

文章编号: 1000-0615(2001)04-0348-07

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

杨先乐, 刘至治, 孙文钦, 蔡完其

(上海水产大学农业部水产增殖生态、生理重点开放实验室, 上海 200090)

摘要:应用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)建立了盐酸环丙沙星在中华绒螯蟹血淋巴内含量的测定方法。本法采用肌肉注射的给药方法, 给药剂量为 $8.17 \pm 0.56 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $6.25 \pm 0.85 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。血淋巴从心区抽取。经各种抗凝方法的比较, 认为等量的 ACD 与等量的血淋巴混合, 可得到持久的抗凝效果。血淋巴样经甲醇去蛋白, 3000 r/min 离心 10min 后, 取上清液上 HPLC。色谱柱, RP-ODS-5 μm $150 \times 4.6 \text{ mm}$; 流动相, 甲醇-磷酸缓冲液-四丁基溴化铵 = 250:750:20 (v/v/v); 流速, $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样量, 2 μL ; 检测波长, 280nm。研究表明, 本法线性关系与重复性良好; 雌、雄蟹平均回收率分别为 $100.08 \pm 3.43\%$ 和 $99.11 \pm 8.20\%$; 日间精密密度、平均提取精密密度分别为 $1.19 \pm 0.92\%$ 、 $1.55 \pm 0.01\%$ 。用该方法对肌肉注射给药后 48h 内中华绒螯蟹雄蟹血淋巴中的盐酸环丙沙星的血药浓度进行检测, 揭示出由 $37.13 \pm 0.08 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 降至 $5.96 \pm 0.18 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的代谢规律。

关键词: 中华绒螯蟹; 盐酸环丙沙星; 药动力学; 反相高效液相色谱法

中图分类号: S65.116 文献标识码: A

The method of RP-HPLC determination of ciprofloxacinum in hemolymph of *Eriocheir sinenses*

YANG Xian-le, LIU Zhi-zhi, SUN Wen-qin, CAI Wan-qi

(Key Laboratory of Ecology & Physiology of Aquaculture of Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: A method of determination of ciprofloxacinum in the hemolymph of Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis*, was established by RP-HPLC. The drug was administered by intramuscular at a dose of 8.17 ± 0.56 and $6.25 \pm 0.85 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ to male and female crab, respectively. The hemolymph was extracted from the cardiac region. By comparison among various anti-coagulant methods, the permanent result of anticoagulation was obtained through ACD mixing with equal volume hemolymph. Hemolymph samples got rid of protein by methanol, centrifuged at $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ for 10 minutes and then the supernatant was used to HPLC. The RP-ODS-5 μm $150 \times 4.6 \text{ mm}$ ID column was used, with a mobile phase of methanol-phosphate buffer-tetrabutylammonium bromide = 250:750:20 (v/v/v); The flow rate was $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; the auto-injected volume, 2 μL and the uv detection wavelength, 280nm. The study showed that the linearity and repeatability were good; the average recovery of both male and female crab were: $100.08 \pm 3.43\%$ and $99.11 \pm 8.20\%$; the intra-day precision, the

收稿日期: 2000-11-29

资助项目: 农业部渔业重点科研项目(渔95-B-00-01)

第一作者: 杨先乐(1948-), 男, 湖南省桃源县人, 研究员, 主要从事水产动物病害研究。Tel: 021-65710870, E-mail: xlyang@shfu.edu.cn

average extracted-precision were $1.19 \pm 0.92\%$, $1.55 \pm 0.01\%$ and $2.31 \pm 1.03\%$, respectively. The law of the metabolism of blood-drug concentration was disclosed dropping from $37.12 \pm 0.08 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ to $5.96 \pm 0.18 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, by using RP-HPLC method to determine the ciprofloxacinum in hemolymph within 48 hours in male crab after administration of the drug through intramuscular.

Key words: *Eriocheir sinensis*; ciprofloxacinum; pharmacokinetics; RP-HPLC

盐酸环丙沙星(Ciprofloxacinum)属第三代喹诺酮类抗菌药,它通过与DNA回旋酶亚基A结合,抑制了酶的切割与连接功能,阻止了DNA的复制,而起到抗菌作用^[1]。由于盐酸环丙沙星的抗菌活性高、抗菌谱广、不易产生耐药性,被广泛地应用在水产动物细菌性疾病的防治上^[2-4]。对由弧菌、嗜水气单胞菌等引起的中华绒螯蟹细菌性疾病,盐酸环丙沙星也是首选药物之一^[5]。但由于对该药在中华绒螯蟹体内的药代动力学缺乏研究,因此,正确的使用剂量、疗程以及相应的停药期都是借鉴人、兽医的资料,存在较大的盲目性,这不仅影响了药物的使用效果,而且也给中华绒螯蟹的品质带来了一定的影响。

以往有关水产动物药动学方面的研究,大部分集中于鱼类,仅少数涉及到虾类、中华鳖等其它水产动物^[6-16]。由于进行中华绒螯蟹药代动力学研究的给药、采样方法和其它水产动物有较大的区别,在某种程度上有一定难度,因此,用反向液相色谱测定法测定中华绒螯蟹体内药物的含量及药物动力学方面的研究鲜有报道。本文旨在摸索从中华绒螯蟹体内抽取血淋巴并建立血药浓度检测方法,为弄清楚盐酸环丙沙星在中华绒螯蟹体内的分布、代谢以及消除规律奠定基础,以便为中华绒螯蟹的合理用药指示方向。

1 材料与方法

1.1 中华绒螯蟹

由上海前卫特种水产养殖公司一场提供,雄蟹130只,体重 $61.5 \pm 4.11\text{g}$;雌蟹110只,体重 $47.81 \pm 7.62\text{g}$ 。试验前,在 $4\text{m} \times 5\text{m}$ 的水泥池中分别暂养50d和15d,并在试验所用水族箱($1.0\text{m} \times 0.5\text{m} \times 0.4\text{m}$)中驯养一周。试验水温 $20.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 。

1.2 实验试剂

甲醇, HPLC级,上海吴径化工厂生产;盐酸环丙沙星标准品(纯度为99.54%),盐酸环丙沙星原粉(纯度为98%),均由上海三维制药公司提供;抗凝剂肝素钠($1.45\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、血淋巴抗凝剂AS(anticoagulant solution)及ACD(acid citrate dextrose)参照蔡武城等的方法配制^[17]。

1.3 高效液相色谱仪及色谱条件

高效液相色谱仪采用SHIMADZU LG-6A型系列,包括SG-6A系统控制仪, SIL-6A自动进样器, SPD-6AV紫外检测器, CTO-6A柱温箱, LG-6A高压泵, G-R5A数据处理装置等。色谱条件:色谱柱为RP-ODS C₁₈分析柱($15\text{cm} \times 4.6\text{mm}$, $5\mu\text{m}$),流动相按甲醇:磷酸缓冲液($0.05\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢甲+ 2.8mL 磷酸):四丁基溴化铵($0.05\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) = 250:750:20(v/v/v)进行配制,流速 $1.0\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长280nm,柱温 40°C ,检测灵敏度0.01AUFS。

1.4 抗凝效果实验

分别采取血淋巴与抗凝剂直接混合(v/v = 0.6:0.2)及抗凝剂浸润注射器与离心管后烘干的方式,比较三种抗凝剂肝素钠、AS与ACD的抗凝效果。在此基础上,选择上述抗凝效果较好的抗凝剂,比较在血淋巴样品中加入不同体积抗凝剂的抗凝效果。

1.5 给药、血淋巴样的采集及血淋巴样前处理

盐酸环丙沙星原粉用双蒸水配成 5 和 $3\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液(分别用于雄、雌蟹),通过中华绒螯蟹第四步足与体壁关节膜处肌肉注射给药,每只蟹 0.1mL (即雄蟹: $8.17 \pm 0.56\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$;雌蟹: 6.25 ± 0.85

$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。从蟹背部心区开一小孔,用抗凝剂润湿管壁的卡介苗注射器抽取血淋巴,每只蟹 1 mL。给药前,先各抽取一组蟹(5只)的血淋巴,作为空白对照;给药后,按所设时间点,定时抽取血淋巴,每个时间点取 5 只蟹,并做一个重复。用最佳抗凝方法 $6000\cdot\text{min}^{-1}$ 15min 分离血浆,样品置于 $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。RP-HPLC 检测前,血浆自然溶解后摇匀,准确吸取 0.5 mL 于 10 mL 离心管中,加入甲醇 1 mL,旋涡混合 2min,再加入甲醇 0.5 mL,同法混合 2min, $3000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10min,吸取上清液于 1.5 mL 样品瓶中,自动进样器 2 μL 进样。

1.6 标准曲线的制备

用定容浓度依次为 1.015、2.030、3.045、4.060、5.075、10.15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的盐酸环丙沙星标准溶液系列,以 RP-HPLC 测得的峰面积为纵坐标,相应的浓度为横坐标,作出浓度范围为 1~10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准曲线,并通过 SYSTAT 软件,求出回归方程和相关系数。

1.7 回收率测定

采用加入法。将 0.5 mL 雄蟹空白血浆分别加入含盐酸环丙沙星标准溶液(浓度为 101.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 15、20、25、50、75 μL 的离心管中,处理与 RP-HPLC 测定同“血样”。同法进行雌蟹空白血浆的回收率测定。HPLC 测定后,按标准曲线回归方程计算回收率[回收率(%) = 样品实测浓度 / 样品实际浓度 \times 100%]。

1.8 精密度测定

采用加入法。

1.8.1 提取精密度(重复性)

在 5 只各盛有 0.5 mL 蟹空白血浆的离心管中分别加入浓度为 1011.33 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准盐酸环丙沙星溶液 50 μL ,其余同“血样”处理。平行测定后,计算出各管盐酸环丙沙星浓度及变异系数(RSD)。同法,对浓度为 101.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准盐酸环丙沙星溶液再重复平行测定一次,计算 RSD。

1.8.2 日间精密度

将浓度为 2.03、4.06、10.15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准盐酸环丙沙星溶液 1 mL 加入 1.5 mL 样品瓶中,RP-HPLC 法连续测定 2 次,每隔 3 d 一次,计算平均峰面积及 RSD。

1.9 中华绒螯蟹血淋巴内盐酸环丙沙星药物浓度(以下简称血药浓度)的测定

按所建立的方法,测定肌肉注射给药 0.017h(1min)、0.083h(5min)、0.167h(10min)、0.5h、1h、1.5h、2h、4h、8h、12h、24h、48h 后中华绒螯蟹雄蟹的血药浓度,以此检验所建立的方法。

2 结果

2.1 最佳抗凝剂和抗凝方法

通过在相同条件下,肝素钠、AS 与 ACD 三种抗凝剂的抗凝效果比较,结果表明在血淋巴中加入肝素钠者 1.5h 后,即出现 50% 以上的胶状凝集,而 AS 在 30h 后才有少量絮状沉淀出现,ACD 36.5h 后才有少量白色絮状物;采取润湿管壁后烘干方式,发现使用肝素钠者血淋巴样迅速凝固,而使用 ACD 者 72 h 后仍未见凝固现象。表 1 是 ACD 的不同处理方式与 ACD 与血淋巴不同体积比的抗凝效果。结果表明,ACD 采取润湿烘干方式不适于血淋巴较长时间保存,只有将等量的 ACD 与等量的血淋巴混合,才能取得较持久的抗凝效果。

2.2 中华绒螯蟹血淋巴中盐酸环丙沙星的色谱行为

在 1.3 所设计的色谱条件下,HPLC 基线走动平稳,盐酸环丙沙星保留时间为 10.3min,样品血浆中虽有杂质峰出现,但无干扰峰,与药峰分离良好(图 1)。

2.3 标准曲线的线性范围和灵敏度

在标准品盐酸环丙沙星浓度为 1~10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,标准曲线为 $Y = -675.63 + 1204.723X$ (Y-峰面

积, X- 盐酸环丙沙星浓度) (图 2)。相关系数为 $r=0.9985$, 相关性良好。根据标准曲线, 以引起两倍基线噪音的药量为最低检测限, 得出本法的灵敏度为 $0.01 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

表 1 ACD 的处理方式及其不同体积的抗凝效果比较

Tab. 1 The comparison of anticoagulation of ACD by different treatments and various volume

处理方式	ACD 加入量 (mL)	血淋巴量 (mL)	ACD 与血淋巴的体积比	试验重复次数	抗凝效果
ACD 润湿管壁 后烘干	-	0.6	-	2	+ / +
	-	0.5	-	3	+ / + / +
ACD 与 血淋巴混合	-	0.2	-	2	+ / +
	0	0.3	0	1	+
	0	0.5	0	1	+
	0.1	1.0	1/10	1	+
	0.2	1.0	1/5	1	+
	0.2	0.6	1/3	1	+
	0.2	0.5	2/5	2	+ / +
	0.2	0.4	1/2	1	+
	0.3	0.5	3/5	4	+ / + / + / +
	0.4	0.5	4/5	4	+ / + / + / +
0.5	0.5	1	2	- / -	

注: 抗凝效果样品在低温 (4°C) 下放置 15 d 以上, “+” 代表凝固, “-” 代表不凝固。

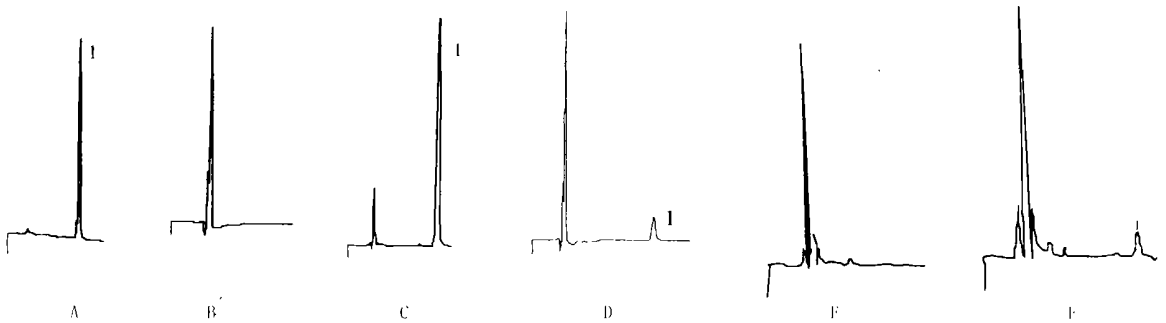


图 1 盐酸环丙沙星的色谱行为

Fig. 1 Liquid chromatogram of ciprofloxacin

- A. 标准盐酸环丙沙星; B. 雄蟹空白血浆; C. 加入标准盐酸环丙沙星后的雄蟹血浆; D. 给药 1h 后的雄蟹血浆样品;
E. 雌蟹空白血浆; F. 给药 48h 后的雌蟹血浆样品; 1 所指示的色谱峰为盐酸环丙沙星峰

2.4 回收率

分别对雌、雄蟹空白血淋巴中 5 种不同浓度的盐酸环丙沙星回收率测定结果表明, 其范围在 $88.71\% \sim 105.76\%$ 和 $97.37\% \sim 105.45\%$ 间; 平均回收率为 $99.11 \pm 8.20\%$ 和 $100.08 \pm 3.43\%$ (表 2, 表 3)。

2.5 精密度

浓度为 $1011.33 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 与 $101.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的盐酸环丙沙星标准溶液的提取精密度 (重复性) 测定结果表明, 其变异系数 (RSD) 分别为 1.55% 与 1.54% ,

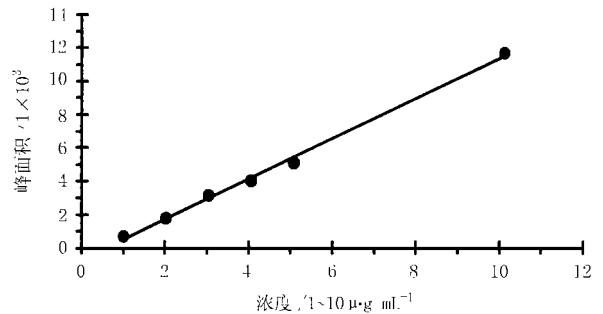


图 2 盐酸环丙沙星标准曲线

Fig. 2 The standard curve of ciprofloxacin

平均为 $1.55 \pm 0.01\%$ (表 4)。

表 2 中华绒螯蟹雌蟹血淋巴中盐酸环丙沙星回收率的测定结果

Tab. 2 The recovery of ciprofloxacin in the hemolymph of female *Eriocheir sinensis*

项目	标准盐酸环丙沙星溶液($101.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)加入量(μL)				
	15	20	25	50	75
样品实际浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	7.53	10.01	12.49	24.67	36.55
样品实测浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	6.68	9.19	13.21	26.07	37.86
回收率(%)	88.71	91.81	105.76	105.67	103.58
平均回收率(%)	99.11 \pm 8.20				

表 3 中华绒螯蟹雄蟹血淋巴中盐酸环丙沙星回收率的测定结果

Tab. 3 The recovery of ciprofloxacin in the hemolymph of male *Eriocheir sinensis*

项目	标准盐酸环丙沙星溶液($101.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)加入量(μL)				
	15	20	25	50	75
样品实际浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	0.76	1.01	1.25	2.48	3.67
样品实测浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	0.74	0.99	1.27	2.43	3.87
回收率(%)	97.37	98.02	101.60	97.98	105.45
平均回收率(%)	100.08 \pm 3.43				

表 4 对中华绒螯蟹血淋巴中盐酸环丙沙星测定的提取精密度(重复性)

Tab. 4 The extracted-precision (or repeatability) of ciprofloxacin in the hemolymph of *Eriocheir sinensis*

项 目	标准盐酸环丙沙星溶液($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	
	1011.33	101.5
加入量(μL)	50	50
各次实测浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	25.82/25.63/26.24/25.22/26.09	2.58/2.62/2.63/2.53/2.61
平均实测浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	25.80 \pm 0.40	2.59 \pm 0.04
RSD(%)	1.55	1.54
平均RSD(%)	1.55 \pm 0.01	

表 5 是 3 种不同浓度的标准盐酸环丙沙星的日间精密度测定结果。由表 5 可知, RSD 最低为 0.21%, 最高为 2.04%, 平均为 $1.19 \pm 0.92\%$ 。

表 5 标准盐酸环丙沙星溶液测定的日间精密度

Tab. 5 The inter-day precision of standard ciprofloxacin

标准盐酸环丙沙星溶液浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	峰 面 积		RSD (%)	平均 RSD (%)
	日间各次实测值	平均数 \pm 标准差		
2.030	2214/2151	2182.5 \pm 44.55	2.04	1.19 \pm 0.92
4.060	4306/4387	4346.5 \pm 57.28	1.32	
10.15	11224/11191	11207.5 \pm 23.33	0.21	

2.6 注射给药后中华绒螯蟹雄蟹血淋巴内盐酸环丙沙星的代谢规律

应用上述所建立的 RP-HPLC 法, 对肌肉注射盐酸环丙沙星的中华绒螯蟹雄蟹的血药浓度进行两次平行测定, 药时曲线如图 3。结果表明, 2h 内, 血药浓度迅速下降, 由开始时的 $37.13 \pm 0.18 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 降至 0.167h (10min) 的 $20.27 \pm 0.59 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 1 h 的 $15.16 \pm 0.78 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以及 2h 的 $11.66 \pm 0.09 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 2h 至 24h, 血药浓度缓慢下降, 维持在 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 左右; 48h 后, 血药浓度降到 $5.96 \pm 0.18 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

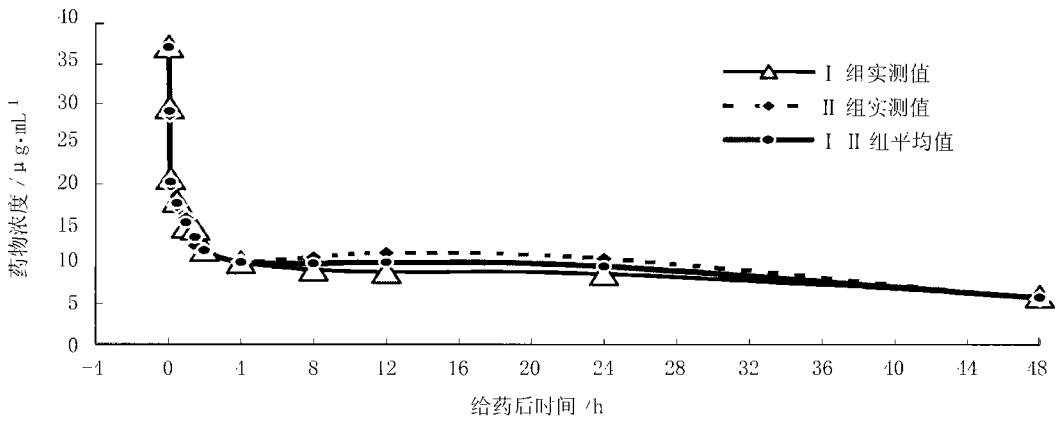


图3 肌肉注射盐酸环丙沙星后的药-时曲线

Fig. 3 The Concentration-Time curve of ciprofloxacinum after intramuscular administration

3 讨论

中华绒螯蟹属甲壳动物,循环系统为开放式,主要成分为血淋巴,它和鱼类有较大的区别。关于中华绒螯蟹血淋巴内药物检测方法的研究,至今尚无报道。动物体内药物浓度的检测方法有酶免疫法、薄层色谱、液相色谱、质谱和光谱等,而以 RP-HPLC 法较为常用,因为它具有灵敏度高、回收率高、精密度高及重现性好等特点,该法也常用于水产动物体内药物浓度的检测上^[6,8-17]。对于甲壳动物中华绒螯蟹,是否亦能用该法检测其血淋巴内的药物含量,使用该法的具体条件是什么,这是本文所要解决的关键问题。本文的结果对此作出了肯定的回答:

(1) 中华绒螯蟹的血淋巴与鱼类的血浆有较大的区别,本试验成功地摸索出了从中华绒螯蟹抽取血淋巴的方法,并筛选了合适的抗凝剂以及确定了抗凝剂的用量,为制备标准的分析样品奠定了基础。试验证明,ACD 的抗凝作用最好,而且当其与血淋巴等量混合后,可取得较持久的抗凝效果;此种方法,完全可满足样品分析的要求。

(2) 在试验所摸索的条件下,血淋巴内盐酸环丙沙星的色谱行为不仅基线走动平稳,保持时间较长,且无干扰峰,这就为药峰峰面积的测定提供了可能。在标准品盐酸环丙沙星浓度范围为 1~10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,标准曲线的相关系数 $r=0.9985$,具有极好的相关性,由此表明了该方法为试验样品的准确定量提供了保障。

(3) 回收率提示着检测方法的准确性。用 HPLC 法,陈会波等测定鳗康素的回收率为 95.32%^[19],Uno 等^[20]测定虹鳟和五条 ♂ 血浆中的磺胺间甲氧嘧啶(SMM)及其代谢物(AG-SMM)的回收率分别为 96.6%和 93.9%、98.0%和 95.0%;用 RP-HPLC 法,陈文银和管国华^[16]测定诺氟沙星在中华蟹血浆中的平均回收率为 98.9%;而我们对雌、雄蟹空白血淋巴中 5 组不同加入量的标准盐酸环丙沙星检测的回收率范围分别为 88.71%~105.76%和 97.37%~105.45%,平均为 $99.11\pm 8.20\%$ 和 $100.08\pm 3.43\%$,表明该法具有较高的准确性。

(4) 精密度是测定方法可靠性的保证。张祚新等^[18]测定鲤鱼体内诺氟沙星的日内和日间精密度分别为 4.72%和 4.98%;Park 等测定对虾体内的 SDM 和 OMP(Ormenthoprim)在血淋巴中的含量时的精密度范围为 0.05~50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^[21]。而本试验的结果表明,日内精密度(或提取精密度)无论是在较高浓度还是较低浓度样品均在 1.54%~1.55%间,日间精密度为 $1.19\pm 0.92\%$ 。由此可以看出,本测定方法具有较高的可靠性。

应用所建立的方法,我们检测了肌注给药后 48h 内各时间点的中华绒螯蟹雄蟹血淋巴内的盐酸环

丙沙星的浓度,结果基本表现出该药在其体内的代谢规律。由图3可以看出,给药后48h内,血药浓度均在 $5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以上,预示着该药在中华绒螯蟹体内有很好的治疗疾病的前景。这说明,RP-HPLC测定法可完全用于中华绒螯蟹血淋巴内盐酸环丙沙星浓度的检测,由此可探讨中华绒螯蟹对环丙沙星的体内代谢状况,相关研究,我们将另有报道。

致谢:在检测样品的过程中,上海大学生命科学学院的雍克岚教授给予了悉心指导,98级研究生陈旭同学提供了很多帮助,谨此致谢。

参考文献:

- [1] 竺心影. 药理学(第三版)[M]. 北京:人民卫生出版社. 1995. 307-311.
- [2] 杨坚. 渔药手册[M]. 北京:中国科学技术出版社. 1998. 179-180.
- [3] 李太武,丁明进,宋协民,等. 皱纹盘鲍脓胞病原菌——河流弧菌 \ominus 的抗药机制的初步研究[J]. 海洋与湖沼, 1996, 27(6): 637-645.
- [4] 林天然,余乃凤. 甲鱼急性肠胃炎鳃腺炎并发症的综合治疗[J]. 内陆水产, 1997, 7: 25.
- [5] 孟庆显,余开康. 鱼虾蟹贝疾病诊治和防治[M]. 北京:中国农业出版社. 1996. 255-281.
- [6] Nouws J F M, Crondel J L, Schutte A R, et al. Pharmacokinetics of ciprofloxacin in carp, African catfish and rainbow trout[J]. Vet Quart, 1988, 10: 179-180.
- [7] Snieszko S F, Friddle S O, Gniffin. Successful treatment of ulcer disease in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) with terramycin[J]. Science, 1951, 113: 179-182.
- [8] Bruno D W. An investigation into oxytetracycline residues in Atlantic salmon, *Salmo salar* L[J]. J Fish Dis, 1989, 12: 77-86.
- [9] Harry B, Gorran B. Temperature related absorption and excretion of oxytetracycline in rainbow trout (*Salmo gairdneri* L)[J]. Aquac, 1990, 84(3/4): 363-372.
- [10] 李美同,郭文林,仲锋,等. 土霉素在鳗鲡组织中残留的消除规律[J]. 水产学报, 1997, 21(1): 39-42.
- [11] Sohlberg S, Czerwinska K, Rasmussen K, et al. Plasma concentrations of flumequine after intraarterial and oral administration to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) exposed to low water temperatures[J]. Aquac, 1990, 84(3/4): 355-361.
- [12] Boon J H, Nouws J M F, VanderHeiden M H T, et al. Disposition of flumequine in plasma of European eel (*Anguilla anguilla*) after a single intramuscular injection[J]. Aquac, 1991, 99(3/4): 213-223.
- [13] Hustredt S O, Saile R. Distribution and elimination of oxolinic acid in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Wabbaum) after a single rapid intravascular injection[J]. Aquac, 1991, 92: 297-303.
- [14] Kleinow K M, Jarboe H H, Shoemaker K E, et al. Comparative pharmacokinetics and bioavailability of oxolinic acid in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Can J Fish Aquat Sci, 1994, 51: 1205-1211.
- [15] 李兰生,王勇强. 对虾体内氯霉素含量测定方法的研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1995, 25(3): 400-406.
- [16] 陈文银,管国华. 甲鱼血液中诺氟沙星浓度的反相高效液相色谱测定法[J]. 上海水产大学学报, 1997, 6(4): 301-303.
- [17] 蔡武城,李碧羽,李玉民. 生化实验技术教程[M]. 上海:复旦大学出版社. 1983. 47.
- [18] 张祚新,张雅斌,杨勇胜,等. 诺氟沙星在鲤鱼体内的药代动力学[J]. 中国兽医学报, 2000, 20(1): 66-69.
- [19] 陈会波,翁燕珍,郭少忠,等. 鳗康素的药代动力学研究[A]. 鱼病学研究论文集(二)[C]. 北京:海洋出版社, 1995. 143-147.
- [20] Uno K, Aoki T, Ueno R, et al. Pharmacokinetics and metabolism of sulphamonomethoxine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) following bolus intravascular administration[J]. Aquac, 1997, 153(1-2): 1-8.
- [21] Park E D, Lightner D V, Milner N, et al. Exploratory bioavailability and pharmacokinetic studies of sulphadimethoxine and ormetoprim in the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*[J]. Aquac, 1995, 130: 113-128.