

大口黑鲈肝细胞中恩诺沙星的消除及其代谢酶活性的测定

王翔凌, 杨先乐^{1,2}, 林茂³, 喻文娟¹, 张宁¹, 张书俊¹

(1. 上海水产大学农业部渔业动植物病原库, 上海 200090; 2. 上海高校水产养殖学 E-研究院, 上海 200090; 3. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

摘要:建立了反相高效液相色谱法检测大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 原代肝细胞中恩诺沙星 (Enrofloxacin, EF) 代谢情况的方法, 并通过其代谢产物环丙沙星 (Ciprofloxacin, CF) 来间接反映恩诺沙星 N-脱乙基酶的活性。采用二氯甲烷提取细胞中的药物, 正己烷去脂, 反相高效液相色谱法测定其中的药物浓度。经测得该方法样品回收率均大于 80.28%, 日间变异系数小于 5.54%。通过 EF 与大口黑鲈肝细胞进行孵育, 发现 EF 在细胞中的消除方程为 $C = 50e^{-0.0008t}$, 消除半衰期 ($T_{1/2}$) 为 86.63 h, 消除速率常数 (K) 为 $8 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$ 。对孵育过程中的酶活研究发现最佳孵育时间为 45 min, 其酶活性为 $0.25 \mu\text{g}/(\text{min} \cdot \text{mg})$, 酶动力学参数中最大反应速率 ($V_{\max}$) 为 $0.29 \mu\text{g}/(\text{min} \cdot \text{mg})$, 米氏常数 (K_m) 为 $22.37 \mu\text{g}/\text{mL}$, 内在清除率 (C_{int}) 为 $0.01 \text{ mL}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ 。结果表明, 该酶与底物结合力不强, 酶促反应强度较弱, EF 在大口黑鲈肝细胞中的代谢较缓慢。[中国水产科学, 2007, 14 (6): 1 004–1 009]

关键词: 大口黑鲈; 肝细胞; 恩诺沙星; 反相高效液相色谱法; 消除; 酶活

中图分类号: S94

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2007)06-1004-06

细胞色素 P450 是肝微粒体混合功能氧化酶中最重要的一族, 在外源性和内源性物质代谢中起着极其重要的作用^[1-2]。恩诺沙星 (Enrofloxacin, EF) 的代谢反应为典型的 P450 酶代谢反应^[3], 代谢酶为 N-脱乙基酶, 其主要活性代谢产物为环丙沙星 (Ciprofloxacin, CF) (图 1)^[4]。EF 作为第三代氟喹

诺酮类药物, 由于其广谱抗菌特性, 曾在兽医和水产上得到了广泛的应用^[5]。目前该药由于其残留问题, 在有些水产动物体内已被禁用, 因此关于该药在水产动物体内的代谢及消除问题已经引起了人们的重视。

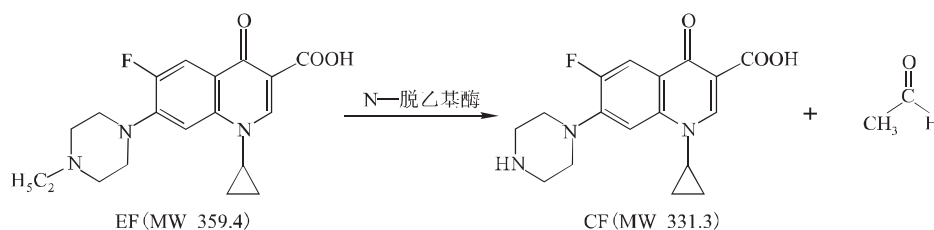


图 1 EF 的氧化脱乙基

Fig. 1 Oxidative deethylation of EF

目前对药物残留问题的研究主要是通过其在动物体内的代谢情况来反应, EF 在家禽、家畜以及海水鲈体内的代谢研究已有报道^[3-6], 而在体外研究 EF 的代谢及其代谢酶的活性从而能够省时经济地反应药物的残留状况目前尚未见报道。有关体外测

定 P450 酶活性的报道多数是以肝微粒体为反应体系^[7-8], 但用靶动物大口黑鲈的肝细胞进行药物代谢的研究尚未见报道。在细胞中研究药物代谢及相关酶活能够排除体内各种因素对该研究的影响, 全面真实地反应药物代谢, 因此本实验采用反相高效

收稿日期: 2007-04-21; 修订日期: 2007-07-20.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30371109); 上海市教委 E-研究院建设资助项目 (E03009); 上海市重点学科建设资助项目 (Y1101).

作者简介: 王翔凌 (1979-), 女, 博士研究生, 主要从事水产动物疾病与药理学研究. Tel: 021-65710870, E-mail: nancywxl@eyou.com

通讯作者: 杨先乐. Tel: 021-65710503; E-mail: xlyang@shfu.edu.cn

液相色谱(RP-HPLC)法测定了抗菌药物EF在大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)肝细胞中代谢情况从而间接反映代谢酶的活性,并建立了N-脱乙酰酶的基础酶活模型,同时该研究也能够为该酶所属的P450家族或亚家族的酶活研究提供理论基础,为水产品的药物残留监控提供理论基础,对该酶的实际应用方面具有一定的指导意义。

1 材料和方法

1.1 材料

大口黑鲈原代肝细胞,由本实验室(农业部渔业动植物病原库)其他人员协助提供,以M199与L15混合培养基(1:1)置于28℃、5%CO₂下培养。

1.2 药品及试剂

EF标准品(含量98%),CF标准品(含量99.03%),均由SIGMA公司提供;二氯甲烷、正己烷、四丁基溴化铵、氯化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸、肝素钠等均为国产分析纯,由中国医药集团上海化学试剂有限公司提供;乙腈为美国Fisher色谱纯。

1.3 高效液相色谱仪及色谱条件

Agilent 1100型高效液相色谱(HPLC)仪(色谱柱类型:ZORBAX SB-C₁₈, 4.6×150 mm, 5 μm);可变波长紫外检测器;流动相:乙腈:pH 7.4 磷酸钠缓冲液(含0.5%四丁基溴化铵)=5:95(V/V),用H₃PO₄调pH至3.0,过滤脱气后现用;流速1.0 mL/min;柱温40℃;紫外检测波长276 nm;进样量20 μL。

1.4 制样方法

取细胞,倒掉培养基,用D-Hank's液轻洗细胞2~3次,不要破坏细胞层。将细胞轻轻吹打后用D-Hank's液稀释成一定浓度,计数。参考王翔凌等^[9]所报道的该类药物的提取方法,取1 mL该细胞于离心管中加入一定量的所需浓度的EF或CF,将制得的细胞样品于漩涡混合器上混合2 min,再根据所取细胞量按1:4(V/V)分别加入二氯甲烷,混合2 min,液体快速混合器上中速混合10 min, 8 000 r/min离心10 min,弃去上层水相,将下层有机相倒入7 mL具塞离心管中,将残渣再次加入以上试剂,试剂量减半,重复以上操作步骤,进行第二次萃取,合并两次有机相,用样品蒸干仪在45℃恒温中蒸干。蒸残物用0.5 mL流动相溶解,漩涡混合器上混匀2 min,加入1 mL正己烷去脂,液体快速混合器上混匀10 min, 8 000 r/min离心10 min,吸取下层液体

20 μL进样,进行HPLC测定。

1.5 定量方法的建立

1.5.1 标准曲线的制备及线性范围的测定 将一系列不同浓度的EF或CF标准液依次加入到各空白细胞中,制得含药物质量浓度分别为0.02、0.05、0.1、0.5、2.5、5、10、20、50、100、200 μg/mL的细胞样品,按1.4中所述方法制样,进行HPLC检测。以药物标准品在空白样品中的质量浓度(C_i)为横坐标,以药物峰面积(A_i)为纵坐标,分别绘制EF和CF在细胞中的标准曲线并且得出回归方程,根据各样品标准曲线的相关系数估计细胞样品中EF和CF定量的线性范围。

1.5.2 最低检测限(LOD)的测定 将细胞样品标准曲线范围内的最低浓度的EF和CF标准液依次稀释成呈梯度降低的一系列标准液并加入到空白细胞样品中,按1.4中所述方法制样,进行HPLC检测。以信噪比≥3的最低浓度作为样品中EF和CF的最低检测限(LOD)。

1.5.3 回收率和变异系数的测定 取空白样品,添加适量药物标准液,配制成分别含EF或CF浓度为0.02、20、200 μg/mL的细胞样品,日内每个浓度设置5个样品(日内),在不同时间重复以上操作5次(日间),进行HPLC检测。分别求得细胞样品中EF或CF峰面积A,可得日内变异系数(Intra-day CV)和日间变异系数(Inter-day CV)。同时将一定量的标准液用流动相配成对应的水平做HPLC分析,可得以上6种浓度的EF或CF标准液的峰面积(B)。根据公式A/B×100%即可得各空白样品中添加EF或CF的回收率(Recovery)。

1.6 大口黑鲈原代肝细胞中恩诺沙星的代谢及脱乙酰酶活的测定

1.6.1 大口黑鲈原代肝细胞的获取 参照文献[10]的方法,待培养的大口黑鲈原代肝细胞状态良好时,倒掉原有的培养基,用pH 7.4的PBS缓冲液清洗2~3遍,刮取细胞,加入适量PBS缓冲液,500 r/min,离心5 min,弃上层,下层用pH 7.4的缓冲液将细胞稀释到密度约2×10⁶ ind/mL,即可用于实验。

1.6.2 恩诺沙星的体外温孵实验 在状态良好的大口黑鲈原代肝细胞中加入EF的标准品,使其终浓度为50 μg/mL,37℃摇床振荡,分别孵育0、15、30、45、60、90 min;另取细胞与浓度为5、10、20、50、100 μg/mL的EF共孵育45 min。每点设5个平行样,按1.4中所述方法制样,测得孵育后EF和CF

的峰面积,每个时间点设 5 个平行样,按 1.4 中所述方法制样,进行 HPLC 检测,根据标准曲线计算 EF 和 CF 浓度。Lowry 法^[11]测定细胞中蛋白含量,则 EF 脱乙酰酶的活性以酶促反应速率,即每 mg 蛋白单位时间内的 CF 生成量 [$\mu\text{g}/(\text{min}\cdot\text{mg})$]表示。

1.7 数据处理

数据处理中利用 SPSS (11.5) 进行显著性分析,采用 one-way ANOVA (单因素方差分析) 中的 Duncan 检验进行多重比较,当 $P<0.05$ 时认为差异显著。消除方程采用 $C_i = C_0 e^{-kt}$ 公式经非线性过程处理, C_i 表示药物浓度, C_0 表示初始浓度, k 表示消除速率常数。药酶反应动态图采用 Excel 软件绘制;参照林茂等^[12]所采用的 Lineweaver-Burk 方程式作图反映药酶动力学,并计算酶动力学参数,其公

式为:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}, C_{\text{int}} = \frac{V_{\max}}{K_m}$$

其中 K_m 为米氏常数, $V_{\max}$ 为最大反应速率, C_{int} 为内在清除率。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的确定

优化流动相组成、pH 和流速等条件后, EF 和 CF 药物峰形较好且能完全分离,并且与杂质峰完全分开。CF 保留时间在 4.91 min 左右, EF 保留时间在 6.73 min 左右,空白样品提取液在上述保留时间无干扰峰出现 (图 2)。

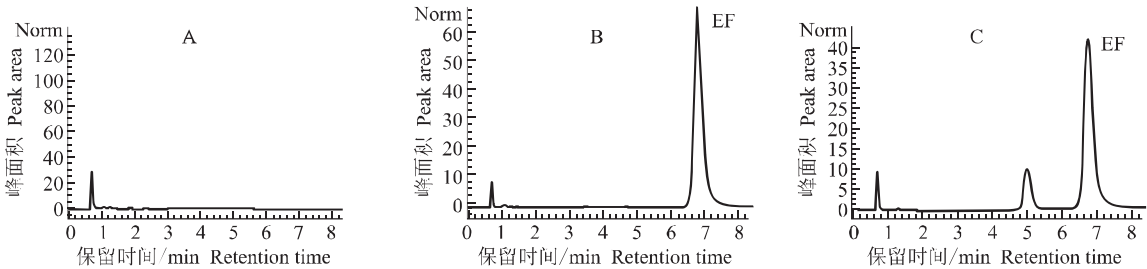


图 2 恩诺沙星 (EF) 及环丙沙星 (CF) 在大口黑鲈肝细胞中的色谱图

A: 空白细胞提取液; B: 含 EF 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的细胞提取液; C: EF 与细胞孵育 45 min

Fig.2 HPLC chromatogram for EF and CF in *Micropterus salmoides* hepatocytes

A: HPLC chromatogram from cells free of EF and CF; B: HPLC chromatogram of EF (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) extracted from cell; C: HPLC chromatogram of EF incubated with cell for 45 minutes.

2.2 定量方法

2.2.1 标准曲线及线性范围 标准曲线的药物浓度线性范围、回归方程及相关系数如下 (A_i 表示药物与内标峰面积比, C_i 表示药物标准品在空白细胞中的浓度): EF 0.02~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $A_i = 140.13C_i - 57.48$, $R = 0.9999$; CF 0.02~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $A_i = 95.78C_i - 93.15$, $R = 0.9998$ 。

2.2.2 最低检测限 (LOD) 经测得 EF 在细胞中

的 LOD 为 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$, CF 在细胞中的 LOD 为 0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.2.3 回收率和变异系数 按 1.4 制样方法操作后,由表 1 可见。测得各样品中平均回收率均大于 (80.28 $\pm$ 4.44) %,测得的日内变异系数不大于 5.13%,日间变异系数不大于 5.54%。所得数据表明此方法的重现性好,精密度高。

表 1 空白细胞中添加 EF 和 CF 时回收率及变异系数

Tab.1 Recoveries and CV of EF and CF to *Micropterus salmoides* Hepatocytes $n = 5; \bar{X} \pm \text{SD}; \%$

质量浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	EF			CF		
	回收率 Recovery rate	变异系数 CV		回收率 Recovery rate	变异系数 CV	
		日内	日间		日内	日间
		Intra-day	Inter-day		Intra-day	Inter-day
0.02	82.70 ± 4.44	4.07	5.37	80.28 ± 4.44	5.13	5.54
20	83.19 ± 4.37	3.44	5.25	85.88 ± 4.66	4.34	5.43
200	91.54 ± 4.24	3.11	4.63	90.73 ± 3.60	3.27	3.97

2.3 恩诺沙星体外温孵的结果

2.3.1 恩诺沙星在大口黑鲈肝细胞中的消除 EF与大口黑鲈原代肝细胞孵育一定时间后, (C_{EF})和(C_{CF})的量随孵育时间的变化情况即药时曲线如图3,可知EF的量随孵育时间的延长在由快到慢的降低,而CF的生成量则是在由快到慢的升高,到90 min时二者几乎趋于平稳状态,但二者在大口黑鲈肝细胞中的变化均为非线性,曲线拟合得消除方程为 $C = 50e^{-0.0008t}$, 相关指数 (R^2) 为 0.71, 消除速率常数 (K) 为 $8 \times 10^{-4} h$, 消除半衰期 ($T_{1/2}$) 为 86.63 h。

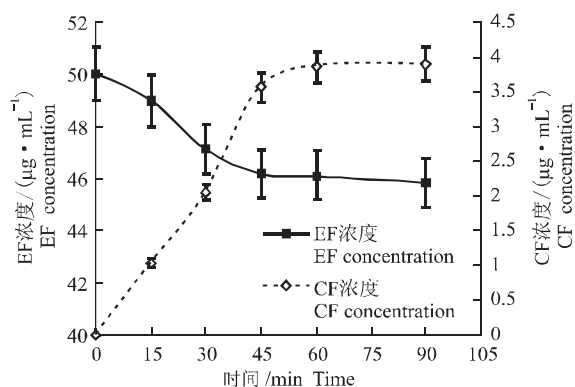


图3 大口黑鲈肝细胞中EF代谢的药时曲线 ($n=5$, $\bar{X} \pm SD$)

Fig.3 Concentration of EF time curve in *Micropterus salmoides* hepatocytes ($n=5$, $\bar{X} \pm SD$)

2.3.2 孵育时间对恩诺沙星脱乙基酶活的影响

底物EF与大口黑鲈原代肝细胞孵育后,其代谢该药物的酶EF脱乙基酶的活性随孵育时间的变化如图4所示。

可看出虽然随着孵育时间的延长,CF的生成量在升高,但升高的速度却在变小,因此由酶活性公式可知其酶活却在降低,尤其在45 min后下降较明显。通过显著性比较分析可看出当孵育时间为45 min时,其酶活性最高为 $0.25 \mu g / (min \cdot mg)$ 。因此可知在该条件下底物与细胞孵育的最佳时间为45 min。

2.3.3 恩诺沙星在大口黑鲈肝细胞中的酶动力学

EF与大口黑鲈原代肝细胞孵育45 min后,通过HPLC法检测EF剩余浓度(C_t)和CF生成量(C_n),根据Lineweaver-Burk作图,其酶促反应动力学方程为: $1/V = 78.35 \times 1/[S] + 3.5017$ ($R^2 = 0.9211$),

如图5。根据方程计算酶动力学参数,其最大反应速率 V_{max} 为 $0.29 \mu g / (min \cdot mg)$, 米氏常数 K_m 为 $22.37 \mu g / mL$, 内在清除率 C_{int} 为 $0.01 mL / (min \cdot mg)$ 。

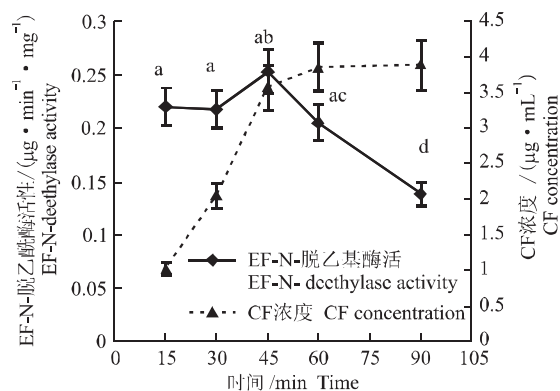


图4 大口黑鲈肝细胞中EF-N-脱乙基酶的酶活与CF浓度曲线 ($n=5$, $\bar{X} \pm SD$)

Fig.4 The curve for EF-N-deethylase activity and CF concentration in *Micropterus salmoides* hepatocytes ($n=5$, $\bar{X} \pm SD$)

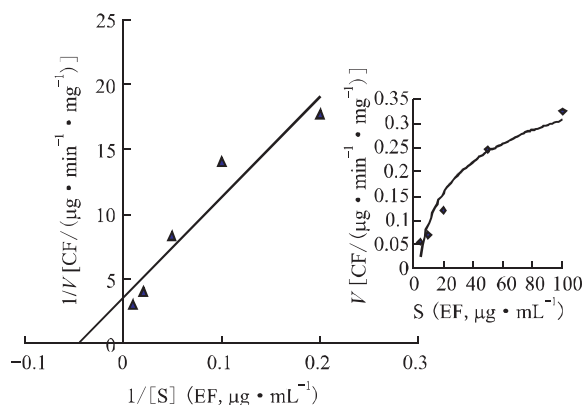


图5 大口黑鲈肝细胞中EF脱乙基酶的lineweaver-Burk作图 ($n=5$, $\bar{X} \pm SD$)

Fig.5 The lineweaver-Burk plot for EF deethylase activity in *Micropterus salmoides* hepatocytes ($n=5$, $\bar{X} \pm SD$)

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

在色谱条件的确定中,流动相的组成曾尝试选用过甲醇,但是基线不易平稳,并且柱压较高,不利于测样。通过对EF标准液在HPLC上进行波谱扫描发现其最大吸收波长为276 nm,因此本实验条件下选定276 nm做为紫外检测波长。在流动相的配比中也做

了不少的尝试,直至两峰得到良好分离。由于EF是两性物质,在流动相中易解离,对组份的保留时间和峰形都会造成不良影响,在流动相中加入四丁基溴化铵,用以消除色谱柱中十八烷基键合硅胶的硅羟基对EF碱性基团的吸附作用,同时将流动相pH调至3.0左右,以抑制药物解离或改变峰形。

3.2 研究体系的选择及药物的分离提取及检测

药物体外代谢的研究中反应体系的选择是影响结果准确性的首要因素,目前为止,主要用到的有亚细胞结构、cDNA表达的P450酶以及肝细胞和肝切片等,但经过与文献[13-14]比较发现,由于肝细胞技术的发展,使用完整的细胞进行研究能够更加符合药物在体内的代谢情况,从而更加准确地推测药物在体内的实际代谢,也使得肝细胞在体外代谢方面有了一定的应用。因此本实验中选用的是的优于鱼的肝微粒体等亚细胞结构或其他反应体系的肝细胞来研究药物代谢,更能反应真实情况。

实验过程中曾用甲醇、乙腈或三氯醋酸直接提取,回收率均不够理想且杂质较多。本实验最终采用了二氯甲烷作为萃取剂,去除细胞中蛋白的效果较好且回收率、变异系数等均能符合要求,且二氯甲烷沸点较低(40℃),极易吹干,因此二氯甲烷是较理想的萃取剂。另外在样品吹干后,将其浓缩2倍,以降低药物在细胞中的最低检测限。

3.3 恩诺沙星在大口黑鲈肝细胞中的代谢

EF与大口黑鲈肝细胞温孵后,从HPLC图上可见EF被迅速代谢形成代谢物CF,随着时间的延长,EF在大口黑鲈肝细胞中呈非线性消除,与此同时其脱乙基代谢物CF呈非线性增加,当给药后90 min时,CF几乎处于饱和状态。Intorre等^[3]研究了EF在黑鲈体内代谢及消除情况,发现在体内的代谢产物同样为CF,说明代谢该药物的P450酶活性在体内外存在一致性。另外,体内研究发现代谢产物CF主要出现在肝脏中,其次是血浆中,而皮肤和肌肉很少出现,说明该代谢酶主要存在于肝脏中,因此选取该酶含量较高的肝细胞作为体外实验材料,具有一定的可操作性。EF在体外的消除半衰期为86.63 h,而在体内的消除半衰期为25 h,体内消除速率常数为0.03/h,体外消除速率常数为 8×10^{-4} h,体内外药物的消除速度存在着一定的差别,差别的存在是由于多种因素造成的,如体内外环境的差异、体内给药的剂量以及体外药物与细胞孵育时的浓度等,因此关于体内外药物代谢的相关性

尚需大量的实验来验证或推断,以使体外实验更具有实际意义。体外研究方法便于控制,操作简便,代谢体系较纯净,易于对代谢产物进行分离提取,可以在较短的时间内得到较为明确的结果,适用于非常重要的I相代谢产物的研究,能够为药物的结构改造及临床给药^[15]提供依据。

3.4 EF在细胞中的代谢及其基础酶活模型

本试验中,选用鱼类常用抗菌药EF来研究其代谢活性,不仅为该药在细胞内的代谢提供了一定的价值,而且通过测定细胞中蛋白含量后,用EF的代谢产物CF的产量来反映酶活性的方法简单易行,是测定P450酶活性所常用的方法。关于P450酶的活性的诱导和抑制已引起医药界的关注^[15],建立一种高效而简便的酶活性检测方法尤为重要。

EF与大口黑鲈在37℃下振荡,孵育时间为45 min,其酶活最高,因此在该条件下可选定最佳孵育时间为45 min。通过对酶动力学研究发现V_{max}为0.29 μg/(min·mg),内在清除率C_{int}为0.01 mL/(min·mg),说明该酶在大口黑鲈肝细胞中的基础酶活一般,由于药物间代谢的相互作用是影响药物在体内浓度水平的一个重要因素^[16],因此关于对该酶的诱导和抑制的作用有待于进一步的研究。

有研究初步证实EF脱乙基酶属于CYP3A亚家族^[17],该家族的P450酶不仅可代谢一些内源性激素(如氢化考的松、雌激素等)和某些饮食中的有害污染物,还参与了许多环境致癌剂以及包括多种常用化疗药物在内的人体中50%以上的药物代谢^[18-19],因此通过对EF脱乙基酶的基础酶活模型的研究能够为该代谢酶所属的P450家族或亚家族作为环境毒理学的生物标志物和水域环境的指示剂的研究提供一定的理论基础;另外通过该药在细胞中代谢的研究能够了解该药在水产动物体内作用机理与消除规律,进而对该药的残留监控有一定的指导意义。

参考文献:

- [1] Meyer U A. Overview of enzymes of drug metabolism[J]. Pharmacokinetic Biopharm. 1996, 24 (5): 449-459.
- [2] Steven A W, Mark V B, Barbara J R. The human drug metabolizing cytochromes P450[J]. Pharmacokinetic Biopharm. 1996, 24 (5): 461.
- [3] Intorre L, Cecchini S, Bertini S, et al. Pharmacokinetics of enrofloxacin in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) [J]. Aquaculture, 2000, 182: 49-59.

- [4] Dunnett M, Richardson D W, Lees P. Detection of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in equine hair [J]. Res Vet Sci. 2004, 77: 143 – 151.
- [5] Brown S A. Fluoroquinolones in animal health [J]. J Vet Pharmacol Therapy, 1996, 19: 1 – 14.
- [6] Mayeaux M H, Winston G H. Antibiotic effects on cytochrome P450 content and mixed-function oxygenase MFO activities in the American alligator *Alligator mississippiensis* [J]. J Vet Pharmacol Therapy, 1998, 21: 274 – 281.
- [7] Sherry K C, Hamner T, Joe B. Determination of 6-hydroxychlorzoxazone and chlorzoxazone in porcine microsome samples [J]. J Chromatogr, 2003, 784B: 111 – 116.
- [8] Kristen L, Crivello W J. Effects of starvation on liver microsomal P450 activity in juvenile *Pleuronectes americanus* [J]. Comp Biochem Physiol, 1999, 123C: 273 – 277.
- [9] 王翔凌, 方之平, 操继跃, 等. 盐酸沙拉沙星在鲫体内的残留及消除规律研究 [J]. 水生生物学报, 2006, (30)2: 198 – 203.
- [10] 喻文娟, 杨先乐, 唐俊, 等. 大口黑鲈肝细胞原代培养方法的建立 [J]. 上海水产大学学报, 2006, 15 (6): 430 – 435.
- [11] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. Biol Chem. 1951, 193 (1): 265 – 75.
- [12] 林茂, 杨先乐, 王翔凌, 等. 草鱼肝细胞中恩诺沙星脱乙基代谢的酶动力学 [J]. 高技术通讯, 2006, 16 (12): 38 – 42.
- [13] Elkins S, Ring B J, Grace J, et al. Present and future *in vitro* approaches for drug metabolism [J]. J Pharmacol Toxicol, 2000, 44 (1): 313.
- [14] Rodrigues A D. Drug – drug interactions [M]. New York: Marcel Dekker Inc, 2002: 217 – 294.
- [15] Adedoyin A, Frey R F, Mauro K, et al. Chlorquine modulation of specific metabolizing enzymes activities: investigation with selective five drug cocktail [J]. Br J Clin Pharmacol, 1998, 46: 215 – 219.
- [16] Nakajima M, Inoue T, Shimada N, et al. Cytochrome P450C9 catalyzes indomethacin o-demethylation in human liver microsomes [J]. Drug Metab Dispos, 1998, 26 (3): 261 – 266.
- [17] Vaccaro E, Giorgi M, Longo V, et al. Inhibition of cytochrome P450 enzymes by enrofloxacin in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) [J]. Aquat Toxicol, 2003, 62: 27 – 33.
- [18] Ingelman-Sundberg M. Implications of polymorphic cytochrome p450 – dependent drug metabolism for drug development [J]. Drug Metab Dispos, 2001, 29 (4 Pt 2): 570 – 573.
- [19] Keshava C, McCanlies E C, Weston A. CYP3A4 polymorphisms potential risk factors for breast and prostate cancer: a HuGE review [J]. Am J Epidemiol, 2004, 160 (9): 825 – 841.

Elimination of enrofloxacin and detection of metabolic enzyme activity in *Micropterus salmoides* hepatocytes

WANG Xiang-ling¹, YANG Xian-le^{1,2}, LIN Mao³, YU Wen-juan¹, ZHANG Ning¹, ZHANG Shu-jun¹

(1. Aquatic Pathogen Collection Center of Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China; 2. E-Institute of Shanghai Municipal Education Commission, Shanghai 200090, China; 3. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: In order to study the metabolism of enrofloxacin (EF) and reflect the EF deethylase activity, Enrofloxacin (EF) and ciprofloxacin (CF) in *Micropterus salmoides* hepatocytes were detected by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). The medicine was extracted by dichloromethane from cell and the cell was degreased by hexane. The mean recovery rates were higher than 80.28% and inter-day CV were all lower than 5.54% for all samples. When EF was incubated with *Micropterus salmoides* hepatocytes, the elimination equations for EF was $C = 50e^{-0.0008t}$, elimination half life ($T_{1/2}$) and elimination rate constant (K) were 86.63 h and 8×10^{-4} /h respectively. The best incubation time was 45 min and the highest enzyme activity was $0.25 \mu\text{g}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ at that time. Enzymatic parameters of maximum rate (V_{max}) was $0.29 \mu\text{g}/(\text{min} \cdot \text{mg})$, the michaelis constant (K_m) and internal clearance rate (C_{int}) were $22.37 \mu\text{g}/\text{mL}$ and $0.01 \text{ mL}/(\text{min} \cdot \text{mg})$, respectively. The results showed that the affinity between EF and EF deethylase enzyme in *Micropterus salmoides* hepatocytes and the intensity for enzymatic reaction were very low. In additional, the metabolism for EF *in vitro* was slow. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (6): 1 004 – 1 009]

Key words: *Micropterus salmoides*; hepatocytes; enrofloxacin; RP-HPLC; elimination; enzyme activity

Corresponding author: YANG Xian-le. E-mail: xlyang@shfu.edu.cn