

4种氟喹诺酮类药物在肉鸡组织中残留的研究

刘波静

(浙江大学华家池校区动物科学学院,杭州 310029)

摘要:采用高效液相色谱法同时检测肉鸡肌肉、脂肪、肝脏和肾脏组织中4种氟喹诺酮类药物(FQS)的残留。检测条件为:采用HP-StableBond C₁₈分析柱(5 μm, 250 mm ×4.6 mm),以15 mmol/L的四丁基溴化铵溶液-乙腈(体积比94:6)为流动相(用乙酸钠缓冲液调pH3.6),流速1.0 ml/min,柱温30℃;采用荧光检测器检测,激发波长280 nm,发射波长460 nm。测定结果表明,该方法对FQS的最低检测限为0.92 μg/kg,在5.00~100.00 μg/mg的线性范围内,溶液含量与峰面积的相关系数达0.9998以上。在高、中、低3种含量水平下对所测肉鸡组织中4种FQS进行回收率测定,结果为74%~99%,相对标准偏差低于6.5%,该方法能同时测定4种FQS在动物组织中的残留,具有简便、准确、灵敏度较高的特点,符合痕量测定的要求。

关键词:高效液相色谱法;肉鸡;环丙沙星;氧氟沙星;诺氟沙星;恩诺沙星

中图分类号:S859.84

文献标识码:B

文章编号:1671-7236(2007)01-0112-04

喹诺酮类(quinolones, Qs)抗菌药自20世纪60年代萘啶酸,也就是第一代喹诺酮问世以来,至今发展到第4代。有关氟喹诺酮类药物(fluoroquinolones, FQS)合成和报道有数篇,但开发应用最为成功的该类药包括环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)、氧氟沙星(ofloxacin, OFL)、诺氟沙星(norfloxacin, NOR)、恩诺沙星(enrofloxacin, ENR)等,此类药物属广谱高效、抗菌活性强、生物利用度高、毒副作用小、组织分布广的药物,已被世界各国广泛用于畜禽和水生动物疾病的防治。由于FQS在动物体内的残留消除缓慢,过量的药物残留通过食物链会严重损害人体健康。随着人民生活水平的提高,人们对动物性食品的品质要求也越来越高,因此研究环丙沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、恩诺沙星在肉鸡组织中的残留限量及检测方法是必要的,它对保障人民群众身体健康,确保畜禽产品进出口贸易的正常进行,具有直接的经济效益和广泛的社会效益。

近年来,有关高效液相色谱法测定FQS残留已有不少报道,但有的方法虽然灵敏度足够高却只能测定单一恩诺沙星或环丙沙星(Nadon, 1995; An等, 2004);有的方法虽然能同时测定2种(仲锋, 1999)或更多种(梁沛等, 2000; 杜黎明等, 2001; 孙慧等, 2003),但检测灵敏度偏低,而且有的流动相体系较为复杂(杜黎明等, 2003),缓冲液易与有机相产生结晶引起色谱流路堵塞等。国外报道的方法中流动

相多采用梯度洗脱(Marazuela等, 2004; Johnston等, 2002; Schneider等, 2003)。本方法采用等度洗脱,可以同时检测肉鸡组织中4种FQS的残留,最低检测限0.92 μg/kg,满足《无公害食品、水产品中渔药残留限量》NY5070-2001中规定的水产品中有关FQS最高残留限量的检测要求。方法简便、快速、灵敏度高、重现性好。

1 试验材料与方法

1.1 试验材料 Agilent-1100系列高效液相色谱仪及化学工作站,包括自动进样器、荧光检测器、恒温柱温箱、真空在线脱气装置;BS22S德国赛多斯十万分之一天平;Sigma K25高速冷冻离心机;DIA X90C匀浆机;KQ-300DE超声波清洗机;Millipore超纯水制备器。对照品:环丙沙星,纯度99.7%;氧氟沙星,纯度99.8%;诺氟沙星,纯度99.6%;恩诺沙星,纯度99.9%,均由中国兽药药品监察所提供。甲醇、乙腈为色谱纯,四丁基溴化铵、正己烷、二氯甲烷、氢氧化钠、冰乙酸、乙酸钠等均为分析纯。水为二次超纯水。试验动物为28日龄AA肉鸡150只,试验地点浙江温岭。

1.2 色谱分析条件 色谱柱:HP-StableBond C₁₈分析柱(5 μm, 250 mm ×4.6 mm),以15 mmol/L的四丁基溴化铵溶液-乙腈(体积比94:6)为流动相(用乙酸钠缓冲液调pH3.6),流速1.0 ml/min,柱温30℃;采用荧光检测器检测,激发波长280 nm,发射波长460 nm。进样量10 μl。

1.3 试液的配制 FQS标准储备液:精密称取环丙沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、恩诺沙星各25 mg,除

收稿日期:2006-06-19

作者简介:刘波静(1965-),女,上海人,副研究员,研究方向:药物分析。

环丙沙星用 0.03 mol/L NaOH 溶液溶解并定容至 50 ml 外,其余 3 种标准品均分别用乙腈溶解并定容至 50 ml。4 种标准储备液的质量浓度均为 500 mg/L。将上述 4 种标准储备液置于 4 冰箱内保存。FQS 标准工作液:准确移取上述 4 种标准储备液各 1.0 ml 于同一 50 ml 棕色容量瓶中,用乙腈稀释并定容,配制成 4 种药物质量浓度均为 10 mg/L 的混合工作液。从 FQS 混合标准工作液 I 中移取 5.0 ml,用流动相稀释并定容于 50 ml 棕色容量瓶中,制成 4 种药物质量浓度均为 1.0 mg/L 的混合工作液。流动相:准确称取四丁基溴化铵 4.8357 g,用适量的超纯水溶解,加入 80 ml 乙腈,余下用超纯水定容至 1000 ml,混合均匀,以乙酸钠缓冲液调 pH 3.6,得 15 mmol/L 四丁基溴化铵溶液,过滤脱气后现用。乙酸钠缓冲液(pH 3.6):0.2 mol/L HAc 185 ml 和 0.2 mol/L NaAc 15 ml 混合即成。

1.4 样品处理 从 -20 冰箱内取出组织,在室温下自然解冻。精确称取 10.0 g 肉鸡组织样品用生理盐水制成匀浆组织,将匀浆后组织全部转移置 100 ml 聚丙烯离心管中,加入 1 ml 0.2 mol/L 乙酸钠缓冲液(pH 3.6)后混匀,加入 3 ml 二氯甲烷,旋涡混合器上混合 2 min,再用超声波振荡萃取 15 min,以 3000 r/min 的速率离心 5 min。取出有机相,用同样方法提取 3 次,合并有机相,于 40 水浴中用 N₂ 流吹至近干。加入 2 ml 流动相溶液溶解残渣后移入 10 ml 离心管中,再加入 2 ml 正己烷,旋涡混匀,离心分层,弃去上层正己烷相,将下层溶液用针头式微孔水相滤膜过滤器(直径 0.13 mm,孔径 0.45 μm)过滤,滤液供液相色谱测定。

1.5 动物试验 选取 28 日龄 AA 肉鸡 150 只,密闭饲养,自配饲料,没有用过任何化学合成类兽药,正常饲喂 1 周后,随机分成 4 组,其中空白组 30 只,试验组各 40 只,试验组肉鸡分别用 50、100 mg/L 环丙沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、恩诺沙星水溶液混饮 7 d,于用药的最后 1 d 和停药后第 1、3、5、7、9、12 d 各屠宰 7 只鸡,取其肌肉、脂肪、肝脏和肾脏组织,-20 冰箱中保存待测。

2 结果与讨论

2.1 氟喹诺酮类药物结构特性 FQS 类药物是以 4-喹诺酮母核,包括 C-3 和 C-4 位的羧酸和羰基,是 QNS 与细菌 DNA 螺旋酶结合的必须基团。N-1 取代基一般为乙基或其电子等配体,主要影响抗菌谱。C-6 上引入氟原子为 FQS 的结构特性,可大大增强 QNS 与细菌 DNA 螺旋酶的结合力和对细胞的渗透

性,抗菌作用较强,抗菌谱增加。C-2、C-5、C-7 位取代基主要影响体内分布或药动学,特别是 C-7 位连接碱性并有适当水溶性的基团可提高抗菌活性和改善药动力学性质,如 C-7 位上接哌嗪基、吡啶基或吡咯。与细菌 DNA 螺旋酶的结合力和组织渗透性是决定 QNS 药效的 2 个关键因素,亦是结构改造的重点。

2.2 色谱柱的选择 FQS 类药物均属于高极性、高熔点物质,测定此类药物广泛使用的硅胶基反相键合相(C₈、C₁₈)固定相表面存在的酸性位点,普通 C₁₈ 填料中尚有 50% 以上硅醇基仅存游离状态。由于此类药物中叔胺基和羟基团能在水中发生解离,固定相表面这些活性位点可通过氢键或离子交换作用强烈吸附 FQS,出现色谱峰拖尾,保留值不稳定或过长,甚至被长期保留在色谱柱上,导致峰型异常和分离度下降。

根据 FQS 类药物的特性,本试验分别选用 Waters Nova Pak C₁₈ (4 μm, 150 mm × 3.9 mm) 和 Waters μBondaPak™ C₁₈ (10 μm, 300 mm × 3.9 mm) 和 HP-StableBond C₁₈ 分析柱(5 μm, 250 mm × 4.6 mm) 3 根 C₁₈ 色谱柱进行试验,结果表明:3 根 C₁₈ 色谱柱都能将 4 种 FQS 类药物完全分离,但流动相比比例差异较大。Waters Nova Pak C₁₈、BondaPak™ C₁₈ 和 HP-StableBond C₁₈ 四丁基溴化铵溶液所占比例分别为 97%、94% 和 92%,从保护柱子角度考虑,高比例的四丁基溴化铵溶液会增加色谱柱的损坏程度。因此本试验选用 HP-StableBond C₁₈ 柱。

2.3 流动相的选择及优化 在反高效液相色谱中,优化流动相的组成是控制保留值和选择性最方便的方法。流动相的组成、种类和离子强度及 pH 均可影响组分和分离。本试验以 4 种不同流动相组分、种类等进行试验:乙腈-甲醇-BR(73:7:20)作流动相时, BR 缓冲液为磷酸、乙酸、硼酸混合液,成分复杂,其与乙腈、甲醇混合极易产生结晶而引起色谱路堵塞,且灵敏度下降。用磷酸盐-乙腈溶液作流动相时,分别调整不同比例、酸度等氧氟沙星与诺氟沙星分离不佳。用甲醇-柠檬酸加醋酸胺(25:75)作流动相,虽能有效地将 4 种药物分离,但灵敏度相对较低,检出限较大。本试验用四丁基溴化铵-乙腈(94:6)作流动相,可将 4 种药物有效分离,同时可有效消除硅羟基的作用,且灵敏度较高(图 1)。本试验同时考察了不同水平四丁基溴化铵溶液的浓度影响。以 15 mmol/L 的四丁基溴化铵溶液浓度时,4 种药物的色谱峰最佳。

在本试验选定的流动相中,用乙酸钠缓冲液调

pH 至 3.6 可以有效抑制离子解离、保持峰型。

2.4 工作曲线、线性范围及最低检测限 取 1.0 ml 混合标准工作液 II,用流动相溶液稀释成 5~100 μg/kg 的标准工作液,在所选择的色谱条件下进样 10 μl,以标准溶液浓度 X 对色谱峰面积 Y 进行线性回归,结果见表 1。

表 1 氟喹诺酮类药物的线性回归、相关系数

试验药物	回归方程	相关系数 r	线性范围 (μg/kg)
OFL	$Y = 1.96 \times 10^3 - 2.46 \times 10^4$	0.9999	5 ~ 100
NOR	$Y = 1.24 \times 10^3 - 3.11 \times 10^4$	0.9998	5 ~ 100
CIF	$Y = 1.27 \times 10^3 - 4.26 \times 10^4$	0.9997	5 ~ 100
ENR	$Y = 1.34 \times 10^3 - 2.95 \times 10^4$	0.9997	5 ~ 100

选取经测定确认样品中不含 4 种 FQS 的空白样品,采用添加标准溶液的方法,检测 FQS 的最低检测限。在选定色谱条件下,以仪器基线噪声 3 倍信号 (S/N = 3) 计算,本方法对 4 种 FQS 药物残留检出限均为 0.92 μg/kg。

2.5 方法回收率、精密度和重复性试验 在已知不含 4 种 FQS 的肉鸡组织样品中,分别添加一定量的 FQS 混合标准溶液,进行 10、50、100 μg/kg 3 个水平的加标回收试验,按 1.4 节所述样品处理方法进

表 2 肉鸡组织中 4 种氟喹诺酮类药物的回收率 ($\bar{X} \pm SD, n = 6, \%$)

样品添加量 (μg/kg)	OFL		NOR		CIF		ENR		
	回收率	相对标准偏差	回收率	相对标准偏差	回收率	相对标准偏差	回收率	相对标准偏差	
肌肉	100	92.56 ± 6.31	2.3	89.11 ± 5.21	4.1	88.56 ± 5.15	3.4	85.64 ± 6.01	4.1
	50	85.91 ± 5.29	4.6	85.11 ± 4.56	5.6	81.12 ± 2.99	4.2	85.01 ± 5.11	5.6
	10	78.15 ± 4.26	6.5	83.15 ± 4.01	5.4	79.91 ± 6.02	5.2	82.19 ± 4.76	5.1
肝脏	100	87.26 ± 5.02	3.1	89.28 ± 3.26	4.2	89.26 ± 5.02	3.6	88.58 ± 4.28	5.7
	50	84.26 ± 2.69	5.1	88.26 ± 2.59	7.1	84.26 ± 5.11	4.8	85.74 ± 3.09	3.6
	10	79.26 ± 3.22	6.5	85.26 ± 2.37	5.2	80.99 ± 4.29	4.6	82.24 ± 3.74	3.7
肾脏	100	88.65 ± 3.45	3.6	87.11 ± 2.39	4.1	88.56 ± 4.44	2.9	89.25 ± 4.05	4.2
	50	85.21 ± 2.96	6.2	85.61 ± 2.33	3.8	85.58 ± 4.78	6.2	86.41 ± 3.04	5.8
	10	79.95 ± 5.26	6.3	83.26 ± 4.24	4.2	79.67 ± 6.37	4.2	84.65 ± 2.48	6.0
脂肪	100	89.56 ± 3.26	2.7	86.23 ± 6.26	4.9	83.57 ± 4.59	4.6	85.29 ± 4.47	4.5
	50	84.67 ± 4.26	4.9	83.59 ± 7.12	5.6	81.74 ± 5.04	5.2	84.75 ± 6.12	5.1
	10	79.23 ± 5.26	6.1	79.65 ± 6.01	5.5	79.27 ± 2.98	6.0	79.28 ± 4.79	6.1

2.6 组织样品残留分析 肉鸡分别用 50、100 mg/L 环丙沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、恩诺沙星水溶液混饮 7 d 后,在用药最后 1 d 和停药后第 1、3、5、7、9、12 d 屠宰,测定其肌肉、脂肪、肝脏和肾脏组织中 FQS 类药物残留量,从表 3 中可见残留量与休药期的关系。试验结果表明:用 50、100 mg/L 环丙沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、恩诺沙星水溶液混饮 7 d 后,在肉鸡各组织中药物残留消除缓慢。休药 7 d 时,肌肉和脂肪中

行,测定 4 种药物含量,计算回收率,每个水平平行测定 5 次。结果见表 2。

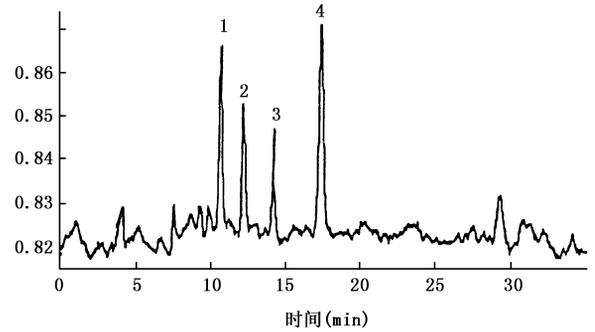


图 1 4 种混合 FQS 组织样品色谱图

注:1. OFL; 2. NOR; 3. CIF; 4. ENR。

将 1.4 节制备的试验样品溶液放置在室温 (25 左右) 0、2、4、6、8 h,分别按上述色谱条件进行测定,计算 RSD 为 0.46 % (n = 5),结果表明在室温条件下,试验样品溶液在 8 h 内精密度及重现性良好。

同样将 1.4 节制备的试验样品溶液放置冰箱 4 保存。放置 1、5、10 d 后按上述色谱条件进行测定,计算 RSD 为 0.76 % (n = 5),试验结果表明,试验样品在 4 冰箱中能稳定保存 6 d。

4 种药物残留均小于 0.030 mg/kg,而肝脏、肾脏中药物残留相对较高。休药 12 d 时,肝脏、肾脏中 4 种药物残留均小于 0.030 mg/kg。根据美国 FDA 和欧共体 (EEC) 规定的 FQS 类药物在肉仔鸡食用组织中的最高残留限量 (MRL) 标准为 0.03 mg/kg,就此标准为限,建议我国在肉鸡食用组织中的最高残留限量标准规定为 0.03 mg/kg,其休药期应以 12 d 以上为宜。

表 3 肉鸡组织中 4 种氟喹诺酮类药物的残留量 ($\bar{X} \pm SD, n = 6, \text{mg/kg}$)

组别与名称	用药天数(d)	停药天数(d)						
		7	1	3	5	7	9	12
50mg/L								
肌肉	OFL	0.59 ± 0.11	0.42 ± 0.082	0.18 ± 0.043	0.051 ± 0.011	0.013 ± 0.006	ND	ND
	NOR	0.57 ± 0.22	0.39 ± 0.071	0.13 ± 0.023	0.049 ± 0.012	0.016 ± 0.002	ND	ND
	CIF	0.54 ± 0.12	0.39 ± 0.062	0.19 ± 0.022	0.050 ± 0.011	0.015 ± 0.008	ND	ND
	ENR	0.51 ± 0.26	0.37 ± 0.051	0.15 ± 0.013	0.048 ± 0.013	0.011 ± 0.007	ND	ND
肝脏	OFL	1.32 ± 0.26	0.98 ± 0.18	0.69 ± 0.16	0.32 ± 0.076	0.27 ± 0.046	0.11 ± 0.039	0.026 ± 0.007
	NOR	1.29 ± 0.19	0.89 ± 0.14	0.71 ± 0.14	0.37 ± 0.099	0.28 ± 0.029	0.17 ± 0.011	0.029 ± 0.005
	CIF	1.27 ± 0.23	0.78 ± 0.20	0.59 ± 0.11	0.27 ± 0.103	0.23 ± 0.043	0.14 ± 0.028	0.026 ± 0.004
	ENR	1.31 ± 0.17	0.87 ± 0.15	0.64 ± 0.13	0.34 ± 0.087	0.27 ± 0.027	0.13 ± 0.012	0.017 ± 0.003
肾脏	OFL	1.12 ± 0.21	0.74 ± 0.15	0.62 ± 0.09	0.42 ± 0.061	0.26 ± 0.033	0.094 ± 0.099	0.006 ± 0.001
	NOR	1.19 ± 0.27	0.79 ± 0.15	0.67 ± 0.10	0.44 ± 0.060	0.28 ± 0.026	0.099 ± 0.084	0.009 ± 0.002
	CIF	1.07 ± 0.19	0.85 ± 0.16	0.71 ± 0.10	0.51 ± 0.064	0.23 ± 0.019	0.087 ± 0.049	0.006 ± 0.004
	ENR	1.22 ± 0.23	0.83 ± 0.12	0.73 ± 0.11	0.49 ± 0.071	0.29 ± 0.022	0.074 ± 0.067	0.007 ± 0.003
脂肪	OFL	0.42 ± 0.096	0.33 ± 0.051	0.18 ± 0.027	0.062 ± 0.012	0.024 ± 0.005	0.008 ± 0.003	ND
	NOR	0.39 ± 0.084	0.26 ± 0.041	0.12 ± 0.019	0.067 ± 0.013	0.022 ± 0.006	0.009 ± 0.011	ND
	CIF	0.47 ± 0.073	0.32 ± 0.070	0.11 ± 0.022	0.057 ± 0.014	0.020 ± 0.006	0.017 ± 0.005	ND
	ENR	0.51 ± 0.077	0.39 ± 0.058	0.16 ± 0.019	0.054 ± 0.010	0.021 ± 0.007	0.008 ± 0.003	ND
100 mg/L								
肌肉	OFL	0.95 ± 0.20	0.66 ± 0.071	0.21 ± 0.031	0.049 ± 0.029	0.021 ± 0.005	0.006 ± 0.002	ND
	NOR	0.89 ± 0.28	0.63 ± 0.066	0.20 ± 0.022	0.051 ± 0.022	0.026 ± 0.009	0.008 ± 0.001	ND
	CIF	1.02 ± 0.16	0.71 ± 0.059	0.24 ± 0.026	0.053 ± 0.015	0.025 ± 0.004	0.009 ± 0.002	ND
	ENR	0.97 ± 0.18	0.70 ± 0.040	0.19 ± 0.022	0.048 ± 0.014	0.022 ± 0.006	0.007 ± 0.003	ND
肝脏	OFL	1.59 ± 0.26	1.11 ± 0.20	0.92 ± 0.14	0.59 ± 0.20	0.31 ± 0.18	0.15 ± 0.039	0.029 ± 0.009
	NOR	1.66 ± 0.19	1.19 ± 0.15	0.85 ± 0.10	0.60 ± 0.17	0.29 ± 0.22	0.14 ± 0.041	0.027 ± 0.009
	CIF	1.57 ± 0.20	1.09 ± 0.22	0.79 ± 0.17	0.51 ± 0.24	0.22 ± 0.19	0.12 ± 0.068	0.024 ± 0.008
	ENR	1.49 ± 0.22	1.16 ± 0.23	0.86 ± 0.15	0.51 ± 0.19	0.32 ± 0.17	0.15 ± 0.052	0.027 ± 0.006
肾脏	OFL	1.61 ± 0.26	1.14 ± 0.12	0.79 ± 0.12	0.60 ± 0.12	0.34 ± 0.08	0.14 ± 0.054	0.015 ± 0.003
	NOR	1.54 ± 0.19	1.09 ± 0.22	0.85 ± 0.13	0.59 ± 0.10	0.29 ± 0.078	0.16 ± 0.062	0.010 ± 0.002
	CIF	1.47 ± 0.23	1.15 ± 0.13	0.80 ± 0.16	0.63 ± 0.13	0.32 ± 0.074	0.13 ± 0.048	0.012 ± 0.002
	ENR	1.52 ± 0.27	1.03 ± 0.18	0.84 ± 0.14	0.60 ± 0.14	0.31 ± 0.069	0.17 ± 0.055	0.013 ± 0.004
脂肪	OFL	0.61 ± 0.102	0.40 ± 0.090	0.20 ± 0.042	0.078 ± 0.021	0.032 ± 0.025	0.012 ± 0.003	ND
	NOR	0.63 ± 0.112	0.38 ± 0.074	0.17 ± 0.055	0.069 ± 0.014	0.028 ± 0.018	0.011 ± 0.005	ND
	CIF	0.59 ± 0.125	0.41 ± 0.064	0.19 ± 0.039	0.069 ± 0.023	0.024 ± 0.014	0.014 ± 0.004	ND
	ENR	0.67 ± 0.109	0.41 ± 0.059	0.18 ± 0.037	0.062 ± 0.011	0.029 ± 0.015	0.013 ± 0.003	ND

参 考 文 献

1 An W, Guo G, Su D, et al. Analysis and Testing Technology and Instruments, 2004, 10(2):107.
 2 Johnston L, Mackay, C Rofit M.J Chromatogr A, 2002, 982(1):97.
 3 Marazuela M D, Moreno-Bondi M C. J Chromatogr A, 2004,

1034(1~2):25.
 4 Nadon A, Martinez-Larranaga. Pharamacokinetics and residues of enrofloxacin in chickens[J]. Am J Vet Res, 1995, 56(4):501~506.
 5 Schneider MJ, Donoghue DJ. Anal Chim Acta, 2003, 483(1~2):39.

Simultaneous Determination of Four Fluoroquinolone Residues in Broilers Tissues

LIU Bo-jing

(Institute of Feed Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: An high performance liquid chromatographic method with a fluorescence detector was established to determine four fluoroquinolone residues in broilers tissues. The chromatographic conditions were as follows: HP- StableBond C₁₈ column (5 μm, 250 mm × 4.6 mm) was used at 30 with 15 mmol/L tetrabutylammonium bromide solution (pH3.0)- acetonitrile (94:6, v/v) as the mobile phase with a flow rate of 1.0 ml/min, At the excitation wavelength of 280 nm and emission wavelength of 460 nm. The detection limit for broilers tissues was 0.92 μg/kg. The linear range was from 5.00 ~ 100.00 μg/mg, And correlation coefficients were more than 0.9998. At the levels of 10, 50 and 100 μg/kg, The recoved can meet the requirement for residue analysis.

Key words: high performance liquid chromatography; broilers; ciprofloxacin; ofloxacin; norfloxacin; enrofloxacin