

CHẾ TẠO KIT XÁC ĐỊNH NHANH CLENBUTEROL TRONG THỨC ĂN GIA SÚC BẰNG KỸ THUẬT SẮC KÝ MIỄN DỊCH

Lê Trọng Văn, Hoàng Thế Yên, Nguyễn Thị Nga, Phạm Thu Hương, Nguyễn Thị Hằng, Trần Minh Trí, Nguyễn Thành Đạt

Viện Kỹ thuật Hóa sinh và Tài liệu nghiệp vụ - Tổng cục VI - Bộ Công an

TÓM TẮT

Clenbuterol (4-amino-(*t*-butylamino) methyl)-3,5-dichlorobenzylalcohol hydrochloride) thuộc họ β -agonist, là nhóm chất có tác động lên thụ thể beta 2 trên tế bào cơ (beta 2-agonist receptor). Một số nghiên cứu cho thấy β_2 -agonist bao gồm cả Clenbuterol làm tăng phát triển mô cơ và giảm chất béo trong cơ thể. Khi động vật ăn thức ăn có chứa hợp chất β_2 -agonist, dư lượng còn lại trong thịt sẽ ảnh hưởng đến sức khỏe người sử dụng. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày quá trình nghiên cứu để đi đến chế tạo bộ KIT phát hiện nhanh Clenbuterol trong thức ăn gia súc bằng phương pháp sắc ký miễn dịch (immunochromatography). Đây là kỹ thuật được ứng dụng nhiều trong chế tạo các KIT phát hiện nhanh vì tính ưu việt của nó là gọn nhẹ, nhanh và chính xác. Đã có nhiều sản phẩm que thử (test strip) được nghiên cứu và sản xuất: que thử ma túy, que thử thai, que thử thuốc kháng sinh... Phản ứng miễn dịch để nhận biết sự có mặt của Clenbuterol xảy ra trên màng mỏng theo kiểu ức chế (inhibitor). Trong đó, có sử dụng kháng thể đơn dòng gắn hạt vàng kích cỡ nano đóng vai trò là chất phát hiện (detection), một kháng nguyên cộng hợp protein tại vạch T và một kháng thể đa dòng gắn (kháng loài) cố định trên màng tại vạch C. Clenbuterol trong mẫu nếu có sẽ kết hợp với kháng thể đơn dòng gắn vàng (gold conjugate) để tạo lên một phức hợp. Phức hợp này sẽ chạy trên màng theo kiểu mao dẫn, nhưng không gắn được với Clenbuterol cố định trên màng để tạo thành vạch T. Nếu trong mẫu không có Clenbuterol, phức hợp này sẽ gắn với Clenbuterol cố định trên màng để tạo nên vạch T. Trong cả hai trường hợp kháng thể đơn dòng gắn vàng đều bị bắt giữ bởi kháng thể đa dòng để tạo lên vạch màu tại vạch C. Kết quả là nếu trong mẫu có Clenbuterol thì trên màng có một vạch màu tại vị trí C, nếu không có Clenbuterol xuất hiện hai vạch màu tại T và C. Sau nhiều nghiên cứu, lựa chọn các thành phần cấu tạo, và tối ưu hóa các kháng thể theo phương pháp thuộc bản quyền của Hãng ARISTA (Mỹ), chúng tôi đi đến chế tạo được bộ KIT có khả năng kiểm tra nhanh Clenbuterol trong thức ăn gia súc, cho kết quả trong 10 phút, giới hạn phát hiện trong nước 5 ppb; trong thức ăn gia súc là 0,0625 mg/kg. Tỷ lệ dương tính giả là 3,6%, độ chính xác là 97%. Bộ KIT có cấu tạo đơn giản, phù hợp với công tác kiểm tra cơ động, đáp ứng được công tác kiểm soát dư lượng Clenbuterol hiện nay tại Việt Nam.

Từ khóa: Chất bắt giữ, Clenbuterol, sắc ký miễn dịch, kit thử nhanh

MỞ ĐẦU

Clenbuterol khi sử dụng với liều cao gấp mười đến hàng trăm lần sẽ làm tăng sự phát triển mô cơ và đồng thời làm giảm khả tích trữ các chất béo ở động vật (Hooijerink *et al.*, 1991; Salleras *et al.*, 1995). Nhiều nghiên cứu đã chứng tỏ rằng sử dụng thực phẩm có chứa Clenbuterol sẽ gây hại cho cơ thể ở mức độ nhẹ chúng gây ra rối loạn nhịp tim, hô hấp, ở liều lượng cao có thể tử vong (Jemo *et al.*, 1996). Do vậy, hầu hết các nước trên thế giới đã cấm sử dụng Clenbuterol trong chăn nuôi. Tại Việt Nam đã cấm sản xuất, nhập khẩu, lưu thông và sử dụng thức ăn chăn nuôi có chứa Clenbuterol từ năm 2002 (Quyết định số 54/QĐ-BNN).

Mặc dầu vậy, trong những năm qua có nhiều báo cáo vi phạm về sử dụng Clenbuterol trong thức ăn

chăn nuôi và phát hiện tồn dư Clenbuterol trong sản phẩm thịt gia súc tại Việt Nam. Sự việc này đã gây tâm lý hoang mang cho người tiêu dùng thực phẩm. Do vậy vấn đề kiểm soát dư lượng Clenbuterol đã trở lên rất cấp bách.

Để phân tích Clenbuterol, hiện nay phải sử dụng kỹ thuật phân tích máy: Kit ELISA, Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), Sắc ký khí khối phổ (GC MS)... Các phương pháp này phải thực hiện trong các phòng thí nghiệm với loại máy móc, chi phí phân tích cao, tốn thời gian, không thể sử dụng để kịp thời phát hiện nhanh các vi phạm trong công tác kiểm soát dư lượng. Trước thực tế đó, một công cụ có thể phát hiện nhanh Clenbuterol trong các mẫu thức ăn gia súc ngay tại chợ, cơ sở sản xuất, cơ sở chế biến ... trong vài phút sẽ là một giải pháp hữu hiệu phục vụ đặc lực cho công tác quản lý sử dụng Clenbuterol

hiện nay.

Trên thế giới các kit nhanh dạng que nhúng được sử dụng để kiểm tra Clenbuterol trong nước tiểu động vật, trong phủ tạng và thịt gia cầm gia súc. Các Kit này đều dựa trên phản ứng miễn dịch trên màng mỏng theo kiểu sắc ký miễn dịch hay còn gọi là dạng que nhúng (dipstick). Đây là phương pháp phân tích, được áp dụng phổ biến trong chế tạo các công cụ phát hiện ma túy, chất độc, hormone... vì cho kết quả nhanh, cấu tạo rất nhỏ gọn và sử dụng tiện lợi.

Viện E17, Tổng cục Kỹ thuật, Bộ Công an là đơn vị đầu tiên tại Việt Nam được trang bị các thiết bị có thể nghiên cứu chế tạo các Kit thuộc dạng sắc ký miễn dịch theo công nghệ của Mỹ. Đến nay, Viện đã nghiên cứu và sản xuất được nhiều loại que thử nhanh như que thử ma túy, độc chất, Hb, PSA... Trên cơ sở này, chúng tôi đặt vấn đề nghiên cứu chế tạo que thử nhanh Clenbuterol với mục tiêu là chế tạo được bộ Kit có thể kiểm tra nhanh sự có mặt của Clenbuterol – một hợp chất đã bị cấm sử dụng trong thức ăn chăn nuôi - phục vụ công tác kiểm soát dư lượng Clenbuterol trong thực phẩm hiện nay.

Để đi đến chế tạo được bộ KIT hoàn chỉnh bao gồm cả dụng cụ hỗ trợ xử lý mẫu phải trải qua nhiều nghiên cứu: nghiên cứu định hướng chế tạo; nghiên cứu lựa chọn nguyên liệu thô (raw materials); nghiên cứu xác định kháng thể phát hiện, kháng nguyên cộng hợp và các nghiên cứu xác định.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu và hóa chất

Clenbuterol và một số hợp chất thuộc nhóm beta - agonist mua của hãng Merck. Kháng nguyên cộng hợp Clenbuterol – BSA, kháng thể đơn dòng kháng Clenbuterol cộng hợp vàng, của ARISTA (Mỹ, kháng thể đa dòng kháng IgG chuột sản xuất tại Viện E17 và được tinh chế bằng cột ái lực protein G. Màng nitrocellulose của hãng MDI) Các loại nguyên liệu thô sử dụng cho chế tạo Kit của Việt Nam. Thiết bị: phòng sạch có khống chế và điều chỉnh độ ẩm; máy định lượng và trải hóa chất lên màng; máy cắt của Mỹ; tủ sấy chân không, máy ổn nhiệt; máy sấy. Các dụng cụ thủy tinh, cân, máy đo pH, máy lắc voltex, pipet các loại. Mẫu thức ăn gia súc dạng bột đã được kiểm định không có Clenbuterol.

Phương pháp nghiên cứu

Theo nguyên tắc của công nghệ sản xuất Kit thử

nhanh dạng sắc ký miễn dịch của hãng ARISTA (Mỹ), cần phải tiến hành lần lượt các nghiên cứu sau:

1- Nghiên cứu lựa chọn nguyên liệu: đặc biệt là các loại màng, màng thấm mẫu, màng mang kháng thể cộng hợp vàng, màng nitrocellulose. Các nguyên liệu này có nhiều loại, nhiều nguồn gốc và chỉ tiêu kỹ thuật rất khác nhau, với mỗi ứng dụng (mỗi loại que thử) cần phải có nghiên cứu, thử nghiệm để đánh giá, lựa chọn các nguyên liệu phù hợp. Với các màng cần phải xử lý trả cần phải nghiên cứu lựa chọn hệ đệm thích hợp và quy trình xử lý các màng này (cách ngâm tẩm, sấy khô, bảo quản). Với mỗi loại màng phải xác định được hệ đệm và quy trình xử lý riêng (Krishnamoorthy *et al.*, 2000; Nazareth, 2001).

2- Nghiên cứu tối ưu hóa nồng độ các chất rải trên màng:

+ Tối ưu hóa nồng độ chất bắt giữ tại vạch kiểm tra (vạch T) và vạch đối chứng (vạch C) (Kevin, 2001).

Chất bắt giữ tại vạch C pha trong hệ đệm phosphat buffer saline (PBS) 10 mM có pH 7,4 [3] với nồng độ khác nhau: 2,5; 2; 1,5; 1; 0,5; 0,1 mg/ml. Chất bắt giữ tại vạch T được pha trong hệ đệm PBS 0,01 M có pH 7,4 thành nồng độ: 1,5; 1; 0,5; 0,1 0,05; 0,025 mg/ml. Màng sau khi trải được khóa các liên kết không đặc hiệu bằng hệ đệm phosphate với nồng độ Triton X-100 = 1,5% (Fishers, 1998). Kết quả được xác định dựa trên cường độ vạch màu trên màng.

+ Xác định tỷ lệ pha kháng thể cộng hợp vàng.

Kháng thể đơn dòng cộng hợp vàng được pha trong đệm PBS có pH 7,4 với tỷ lệ: (1 : 5); (1 : 10); (1 : 15); (1 : 20); (1 : 25); (1 : 30); (1 : 35). Trải lên màng chứa kháng thể cộng hợp đã xử lý ở mật độ 1 mcg/cm. Mỗi tỷ lệ pha loãng trải trên 1 đường dọc lập. Sấy khô. Kết quả được đánh giá bằng cường độ màu tại các vạch T và C (Julian *et al.*, 2003).

3- Xây dựng quy trình chế tạo que thử: trên cơ sở các số liệu nghiên cứu, tối ưu và các nguyên liệu phù hợp để xây dựng quy trình chế tạo que thử Clenbuterol.

4- Xác định thông số kỹ thuật của que thử.

+ Giới hạn phát hiện:

Trong nước: pha loãng chất cần phát hiện tại các nồng độ khác nhau. Xác định giới hạn phát hiện là nồng độ thấp nhất mà tại đó que thử vẫn cho kết quả dương tính. Thí nghiệm được lặp lại với 6 que

thứ khác nhau tại một nồng độ.

+ Trong mẫu thức ăn: 07 mẫu thức ăn gia súc không có dư lượng beta agonist (kiểm tra bằng GC), bổ sung thêm Clenbuterol HCl tinh khiết (chất chuẩn) để tạo thành các mẫu có nồng độ là: 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03 mg/kg. Tiến hành kiểm tra các mẫu bằng bộ kit theo đúng hướng dẫn sử dụng của que thử. Tại mỗi mẫu kiểm tra 5 lần với 5 que thử khác nhau. Xác định giới hạn phát hiện là giá trị hàm lượng Clenbuterol của mẫu có nồng độ Clenbuterol thấp nhất mà que thử cho kết quả dương tính rõ.

+ Độ nhạy và độ đặc hiệu (Judith, Tenafly, 1995):

Que thử được kiểm tra với một tập hợp mẫu gồm mẫu có và không có Clenbuterol để xác định khả năng dương tính thật và âm tính giả. Kết quả được tính toán ra tỷ lệ %.

Kiểm tra dư lượng Clenbuterol của 107 mẫu cá m thu thập được bằng test nhanh và GC - MS. Kết quả phân tích các mẫu bằng GC- MS cho thấy 24 mẫu có giá trị dư lượng Clenbuterol và 83 mẫu không có dư lượng Clenbuterol.

Kiểm tra các mẫu bằng que thử que thử nhanh: 24 mẫu có dư lượng > 0,06 mg/kg cho kết quả dương tính rõ. Trong số 83 mẫu còn lại kết quả có 3 mẫu cho kết quả dương tính, 80 mẫu cho kết quả âm tính.

+ Khả năng phản ứng chéo:

Que thử sẽ được kiểm tra khả năng gây phản ứng chéo của một số chất sử dụng trong dược phẩm có cơ chế tác động tới nhóm β -agonist receptor giống với Clenbuterol như: sabutamol; fenoterol; ritodrine; terbutaline. Các chất này sẽ được pha ở các nồng độ trong nước.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Chọn nồng độ phù hợp để pha chất bắt giữ tại vạch T và vạch C

+ Chất bắt giữ tại vạch C.

Kết quả từ hình 1 cho thấy, độ nét của vạch C trên que giảm dần theo nồng độ chất bắt giữ tại vạch C mặc dù tỷ lệ pha loãng chất cộng hợp màu là 1:1 nhằm mục đích tạo lượng dư chất cộng hợp màu. Vạch đậm nhất ở nồng độ 2,5 mg/ml, và mờ nhất ở nồng độ 0,1 mg/ml, do đó chúng tôi chọn nồng độ

phù hợp nhất 2 mg/ml để có thể đọc kết quả rõ ràng, độ nét vừa phải, tốn ít hóa chất.

+ Chất bắt giữ tại vạch kiểm tra.

Hình 2 cho thấy, nồng độ chất bắt giữ tại vạch T khác nhau thì khả năng bắt giữ khác nhau và có ảnh hưởng đến độ nét của vạch T. Chúng tôi chọn nồng độ 1 mg/ml, đây là nồng độ phù hợp cho phép đọc kết quả tốt, độ nét vừa phải, tốn ít hóa chất.

Chọn tỷ lệ phù hợp để pha chất cộng hợp màu

Trong một dãy tỷ lệ pha trên hình 3 cho thấy, tỷ lệ pha có độ nét và phù hợp là tỷ lệ (1 : 5); (1 : 10); (1 : 15). Các tỷ lệ còn lại đều cho kết quả hai vạch mờ nhạt. Tuy nhiên, trong 3 tỷ lệ pha được xem là rõ nét, để đọc kết quả thì chúng tôi chọn tỷ lệ pha (1 : 5). Cũng không nên chọn các tỷ lệ cao hơn vì có thể chúng sẽ thừa trong phản ứng hoặc quá đậm điều này sẽ rất hao tốn hóa chất.

Xác định giới hạn phát hiện của que thử (Hình 4)

Trong đó mẫu M1 là mẫu không có Clenbuterol.

Kết quả ở bảng 1 cho thấy giá trị thấp nhất mà que thử còn cho kết quả dương tính ứng với mẫu có nồng độ 5 ppb. Như vậy, giới hạn phát hiện của que thử trong nước tương ứng là 5 ppb.

Đối với mẫu thức ăn gia súc (Bảng 2) cho thấy: giá trị phát hiện nhỏ nhất của que thử trong mẫu thức ăn gia súc khi kiểm tra trực tiếp không qua tách chiết làm giàu là 0,0625 mg/kg. Nồng độ này là thấp so với lượng thường được bổ sung trong cám. Zhang 2004 đã phát hiện dư lượng clenbuterol trong thịt và gan lợn bằng kỹ thuật HPLC là 1,2 ng/g (Zhang Xue-zhu *et al.*, 2004). Do vậy, để đảm bảo đơn giản và thuận tiện cho quá trình sử dụng, chúng tôi thấy không cần thiết áp dụng thêm biện pháp chiết mà sử dụng que thử theo cách thử trực tiếp với công cụ tách đơn giản kèm theo que thử. Với cấu tạo này, que thử có thể kiểm tra cơ động tại mọi nơi mọi lúc mà không cần sự tham gia của bất cứ dụng cụ nào khác.

Xác định độ nhạy và độ đặc hiệu của que thử

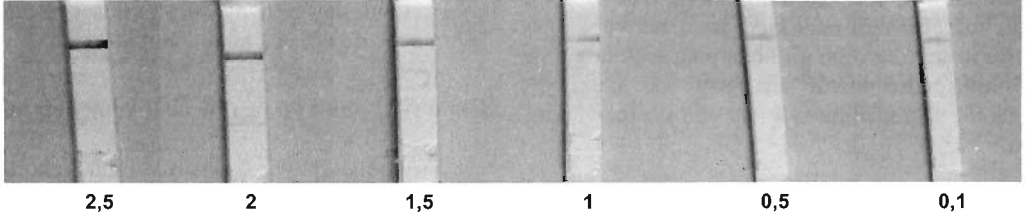
Như vậy, tỷ lệ dương tính giả của test là $\frac{3}{83} \times 100 = 3,6\%$. Độ chính xác của test sẽ là $\frac{104}{107} = 97\%$.

Chúng tôi cũng tiến hành xác định khả năng phản ứng chéo của que thử với một số chất thuộc

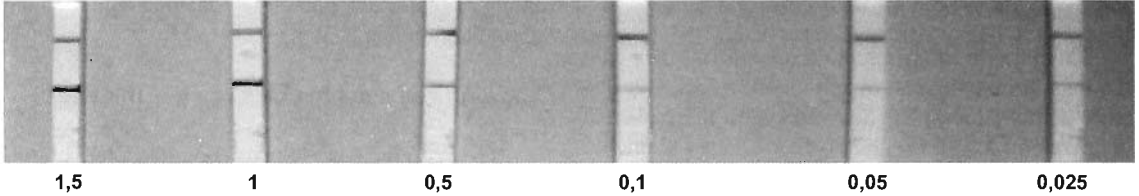
nhóm β -agonist khác: salbutamol; fenoterol; ritodrine; terbutaline.

phản ứng chéo tại nồng độ 1 ppm. Simon và đồng tác giả (2001) đã sử dụng biosenor để phát hiện Clenbuterol và thấy rằng khả năng phản ứng chéo với 7 loại beta-agonist khác.

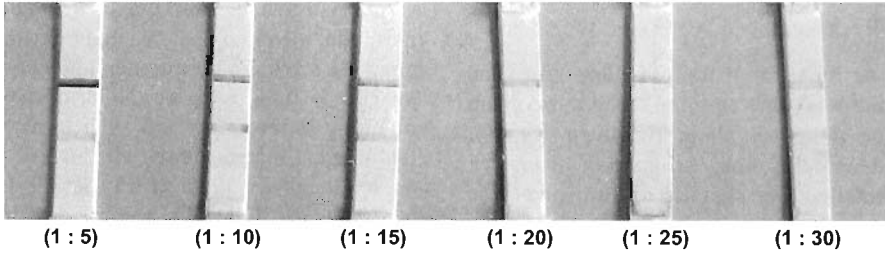
Kết quả cho thấy, các chất trên có khả năng gây



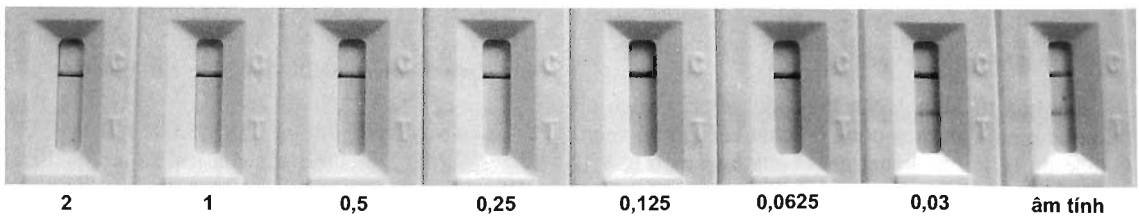
Hình 1. Ảnh hưởng nồng độ (mg/ml) chất bắt giữ tại vạch C đến độ nét.



Hình 2. Ảnh hưởng nồng độ (mg/ml) chất bắt giữ tại vạch T đến độ nét.



Hình 3. Ảnh hưởng tỷ lệ pha loãng chất cộng hợp màu đến độ nét của T và C line.



Hình 4. Thử nghiệm xác định giới hạn phát hiện trong thức ăn gia súc.

Bảng 1. Kết quả xác định giới hạn phát hiện trong mẫu nước.

Mẫu	Hàm lượng Clenbuterol trong mẫu (ppb)	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5	Test 6
M 1	0	-	-	-	-	-	-
M 2	80	+	+	+	+	+	+
M 3	40	+	+	+	+	+	+
M 4	20	+	+	+	+	+	+
M5	10	+	+	+	+	+	+
M 6	5	+	+	+	+	+	+
M 7	2,5	-	-	-	-	-	-
M 8	1	-	-	-	-	-	-

Bảng 2. Kết quả xác định giới hạn phát hiện trong mẫu thức ăn gia súc.

Mẫu	Hàm lượng Clenbuterol trong mẫu (mg/kg)	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4
M 1	0	-	-	-	-
M 2	2	+	+	+	+
M 3	1	+	+	+	+
M 4	0,5	+	+	+	+
M5	0,25	+	+	+	+
M 6	0,125	+	+	+	+
M 7	0,0625	+	+	+	+
M 8	0,03	-	-	-	-

Bảng 3. Kết quả thử nghiệm xác định mức độ dương tính giả và độ chính xác.

Mẫu	Số lượng	Kết quả thử	
		Dương tính	Âm tính
Mẫu có dư lượng clenbuterol >0,06 mg/kg	24	24	0
Không có dư lượng	83	3	80
Tổng	107		

KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu thực nghiệm đã xác định được: nồng độ các kháng thể tối ưu tại vạch T là 2 mg/ml, nồng độ kháng thể tại vạch C là 1 mg/ml; tỷ lệ pha loãng kháng thể cộng hợp vàng là 1:5, và đã xác định được các nguyên liệu, các hệ đệm và quy trình xử lý tương ứng cho mỗi loại nguyên liệu để đi đến chế tạo Kit thử nhanh Clenbuterol trong thức ăn gia súc có chỉ tiêu kỹ thuật như sau: giới hạn phát hiện trong nước là 5 ppb; giới hạn phát hiện trong thức ăn gia súc là 0,0625 mg/kg; tỷ lệ dương tính giả là 3,6%; độ chính xác là 97%.

Với cách sử dụng đơn giản, chỉ cần 10 phút ta có thể xác định được trong mẫu có Clenbuterol hay không, bộ Kit hoàn toàn đáp ứng được nhu cầu kiểm soát dư lượng Clenbuterol hiện nay.

Lời cảm ơn: Nhóm đề tài xin chân thành cảm ơn Sở Khoa học và Công nghệ Hà Nội đã tạo điều kiện cho chúng tôi được nghiên cứu công trình này, cảm ơn sự giúp đỡ của các chuyên gia thuộc Trung tâm phân tích - Viện Dinh dưỡng - Bộ Y tế, Trung tâm phân tích Cục Thú Y - Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đã giúp đỡ chúng tôi hoàn thành nội dung nghiên cứu của đề tài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Fishers (1998) Immunochromatographic, Lateral Flow or Strip Tests Development Ideas. Provided by Bangs Laboratories Inc. 9025 *Technology Drive*, IN 46038-7034: 3-5.
- Hooijerink H, Schilt R, Haasnoot W, Courtheijn D. (1991) Determination of Clenbuterol in urine of calves by high-performance liquid chromatography with in series ultraviolet and electrochemical detection. *J Pharm Biomed Anal* 9: 485-492
- Jemo K, Byungwoo Y, Young H (1996) Immunoassay devices and materials. *US Patent No 5,559,041*.
- Judith F, Tenaflly N (1995) Method and device for detecting the presence of analyte in a sample. *US Patent No 5,451,504*.
- Julian G, Shanfun C, Patricia AB (2003) Process for immunochromatography with colloidal particles. *US Patent No. 46171*
- Kevin D (2001) Troubleshooting protein binding in nitrocellulose membranes. Part 1: Principles *IVD Technology Magazine*.
- Krishnamoorthy S, Makhijani V, Lei M, Giridharan M, Tisone T (2000) Computational Studies of Membrane-Based Test Formats. *MSM 2000*. CFD Reseach Corporation, USA ISBN: 0-9666135-7-0
- Nazareth (2001) Diagnostic detection device and method. *US Patent No 6,319,676 B1*.
- Salleras L, Dominguez A, Mata E, Taberner J L, Moro I, and Salvà P (1995) Epidemiologic study of an outbreak of Clenbuterol poisoning in Catalonia. Spain. *Public Health Reports* 110(3): 338-342.
- Simon A. Haughey, G. Andrew B, Christopher TE, Bjorn P, Carin J, Peter B (2001) Determination of Clenbuterol Residues in Bovine Urine by Optical Immunobiosensor Assay. ISSN: 1060-3271. 84(4): 1025-1030.
- Zhang Xue-zhu, Gan Yi-ru, Zhao Fu-nian (2004) Determination of residual Clenbuterol in pork meat and liver by HPLC with electrochemical detection. *Acts Pharmaceutics Sinica* 39(4): 276-280.

DEVELOPMENT OF IMMUNOCHROMATOGRAPHY TEST KIT FOR SCREENING CLENBUTEROL IN FEED FOOD

Le Trong Van*, Hoang The Yen, Nguyen Thi Nga, Nguyen Thi Hang, Pham Thu Huong, Tran Minh Tri, Nguyen Thanh Dat

Institute of Security Technology of Chemistry-Biology and Documents

SUMMARY

Clenbuterol belongs to the β_2 -agonist. Some studies reported that the β_2 -agonist including Clenbuterol could promote muscle growth and reduce body fat. When animals are treated with β_2 -agonist, the accumulated residue in their tissue may have a effect in human. This article reported an immunochromatography device based on the principle of inhibitor assay. The Clenbuterol in the feed food inhibited with the monoclonal anti-Clenbuterol antibody in the conjugate pad. This antibody was not be captured by the Clenbuterol-BSA coated on the nitrocellulose membrane for the limited binding sites, so T line disappear. When an amount of the extracted feed food was applied to the sample pad, the solution migrates by capillary action through the test strip. If it was negative, the T line appeared as a visible line. If it was positive, no T line developed in the T region. This method had high sensitivity and specificity. Result was read rapidly in several minutes. We chosen several appropriate conditions as: concentration of capture reagents on test line and control line, concentration of colloidal conjugated gold on the conjugate pad, treated sample pad to make a rapid test. We successfully created a rapid test to detect Clenbuterol in feed food. The method and device have high exactly (97%) and false positive rate (3.6%), limited detection Clenbuterol in water is 5ppb and feed food is 0,0625 mg/kg. Reading results are set at 5 - 10 minutes. We also make a sample extractor which is simple and activities in field. Store the test below room temperature. Expiry date is about 18 months.

Keywords: *Capillary reagent, Clenbuterol, Clenbuterol detection, immunochromatography, rapid test*

* Author for correspondence: Tel: 84-4-6947673; Fax: 84-4-6947673; E-mail: levan282@gmail.com