

赵艳红,沈向荣,刘 彩,等. 磷酸替米考星在肉鸡体内的药代动力学研究[J]. 江苏农业科学,2013,41(7):207-210.

磷酸替米考星在肉鸡体内的药代动力学研究

赵艳红¹, 沈向荣¹, 刘 彩¹, 张晓辉¹, 杨 迪¹, 宗昕茹¹, 辛凌翔¹, 王文超², 鲍恩东¹

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏南京 210095; 2. 宁夏泰瑞制药有限公司, 宁夏银川 750000)

摘要:为了探讨磷酸替米考星在肉鸡体内的药物代谢动力学过程并阐明其药动学特征,本试验给受试鸡分别口服不同剂量,以及静脉注射一定剂量的 10% 磷酸替米考星可溶性粉,利用 HPLC 方法分析不同时间点受试鸡血浆中磷酸替米考星的药物浓度。试验结果显示,口服高(16 mg/kg)、中(8 mg/kg)、低(4 mg/kg)剂量的 10% 磷酸替米考星可溶性粉与对照药 10% 替米考星可溶性粉(7.16 mg/kg),4 组药物投服受试鸡体内的药物浓度-时间曲线下面积(AUC)分别为 5.6163 ± 0.9584 、 2.6082 ± 0.2665 、 1.4716 ± 0.0869 、 2.3314 ± 0.1956 ($\mu\text{g/mL}$)·h,与喂药量成正比,说明 10% 磷酸替米考星可溶性粉在鸡体内的药物动力学呈一级动力学过程;口服中剂量 10% 磷酸替米考星可溶性粉和对照药 10% 替米考星可溶性粉后,受试鸡体内的 C_{\max} 分别为 (0.2658 ± 0.0205) 、 (0.2336 ± 0.0337) $\mu\text{g/mL}$,处于生物等效性范围之内(0.80~1.25),说明口服 10% 磷酸替米考星可溶性粉后,鸡体内替米考星的血药分布与口服对应量的对照药 10% 替米考星可溶性粉相类似,二者的差异不显著。试验结果表明,10% 磷酸替米考星可溶性粉口服后吸收极为迅速,达峰快,消除缓慢。此外,静脉注射 10% 磷酸替米考星可溶性粉(5 mg/kg),所有试验鸡均迅速出现死亡,因此,临床不推荐使用磷酸替米考星静脉注射肉鸡。

关键词:磷酸替米考星;药代动力学;肉鸡

中图分类号: S851.34⁺7.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)07-0207-04

替米考星是泰乐菌素经酸水解后的衍生物,是半合成的大环内酯类抗生素。替米考星是大环内酯类畜禽专用抗生素^[1],由于其特殊的抗菌活性^[2]和药动学特征^[3],在兽医临床上主要用于牛、山羊、猪、鸡等动物由敏感菌引起的感染性疾病^[4],特别是畜禽呼吸道感染性疾病,如家畜放线杆菌性胸膜肺炎、巴氏杆菌病、鸡支原体病以及泌乳动物乳房炎的防治^[5]。但由于替米考星不溶于水,不管是口服还是注射都影响其使用效果和利用率。然而,磷酸替米考星是替米考星与 3,5-二甲基嘧啶反应生成替米考星碱,再加磷酸和水后形成的,尽管其有效成分仍然为替米考星,但由于磷酸替米考星易溶于水,具有特殊的抗菌性和药动学特征,所以在兽医临床上应用于预防和治疗动物的感染性疾病时更加便捷。不过,由于磷酸替米考星与替米考星比较,毕竟由于增加了化学基团而造成其化学结构的变化,其在动物体内的药代动力学也可能发生相应的变化,而有关此类报道十分鲜见。因此,为了拓宽替米考星的应用范围,本试验以一定剂量的 10% 磷酸替米考星可溶性粉采用口服和静脉注射给鸡用药,探讨磷酸替米考星可溶性粉在鸡体内的药物代谢动力学过程,同时阐明其药代动力学特征^[6],旨在为家禽合理给药等提供科学依据^[7]。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 主要试剂 替米考星对照品(批号:k0310711,含量

91.0%) 购自中国兽药监察所;10% 磷酸替米考星可溶性粉(批号:20110401,标示量为 94.0%) 由宁夏泰瑞制药股份有限公司提供;对照药物为 10% 替米考星可溶性粉(批号:11020601,标示量 90.7%) 由瑞普(天津)生物药业有限公司提供;磷酸(分析纯)、乙酸铵(分析纯)为国药集团化学试剂有限公司产品;乙腈(色谱纯)为德国 Merck 公司产品;甲醇(色谱纯)为江苏汉邦科技公司产品;四氢呋喃(色谱纯)为美国 TEDIA 天地试剂公司产品。

1.1.2 主要仪器设备 高效液相色谱仪(LC-2010)为日本岛津公司产品;色谱柱(XTerra C₁₈ RP18, 4.6 mm × 50 mm, 5 μm) 为美国 Waters 公司产品;台式离心机(LD4-2A)为北京京立离心机有限公司产品;旋涡混合仪(WH-2 型)为上海沪西分析仪器有限公司产品;微量分析天平(FA1004N,精确度 0.000 1 g)为德国莎多利斯公司产品;pH 计(pH221)为意大利哈纳 HANNA 公司产品;固相萃取真空管装置为天津市东康科技有限公司产品;溶剂过滤器为天津市奥特塞恩斯仪器有限公司产品;针筒式微孔滤膜过滤器(孔径 0.22 μm) 为江苏汉邦科技公司产品;SPE 柱(BondElut, C₁₈, 100 mg/mL) 为美国 Agilent 公司产品。

1.1.3 试验动物 120 羽健康 AA 白羽肉鸡,公母各半,体重约(1.5 ± 0.5) kg,饲养于封闭动物房内,试验期内自由饮水,饲喂不添加任何抗生素的饲料,每天定时给料 2 次。给药前连续饲喂 3 周以适应环境。试验前将所有试验鸡随机分为 5 组,即 10% 磷酸替米考星可溶性粉高、中、低剂量组以及 10% 替米考星可溶性粉对照组、10% 磷酸替米考星可溶性粉静脉注射组^[8]。

1.2 试验方法

1.2.1 色谱条件 检测器:光二极管阵列检测器(PDA);检测波长:280 nm^[8];色谱柱:Inertsil, ODS 反相色谱柱(5 μm ,

收稿日期:2013-01-28

基金项目:江苏高校优势学科建设工程资助项目。

作者简介:赵艳红(1987—),女,江苏滨海人,硕士,主要从事免疫病理研究。E-mail:zhaoyh0305@163.com。

通信作者:鲍恩东。E-mail:b_endong@njau.edu.cn。

4.6 mm×250 mm);流动相:乙腈-四氢呋喃-二丁胺磷酸缓冲液(115:55:25:805,体积比);流速:1.0 mL/min。
1.2.2 标准曲线绘制 用流动相将替米考星标准贮备液稀释成 0.05、0.5、1、5、10、25 μg/mL 的标准工作溶液,各取 10 μL 进行 HPLC 分析。以浓度为横坐标,峰面积(顺式和反式异构体的峰面积之和)为纵坐标,绘制标准曲线。
1.2.3 给药 受试鸡在给药前禁食 12 h,试验开始后每羽鸡分别以 10% 磷酸替米考星可溶性粉高、中、低剂量组和 10% 替米考星可溶性粉药物对照组规定的剂量 1 次灌喂给药,药

物用水冲服,再以适量水冲洗注射器后灌服,确保给药量精确;第 5 组受试鸡则于翅下静脉注射 10% 磷酸替米考星可溶性粉(表 1)。
1.2.4 血样采集 在预试验基础上,确定在口服给药后的 0.25、0.50、1、2、4、6、8、12、24、36、48 h 时分别进行采血;注射给药后在 0.08、0.25、0.5、0.75、1、2、4、6、8、12、24、36 h 时分别采血。所有血样均 3 500 r/min 离心 10 min,吸取上层血浆置于聚丙烯管中,密封,避光,-20 ℃ 保存备用。

表 1 试验分组与处理方法

组别	数量(羽)	处理方法
10% 磷酸替米考星可溶性粉高剂量口服组	24	120 mg/L(16 mg/kg),1 次灌服
10% 磷酸替米考星可溶性粉中剂量口服组	24	60 mg/L(8 mg/kg),1 次灌服
10% 磷酸替米考星可溶性粉低剂量口服组	24	30 mg/L(4 mg/kg),1 次灌服
10% 替米考星可溶性粉口服组	24	53.7 mg/L(7.16 mg/kg),1 次灌服
10% 磷酸替米考星可溶性粉静脉注射组	24	5 mg/kg,1 次静脉注射

1.2.5 血浆样品处理与测定 分别用 10 mL 甲醇活化和 10 mL 水平衡 SPE 柱,将 SPE 柱置于固相萃取真空管装置上,精确量取血浆样品 2 mL 上样,让样品通过 SPE 柱,调整真空泵的压力使流速约为 1 滴/s,10 mL 纯水和 10 mL 乙腈-水(35:65,体积比)分别洗涤,溶液从 SPE 柱流出后,将真空泵的压力调小,让 SPE 柱在真空下干燥至少 5 min,2.5 mL 洗脱液洗脱于刻度试管中,30 ℃ 水浴中氮气吹至近干。用流动相溶解定容至 1 mL,涡动 30 s,静置 15 min,0.22 μm 针孔式滤膜过滤,取 10 μL 进行 HPLC 分析。
1.2.6 检测限和定量限的检测 取空白(未给药)的血浆样品,添加标样,采用倍比稀释,分别按照上述样品处理方法进行处理。测得基线噪音值求其平均值,按信噪比 S/N=3 为检测限,S/N=10 为定量限。

1.2.7 添加回收率和精密度试验 取血浆 2.0 mL,添加一定体积的标准添加溶液,使血浆中药物浓度为 0.05、0.5、5 μg/mL。按上述样品前处理方法分别处理后进行 HPLC 测定,1 d 内每个浓度取 3 个平行样品,分别测定,计算回收率和日内变异系数。

1.3 数据处理

药时数据采用中国药理学学会数学专业委员会编制的 3p97 药代动力学程序软件在微机上进行曲线拟合,采用 Marquardt 法对一、二、三房室分别权重 1、1/C、1/C² 3 种情况进行计算。根据残差平方和(WSS)最小和拟合度(r²)最大判断最适药代动力学模型,如果 WWS 和 r² 的值相近,AIC(akaike's information criterion)值愈小,则拟合愈好^[9-10]。根据试验中测得的每羽鸡的血药浓度-时间数据,绘制每羽鸡的药-时曲线及平均药-时曲线,进行药代动力学参数的计算,求得药物的主要药代动力学参数,以全面反映药物在鸡体内吸收、分布和消除的特点。

2 结果与分析

2.1 标准曲线

在浓度为 0.05~25 μg/mL 范围内,替米考星峰面积(顺式和反式异构体的峰面积之和)与浓度呈线性相关(图 1),得

到其回归方程 $y = 14\,192x - 1\,035.2$, $r^2 = 0.999\,8$ 。结果显示替米考星面积与浓度呈正相关,通过此方程求得的替米考星的浓度比较精准。如果分析样品的浓度不在这个线性范围内,则将分析物浓度浓缩或稀释。

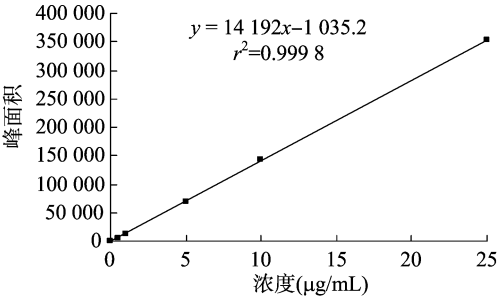


图1 替米考星标准曲线

2.2 定量限和检测限

取空白(未给药)血浆样品,添加标样,倍比稀释及样品前处理后,按信噪比 S/N=3 为检测限,S/N=10 为定量限,求得血浆中替米考星浓度的检测限和定量限分别为 0.025、0.05 μg/mL。如果分析的样品浓度不在这个范围,要将样品浓缩或稀释。

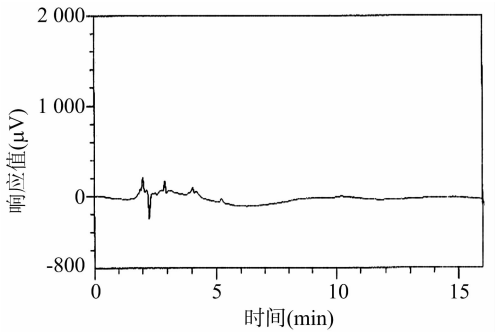


图2 鸡空白血浆色谱图

2.3 添加回收率和精密度

样品的低、中、高 3 个浓度的添加回收率和精密度检测结果如表 2 和图 3 所示。鸡血浆在 0.05、0.5、5 μg/mL 添加范围内,平均回收率为 76.9%~86.1%,变异系数范围是 3.8%~

表 2 替米考星在血浆中的回收率

鸡血浆添加浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	实测值 ($\mu\text{g/mL}$)	回收率 (%)	变异系数 (%)
0.05	0.0384 ± 0.0063	76.9	16.4
0.5	0.4307 ± 0.0274	86.1	6.4
5.0	4.2071 ± 0.1581	84.1	3.8

16.4% ($n=3$)。

2.4 鸡口服 10% 磷酸替米考星的血药浓度及药代动力学参数

受试鸡口服一定剂量 10% 磷酸替米考星可溶性粉和对照药物 10% 替米考星可溶性粉后的血药浓度、药代动力学参

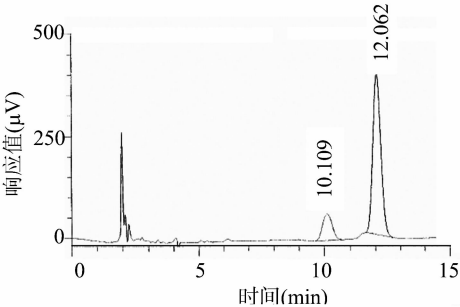


图 3 鸡空白血浆添加 5 $\mu\text{g/mL}$ 替米考星回收色谱图

数结果如表 3、表 4、图 4 所示。

表 3 鸡口服不同剂量 10% 磷酸替米考星可溶性粉后不同时间血浆中所含替米考星的平均浓度

时间 (h)	血浆替米考星浓度 ($\mu\text{g/mL}$)			
	磷酸替米考星高剂量组	磷酸替米考星中剂量组	磷酸替米考星低剂量组	替米考星对照组
0.25	0.1718 ± 0.0571	0.1184 ± 0.0356	0.0610 ± 0.0276	0.0591 ± 0.0209
0.5	0.3331 ± 0.1694	0.2415 ± 0.0541	0.1279 ± 0.0454	0.2029 ± 0.0825
1	0.4186 ± 0.1264	0.2575 ± 0.0521	0.1083 ± 0.0213	0.2192 ± 0.0414
2	0.4392 ± 0.1141	0.1910 ± 0.0212	0.0878 ± 0.0152	0.1451 ± 0.0227
4	0.2575 ± 0.0528	0.1312 ± 0.0124	0.0713 ± 0.0136	0.1069 ± 0.0267
6	0.1878 ± 0.0459	0.1008 ± 0.0102	0.0498 ± 0.0102	0.0736 ± 0.0148
8	0.1332 ± 0.0224	0.0699 ± 0.0118	0.0522 ± 0.0058	0.0619 ± 0.0147
12	0.1033 ± 0.0135	0.0480 ± 0.0127	0.0532 ± 0.0057	0.0448 ± 0.0110
24	0.0743 ± 0.0098	0.0562 ± 0.0056	0.0447 ± 0.0014	0.0518 ± 0.0130
36	0.0512 ± 0.0130	0.0492 ± 0.0028	0.0524 ± 0.0029	0.0489 ± 0.0042
48	0.0411 ± 0.0052	0.0413 ± 0.0031	ND	0.0436 ± 0.0019

注:ND = 未检测到。

表 4 鸡口服不同剂量 10% 磷酸替米考星可溶性粉后各项药代动力学参数

参数	单位	磷酸替米考星 高剂量组	磷酸替米考星 中剂量组	磷酸替米考星 低剂量组	替米考星 对照组
A	$\mu\text{g/mL}$	$1.2232 \pm 0.7287\text{A}$	$0.2834 \pm 0.0714\text{a}$	$0.2486 \pm 0.1115\text{a}$	$0.2787 \pm 0.1166\text{a}$
α	h^{-1}	$0.6335 \pm 0.3815\text{a}$	$0.4801 \pm 0.2075\text{a}$	$0.5376 \pm 0.1955\text{a}$	$0.6637 \pm 0.2032\text{a}$
B	$\mu\text{g/mL}$	$0.1441 \pm 0.0409\text{A}$	$0.0822 \pm 0.0408\text{Aa}$	$0.0339 \pm 0.0101\text{a}$	$0.0854 \pm 0.0339\text{Aa}$
β	$1/\text{h}$	$0.0334 \pm 0.0107\text{a}$	$0.0409 \pm 0.0168\text{a}$	$0.0304 \pm 0.0057\text{a}$	$0.0402 \pm 0.0107\text{a}$
K_a	$1/\text{h}$	$1.2718 \pm 0.3941\text{Aa}$	$2.7111 \pm 0.7463\text{A}$	$0.5888 \pm 0.3201\text{a}$	$2.4070 \pm 1.3497\text{A}$
T_{lag}	h	$0.1446 \pm 0.0635\text{a}$	$0.1695 \pm 0.0681\text{a}$	$0.1506 \pm 0.0883\text{a}$	$0.1602 \pm 0.0833\text{a}$
$V/F(C)$	$(\text{mg/kg})/(\mu\text{g/mL})$	$20.2394 \pm 4.5611\text{a}$	$23.7194 \pm 3.5724\text{a}$	$18.6360 \pm 6.1237\text{a}$	$22.1623 \pm 3.4427\text{a}$
$T_{1/2\alpha}$	h	$1.4553 \pm 0.7021\text{a}$	$1.3169 \pm 0.5026\text{a}$	$1.5186 \pm 0.6524\text{a}$	$1.1606 \pm 0.3765\text{a}$
$T_{1/2\beta}$	h	$23.1368 \pm 7.5986\text{a}$	$15.7275 \pm 3.6585\text{a}$	$23.6962 \pm 3.8821\text{a}$	$16.0681 \pm 2.1858\text{a}$
$T_{1/2ka}$	h	$0.5173 \pm 0.2921\text{A}$	$0.1421 \pm 0.1145\text{a}$	$0.5386 \pm 0.3160\text{A}$	$0.2083 \pm 0.1653\text{a}$
K_{21}	$1/\text{h}$	$0.1391 \pm 0.0849\text{a}$	$0.1501 \pm 0.0987\text{a}$	$0.1027 \pm 0.0399\text{a}$	$0.1817 \pm 0.0725\text{a}$
K_{10}	$1/\text{h}$	$0.1541 \pm 0.0484\text{a}$	$0.1259 \pm 0.0260\text{a}$	$0.1581 \pm 0.0379\text{a}$	$0.1434 \pm 0.0263\text{a}$
K_{12}	$1/\text{h}$	$0.3737 \pm 0.2693\text{a}$	$0.2054 \pm 0.1048\text{a}$	$0.3070 \pm 0.1435\text{a}$	$0.5931 \pm 0.3664\text{A}$
AUC	$(\mu\text{g/mL}) \cdot \text{h}$	$5.6163 \pm 0.9584\text{A}$	$2.6082 \pm 0.2665\text{a}$	$1.4716 \pm 0.0869\text{a}$	$2.3314 \pm 0.1956\text{a}$
$CL(S)$	$\text{mg}/[\text{kg} \cdot \text{h} \cdot (\mu\text{g/mL})]$	$2.9233 \pm 0.4408\text{a}$	$3.0964 \pm 0.2860\text{a}$	$2.7282 \pm 0.1702\text{a}$	$3.0927 \pm 0.2578\text{a}$
T_{max}	h	$0.7145 \pm 0.3673\text{a}$	$0.5222 \pm 0.3373\text{a}$	$0.6172 \pm 0.4918\text{a}$	$0.6874 \pm 0.4052\text{a}$
C_{max}	$\mu\text{g/mL}$	$0.4771 \pm 0.0527\text{A}$	$0.2658 \pm 0.0205\text{a}$	$0.1332 \pm 0.0258\text{a}$	$0.2336 \pm 0.0337\text{a}$

3 讨论

从试验结果可以看出,口服给药后 10% 磷酸替米考星可溶性粉在鸡体内吸收、分布很快,消除较为缓慢,药-时数据基本符合一级吸收二室开放模型。10% 磷酸替米考星可溶性粉高、中、低 3 种剂量在体内的滞留时间 (T_{lag}) 分别为 (0.1446 ± 0.0635)、(0.1695 ± 0.0681)、(0.1506 ± 0.0883) h;

达峰时间 (T_{max}) 分别为 (0.7145 ± 0.3673)、(0.5222 ± 0.3373)、(0.6172 ± 0.4918) h,经 t 检验分析,3 个剂量组间差异不显著,说明 10% 磷酸替米考星可溶性粉口服后吸收极为迅速,达峰快。达峰浓度 (C_{max}) 分别为 (0.4771 ± 0.0527)、(0.2658 ± 0.0205)、(0.1332 ± 0.0258) $\mu\text{g/mL}$,达峰浓度与投药量基本成正比;10% 磷酸替米考星可溶性粉高、中、低 3 种剂量组的药物浓度-时间曲线下面积 (AUC) 分别为 ($5.6163 \pm$

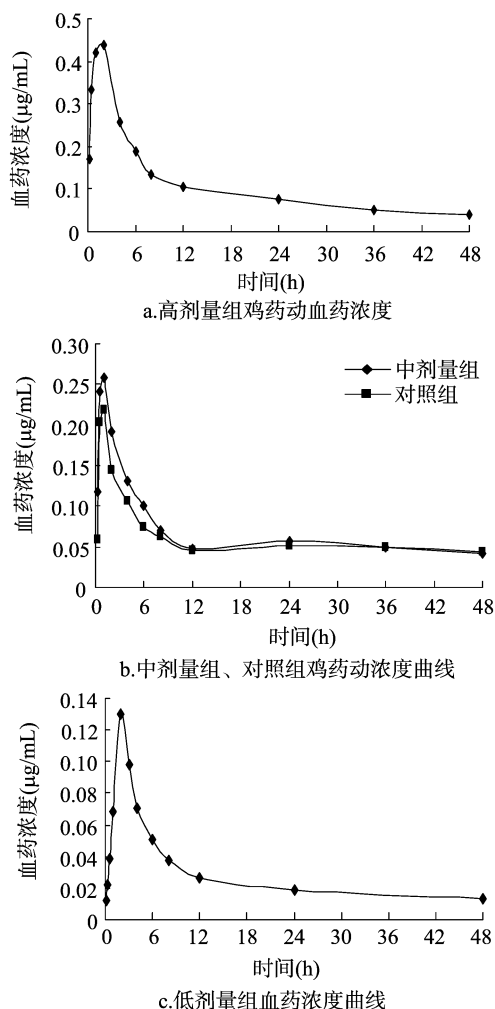


图4 10%磷酸替米考星可溶性粉高、中、低剂量组、对照组血药浓度曲线图

0.958 4)、(2.608 2 ± 0.266 5)、(1.471 6 ± 0.086 9) (μg/mL) · h, AUC 与喂药量也基本成正比,说明 10% 磷酸替米考星可溶性粉在鸡体内的药物动力学呈一级动力学过程。

口服 10% 磷酸替米考星可溶性粉与相同条件下口服 10% 替米考星可溶性粉进行比较,发现两组的 $T_{1/2\alpha}$ 分别为 (1.316 9 ± 0.502 6)、(1.160 6 ± 0.376 5) h,经 t 检验分析,二者差异不显著。二组分别在 (0.522 2 ± 0.337 3)、(0.687 4 ± 0.405 2) h 达到最大血药浓度 (C_{\max}),最高血药浓度分别为 (0.265 8 ± 0.020 5)、(0.233 6 ± 0.033 7) μg/mL,差异均不显著;10% 磷酸替米考星可溶性粉口服后药物浓度-时间曲线下面积 (AUC) 为 2.608 2 ± 0.266 5 (μg/mL) · h,对应浓度的 10% 替米考星可溶性粉口服后药物浓度-时间曲线下面积 (AUC) 为 2.331 4 ± 0.195 6 (μg/mL) · h,经 t 检

验,二者差异不显著。口服 10% 磷酸替米考星可溶性粉和口服 10% 替米考星可溶性粉后的 C_{\max} 分别为 (0.265 8 ± 0.020 5)、(0.233 6 ± 0.033 7) μg/mL,二者的 C_{\max} 比值为 1.13,处于生物等效性范围之内 (0.80 ~ 1.25),说明口服 10% 磷酸替米考星可溶性粉后,鸡体内替米考星的血药分布与口服对应量的 10% 替米考星可溶性粉后鸡体内替米考星的分布相类似,二者差异不显著。

另外,在试验过程中选择平均体重接近 1、1.5、2、2.5、3 kg 的试验鸡分别进行一次性静脉注射 10% 磷酸替米考星可溶性粉 (5 mg/kg),结果发现,所有受试鸡均迅速出现死亡,说明磷酸替米考星可溶性粉对鸡有显著致死作用,故临床上应禁止通过静脉注射途径给鸡投药。有资料显示磷酸替米考星牛一次静脉注射 5 mg/kg 即可致死,对猪、灵长类动物和马也有致死的危险性。毒作用的靶器官是心脏,可引起心动过速和收缩力减弱^[10]。

参考文献:

- [1] Wang X F, Zhang S L, Zhu L Y, et al. Enhancement of antibacterial activity of tilmicosin against *Staphylococcus aureus* by solid lipid nanoparticles *in vitro* and *in vivo* [J]. Original Research Article the Veterinary Journal, 2012, 191 (1): 115 - 120.
- [2] 孙永学, 陈杖榴. 替米考星在兽医临床上应用的研究概况 [J]. 兽药与饲料添加剂, 2002 (7): 22 - 25.
- [3] 郭 滕, 吴连勇, 张家祥. 兽用抗菌新药替米考星研究进展 [J]. 中国兽医杂志, 2002, 36 (7): 38 - 39.
- [4] Reeve - Johnson L, Kempf I, Charleston B. An evaluation of the efficacy of tilmicosin treatment and control measure against artificial infection with *Mycoplasma gallisepticum* in chickens [J]. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 1997, 20 (Suppl. 1): 132.
- [5] Scomearx B, Shryock T R. Intracellular accumulation, subcellular distribution, and diffux of tilmicosin in bovine mammary, blood, and lung cells [J]. Dairy Sci, 1999, 82 (6): 1202 - 1212.
- [6] Kempf I, Johnson, L R, Gesbert F, et al. Efficacy of tilmicosin in the control of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens [J]. Avian Diseases, 1997, 41: 802 - 807.
- [7] 沈建忠, 谢连金. 兽医药理学 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2000.
- [8] 舒 刚, 李英伦, 熊浩山. 鸡单剂量内服替米考星的药代动力学研究 [J]. 中国家禽, 2004, 8 (1): 79 - 81.
- [9] Modric S, Webb A, Davidson M. Effect of respiratory tract disease on pharmacokinetics of tilmicosin in rats [J]. Laboratory Animal Science, 1999, 49 (3): 248 - 253.
- [10] Maksim B, Inna G. Simultaneous separate and group determination of tylosin and tilmicosin in foodstuffs using single antibody - based immunoassay [J]. Food Chemistry, 2012, 132 (2): 1080 - 1086.