอดพลาสติกสำหรับตักตัวอย่างหรือหลอดหยดตัวอย่างที่เป็นของเหลวลงในหลอดทดสอบพลาสติก หยดน้ำยาจากขวดบรรจุน้ำยาละลายตัวอย่างลงในหลอดทดสอบที่ใส่ตัวอย่าง ปิดด้วยจุกพลาสติก เขย่าให้เข้ากันประมาณ 3 นาที ตั้งทิ้งไว้จนเกิดการแยกชั้น นำชุดทดสอบออกจากซองบรรจุ วางบนพื้นราบที่สะอาด ใช้หลอดหยดตัวอย่างดูดน้ำยาส่วนใสไม่ให้มีฟองอากาศและหยดลงในหลุมทดสอบในลักษณะตั้งตรงทีละหยด จำนวน 4 หยด อ่านผลการทดสอบภายใน 10-15 นาที

การประเมินผลการตรวจสอบ

ดังแสดงในรูปที่ 3 บนเมมเบรนจะมี test line (T) ซึ่งเป็นคอนจูเกตของโปรตีนกับเดกซ์ซาเมธาโซน และ control line (C) ซึ่งเป็นแอนติบอดีต่อเดกซ์ซาเมธาโซนแอนติบอดี โดย control line เป็นตัวบ่งบอกความสมบูรณ์ของชุดทดสอบในการตรวจสอบตัวยาในตัวอย่าง และ test line เป็นตัวบ่งบอกถึงผลของการตรวจสอบตัวอย่าง ดังนั้นถ้าตัวอย่างที่ทดสอบไม่มีเดกซ์ซาเมธาโซนหรือเพร็ดนิโซโลนอยู่ เดกซ์ซาเมธาโซนแอนติบอดีที่คอนจูเกตกับอนุภาคทองคำจะเคลื่อนที่ไปจับกับ test line และ จับกับ control line ทำให้เห็นเป็นเส้นสีชมพูหรือสีม่วงแดง 2 เส้น ซึ่งจะรายงานผลว่า “ตรวจไม่พบ” แต่ถ้าในตัวอย่างมีเดกซ์ซาเมธาโซนหรือเพร็ดนิโซโลนอยู่ สารทั้งสองจะจับกับเดกซ์ซาเมธาโซนแอนติบอดีที่คอนจูเกตกับอนุภาคทองคำ ทำให้เดกซ์ซาเมธาโซนแอนติบอดีที่คอนจูเกตจะจับกับอนุภาคทองคำไม่สามารถไปจับ test line ได้ แต่แอนติบอดีที่คอนจูเกตกับอนุภาคทองคำจะถูกจับโดย control line ได้ จึงปรากฏเป็นเส้นสีชมพูหรือสีม่วงแดงเพียง 1 เส้น จะรายงานผลว่า “ตรวจพบ” ซึ่งควรตรวจสอบยืนยันผลด้วยเทคนิค TLC แต่ถ้าไม่เกิดสีชมพูหรือสีม่วงแดงทั้งที่ตำแหน่ง C และ T หรือปรากฏแถบสีที่ T ตำแหน่ง

รูปที่ 4 การอ่านผลการทดสอบเดกซ์ซาเมธาโซนและเพร็ดนิโซโลนในผลิตภัณฑ์สมุนไพรด้วยเทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟี

เดียวแสดงว่าชุดทดสอบนั้นไม่สมบูรณ์ ไม่สามารถใช้ในการทดสอบได้จะต้องทำการตรวจสอบซ้ำโดยใช้ชุดทดสอบใหม่

ผลการศึกษา

ชุดทดสอบด้วยเทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟีที่พัฒนานี้ไม่ต้องใช้เครื่องมือหรือความชำนาญการพิเศษ ประชาชนทั่วไปสามารถนำไปใช้ตรวจสอบการปนปลอมของเดกซ์ซาเมธาโซนและเพร็ดนิโซโลนในผลิตภัณฑ์สมุนไพรได้ โดยสามารถตรวจสอบการปนปลอมของสารทั้งสองตัวดังกล่าวได้พร้อมกันในคราวเดียว แต่ไม่สามารถระบุได้ว่าตัวยาที่ตรวจพบเป็นเดกซ์ซาเมธาโซนหรือเพร็ดนิโซโลน ด้วยความไวของการทดสอบเดกซ์ซาเมธาโซนและเพร็ดนิโซโลนที่ความเข้มข้น 1 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2

สภาวะที่เหมาะสมของการเตรียมชุดทดสอบเมื่อใช้เดกซ์ซาเมธาโซนแอนติบอดีคอนจูเกตกับอนุภาคทองคำปริมาตร 10.0 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร คือ การใช้ตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร ส่วนทั้ง test line และ control line จะใช้ความเข้มข้นและปริมาตรที่ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ 1.0 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร ตามลำดับ

ในขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่างจะใช้ตัวทำละลายผสมของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ pH 7.4 และเอทานอล (3:1 โดยปริมาตร) ปริมาตรประมาณ 1.5 มิลลิลิตร เมื่อตรวจสอบความถูกต้องของชุดทดสอบพบว่าตัวอย่างยาแผนโบราณซึ่งส่งมาตรวจการปนปลอมของเดกซ์ซาเมธาโซนและเพร็ดนิโซโลนที่สำนักยาและวัตถุเสพติด จำนวน 200 ตัวอย่างที่มีผลของการตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC แล้วเมื่อนำมาตรวจสอบด้วยชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นนี้ ให้ผลสอดคล้องตรงกันทั้งหมด ไม่

ตารางที่ 2 การหาค่าความไวของชุดทดสอบ (n = 30 ตัวอย่าง)

ความเข้มข้นเดกซ์ซาเมธาโซน (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	Percent of cut-off (%)	ผลการตรวจสอบ	
		ผลลบ	ผลบวก
0	0	30	0
500	-50	30	0
750	-25	28	2
1,000	Cut-off	0	30
1,250	+25	0	30
1,500	+50	0	30
ความเข้มข้นเพร็ดนิโซโลน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	**Percent of cut-off (%)**	**ผลการตรวจสอบ**	
		ผลลบ	**ผลบวก**
0	0	30	0
25.0	-50	30	0
32.5	-25	30	0
50.0	Cut-off	0	30
62.5	+25	0	30
75.0	+50	0	30

ตารางที่ 3 ความถูกต้องของการตรวจสอบตัวอย่างยาสมุนไพร เปรียบเทียบระหว่างวิธี Thin layer chromatography และ ชุดทดสอบอิมมูโนโครมาโทกราฟี

ชุดทดสอบ	จำนวนตัวอย่าง Thin layer chromatography		
	ผลบวก	ผลลบ	รวม
ผลบวก	50	0	50
ผลลบ	0	150	150
รวม	**50**	**150**	**200**

**ผลบวก : ตรวจพบเดกซ์ซาเมธาโซนและ/หรือเพร็ดนิโซโลน*
ผลลบ : ตรวจไม่พบเดกซ์ซาเมธาโซนและ/หรือเพร็ดนิโซโลน

ตารางที่ 4 การเกิดปฏิกิริยาข้ามของสารที่ตรวจสอบ

ชื่อสาร	ความเข้มข้นที่ให้ผลบวกกับชุดทดสอบ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	การเกิดปฏิกิริยาข้าม (ร้อยละ)
เดกซ์ซาเมธาโซน	1.0	100.0
เพร็ดนิโซโลน	50.0	2.0
เบต้าเมธาโซน	1.0	100.0
ไตรแอมซิโนโลน	> 100.0	< 1.0
เพร็ดนิโซน	> 100.0	< 1.0
ฟูโอซิโนโลนอะซีโทไนด์	> 100.0	< 1.0

พบผลบวกลวงหรือผลลบลวง (ตารางที่ 3)

ดังแสดงในตารางที่ 4 เบต้าเมธาโซนสามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกับชุดทดสอบได้ร้อยละ 100 ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่สารตัวอื่นที่ทดสอบตามข้อ 6.3 ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เนื่องจากยาสมุนไพรที่จะมีการปนปลอมของเดกซ์ซาเมทาโซนและเพร็ดนิโซโลนจะเป็นยาในรูปแบบของยากิน ทำให้โอกาสการเกิดผลบวกลวงจากเบต้าเมธาโซนมีน้อยมาก เพราะเบต้าเมธาโซนเป็นยาใช้ภายนอกเท่านั้น

เนื่องจากชุดทดสอบมีความคงตัวที่อุณหภูมิ 45 และ 60 องศาเซลเซียสที่เวลา 4 สัปดาห์ ทำให้สามารถระบุอายุของชุดทดสอบเป็น 2 ปี โดยจะยังคงศึกษาความคงตัวที่อุณหภูมิ 4, 25, 37 และที่สภาวะเปิดต่อจนครบอายุจริงของชุดทดสอบที่กำหนดไว้คือ 2 ปี

วิจารณ์

ห้องปฏิบัติการสำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จะใช้วิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (TLC) ในการตรวจสอบการปนปลอมของเดกซ์ซาเมธาโซนและเพร็ดนิโซโลนในผลิตภัณฑ์สมุนไพร ซึ่งในปี 2539 ได้พัฒนาชุดตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC ที่มีความไวของการตรวจสอบเดกซ์ซาเมธาโซนและ/หรือเพร็ดนิโซโลนที่ความเข้มข้นประมาณ 2.0 ไมโครกรัม[27] โดยชุดทดสอบดังกล่าวสามารถใช้ได้ทั้งในและนอกห้องปฏิบัติการ แต่การตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC ต้องทำโดยผู้ชำนาญ การตรวจสอบจะมีหลายขั้นตอนและต้องใช้สารละลายอินทรีย์ ทำให้เป็นข้อจำกัดในการใช้ชุดทดสอบดังกล่าวโดยประชาชนทั่วไป

ในปัจจุบันเทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟีเป็นเทคนิคที่ได้พัฒนาเป็นชุดทดสอบเบื้องต้นอย่างง่ายในการตรวจสอบสารต่าง ๆ ได้แก่ สารเสพติด (drug abuse) และการตรวจติดตามระดับยาในเลือด (therapeutic drug monitoring) ซึ่งสามารถตรวจสอบสารที่มีปริมาณน้อย ๆ ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ เมื่อนำเทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟีมาพัฒนาเป็นชุดทดสอบการปนปลอมของเดกซ์ซาเมธาโซนและเพร็ดนิโซโลนในยาแผนโบราณจึงสามารถตรวจสอบการปนปลอมในตัวอย่างยาน้ำได้ ซึ่งตัวอย่างยาน้ำจะไม่สามารถตรวจสอบด้วยชุดทดสอบเทคนิค TLC ได้ เพราะเดกซ์ซาเมธาโซนและเพร็ดนิโซโลนที่ปนปลอมของในยาน้ำจะมีความเข้มข้นต่ำกว่าความไวของชุดทดสอบ TLC การตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC จึงต้องมีขั้นตอนของการทำให้ตัวอย่างมีความเข้มข้นมากขึ้นด้วยการใช้อ่างน้ำร้อนก่อน ทำให้เป็นข้อจำกัดของการใช้ชุดทดสอบแบบ TLC ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ แต่ตัวอย่างยาน้ำดังกล่าว

สามารถตรวจสอบได้ด้วยชุดทดสอบอิมมูโนโครมาโทกราฟีนี้ เพราะชุดทดสอบไวต่อการตรวจสอบเดกซ์ซาเมธาโซนที่ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นถ้าตัวอย่างยาน้ำมีการปนปลอมของเดกซ์ซาเมธาโซน 1 มิลลิกรัมต่อปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ก็จะสามารถตรวจสอบด้วยชุดทดสอบนี้ได้

ในขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจสอบด้วยชุดทดสอบที่พัฒนานี้ ละลายตัวอย่างยาแผนโบราณทุกประเภททั้งของแข็งน้ำหนักประมาณ 250 มิลลิกรัม และของเหลวปริมาตรประมาณ 250 ไมโครลิตรด้วยตัวทำละลายผสมของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ pH 7.4 และเอทานอล (3:1 โดยปริมาตร) ปริมาตรประมาณ 1.5 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง ตัวทำละลายที่ใช้นอกจากจะเป็นตัวช่วยละลายเดกซ์ซาเมธาโซนและเพร็ดนิโซโลนออกจากตัวอย่างแล้ว ยังเป็นตัวเจือจางแอลกอฮอล์ที่อาจมีการเติมลงในตัวอย่างยาน้ำ เพราะปริมาณแอลกอฮอล์หรือตัวทำละลายอินทรีย์ที่มากเกินไปจะทำลายแอนติบอดีในคอนจูเกตของอนุภาคทองคำและโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของ test line ได้

การตรวจสอบโดยใช้เทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟีส่วนใหญ่จะใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี เพื่อให้สามารถตรวจสอบได้อย่างจำเพาะเจาะจงต่อสารหรือยาตัวใดตัวหนึ่งที่ต้องการตรวจสอบเท่านั้น[10-13,24] แต่ก็พบมีการศึกษาและพัฒนาชุดทดสอบโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อตรวจสอบสารในกลุ่มซัลโฟนาไมด์[12] และพบว่าความไวในการตรวจสอบสารแต่ละตัวในกลุ่มดังกล่าวจะไม่เท่ากันเพราะเป็นการใช้แอนติบอดีต่อโครงสร้างหลักของซัลโฟนาไมด์ สำหรับชุดทดสอบเดกซ์ซาเมธาโซนและเพร็ดนิโซโลนนี้ใช้เดกซ์ซาเมธาโซนโพลีโคลนอลแอนติบอดี เพื่อให้ชุดทดสอบสามารถตรวจสอบได้ทั้งเดกซ์ซาเมธาโซนและเพร็ดนิโซโลนในชุดทดสอบเดียว ก็จะพบปัญหาของความไวที่ไม่เท่ากันต่อเดกซ์ซาเมธาโซนและเพร็ดนิโซโลนเช่นกัน และเมื่อนำชุดตรวจสอบนี้มาใช้ในการตรวจสอบยาแผนโบราณพบว่าให้ผลที่สอดคล้องกับเทคนิค TLC แสดงว่าชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นนี้มีความไวที่สามารถใช้ใน การตรวจสอบปนปลอมของเดกซ์ซาเมธาโซนและ/หรือเพร็ดนิโซโลนในยาแผนโบราณได้

ชุดทดสอบด้วยเทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟีนี้มีจำหน่ายแล้วในราคา 55 - 65 บาทต่อชุดทดสอบ ที่ขนาดบรรจุ 1, 10 และ 20 ชุดทดสอบต่อกล่อง ราคาจะแพงกว่าชุดทดสอบด้วยเทคนิค TLC ซึ่งจำหน่ายที่ 1,300 บาทต่อ 30 ตัวอย่าง หรือประมาณ 43 บาทต่อตัวอย่าง แต่ชุดทดสอบด้วยเทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟีจะมีความไว ความถูกต้อง ความคุ้มค่า สะดวกและความง่ายของการใช้งานมากกว่าชุดทดสอบด้วยเทคนิค TLC จึงได้รับความสนใจและมีการติดต่อสอบถามทั้งจากหน่วยงานราชการและประชาชนทั่วไปที่จะนำไปใช้ในการตรวจสอบเดกซ์ซาเมธาโซนและ/หรือเพร็ดนิโซโลนที่ปนปลอมในยาแผนโบราณเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง

ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานของการตรวจสอบเชิงปริมาณของเดกซ์ซาเมธาโซนและเพร็ดนิโซโลนที่ปลอมปนในผลิตภัณฑ์สมุนไพร อีกทั้งตัวอย่างที่นำมาทดสอบในการศึกษานี้ไม่มีตัวอย่างรูปแบบยาน้ำที่ให้ผลบวกในการตรวจสอบด้วย TLC ว่ามีการปนปลอมของเดกซ์ซาเมธาโซนหรือเพร็ดนิโซโลน เนื่องจากคาดว่ารูปแบบยาน้ำจะมีการปนปลอมในความเข้มข้นที่ต่ำกว่ารูปแบบอื่น ๆ จึงยังไม่สามารถสรุปถึงค่าความไวที่เหมาะสมของชุดทดสอบได้ หากมีข้อมูลของปริมาณเดกซ์ซาเมธาโซนและเพร็ดนิโซโลนที่ตรวจพบในผลิตภัณฑ์สมุนไพรทุกรูปแบบ อาจต้องปรับปรุงความไวของชุดทดสอบที่พัฒนานี้ เพื่อให้สามารถตรวจสอบการปนปลอมของเดกซ์ซาเมธาโซนและเพร็ดนิโซโลนได้อย่างครอบคลุมและไม่เกิดผลลบลวงขึ้นได้ โดยเฉพาะเพร็ดนิโซโลน ซึ่งขณะนี้มีค่าความไวของชุดทดสอบต่ำกว่าเดกซ์ซาเมธาโซนเพราะชุดทดสอบนี้ใช้แอนติบอดีต่อเดกซ์ซาเมธาโซน ดังนั้นการสำรวจและตรวจหาปริมาณเดกซ์ซาเมธาโซนและเพร็ดนิโซโลนที่ปนปลอมในผลิตภัณฑ์ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ ด้วย

เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาและการกำหนดค่าความไวของชุดทดสอบนี้ต่อไป

สรุป

ชุดทดสอบการปนปลอมของเดกซ์ซาเมธาโซนและเพร็ดนิโซโลนในผลิตภัณฑ์สมุนไพรชนิดรวดเร็วโดยใช้หลักการของอิมมูโนโครมาโทกราฟีเป็นชุดทดสอบที่ประชาชนทั่วไปสามารถนำไปใช้ตรวจสอบการปลอมปนเดกซ์ซาเมธาโซนและเพร็ดนิโซโลนในผลิตภัณฑ์สมุนไพรได้ด้วยตัวเอง เนื่องจากเป็นชุดทดสอบที่ใช้ง่าย สะดวก รวดเร็ว และไม่ต้องใช้ความชำนาญหรือเครื่องมือในการทดสอบ ชุดทดสอบนี้สามารถตรวจสอบเดกซ์ซาเมธาโซนและเพร็ดนิโซโลนได้ด้วยความไวที่ความเข้มข้น 1.0 และ 50.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ มีความถูกต้องของการตรวจสอบสอดคล้องกับเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดชั้นบาง ดังนั้นชุดทดสอบนี้จึงเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการคุ้มครองผู้บริโภค เพราะนอกจากจะช่วยในส่วนของการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์สมุนไพรแล้ว ยังเป็นลดความเสี่ยงต่อการได้รับผลข้างเคียงจากการใช้เดกซ์ซาเมธาโซนและเพร็ดนิโซโลนติดต่อกันเป็นเวลานาน ซึ่งเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญเรื่องหนึ่งในขณะนี้ นอกจากนี้องค์ความรู้ที่ได้รับจากการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการพัฒนาชุดตรวจสอบชนิดรวดเร็วด้วยเทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟีสำหรับสารตัวอื่น ๆ ในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ของสำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ให้ความอนุเคราะห์และอำนวยความสะดวกในการศึกษานี้

เอกสารอ้างอิง

1. ศูนย์วิทยบริการ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข. [online] 2544 [สืบค้นเมื่อ 29 สิงหาคม 2550] แหล่งข้อมูล: URL: http://elib.fda.moph.go.th/library/default.asp?page2=detail&ngid=27&id=15612
2. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข. [online] 2545 [สืบค้นเมื่อ 29 สิงหาคม 2550] แหล่งข้อมูล: URL: http://www1.fda.moph.go.th/consumer/csmb/csmb2545.nsf/
3. กองพัฒนาศักยภาพผู้บริโภค สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข. [online] 2548 [สืบค้นเมื่อ 29 สิงหาคม 2550] แหล่งข้อมูล: URL: http://webnotes.fda.moph.go.th/information2548
4. จินดาพร ภูริพัฒนาวงษ์. การตรวจสอบสารเพรดนิโซโลน และเด็กซ์ซ่าเมทธาโซนในยาแผนโบราณ วารสารสงขลานครินทร์ 2538; 17(2):187-93.
5. Tappayuthpijarn P, Dejatiwong Q. Quantitative analysis of prednisolone and dexamethasone in modified herbal drugs. Siriraj Hospital Gazette 1989; 41(3):146-8.
6. Friedrich A, Schulz R, Meyer HHD. Use of enzyme immunoassay and reverse-phase high performance liquid chromatography to detect and confirm identity of dexamethasone in equine blood. Am J Vet Res 1992; 53(12):2213-20.
7. Chen CL, Zhu D, Gills K.D, Meleka BM. Use of enzyme-linked immunosorbent assay and radioimmunoassay to determine serum and urine dexamethasone concentrations in throughbreds after intravenous administration of the steroid. Am J Vet Res 1996; 57(2): 182-5.
8. Hichens M, Hogans AF. Radioimmunoassay for dexamethasone in plasma. Clin Chem 1974; 20(2):266-71.
9. Immunochromatographic, lateral flow or strip tests development: Bangs Laboratories. [Online] 2009 [cited 2009 Apr 24] Available from: URL: http://www.pall.com/sls-4154.asp
10. Paek SH, Lee SH, Cho JH, Kim YS. Development of rapid one-step immunochromatographic assay. Methods 2000; 22:53-60.
11. Zhang GP, Wang XN, Yang JF, Yang YY, Xing GX, Li QM, et al. Development of an immunochromatographic lateral flow test strip for detection of β-adrenergic agonist clenbuterol residues. J Immunol Methods 2006; 312:27-33.
12. Wang X, Li K, Shi D, Xiong N, Jin X, Yi J, et al. Development of an immunochromatographic lateral-flow test strip for rapid detection of sulfonamides in eggs and chicken muscles. J Agric Food Chem 2007; 55(6):2072-8.

13. Bhaskar S, Singh S, Sharma M. A single-step immunochromatographic test for the detection of *Entamoeba histolytica* antigen in stool samples. J Immunol Methods 1996: 196(2):193-8.
14. Dumasia MC, Chapman DI, Moss MS, O'Connor C. Production and properties of antisera to dexamethasone-protein conjugates. Biochem J 1973;133:401-4.
15. Caraway KL, Koshland Jr DE. Carbodiimide modification of proteins. Methods Enzymol 1972; 25:616-23.
16. Erlanger BF, Borex F, Beiser SM, Lieberman S. Steroid-protein conjugates I. Preparation and characterization of conjugate of bovine serum albumin with testosterone and with cortisone. J Biol Chem 1957; 228(2):713-27.
17. Erlanger BF, Borex F, Beiser SM, Lieberman S. Steroid-protein conjugates II. Preparation and characterization of conjugate of bovine serum albumin with progesterone, deoxycorticosterone and estrone. J Biol Chem 1959; 234(5):1090-4.
18. Catty D, Raykundalia C. Production and quality control of polyclonal antibodies. In: Catty D, editor. Antibodies; volume I: a practical approach. Oxford: IRL press; 1988. p. 19-80.
19. Kemeny DM. Titration of antibodies. J Immunol Methods 1992; 150:57-76.
20. Porstmann T, Kiessig ST. Enzyme immunoassay techniques: an overview. J Immunol Methods 1992; 150:5-21.
21. Tijssen P. Practice and theory of enzyme immunoassay. New York: Elsevier-North Holland; 1985.
22. Goodman SL, Hodges GM, Livingston DC. A review of the colloidal gold marker system. Scan Elect Microsc 1980; 2:133-44.
23. Gribnau TCJ, Leuvering JHW, Van Hell H. Particle-labelled immunoasssay: a review. J Chromato 1986; 376:175-89.
24. Paek SH, Jang MR, Mok RS, Kim SC, Kim HB. Immunochromatographic membrane strip assay system for a single-class plasma lipoprotein cholesterol, exemplified by high-density lipoprotein cholesterol measurement. Biotechnology Bioengineering 1998; 62(2):145-54.
25. Liu L, Peng C, Jin Z, Xu C. Development and evaluation of a rapid lateral flow immunochromatographic strip assay for screening 19-nortestosterone. Biomedical Chromatography 2007; 21(8):861-6.
26. Guidance for Industry. Guidance for premarket submissions for kits for screening drugs of abuse to be used by the consumer. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. [online] 1997 [cited 2009 Apr 24] Available from: URL: http://www.druglibrary.org/crl/drugtesting/drug%20testing, %20Guidance_%20CDRH.pdf
27. ชุดทดสอบสเตอรอยด์. [online] 2552 [สืบค้นเมื่อ 2009 May 24] แหล่งข้อมูล: URL: http://www.jsppharma.com/index.php?lay=show&ac=article&Id=538771734&Ntype=12 - 67k

Abstract **Immunochromatography Test Kit for Detection of Dexamethazone and Prednisolone in Herbal Medicinal Products**

Waliluk Matapatara, Masvalai Likitthanaset
Bureau of Drug and Narcotic, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health
Journal of Health Science **2010; 19:59-70.**

The adulteration of dexamethasone and prednisolone in herbal medicinal products claims serious side effects and leads to premature mortality. Therefore, a qualitative immunochromatographic test kit for screening the adulterated dexamethasone and prednisolone in herbal medicinal products was developed. This test kit was found to be rapid and easy to perform with no pre requisite regarding laboratory equipments or skills. The detection is accomplished by the reaction between anti-dexamethasone gold conjugate and dexamethasone and/or prednisolone indicated by a purple-red color band on a nitrocellulose membrane. The sensitivity for detection of dexamethasone and prednisolone in terms of the cut-off concentrations was determined to be 1 and 50 µg/ml, respectively. The accuracy of this test kit was comparable with that of thin layer chromatographic technique. It was therefore concluded that the application of immunochromatography test kit for detection of dexamethasone and prednisolone in herbal medicinal products would be fruitful for surveillance in public health consumer protection. The knowledge of this rapid test would possibly be further useful for the development of various medicinal product testings.

Key words: **dexamethasone, prednisolone, herbal medicinal products, immunochromatography**