

文章编号: 1000-0615(2019)04-1146-08

DOI: 10.11964/jfc.20161210668

## 液相色谱—串联质谱法研究恩诺沙星 在中华草龟体内的药物代谢动力学

茅玲燕, 潘连德\*

(上海海洋大学, 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

**摘要:** 为研究不同给药方式下, 恩诺沙星在中华草龟体内的药物代谢动力学规律, 实验选取20只健康中华草龟, 每组10只, 随机分为2组, 分别为肌注组和胃插管强制口服组, 给药量均为10 mg/kg, 应用液相色谱—串联质谱法测定数据, Kinetic 4.4软件的非房室模型分析药时数据。胃插管强制口服给药主要药动学参数为 $C_{\max}$  7.49  $\mu\text{g/mL}$ 、 $T_{\max}$  12 h、 $T_{1/2\lambda_z}$ 为99.85 h、 $AUC_{0-\infty}$ 为531.67  $\mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{h})$ ; 肌注给药主要药动学参数为 $C_{\max}$  5.85  $\mu\text{g/mL}$ 、 $T_{\max}$  4 h、 $T_{1/2\lambda_z}$ 为30.42 h、 $AUC_{0-\infty}$ 为193.6  $\mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{h})$ 。2种不同给药条件下, 肌注恩诺沙星比胃插管强制口服更快达到最高血药浓度, 表明肌注恩诺沙星在中华草龟体内吸收更快; 胃插管强制口服给药的 $C_{\max}$ 和 $AUC$ 均高于肌注给药, 表明胃插管强制口服恩诺沙星在中华草龟体内吸收更完全, 分布更广泛, 效果更好。恩诺沙星在中华草龟体内消除缓慢, 滞留时间(MRT)长, 胃插管强制口服给药MRT显著长于肌注给药, 其血药浓度保留时间长, 效果更持久。研究表明, 需较快达到疗效时, 建议肌注恩诺沙星; 需持续给药且龟体代谢状态正常时, 建议胃插管强制口服恩诺沙星; 恩诺沙星在胃插管强制口服给药条件下, 在中华草龟体内血药浓度高、保留时间长、生物利用度高, 更适宜作为中华草龟个体疾病治疗的给药方式。

**关键词:** 中华草龟; 恩诺沙星; 药物代谢动力学; 非房室模型; 液相色谱—质谱联用法  
**中图分类号:** R 969.1; S 948

**文献标志码:** A

恩诺沙星(enrofloxacin)为第3代喹诺酮类药物, 对于革兰氏阳性菌、阴性菌和霉菌体都具有很好的抑制效果, 具有广谱抗菌性; 不仅毒副作用小、有良好的组织分布性, 并且与其他抗生素之间无交叉耐药性<sup>[1-5]</sup>, 被列为动物专用药, 也是水产养殖中的常用药<sup>[1]</sup>。农业部于2015年发布的第2292号公告中, 将洛美沙星、培氟沙星、氧氟沙星、诺氟沙星4种原料药的各种盐、酯及其各种制剂列入禁用渔药, 自2016年12月31日起禁止使用于食品动物<sup>[6]</sup>。因此, 恩诺沙星的临床合理用药显得尤为重要。

中华草龟(*Chinemys reevesii*)是我国常见的本土龟类, 不仅可以入药、食用, 还可作家庭观

赏, 是我国除中华鳖(*Trionyx sinensis*)外的又一大经济龟鳖物种。本实验选取中华草龟观赏个体为实验对象, 旨在通过探究恩诺沙星在中华草龟体内的药物代谢规律, 为后期观赏龟鳖个体治疗中的临床合理用药提供依据。

### 1 材料与amp;方法

#### 1.1 实验材料

仪器和设备 线性离子阱质谱仪(Thermo Scientific LTQ-XL), 高效液相色谱仪(Uitimate 3000), 超纯水仪(Molelement 1820a), 固相萃取装置(Supelco 12位), 氮吹仪(QGC-24T), 高速冷

收稿日期: 2016-12-30 修回日期: 2017-03-12

资助项目: 水产动物遗传育种上海市协同创新中心项目(ZF1206)

通信作者: 潘连德, E-mail: ldpan@shou.edu.cn

冻离心机(Eppendorf 5424R),漩涡混合器(IKA Vortex-3)

**试剂与药品** 恩诺沙星标准品(纯度>99.8%,德国DR)购自中国国家标准物质网;拜有利(5%恩诺沙星)购自德国拜耳;甲醇(色谱纯),正己烷(色谱纯),氨水(分析纯),EDTA-K<sub>2</sub>(分析纯),购自国药试剂;实验用水为超纯水,符合国家一级用水标准;BOSHI HLB固相萃取小柱(60 mg, 3 mL),购自上海博势生物科技有限公司。

**实验对象** 中华草龟20只,购自江苏无锡龟灵阁水产养殖场,平均体质量(800±50) g,体表完整、四肢健全、吃食正常、状态活跃、健康无病。暂养2周后,给药、采血。

## 1.2 实验方法

**给药及样品采集** 20只健康中华草龟(均为母龟),随机分为2组,分别标号、分缸单独饲养,平均水温(25±3) °C,每天8:00定时投喂占体质量1%海皇牌龟粮,暂养2周。参考国外对于恩诺沙星在龟类体内药动学报道<sup>[7-9]</sup>,以及上海海洋大学攀世水族宠物健康中心实际治疗中常用剂量,选定10 mg/kg龟体质量作为给药量。中华草龟单剂量肌注或采用胃插管强制口服恩诺沙星,分别于0、0.5、4、8、12、24、48、96、120、144、172和196 h后在龟颈静脉窦处采血。每次采血量1 mL,置于含EDTA-K<sub>2</sub> 2 mL离心管中,混匀,4 °C静置8~12 h后,10 000 r/min离心10 min,分离血浆,取上清液置于2 mL离心管中,编号,-40 °C冻存待测。

**样品前处理** 样品前处理方法参考李小玲等<sup>[10]</sup>和张乐等<sup>[11]</sup>前处理方法,稍作修改。取冷冻保存血浆自然解冻,分别吸取血浆0.1 mL于2 mL离心管中,加入1.9 mL超纯水稀释,漩涡混匀1 min。取HLB固相萃取小柱(60 mg, 3 mL),先依次用3 mL甲醇,6 mL水活化,然后将样品过柱,在大气压力下自然抽取,流速控制在每秒1~2滴。样品过完后,加入3 mL水淋洗,负压抽干。最后进行洗脱,洗脱液选用4 mL氨水—甲醇混合溶液(体积比V:V=30:70)分2次洗脱,收集洗脱液,于40 °C氮气吹干,加入1 mL甲醇溶解残渣,漩涡混匀1 min。为除去脂肪及其他杂质影响,加入2 mL正己烷,漩涡混匀1 min,10 000 r/min离心10 min,取下层液体过0.22 μm滤膜,上机测定或-40 °C保存待测。

## 1.3 测定条件

**色谱条件** 色谱柱为Thermo Scientific Hypersil GOLD C<sub>18</sub> (2.1 mm×150 mm, 5 μm);柱温30 °C;进样量10 μL;流动相A为0.1%甲酸水溶液,B为乙腈,梯度洗脱程序为0~1 min,40%A;1~8 min,40%~5%A;10~13 min,40%A,并保持2 min,流速为0.2 mL/min。

**质谱条件** 采用大气压电喷雾离子源(ESI),喷雾电压3 kV,离子传输毛细管温度325 °C,碰撞气为氩气,压力2.0 mTorr;鞘气流量11 L/min;辅助气流量20 L/min;采用选择反应监测模式(SRM),恩诺沙星定性离子为360 m/z,定量离子316 m/z,碰撞能量为20 eV,回归方程 $y=791\ 900x-2126.1$ , $R^2=0.999\ 9$ 。

## 1.4 标准曲线

称取恩诺沙星标准品各10 mg,溶于甲醇中,配制成100 μg/mL的恩诺沙星标准品母液,4 °C保存备用。

**标准曲线的制备** 将100 μg/mL的恩诺沙星标准品母液依次稀释成1、0.5、0.1、0.05、0.005 μg/mL的标准工作液,过0.22 μm滤膜,分别通过液质进行测定。分别以峰面积和药物配制浓度作为y轴和x轴,建立坐标曲线,并确定相关系数。

**回收率、精密度测定** 取0.1 mL空白血浆,加入1.9 mL超纯水稀释,然后分别取10、1、0.1 μg/mL标准品溶液0.1 mL,按“样品前处理”方法处理样品,进行液质测定,每个浓度水平重复3次,得到实测浓度,并计算相对回收率(%)=样品实测浓度/样品理论浓度×100%。将上述样品分别在1 d的不同时间点重复进样测3次,并重复3 d进行测定,以此血浆中恩诺沙星的日内平均变异系数和日间变异系数,以衡量检测方法的精密度。变异系数(CV,%)= $S/X \times 100\%$ (S为标准偏差,X为平均值)。

## 1.5 数据分析

实验数据应用Excel管理计算,SPSS 16.0软件统计分析,Kinetic 4.4药代动力学软件计算动力学参数,绘制药时曲线。 $P<0.05$ 为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 恩诺沙星标准工作曲线

应用液相色谱—串联质谱法测定中华草龟

体内恩诺沙星的药物浓度。在测定条件下, 恩诺沙星的基线平稳, 色谱峰尖锐对称, 出峰时

间早, 与血浆中杂质分离良好(图1), 可做实验分析依据。

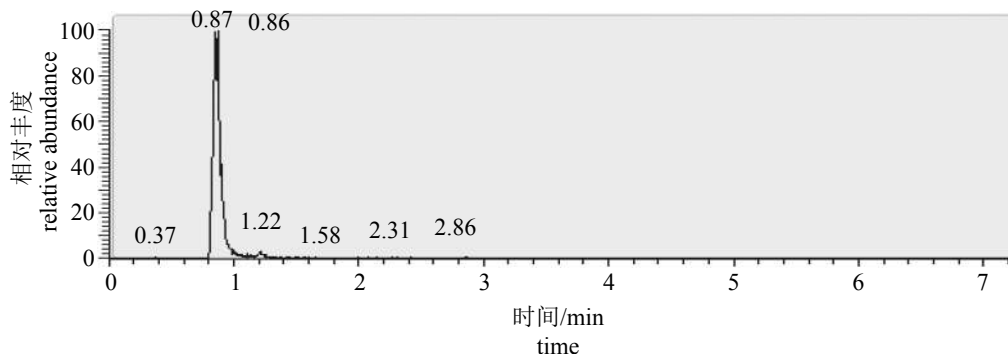


图1 恩诺沙星的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of enrofloxacin

以测得的恩诺沙星峰面积作为纵坐标( $y$ ,  $\mu\text{g/mL}$ ), 其对应标准工作液浓度为横坐标( $x$ ), 绘制标准工作曲线, 所得标准工作曲线方程:  $y=791\ 900x-2126.1$ ,  $R^2=0.999\ 9$ , 可知在 $0.005\sim 1\ \mu\text{g/mL}$ 范围内具有良好线性关系。

## 2.2 回收率与精密度

在空白血浆中分别添加 $0.005$ 、 $0.1$ 、 $1.0\ \mu\text{g/mL}$ 浓度的标准品, 所得到的平均回收率为 $85.9\%\pm 1.1\%$ , 日内变异系数为 $1.54\%\pm 0.14\%$ , 日间变异系数为 $2.40\%\pm 0.19\%$ 。

## 2.3 单剂量肌注和胃插管强制口服恩诺沙星后的药代动力学

在单剂量肌注和胃插管强制口服 $10\ \text{mg/kg}$ 龟体质量恩诺沙星后, 在13个连续的采血点对中华草龟进行同一个体连续采血。通过液相串联质谱法测定血浆药时浓度, 经Excel软件处理得到平均药时浓度(表1)以及药时曲线(图2)。

利用Kinetic 4.4药代动力学软件对恩诺沙星药动学数据进行非房室模型分析, 得到的主要药代动力学参数(表2)。

中华草龟单剂量肌注和胃插管强制口服恩诺沙星后, 分别于4与12 h达到最高药物浓度 $C_{\text{max}}$ 为 $5.85$ 与 $7.49\ \mu\text{g/mL}$ , 血药浓度曲线下面积AUC分别为 $193.6$ 与 $531.67\ \mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mL})$ , 均差异显著( $P<0.05$ )。胃插管强制口服吸收缓慢, 但是其 $C_{\text{max}}$ 与AUC显著高于肌注, 说明胃插管强制口服相比肌注吸收更完全, 进入体内循环的药物浓度高; 并且口服的滞留时间(MRT)显著高于肌注, 消除

缓慢, 血药浓度维持时间长。结果显示, 在中华草龟的疾病防治中, 胃插管强制口服恩诺沙星比肌注治疗效果好。

## 3 讨论

### 3.1 恩诺沙星在中华草龟体内的药物代谢动力学特征

经典房室模型是最常见的分析体内药动学

表1 单剂量肌注和强制口服给药后中华草龟体内恩诺沙星药物浓度( $n=10$ )

Tab. 1 Residue level of enrofloxacin in *C. reevesii* following a single dose of intramuscular injection

采血点/h time	and forced oral administration $\mu\text{g/mL}$	
	肌注 intramuscular injection	强制口服 forced oral administration
0.5	$3.64\pm 0.87$	$5.71\pm 1.00$
4	$5.85\pm 1.61$	$6.00\pm 0.63$
8	$4.74\pm 0.78$	$6.83\pm 1.12$
12	$4.38\pm 0.59$	$7.49\pm 0.86$
24	$2.56\pm 0.03$	$4.80\pm 1.68$
48	$1.30\pm 0.36$	$2.93\pm 0.71$
72	$0.53\pm 0.18$	$1.76\pm 0.48$
96	$0.20\pm 0.04$	$1.36\pm 0.35$
120	$0.23\pm 0.12$	$1.00\pm 0.13$
144	$0.13\pm 0.26$	$0.91\pm 0.07$
172	$0.14\pm 0.19$	$0.87\pm 0.17$
196	$0.06\pm 0.03$	$0.69\pm 0.20$

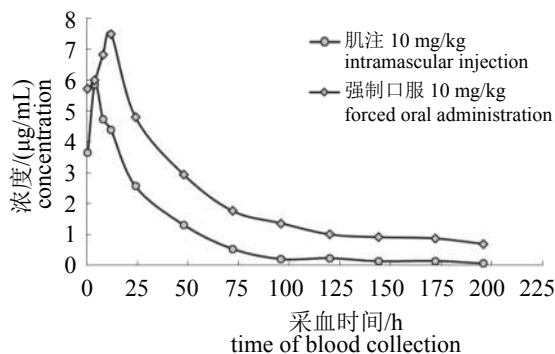


图2 单剂量肌注和强制口服恩诺沙星在中华草龟体内药时曲线图

Fig. 2 Concentration time curve of enrofloxacin in *C. reevesii* following a single dose of intramuscular injection and forced oral administration

表2 单剂量肌注和强制口服给药后中华草龟体内恩诺沙星药代动力学参数( $n=10$ )

Tab. 2 Pharmacokinetic parameters of enrofloxacin in *C. reevesii* following a single dose of intramuscular injection and forced oral administration

参数 parameters	单位 unit	肌注 intramuscular injection	强制口服 forced oral administration
RAP		0.94±0.05 <sup>a</sup>	0.93±0.06 <sup>b</sup>
$\lambda_z$	1/h	0.023±0.001 <sup>a</sup>	0.007±0.002 <sup>b</sup>
$T_{1/2\lambda_z}$	h	30.42±0.06 <sup>b</sup>	99.85±4.25 <sup>a</sup>
$T_{max}$	h	4.00±0.12 <sup>b</sup>	12.00±0.27 <sup>a</sup>
$C_{max}$	µg/mL	5.85±0.31 <sup>b</sup>	7.49±0.76 <sup>a</sup>
$AUC_{0-\infty}$	µg/(mL·h)	193.6±8.23 <sup>b</sup>	531.67±23.13 <sup>a</sup>
$V_z/F$	mL/kg	2 266.98±64.13 <sup>b</sup>	2 721.02±87.89 <sup>a</sup>
$CL/F$	mL/(h·kg)	51.65±1.58 <sup>a</sup>	18.89±0.67 <sup>b</sup>
$AUMC_{0-\infty}$	µg/(mL·h)	7 160.13±470.84 <sup>b</sup>	58 499.62±1 293.56 <sup>a</sup>
MRT	h	34.19±1.27 <sup>b</sup>	56.75±3.09 <sup>a</sup>

注: RAP.  $R^2$ 相关系数;  $\lambda_z$ . 消除相斜率;  $T_{1/2\lambda_z}$ . 消除相半衰期;  $T_{max}$ . 达峰时间;  $C_{max}$ . 达峰浓度;  $AUC_{0-\infty}$ . 0-∞内药时曲线下面积;  $V_z/F$ . 表观分布容积;  $CL/F$ . 清除率;  $AUMC_{0-\infty}$ . 0-∞内第一矩曲线下面积; MRT. 滞留时间, 同行数据不同字母代表差异显著( $P<0.05$ )  
Notes: RAP. correlation coefficient;  $\lambda_z$ . terminal phase rate constant;  $T_{1/2\lambda_z}$ . terminal half-life;  $T_{max}$ . time of peak;  $C_{max}$ . peak blood concentration;  $AUC_{0-\infty}$ . area under the blood concentration-time curve extrapolated from zero to infinity;  $V_z/F$ . volume of distribution;  $CL/F$ . clearance;  $AUMC_{0-\infty}$ . area under the first moment curve from zero to infinity; MRT. mean resident time. Value with the different letters in the row mean significant difference ( $P<0.05$ )

的方法, 计算准确、提供药动力学参数齐全<sup>[12]</sup>。但是其不能描述组织间浓度差异较大的生理系统, 且经常受到数学模型的限制, 药物给药方式、

给药次数、取血部位以及测定方法等都可能影响拟合模型, 具有一定的不确定性<sup>[13]</sup>。本实验采用非房室模型对2种给药方式下恩诺沙星在中华草龟体内的药时数据进行计算分析。非房室模型不受经典房室模型的限制, 仅仅假设药物末端以单指数消除, 其主要计算药时曲线下面积, 有较强的客观性和实用性, 可适用于大多数药物<sup>[12-14]</sup>。

血药浓度峰值( $C_{max}$ )、达峰时间( $T_{max}$ )和药时曲线下面积(AUC)是描述药物在动物体内的吸收速率和程度的重要药动力学参数。罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)肌注10 mg/kg恩诺沙星, 吸收迅速, 0.083 h达到 $C_{max}$  6.293 µg/mL, AUC为291.898 µg/(mL·h), 与血管给药相近<sup>[15]</sup>。大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)肌注20 mg/kg恩诺沙星, 0.5 h  $C_{max}$ 达21.717 µg/mL, AUC为390.452 µg/(mL·h)<sup>[16]</sup>。黄耳巴西龟(*Trachemys scripta scripta*)肌注10 mg/kg恩诺沙星, 2.6 h  $C_{max}$ 为10.36 µg/mL, AUC为308.769 µg/(mL·h), 分布广泛<sup>[7]</sup>。本实验中, 肌注恩诺沙星在中华草龟体内 $T_{max}$ (4 h)长,  $C_{max}$ 与AUC均显著低于上述水产动物。蠪龟(*Caretta caretta*)肌注10 mg/kg恩诺沙星, 20 h  $C_{max}$ 为4.1 µg/mL, AUC为261 µg/(mL·h), 吸收速率慢,  $C_{max}$ 偏低, AUC却显著高于本实验结果<sup>[9]</sup>。这可能是由于蠪龟和中华草龟虽同属龟鳖目(Chelonia), 但其生存环境差异大, 尤其是盐度完全不同, 导致药物代谢规律不同。

胃插管强制口服给药条件下, 恩诺沙星在中华草龟体内的吸收速率明显减慢, 12 h才达到最高血药浓度, 但其吸收效果显著提高,  $C_{max}$ 和AUC均显著高于肌注给药; 这一结果与其他水产动物存在较大差异。5 mg/kg恩诺沙星分别对巴西红耳龟(*T. scripta elegans*)肌注和口服给药,  $C_{max}$ 分别为6.28和3.44 µg/mL, AUC分别为75.01和59.91 µg/(mL·h)<sup>[8]</sup>; 拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)分别肌注和口服10 mg/kg恩诺沙星,  $C_{max}$ 分别为31.86和12.90 µg/mL, AUC分别为830.8和255.7 µg/(mL·h)<sup>[17]</sup>, 肌注给药均优于口服给药。

可见, 同一药物在不同的水产动物体内吸收规律差异明显, 主要原因可能是种属差异, 水产动物种类繁多, 龟鳖类属于爬行动物, 无论是生理结构还是生活习性都与其他鱼类、甲壳动物存在相当大的差异; 生存环境不同, 温度、盐度等对于水产动物体内药物代谢吸收有很大影响; 选择的房室模型不同, 拟合模型的不同

对于药动学参数产生一定的限制和影响, 药物在体内代谢过程复杂, 并不能统一简单划分为二室、三室等。

$T_{1/2\lambda z}$ 和MRT是描述药物在动物体内消除规律的主要参数。本实验中, 中华草龟肌注恩诺沙星后的消除半衰期远远大于鹅(2.364 h)<sup>[18]</sup>、眼斑拟石首鱼(*Sciaenops ocellatus*)(4.989 h)<sup>[19]</sup>、巴西红耳龟(17.64 h)<sup>[8]</sup>, 与蠪龟(37.8 h)<sup>[9]</sup>接近。中华草龟胃插管强制口服恩诺沙星后的消除半衰期为99.85 h, 也显著大于雏肉鸡(10.6 h)<sup>[20]</sup>、拟穴青蟹(26.45 h)<sup>[17]</sup>、巴西红耳龟(32.34 h)<sup>[8]</sup>, 与大菱鲆(99.137 h)<sup>[16]</sup>、大西洋鲑(*Salmo salar*)(105.1 h)<sup>[21]</sup>相近。可见, 恩诺沙星在中华草龟体内的代谢普遍慢于其他动物消除半衰期, 血药浓度保持时间长, 且胃插管强制口服给药消除半衰期显著慢于肌注, 与James等<sup>[8]</sup>的研究结果一致。

本实验中, 恩诺沙星在中华草龟体内胃插管强制口服给药MRT显著长于肌注给药, 196 h后仍能检测到, 进一步说明恩诺沙星在中华草龟体内代谢缓慢、滞留时间长, 与中华鳖和蠪龟代谢规律相似。中华鳖肌注恩诺沙星, 给药后24 h左右药时曲线逐渐平缓, 此后消除缓慢, 直到第26天仍可在中华鳖体内检测到恩诺沙星<sup>[11]</sup>。蠪龟肌肉注射恩诺沙星, 168 h后仍能在血液中检测到恩诺沙星<sup>[9]</sup>。

由此可见, 药物在水产动物体内代谢与消除规律十分复杂, 针对特定药物开展其在不同养殖动物体内的药代动力学研究非常重要; 在临床治疗中应注意不同品种, 制定不同给药量和间距。建议尽量避免持续性给药, 减少因药物在动物体内不断累积而引发的药源性疾病<sup>[22]</sup>。

### 3.2 龟鳖类药动学研究的连续采血法

血样采取是研究动物体内药物代谢动力学非常重要的一步。目前, 国内龟鳖药动学研究报道中, 血样的采取方式有多种。最常见的是断头一次性采血<sup>[23]</sup>与颈静脉采血<sup>[24]</sup>, 均为不同个体、大样本采血, 并未见关于同一个体、连续采血方法的报道。群体采血存在较大个体差异问题, 直接影响药动学数据, 增加实验结果误差。本实验参考国外对海龟采取的颈静脉、前肢静脉连续采血方法<sup>[25]</sup>, 结合中华草龟生理特性, 选取了颈静脉窦连续采血法。不仅减少了实验动物使用量, 更减少了个体差异性对结果

的影响, 保证了数据的准确性。

本实验中, 共计连续采血13次, 每次每只采血量为1 mL, 除个别出现食欲减退现象外, 未发现死亡个体, 实现了首次针对中华草龟的同一个体药物代谢动力学研究, 不仅减少了误差, 提高了准确性, 更为恩诺沙星在龟鳖体内的个体用药, 以及其他药物在龟鳖体内的药动学研究提供了参考。

### 3.3 液相色谱—串联质谱法应用评价

恩诺沙星作为水产和畜牧病害防治的常用药物, 对于其在动物体内的药物代谢动力学研究已有很多, 最为常见的测定方法为高效液相色谱法<sup>[26]</sup>。随着液相色谱-串联质谱法的不断发展, 其相较于液相色谱法的优势越来越明显。本实验中, 恩诺沙星色谱图显示其保留时间稳定在0.86 min, 显著短于液相色谱法6.86 min<sup>[27]</sup>, 更快捷。龟鳖类血浆基质相较于其他动物的更为复杂, 杂质较多。采用液相色谱法测定杂峰多, 影响判断。质谱仪可准确根据选定离子确定物质, 对色谱分离度要求降低, 准确性更高, 其检测限相比色谱法更低, 测定范围更广<sup>[28]</sup>。可见, 液相色谱—串联质谱法是更适宜的代谢动力学测定方法。

#### 参考文献:

- [1] 应翔宇, 杨永胜. 兽用新型抗菌药物——恩诺沙星[J]. 中国兽药杂志, 1995, 29(3): 53-56.  
Ying X Y, Yang Y S. Enrofloxacin, a new antimicrobial drug for veterinary use[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 1995, 29(3): 53-56(in Chinese).
- [2] Dowling P M, Wilson R C, Tyler J W, et al. Pharmacokinetics of ciprofloxacin in ponies[J]. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 1995, 18(1): 7-12.
- [3] Wetzstein H G, Schmeer N, Karl W. Degradation of the fluoroquinolone enrofloxacin by the brown rot fungus *Gloeophyllum striatum*: identification of metabolites[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(11): 4272-4281.
- [4] Parshikov I A, Freeman J P, Lay Jr J O, et al. Microbiological transformation of enrofloxacin by the fungus *Mucor ramannianus*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(6): 2664-2667.

- [5] Wetzstein H G, Schneider J, Karl W. Patterns of metabolites produced from the fluoroquinolone enrofloxacin by basidiomycetes indigenous to agricultural sites[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 71(1): 90-100.
- [6] 李改娟, 刘艳辉, 戴欣, 等. 同水温联合用药中恩诺沙星在鲤体内的药代动力学及残留的影响[J]. 吉林农业大学学报, 2017, 39(4): 471-476.
- Li G J, Liu Y H, Dai X, *et al.* Effecta of combined drug administration at different water temperature on pharmacokinetics and residues of Enrofloxac in carp[J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2017, 39(4): 471-476(in Chinese).
- [7] Giorgi M, Rota S, Giorgi T. Blood concentrations of enrofloxacin and the metabolite ciprofloxacin in yellow-bellied slider turtles (*Trachemys scripta scripta*) after a single intracoelomic injection of enrofloxacin[J]. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 2013, 22(2): 192-199.
- [8] James S B, Calle P P, Raphael B L, *et al.* Comparison of injectable versus oral enrofloxacin pharmacokinetics in red-eared slider turtles, *Trachemys scripta elegans*[J]. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 2003, 13: 5-10.
- [9] Richez P, Dellac B, Froyman R, *et al.* Pharmacokinetics of enrofloxacin in calves and adult cattle after single and repeated subcutaneous injections[M]//Lees P. Proceedings of the 6th EAVPT International Congress. Deinburgh, 1994: 233-234.
- [10] 李小玲, 黄向荣, 万译文, 等. 高效液相色谱—串联质谱法同时测定水产品中诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星[J]. 中国渔业质量与标准, 2013, 3(4): 25-30.
- Li X L, Huang X R, Wan Y W, *et al.* Simultaneous determination of norfloxacin, ciprofloxacin and enrofloxacin residues in aquatic products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2013, 3(4): 25-30(in Chinese).
- [11] 张乐, 刘超. 水产品体内血、肝、肾、肌肉中恩诺沙星及其代谢产物的测定研究[J]. 安徽农学通报, 2013, 19(1-2): 116-117.
- Zhang L, Liu C. Determination of enrofloxacin and its metabolites in blood, liver, kidney and muscle of aquatic products[J]. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 2013, 19(1-2): 116-117(in Chinese).
- [12] 田洋, 肖蓉, 杨兰兰, 等. 非房室模型统计矩原理分析角黄素在鸡体内的药代动力学特征[J]. 中国兽医杂志, 2014, 50(5): 82-84.
- Tian Y, Xiao R, Yang L L, *et al.* Pharmacokinetic of canthaxanthin in chicken by non-compartmental model[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2014, 50(5): 82-84(in Chinese).
- [13] 白耀武, 杨俊红, 王树华. 非房室模型统计矩方法测定妊娠晚期孕妇瑞芬太尼的药代动力学特点[J]. 河北医药, 2009, 31(18): 2382-2384.
- Bai Y W, Yang J H, Wang S H. Detection of pharmacokinetics of remifentanil at late trimester of pregnancy by using Rosenblueth method of non compartment model[J]. *Hebei Medical Journal*, 2009, 31(18): 2382-2384(in Chinese).
- [14] 王广基. 药物代谢动力学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 136-137.
- Wang G J. Pharmacokinetic[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 136-137 (in Chinese).
- [15] 钱云云, 唐俊, 郑宗林, 等. 恩诺沙星在罗氏沼虾体内的药物代谢动力学[J]. 动物学杂志, 2007, 42(5): 62-69.
- Qian Y Y, Tang J, Zheng Z L, *et al.* Pharmacokinetics of enrofloxacin in *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2007, 42(5): 62-69(in Chinese).
- [16] 梁俊平, 李建, 张喆, 等. 肌注和口服恩诺沙星在大菱鲂体内的药代动力学比较[J]. 水生生物学报, 2010, 34(6): 1122-1129.
- Liang J P, Li J, Zhang Z, *et al.* Pharmacokinetics of enrofloxacin in turbot (*Scophthalmus maximus*) after a single intramuscular and oral administration[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, 34(6): 1122-1129(in Chinese).
- [17] 周帅, 胡琳琳, 房文红, 等. 恩诺沙星及其代谢产物环丙沙星在拟穴青蟹体内的药代动力学[J]. 水产学报, 2011, 35(8): 1182-1190.
- Zhou S, Hu L L, Fang W H, *et al.* Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in mud crab (*Scylla paramamosain*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(8): 1182-1190(in Chinese).
- [18] 蒋智钢, 施飞. 恩诺沙星在鹅体内的药代动力学研究[J]. 中国兽医杂志, 2013, 49(9): 76-77, 79.
- Jang Z G, Shi F. Pharmacokinetics of enrofloxacin in geese[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2013, 49(9): 76-77, 79(in Chinese).

- [19] 简纪常, 吴灶和, 陈刚. 恩诺沙星在眼斑拟石首鱼体内的药物代谢动力学[J]. 中国兽医学报, 2005, 25(2): 195-197.  
Jian J C, Wu Z H, Chen G. Pharmacokinetics of enrofloxacin in *Sciaenops ocellatus*[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2005, 25(2): 195-197(in Chinese).
- [20] Bugyei K, Black W D, McEwen S. Pharmacokinetics of enrofloxacin given by the oral, intravenous and intramuscular routes in broiler chickens[J]. Canadian Journal of Veterinary Research, 1999, 63(3): 193-200.
- [21] Stoffregen D A, Wooster G A, Bustos P S, et al. Multiple route and dose pharmacokinetics of enrofloxacin in juvenile Atlantic salmon[J]. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 1997, 20(2): 111-123.
- [22] 陈彦伶, 牟群, 潘连德, 等. 中华鳖药源性肝病模型的构建及其病理学观察[J]. 大连海洋大学学报, 2013, 28(1): 61-66.  
Chen Y L, Mou Q, Pan L D, et al. Establishment of drug-induced liver disease model and pathological observation in soft shell turtle *Trionyx sinensis*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2013, 28(1): 61-66(in Chinese).
- [23] 朱利敏, 杨先乐, 林启存, 等. 肌注和口服氟苯尼考在中华鳖体内残留分析及药代动力学[J]. 水产学报, 2006, 30(4): 515-519.  
Zhu L M, Yang X L, Lin Q C, et al. The residues and pharmacokinetics of florphenicol in *Trionyx sinensis* following intramuscular injection and oral administration[J]. Journal of Fisheries of China, 2006, 30(4): 515-519(in Chinese).
- [24] 陈文银, 印春华. 诺氟沙星在中华鳖体内的药代动力学研究[J]. 水产学报, 1997, 21(4): 434-437.  
Chen W Y, Yin C H. Pharmacokinetic studies on norfloxacin in *Trionyx sinensis*[J]. Journal of Fisheries of China, 1997, 21(4): 434-437(in Chinese).
- [25] 成奇, 潘连德. 绿海龟健康幼体心肾功能血液生化指标参考值研究[J]. 上海海洋大学学报, 2016, 25(4): 534-540.  
Cheng Q, Pan L D. Research on the plasma biochemistry of cardiac function, liver function and renal function from healthy larval green turtles (*Chelonia mydas*) in captivity[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2016, 25(4): 534-540(in Chinese).
- [26] 郭娇娇, 潘红艳, 杨虎, 等. 恩诺沙星在杂交鲟体内的药物代谢动力学[J]. 大连海洋大学学报, 2011, 26(4): 362-366.  
Guo J J, Pan H Y, Yang H, et al. Pharmacokinetics of enrofloxacin in sturgeon *Acipenser schrenckii*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2011, 26(4): 362-366(in Chinese).
- [27] 李春雨, 李继昌, 卢彤岩, 等. 不同给药方式下恩诺沙星在鲤体内的药动学研究[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2009, 14(3): 234-239.  
Li C Y, Li J C, Lu T Y, et al. Pharmacokinetic of enrofloxacin in carp following different ways of administration[J]. Journal of Jimei University (Natural Science), 2009, 14(3): 234-239(in Chinese).
- [28] 何欣, 张海琪, 戴志远, 等. 头孢拉定、诺氟沙星及罗红霉素在中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)日本品系体内残留代谢的比较研究[J]. 海洋与湖沼, 2014, 45(4): 848-854.  
He X, Zhang H Q, Dai Z Y, et al. Comparative research of cefradine, norfloxacin and roxithromycin in Chinese soft-shelled turtles (*Pelodiscus sinensis*) Japanese strain[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45(4): 848-854(in Chinese).

## Pharmacokinetics of enrofloxacin in *Chinemys reevesii* by HPLC-MS/MS

MAO Lingyan, PAN Liande\*

(Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education,  
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** The pharmacokinetics of enrofloxacin in *Chinemys reevesii* was studied following intramuscular injection and oral administration by HPLC-MS/MS. Enrofloxacin is the third generation of quinolones and the first animal-specific drug. Now, it is also the commonly used drug for reptiles. *C. reevesii* is a common native turtles in China, it is not only used as medicine or food, but also for ornament. It is another economic turtle species in addition to *Trionyx sinensis*. As the scale of farming has expanded each year, disease problem have gradually highlighted, but the technical problems encountered in clinical medicine has become the bottleneck of industrial development. At present, enrofloxacin is often used in the treatment of diseases of *C. reevesii*, such as respiratory diseases and urinary system diseases. However, there are few reports about pharmacokinetic of enrofloxacin in *C. reevesii*, and this experiment filled the gap. In this experiment, 20 healthy Chinese pond turtles were selected from a farm in Wuxi, Jiangsu Province. All turtles were female. After holding for two weeks, they were selected and followed by a single dose of enrofloxacin (10 mg/kg) by intramuscular injection and forced oral administration (gastric intubation) respectively. Blood samples were collected continuously for the same subject 13 times from the jugular sinus. Samples were obtained and assayed by HPLC-MS/MS, and the corresponding pharmacokinetic parameters were calculated with non-compartmental models by Kinetic 4.4. The main pharmacokinetic parameters of forced oral administration were  $C_{max}$ : 7.49  $\mu\text{g/mL}$ ,  $T_{max}$ : 12 h,  $T_{1/2\lambda z}$ : 99.85 h and  $AUC_{0-\infty}$ : 531.67  $\mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{h})$ ; The main pharmacokinetic parameters of intramuscular injection were  $C_{max}$ : 5.85  $\mu\text{g/mL}$ ,  $T_{max}$ : 4 h,  $T_{1/2\lambda z}$ : 30.42 h and  $AUC_{0-\infty}$ : 193.6  $\mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{h})$ . The results showed that enrofloxacin was absorbed faster by intramuscular injection, but was absorbed better and comprehensively by forced oral administration in *Chinemys reevesii*. And the retention time of forced oral administration was longer. So in the control of Chinese turtle disease, enrofloxacin is more suitable for oral administration. When we need to quickly achieve the effect, intramuscular injection of enrofloxacin will be better. When we need to continue to administer and the turtle metabolic state is normal, it is recommended to use forced oral administration of enrofloxacin by gastric intubation.

**Key words:** *Chinemys reevesii*; enrofloxacin; pharmacokinetics; non-compartmental models; HPLC-MS/MS

**Corresponding author:** PAN Liande. E-mail: ldpan@shou.edu.cn

**Funding projects:** Shanghai Collaborative Innovation Center for Aquatic animal Genetics and Breeding (ZF1206)