

液相色谱-三重四级杆复合线性离子阱质谱法 分析恩诺沙星在鲤鱼(*Cyprinus carpio*)中 的代谢产物*

唐锡招^{1,2} 李兆新^{1①} 邢丽红¹ 吴海燕¹ 宋才湖^{1,2}
付树林¹ 张婷婷^{1,2} 蒋万枫³

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
2. 上海海洋大学食品学院 上海 201306; 3. 青岛市食品药品检测中心 青岛 266071)

摘要 采用液相色谱-三重四级杆复合线性离子阱质谱(HPLC/Q-TRAP MS), 在正离子检测模式下, 对鲤鱼(*Cyprinus carpio*)腹腔注射恩诺沙星给药后肝脏中的代谢产物进行分析。根据保留时间和各色谱峰质谱裂解规律, 推测了恩诺沙星在鲤鱼肝脏中的代谢产物, 同时, 根据二级质谱碎片离子推测代谢途径及代谢产物结构。结果显示, 恩诺沙星进入鲤鱼肝脏后, 除以恩诺沙星原形药物(M0)和 N-去乙基代谢产物环丙沙星(M2)形式存在外, 还有少量恩诺沙星脱羧代谢产物(M1)和恩诺沙星羟基化代谢产物(M3-1 和 M3-2)。该研究可为深入了解恩诺沙星在水生动物体内代谢产物及代谢机理提供理论基础, 为在水产养殖生产中科学、合理地使用恩诺沙星提供参考。

关键词 恩诺沙星; 环丙沙星; 鲤鱼; 恩诺沙星脱羧代谢产物; 液相色谱-质谱

中图分类号 O657.63 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)01-0148-08

恩诺沙星(Enrofloxacin, ENR)化学名称为 1-环丙基-6-氟-4-氧代-1,4-二氢-7-(4-乙基-1-哌嗪基)-3-喹啉羧酸, 分子式为 $C_{19}H_{22}FN_3O_3$, 分子量为 359.1645, 为第三代人工合成喹诺酮类广谱抗菌药物, 具有抗菌谱广、抗菌活性强、给药方便以及与常用抗菌药物无交叉耐药性等特点, 广泛应用于畜禽业和水产养殖业(杨先乐, 2006)。目前, 对于恩诺沙星在真菌作用下(Wetzstein *et al*, 1997、2006; Parshikov *et al*, 2000)、在畜牧类(饶勇等, 2006¹⁾; 方舟等, 2012)、家禽类(Morales *et al*, 2014)动物中代谢产物及代谢途径的研究较为详细。恩诺沙星在水产动物体内代谢动力学研究较多, 通过乙烷基哌嗪环上脱去乙基生成的环丙沙

星被普遍认为是恩诺沙星在大部分水产动物体内的主要代谢产物(Fang *et al*, 2007; Intorre *et al*, 2000; 徐维海等, 2004), 但研究方向主要集中在恩诺沙星及其主要代谢产物环丙沙星的代谢动力学特征方面, 对于恩诺沙星在水产动物体内其他代谢途径和代谢产物的研究较少, 仅有房文红等(2009)、林峰等(2004)、周帅等(2012、2013)对恩诺沙星在锯缘青蟹(*Scylla serrata*)、烤鳗、异育银鲫(*Carassius auratus Gibelio*)和凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)中代谢途径及代谢产物情况进行较深入的研究。

本研究采用液相色谱-三重四级杆复合线性离子阱质谱(HPLC/Q-TRAP MS), 对恩诺沙星在鲤鱼肝脏

* 2013 年农业行业标准制定与修订(农产品质量安全)项目资助。唐锡招, E-mail: tangxizhaoxiaobai@163.com

① 通讯作者: 李兆新, 研究员, E-mail: lizx@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-01-12, 收修改稿日期: 2015-03-11

1) 饶勇, 曾振灵. QNs 残留检测确证方法的建立和恩诺沙星代谢的比较研究. 中国畜牧兽医学学会兽医药理毒理学会第九次学术讨论会论文与摘要集, 2006

中的代谢产物进行系统分析,以期推测恩诺沙星在鲤鱼肝脏中的主要代谢途径和代谢产物。

1 材料与方法

1.1 试验动物

实验动物采用生命体征健康的鲤鱼,购自青岛市平度双庙水库。鱼体重为730–950 g,试验喂药前于水族箱中暂养7 d,养殖用水为自来水,使用前连续充气24 h,养殖水温为(21±1)°C。

1.2 化学试剂

甲酸(色谱纯, CNW 公司), 乙腈(色谱纯, Sigma 公司), 甲醇(色谱纯, Merck 公司), 正己烷(色谱纯, CNW 公司), 恩诺沙星和环丙沙星标准品(纯度≥98.0%, 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司), 无水硫酸钠(分析纯, 国药集团化学试剂公司), 试验用水均为超纯水。

1.3 试验仪器

LC-20A 液相系统(日本 Shimadzu 公司); QTRAP™ 5500 三重四级杆复合线性离子阱质谱仪(美国 AB Sciex 公司), 配有电喷雾电离源(ESI 源); 旋转蒸发器(Heidolph Laborota 4000-efficient); 旋涡混合仪(TALBOYS); 离心机(Xiang Yi L-550); Gradient A10 Milli-Q 超纯水器(Millipore); KQ-600DE 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.4 体内给药和肝脏采集

取鲤鱼6条,其中3条为空白对照,采集肝脏。将空白对照组鲤鱼肝脏混匀,置于生理盐水中反复冲洗,剔除脂肪和结缔组织后,用滤纸吸干表面水分,用研钵研磨后,于-20°C条件下保存待用。另外3条鲤鱼腹腔注射恩诺沙星,给药剂量为30 mg/kg 鱼体重,给药后24 h采集肝脏,与空白对照组鲤鱼肝脏采用相同的处理方式,研磨后,于-20°C条件下保存待用。

1.5 样品提取净化

准确称取(2.00±0.02) g 肝脏研磨组织于50 ml 具塞离心管中,加入10 g 无水硫酸钠,涡旋混匀,再加入10 ml 酸化乙腈(甲酸:乙腈=1:99, V/V),涡旋混合1 min,超声波提取10 min。4000 r/min 离心5 min,取上清液于100 ml 鸡心瓶中。残渣中加10 ml 酸化乙腈,重复提取,合并两次提取液,于40°C水浴旋转蒸发至干。1 ml 甲醇-0.1%甲酸溶液(10:90, V/V)涡旋溶解残留物,再加入3 ml 正己烷,涡旋混合30 s,静置后弃上层液,取下层清液,过0.22 μm 滤

膜,供 HPLC/Q-TRAP MS 测定(样品提取净化过程参照农业部 1077 号公告-1-2008,略有修改)。

1.6 HPLC/Q-TRAP MS 液相色谱条件

HPLC/Q-TRAP MS 液相色谱柱为 C18 MG III (150 mm×2.0 mm I.D., 5 μm 粒径,日本资生堂公司),柱温为35°C,流速为0.2 ml/min,进样体积为10 μl,流动相 A 为甲醇,流动相 B 为0.1%(v/v)甲酸溶液,梯度洗脱程序为:0–3 min, 10%–35% A; 3–9 min, 35% A; 9–11 min, 35%–80% A; 11–15 min, 80% A; 15–16.5 min, 80%–10% A, 16.5–20 min, 10% A。

1.7 HPLC/Q-TRAP MS 质谱条件

采用电喷雾离子源(Electrospray ionization, ESI) 正离子检测方式,气帘气30 psi,喷雾电压5000 V,雾化气60 psi,辅助气55 psi,离子化温度为550°C。扫描模式:多反应监测扫描引发增强型离子扫描(MRM-IDA-EPI),二级质谱碰撞电压为35 eV,碰撞电压差为±15 eV,碰撞室射出电压为12 eV。

1.8 标准工作曲线绘制

分别准确称取0.0100 g 恩诺沙星、环丙沙星标准品于10 ml 棕色容量瓶中,以色谱纯甲醇定容至10 ml,配制成浓度为1 mg/ml 的恩诺沙星与环丙沙星标准储备液。再分别稀释成浓度为0.002、0.005、0.010、0.020、0.050、0.100、0.200、0.500、1.00 μg/ml 的标准溶液。系列标准溶液用 HPLC/Q-TRAP MS 法进行检测,采用外标法对恩诺沙星和环丙沙星的标准曲线系列进行测定,以药物浓度(x)为横坐标,以峰面积(y)为纵坐标,作线性回归,并得回归方程和相关系数。

1.9 回收率与精密度

取空白肝脏样品,添加一定量的标准工作液,分别按照2.0、10.0、20.0 μg/kg 添加水平进行回收率实验,按照1.5进行样品前处理,按照1.6、1.7的液相色谱条件与质谱条件进行测定,每个浓度设置3个批次,每个批次3个平行。

1.10 数据处理方法

采用 AB Sciex Analyst Software 1.6 和 MultiQuant 2.1.1 数据分析软件对鲤鱼肝脏中恩诺沙星及其代谢产物进行处理分析。

2 结果与分析

2.1 线性范围和最低检出限

恩诺沙星和环丙沙星标准溶液在0.002–1.00 μg/ml

浓度范围内,线性关系良好,相关系数均大于0.995,该方法最低检出限为1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.2 回收率与精密度

在本实验条件下,以2.0、10.0、20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3个添加水平分别测试恩诺沙星和环丙沙星在肝脏中的回收率,每个浓度设置3个批次,每个批次3个平行。测得恩诺沙星和环丙沙星在肝脏中的平均回收率均大于70%。批内变异系数和批间变异系数均小于3.0%和5.0%。

2.3 恩诺沙星和环丙沙星标准品的 HPLC/Q-TRAP MS 分析

对恩诺沙星和环丙沙星的色谱质谱行为进行分析。分别取恩诺沙星和环丙沙星对照品溶液,按1.6、1.7色谱、质谱条件进行HPLC/Q-TRAP MS分析,见图1和图2。恩诺沙星和环丙沙星色谱保留时间 t_R 分别为6.63、6.71 min,得到恩诺沙星的主要碎片离子有 m/z 342.000 ($[\text{MH}-\text{H}_2\text{O}]^+$)、316.200 ($[\text{MH}-\text{CO}_2]^+$)、245.000 ($[\text{MH}-\text{CO}_2-\text{C}_2\text{H}_5\text{NC}_2\text{H}_4]^+$),质谱裂解特征是中性的丢失-18 Da、-44 Da、-115 Da,环丙沙星的主要碎片离子有 m/z 288.200 ($[\text{MH}-\text{CO}_2]^+$)、268.200 ($[\text{MH}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}_2]^+$)、245.200 ($[\text{MH}-\text{CO}_2-\text{HNC}_2\text{H}_4]^+$),质谱裂解特征是中性的丢失-44 Da、-62 Da、-87 Da。

2.4 恩诺沙星在鲤鱼肝脏中代谢产物的鉴定

在HPLC/Q-TRAP MS条件下,分别对空白鲤鱼和给药后24 h鲤鱼的肝脏提取物进行分析,首先对照其一级质谱的差异,分析可能存在的恩诺沙星代谢产物。然后对可能存在的恩诺沙星代谢产物进行二级质谱分析,结合恩诺沙星结构,并据各个代谢产物二级质谱图的碎片离子,推测代谢产物的化学结构。在一级质谱分析中共检测到5种相关物质,其保留时间 t_R 分别为6.53、6.48、6.60、6.90、8.25 min,其质核比 m/z 分别为316.180 (M1)、332.180 (M2)、360.200 (M0)、376.210 (M3-1)和376.210 (M3-2)。

2.4.1 M1($[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 316.210) 在 m/z 为316.210的提取离子流色谱图中,检测到1个色谱峰M1,保留时间 t_R 为6.53 min,主要碎片离子为 m/z 245.200 ($[\text{MH}-\text{C}_2\text{H}_5\text{NC}_2\text{H}_4]^+$)、203.000 ($[\text{MH}-\text{C}_2\text{H}_5\text{N}_2\text{C}_4\text{H}_8]^+$),质谱裂解特征是中性的丢失-71 Da、-113 Da(图3)。M1的准分子离子 m/z 316.210,比恩诺沙星质荷比少44,推测M1是恩诺沙星母核六元环脱去-COOH得到,分子式为 $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{FN}_3\text{O}$,判断M1为恩诺沙星脱羧代谢产物。

2.4.2 M2($[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 332.180) 在 m/z 为332.180的提取离子流色谱图中,检测到1个色谱峰M2,保留时间 t_R 为6.48 min,得到的主要碎片离子为 m/z

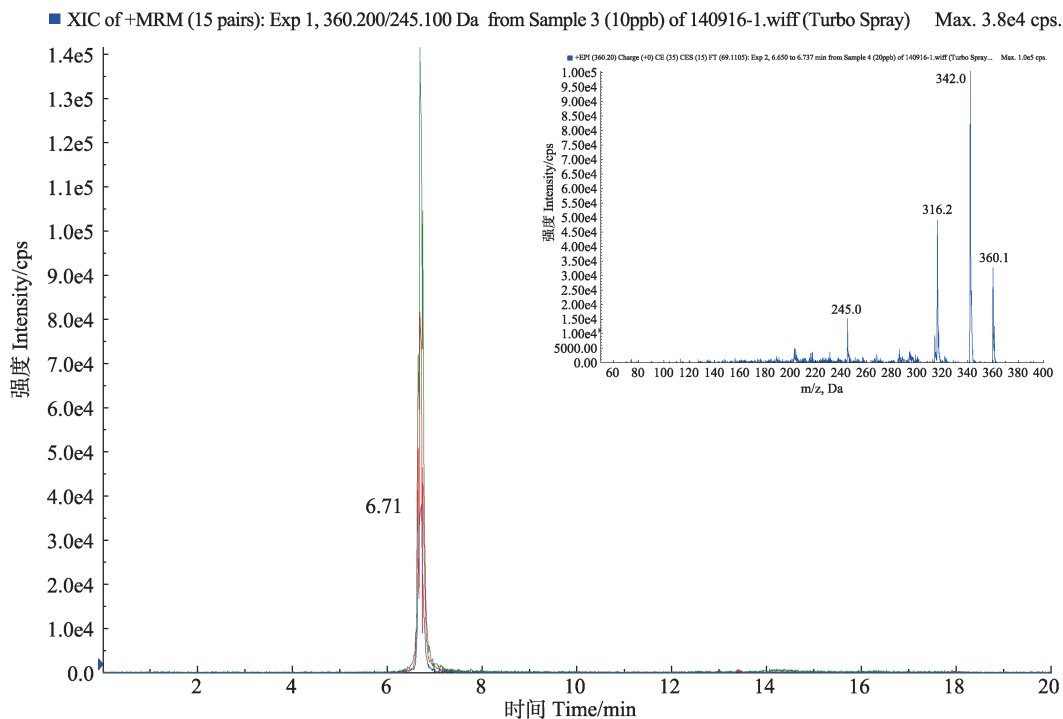


图1 恩诺沙星提取离子流色谱和二级质谱
Fig.1 Extracted ion chromatograms and MS² spectra of enrofloxacin

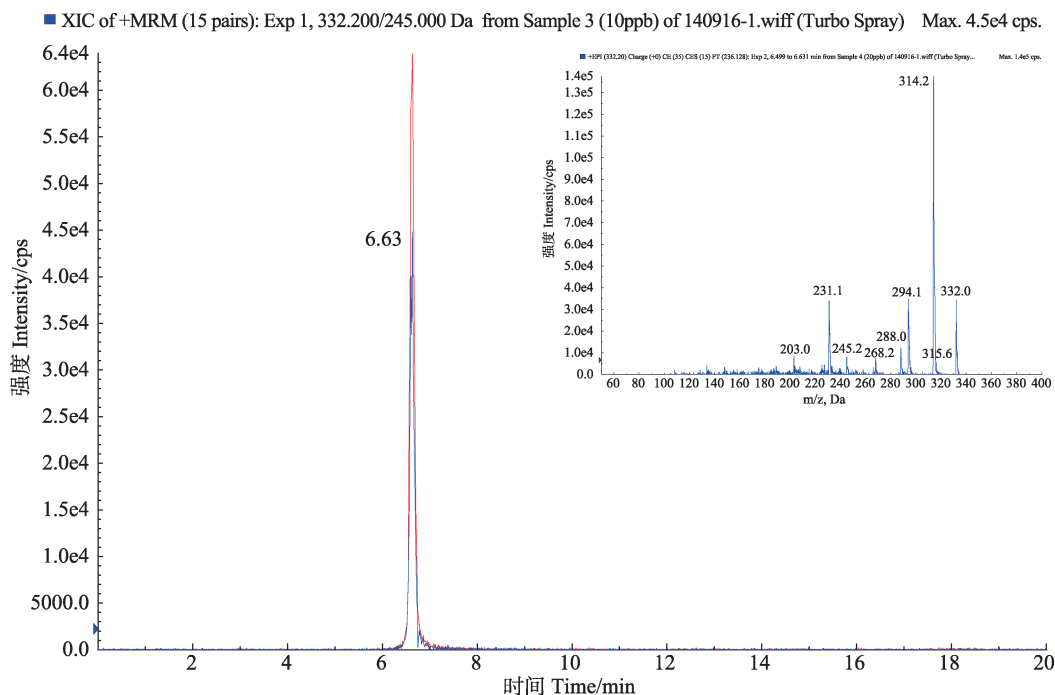


图 2 环丙沙星提取离子流色谱和二级质谱
Fig.2 Extracted ion chromatograms and MS² spectra of ciprofloxacin

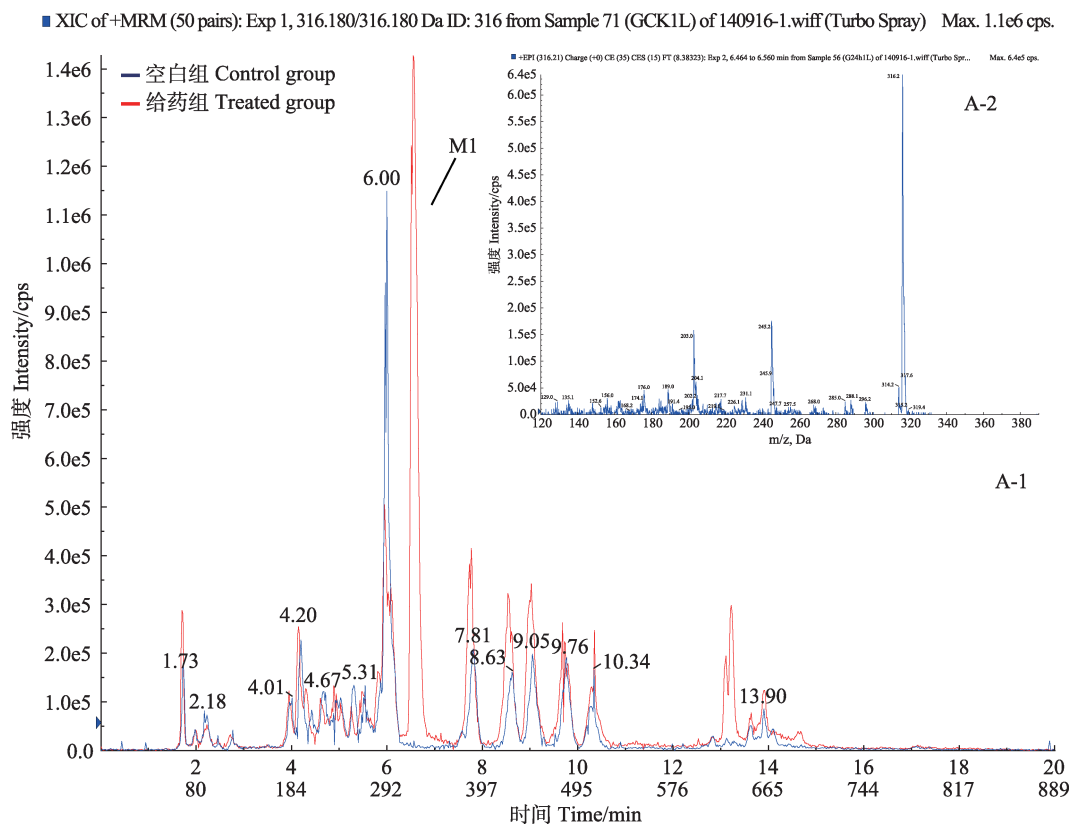


图 3 空白组与给药组鲤鱼肝脏中 M1 提取离子流色谱(A-1)和二级质谱(A-2)
Fig.3 Extracted ion chromatogram(A-1) and MS² spectra(A-2) for M1 in the liver of carp in control and treated groups

314.000 ($[MH-H_2O]^+$)、 m/z 288.200 ($[MH-CO_2]^+$)、
245.200 ($[MH-C_2H_5NC_2H_4]^+$), 质谱裂解特征是中性

丢失-18 Da、-44 Da、-87 Da (图 4)。M2 的准分子
离子 m/z 332.180, 比恩诺沙星质荷比少 28, 推测 M2

是由恩诺沙星母核侧链上的哌嗪环脱去乙基得到,且 M2 与环丙沙星对照品色谱保留时间及质谱行为相同,因此,代谢产物 M2 被确认为环丙沙星。

2.4.3 M0($[M+H]^+$, m/z 360.200) 选择性检测 m/z 360.200, 色谱保留时间 t_R 为 6.60 min 时出现一个色谱峰,命名为 M0,进行二级质谱分析,得到的主要碎片离子为 m/z 342.000 ($[MH-H_2O]^+$)、316.200 ($[MH-CO_2]^+$)、245.000 ($[MH-CO_2-C_2H_5NC_2H_4]^+$) (图 5), 质谱裂解特征是中性的丢失-18 Da、-44 Da、-115 Da。M0 与恩诺沙星对照品的色谱保留时间以及质谱行为相同,确定 M0 是未被代谢的原形药物恩诺沙星。

2.4.4 M3($[M+H]^+$, m/z 376.210) 选择性检测 m/z 376.210, 色谱保留时间 t_R 为 6.90、6.82 min 时,出现两个色谱峰 M3-1 和 M3-2。对这两个峰分别进行二级质谱分析(图 6), M3-1 得到的主要碎片离子为 m/z 358.100 ($[MH-H_2O]^+$)、342.100、332.200 ($[MH-CO_2]^+$)、261.200 ($[MH-CO_2-C_2H_5NC_2H_4]^+$)。M3-2 得到的主要碎片离子为 m/z 358.000 ($[MH-H_2O]^+$)、332.000 ($[MH-CO_2]^+$)、261.000 ($[MH-CO_2-C_2H_5NC_2H_4]^+$)、243.000。M3-1 和 M3-2 与原形药物相比,代谢产物的分子量均增加了 16 Da,并且与原形药物具有相似的质谱裂解特征,即中性的丢失-18 Da、-44 Da、-115 Da,因此,推测 M3-1 和 M3-2 是恩诺沙星羟基化代谢产物,二者是同分异构体。

2.5 鲤鱼肝脏中恩诺沙星及其代谢产物环丙沙星比例

表 1 是 30 mg/kg 鱼体重恩诺沙星腹腔注射给药 24 h 后,鲤鱼肝脏中所测得的原形药物和代谢产物的峰面积。根据标准曲线,鲤鱼肝脏中存在恩诺沙星和代谢产物环丙沙星,浓度分别为 0.2780 mg/kg、0.0064 mg/kg。对鲤鱼腹腔注射 30 mg/kg 鱼体重的恩诺沙星,给药 24 h 后,恩诺沙星在鲤鱼肝脏中大部分以原形物形式存在,环丙沙星为主要代谢产物。环丙沙星与恩诺沙星浓度比约为 2.3%。

3 讨论

房文红等(2009)对锯缘青蟹进行恩诺沙星 30 mg/kg 口灌给药,采用液相色谱-电喷雾离子阱质谱法(LC/MSⁿ)分析了给药 24 h 后锯缘青蟹血淋巴中恩诺沙星的代谢产物,发现除恩诺沙星和主要代谢产物环丙沙星外,还存在恩诺沙星羟基化代谢产物及加氧恩诺沙星代谢产物,含量分别占总残留的 98.56%、1.17%、0.18%和 0.09%。推测恩诺沙星在锯缘青蟹体内的代谢反应主要是脱乙基反应、羟基化反应和氧化反应。林峰等(2004)采用液相色谱串联质谱法发现,恩诺沙星在烤鳗中发生脱羧、脱羧后哌嗪环断裂重排及脱羧、脱羰基后结构重排,但未详细解释其质谱裂解行为。周帅等(2012、2013)采用超高效液相色谱-

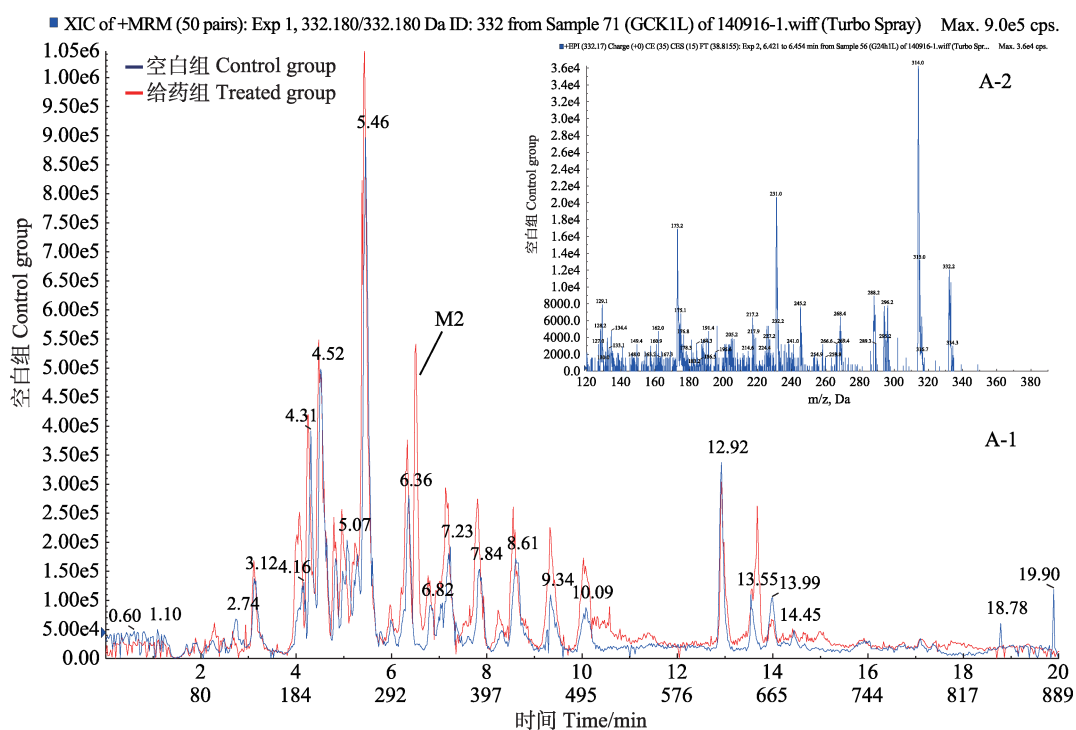


图 4 空白组与给药组鲤鱼肝脏中 M2 提取离子流色谱(A-1)和二级质谱(A-2)

Fig.4 Extracted ion chromatogram(A-1) and MS² spectra(A-2) for M2 in the liver of carp in control and treated groups

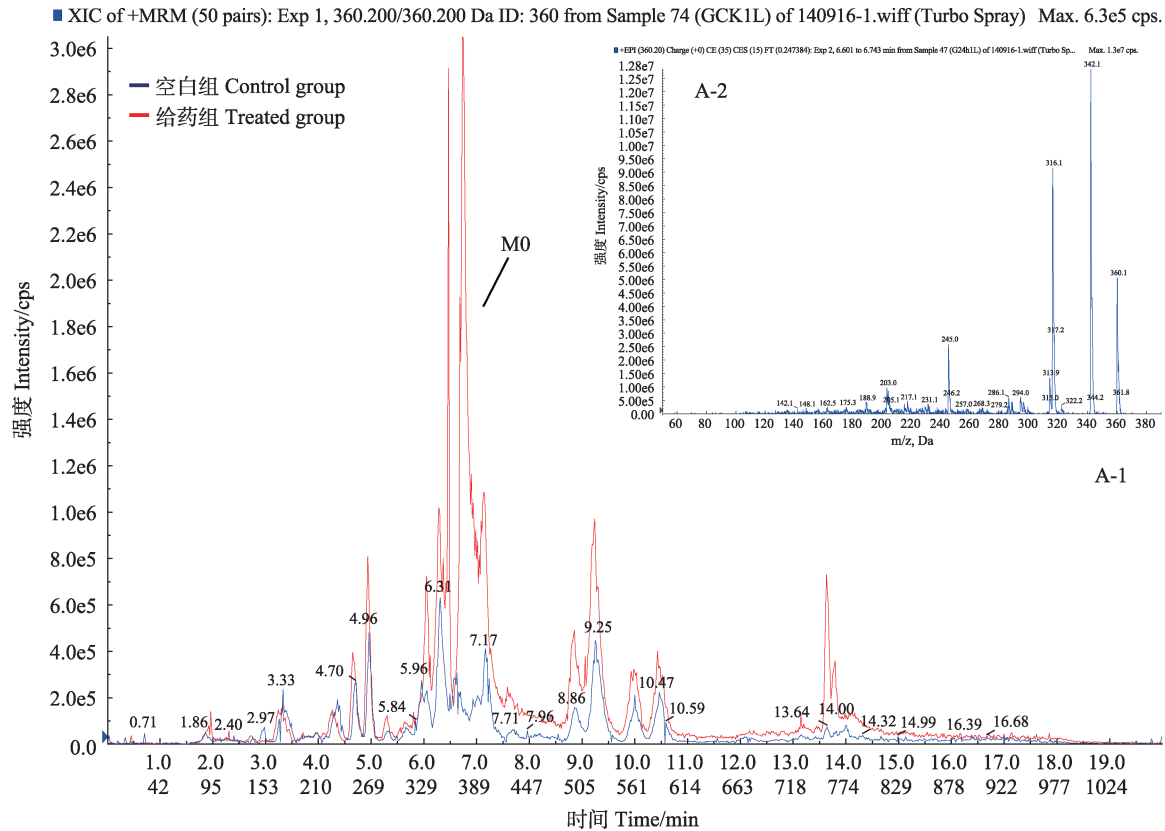


图 5 空白组与给药组鲤鱼肝脏中 M0 提取离子流色谱(A-1)和二级质谱(A-2)

Fig.5 Extracted ion chromatogram(A-1) and MS² spectra(A-2) for M0 in the liver of carp in control and treated groups

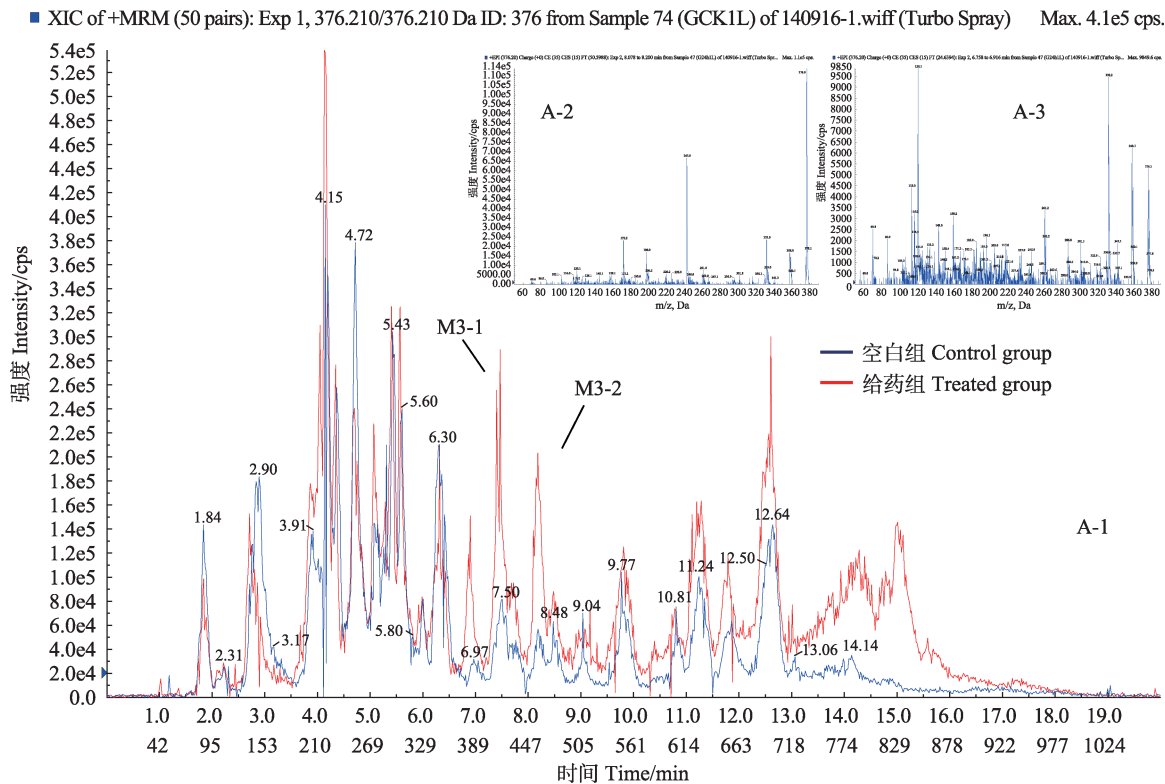


图 6 空白组与给药组鲤鱼肝脏中 M3-1、M3-2 提取离子流色谱(A-1)和二级质谱(A-2、A-3)

Fig.6 Extracted ion chromatogram(A-1) and MS² spectra(A-2 and A-3) for M3-1 and M3-2 in the liver of carp in control and treated groups

表1 鲤鱼肝脏中原形药物及主要代谢产物的峰面积及浓度
Tab.1 The peak area and concentrations of enrofloxacin and its metabolites in carp liver

原形药物和代谢产物 Parent drug and metabolites	峰面积 Peak area	推算浓度 Calculated concentration (mg/kg)
M0	32600000	0.2780
M2	478000	0.0064

四级杆-飞行时间质谱对恩诺沙星在异育银鲫、凡纳滨对虾体内和体外肝微粒体中代谢产物进行分析,结果显示,口灌给药 24 h 后,异育银鲫、凡纳滨对虾血浆中均以恩诺沙星原形药物为主(>99.80%),有少量 N-去乙基代谢产物环丙沙星(<0.30%),在异育银鲫血浆中还检测到少量葡萄糖醛酸结合物(0.21%),在凡纳滨对虾血浆中检测到少量通过加氢还原反应得到的环丙沙星哌嗪环开环代谢物(0.02%)及同分异构体(0.05%)。但恩诺沙星在异育银鲫和凡纳滨对虾肝微粒体中仅发生脱乙基反应生成环丙沙星($\leq 0.20\%$)。

在本研究中,恩诺沙星在鲤鱼肝脏中除原药形式以及主要代谢产物环丙沙星存在外,推测还有 3 种代谢产物,即恩诺沙星脱羧代谢产物(M1)和恩诺沙星羟基化代谢产物(M3-1 和 M3-2),从代谢产物的结构可以初步推断,恩诺沙星在鲤鱼肝脏中发生的代谢途径主要有母核六元环脱羧以及羟基化(图 7)。其中恩诺沙星脱乙基产生环丙沙星与大部分报道一致,恩诺沙星羟基化代谢产物与房文红等(2009)和方舟等(2012)研究一致。水产动物体内发现恩诺沙星脱羧代谢产物(M1)未见报道过,但饶勇等(2006)¹⁾发现在大鼠体内存在恩诺沙星脱羧代谢产物。

恩诺沙星在不同动物体内代谢途径较为复杂,代谢产物种类与含量也存在差异。原因可能是动物种属、作用于药物代谢的酶种类以及检测分析的组织器官的不同而存在差别(赵冬梅等, 2000)。在后续的研究工作中,随着分析手段的提高,对恩诺沙星在水产动物体内代谢途径和代谢产物的状况,可以有更加深入的认识,进一步补充恩诺沙星的药物代谢动力学特征,为科学、合理地使用恩诺沙星提供理论依据。

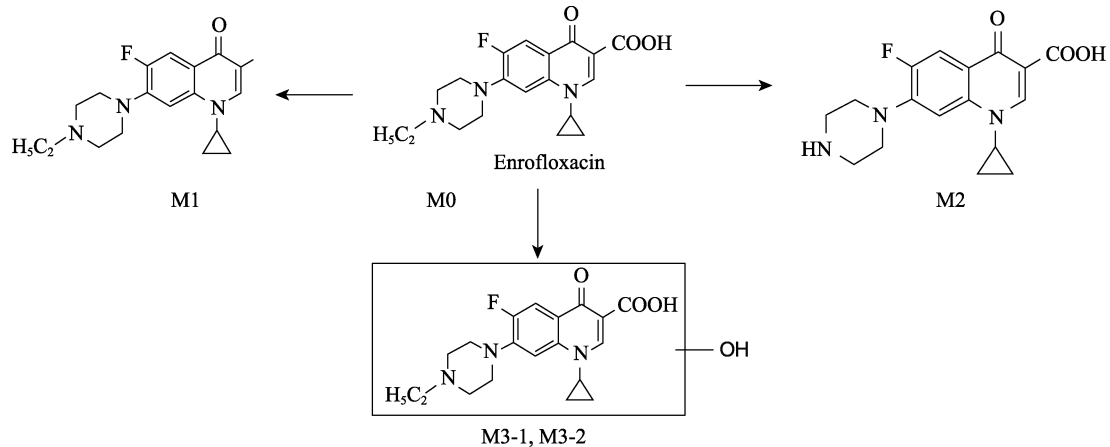


图7 推测的鲤鱼肝脏中恩诺沙星的代谢途径

Fig.7 Speculated metabolism pathway of enrofloxacin in carp liver

参 考 文 献

方舟,任恒鑫,许鑫,等. HPLC-DAD-MSⁿ法分析恩诺沙星在兔血浆中的代谢产物. 中国兽药杂志, 2012, 46(2): 19-22
杨先乐. 新编渔药手册. 中国农业出版社, 2006, 5: 183-184
房文红,胡琳琳,陈玉露,等. 采用 LC/MSⁿ法分析恩诺沙星在锯缘青蟹血浆中的代谢产物. 海洋渔业, 2009, 30(4): 350-355

林峰,林海丹,吴映璇,等. LC-MS-MS 测定烤鳗中 4 种氟喹诺酮药物残留量. 分析测试学报, 2004, 23(5): 43-47
周帅,李国烈,胡琳琳,等. 恩诺沙星在异育银鲫体内和体外肝微粒体中代谢产物分析. 东北农业大学学报, 2013, 44(6): 101-106
周帅,胡琳琳,孙贝贝,等. 恩诺沙星在凡纳滨对虾体内和体外肝微粒体中的代谢产物比较分析. 海洋渔业, 2012, 34(3): 342-349

1) 饶勇. QNs 残留检测确证方法的建立和恩诺沙星代谢的比较研究. 中国畜牧兽医学会兽医药理毒理学会第九次学术讨论会论文与摘要集, 2006

- 赵冬梅, 李燕, 卢业竝. 药物代谢研究在新药开发中的作用. 药学学报, 2000, 35(2): 156-160
- 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. 水产科学, 2004, 23(7): 5-8.
- Fang W, Zhou S, Yu H, *et al.* Pharmacokinetics and tissue distribution of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in *Scylla serrata* following oral gavage at two salinities. Aquaculture, 2007, 272(1): 180-187
- Intorre L, Cecchini S, Bertini S, *et al.* Pharmacokinetics of enrofloxacin in the seabass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture, 2000, 182: 49-59
- Morales-Gutiérrez FJ, Hermo MP, Barbosa J, *et al.* High-resolution mass spectrometry applied to the identification of transformation products of quinolones from stability studies and new metabolites of enrofloxacin in chicken muscle tissues. J Pharmaceut Biomed, 2014, 92: 165-176
- Parshikov IA, Freeman JP, Lay JO, *et al.* Microbiological transformation of enrofloxacin by the fungus *Mucor ramannianus*. Appl Environ Microb, 2000, 66(6): 2664-2667
- Wetzstein HG, Schmeer N, Karl W. Degradation of the fluoroquinolone enrofloxacin by the brown rot fungus *Gloeophyllum striatum*: identification of metabolites. Appl Environ Microb, 1997, 63(11): 4272-4281
- Wetzstein HG, Schneider J, Karl W. Patterns of metabolites produced from the fluoroquinolone enrofloxacin by basidiomycetes indigenous to agricultural sites. Appl Microbiol Biot, 2006, 71(1): 90-100

(编辑 刘丛力)

Analysis on the Metabolites of Enrofloxacin in the Carp Liver by Using HPLC/Q-TRAP MS

TANG Xizhao^{1,2}, LI Zhaoxin¹*, XING Lihong¹, WU Haiyan¹, SONG Caihu^{1,2}, FU Shulin¹, ZHANG Tingting^{1,2}, JIANG Wanfeng³

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;

2. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;

3. Qingdao Food and Drug Center for Control, Qingdao 266071)

Abstract Enrofloxacin is one of the third-generation synthetic broad-spectrum antibiotics in the class of quinolone, and has been widely used in the prevention and treatment of animal infectious diseases. Previous pharmacokinetics studies have been mainly focused on the metabolites of enrofloxacin in fungi and animals, but little is known about the metabolic pathways and the metabolites in fish. Our study aimed for better understanding of this drug in aquatic animals because it would provide a theoretical basis for the proper use of enrofloxacin in aquaculture. In our experiment carps (*Cyprinus carpio*) were orally administered a single dose of 30 mg/kg body weight enrofloxacin. Liver samples from the control group and the 24 h post-administration group were collected for the metabolite analysis. Following intraperitoneal injection, enrofloxacin and its metabolites in the liver of carp were analyzed using a positive liquid chromatography coupled with Q-Trap mass spectrometry (HPLC/Q-TRAP MS). Based on the retention time and MS/MS spectra, we surmised the possible metabolites of enrofloxacin in the liver, and also proposed the potential metabolic pathways and the structures of metabolites by analyzing the fragmentation pathway. The results revealed that most of enrofloxacin remained in the form of the parent drug, and that a small portion of enrofloxacin was converted into metabolites in the liver. Besides the parent drug enrofloxacin (M0) and the known metabolite ciprofloxacin (M2), a very small amount of decarboxylation (M1) and hydroxylated enrofloxacin (M3-1 and M3-2) were found. The quantitative analysis revealed that the concentrations of enrofloxacin and its primary metabolite ciprofloxacin were 0.2780 mg/kg and 0.0064 mg/kg respectively. These results suggested that enrofloxacin could be converted into a variety of metabolites through distinct metabolic pathways in different organisms. This is probably due to diverse living environments, fish figures, drug metabolic enzymes, and other factors in different species.

Key words Enrofloxacin; Ciprofloxacin; Carp; Enrofloxacin decarboxylation metabolites; HPLC/Q-TRAP MS

① Corresponding author: LI Zhaoxin, E-mail: lizx@ysfri.ac.cn