维普资讯 http://www.cqvip.com

Preparation and Determination of Chondroitin Sulfate

Tang Xianjue, et al
Research laboratory of pharmaceutical chemistry and biomaterials ,college of basic medical sciences

Preparation and determination of chondroitin sulfate from pig cartilage was described.This method is a simpler process with lower cost and 14% higher yield (by weight of cartilage). The content of chondroitin sulfate (about 70%) was determined by complexometric titration . The accuracy of determination was studied.

KEY WORDS Chondroitin sulfate ; Determination ; Complexometric titration

家兔静注环丙沙星后眼组织分布及其药代动力学研究

第二临床学院眼科 杨淑群 *
临床学院临床药理研究室 周远大 何海霞

提 要 家兔静注环丙沙星(CPFX)后,用高效液相色谱仪测定眼内各组织中药物浓度。环丙沙星在泪液、角膜、房水、虹膜－睫状体、晶体和玻璃体组织内峰浓度值分别为8.92±2.88、142.84±25.02、11.06±2.80、99.32±10.60、30.28±1.91和8.10±1.71μg/g:ml;其各组织中半衰期分别为1.49±0.97、1.66±0.13、2.09±0.51、2.01±0.44、1.52±0.92和1.21±0.66h。结果表明CPFX静注后能穿透到各眼内组织中。

关键词 环丙沙星;组织分布;药代动力学;高效液相色谱法
中图分类号 R969.1

环丙沙星(Ciprofloxacin,CPFX)是喹诺酮类药物,其抗菌谱广,抗菌活性强,对大肠杆菌、绿脓杆菌等多种革兰氏阴性和金葡菌等革兰氏阳性菌都有较强的抗菌作用。文献报道CPFX较其它喹诺酮类药物穿透性强,临床用于治疗细菌性角膜炎、角膜溃疡等眼部感染性疾病[1]。近年来临床单用CPFX静注治疗耐氨基甙类绿脓杆菌感染性角膜炎以及耐多种抗生素金葡菌感染顽固性角膜炎与角膜溃疡,疗效好,毒副反应较轻微。认为CPFX静注是防治眼内容炎较好的制剂[2]。有文献报道静注CPFX后房水、晶体中浓度,但未见有关CPFX静注后在眼内各组织中的分布及其药代动力学报道[3,4],为此,本实验报道了CPFX家兔静注后CPFX在眼内各组织中的分布和药代动力学参数,供临床医师参考。

1 材料和方法

1.1 **药物** CPFX由重庆药友制药有限公司提供,批号920402,纯度99.8%。按制剂手册用生理盐水配为1%浓度备用。

四丁基溴化胺,上海试剂一厂生产,批号872301。

二氯甲烷,重庆东方试剂厂生产,分析纯,批号981125。

1.2 **动物** 健康合格一级新西兰家兔。雌雄兼用,体重2.5～3.0kg,每组3兔6眼,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.3 **仪器** Bio－Rad高效液相色谱仪,色谱柱ODS C18反相柱,流动相为甲醇:磷酸四丁基溴化胺＝25:75(磷酸四丁基溴化胺0.005mol/L),流速1.5ml/min,紫外检测波长为294nm,柱温室温,纸速0.1cm/min,数据处理仪为3392A积

* 女,1946－04出生,副教授

维普资讯 http://www.cqvip.com

分仪,20μl固定进样环。

ZS83－1内切式组织匀浆器,浙西机械厂生产。

高速台式离心机,上海医疗器械六厂生产。

Sartorius 电子分析天平,由德国生产。

2 方法及方法学考察

2.1 动物分组、标本制备及测定

选取健康合格一级新西兰家兔24只,雌雄兼用,体重2.5～3.0kg。随机将24只家兔分为8组,每组3兔6眼,各组动物均行左耳缘静脉注射给药,剂量25mg/kg。分别于静脉给药后7.5、15、30、60、120、240、360和480分钟前1分钟用长5mm,宽2mm,重1mg的滤纸片置于结膜囊下穹窿处吸取泪液,电子分析天平称重,滤纸前后之差为泪液重量,滤纸制为0.08%泪液匀浆备用。随即空气栓塞处死动物,迅速摘除眼球,用生理盐水充分冲洗。抽取房水、玻璃体、剖开眼球,取出角膜、虹膜－睫状体、晶体,经滤纸吸干后称重,置试管中剪碎,分别制为0.6～4%组织匀浆。分别取泪液、角膜、虹膜－睫状体、晶体组织匀浆1ml,置10ml试管中,依次加入内标稀释液25μl,0.1mol/L磷酸缓冲液(pH7.0)1.0ml,二氯甲烷5ml,振荡5min,离心5min(4000rpm/min),弃除水层,取二氯甲烷3.0ml,置5ml离心管中,50℃水浴下氮气吹干,50μl流动相复溶,取20μl经高效液相色谱仪测定CPFX浓度。并与CPFX标准曲线对比换算,计算眼内各组织中的药物浓度(μg/g · ml)。

2.2 标准曲线制备

取空白眼组织混合匀浆1ml共6份,分别置于10ml试管中,加入不同量的CPFX标准液,使其终浓度分别为4、2、1、0.5、0.25、0.125μg/ml,按组织样品处理,经HPLC法测定,以CPFX峰高与内标峰高之比为纵坐标,浓度为横坐标进行回归,得标准曲线Y＝5613.64X－2478.60,r＝0.9988。

2.3 **回收率** 回收率试验用空白眼组织混合匀浆,配制为含CPFX浓度分别为0.25、1.00、4.00μg/ml各5份,按组织提取,经HPLC法测定,得回收率,结果如表1所示。

表1 眼组织混合匀浆中CPFX的回收率($\bar{x}\pm s$,$n=5$)

加入量(μg/ml)	回收量	相对回收率(%)
0.25	0.24±0.01	96.0
1.00	0.95±0.08	95.0
4.00	3.76±0.23	94.0

2.4 精密度试验

在空白眼组织混合匀浆中加入不同浓度的CPFX标准液,使其浓度分别为0.125 、0.5和2.0μg/ml,分别日内、日间按组织提取,经HPLC法测定,测定日内和日间变异,结果如表2所示。

表2 眼组织混合匀浆中CPFX日内、日间精密度分析($\bar{x}\pm s$,$n=5$)

标准浓度	测得浓度(μg/ml)		RSD(%)	
(μg/ml)	日内	日间	日内	日间
0.125	0.122±0.01	0.120±0.01	8.1	8.3
1.00	0.96±0.10	0.94±0.11	10.4	11.7
4.00	3.70±0.31	3.62±0.33	8.3	9.1

表3 CPFX静注后不同时间眼内各组织中的药物浓度(μg/g · ml,$\bar{x}\pm s$, $n=6$)

时间(min)	泪液	角膜	房水	虹膜睫状体	晶体	玻璃体
7.5	0.43±0.54	42.27± 4.65	18.77±2.61	34.35±17.04	2.68±0.75	2.80±0.76
15	5.34±2.44	111.91±17.89	11.06±2.80	59.95±17.39	8.32±0.50	3.52±1.13
30	8.92±2.88	142.84±25.02	7.51±1.29	99.32±10.60	30.28±1.91	8.10±1.71
60	3.83±1.97	97.14±13.62	5.24±0.49	37.10±9.84	14.56±4.02	7.11±2.40
120	1.99±0.81	54.94±13.78	3.61±0.80	16.04±7.72	8.70±1.67	4.26±1.34
240	0.93±0.55	37.94±14.53	2.57±0.59	7.34±5.10	4.32±0.91	1.88±0.54
360	0.19±0.23	10.55±2.22	1.65±0.45	2.45±1.77	1.54±0.32	0.45±0.39
480	/	3.32±1.41	0.55±0.50	/	/	/

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 结果

3.1 CPFX在眼内各组织中含量

眼内各组织中CPFX得到良好分离,如图1所示。

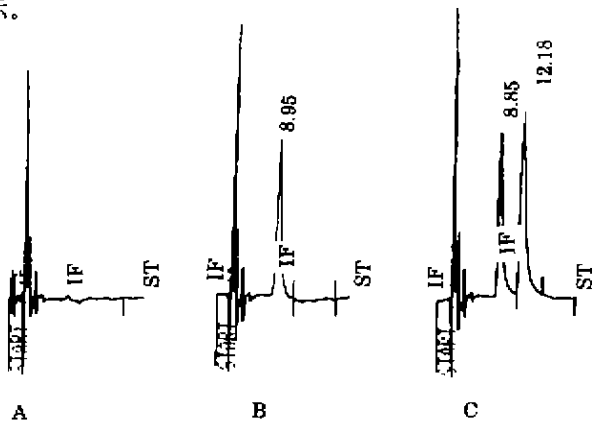


图1 眼组织中CPFX分离色谱图

A空白眼组织 B空白眼组织+OFLX(内标氧氟沙星) C空白眼组织+OFL+CPFX

静注CPFX后,不同时间(7.5、15、30、60、120、240、360或480min)分别测得泪液、角膜、房水、虹膜-睫状体、晶体和玻璃体中CPFX浓度及药时曲线如表3和图2所示。

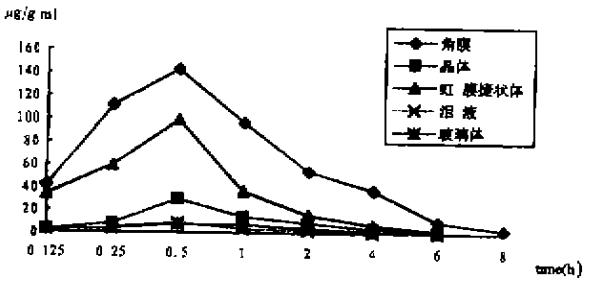


图2 静注CPFX后眼各组织药时曲线

3.2 CPFX在房水中的浓度变化及其药代动力学参数

如表3所示,CPFX静注给药后,迅速穿过血眼屏障,在房水中达到较高浓度。随着房水不断分泌和转运,房水中CPFX浓度逐渐被稀释,其药时曲线如图3所示。

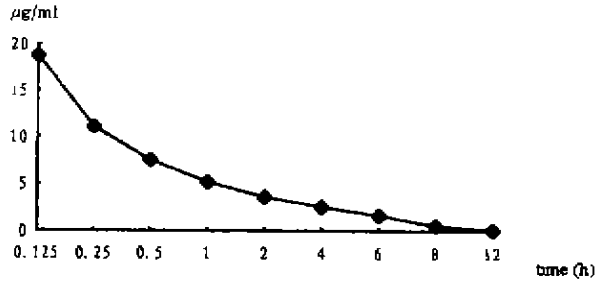


图3 静注CPFX后房水药时曲线

将所测得房水中CPFX浓度在微机上用非线性最小二乘法按2室模型拟合,经实用药物动力学程序(3p87)计算各药动学参数如表4所示。

表4 CPFX静注后房水中的药动学参数

$\alpha(h^{-1})$(分布相速率常数)	5.8000±2.6719
t1/2α(h)(分布相半衰期)	0.1307±0.0874
$\beta(h^{-1})$(消除相速率常数)	0.3385±0.0542
t1/2β(h)(消除相半衰期)	2.0885±0.5071
$K12(h^{-1})$(房水→组织转运速率常数)	4.5921±1.7164
$K21(h^{-1})$(组织→房水转运速率常数)	1.7123±0.3450
AUC(μg/g·ml)·h(进入房水中药物总量)	26.9840±3.5366
Cls(ml/min)(CPFX清除率)	0.9397±0.1219

3.3 CPFX在泪液、角膜、虹膜-睫状体、晶体和玻璃体中的浓度变化及其药代动力学参数

CPFX静注后在泪液、角膜、虹膜-睫状体、晶体和玻璃体中的浓度变化如表3所示。在微机经实用药物动力学程序(3p87)进行最佳拟合,均符合二室药物动力学模型,药动学参数如表5所示。

四 讨论

CPFX是第三代氟喹诺酮类广谱高效抗菌药物,通过抑制细菌的DNA回旋酶而抑制DNA的合成产生抗菌作用。常用于眼科细菌感染性疾病。文献报道其对组织有极强的穿透性,对其它抗菌药

维普资讯 http://www.cqvip.com

表5 CPFX静注后在泪液、角膜、虹膜－睫状体、晶体和玻璃体中药动学参数

组织	α (h^{-1})	$t_{1/2}\alpha$ (h)	β (h^{-1})	$t_{1/2}\beta$ (h)	CL (L/h)	Tpeak (h)	Cmax (μg/g·ml)	AUC (μg/g·ml)
泪液	3.3959±0.8003	0.1991±0.0797	0.5973±0.3024	1.4852±0.9690	2.4862±0.9690	0.4425±0.1234	7.6401±2.3408	11.3440±4.1545
角膜	2.7979±0.5486	0.2320±0.0600	0.4212±0.0340	1.6550±0.1345	0.0800±0.0149	0.4358±0.0864	136.2771±14.8542	321.8595±60.4619
虹膜－睫状体	2.9494±0.5451	0.2439±0.0523	0.3601±0.0873	2.0129±0.4379	0.2334±0.0708	0.3933±0.0622	79.9160±16.1826	117.2569±41.1367
晶体	2.6592±0.9324	0.2872±0.0953	0.3067±0.0710	1.5231±0.9200	0.5451±0.1227	0.6308±0.0760	19.2446±2.6657	47.6765±9.6975
玻璃体	4.3448±1.4796	0.2005±0.1536	0.7488±0.4205	1.2062±0.6562	1.4419±0.4101	0.7617±0.2107	7.2382±1.0189	18.6008±5.5218

物难于穿透的脑膜和骨组织均有较强的穿透性[1]。本实验结果表明,CPFX静注给药后15～30分钟眼各组织达高峰浓度,泪液为8.92±2.88μg/g;角膜为142.84±25.02μg/g; 房水11.06±2.80μg/ml,虹膜－睫状体99.32±10.60μg/g;晶体30.28±1.91μg/g;玻璃体8.10±1.71μg/ml,对肠杆菌科绿脓杆菌、流感杆菌、淋球菌及脆性厌氧杆菌等均有十分强大抗菌作用,约为其MIC90 0.08～2μg/ml的数百倍之高。直至静注给药后6小时,泪液、角膜、房水、虹膜－睫状体、晶体和玻璃体中CPFX浓度仍分别为0.19±0.23、10.55±2.22、1.65±0.45、2.45±1.77、1.54±0.32和0.45±0.39μg/ml·g,仍有较强的抗菌作用,与文献报道静注CPFX 200mg 1小时后房水峰浓度0.21μg/ml相比较,高出数十倍之多。其原因可能与剂量有关。

目前眼内抗菌药物浓度维持仍依赖于全身给药途径,因此,选用穿透性高,能在眼内达较高浓度的抗菌药物是治疗眼内容炎的重要措施。但由于血－眼屏障的存在,一般药物透入眼内的浓度较低,难以达到有效的药物浓度。本实验结果,CPFX脂溶性高,分布速度快。易于达到眼内各组织中,泪液、角膜、房水、虹膜－睫状体、晶体和玻璃体分布半衰期(t1/2α)分别为0.20±0.08、0.23±0.06、0.13±0.09、0.24±0.05、0.29±0.09和0.20±0.15h,即静注CPFX后15min左右即可分布到眼内各组织中,并且CPFX在眼内各组织中的达峰速度快(Tpeak),泪液为0.44±0.12h、角膜为0.44±0.09h、虹膜－睫状体为0.39±0.06h、晶体为0.63±0.08h、玻璃体为0.76±0.21h;峰浓度(Cmax)分别依次为7.64±2.34、136.28±14.88、79.92±16.18、19.24±2.67和7.24±1.02μg/ml·g。而CPFX到达眼各组织中的总量(AUC)依次分别为角膜＞虹膜－睫状体＞晶体＞房水＞玻璃体＞泪液,即321.86±60.46＞117.26±41.14＞47.68±9.70＞26.98±3.54＞18.60±5.52＞11.34±4.15(μg/g·ml)·h。实验结果表明CPFX静注给药后,能迅速分布到眼各组织中,且分布量高,有很高抗菌浓度。

治疗感染性眼病时,应选用能在感染部位既可达有效抗菌浓度,又可滞留较长时间仍保持抗菌作用的药物。本实验结果,CPFX在眼各组织中的消除半衰期(t1/2β)分别是泪液1.49±0.97h、角膜1.66±0.13h、房水2.09±0.51 h虹膜－睫状体2.01±0.44h、晶体1.52±0.92h、玻璃体1.21±0.66h。结果表明静注CPFX后分布到眼大部分组织中的CPFX经4～6 t1/2后,眼各组织中的药物浓度仍有较高的抗菌浓度。

实验结果表明,静注CPFX是治疗眼内感染的一种有效措施,值得临床采用。

参考文献

1.Lesk RM, et al. . American Journal of Ophthalmology, 1993; 115.
2.张文华,中华眼科杂志 1998; 34(1):5.
3.Behrens W B, Infection, 1988; (1):62
4.Virgil DA, et al. American Journal of Ophthalmology, 1996; 122:678

(收稿日期 1999－02－01)

维普资讯 http://www.cqvip.com

Distribution and pharmacokinetics after intravenous injection of ciprofloxacin in the rabbit eye

Yang Shuqun, et al
Department of ophthalmology, the second college of clinical medicine

The intraocular concentration of ciprofloxacin was measured by high performance liquid chromatography after single intravenous injection ciprofloxacin in the rabbit eye. The peak concentrations (Cmax) of ciprofloxacin in lachrymal fluid , cornea, aqueous humour, iris－ciliary body, lens, vitreous body were 8.92±2.88, 142.84±25.02, 11.06±2.80, 99.32±10.60, 30.28±1.91 and 8.10±1.71μg/g · ml, respectively. The half－life($t1/2<\beta$) of various concentrations in lachrymal fluid, cornea, aqueous humour, iris－ciliary body, lens and vitreous body was 1.49±0.97, 1.66±0.13, 2.09±0.51, 2.01±0.44, 1.52±0.92 and 1.21±0.66h, respectively. The results indicate that ciprofloxacin can penetrate intraocular various tissure.

KEY WORDS Ciprofloxacin; Distribution; Pharmacokinetics; HPLC

结核分支杆菌rpoB基因突变和耐利福平的相关性研究

临床学院检验科 张玉洪* 胥 飚 阳 苹
药剂科 何 芳

提 要 研究结核分支杆菌rpoB基因突变及其与利福平(RFP)耐药性的关系,建立快速检测耐药基因型的分子药敏试验方法. 用PCR－SSCP分析结核分支杆菌rpoB基因. 结果显示PCR扩增rpoB基因为属特异性。81株结核分支杆菌的PCR－SSCP图谱与H37Rv为对照,35株敏感菌仅有一株位置有区别;46株耐药菌有42株有明显区别;检测阳性率为91.3%;特异性97.1%。证明rpoB基因突变是结核分支杆菌耐利福平的主要机理,PCR－SSCP可简便快速地检出rpoB基因的突变,有助于结核分支杆菌耐药性的快速检测和研究。

关键词 结核分支杆菌; 耐药; 利福平; rpoB基因; 聚合酶链反应; 单链构象多态性
中图分类号 R446.5

结核病是我国较严重的传染病,利福平(RFP)作为抗结核治疗的主要药物之一,对结核病的有效控制发挥了重要作用。近年来结核分支杆菌的RFP耐药性及耐多药性(MDR)导致了结核病的疗效降低,防治困难,已引起了公众对结核分支杆菌耐药性以及结核病快速诊断和有效控制的广泛关注。近年的研究表明RFP耐药性发生的机制是由于其作用靶分子RNA多聚酶亚单位的编码基因(rpoB)突变所致[1,2],rpoB基因个别密码的替换,导致了RNA聚合酶分子原有的利福平结合位点的构象发生改变,失去了结合利福平的能力,研究发现所有rpoB基因的突变都集中在一个23个氨基酸的区域内。针对该突变区域建立了聚合酶链反应加单链构象多态性分析(PCR－SSCP)法,并与传统的药敏试验对照,证实其检测结果与药物敏感试验结果基本一致。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 H37RV标准菌株及其它非结核分支杆菌

* 男,1963－07出生,主管技师