

文章编号: 1004-7271(2006)02-0156-07

RP-HPLC 法测定中华绒螯蟹主要组织中的 恩诺沙星及其代谢产物

郑宗林¹, 唐俊¹, 喻文娟¹, 胡赬¹, 叶金明^{1,2}, 杨先乐¹

(1. 上海高校水产养殖 E-研究院, 上海水产大学农业部水产种质资源与养殖生态
重点开放实验室, 农业部渔业动植物病原库, 上海 200090;
2. 扬州水产生产技术指导站, 江苏扬州 225003)

摘要:建立了反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定中华绒螯蟹肌肉、肝胰腺、精巢和卵巢组织内的恩诺沙星、环丙沙星含量。结果表明,恩诺沙星和环丙沙星在四种组织中的平均回收率分别为 $70.5\% \pm 12.61\%$ 、 $70.25\% \pm 14.73\%$;日内精密度分别为 $3.27\% \pm 0.84\%$ 、 $2.14\% \pm 0.68\%$;日间精密度分别为 $5.38\% \pm 2.46\%$ 、 $3.48\% \pm 1.16\%$ 。恩诺沙星、环丙沙星的最低检测限分别为 $0.02 \mu\text{g/g}$ 和 $0.004 \mu\text{g/g}$ 。以 10 mg/kg 蟹体重剂量单次肌肉注射给药后,恩诺沙星在中华绒螯蟹肌肉、肝胰腺、精巢和卵巢内的 T_{max} 、 C_{max} 分别为:1 h, $4.323 \pm 0.56 \mu\text{g/g}$;1 h, $6.042 \pm 0.72 \mu\text{g/g}$;3 h, $2.381 \pm 0.43 \mu\text{g/g}$;3 h, $2.101 \pm 0.29 \mu\text{g/g}$,各组织的药物消除半衰期($t_{1/2\beta}$)分别为:45.186 h, 73.93 h, 45.577 h, 38.081 h。各组织中均能检测到环丙沙星,但含量均处较低水平,且代谢和消除起伏波动较大。本方法快速、灵敏、准确,适合于中华绒螯蟹组织中恩诺沙星、环丙沙星含量分析。

关键词:中华绒螯蟹;反相高效液相色谱法;恩诺沙星;环丙沙星;药代动力学

中图分类号:S 948

文献标识码:A

Development of RP-HPLC for determination of enrofloxacin and its metabolite in tissues of Chinese mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*) by RP-HPLC

ZHENG Zong-lin¹, TANG Jun¹, YU Wen-juan¹, HU Kun¹, YE Jin-ming^{1,2}, YANG Xian-le¹

(1. E-institute of Shanghai Municipal Education Commission, Key Laboratory of Aquac Genetic Resources and
Aquaculture Ecology Certificated by Ministry of Agriculture, Fishery Pathogen Collection
of the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;
2. Yangzhou Instruction Station of Technology for Fishery, Yangzhou 225003, China)

Abstract: The methods of reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) were developed to determine concentration of enrofloxacin (ENR) and ciprofloxacin (CIP) in muscle, hepatopancreas, spermary, ovary of Chinese mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*). The average recovery of ENR and CIP in four tissues is $70.5\% \pm 12.61\%$, $70.25\% \pm 14.73\%$; The intra-day precision of ENR and CIP is $3.27\% \pm 0.84\%$, $2.14\% \pm 0.68\%$, respectively; The inter-day precision is $5.38\% \pm 2.46\%$, $3.48\% \pm 1.16\%$, respectively. The

收稿日期: 2005-06-28

基金项目: 科技部项目“重要技术标准研究”(2002BA906A39-01); 国家科技攻关项目(2004BA526B0504); 上海市重点学科建设资助项目(Y1101); 上海市教育委员会 E-研究院建设资助项目(E03009)

作者简介: 郑宗林(1978-), 男, 重庆人, 硕士研究生, 专业方向为水产药理学。E-mail: zzheng@stmail.shfu.edu.cn

通讯作者: 杨先乐, Tel: 021-65710870, E-mail: xyang@shfu.edu.cn

lowest detected limit of enrofloxacin in tissues is 0.02 $\mu\text{g/g}$, and ciprofloxacin is 0.004 $\mu\text{g/g}$. ENR was administered to *E. sinensis* in a single dose (10 mg/kg b.w.) following intramuscular administration. The T_{max} , C_{max} of ENR in four tissues are 1 h, $4.323 \pm 0.56 \mu\text{g/g}$; 1 h, $6.042 \pm 0.72 \mu\text{g/g}$; 3 h, $2.381 \pm 0.43 \mu\text{g/g}$; 3 h, $2.101 \pm 0.29 \mu\text{g/g}$, respectively, and the half-life of elimination in these tissues is 45.186 h, 73.93 h, 45.577 h, 38.081 h, respectively. The method is fast, sensitive, precise and suitable to determine the concentrations of enrofloxacin and ciprofloxacin in Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis*.

Key words: *Eriocheir sinensis*; RP-HPLC; enrofloxacin; ciprofloxacin; pharmacokinetics

恩诺沙星(enrofloxacin, ENR)属于第三代喹诺酮类药物,作用机理为通过抑制细菌 DNA 回旋酶(gyrase)的活性,阻碍细菌 DNA 的解链、切割和重封等而达到抑菌、杀菌的目的^[1]。恩诺沙星作为第一个畜禽专用的喹诺酮类药物,其在水产动物^[2-13]、畜禽^[14-20]体内的药代动力学研究较多,其中水产动物的研究主要集中在海水鱼类如尖吻鲈(*Sparus aurata* L)^[6]、菱羊鲷(*Dicentrarchus labrax*)^[7]、甲壳动物中的中国对虾(*Penaeus chinensis*)^[5,12]、凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)^[13]等,而对中华绒螯蟹仅有杨先乐等^[3]和李正等^[11]建立的蟹血淋巴中盐酸环丙沙星(2003 年已被禁用)的检测方法及其代谢动力学研究,此外其它药物在中华绒螯蟹体内的残留检测、代谢规律等的研究还未见报道。鉴此,本文建立了恩诺沙星及其代谢产物环丙沙星在中华绒螯蟹主要组织中的检测方法,同时研究了恩诺沙星在中华绒螯蟹体内的药动学规律,以期对恩诺沙星在水产动物体内的残留检测及在养殖中的合理使用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验动物

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)购于江苏省南通国营农场。雄雌蟹各 100 只,体重 $54.5 \pm 5.2 \text{ g}$ 。水温 $25.0 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$, 24 h 连续充气。

1.2 实验试剂

恩诺沙星(enrofloxacin, ENR)标准品(含量 $\geq 98.0\%$),环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)标准品(含量 $\geq 99.0\%$),购于 Sigma 公司;恩诺沙星原药(纯度为 97.5%,批号 040518-2),浙江医药股份有限公司新昌制药厂。甲醇、乙腈、三乙胺,均为 HPLC 级;柠檬酸、醋酸铵、正己烷,均为分析纯。

1.3 试验仪器

Agilent-1100 型高效液相色谱仪,附紫外检测器;低温冰箱;漩涡混合器;微型匀浆机;氮气吹干仪;真空泵;万分之一电子天平;ependorf 台式离心机等。

1.4 流动相及色谱条件

流动相为:甲醇/(0.05 mol/L 柠檬酸 + 0.01 mol/L 醋酸铵,三乙胺调 pH 4.5) = 25/75(V/V)。色谱条件为:RP-ODS C_{18} 分析柱(150 mm \times 4.6 mm, 5 μm);检测波长:276 nm;流速:1.5 mL/min;柱温:40 $^\circ\text{C}$;自动进样量:10 μL 。

1.5 给药及组织样采集

恩诺沙星原药用生理盐水配成 10 mg/mL 溶液,用 1 mL 注射器通过中华绒螯蟹第四步足与体壁关节膜处肌肉稍斜插入注射给药,剂量 10 mg/kg。给药后,在确定时间点取样,取样时拨开背甲并立即摘除心脏,将混于肝胰腺中的肠道等剔除后用镊子分别取肝胰腺和性腺(精巢或卵巢);肌肉则取与步足相连的腹壁肌肉。所取样品均置低温冰箱保存至用。

1.6 组织样处理

1.6.1 提取

样品室温自然解冻。将所取蟹组织样置于研钵中研磨约 10 min,达到均质后精确称取匀浆样品

5.00 g,置于附2~3粒玻璃珠的三角瓶中,加15 mL乙腈,摇床振荡15 min(120 r/min),4500 r/min离心15 min,取上清液。往残渣中加入10 mL乙腈,摇床振荡15 min,4500 r/min离心15 min,合并上清液。

1.6.2 净化和浓缩

上清液加入10 mL正己烷,充分振荡5 min后静置,取下层移入烧瓶中,55 °C旋转蒸发至近干,用3.0 mL乙腈溶解残留物,重复1次,合并溶解液,经砂芯漏斗过滤,并用3.0 mL乙腈洗涤漏斗壁和滤纸,重复洗涤一次,合并滤液,于45 °C恒温氮气吹干,用0.5 mL流动相充分溶解残渣,经0.45 μm微孔滤膜过滤后,4 °C冰箱保存至分析。

1.7 组织样添加恩诺沙星、环丙沙星标准工作曲线

1.7.1 标准母液配制

准确称取0.010 g恩诺沙星标、环丙沙星准品,置于50 mL烧杯中,用1 mL浓HCl溶解后,转移至100 mL容量瓶中,用双蒸馏水稀释至刻度,即成100 μg/mL的恩诺沙星、环丙沙星标准品母液。

1.7.2 肝胰腺样品标准曲线

称取2.0 g蟹空白肝胰腺8份,分别加入相应体积的恩诺沙星和环丙沙星标准溶液,使之浓度为0~10.0 μg/g,然后按“1.6组织样处理”。以HPLC测得的峰面积为横坐标,相应的浓度为纵坐标,作标准曲线。

1.7.3 肌肉(或性腺)样品标准曲线

称取2.0 g蟹空白肌肉(或性腺)7份,分别加入相应体积的恩诺沙星(环丙沙星)标准溶液,使之浓度为0~5.0 μg/g,其余同上。

1.8 回收率及精密度测定

1.8.1 回收率

采用加样回收法。取4份1.00 g蟹空白组织(肌肉、肝胰腺、精巢或卵巢)置于研磨中,分别加入定量100.0 μg/mL的恩诺沙星和环丙沙星标准品母液,使其理论浓度分别为2、5、10 μg/g,其余同“组织样处理”。根据恩诺沙星及环丙沙星标准曲线计算出各组织中药物浓度。回收率(%) = 样品实测浓度 / 样品理论浓度 × 100%。

1.8.2 精密度

日内精密度:采用加入法。在一日内的试验的前、中、末,分别取100.0 μg/mL的恩诺沙星标准母液50.0 μL,加入到1.00 g组织样中,混匀后按同“组织样处理”,HPLC测定各组织中药物浓度。每样重复3次,记录恩诺沙星、环丙沙星的峰面积,计算日内精密度;日间精密度:一周重复测定3次,每样重复3次,计算日间精密度。

1.9 数据处理

药代动力学模型拟合及参数计算采用MCPKP药动力学软件。

2 结果

2.1 恩诺沙星、环丙沙星的色谱行为

在1.4所设计的色谱条件下,HPLC基线走动平稳,恩诺沙星的保留时间约为9.49 min,环丙沙星的保留时间约为5.34 min。其中肝胰腺和精巢样品中均有较多杂质峰出现,但基本都无干扰峰,杂峰与药峰分离良好(图1)。

2.2 恩诺沙星、环丙沙星标准工作曲线

将浓度分别为0.02~10.0 μg/mL的恩诺沙星、环丙沙星标准溶液进样检测后,记录其峰面积,得到各组织标准工作曲线。从表1中可知各曲线相关性良好,以引起两倍基线噪音的药量为最低检测限,可知恩诺沙星的检测限为0.02 μg/g,环丙沙星的检测限为0.004 μg/g。

2.3 回收率

蟹空白组织中添加恩诺沙星和环丙沙星标准溶液,使理论浓度分别为 2.0、5.0、10.0 $\mu\text{g/g}$,然后按“1.6 组织样处理”,测定恩诺沙星、环丙沙星含量。根据实测浓度和理论浓度计算出回收率,肌肉、肝胰腺、精巢和卵巢中恩诺沙星、环丙沙星在三个浓度下平均回收率分别为 $79.4\% \pm 1.15\%$, $80.8\% \pm 5.73\%$; $63.6\% \pm 5.60\%$, $60.8\% \pm 3.12\%$; $56.3\% \pm 1.20\%$, $54.7\% \pm 3.49\%$; $82.7\% \pm 6.61\%$, $84.7\% \pm 3.22\%$ (表 2)。各浓度下,恩诺沙星、环丙沙星在各组织中的平均回收率分别为 $70.5\% \pm 12.61\%$, $70.25\% \pm 14.73\%$ 。

2.4 精密度

日内精密度:在空白组织中添加恩诺沙星和环丙沙星标准溶液,浓度为 5.0 $\mu\text{g/g}$,在试验的前、中、末期分别测定药物浓度,每次重复 3 次,记录恩诺沙星峰面积,推算血药浓度。计算出日内相对标准偏差(RSD),肌肉、性腺中恩诺沙星和环丙沙星的日内标注偏差均小于 3%,只有肝胰腺中恩诺沙星的差异稍大,为 4.61%。

日间精密度:在空白组织中添加恩诺沙星和环丙沙星标准溶液,浓度为 5.0 $\mu\text{g/g}$,在一周内重复测定 3 次,计算其标准偏差和相对标准偏差。总体上看,恩诺沙星的日间精密度差异比环丙沙星略大,最大的为肝胰腺,达 8.995%(表 3)。

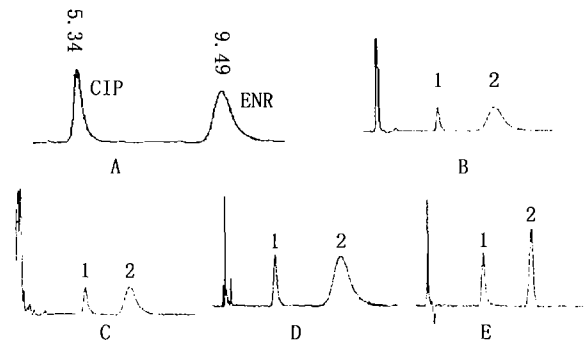


图 1 中华绒螯蟹组织中恩诺沙星、环丙沙星的色谱行为
Fig.1 HPLC chromatogram of ENR and CIP in the tissues of *E. sinensis*

A. 标准恩诺沙星、环丙沙星图谱; B. 加入标准恩诺沙星、环丙沙星后的蟹肌肉; C. 加入标准恩诺沙星、环丙沙星后的蟹肝胰腺; D. 加入标准恩诺沙星、环丙沙星后的蟹卵巢; E. 加入标准恩诺沙星、环丙沙星后的蟹精巢; “1”所指示的色谱峰为环丙沙星峰,“2”所指示的色谱峰为恩诺沙星峰

表 1 蟹各组织恩诺沙星和环丙沙星标准工作曲线

Tab.1 The standard working curve of ENR&CIP in tissues of *E. sinensis*

组织	恩诺沙星		环丙沙星	
	标准曲线	相关系数	标准曲线	相关系数
肌肉	$Y = 0.0751X$	0.9923	$Y = 0.1434X - 0.0263$	0.9941
肝胰腺	$Y = 0.0868X - 0.0766$	0.9909	$Y = 0.1600X$	0.9931
精巢	$Y = 0.0828X - 0.0766$	0.9917	$Y = 0.1532X$	0.9979
卵巢	$Y = 0.0785X - 0.1003$	0.9877	$Y = 0.1358X$	0.9958

表 2 中华绒螯蟹组织中恩诺沙星、环丙沙星回收率的测定结果

Tab.2 The recovery of ENR&CIP in the tissues of *E. sinensis*

组织	理论浓度	恩诺沙星			环丙沙星		
		实测浓度	回收率(%)	平均回收率(%)	实测浓度	回收率(%)	平均回收率(%)
肌肉	2	1.58	79.00	79.4 ± 1.15	1.486	74.30	80.8 ± 5.73
	5	4.032	80.64		4.149	82.98	
	10	7.841	78.41		8.513	85.13	
肝胰腺	2	1.324	66.20	63.6 ± 5.60	1.29	64.50	60.8 ± 3.12
	5	2.858	57.15		2.94	58.73	
	10	6.74	67.40		5.93	59.30	
精巢	2	1.13	56.7	56.3 ± 1.20	1.05	52.25	54.7 ± 3.49
	5	2.86	57.16		2.94	58.72	
	10	5.49	54.88		5.32	52.23	
卵巢	2	1.71	85.40	82.7 ± 6.61	1.63	81.50	84.7 ± 3.22
	5	3.76	75.24		4.23	84.68	
	10	8.76	87.84		8.79	87.93	

表3 恩诺沙星、环丙沙星的日内精密度和日间精密度

Tab.3 The intra-day precision and inter-day precision of RP-HPLC methods for ENR&CIP %

		肌肉	肝胰腺	精巢	卵巢
恩诺沙星	日内	2.83	4.61	2.92	2.73
	日间	3.41	8.995	4.51	4.61
环丙沙星	日内	1.14	2.47	2.61	2.34
	日间	2.62	4.84	2.41	4.04

恩诺沙星和环丙沙星在中华绒螯蟹各组织的平均日内、日间精密度分别为 $3.27\% \pm 0.84\%$, $2.14\% \pm 0.68\%$; $5.38\% \pm 2.46\%$, $3.48\% \pm 1.16\%$ 。

2.5 蟹单次肌注给药后恩诺沙星、环丙沙星的药代动力学

恩诺沙星以 10 mg/kg 剂量, 单次肌注给药中华绒螯蟹后, 不同时间点采集蟹组织样品, 处理后经 HPLC 测得其组织中恩诺沙星及其代谢产物环丙沙星的浓度, 绘制了中华绒螯蟹肌肉、肝胰腺、性腺中恩诺沙星和环丙沙星的浓度-时间曲线图(图 2, 3)。给药后第 0.5 h, 肌肉中即检测到恩诺沙星, 并在第 1 h 达峰值 $4.323 \pm 0.564 \mu\text{g/g}$, 其后浓度开始缓慢下降, 第 1~12 h 药物浓度变化不大, 至第 12 h 仍达 $2.572 \pm 0.379 \mu\text{g/g}$; 第 12 h 后药物开始快速消除, 至第 24 h 的药物浓度仅为第 12 h 的 39.58%。肝胰腺的药物浓度达峰也较快, 第 1 h 达峰, 其峰浓度为 $6.042 \pm 0.720 \mu\text{g/g}$, 高出肌肉中恩诺沙星峰浓度达 28.45%, 第 0.5 h~48 h, 肝胰腺中恩诺沙星浓度变化不大, 虽有波动, 但均维持在 $3.0 \mu\text{g/g}$ 以上。从图 2 可看出, 给药后各时间点精巢和卵巢中恩诺沙星浓度较为接近, 精巢中药物浓度略高于卵巢, 但消除趋势一致; 相对肌肉和肝胰腺组织, 性腺中药物消除速率较慢, 但由于其药物浓度均处于较低值, 所以至第 168 h, 性腺与肌肉中药物消除情况一致, 均在 $0.16 \sim 0.18 \mu\text{g/g}$ 之间。

恩诺沙星在中华绒螯蟹各组织中的代谢率均较低。由图 3 可知, 肝胰腺中环丙沙星在第 1 h 达到峰值 ($0.141 \pm 0.0156 \mu\text{g/g}$), 仅为与之同时达峰的恩诺沙星浓度的 2.33%; 给药后从第 3 h 至第 168 h, 肌肉、卵巢和精巢组织中恩诺沙星的代谢产物环丙沙星都维持在 $0.02 \sim 0.05 \mu\text{g/g}$ 之间(除第 96 h 精巢中未检测到环丙沙星外); 从图 3 可看出, 环丙沙星在经历了恩诺沙星在前期的持续代谢而浓度增加后, 至第 1~3 h 起其浓度开始逐渐降低。肝胰腺中环丙沙星的浓度较高, 但下降较其它组织也更为迅速, 第 240 h 以后, 其浓度也与其它组织接近一致。

应用非线性最小二乘回归分析法对所测得数据进行一室模型 ($C_0 = A \cdot e^{-kt}$)、二室模型 ($C_0 = A \cdot e^{-\alpha t} + B \cdot e^{-\beta t}$) 和三室模型 ($C_0 = A \cdot e^{-1.1t} + B \cdot e^{-1.2t} + C \cdot e^{-1.3t}$) 的拟合, 使数据的加权平方和最小。拟合结果为各组织中应用二室模型方程与所测的数据拟合最好。这表明中华绒螯蟹单次口灌给药后, 恩诺沙星在组织中的处置可以用开放性二室模型来描述, 其肝胰腺中药物浓度-时间关系方程为: $C_0 = 0.215 \times$

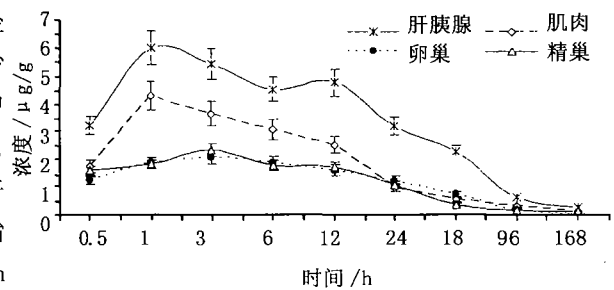


图2 中华绒螯蟹肌注给药恩诺沙星后各组织中药物浓度变化

Fig.2 The tissues concentration of ENR v.s. time after injected administration to *E. sinensis* at a dose of 10 mg/kg

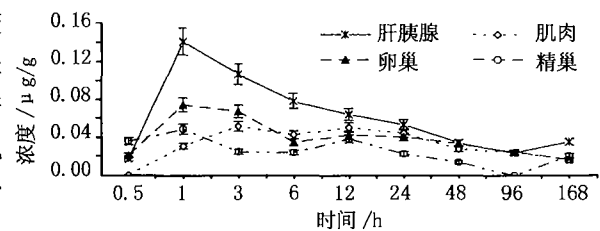


图3 中华绒螯蟹肌注给药恩诺沙星后组织中 环丙沙星的药物浓度变化

Fig.3 The tissues concentration of CIP vs. time after injected administration to *E. sinensis* at a dose of 10 mg/kg with ENR

$e^{-0.087t} + 5.651 \times e^{-0.009t}$, 该拟合曲线相关指数(R^2)0.987, 消除半衰期($t_{1/2\beta}$)为 73.93 h; 肌肉中药物浓度-时间关系方程为: $C_0 = 3.995 \times e^{-0.099t} + 0.967 \times e^{-0.011t}$, R^2 为 0.997, $t_{1/2\beta}$ 为 45.186 h; 精巢中药物浓度-时间关系方程为: $C_0 = 2.406 \times e^{-0.059t} + 0.416 \times e^{-0.006t}$, R^2 为 0.984, $t_{1/2\beta}$ 为 45.577 h; 卵巢中药物浓度-时间关系方程为: $C_0 = 0.474 \times e^{-0.074t} + 1.808 \times e^{-0.018t}$, R^2 为 0.998, $t_{1/2\beta}$ 为 38.081 h。

3 讨论

3.1 关于流动相的筛选

水产动物体内药物残留检测方法以反相高效液相色谱(RP-HPLC)法最为常用^[2-20],因为它具有灵敏度、回收率和精密度高等特点^[1]。虾类等甲壳动物体内药物的 HPLC 法检测研究也较多^[2,5,9,12,13]。但对于中华绒螯蟹体内药物 HPLC 法检测方法的研究报道较少^[3,11],且关于蟹组织中药物含量的检测方法还未见报道。

氟喹诺酮类药物的 HPLC 分析,多以甲醇(乙腈)-磷酸盐缓冲液(pH 2.0~3.5)为流动相。方星星等^[12]研究恩诺沙星在中国对虾体内的药代动力学时的流动相是 0.017 mol/L 四丁基溴化胺:乙腈(88:12, V/V), 75% 磷酸调 pH 3.0, 而巩华等^[13]测定凡纳滨对虾血淋巴中恩诺沙星时采用的流动相则为 0.05 mol/L 磷酸:甲醇(60:40, V/V), 三乙胺调 pH 2.8; Intorre^[7]研究恩诺沙星在尖吻鲈中的药代动力学时使用的流动相为 0.01 mol/L 磷酸缓冲液/乙腈(85/15, v/v), 三乙胺调 pH 3.0, Rocca^[6]研究菱羊鲷对恩诺沙星的处置时采用的流动相为 0.01 mol/L 磷酸二氢钾 + 4.5 mL/L 磷酸(pH 2.0)/乙腈/三乙胺(75/15/10, V/V/V); Lewbart^[8]在研究恩诺沙星不同方式给药后,在观赏鱼(短盖巨脂鲤)中的药代动力学时采用的流动相最为简单,为 86% 磷酸(HPLC 级)。本试验在测定中华绒螯蟹肌肉、肝胰腺、精巢和卵巢组织中恩诺沙星和环丙沙星含量时,曾尝试采用上述方法所用流动相,结果发现存在两个问题:一是蟹组织,特别是肝胰腺和精巢中“杂质”难以处理,导致杂峰和药物峰较难分离;二是出峰时间过长,对于大量样品的处理有困难。经过数十次的尝试后,发现甲醇、柠檬酸和醋酸铵的混合盐可以较好地满足实验要求,但仍发现恩诺沙星的保留时间过长(达 20 min);最后我们采用三乙胺调节 pH 4.5 时,恩诺沙星和环丙沙星与杂质峰都能得到较好的分离,出峰时间均在 10 min 以内,且峰形良好。

3.2 关于检测限的确定

本研究采用的 Agilent-1100 型高效液相色谱仪配备紫外检测器,其检测灵敏度相对荧光检测器要低, Rocca^[6]、Intorre^[7]在使用荧光检测器时,恩诺沙星、环丙沙星的检测限均为 0.01 $\mu\text{g/g}$ ($\mu\text{g/mL}$)。日本厚生劳动省规定中国烤鳗中恩诺沙星最大残留限量(MRL)为 0.05 $\mu\text{g/g}$; 2001 年我国农业部制定的《无公害食品 水产品中渔药残留限量》^[21]规定恩诺沙星和环丙沙星在水产动物中的最大残留限量也为 0.05 $\mu\text{g/g}$ 。本研究在样品的前期处理中增加了氮气吹干和旋转蒸发两个步骤,以求将样品中药物进行浓缩以增加样品相对浓度。结果发现:恩诺沙星最低可以检测到 0.02 $\mu\text{g/g}$, 而环丙沙星可达 0.004 $\mu\text{g/g}$, 能较好满足蟹组织中恩诺沙星和环丙沙星残留检测的要求。

3.3 关于回收率和精密度

回收率系指某一种物质经一定方法处理后,所测定的量与加入量的百分比,可以表明从样品的制备和样品的测定整个过程药物的损失程度。分析方法的回收率试验和精密度试验应包括样品处理在内的全过程操作^[2]。恩诺沙星在四种组织中的平均回收率为 $70.5\% \pm 12.61\%$, 环丙沙星在四种组织中的平均回收率为 $70.25\% \pm 14.73\%$, 两种药物的组织回收率较为接近,均在 70% 左右。虽然回收率的绝对值不高,但是其日内精密度和日间精密度(用“相对标准偏差(RSD)”表示)分别为 $3.27\% \pm 0.84\%$, $2.14\% \pm 0.68\%$; $5.38\% \pm 2.46\%$, $3.48\% \pm 1.16\%$, 这表明本试验建立的方法精密度较高,即包括组织样品处理在内的高效液相色谱全过程操作分析测定恩诺沙星、环丙沙星的方法具有较好的再现性。

应用所建立的方法,测定了肌注给药后中华绒螯蟹肌肉、肝胰腺、精巢和卵巢中恩诺沙星和环丙沙

星的浓度,结果基本反映出该药在其体内的代谢规律。由图2可知,恩诺沙星在蟹组织中24 h内浓度均在 $1\ \mu\text{g/g}$ 以上,其中肝胰腺中更达到 $3\ \mu\text{g/g}$;环丙沙星的代谢规律不能用房室模型进行模拟,但从图3可以看出,环丙沙星在各组织中的消除规律基本一致,第48 h其浓度就已接近安全限量。因此,在合理用药的情况下,恩诺沙星作为水产药物具有较好的前景。

综上所述,试验所设计的高效液相色谱法条件适合于分析中华绒螯蟹组织中恩诺沙星、环丙沙星的浓度。

参考文献:

- [1] 刘开永,汪开毓.恩诺沙星在水产中应用与研究[J].中国兽药杂志,2004,38(10):32-34.
- [2] 房文红,邵锦华,施兆鸿,等.斑节对虾血淋巴中诺氟沙星含量测定及药代动力学[J].水生生物学报,2003,27(1):13-17.
- [3] 杨先乐,刘至治,孙文钦,等.中华绒螯蟹血淋巴内盐酸环丙沙星的反相高效液相色谱法的建立[J].水产学报,2001,25(4):348-354.
- [4] 张雅斌,张祚新,刘艳辉,等.恩诺沙星、氧氟沙星在鲤鱼体内的血药浓度测定[J].水产科学杂志,2003,16(1):5-8.
- [5] 徐维海,林黎明,朱校斌,等.恩诺沙星及其代谢产物在吉富罗非鱼、中国对虾体内的残留规律研究[J].水产科学,2004,23(7):5-8.
- [6] Rocca G, Della A D, Salvo J, et al. The disposition of enrofloxacin in seabream (*Sparus aurata* L.) after single intravenous injection or from medicated feed administration[J]. Aquaculture, 2004, 232: 53-62.
- [7] Intorre L, Cecchini S, Deen J, et al. Pharmacokinetics of enrofloxacin in the seabass (*Dicentrarchus labrax*) [J]. Aquaculture, 2000, 182: 49-59.
- [8] Lewbart G, Vaden S, Deen J, et al. Pharmacokinetics of enrofloxacin in the red pacu (*Colossoma brachypomum*) after intramuscular, oral and bath administration[J]. J Vet Pharmacol Ther, 1997, 20: 124-128.
- [9] 房文红,于慧娟.对虾肌肉、肝胰腺中诺氟沙星含量反相高效液相色谱法测定[J].水产学报,2004,28(增刊):7-12.
- [10] 房文红,杨先乐,周凯,等.诺氟沙星在凡纳滨对虾不同组织中处置和消除规律[J].水产学报,2004,28(增刊):19-24.
- [11] 李正,杨勇,杨先乐,等.盐酸环丙沙星药液口灌在中华绒螯蟹体内的代谢动力学研究[J].水产学报,2004,28(增刊):25-29.
- [12] 方星星,王群,李健.恩诺沙星及其代谢产物环丙沙星在中国对虾体内的代谢动力学[J].水产学报,2004,28(增刊):35-41.
- [13] 巩华,宫晶,李华.凡纳滨对虾血淋巴内恩诺沙星检测方法的建立[J].水产学报,2004,28(增刊):42-46.
- [14] 祝万菊,邓旭明,张艳萍.恩诺沙星缓释溶液在猪体内的药物动力学及生物利用度[J].吉林农业大学学报,2003,25(3):335-338.
- [15] 曾振灵,冯其辉.恩诺沙星在猪体内的生物利用度及药物动力学研究[J].中国兽医学报,1996,16(6):606-612.
- [16] 胡功政,冯其辉.恩诺沙星及其活性代谢物在鸡体内的药物动力学[J].中国兽医学报,1999,19(2):171-174.
- [17] Haritova A, Lashev L, Pashov D. Pharmacokinetics of enrofloxacin in lactating sheep[J]. Research in Vet Sci, 2003, 182: 241-245.
- [18] Manceau J, Gicquel M, Laurentie M, et al. Simultaneous determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in animal biological fluids by high-performance liquid chromatography application in pharmacokinetics studies in pigs and rabbit[J]. Journal of Chromatography B, 1999, 26: 175-184.
- [19] Rao G S, Ramesh S, Ahmad A H, et al. Disposition kinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin following intravenous administration of enrofloxacin in goats[J]. Small Ruminant Research, 2002, 44: 9-15.
- [20] Mark, Dean D, Richardson W, et al. Detection of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in equine hair[J]. Research in Vet Sci, 2004, 77: 143-151.
- [21] NY 5070.无公害食品——水产品中渔药残留限量[S]. 2001.