วารสารแก่นเกษตร
THAIJO
Content List Available at ThaiJo
Khon Kaen Agriculture Journal
Journal Home Page : https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj

การทดสอบความใช้ได้ของชุดแถบทดสอบสำหรับตรวจวัดแรคโตพามีนตกค้างในตัวอย่างเนื้อสุกรและอาหารสุกร

Feasibility of lateral flow test strip for ractopamine residue detection in pork and feed sample

ศุภรดา จันทรทิณ[1], อณุมาศ บัวเขียว[1] กิตตินันท์ โกมลภิส[1,2], อุมาพร พิมพิทักษ์, ทรงจันทร์ ภู่ทอง และ นันทิกา คงเจริญพร[1,2*]

Suppharada Jantarathin[1], Anumart Buakeaw[1], Kittinan Komolpis[1,2], Umaporn Pimpitak[1], Songchan Puthong[1], and Nanthika Khongchareonporn[1,2*]

[1] สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ, *10330*
[1] *Institute of Biotechnology and Genetic Engineering, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand.*
[2] หน่วยปฏิบัติการวิจัยศูนย์ความเสี่ยงอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ, *10330*
[2] *Food Risk Hub, Research Unit of Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand*

บทคัดย่อ: วัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้เพื่อศึกษาความใช้ได้ของชุดแถบทดสอบแบบ lateral flow test strip สำหรับตรวจวัดแรคโตพามีนตกค้างในเนื้อสุกรและอาหารสุกร การแปลผลเชิงคุณภาพทดสอบด้วยสายตาและแปลผลเชิงปริมาณด้วยการถ่ายภาพและวัดความเข้มแถบสีด้วยโปรแกรม ImageJ พบว่า ค่า cut-off ของชุดแถบทดสอบในบัฟเฟอร์ เนื้อสุกรและอาหารสุกร เท่ากับ 3, 6, และ 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า limit of detection เท่ากับ 0.42, 0.85, และ 0.89 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ผลการทดสอบค่าความถูกต้องและแม่นยำของชุดแถบทดสอบในสารสกัดจากตัวอย่างแต่ละชนิด มีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ แรคโตพามีนตกค้างในตัวอย่างเนื้อสุกรและอาหารสุกร ทดสอบโดยใช้ชุดแถบทดสอบที่ผลิตเปรียบเทียบกับชุดแถบทดสอบที่มีจำหน่ายเชิงการค้า พบว่าได้ผลทดสอบเป็นลบ สอดคล้องกันและสุ่มยืนยันผลด้วย LC-MS/MS นอกจากนี้จากการทดสอบความคงสภาพ พบว่าชุดแถบทดสอบสามารถเก็บได้ที่อุณหภูมิช่วง 4-30 องศาเซลเซียส มีความคงสภาพ เป็นเวลา 9 เดือน ดังนั้นจากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่า ชุดแถบทดสอบแรคโตพามีนตกค้างที่ผลิตขึ้นเองด้วยวิธี lateral flow test strip มีความไว ความถูกต้องแม่นยำ และน่าเชื่อถือ สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นวิธีการคัดกรองเบื้องต้นหรือเฝ้าระวังการตกค้างของแรคโตพามีนในเนื้อสุกรและอาหารสุกรได้
คำสำคัญ: แรคโตพามีน; แถบทดสอบ; โมโนโคลนอลแอนติบอดี

ABSTRACT: The purpose of this research was to study the feasibility of using the developed lateral flow test strip for detecting ractopamine residue in pork and feed samples. Test results were recorded qualitatively by naked eye observation and quantitatively by measuring color intensity of strip images using ImageJ software. The results showed that the cut-off values of the tests were 3, 6, and 5 ng/mL and the limit of detection values were 0.42, 0.85, and 0.89 ng/mL for solution buffer, pork, and feed samples, respectively. The accuracy and precision of the test results were in an acceptable range. Ractopamine residue in pork and feed samples were comparatively detected by both the developed test strips and the commercially available test strips. In addition, the residue in a random group of

* Corresponding author: nanthika.k@chula.ac.th

Received: date; December 19, 2019 Accepted: date; February 16, 2021 Published: date June 15, 2021

samples was tested by the LC-MS/MS confirmation method. It was found that all test results were in an agreement. Furthermore, test strips kept in a temperature range of 4 ºC – 30 ºC were found to be stable for 9 months. These results indicated that the developed lateral flow test strips were sensitive, accurate and reliable enough to be used for screening detection or monitoring of ractopamine residue in pork and feed samples.
Keywords: ractopamine; test strip; monoclonal antibody

บทนำ

แรคโตพามีน (Ractopamine) เป็นสารเคมีกลุ่มเบต้า-อะโกนิสต์ (beta-agonist) เช่นเดียวกับสารซัลบูทามอลและเคลนบูเทอรอล หรือเรียกทั่วไปว่า “สารเร่งเนื้อแดง” ถูกนำมาใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหาร เพื่อลดไขมัน โดยผสมในน้ำหรือในอาหารสัตว์ ทำให้สัตว์มีปริมาณเนื้อแดงเพิ่มขึ้น และมีการเจริญเติบโตดีขึ้น อย่างไรก็ตามการใช้แรคโตพามีนนั้น มีผลต่อการเต้นของหัวใจและเกิดการขยายของหลอดเลือดได้ ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของสัตว์โดยตรงและสุขภาพของมนุษย์ได้ ซึ่งบางประเทศโดยเฉพาะสหรัฐอเมริกา อนุญาตให้ใช้แรคโตพามีน ในการเลี้ยงสัตว์ประเภทสุกรและโค จากคณะกรรมาธิการโครงการมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศหรือ Codex (Codex Alimentarius Commission) ได้กำหนดปริมาณสารตกค้างสูงสุดที่อนุญาตให้มีได้ของแรคโตพามีน (Maximum Residue Limits, MRLs) ในเนื้อสัตว์และไขมันไม่เกิน 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และในตับและไตไม่เกิน 40 และ 90 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ แต่ในบางประเทศ เช่น ประเทศในสหภาพยุโรป จีนและประเทศไทยไม่อนุญาตให้ใช้แรคโตพามีนเลี้ยงสัตว์เพื่อการบริโภคเนื้อ ดังนั้นเพื่อเฝ้าระวังและติดตามการตกค้างของแรคโตพามีน ที่อาจจะส่งผลต่อสุขภาพของผู้บริโภค มีการติดตามเฝ้าระวังการตกค้างของสารเร่งเนื้อแดงในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ทั้งผลิตจากภายในประเทศ และจากการนำเข้าจึงเป็นสิ่งจำเป็น วิธีวิเคราะห์สารเร่งเนื้อแดง รวมทั้งแรคโตพามีน สามารถทำได้หลายวิธี ทั้งวิธี confirmation method ซึ่งเป็นการยืนยันผลทดสอบโดยใช้เครื่องมือ เช่น วิธี LC-MS และ HPLC (Wu et al., 2014; Ding et al., 2015) และวิธี screening method ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะสำหรับการคัดกรองเบื้องต้น ก่อนส่งวิเคราะห์เพื่อยืนยันอีกครั้ง ดังเช่น วิธี immunoassay (He et al., 2008; Li et al., 2010; Zhang and Wang, 2009; Zhang et al., 2012)

เทคนิค immunoassay เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมนำมาตรวจวิเคราะห์สารเร่งเนื้อแดง เช่น Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) และ lateral flow immunoassay หรือ immunochromatography โดยอาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจนหรือสารที่สนใจ นิยมใช้ตรวจคัดกรองตัวอย่างเบื้องต้นหรือติดตามการตกค้างสารเร่งเนื้อแดงในผลิตภัณฑ์อาหาร (He et al., 2008; Li et al., 2010; Zhang et al., 2009; Zhang et al., 2012) คณะผู้วิจัยได้ประสบความสำเร็จในการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาสำหรับผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแรคโตพามีน (Buakeaw et al., 2016) และนำโมโนคลอนอลแอนติบอดีต่อแรคโตพามีนที่ได้ไปพัฒนาต่อเป็นชุดแถบทดสอบสำหรับการตรวจวัดแรคโตพามีนต้นแบบ โดยวิธี immunochromatography แบบ lateral flow immunoassay หรือเรียกโดยย่อว่า test strip โดยอาศัยหลักการของการนำแอนติบอดีต่อแรคโตพามีน ติดฉลากด้วยอนุภาคทอง เคลื่อนที่ไปทำปฏิกิริยากับแรคโตพามีนบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน เกิดเป็นสีม่วงแดงของอนุภาคทอง ทำให้เห็นผลทดสอบด้วยตาเปล่า เนื่องจากแรคโตพามีนเป็นสารโมเลกุลเล็ก การทดสอบแรคโตพามีนจึงเป็นแบบแข่งขัน (competitive assay) ระหว่างแรคโตพามีนในตัวอย่างกับแรคโตพามีนที่เชื่อมกับโปรตีนบนเมมเบรน ให้ผลทดสอบเชิงคุณภาพ กรณีที่ตัวอย่างมีแรคโตพามีนจะไปแย่งจับกับแอนติบอดีที่ติดฉลากอนุภาคทอง ทำให้ไม่สามารถจับกับแรคโตพามีนที่เชื่อมกับโปรตีนตรึงอยู่บนเส้นทดสอบบนเมมเบรนได้ จึงไม่มีแถบสีปรากฏขึ้น หมายความว่าให้ผลทดสอบเป็นบวก ในกรณีที่ในตัวอย่างไม่มีแรคโตพามีน แอนติบอดีที่ติดฉลากอนุภาคทอง ทำให้สามารถจับกับแรคโตพามีนที่เชื่อมกับโปรตีนตรึงอยู่บนเส้นทดสอบบนเมมเบรนได้ จึงมีแถบสีปรากฏที่เส้นทดสอบ จะเห็นว่าวิธีนี้จึงเห็นผลด้วยตาเปล่าไม่ต้องใช้อุปกรณ์พิเศษ ขั้นตอนง่าย ใช้เวลาอ่านผลได้รวดเร็ว 5-15 นาที ไม่ต้องอาศัยความชำนาญ สามารถนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์ในสถานที่จริงได้

การประเมินประสิทธิภาพผลทดสอบของชุดแถบทดสอบโดยการถ่ายภาพร่วมกับโปรแกรม ImageJ เป็นการประเมินในส่วนของความสม่ำเสมอหรือคงที่ของเส้นสีที่ปรากฏในแต่ละชุดทดสอบและผลทดสอบในเชิงปริมาณ ทั้งนี้ประเทศไทยนำเข้าชุดแถบทดสอบทางการค้าที่มีจำหน่ายจากต่างประเทศ คณะผู้วิจัยได้ประสบความสำเร็จในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแรคโตพามีน ซึ่งยังไม่มีการ

พัฒนาวิจัยต่อยอด จนนำไปสู่ผลิตภัณฑ์ชุดแถบทดสอบ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความใช้ได้ของชุดแถบทดสอบสำหรับตรวจวัดแรคโตพามีนที่พัฒนา ซึ่งผลิตในจำนวน 2,000 ชิ้น โดยนำมาทดสอบกับตัวอย่างจริงของเนื้อสุกรและอาหารสุกร การประเมินประสิทธิภาพของชุดแถบทดสอบแรคโตพามีนที่ผลิตขึ้นเองนั้น จะเป็นการสร้างความน่าเชื่อถือและความถูกต้องของชุดแถบทดสอบ โดยให้ผลทดสอบทั้งในเชิงคุณภาพและผลทดสอบในเชิงปริมาณ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการใช้งานในเชิงพาณิชย์ต่อไป รวมถึงนำไปสู่การลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์เพื่อยืนยันผลและลดการนำเข้าของชุดแถบทดสอบทางการค้าที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

วิธีการศึกษา

1. การเตรียมชุดแถบทดสอบต้นแบบ

1.1การเตรียมสารละลายสำหรับประกอบชุดแถบทดสอบ

สารละลายสำหรับใช้เป็นเส้นควบคุมของแถบทดสอบ คือ Goat anti-mouse IgG (GAM) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายแรคโตพามีนเชื่อมติดกับโปรตีน BSA (RAC-BSA) ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับใช้เป็นเส้นทดสอบของแถบทดสอบ (Preechakasedkit et al., 2019) ทั้งนี้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่นำมาใช้ ได้ทำการทดสอบความจำเพาะต่อสารแรคโตพามีน พบว่ามีความจำเพาะสูงต่อสารแรคโตพามีน ทำให้ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารเคมีชนิดอื่นในกลุ่มเบต้า-อะโกนิสต์ โดยเตรียมสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแรคโตพามีน ด้วยการนำเซลล์ไฮบริโดมา รหัส 10A4 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ แยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยการปั่นเหวี่ยง จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี protein G affinity chromatography จากนั้นเตรียมสารละลายอนุภาคทอง (colloidal gold) ขนาด 20 นาโนเมตร นำมาติดฉลากกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb-colloidal gold) และศึกษาสัดส่วนความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีและอนุภาคทองที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต่ำที่สุดที่ให้ค่าดูดกลืนแสงสูงสุด หรือปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่น้อยที่สุด ที่ทำให้สีของอนุภาคทองไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง โดยสีของสารละลายอนุภาคทองยังคงมีสีม่วงแดงเช่นเดิม (Preechakasedkit et al., 2019)

1.2 การเตรียมส่วนประกอบของชุดแถบทดสอบ

นำแผ่น conjugate pad พ่นด้วยสารละลาย MAb-colloidal gold ด้วยอัตราการพ่น 10 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร และนำแผ่นเมมเบรนสำหรับวิเคราะห์ (analytical pad) ติดบนแผ่นรองพลาสติก (plastic backing card) สำหรับพ่นเส้นทดสอบด้วย RAC-BSA และเส้นควบคุม ด้วย GAM อัตราการพ่น 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แผ่นรองรับตัวอย่าง (sample pad) และแผ่นดูดซับ (absorbent pad) อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำแต่ละแผ่นที่เตรียมไว้มาประกอบเป็นแถบทดสอบ และนำมาตัดให้มีความกว้างขนาด 4 มิลลิเมตร นำแต่ละแถบทดสอบที่ได้มาประกอบเข้ากับตลับพลาสติก โดยผลิตชุดแถบทดสอบจำนวน 2,000 ชุด จากนั้นเก็บในถุงฟอยด์พร้อมถุงกันความชื้น ปิดให้สนิท (**Figure 1**)

1.3 วิธีการทดสอบและการแปลผลของชุดแถบทดสอบ

วิธีการทดสอบชุดแถบทดสอบด้วยการหยดตัวอย่างปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงในช่องหยดตัวอย่าง จากนั้นวางทิ้งไว้ 15 นาที อ่านผลทดสอบ ประเมินผลด้วยสายตา และทำการถ่ายภาพภายใต้กล่องควบคุมแสง ประเมินผลด้วยโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ พิจารณาจากความเข้มสีของเส้นทดสอบที่เปลี่ยนไปด้วย

การแปลผลชุดแถบทดสอบ กรณีแปลผลด้วยสายตา ถ้าชุดแถบทดสอบปรากฏแถบสีหนึ่งเส้น บริเวณเส้นควบคุมแต่ไม่ปรากฏแถบสีที่เส้นทดสอบ แสดงว่า ตัวอย่างทดสอบมีแรคโตพามีน ในปริมาณมากกว่าหรือเท่ากับค่า cut-off ของชุดแถบทดสอบ รายงานเป็นผลบวก (positive result) แต่ถ้าชุดทดสอบปรากฏแถบสีสองเส้น ทั้งบริเวณควบคุมและเส้นทดสอบ แสดงว่าตัวอย่างทดสอบไม่มีแรคโตพามีน ในปริมาณน้อยกว่าค่า cut-off ของชุดแถบทดสอบ รายงานเป็น ผลลบ (negative result) กรณีประเมินผลด้วยโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ ทำการถ่ายภาพแถบทดสอบภายใต้กล่องควบคุมแสง นำมาวัดค่าความเข้มสีของเส้นทดสอบ เพื่อเปรียบเทียบและประเมินผลชุดแถบทดสอบแต่ละชุด (**Figure 2**)

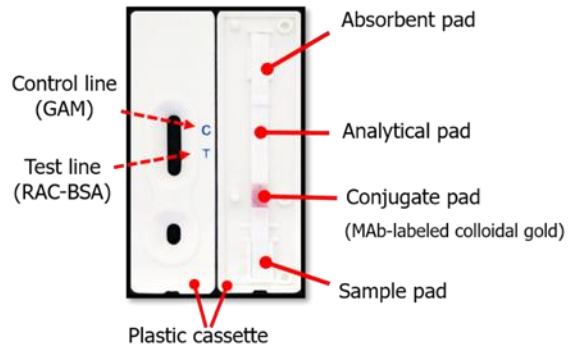

Figure 1 Typical configuration of a lateral flow test strip

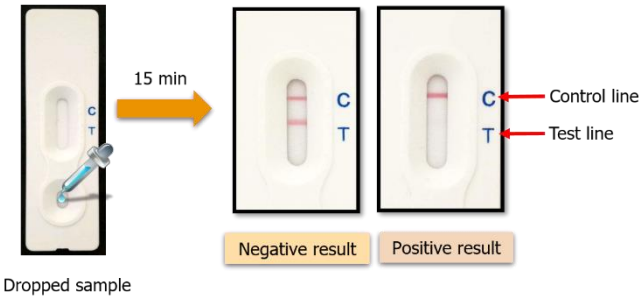

Figure 2 Operation of a lateral flow test strip

2. การเตรียมสารสกัดตัวอย่างเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์

นำตัวอย่างเนื้อสุกรและอาหารสุกร ชนิดละ 20 ตัวอย่าง ที่ผ่านการตรวจแล้วว่าไม่มีแรคโตพามีนตกค้าง นำมาเตรียมสารสกัดโดยบดตัวอย่างให้ละเอียด กรณีตัวอย่างเนื้อสุกร นำมาชั่งน้ำหนัก 1 กรัม เติม 50% เมทานอลในสารละลาย PBS-T 1 มิลลิลิตร เขย่าด้วย vortex เป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนใส นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 30 นาที ตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เก็บสารสกัดส่วนใส สำหรับนำไปทดสอบต่อไป กรณีตัวอย่างอาหารสุกร ชั่งน้ำหนัก 1 กรัม เติม 10% เมทานอลในสารละลาย PBS-T 4 มิลลิลิตร เขย่าด้วย vortex เป็นเวลา 10 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารสกัดส่วนใส สำหรับนำไปทดสอบต่อไป

3. วิธีการทดสอบความใช้ได้ของชุดแถบทดสอบและการแปลผล

3.1 การหาค่าความไวของชุดแถบทดสอบ (Sensitivity)

การหาค่าความไวในตัวอย่างเนื้อสุกรและอาหารสุกร เนื่องจากผลของแมทริกซ์จากการสกัดตัวอย่างแต่ละชนิด อาจส่งผลต่อชุดแถบทดสอบ จึงต้องทำการหาค่า cut-off ของชุดแถบทดสอบในแต่ละชนิดตัวอย่าง โดยพิจารณาจากการนำสารสกัดจากเนื้อสุกร และอาหารสุกรมาใช้เป็นสารละลายตัวอย่างแทนสารละลายบัฟเฟอร์ โดยเติมแรคโตพามีนให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0 - 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร หยดลงแถบทดสอบ แปลผลด้วยสายตา หาค่า cut-off และอ่านค่าความเข้มสีของเส้นทดสอบด้วยโปรแกรม ImageJ นำค่าความเข้มสีมาสร้างกราฟมาตรฐานและหาค่า limit of detection (LOD) ทำการทดสอบความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ 3 ชุดการทดลอง

3.2 การทดสอบความจำเพาะของชุดแถบทดสอบแรคโตพามีน (Specificity)

เพื่อทดสอบความจำเพาะของชุดแถบทดสอบ โดยพิจารณาจากการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามของชุดแถบทดสอบในตัวอย่างแต่ละชนิด ด้วยสารเคลนบูเทอรอลและซัลบูทามอล ซึ่งเป็นสารในกลุ่มเบต้า-อะโกนิสต์ เช่นเดียวกับแรคโตพามีน โดยเตรียมสารละลายเคลนบูเทอรอลและซัลบูทามอล ให้มีความเข้มข้นเดียวกับค่า cut-off และสูงกว่าค่า cut-off 10 เท่าของตัวอย่างแต่ละชนิด นำมาหยดทดสอบ ทำการทดสอบความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ 3 ชุดการทดลอง

3.3 การหาค่าความถูกต้อง (Accuracy) และความแม่นยำ (Precision) ของชุดแถบทดสอบ

การหาค่าความถูกต้องและความแม่นยำของชุดแถบทดสอบ พิจารณาจากค่าเฉลี่ยการกลับคืน (%Recovery) และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%coefficient of variation; %CV) โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน (intra-variation assay) ความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ และวิเคราะห์ซ้ำต่างวัน (inter-variation assay) ความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ ทั้งหมด 3 วัน โดยนำสารสกัดตัวอย่างเนื้อสุกร และอาหารสุกร ทำการเติมแรคโตพามีน โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ในช่วงเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน นำมาหยดทดสอบ อ่านค่าความเข้มสีของเส้นทดสอบด้วยโปรแกรม ImageJ นำค่าความเข้มสีที่อ่านได้จากโปรแกรมมาเทียบกับกราฟมาตรฐานแรคโตพามีน เพื่อคำนวณหาปริมาณแรคโตพามีนที่มีอยู่ในตัวอย่าง แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหา %recovery และ %CV และทำการเปรียบเทียบตัวอย่างเนื้อสุกรที่ผ่านการเติมแรคโตพามีน ด้วย LC-MS/MS

โดยพิจารณาจากเกณฑ์มาตรฐานของ AOAC (2016) คือ สารที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1-10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า %recovery อยู่ในช่วง 60-115% และค่า %CV มีค่าเท่ากับหรือน้อยกว่า 32%

$$\%\text{Recovery} = \frac{\text{ค่า ImageJ ของ spiked sample} - \text{ค่า ImageJ ของ blank sample}}{100} \times 100$$

$$\%\text{CV} = \frac{\text{ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน}}{\text{ค่าเฉลี่ยของข้อมูล}} \times 100$$

3.4 การทดสอบความคงสภาพ (Stability)

โดยเก็บชุดแถบทดสอบในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 0, 3, 6 และ 9 เดือน นับจากวันผลิตชุดแถบทดสอบ ทำการทดสอบจำนวน 6 ซ้ำ สังเกตความเข้มสีของแถบทดสอบว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปหรือไม่ จากการอ่านค่าความเข้มสีของเส้นทดสอบด้วยโปรแกรม ImageJ

3.5 การเปรียบเทียบการทดสอบตัวอย่างด้วยชุดแถบทดสอบที่ผลิตขึ้นเองกับชุดแถบทดสอบทางการค้าและวิธี LC-MS/MS

ทดสอบตัวอย่างด้วยชุดแถบทดสอบที่ผลิตขึ้นเองและชุดแถบทดสอบทางการค้า โดยทำการเตรียมสารสกัดและใช้วิธีวิเคราะห์ตามวิธีของแต่ละชุดทดสอบ ทำการสุ่มตัวอย่างเนื้อสุกรและอาหารสุกร ชนิดละ 20 ตัวอย่าง จากตลาดและซุปเปอร์มาร์เก็ตทั่วไปในกรุงเทพมหานคร จากนั้นนำตัวอย่างเนื้อสุกรและอาหารสุกร มาสกัดเป็นสารสกัดและทดสอบด้วยชุดแถบทดสอบที่ผลิตขึ้นเอง ในกรณีใช้ชุดแถบทดสอบทางการค้า ใช้วิธีสกัดสารสกัดตามที่ชุดแถบทดสอบนั้นๆ กำหนด และนำสารสกัดมาทดสอบกับชุดแถบทดสอบตัวอย่างละ 2 ซ้ำ นอกจากนี้ทำการสุ่มตัวอย่างเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์ 5 ตัวอย่างจากทั้งหมดชนิดละ 20 ตัวอย่าง ส่งวิเคราะห์เพื่อยืนยันผล ด้วย LC-MS/MS ณ บริษัทห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด

4. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างผลทดสอบความคงสภาพของชุดแถบทดสอบ โดยการประเมินผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS ด้วยวิธีวิเคราะห์ analysis of variance และวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการศึกษาและวิจารณ์

วิธีการทดสอบความใช้ได้ของชุดแถบทดสอบและการแปลผล

1. การหาค่าความไวของชุดแถบทดสอบ

เมทริกซ์จากตัวอย่างทดสอบเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ ซึ่งอาจจะทำให้ได้ผลการทดสอบโดยเฉพาะค่าความไวที่เปลี่ยนแปลงไปจากเมื่อทดสอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ วิธีการเจือจางสารละลายตัวอย่างเป็นวิธีการที่นิยมทำ เพื่อลดผลข้างเคียงของเมทริกซ์ ก่อนหยดลงในชุดแถบทดสอบแรคโตพามีน จากการเจือจางสารสกัดเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์ ด้วย 0.25% PBS-T ที่อัตราส่วน 1:1, 1:2, 1:3 และ 1:4 พบว่าอัตราส่วนการเจือจางที่เหมาะสม สำหรับเนื้อสุกรและอาหารสุกรคือ 1:3 และ 1:2 ตามลำดับ โดยพิจาณาจากการไหลของสารละลายต่อเนื่องจาก sample pad ผ่านไปยัง absorbent pad ได้ และอัตราส่วนการเจือจางที่น้อยที่สุดของสารสกัดแต่ละชนิดที่ให้ผลทดสอบความเข้มสีบริเวณเส้นทดสอบใกล้เคียงกับเส้นควบคุม ดังนั้นอัตราส่วนการเจือจางที่เหมาะสมของสารสกัดแต่ละชนิดนี้ จะถูกนำไปเป็นวิธีการเตรียมสารทดสอบก่อนหยดลงในชุดแถบทดสอบแรคโตพามีน

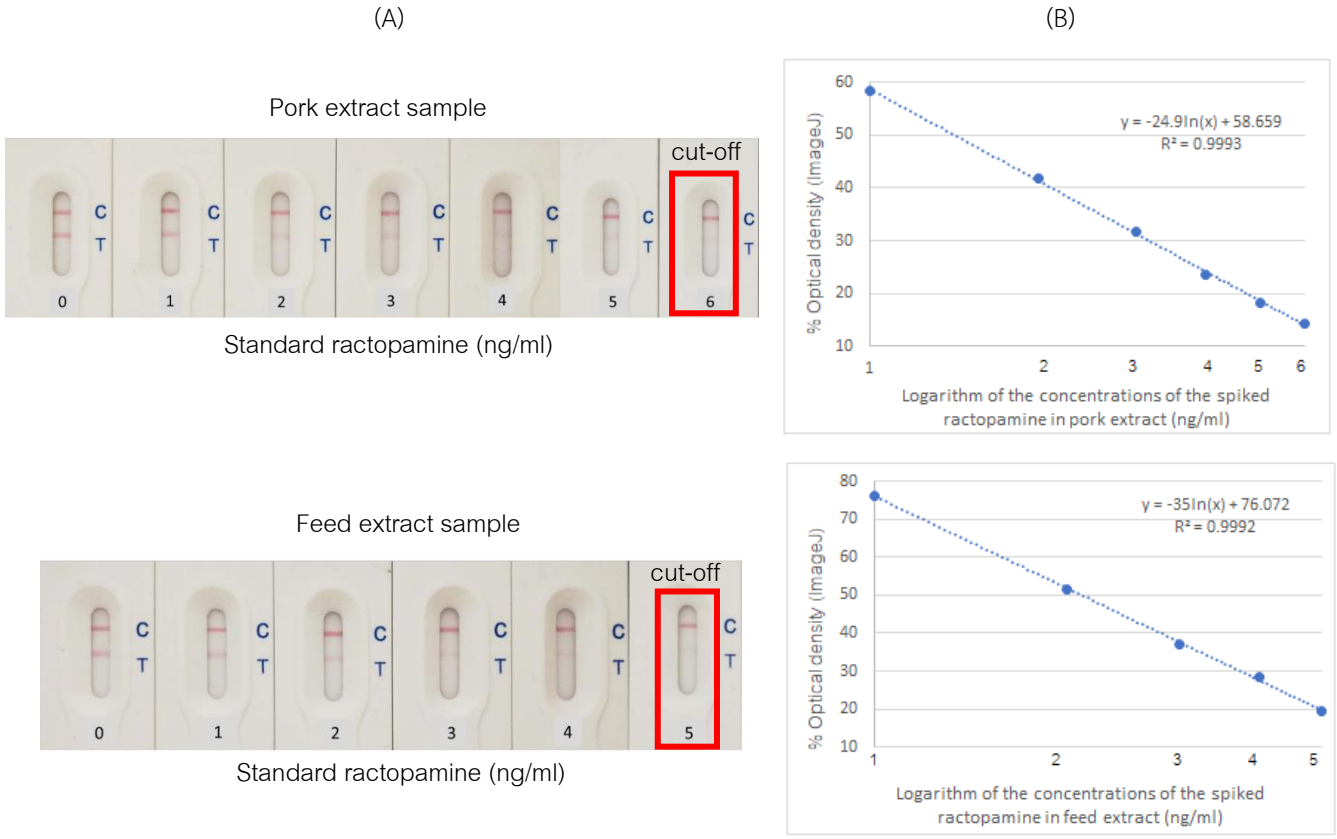

Figure 3 Ractopamine detection by lateral flow test strip

(A) cut-off of lateral flow test strip in pork extract and feed extract sample (B) Standard curves of ractopamine quantitation by lateral flow test strip between % optical density of ImageJ analysis and the logarithm of the concentrations of the spiked ractopamine in pork extract and feed extract sample

จากผลการทดลองหาค่าความไวของแถบทดสอบ พบว่าความเข้มสีที่บริเวณเส้นทดสอบจะลดลง เมื่อความเข้มข้นของแรคโตพามีนเพิ่มขึ้น ซึ่งให้ค่า cut-off ของแถบทดสอบที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากเนื้อสุกร และอาหารสุกร จากการแปลผลด้วยสายตา เท่ากับ 6 และ 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยพิจารณาจากค่าความเข้มข้นของแรคโตพามีนที่น้อยที่สุด ที่ทำให้ไม่ปรากฏแถบสี ณ บริเวณเส้นทดสอบ และทำการแปลผลบริเวณเส้นทดสอบด้วยโปรแกรม ImageJ นำมาสร้างกราฟมาตรฐานของแต่ละชนิดตัวอย่าง (**Figure 3**) จากกราฟมาตรฐานเส้นตรงของสารสกัดจากเนื้อสุกร และอาหารสุกร ให้ค่า R^2 เท่ากับ 0.9993 และ 0.9992 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ดียอมรับได้สำหรับการทำกราฟมาตรฐาน นอกจากนี้จากกราฟมาตรฐาน สามารถหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของแรคโตพามีนที่ตรวจวัดได้ (limit of detection, LOD) ในสารสกัดจากเนื้อสุกร และอาหารสุกร เท่ากับ 0.42 และ 0.89 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อพิจารณาการลดลงของสีที่ 20% โดยวัดความเข้มสีด้วยโปรแกรม ImageJ

2. การทดสอบความจำเพาะของชุดแถบทดสอบแรคโตพามีน

โดยทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามของชุดแถบทดสอบ ผลการทดลองพบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารเคลนบูเทอรอลและซัลบูทามอลเพิ่มสูงขึ้น ความเข้มสีบริเวณเส้นทดสอบยังคงปรากฏไม่จางลง ถึงแม้ว่าสารละลายเคลนบูเทอรอลและซัลบูทามอลที่ใช้มีความเข้มข้นสูงกว่าค่า cut-off 10 เท่า เมื่อเทียบกับแถบทดสอบที่ทดสอบด้วยสารละลายมาตรฐานแรคโตพามีนที่แถบสีของแถบทดสอบจางลงเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าชุดแถบทดสอบที่ผลิตขึ้นเองนี้ มีความจำเพาะกับแรคโตพามีนและไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามในช่วงความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ

3. การหาค่าความถูกต้องและแม่นยำของชุดแถบทดสอบ

การหาค่าความถูกต้องและความแม่นยำของชุดแถบทดสอบ พิจารณาจากค่าเฉลี่ยการกลับคืน (%recovery) และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%coefficient of variation; %CV) โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน (intra-variation assay) ความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ (**Table 1**) และวิเคราะห์ซ้ำต่างวัน (inter-variation assay) ความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ ทั้งหมด 3 วัน (**Table 2**)

Table 1 Intra-variation assay of accuracy and precision in pork and feed sample (n=6)

Spiked ractopamine concentration (ng/ml)	Ractopamine in sample (ng/ml)		%Recovery		%CV	
	Pork	Feed	Pork	Feed	Pork	Feed
1	0.90±0.04	0.99±0.05	89.77	99.14	4.39	4.94
2	1.75±0.07	2.01±0.05	87.47	100.37	3.90	2.68
3	2.72±0.11	2.95±0.01	90.73	98.34	3.87	0.42
4	3.67±0.11	3.97±0.07	91.73	99.29	3.03	1.76
5	4.35±0.17	4.94±0.04	87.02	98.90	3.97	0.74
6	5.45±0.19	-	90.88	-	3.47	-

Table 2 Inter-variation assay of accuracy and precision in pork and feed sample (N=3, n=6)

Day	Spiked ractopamine concentration (ng/ml)	Ractopamine in sample (ng/ml)		%Recovery		%CV	
		Pork	Feed	Pork	Feed	Pork	Feed
1	1	0.88±0.10	1.04±0.04	88.35	104.02	11.07	3.61
	2	1.73±0.21	2.06±0.09	86.46	103.18	12.27	4.18
	3	2.83±0.44	2.94±0.09	94.40	97.95	15.64	2.91
	4	3.75±0.30	3.98±0.34	93.85	99.40	8.02	8.65
	5	4.32±0.53	4.98±0.06	86.40	99.66	12.23	1.15
	6	5.51±0.35	-	91.85	-	6.44	-
2	1	0.94±0.17	0.94±0.11	94.22	94.22	17.83	11.68
	2	1.69±0.21	2.00±0.09	84.68	100.09	12.11	4.25
	3	2.71±0.35	2.96±0.38	90.38	98.76	12.88	12.81
	4	3.71±0.49	4.04±0.28	92.76	100.98	13.17	7.05
	5	4.54±0.52	4.91±0.49	90.75	98.20	11.39	10.00
	6	5.24±0.37	-	87.35	-	7.05	-
3	1	0.87±0.11	0.99±0.15	86.74	99.19	12.85	15.18
	2	1.83±0.32	1.96±0.19	91.27	97.83	17.60	9.51
	3	2.62±0.40	2.95±0.12	87.41	98.32	15.13	3.92
	4	3.54±0.38	3.90±0.28	88.59	97.49	10.82	7.25
	5	4.20±0.39	4.94±0.26	83.92	98.84	9.41	5.17
	6	5.61±0.77	-	93.44	-	13.73	-

ผลการทดลองพบว่าตัวอย่างเนื้อสุกร มีค่า %recovery อยู่ในช่วง 86.46-94.22% และตัวอย่างอาหารสุกร อยู่ในช่วง 97.49-104.02% ค่า %CV ของเนื้อสุกร มีค่าอยู่ในช่วง 3.03-15.64% และตัวอย่างอาหารสุกรอยู่ในช่วง 0.74-15.18% ซึ่งค่า %recovery และ %CV ที่ได้นี้ เป็นค่าที่อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ตามเกณฑ์มาตรฐานของ AOAC (2016) คือ สารที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1-10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า %recovery อยู่ในช่วง 60-115% และค่า % CV มีค่าเท่ากับหรือน้อยกว่า 32% แสดงว่าชุดแถบทดสอบที่ผลิตขึ้นเองนี้อยู่ในเกณฑ์ความเชื่อมั่นและยอมรับได้

จากการเปรียบเทียบค่า %recovery จากตัวอย่างเนื้อสุกรที่ผ่านการเติมแรคโตพามีนความเข้มข้น 2, 4, และ 6 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทดสอบกับชุดแถบทดสอบที่ผลิตขึ้นนี้กับวิธีทดสอบเพื่อยืนยันผลด้วยเครื่อง LC-MS/MS โดยส่งตัวอย่างวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) พบว่าให้ผลทดสอบใกล้เคียงกับความเข้มข้นของแรคโตพามีนที่เติมลงไป ซึ่งแสดงชุดทดสอบนี้มีความถูกต้องน่าเชื่อถือ (**Table 3**) ส่วนในตัวอย่างอาหารสุกร ไม่มีผลเปรียบเทียบ เนื่องจากห้องปฏิบัติการกลาง ประเทศไทยไม่มีบริการทดสอบในอาหารสัตว์

Table 3 Comparison of lateral flow test strip and LC-MS/MS method for ractopamine detection in pork sample

Sample	Spiked ractopamine concentration (ng/ml)	Ractopamine in sample (ng/ml)	
		Test strip	LC-MS/MS
Pork	2	1.75	2.19
	4	3.67	4.04
	6	5.45	6.19

4. ความคงสภาพของชุดแถบทดสอบ

ทำการทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อความคงสภาพของชุดแถบทดสอบแรคโตพามีน คือ อุณหภูมิและระยะเวลา ในการเก็บรักษาชุดแถบทดสอบ โดยเก็บชุดแถบทดสอบที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบกำหนดระยะเวลา 0, 3, 6, และ 9 เดือน นับจากวันผลิตชุดแถบทดสอบ นำชุดแถบทดสอบมาหยดทดสอบและวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ ประเมินผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS ด้วยวิธีวิเคราะห์ analysis of variance และวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's multiple range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ผลการทดลองพบว่าค่าความเข้มสีของแถบทดสอบที่เก็บ ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 0-9 เดือน และที่อุณหภูมิห้องระยะเวลา 0-9 เดือน ไม่มีความแตกต่างกัน ในขณะที่ค่าความเข้มสีของแถบทดสอบที่เก็บ ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสระยะเวลา 9 เดือนมีค่าความเข้มสีลดลงความแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นๆ (**Table 4**) แสดงให้เห็นว่าชุดแถบทดสอบที่ผลิตขึ้นเอง มีความเสถียรและสามารถเก็บรักษาได้เป็นระยะเวลานาน อีกทั้งสามารถเก็บได้ในช่วงอุณหภูมิกว้าง ทั้งที่อุณหภูมิห้อง (28 – 35 องศาเซลเซียส) และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยชุดแถบทดสอบไม่เสื่อมสภาพ โดยทั่วไปเมื่อแอนติบอดี อยู่ในรูปสารละลายจะมีความเสถียรน้อยกว่าเมื่ออยู่ในรูปแบบแห้ง ไม่ว่าจะเก็บที่อุณหภูมิต่ำหรืออุณหภูมิห้อง ทั้งนี้สำหรับสภาวะที่ใช้ในการเก็บรักษาชุดแถบทดสอบ มาศวลัย ลิขิตธนเศรษฐ์ และคณะ (2556) ได้รายงานการเก็บรักษาชุดทดสอบอิมมูโนโครมาโทกราฟีชนิดทราบผลรวดเร็ว สำหรับคลอแรมเฟนคอล ในเภสัชเคมีภัณฑ์ ในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 45 และที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วัน และ 30 วัน ตามลำดับ พบว่าสภาวะที่ทดสอบไม่ส่งผลต่อความไวและความจำเพาะของชุดทดสอบ นอกจากนี้การเก็บรักษาชุดทดสอบทางการค้าสำหรับแรคโตพามีน ที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้ แนะนำไว้ที่ 4-30 องศาเซลเซียส มีอายุการใช้งาน 1 ปี นับจากวันผลิต แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีมีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิกว้างและเก็บได้เป็นระยะเวลานาน

Table 4 Stability of lateral flow test strip at 4°C and room temperature

Period (month)	ImageJ analysis	
	4°C	Room temperature
0	22.31±2.61[a]	22.31±2.61[a]
3	19.89±2.19[ab]	21.27±2.28[ab]
6	19.39±1.16[ab]	20.60±2.09[ab]
9	18.44±2.29[b]	19.94±2.45[ab]

[a,b] Means±standard deviation in the same column with different superscript are significantly different (P<0.05) according to Duncan multiple range test

5. การเปรียบเทียบการทดสอบตัวอย่างด้วยชุดแถบทดสอบที่ผลิตขึ้นเองเปรียบเทียบกับชุดแถบทดสอบทางการค้าและวิธี LC-MS/MS

ทดสอบการใช้งานชุดทดสอบที่ผลิตขึ้นเองและชุดทดสอบทางการค้า จากบริษัท Biopanda Reagents ทำการสุ่มตัวอย่างเนื้อสุกรและอาหารสุกร อย่างน้อยชนิดละ 20 ตัวอย่าง จากตลาดและซุปเปอร์มาร์เก็ตทั่วไปในกรุงเทพมหานคร จากนั้นนำตัวอย่างมาสกัดเป็นสารสกัด โดยทำการเตรียมสารสกัดและใช้วิธีวิเคราะห์ตามวิธีของแต่ละชุดทดสอบ โดยรายงานผลเป็น ผลบวก (+) ในกรณีชุดทดสอบปรากฏแถบสีของเส้นควบคุมเส้นเดียว แสดงว่ามีการตกค้างของแรคโตพามีน ในปริมาณมากกว่าหรือเท่ากับค่า cut-off ของชุดแถบทดสอบ แต่ถ้าชุดทดสอบปรากฏแถบสีสองเส้น ทั้งบริเวณเส้นควบคุมและและเส้นทดสอบ แสดงว่ามีการตกค้างของแรคโตพามีน ในปริมาณที่น้อยกว่าค่า cut-off ของชุดแถบทดสอบ รายงานผลเป็น ผลลบ (-) จากการทดลองพบว่า ผลทดสอบจากชุดแถบทดสอบที่ผลิตขึ้นเองและชุดแถบทดสอบทางการค้า ให้ผลการทดสอบสอดคล้องกัน คือให้ผลเป็นผลลบ แสดงว่าไม่พบการตกค้างของแรคโตพามีนในตัวอย่างที่นำมาทดสอบ

สรุป

ชุดแถบทดสอบสำหรับตรวจวัดแรคโตพามีนที่พัฒนาขึ้นมานี้ ได้นำมาทดสอบความใช้ได้ของวิธี เพื่อใช้ตรวจวัดการตกค้างของแรคโตพามีนในตัวอย่างเนื้อสุกร และอาหารสุกร พบว่าสารสกัดตัวอย่างทั้งจากเนื้อสุกรและอาหารสุกร ต้องมีขั้นตอนการเจือจางก่อนนำหยดลงชุดแถบทดสอบ ค่า cut-off ของชุดแถบทดสอบเท่ากับ 6 และ 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ผลของค่าความถูกต้องและแม่นยำ อยู่ในเกณฑ์ที่ยอบรับได้ การศึกษาความคงสภาพ โดยเก็บที่อุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 0-9 เดือน ชุดแถบทดสอบยังมีสภาพดี และจากการเก็บตัวอย่างเนื้อสุกรจากตลาด นำตรวจวัดแรคโตพามีนตกค้างด้วยชุดแถบทดสอบที่มีจำหน่ายกับที่ผลิตขึ้นเอง ให้ผลทดสอบสอดคล้อง นั่นแสดงให้เห็นว่าชุดแถบทดสอบสำหรับตรวจวัดแรคโตพามีนที่พัฒนาขึ้นมานี้ มีประสิทธิภาพดี มีขั้นตอนทดสอบเพียงขั้นเดียว ให้ผลทดสอบที่รวดเร็วภายใน 15 นาที อ่านผลด้วยตาเปล่าสามารถนำไปใช้ในการตรวจวัดการตกค้างของแรคโตพามีนในตัวอย่างเนื้อสุกรและอาหารสุกร เพื่อใช้เป็นวิธีคัดกรองเบื้องต้นได้ ซึ่งจะช่วยลดค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์เพื่อยืนยันผล

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย SRI6120204 จากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ทุนสนับสนุนวิจัยโครงการทุนหลังปริญญาเอก และโครงการวิจัยเลขที่ CU_GR_62_80_61_03 กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นอกจากนี้ขอขอบคุณกลุ่มงานวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์และฮอร์โมน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ และจากกลุ่มงานวิเคราะห์สารตกค้างในอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง ด้วยวิธี LC-MS/MS

เอกสารอ้างอิง

มาศวลัย ลิขิตธนเศรษฐ์, วลัยลักษณ์ เมธาภัทร, และสุขศรี อึ้งบริบูรณ์ไพศาล. 2556. การพัฒนาชุดทดสอบอิมมูโนโครมาโทกราฟีชนิดทราบผลเร็วสำหรับคลอแรมเฟนิคอลในเภสัชเคมีภัณฑ์. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 55 (4): 214-223.

AOAC. 2016. Guidelines for standard method performance requirements AOAC official methods of analysis. Available: http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf. Accessed May. 11, 2017.

Buakeaw, A., S. Puthong, P. Kongkavitoon, K. Khongarsa, K. Komolpis, and N. Khongchareonporn. 2016. Production of monoclonal antibodies for ractopamine residue detection in pork. Maejo International Journal of Science and Technology. 10: 175 – 186.

Codex Alimentarius. 2015. Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods CAC/MRL 2-2015. Available: http://www.codexalimentarius.org/download/standards/45/MRL2_2015e.pdf. Accessed May. 11, 2017.

Ding, G., D. Li, J. Qin, J. Zhu, B. Wang, Q. Geng, M. Guo, D. Punyapitak, and Y. Cao. 2015. Development and validation of high-performance liquid chromatography method for determination of ractopamine residue in pork samples by solid phase extraction and pre-column derivatization. Meat Science. 106: 55-60.

European Food Safety Authority. 2009. Safety evaluation of ractopamine: scientific opinion of the panel on additives and products or substances used in animal feed. Available: https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2009.1041. Accessed Sep. 20, 2018.

FDA. 2003. New animal drugs; ractopamine. Federal Register 68: 54658-54659. Available: https://www.federalregister.gov/documents/2003/09/18/03-23892/new-animal-drugs-ractopamine. Accessed Sep. 20, 2018.

Gu, H., L. Liu, S. Song, H. Kuang, and C. Xu. 2016. Development of an immunochromatographic strip test assay for ractopamine detection using an ultrasensitive monoclonal antibody. Food and Agricultural Immunology. 27: 471-483.

He, P., L. Zhang, and T. Yang. 2008. Determination of ractopamine in swine feed and urine using an indirect competitive immunoassay. Journal of Animal and Veterinary Advances. 7: 268-275.

Li, X., G. Zhang, R. Deng, Y. Yang, Q. Liu, Z. Xiao, J. Yang, G. Xing, D. Zhao, and S. Cai. 2010. Development of rapid immunoassays for the detection of ractopamine in swine urine. Food Additives and Contaminants. 27: 1096-1103.

Preechakasedkit, P., N. Ngamrojanavanich, N. Khongchareonporn, and O. Chailapakul. 2019. Novel ractopamine–protein carrier conjugation and its application to the lateral flow strip test for ractopamine detection in animal feed. Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology). 1673-1581.

Wu, J., X. Liu, and Y. Peng. 2014. Determination of ractopamine in pig hair using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. 69: 211-216.

Zhang, Y., F. X. Wang, L. Fang, S. Wang, and G. Z. Fang. 2009. Rapid determination of ractopamine residues in edible animal products by enzyme-linked immunosorbent assay: Development and investigation of matrix effects. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2009: 1-9.

Zhang, H.Y. and S. Wang. 2009. Review on enzyme-linked immunosorbent assays for sulfonamide residues in edible animal products. Journal of Immunological Methods. 350: 1-7.

Zhang, M. Z., M. Z. Wang, Z. L. Chen, J. H. Fang, M. M. Fang, J. Liu, and X. P. Yu. 2009. Development of a colloidal gold-based lateral-flow immunoassay for the rapid simultaneous detection of clenbuterol and ractopamine in swine urine. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 395: 2591-2599.

Zhang, Y., X. Gao, A. Gao, and M. Fan. 2012. A biotin-streptavidin amplified enzyme-linked immunosorbent assay with improved sensitivity for rapid detection of ractopamine in muscular tissue. Food Analytical Methods. 5(5): 1214-1220.