

液相色谱-四级杆/线性离子阱复合质谱法分析 恩诺沙星在海参体内的代谢产物

邢丽红, 孙伟红, 李兆新, 孙晓杰, 彭吉星, 付树林, 郭江涛

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业部水产品质量安全检测与评价重点实验室, 农业部水产品质量安全风险
风险评估实验室(青岛), 山东青岛 266071)

摘要: 为鉴定恩诺沙星给药后其在海参(*Stichopus japonicus*)体内的主要代谢产物, 取药浴后均质的海参样品, 经酸化乙腈提取、浓缩、正己烷净化后, 利用液相色谱-四级杆/线性离子阱复合质谱法进行分析。采用电喷雾离子源在正离子模式下进行多反应选择监测结合实时触发增强子离子模式(MRM-IDA-EPI)扫描, 分析恩诺沙星在海参体内的代谢产物。实验结果表明, 给药6 h后海参体内共鉴定出10种恩诺沙星代谢产物, 包括恩诺沙星异构化产物(M3)、脱乙基产物环丙沙星(M1)及其异构体(M2)、加氢还原产物及其异构体(M4、M5和M6)、羟基化恩诺沙星及其异构体(M7和M8)和加氧恩诺沙星及其异构体(M9和M10)。恩诺沙星在海参体内的代谢产物M2~M5以峰面积计, 均高于环丙沙星(M1)。研究发现恩诺沙星在海参体内主要发生脱乙基反应和加氢还原反应, 其主要代谢产物为M2和M4。

关键词: 恩诺沙星; 海参; 代谢产物; 液相色谱-四级杆/线性离子阱复合质谱

文章编号: 1673-9078(2017)1-212-220

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.1.033

Analysis of Sea Cucumber (*Stichopus japonicus*) Enrofloxacin Metabolites by Liquid Chromatography Coupled with Quadrupole-linear Ion Trap Mass Spectrometry

XING Li-hong, SUN Wei-hong, LI Zhao-xin, SUN Xiao-jie, PENG Ji-xing, FU Shu-lin, GUO Jiang-tao

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture, P. R. China; Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Products(Qingdao), Ministry of Agriculture, Qingdao 266071, China)

Abstract: Homogenized sea cucumber (*Stichopus japonicus*) samples were collected after incubating in medicated enrofloxacin bath. Metabolites were extracted from samples using acidified acetonitrile to identify the major metabolites of enrofloxacin in sea cucumber. The extracts were concentrated and purified using hexane, and analyzed by liquid chromatography coupled with quadrupole-linear ion trap mass spectrometry. Multiple reaction monitoring-information dependent acquisition-enhanced product ion (MRM-IDA-EPI) scanning was performed using an electrospray ionization source operated in positive mode to elucidate the structures of the major sea cucumber enrofloxacin metabolites. Ten potential metabolites were found after 6 h of drug administration: an isomerization product of enrofloxacin (M3); a deethylation product, ciprofloxacin (M1), and its isomer (M2); a hydrogenation reduction product and its isomers (M4, M5, and M6); a hydroxylation product and its isomer (M7 and M8); and an oxygenation product and its isomers (M9 and M10). The peak areas of sea cucumber enrofloxacin metabolites M2~M5 were higher than that of ciprofloxacin (M1). Metabolism of enrofloxacin primarily occurred by deethylation and hydrogenation reduction reactions, and M2 and M4 were the major enrofloxacin metabolites identified in sea cucumber.

Key words: enrofloxacin; *Stichopus japonicus*; metabolites; liquid chromatography coupled with quadrupole/linear ion trap mass spectrometry

收稿日期: 2016-02-02

基金项目: 2016年国家水产品质量安全风险项目(GJFP2016); 国家自然科学基金资助项目(21207162)

作者简介: 邢丽红(1981-), 女, 助理研究员, 研究方向: 水产品质量安全检测及药物代谢研究。通讯作者: 孙伟红(1977-), 女, 博士, 高级工程师, 研究方向: 水产品质量安全及风险评估研究; 李兆新(1967-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 水产品安全与海洋生物毒素研究

恩诺沙星(Enrofloxacin, ENR)属于第三代喹诺酮类合成抗菌药物,是水产养殖中的主要抗菌药物之一。然而,恩诺沙星的不规范使用和滥用可以在动物体、食品、环境和消费者体内引起细菌耐药性增强,威胁人类和动物的健康。恩诺沙星在生物体内被转化成多种代谢产物。锯缘青蟹口灌恩诺沙星后在血淋巴中发现环丙沙星、羟基化恩诺沙星和加氧恩诺沙星3种代谢产物^[1]。恩诺沙星在凡纳滨对虾体内的代谢产物主要为环丙沙星、环丙沙星派离开环代谢物及其同分异构体^[2]。异育银鲫口灌恩诺沙星后体内的代谢产物主要有环丙沙星和葡萄糖醛酸结合物^[3]。恩诺沙星在大鼠^[4]和兔^[5]体内的代谢产物以环丙沙星为主。恩诺沙星在不同动物体内的代谢产物有较大差异,但主要代谢产物是环丙沙星,其代谢机制是通过乙烷基哌嗪环上脱去乙基生成环丙沙星。恩诺沙星在真菌作用下未发现环丙沙星代谢产物^[6],在环境作用下环丙沙星降解产物的生成与其所处的环境条件密切相关^[7-14]。

虽然前期已有一些关于恩诺沙星在动物体内代谢产物的研究报道,但海参(*Stichopus japonicus*)属于棘皮动物门,海参纲,海参属,其生理结构与其它水生动物有较大差异,与陆生动物的差异则更大。恩诺沙星在海参体内的代谢途径及代谢产物还没有文献报道。目前关于恩诺沙星代谢产物的研究主要以飞行时间质谱和离子阱质谱法为主,本研究拟采用液相色谱-四级杆/线性离子阱复合质谱法,通过对给药恩诺沙星后的海参样品进行多反应选择监测结合实时触发增强子离子模式(MRM-IDA-EPI)扫描,分析恩诺沙星在海参体内的代谢产物,并对其碎片离子进行解析,通过色谱及质谱数据推测代谢产物的结构,进而为研究该药物代谢的种属差异及指导临床用药提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与设备

5500 Qtrap 四级杆/线性离子阱质谱仪(美国 AB Sciex 公司),配有电喷雾离子源(ESI)、岛津 LC-20A 高效液相色谱系统及 Analyst 1.6.2 数据处理系统;均质机(德国 IKA 公司);涡旋混合器(美国 Talboys 公司);KQ-600DE 超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司);高速离心机(美国 Thermo Fisher 公司);旋转蒸发仪(德国 Heidolph 公司);Gradient A10 Mill-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司)。

1.2 主要材料与试剂

恩诺沙星和环丙沙星标准品(德国 Sigma 公司);甲酸(色谱纯,德国 Sigma 公司);乙腈、甲醇和正己烷(色谱纯,德国 Merck 公司);无水硫酸钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。

1.3 动物实验

健康海参苗,购于山东威海荣成市,规格平均为 3.2 cm,试验前检测表明海参体内无恩诺沙星及环丙沙星残留。试验前将海参暂养 2 周,每日投喂不含其它药物的海藻泥。试验用海水经沙滤,无污染,试验过程中 24 h 不间断充气。水温 15 °C~18 °C,pH 值 8.1,溶解氧 7.8 mg/L,试验用水符合 GB 11607-89《渔业水质标准》。

试验时将海参苗随机分为对照组和试验组两组,对照组不添加恩诺沙星,其它试验条件同试验组。对照组和试验组每组 10 头海参,各分 3 个平行,药浴水体体积为 10 L。试验组恩诺沙星按照 5 µg/mL 浓度给药,采用静水药浴的方法,连续药浴 2 h,停药后,立即将海参转移到正常海水中代谢。停药时间从海参转移到空白海水中开始计时,并于停药 6 h,分别采集对照组和试验组的海参样品。取样时,取整只海参,置 100 目纱网内,用 100 mL 纯净水冲洗体表的附着药物,并用吸水纸吸干表面残余水分,立即将整只海参充分剪碎并匀浆,分别置于塑料封口袋中,保存于 -18 °C 条件下,备用。

1.4 实验条件

1.4.1 色谱条件

色谱柱:CAPCELL PAK C18 MG II (150×2.1 mm I.D., 5 µm);柱温:35 °C;流速 0.35 mL/min;进样量:10 µL;流动相:A 为 0.1%甲酸水溶液,B 为乙腈;梯度洗脱条件:0~1 min, 10%B;1~6 min, 10%~30%B;6~11 min, 30%~60%;11~16 min, 60%~90%B;16~18 min, 90%~10%B;18~20 min, 10%B。

1.4.2 质谱条件

电离模式:ESI⁺;碰撞气(CAD):Medium;气帘气(Curtain gas):35 psi;雾化气(Gas1):30 psi;辅助加热气(Gas2):30 psi;离子源温度:550 °C。恩诺沙星的代谢产物通过 MRM-IDA-EPI 模式来分析。其中 MRM 扫描的 IDA 阈值为 500 cps,EPI 扫描速率为 1000 u/s,CE 为 35±15 eV,DP 为 50 V,驻留时间 20 ms。根据恩诺沙星的结构及在体内可能发生的化学反应,建立 MRM 离子对,其可能代谢产物的母离子及特征子离子见表 1。

表1 恩诺沙星可能代谢产物的母离子和子离子等

Table 1 Parent and daughter ions from possible enrofloxacin

metabolites				
母离子 m/z	特征子离子 m/z	时间 /ms	EP /V	CXP /V
376	332, 261, 245	20	60	12
376	359, 315, 300	20	60	12
362	318, 316, 247, 245	20	60	12
360	342, 316, 245	20	60	12
332	314, 288, 245, 217	20	60	12

1.5 样品处理

称取约 2 g 试样于 50 mL 具塞离心管中, 加入 4 g 无水硫酸钠, 涡旋混匀, 再加入 10 mL 酸化乙腈, 涡旋混合 1 min, 超声提取 10 min, 4000 r/min 离心 5 min, 取上清液于 50 mL 梨形瓶中。残渣中加 10 mL 酸化乙腈, 重复提取一次, 合并两次提取液, 于 40 °C 水浴旋转蒸发至干。加 1 mL 10% 甲醇溶液涡旋溶解残留物, 再加入 2 mL 正己烷涡旋混合 30 s, 转入 5 mL 具塞离心管中, 以 4000 r/min 离心 5 min, 弃上层液, 取下层清液, 过 0.22 μm 滤膜, 供液相色谱-四级杆/线性离子阱质谱仪测定。

2 结果与讨论

2.1 恩诺沙星和环丙沙星的结构分析

对恩诺沙星和环丙沙星标准品进行一级扫描质谱分析, 其准分子离子峰 $[M+H]^+$ 分别为 m/z 360 和 332, 色谱保留时间分别为 5.16 min 和 4.70 min。采用 MRM-IDA-EPI 方式对恩诺沙星和环丙沙星的准分子离子 m/z 360 和 332 进行质谱分析, 得到恩诺沙星的主要碎片离子有 m/z 342 $[MH-F]^+$ 、316 $[MH-CO_2]^+$ 和 245 $[MH-CO_2-C_2H_5NC_2H_4]^+$ 。恩诺沙星质谱裂解特征是中性的丢失 18 u、44 u 和 115 u。环丙沙星的主要碎片离子有 m/z 314 $[MH-F]^+$ 、288 $[MH-CO_2]^+$ 、245 $[MH-CO_2-C_2H_4N]^+$ 、231 $[MH-CO_2-C_2H_4N-CH_2]^+$ 和 203 $[MH-CO_2-C_2H_4N-C_2H_4N]^+$ 。环丙沙星质谱裂解特征是中性的丢失 18 u、44 u、87 u、101 u 和 129 u。

2.2 海参体内代谢产物的 MRM-IDA-EPI 分析

未知代谢产物往往浓度低、基质复杂, 本文根据 pMRM (pMRM 即 predict multiple reaction monitoring, 通过理论上预知得到的代谢产物, 推测代谢产物的 MRM 离子对, 然后进行 IDA 分析) 方法, 采用

MRM-IDA-EPI 扫描模式分别测定对照组和给药组海参样品提取液。根据恩诺沙星在海参体内可能发生的化学反应(如氧化反应、还原反应、(脱)甲基化和(脱)乙基化等), 共预设 75 个 MRM 离子对, 通过逐一对比分析给药恩诺沙星前后海参样品的提取离子流图发现, 药浴恩诺沙星后的海参比对照组的海参多出 11 个提取离子峰。与恩诺沙星和环丙沙星标准品对应的保留时间及相应的色谱图和质谱图进行对比分析可知, M0 和 M1 分别为恩诺沙星和环丙沙星。另外 9 个组分可能为恩诺沙星的其他代谢产物。图 1 和图 2 分别为恩诺沙星和环丙沙星标准品的提取离子流色谱图及相应的质谱图。图 3~7 分别为对照组和试验组代谢产物的提取离子流色谱图及相应的质谱图。

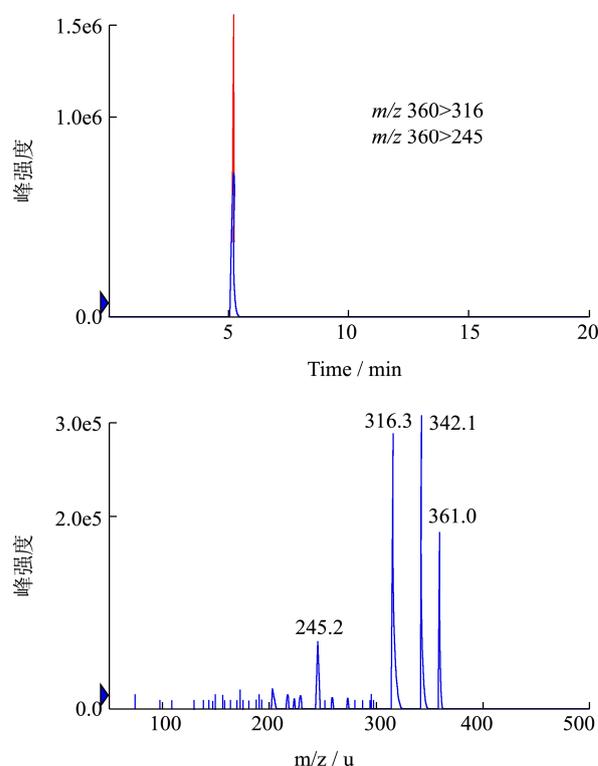
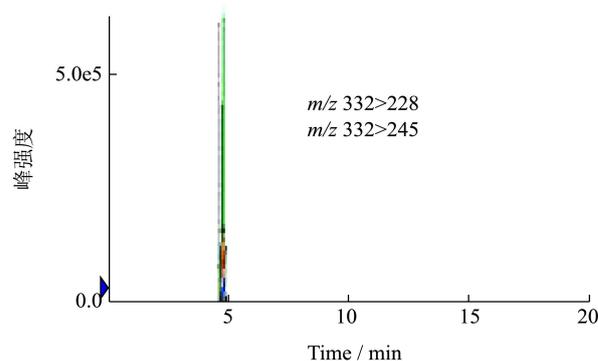


图1 恩诺沙星的提取离子流色谱图和质谱图

Fig.1 Extracted ion chromatogram and mass spectrum of enrofloxacin



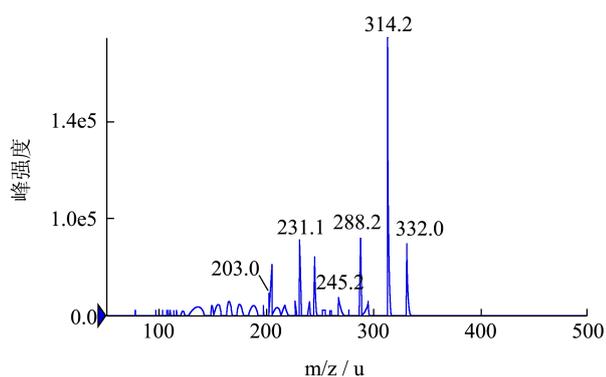


图2 环丙沙星的提取离子流色谱图和质谱图

Fig.2 Extracted ion chromatogram and mass spectrum of ciprofloxacin

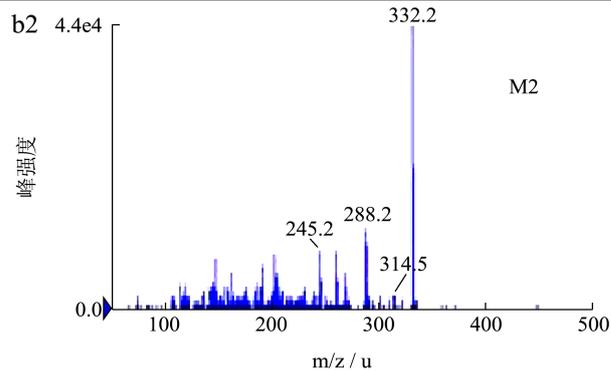
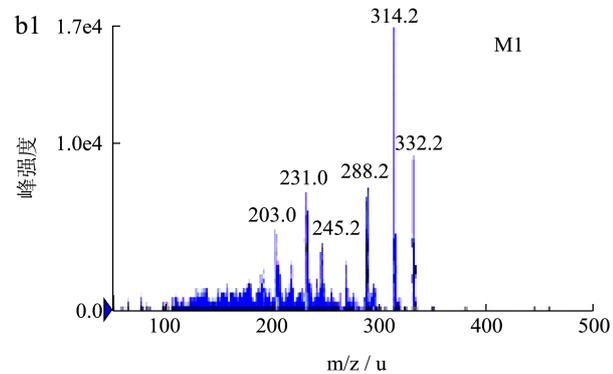
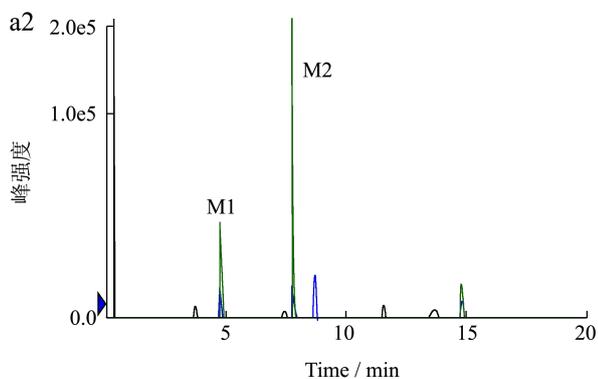
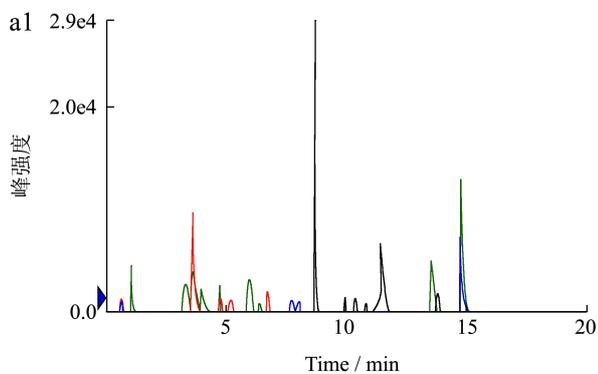
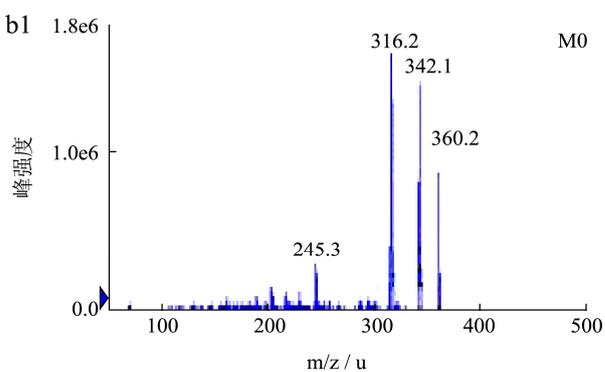
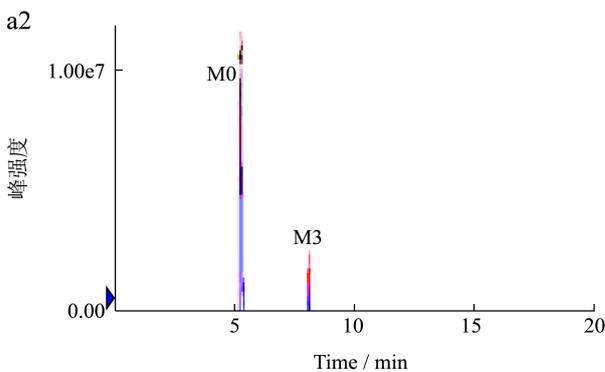
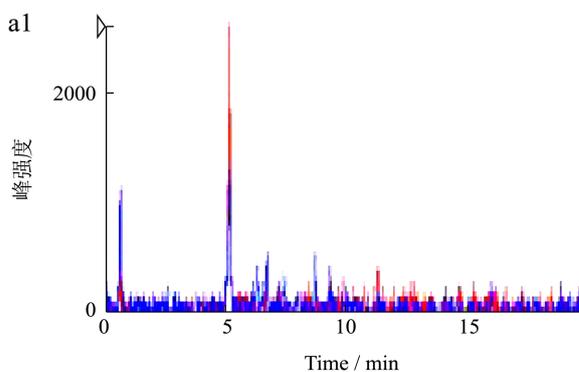


图3 (a) 海参样品中 m/z 332 提取离子流色谱图; (b) 海参体内代谢产物 M1 和 M2 的质谱图

Fig.3 (a) Extracted ion chromatogram of m/z 332 in sea cucumber samples; (b) Mass spectra of metabolites M1 and M2 in sea cucumber

注: 图a中, a1为对照组; a2为试验组。



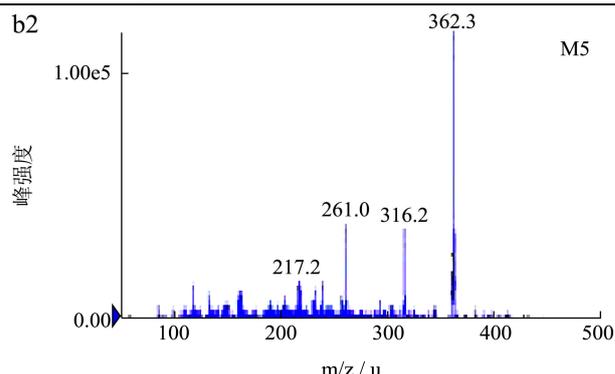
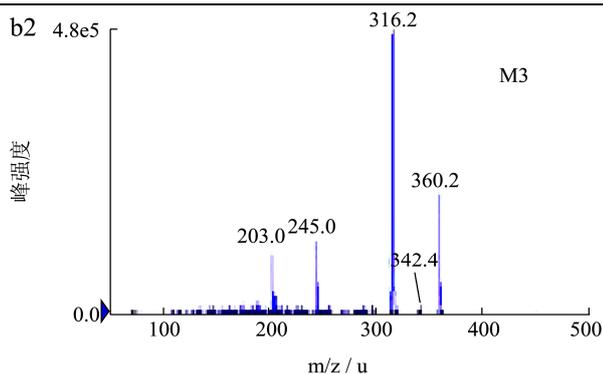


图4 (a) 海参样品中 m/z 360 提取离子流色谱图; (b) 海参体内代谢产物 M0 和 M3 的质谱图

Fig.4 (a) Extracted ion chromatograms of m/z 360 in sea cucumber samples; (b) Mass spectra of metabolites M0 and M3 in sea cucumber

注: 图a中, a1为对照组; a2为试验组。

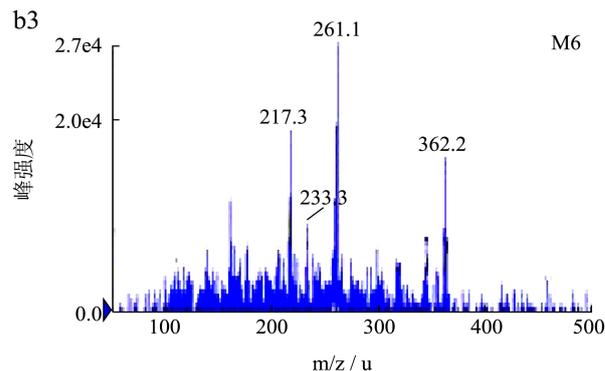
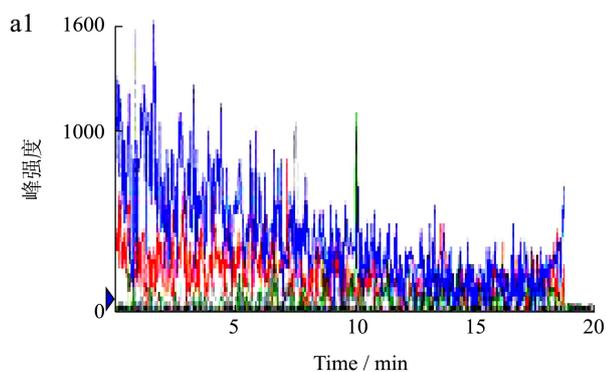
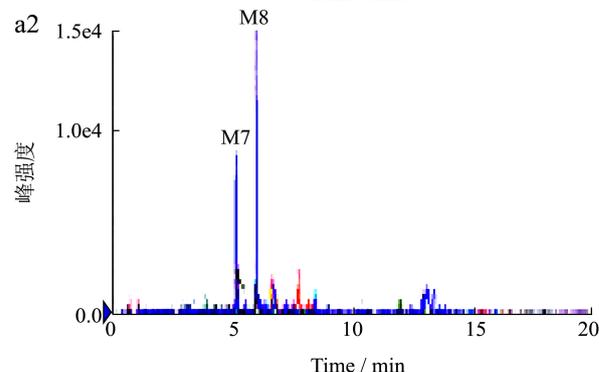
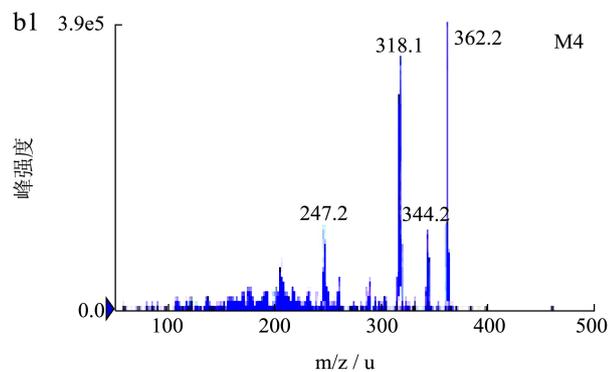
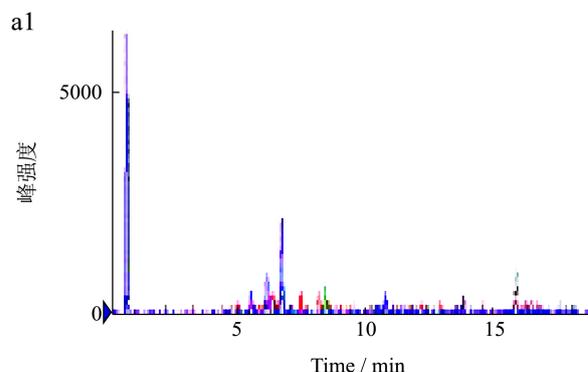
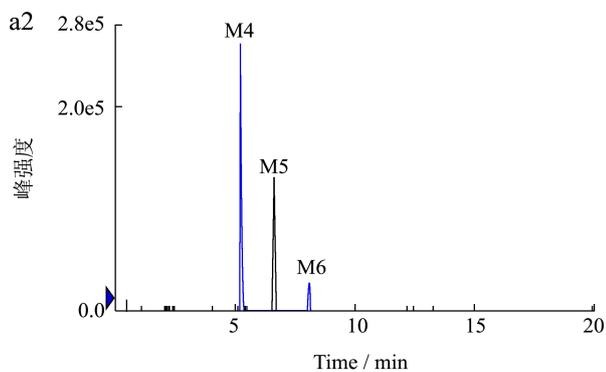


图5 (a) 海参样品中 m/z 362 提取离子流色谱图; (b) 海参体内代谢产物 M4、M5 和 M6 的质谱图

Fig.5 (a) Extracted ion chromatograms of m/z 362 in sea cucumber samples; (b) Mass spectra of metabolites M4, M5, and M6 in sea cucumber

注: 图a中, a1为对照组; a2为试验组。



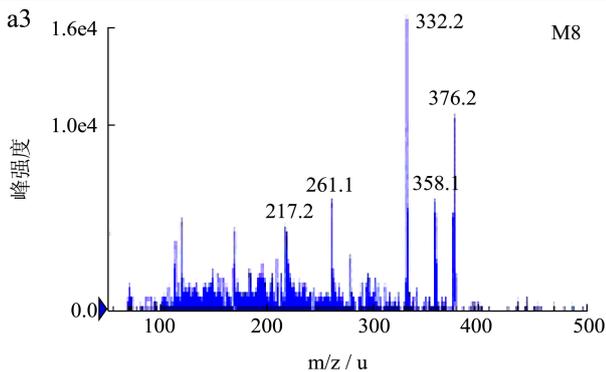


图6 (a) 海参样品中 m/z 376>261, 376>245, 376>332 提取离子流色谱图; (b) 海参体内代谢产物 M8 的质谱图

Fig.6 (a) Extracted ion chromatograms of m/z 376>261, m/z 376>245, and m/z 376>332 in sea cucumber samples; (b) Mass spectra of metabolite M8 in sea cucumber

注: 图a中, a1为对照组; a2为试验组。

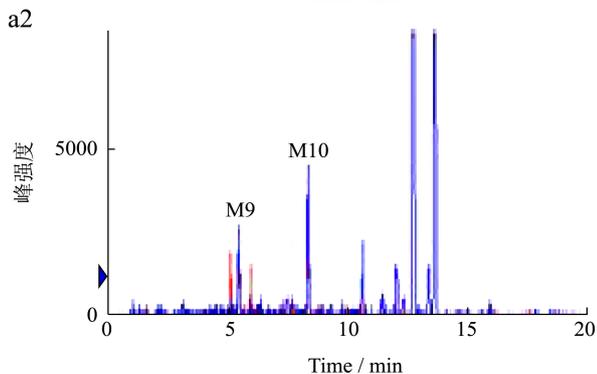
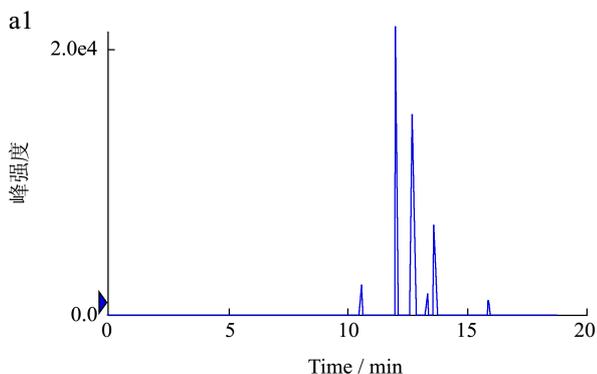


图7 海参样品中 m/z 376>315, 376>300 提取离子流色谱图

Fig.7 Extracted ion chromatograms of m/z 376>315 and m/z 376>300 in sea cucumber samples

注: a1为对照组; a2为试验组。

2.2.1 M0 和 M3 结构分析

对海参体内恩诺沙星代谢产物进行 MRM-IDA-EPI 分析, M0 和 M3 对应的准分子离子均为 m/z 360, M0 的主要碎片离子分别为 m/z 342[MH-F]⁺、316[MH-CO₂]⁺ 和 245[MH-CO₂-C₂H₅NC₂H₄]⁺, 而 M3 的主要碎片离子分别为 m/z 316[MH-CO₂]⁺、245[MH-CO₂-CH₂-C₃H₆NH]⁺ 和 203[MH-CO₂-CH₂-C₃H₆NH-NC₂H₄]⁺. M3 与 M0 相比, 碎片离子 m/z

342[MH-F]⁺ 的相对丰度很低。M0 与 M3 对应的保留时间分别为 5.16 min 和 8.05 min。M0 色谱保留时间及质谱图与恩诺沙星标准品一致, 由此可以确定, M0 即为原药恩诺沙星。而 M3 的准分子离子和两个主要碎片离子与恩诺沙星一致, 碎片离子 m/z 342[MH-F]⁺ 及保留时间与恩诺沙星标准品差异较大, 推测 M3 为恩诺沙星的异构化产物。M0 碎片离子 m/z 342[MH-F]⁺ 为恩诺沙星脱去一分子氟, 而 M3 相对稳定, 不易脱去氟, 结合恩诺沙星的结构, 推测 M3 为哌嗪环上 N-乙基转化产物。M0 和 M3 (m/z 360) 离子的可能裂解机制见图 8 和图 9。

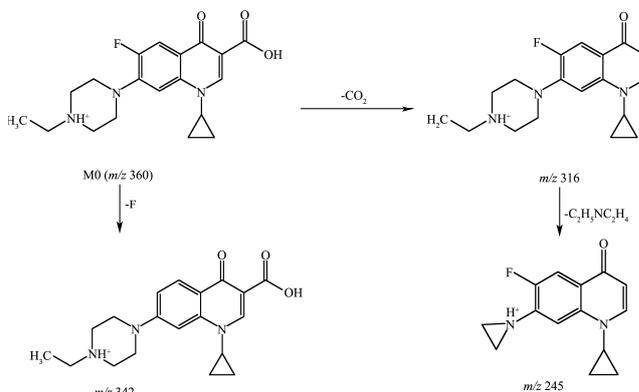


图8 恩诺沙星 M0 (m/z 360) 离子的可能裂解机制

Fig.8 Proposed decomposition process of the M0 (m/z 360) ion of enrofloxacin

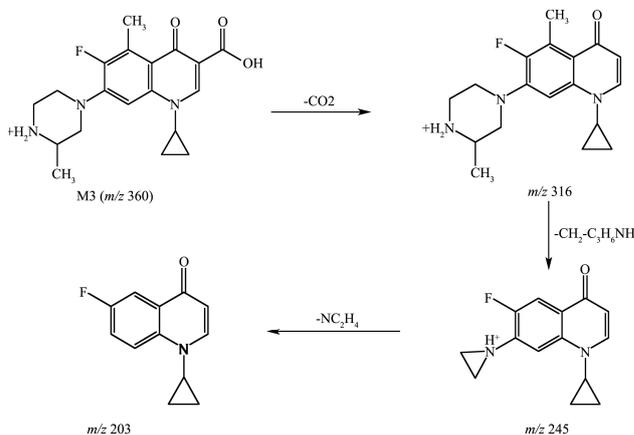


图9 恩诺沙星代谢产物 M3 (m/z 360) 离子的可能裂解机制

Fig.9 Proposed decomposition process of the M3 (m/z 360) ion metabolite of enrofloxacin

2.2.2 M1 和 M2 结构分析

代谢产物 M1 和 M2 的准分子离子均为 m/z 332, M1 的主要碎片离子有 m/z 314[MH-F]⁺、288[MH-CO₂]⁺、245[MH-CO₂-HNC₂H₄]⁺、231[MH-CO₂-C₂H₄NH-CH₂]⁺ 和 203[MH-CO₂-C₂H₄NH-C₂H₄N]⁺, M2 的主要碎片离子有 m/z 288[MH-CO₂]⁺ 和 245[MH-CO₂-NH₂C₂H₃]⁺. 与原形药物恩诺沙星相比, 代谢产

物 M1 和 M2 的相对分子质量减少了 28 u, 推测为恩诺沙星氮去乙基的产物。M1 的保留时间为 4.70 min, 且 M1 的质谱图与环丙沙星的质谱图一致, 确定代谢产物 M1 为环丙沙星。代谢产物 M2 与环丙沙星标准品具有相似的碎片离子, 而碎片离子 m/z 314 $[MH-F]^+$ 的离子丰度却很低, 且具有不同的保留时间 7.75 min, 推测 M2 可能是环丙沙星的哌嗪环异构化的产物。M1 和 M2 (m/z 332) 离子的可能裂解机制见图 10 和图 11。

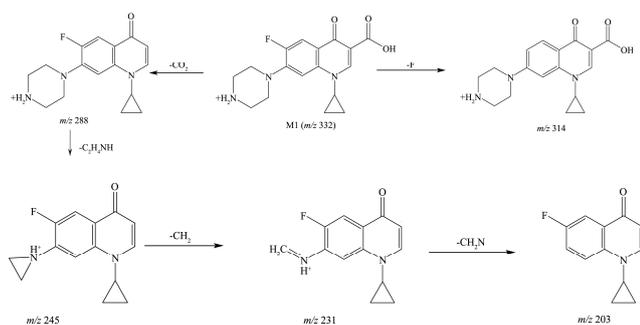


图10 恩诺沙星代谢物M1 (m/z 332) 离子的可能裂解机制

Fig.10 Proposed decomposition process of the M1 (m/z 332) ion metabolite of enrofloxacin

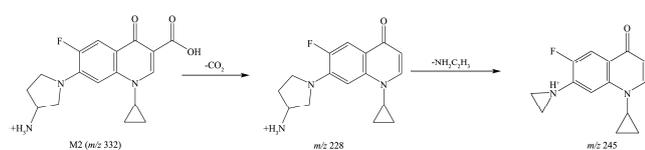


图11 恩诺沙星代谢物M2 (m/z 332) 离子的可能裂解机制

Fig.11 Proposed decomposition process of the M2 (m/z 332) ion metabolite of enrofloxacin

提取离子色谱图上显示, M2 的离子质谱响应信号强度远高于环丙沙星。查阅前期研究结果进行分析, 发现恩诺沙星在不同生物体内的代谢产物有较大差异, 其在动物体内的主要代谢产物是环丙沙星, 其它代谢产物含量很低^[1-5]。但在本试验中分析结果表明, 恩诺沙星在海参体内的主要代谢产物除环丙沙星之外, M2 也是其中之一。

2.2.3 M4、M5 和 M6 结构分析

代谢产物 M4、M5 和 M6 的准分子离子均为 m/z 362。对照质谱图, M4 的碎片离子主要有 m/z 344 $[MH-F]^+$ 、318 $[MH-CO_2]^+$ 和 247 $[MH-CO_2-C_2H_5NC_2H_4]^+$, M5 的碎片离子主要有 m/z 316 $[MH-H_2CO_2]^+$ 、261 $[MH-(CHO)_2NHC_2H_4]^+$ 和 217 $[MH-(CHO)_2NHC_2H_4-CO_2]^+$, M6 的碎片离子主要有 m/z 261 $[MH-(C_2H_4)_3H_2NH]^+$ 和 217 $[MH-(C_2H_4)_3H_2NH-CO_2]^+$ 。

与原型药物恩诺沙星相比, 代谢产物 M4、M5 和 M6 的相对分子质量均增加了 2 u, 推测是恩诺沙星的加氢还原产物或是哌嗪环及环丙烷结构发生变化。M4、M5 和 M6 具有相同的准分子离子峰, 但其保留

时间及碎片离子不同, 推测 M4、M5 和 M6 互为同分异构体。根据碎片离子峰推测, M4 可能为恩诺沙星环丙烷还原为异丙基的产物, M5 可能为哌嗪环开环后的氧化产物, M6 则为哌嗪环和环丙烷同时转化结构的产物。M4、M5 和 M6 (m/z 362) 离子的可能裂解机制见图 12~14。

从提取离子色谱图上可以看出, 三个代谢产物中 M4 的质谱响应信号强度最强, 与 M2 相当。由此也可以推断, M4 是除环丙沙星和 M2 之外恩诺沙星的又一主要代谢产物。

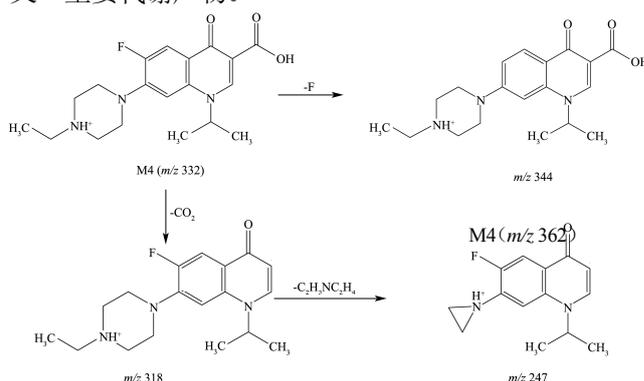


图12 恩诺沙星代谢物M4 (m/z 362) 离子的可能裂解机制

Fig.12 Proposed decomposition process of the M4 (m/z 362) ion metabolite of enrofloxacin

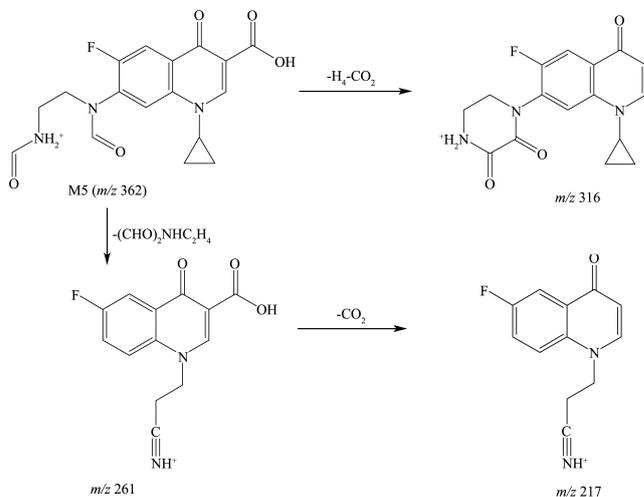


图13 恩诺沙星代谢物M5 (m/z 362) 离子的可能裂解机制

Fig.13 Proposed decomposition process of the M5 (m/z 362) ion metabolite of enrofloxacin

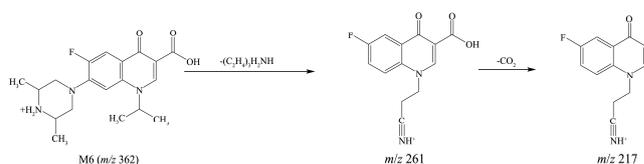
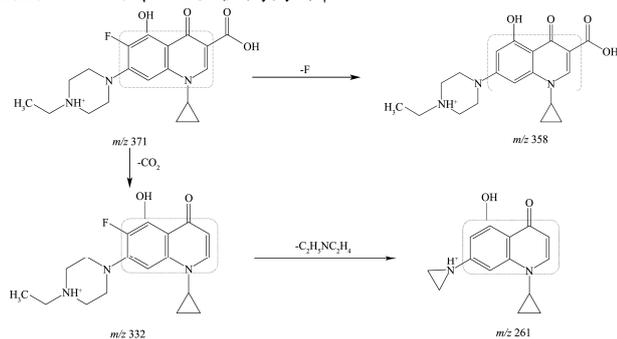


图14 恩诺沙星代谢物M6 (m/z 362) 离子的可能裂解机制

Fig.14 Proposed decomposition process of the M6 (m/z 362) ion metabolite of enrofloxacin

2.2.4 M7和M8结构分析

图15 恩诺沙星代谢物M7和M8 (m/z 376) 离子的可能裂解机制Fig.15 Proposed decomposition process of the M7 and M8 (m/z 376) ion metabolites of enrofloxacin

代谢产物 M7 和 M8 的准分子离子峰均为 m/z 376, M7 和 M8 的提取离子对均为 m/z 376>261、332 和 245, 相对应的保留时间分别为 5.13 min 和 5.96 min。对照质谱图, M8 的主要碎片离子有 m/z 358[MH-F]⁺、332[MH-CO₂]⁺ 和 261[MH-CO₂-C₂H₅NC₂H₄]⁺, 与原型药物恩诺沙星具有相似的质谱裂解特征, 即中性丢失 18 u、44 u 和 115 u, 推测 M8 为恩诺沙星的羟基化产物, 其碎片离子与产物分析与房文红等^[1]报道基本一致。M7 由于含量太低, 采集到的二级碎片离子质谱图不够清晰, 但其主要碎片离子及 MRM 提取离子对与 M8 一致, 推测 M7 与 M8 互为同分异构体。M7 和 M8 (m/z 376) 离子的可能裂解机制见图 15。

2.2.5 M9 和 M10 结构分析

代谢产物M9和M10的准分子离子峰均为 m/z 376, 提取离子对均为 m/z 376>315和300, 相应的保留时间为5.45 min和8.32 min。对照质谱图, M9的主要碎片离子有 m/z 359和315, M10的主要碎片离子有 m/z 359、315和300。由于M9和M10的质谱裂解特征与恩诺沙星原型药物有较大差异, 推测M9和M10为恩诺沙星原型药物基础上增加了一个氧原子。房文红等^[1]报道了恩诺沙星在锯缘青蟹血浆中的代谢产物含有加氧恩诺沙星, 其准分子离子峰为 m/z 376, 主要碎片离子有 m/z 359、348、328、315和300等, 报道与本文结果相似。Parshikov^[6]研究表明, 恩诺沙星在毛霉的作用下可生成代谢产物N-氧化恩诺沙星, 碎片离子包括 m/z 358、315和300, 并对其结构进行推测。由于M9和M10含量太低, 无法采集到清晰的二级碎片离子质谱图, 对分析其结构有一定难度。M9与M10具有相似的质谱裂解特征, 推测M9和M10为同分异构体。

2.3 恩诺沙星及其代谢产物的比例

恩诺沙星在海参体内生成 10 种代谢产物, 目前仅

有恩诺沙星和环丙沙星的标准品, 其它几种代谢产物均无标准品, 因此无法准确测定其含量。本试验采用面积归一化法计算原型药物及代谢产物峰面积所占百分比, 见表 2。恩诺沙星停药 6 h 后, 仍以原型药物所占比例最大, 为 74.8%, 环丙沙星 M1 所占比例仅为 2.2%, 而代谢产物 M2~M5 所占比例均高于环丙沙星, 环丙沙星同分异构体 M2 的峰面积百分比最大, 其次为 M4, 其余几种代谢产物 M6~M10 所占比例均小于 1%。

表2 海参中恩诺沙星原型药物及代谢产物的峰面积及其所占百分比

Table 2 Peak area and percentage of enrofloxacin and its metabolites in sea cucumber

原型药物和代谢产物	峰面积	峰面积百分比/%
M0	8494100±237467	74.8
M1	239920±9210	2.11
M2	746060±23478	6.57
M3	635310±14811	5.60
M4	689610±21207	6.07
M5	372410±18244	3.28
M6	52192±1726	0.46
M7	32868±1455	0.29
M8	63298±1950	0.56
M9	10267±535	0.09
M10	15864±610	0.14

3 结论

3.1 现有报道分析代谢产物时主要借助液相色谱-离子阱质谱法 (LC-MSⁿ) 和四级杆-飞行时间质谱法 (QTOF) 研究化合物的裂解机制。四级杆-飞行时间质谱可在宽质量范围内实现高分辨, 在研究污染物的转换和降解及代谢产物方面具有较大优势, 但其造价昂贵。液相色谱-离子阱质谱法在鉴定未知物结构方面虽然可以进行多级质谱分析, 但其灵敏度有待提高。而液相色谱-四级杆/线性离子阱复合质谱是将三重四级杆质谱与线性离子阱质谱有机地结合在一起, 其独有的工作模式MRM-IDA-EPI, 在进行三重四级杆质谱工作的同时, 还能进行线性离子阱质谱的工作, 一次进样, 可得到MRM色谱图及MS²质谱图。MRM-IDA-EPI模式具有选择性好, 灵敏度高和定性准确的优点。

3.2 目前普遍认为恩诺沙星在动物体内的代谢产物为环丙沙星。本文采用MRM-IDA-EPI模式分析恩诺沙星在海参体内的代谢产物, 共发现有10种代谢产物。恩诺沙星在海参体内发生脱乙基反应、加氢还原反应、

羟基化反应和氧化反应,且同一代谢过程出现了两种以上的同分异构体,这在已有的文献报道中并不多见。恩诺沙星在海参体内以脱乙基反应和加氢还原反应为主,其在海参体内的主要代谢产物为M2和M4。

3.3 恩诺沙星在不同生物作用下的降解途径和代谢产物不同。恩诺沙星在动物体内的主要代谢产物为环丙沙星^[1~5],在环境作用下环丙沙星并非主要降解产物^[7~14],在真菌作用下则没有环丙沙星生成^[6]。海参与其他水生动物的生理学差异较大,恩诺沙星在海参体内的代谢途径与在其他动物体内的代谢途径存在差异,其在海参体内的可能代谢产物结构如图16所示。

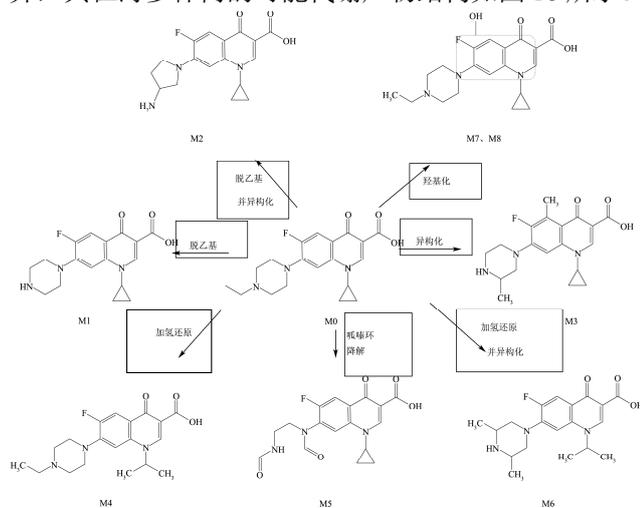


图16 恩诺沙星在海参体内可能代谢产物结构推测

Fig.16 Proposed metabolites of enrofloxacin in sea cucumber

参考文献

[1] 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[J].海洋渔业,2008,30(4):351-355
FANG Wen-hong, HU Lin-lin, CHEN Yu-lu, et al. Analysis on the metabolites of enrofloxacin in the hemolymph of mud crab (*Scylla serrata*) by means of LC/MSⁿ [J]. Marine Fisheries, 2008, 30(4): 351-355

[2] 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[J].海洋渔业,2012,34(3):342-349
ZHOU Shuai, HU Lin-lin, SUN Bei-bei, et al. Analysis of the metabolites of enrofloxacin from *Litopenaeus vannamei* in vivo and in vitro using UPLC/Q-TOF MS [J]. Marine Fisheries, 2012, 34(3): 342-349

[3] 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[J].东北农业大学学报,2013,44(6):101-106
ZHOU Shuai, LI Guo-lie, Hu Lin-lin, et al. In vivo and liver microsome in vitro analysis of metabolites of enrofloxacin from crucian carp (*Carassius auratus* Gibelio) using UPLC/Q-TOF MS [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2013, 44(6): 101-106

[4] Enrofloxacin[OL].[2014-05-22]. <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v34je05.htm>

[5] 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[J].中国兽药杂志,2012,46(2):19-22
FANG Zhou, REN Heng-xin, XU Xin, et al. Analysis on the metabolites of enrofloxacin in the plasma of rabbit by HPLC-DAD-MSⁿ [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2012, 46(2): 19-22

[6] Parshikov I A, Freeman J P, Lay J O, et al. Microbiological transformation of enrofloxacin by the fungus *micor ramannianus* [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2000, 66(6): 2664-2667

[7] Guido D G, Giuseppina B, Alfio C. Photosensitization reactions of fluoroquinolones and their biological consequences [J]. Photochemistry and Photobiology, 2011, 87(6): 1214-1229

[8] Babic S, Perisa M, Skoric I. Photolytic degradation of norfloxacin, enrofloxacin and ciprofloxacin in various aqueous media [J]. Chemosphere, 2013, 91(11): 1635-1642

[9] Wammer K H, Korte A R, Lundeen R A, et al. Direct photochemistry of three fluoroquinolone antibacterials: norfloxacin, ofloxacin, and enrofloxacin [J]. Water Research, 2013, 47(1): 439-448

[10] Sturini M, Speltini A, Maraschi F, et al. Photochemical degradation of marbofloxacin and enrofloxacin in natural water [J]. Environ. Sci. Technol., 2010, 44(12): 4564-4569

[11] Li Y, Niu J F, Wang W L. Photolysis of enrofloxacin in aqueous systems under simulated sunlight irradiation: Kinetics, mechanism and toxicity of photolysis products [J]. Chemosphere, 2011, 85(5): 892-897

[12] Li Y, Niu J F, Wang W L. Reply to Comment on "Photolysis of enrofloxacin in aqueous systems under simulated sunlight irradiation: kinetics, mechanism and toxicity of photolysis products" [J]. Chemosphere, 2013, 92(11): 1581-1584

(下转第196页)