

Aleksandra Chmielewska, Lucyna Konieczna, Henryk Lamparczyk

OSNACZANIE ENROFLOKSACYNY W OSOCZU KRWI ZWIERZĘCEJ METODĄ RP-HPLC Z DETEKcją FLUORYMETRYCZNĄ

Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku
Kierownik: dr hab. *Tomasz Bączek*, prof. nadzw.

Przeprowadzone badania enrofloksacyiny u świń po domięśniowym podaniu jednorazowej dawki leku pozwoliły na wyznaczenie całkowitego profilu farmakokinetycznego badanego związku. Opracowana metodyka może być z powodzeniem wykorzystana w badaniach biodostępności, biorównoważności i monitoringu stężeń po podaniu terapeutycznej dawki leku. Przedstawiona metoda jest specyficzna i selektywna, a prosta procedura przygotowania próbki umożliwia zastosowanie opracowanej metodyki również do oznaczeń seryjnych w badaniach pozostałości enrofloksacyiny w tkankach zwierzęcych, a tym samym do oceny jakości żywności pochodzenia zwierzęcego.

Hasła kluczowe: enrofloksacyina, osocze krwi zwierzęcej, wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC).

Keywords: enrofloxacin, animal plasma, high-pressure liquid chromatography (HPLC).

Postępowi cywilizacji coraz częściej towarzyszy występowanie zjawiska lekooporności u ludzi. Związane to jest niewątpliwie m.in. ze stosowaniem różnego rodzaju chemioterapeutyków jako leków weterynaryjnych.

Enrofloksacyina jest syntetycznym chemioterapeutykiem z grupy fluorochinolonów, należącym do najnowszej III generacji leków tej grupy. Mechanizm jej działania polega na hamowaniu aktywności gyrazy DNA (topoizomerazy), enzymu warunkującego proces związania się nici DNA. Dzięki szerokiemu spektrum działania antybakteryjnego (bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne, mykoplazmy, riketsje oraz chlamydie), korzystnym właściwościom farmakokinetycznym oraz niskiej toksyczności (posiada szeroki margines bezpieczeństwa) znajduje od lat szerokie zastosowanie w weterynarii. Jest wysoko skuteczna w zwalczaniu chorób ogólnych i miejscowych u zwierząt wywołanych przez wrażliwe na ten lek drobnoustroje, a w szczególności chorób układu oddechowego, pokarmowego, moczowego, rozrodczego i zakażeń okołolęgowych oraz zakażeń wtórnych towarzyszących chorobom wirusowym.

W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania chorobami bakteryjnymi wywołanymi przez drobnoustroje wrażliwe na działanie enrofloksacyny u bydła, świń, psów i kotów (1, 2). Lek ten stosuje się przede wszystkim w zwalczaniu infekcji bakteryjnych przewodu pokarmowego i dróg oddechowych (1). Szczególnym wskazaniem do podawania tej substancji leczniczej u świń i bydła są pasterelozy, mykoplazmozy, kolibaciloza, kolisepticemia oraz salmonellozy. U świń z powodzeniem stosowano enrofloksacynę w leczeniu chorób o złożonej etiologii takich jak zanikowe zapalenie nosa, enzootyczna pneumonia czy zespół MMA (3). W przypadku braku lub niezadowalającej odpowiedzi na podanie innych klas leków przeciwbakteryjnych czego skutkiem jest niedostateczna reakcja na leczenie, należy stosować leki z grupy fluorochinolonów, w tym enrofloksacynę. Powszechne występowanie chorób zwłaszcza o złożonej etiologii u zwierząt zwiększa ryzyko wystąpienia pozostałości aplikowanych leków w produktach pochodzenia zwierzęcego, co z kolei ma ujemny wpływ na zdrowie człowieka. Dlatego wciąż poszukiwane są wiarygodne, proste i szybkie metody analityczne, które pozwoliłyby na rutynowe badania farmakokinetyczne enrofloksacyny, przewidywanie jej losów w organizmie oraz ocenę skuteczności działania preparatów zawierających analizowaną substancję leczniczą. W dostępnej literaturze naukowej, w tym szczególnie w ostatnich latach, znajdujemy wiele przykładów przeprowadzonych badań farmakokinetycznych enrofloksacyny u świń (4), mlecznych owiec (5), koni (6), indyków (7), ryb (8). Ze względu na obecność w badanym związku chromoforów, a tym samym zdolność do emitowania energii o charakterystycznej długości fali, najczęściej do analiz farmakokinetycznych enrofloksacyny wykorzystuje się metody chromatograficzne z detekcją spektrofotometryczną (UV) (5, 7-11) i fluorescencyjną (12, 13). Prezentowana praca jest przykładem zastosowania chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz do oznaczenia enrofloksacyny w osoczu krwi zwierzęcej po podaniu jednorazowej dawki leku w formie iniekcji domięśniowej.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiło osocze krwi świni. Badania przeprowadzono na grupie 8 zdrowych osobników po podaniu domięśniowo jednorazowej dawki leku (enrofloksacyna 5% roztwór do wstrzykiwań) w ilości 2,5 mg na 1 kg m.c. Wykonanie badań poprzedziło uzyskanie zgody lokalnej Komisji Bioetycznej.

Zwierzęta żywione były mieszanką paszy przemysłowej typu PT-2 (50%) ze śrutą pszenną *ad libitum*, woda do picia podawana była bez ograniczeń.

Krew do analizy w ilości 10 ml pobierano z żyły brzeżnej ucha przed podaniem preparatu, a następnie w czasie 1.0; 2.5; 4.0; 7.0; 12.0; 24 h od chwili przyjęcia preparatu. Próbkę krwi pobierano do heparynizowanych probówek, odwirowywano, a uzyskane osocze przechowywano w temperaturze -20°C do momentu oznaczenia leku. W tym celu do 0,2 ml osocza dodawano wzorzec wewnętrzny (chininy chlorowodorek) w ilości 40 µg/ml i 3 ml dichlorometanu. Mieszaninę wytrząsano

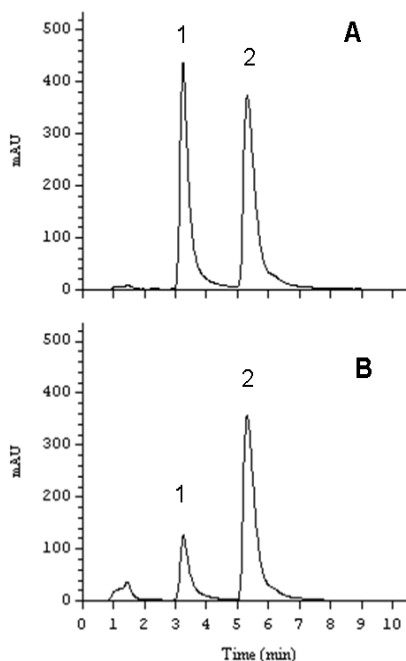
mechanicznie przez 10 min, a następnie odwirowywano przy 3500 obr./min w czasie 15 minut. Po odrzuceniu warstwy wodnej, warstwę organiczną przenoszono do czystej probówki, po czym odparowywano do sucha na łaźni wodnej w atmosferze sprężonego powietrza w 45°C. Suchą pozostałość rozpuszczano w 600µl metanolu, odwirowywano przy 10 000 obr./min. i dozowano na kolumnę chromatograficzną.

Do separacji chromatograficznej zastosowano chromatograf cieczowy firmy Knauer z detektorem fluorescencyjnym RF-551 firmy Shimadzu oraz system akwizycji danych EUROCHROM 2000.

Postępowanie analityczne realizowano w oparciu o wysokosprawną chromatografię cieczową w układzie faz odwróconych z detekcją fluorymetryczną. Długość fali wzbudzenia detektora fluorescencyjnego wynosiła 280 nm, długość fali emisji 445 nm. Właściwą separację chromatograficzną uzyskano na kolumnie LiChrospher-100 C₁₈ 5µm 125×4mm. Fazą ruchomą był binarny układ metanol-woda (68:32 v/v) doprowadzony do pH 3,4 za pomocą 85% kwasu fosforowego, przepływ 1ml/min. W opisanych warunkach czas retencji enrofloksacyny wynosił 3,2 min, natomiast wzorca wewnętrznego (chininy chlorowodorek) 5,3 min. Całkowity czas analizy wraz z regeneracją kolumny trwał 10 minut. Liniowość została doświadczalnie potwierdzona w szerokim zakresie stężeń od 10 do 1000 ng/ml. Równanie regresji prostej wyznaczone metodą najmniejszych kwadratów z współczynnikiem korelacji (r) 0.999, posłużyło do wyliczenia wartości stężeń enrofloksacyny w osoczu krwi każdego z osobników. Dokonano oceny statystycznej opracowanej metody. Przebadano specyficzność i selektywność, wyznaczono granicę wykrywalności i oznaczalności, zakres liniowości, powtarzalność oraz odtwarzalność metody. Uzyskane wyniki walidacji w pełni odpowiadają wymogom stawianym oznaczeniom ilościowym.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Zastosowanie fluorochinolonów, głównie enrofloksacyny w celu leczenia chorób infekcyjnych układu pokarmowego i oddechowego u trzody chlewnej i bydła jest powszechne, zwłaszcza w przypadku, gdy nie można stosować innych leków antybakteryjnych lub gdy infekcja ma charakter złożony. Okres karencji dla tkanek jadalnych u świń i bydła wynosi 10 dni, pomimo podstaw prawnych (14) spotyka się jednak przypadki występowania pozostałości enrofloksacyny w tkankach, co ma niekorzystny wpływ na organizm człowieka (15). Badania farmakokinetyczne są podstawowym badaniem warunkującym odpowiednią biodostępność leku oraz jego skutek terapeutyczny. Przydatność opracowanej metodyki oznaczania enrofloksacyny potwierdzono i zweryfikowano w badaniach farmakokinetycznych u ośmiu świń. Reprezentatywne chromatogramy ekstraktów osocza krwi pobrane od badanego osobnika po 2.5 i 24 h od momentu podania leku przedstawiono na ryc. 1.



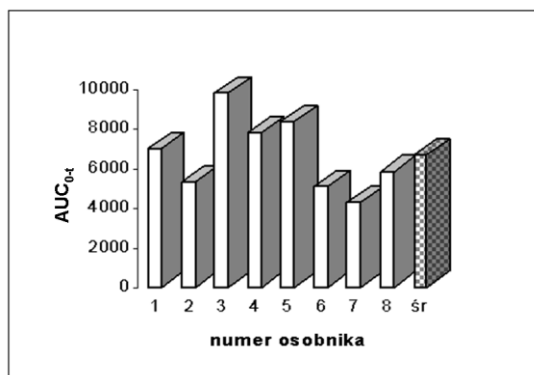
Ryc. 1. Chromatogram ekstraktu osocza krwi osobnika nr 6 po 2,5 h (A) i 24h (B) od podania domięśniowo jednorazowej dawki enrofloksacyny w ilości 2,5 mg na 1kg m.c.

1- enrofloksacyna; 2- chininy chlorowodorek (wzorzec wewnętrzny).

Fig. 1. Chromatogram of pig plasma extract from subject number 6 after 2,5 h (A) and 24 h (B) following single intramuscular injection of 2,5 mg per 1kg bw. of enrofloxacin.

1- enrofloxacin; 2- chinine hydrochloride (internal standard).

Wyznaczone podstawowe parametry farmakokinetyczne (c_{\max} , T_{\max} , AUC_{0-t}) odpowiadają oczekiwany wartościom po podaniu jednorazowej dawki leku i są porównywalne z wartościami literaturowymi (4). Wartości AUC_{0-t} dla poszczególnych osobników po domięśniowym podaniu jednorazowej dawki leku 2,5 mg na 1 kg m.c. przedstawiono na ryc. 2. Odmiennym kolorem oznaczono średnią wartość AUC_{0-t} . Po podaniu zaobserwowano szybkie narastanie stężenia enrofloksacyny w osoczu krwi badanych osobników z osiągnięciem stężenia maksymalnego po około 3 h. Do całkowania pól cząstkowych pod krzywą stężenie–czas zastosowano metodę Purvesa. Przeprowadzenie badań farmakokinetycznych jest podstawowym i koniecznym warunkiem przed dopuszczeniem leku do obrotu. Uzyskane wyniki wskazują, iż enrofloksacyna charakteryzuje się dobrą biodostępnością. Zgodnie z wytycznymi o stosowaniu fluorochinolonów pod pojęciem dopuszczalnej dawki należy rozumieć dawkę minimalną, a jej zwiększenie uzasadnione jest tylko w przypadku oporności lub słabej skuteczności. Udowodniono pięciokrotnie wyższą skuteczność enrofloksacyny w porównaniu z innymi fluorochinolonami. W oparciu o dostępne dane enrofloksacyna jako pierwszy lek z tej grupy wykazuje aktualnie taką samą a nawet wyższą skuteczność.



Ryc. 2. Wyznaczone wartości AUC_{0-t} dla poszczególnych osobników po domięśniowym podaniu jednorazowej dawki leku 2,5 mg na 1kg m.c. Odmiennym kolorem oznaczono średnią wartość AUC_{0-t} .

Fig. 2. Determined AUC_{0-t} values for individual subjects after a single intramuscular dose of 2.5 mg per 1 kg bw. of drug. A different colour was marked an average value of AUC_{0-t} .

WNIOSKI

Zaproponowana metodyka analizy farmakokinetycznej enrofloksacyny w osoczu krwi świń przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem fluorescencyjnym o wysokiej czułości umożliwiła wyznaczenie całkowitych profili farmakokinetycznych u przebadanych świń. Może być z powodzeniem stosowana zarówno do badań farmakokinetycznych w osoczu innych zwierząt, do badań pozostałości enrofloksacyny w tkankach zwierzęcych oraz do oceny jakości żywności pochodzenia zwierzęcego. Ponadto krótki czas analizy oraz szybkie i proste przygotowanie próbek pozwalają na wykonanie oznaczeń seryjnych i monitorowanie stężeń enrofloksacyny w płynach ustrojowych zwierząt.

A. Chmielewska, L. Konieczna, H. Lamparczyk

DETERMINATION OF ENROFLOXACIN IN ANIMAL PLASMA SAMPLES BY RP-HPLC METHOD WITH FLUORESCENCE DETECTION

Summary

In this study, we have been able to develop and validate a HPLC method, which is accurate and sensitive, and allows complete (92%) recovery of enrofloxacin from pig plasma. The reported RP-HPLC method used simple extraction procedure. The assay was specific for the determination of enrofloxacin concentrations in pig plasma after administration of single intramuscular 2,5 mg/kg dose of enrofloxacin. We conclude, that HPLC analysis is suitable for use in studies to examine the disposition of its in pig plasma and may be applicable as an alternative to other separation methods for the analysis of enrofloxacin.

PIŚMIENNICTWO

1. Zhang L.L., Zhang J.R., Guo K., Ji H., Zhang Y., Jiang S.X.: Effects of fluoroquinolones on CYP4501A and 3A In Male broilers. Res. Vet. Sci., 2011; 90: 99-105. – 2. Validation of an HPLC-UV

method according to the European Union Decision 2002/657/EC for the simultaneous determination of 10 quinolones in chicken muscle and egg yolk. *J. Chromatogr. B*, 2007; 859: 246-255. – 3. *Sumano L.H., Gutierrez O.L., Zamora Q.M.*: Strategic administration of enrofloxacin in poultry to achieve higher maximal serum concentrations. 2003; 165: 143-148. – 4. *Wuiff C., Lykkesfeldt J., Svendsen O., Aarestrup F.M.*: The effect of oral and intramuscular administration and dose escalation of enrofloxacin on the selection of quinolone resistance among *Salmonella* and coliforms in pig. *Res. Vet. Sci.* 2003; 75: 185-193. – 5. *Haritova A., Lashev L., Pashov D.*: Pharmacokinetics of enrofloxacin in lactating sheep. *J. Chromatogr. A*, 2003; 74: 241-245. – 6. *Dunnett M., Richardson D.W., Lees P.*: Detection of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in equine hair. *Res. Vet. Sci.* 2004; 77: 143-151. – 7. *Dimitrova D.J., Lashev L.D., Yanev S.G., Pandova B.*: Pharmacokinetics of enrofloxacin in turkeys. *Res. Vet. Sci.*, 2007; 82: 392-397. – 8. *Koc F., Unev K., Atamanalp M., Tumer L., Kaban G.*: Pharmacokinetic disposition of enrofloxacin in brown trout (*Salmo trutta fario*) after oral and intravenous administrations. *Aquaculture* 2009; 295: 142-144. – 9. *e Souza M.J., Bittencourt C.F., Morsach L.M.*: LC determination of enrofloxacin. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002; 28: 1195-1199. – 10. *Idowu O.R., Peggins J.O., Cullison R., von Bredow J.*: Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in lactating dairy cows and beef steers following intravenous administration of enrofloxacin. *Res. Vet. Sci.*, 2010; 89: 230-235. – 11. *Wu G., Meng Y., Zhu X., Huang Ch.*: Pharmacokinetics and tissue distribution of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in the Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis*. *Anal. Biochem.*, 2006; 358: 25-30. – 12. *Zeng Z., Dong A., Yang G., Chen z., Huang X.*: Simultaneous determination of nine fluoroquinolones in egg white and egg yolk by liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B*, 2005; 821: 202-209. – 13. *Ho C., Sin D.W.M., Tang H.P.O., Chung L.P.K., Siu S.M.P.*: Determination and on-line clean-up of (fluoro)quinolones in bovine milk using column-switching liquid chromatography fluorescence detection. *J. Chromatogr. A*, 2004; 1061: 123-131. – 14. Art. 7 ust. 2 ustawy z dnia 11 maja 2001 r. o warunkach zdrowotnych żywności i żywienia (Dz. U. Nr 63, poz. 634, z późn. zm.²⁾). – 15. *Posytniak A., Zmudzki J., Semeniuk S.*: Effect of the matrix and sample preparation on the determination of fluoroquinolone residues in animal tissues. *J. Chromatogr. A*, 2001; 914: 89-94.

Adres: 80-416 Gdańsk, ul. Gen. Hallera 107.