维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2001)01-0072-02

高效液相色谱法测定4株肠道杆菌胞内环丙沙星浓度

贾　蓓[1]，钱元恕[1]，来晓云[2]

（1. 重庆医科大学临床学院传染科　重庆　400016；2. 四川省安县63839部队门诊部　安县　622663）

【摘　要】目的：建立用反相高效液相色谱法（HPLC）测定肠道杆菌胞内药物浓度的方法。方法：将待测肠道杆菌与环丙沙星在37℃振荡温育，不同时段各取出1ml菌液超声裂解，取上清以HPLC法测定浓度，以ODS-C18作固定相，流动相组成为甲醇/0.008M磷酸缓冲液/四丁基溴化铵（25:75:4. v/v/v），荧光检测激发波长278nm，发射波长445nm。结果：最低检出限0.06mg/L，线性范围0.154～12.5mg/L，r=0.9997，日内精密度2.66%，日间精密度4.15%。摄取曲线表明各菌株在10min处达最大峰浓度。结论：高效液相色谱法测定细菌胞内药物浓度能更好的避免干扰，准确检测药物浓度，可用于氟喹诺酮类药物耐药机制的研究。

【关键词】高效液相色谱法；肠道杆菌；药物摄取

【中国图书分类法分类号】R978.1　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2000-04-05

High performance liquid chromatography(HPLC) assay for ciprofloxacin uptake by 4 strains of enteric bacilli

JIA Bei, et al

(Department of Infectious Diseases, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University, 400016)

【Abstract】 *Objective*: A reversed-phase high performance liquid chromatographic method was described for the determination of ciprofloxacin (CPLX) in 4 strains of enteric bacilli. *Methods*: Ciprofloxacin was added to the bacterial suspension, and the culture was incubated at 37 ℃ with shaking. At appropriate time intervals 1ml samples were removed and treated by ultrasonic wave. The concentration of CPLX in the supernatants was measured by HPLC assay. Samples were analysed on an ODS-C18 column with a mobile phase of methand-0.008M phosphate buffer -0.5M tetrabulylammonium bromide (25:75:4,v/v/v). A fluorescence detecter was used. Excitation and emission wavelenth were 278nm , 445nm, respectively. *Results*: The detection limit was 0.06mg/L. Good linearity was obtained in the concentration range from 0.154 to 12.5mg/L with the correlation coefficient (r= 0.9997). The variant rates of within-day and day- to- day were 2.66% and 4.15% respectively. The uptake curve showed that all strains attained peak concentration at 10 minutes. *Conclusion*: HPLC assay for CPLX uptake by enteric bacilli is better for measuring drug concentrations because of lesser interference from other bioactive substances in cell extracts. So it may be a good way to study of fluoroquinolone resistant mechanisms.

【Key words】 HPLC; Enteric bacilli; Drug uptake

氟喹诺酮类药物在细菌胞内积聚减少是其重要的耐药机理之一[1]，测定其胞内浓度是关键步骤，我们建立了以反相高效液相色谱法（HPLC）测定肠道杆菌胞内浓度的方法。

1　材料与方法

1.1　菌株

2株奇异变形杆菌，1株阴沟杆菌，1株粘质沙雷杆菌均由重庆医科大学临床学院抗生素研究室分离鉴定。对环丙沙星的最低抑菌浓度（MIC）分别为0.125，0.25，0.5mg/L。

1.2　仪器

美国PE公司LC-100型高效液相色谱仪（HPLC），日本岛津公司产微量进样器，上海超声波仪器厂产超声波清洗机，江苏太仓医用仪器厂产SHZ-22型水浴恒温振荡器，美国Virsonic 300型超声波细胞破碎仪。

1.3　试剂

环丙沙星（ciprofloxacin, CPLX，上海制药二厂生产）。甲醇（重庆东方试剂厂生产），四丁基溴化铵（上海试剂一厂生产），磷酸二氢钾，磷酸二氢钠（天津化学试剂厂产品），均为分析纯。

1.4　标本制作

作者介绍：贾　蓓（1971-　），女，住院医师，硕士

维普资讯 http://www.cqvip.com

参照文献[2]加以修改，过夜孵育活化待测菌倒入200ml培养基中37℃过夜振荡温育，低速离心10min收获沉淀，称重并以0.05mol/L的磷酸缓冲液(PBS, pH7.0)稀释达湿菌重40mg/ml，加入环丙沙星使其终浓度为10mg/L，37℃振荡水浴中温育，并从温育开始起1、2、5、10、15、25、35min时各取菌液1ml，5000g离心2min，取菌体用PBS冲洗表面2次，悬浮于2ml PBS中超声裂解（60s破碎+60s间隔，强度12kHz，共8次）离心去碎片，取50μl上清加入150μl甲醇沉淀蛋白质，离心保留上清转于另一离心管，以HPLC法测定环丙沙星浓度，每个标本进样40μl，共3次。

1.5 色谱条件

中国科学院大连色谱中心产(Polygosil) ODS-C18反相色谱柱（250mm×4.6mm, 10μm），流动相组成为甲醇/0.008M磷酸缓冲液/四丁基溴化铵(25:75:4, v/v/v)，经抽滤，脱气，最终pH2.74，流速0.8ml/min，室温，衰减2；RF-53F荧光检测仪检测，激发波长278nm，发射波长445nm，保留时间9.8min，记录纸速15cm/h，

1.6 标准曲线制备

精确称取环丙沙星10mg，用容量瓶精确配制成100mg/L标准溶液，然后准确稀释成12.5、6.25、3.125、1.56、0.78、0.346和0.154mg/L的系列溶液，各取50μl与甲醇按1:3混合后，准确进样40μl各3次，以峰高与药物浓度绘制标准曲线。

1.7 精密度试验

准确配制10mg/L的环丙沙星溶液，一日内重复进样5次，计算日内精密度。含环丙沙星的甲醇溶液，每天分析一次共5次，计算日间精密度。

2 结 果

2.1 色谱图

甲醇的保留时间为3.4min，环丙沙星的保留时间为9.8min，各成份分离较好，分离度R>1。

2.2 标准曲线

在0.154～12.5mg/L范围内，峰高与CPLX浓度呈线性关系，r=0.9997，以峰高为横坐标，以环丙沙星浓度为纵坐标，建立回归方程，y=-0.042+1.545x。

2.3 精密度

日内精密度CV%=2.66%，日间CV%=4.15%。

2.4 各细菌对环丙沙星的摄取曲线（图1～4）

摄取曲线表明各菌株在10min处摄取达最大峰浓度，且各菌株胞内CPLX浓度均高于1mg/L（CPLX的临界耐药浓度）。沙雷杆菌和阴沟杆菌对环丙沙星摄取量少于奇异变形杆菌。

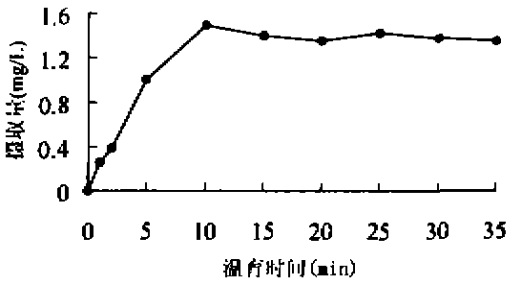


图1 奇异变形杆菌76对环丙沙星的摄取曲线
-----环丙沙星的临界耐药浓度下图同

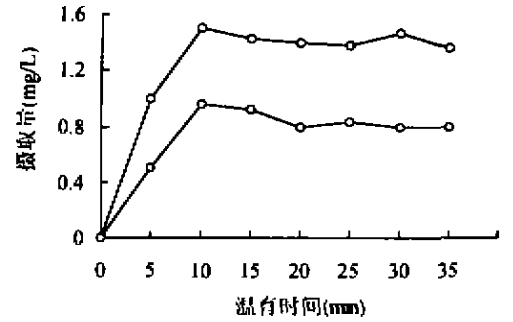


图2 奇异变形杆菌93对环丙沙星的摄取曲线

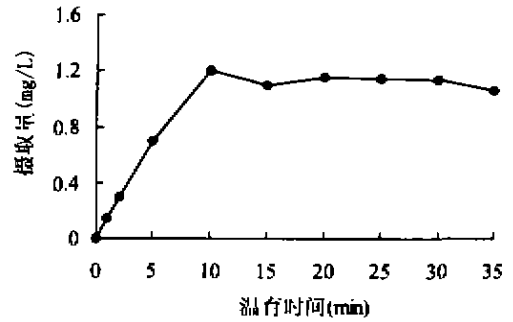


图3 沙雷杆菌对环丙沙星的摄取曲线

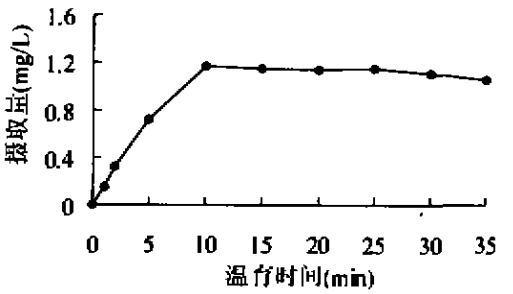


图4 阴沟杆菌对环丙沙星的摄取曲线

3 讨 论

由于细菌细胞对药物摄取量很少，且破碎细胞

(下转第77页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

检出率为92.3%，略高于文献报导的EEG检出率(76.4%)[5]。可以看出，由于AEEG昼夜24h长时间监测，对于癫痫这种发作性疾病捕捉到阳性放电的机率远远高于常规脑电图（EEG一般记录20min）。(2)112例术后癫痫发作只有28例。虽然本组病例术中未应用皮层电极监测，但术后癫痫症状消除效果满意（75.0%）。Goldring认为[6]对确定的病灶不需要作皮层电极。当然也有人认为[7]借助皮层电极术中监测整个病灶的部位和范围，手术切除会得到更满意的效果。

表4可见，术前无癫痫发作组，术后有17例出现癫痫发作。多数学者认为其主要原因可能是手术操作所造成的脑皮质的损伤。因为脑皮质只要受到微生物、异物的侵袭或暴力、出血的损害，均可增加致痫的机会[8]。有学者报导一组颅脑损伤后使用苯妥英钠的病例，其2/3只用了一个月，1/2的血浆浓度达不到抑痫的最低限度，而发病率却显著降低[9]。故笔者建议，开颅手术后AEEG监测显示有痫样放电虽无临床发作（临床下发作），在排除肿瘤复发后应早期给予药物治疗。尤其应该注意术前有癫痫发作或AEEG示有痫样放电（临床下发作）者尽早配合抗癫痫的药物治疗，因本文结果可见术前有癫痫的发作组，手术后更易出现癫痫发作。

综上所述，对颅内占位性疾病术前诊断虽然CT更为直观、精确，但它反映的是解剖形态上的变化，对于病灶所引起的大脑皮质功能障碍及周围神经细胞的代偿等脑功能的变化它却不能反映。而AEEG不仅能准确或大致反映病灶的部位，也能反映出病灶对脑机能影响的程度和范围；通过术后的监测，它还能反映手术对脑机能的影响以及脑机能恢复的程度。尤其是它对于术前术后的癫痫的诊断、疗效的观察等更起着非常重要的作用。

参 考 文 献

[1] 黄远桂，吴声伶. 临床电图学[M]. 西安：陕西科学技术出版社，1984;141-152.

[2] 冯应瑞. 临床脑电图学[M]. 北京：人民卫生出版社，1980;171.

[3] 沈鼎烈. 临床癫学[M]. 上海：上海科学技术出版社，1993;67.

[4] Robort H W. Neurosurgery[M]. New youk: Mc Graw-Hill book company, 1985.

[5] 李书鑫，冯祖荫. 72例幕上肿瘤的EEG与病理学对比分析[J]. 临床脑电学杂志，1994;7(3):4.

[6] 谭启富. 癫痫的外科治疗(附104例报告)[J]. 中华神经外科杂志，1988;4(3):151.

[7] 夏玉成，孙 涛，马志荣，等. 癫痫外科治疗研究[J]. 功能性和立体定向神经外科杂志，1994;7(3):28.

[8] Annegers J F, Groover R V, et al. Seizures after head trauma: A population study[J]. Neurology, 1980;30(7):683.

[9] Young B, Rapp R, Brooks WH, et al. Posttraumatic epilepsy the prophylaxis [J]. Epilepsia,1979.20(6):671.

(上接第73页)

产生许多杂质及活性物质，与荧光法相比，我们建立的HPLC法能减少干扰，准确测定药物浓度，与紫外测定相比，灵敏度高，与生物检测法相比[3]，本法简便，需样量小，与放射法相比[4]，虽灵敏度不及，但因为氟喹诺酮类药物具有荧光特性，不需标记，且减少污染性。从而为研究氟喹诺酮类药物耐药机制提供了一种较好的方法。

由摄取曲线可看到三类肠道杆菌胞内HPLX浓度在10min时达最大峰，与文献报告一致[5]，且CPLX含量均在1mg/L以上（环丙沙星的临界耐药浓度，1997年NCCLS标准），表明均为敏感菌，与MIC结果一致。同时，阴沟杆菌和沙雷杆菌胞内CPLX浓度均低于变形杆菌，而MIC高于奇异变形杆菌，但胞内药物浓度是否与MIC相关尚不清楚，有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Dechene M, Leying H , Cullmann W. Role of the outer membrane for quinolone resistance in enterobacteria[J]. Chemotherapy 1990;36(2):13-23.

[2] Chapman JS, Georgopapadakou NH. Route of quinolone permeation in Escherichia coli [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1988;32(4):438-442.

[3] Hirai K, Aoyama H, Irikura T, et al. Differences in susceptibility to quinolones of outer membrane mutants of salmonella typhimurium and escherichia coli [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1986;29(3):535-538.

[4] Bedard J, Wong S, Bryan LE. Accumulation of enoxacin by escherichia coli and bacillus subilis [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1987;31(5):1348-1354.

[5] McCaffrey C, Bertasso J, Pace J. Quinolone accumulation in E. coli, pseudomonas aeruginosa, and staphylococcus aureus [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1992;36(8):1601-1605.