

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.24.004

血必净注射液对小鼠血液和肺组织中左氧氟沙星分布的影响

郭茂华¹, 杨 辉², 姚高琼^{2△}

(1. 四川省泸州市妇幼保健计划生育服务中心, 四川 泸州 646100; 2. 重庆医科大学附属第一医院, 重庆 400016)

摘要:目的 探讨血必净注射液对小鼠血液和肺组织中左氧氟沙星(LVFX)分布的影响。方法 将108只小鼠随机分为实验组(血必净注射液联合LVFX)和对照组(0.9%氯化钠注射液),各54只。两组小鼠分别腹腔注射血必净注射液(22 mL/kg)或等体积0.9%氯化钠注射液,末次腹腔注射1 h后两组小鼠均静脉注射LVFX(132 mg/kg, 1.32%);静脉注射3, 5, 10, 30, 60, 120, 240, 480, 720 min后,采集小鼠血液和肺组织,制成血浆或肺组织匀浆,以高效液相色谱法检测样本中LVFX质量浓度,采用DAS 2.0药代动力学分析软件计算药代动力学参数。结果 对照组和实验组小鼠静脉注射LVFX后血液和肺组织中药时曲线均符合二室模型。对照组和实验组小鼠血液 AUC_{0-12h} 分别为 $(223.57 \pm 23.42) \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{h})$ 和 $(192.02 \pm 20.34) \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{h})$,小鼠肺组织中 AUC_{0-12h} 分别为 $(218.48 \pm 31.05) \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{h})$ 和 $(283.66 \pm 21.53) \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{h})$, $AUC_{0-\infty}$ 分别为 $(246.32 \pm 34.95) \text{ mg}/(\text{h} \cdot \text{L})$ 和 $(305.78 \pm 25.66) \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{h})$, P 均小于0.05)。结论 血必净注射液可降低LVFX在血液中的质量浓度,升高其在肺组织中的质量浓度。

关键词:血必净注射液;左氧氟沙星;高效液相色谱法;血药浓度;二室模型;小鼠

中图分类号:R965;R978

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)24-0013-04

Effect of Xuebijing Injection on Distribution of Levofloxacin in Plasma and Lung Tissue of Mice

GUO Maohua¹, YANG Hui², YAO Gaoqiong²

(1. Luzhou Maternal and Child Health and Family Planning Service Center, Luzhou, Sichuan, China 646100; 2. The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, China 400016)

Abstract: Objective To investigate the effect of Xuebijing Injection on the distribution of levofloxacin in plasma and lung tissue of mice. **Methods** Totally 108 mice were randomly divided into the experimental group(Xuebijing Injection combined with levofloxacin) and the control group(0.9% Sodium Chloride Injection), 54 mice in each group. The mice in the experimental group were intraperitoneally injected with Xuebijing Injection(22 mL/kg), while the mice in the control group were intraperitoneally injected with equal volume of 0.9% Sodium Chloride Injection. One hour after the last intraperitoneal injection, the mice in the two groups were injected levofloxacin(132 mg/kg, 1.32%) intravenously. After 3, 5, 10, 30, 60, 120, 240, 480 and 720 min of intravenous injection, the blood and lung tissues of mice were collected to make plasma or lung tissue homogenate. The concentrations of levofloxacin in the samples were detected by HPLC, and the pharmacokinetic parameters were calculated by DAS 2.0 software. **Results** After intravenous injection of levofloxacin, the drug concentration-time curve of blood and lung tissue of mice in the control group and the experimental group were consistent with the two-compartment model. The AUC_{0-12h} of the blood in the control group and the experimental group were $(223.57 \pm 23.42) \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{h})$ and $(192.02 \pm 20.34) \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{h})$, the AUC_{0-12h} of the lung tissue in the control group and the experimental group were $(218.48 \pm 31.05) \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{h})$ and $(283.66 \pm 21.53) \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{h})$, and the $AUC_{0-\infty}$ of the lung tissue in the control group and the experimental group were $(246.32 \pm 34.95) \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{h})$ and $(305.78 \pm 25.66) \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{h})$ ($P < 0.05$). **Conclusion** Xuebijing Injection can reduce the concentration of levofloxacin in blood and increase the concentration of levofloxacin in lung tissue.

Key words: Xuebijing Injection; levofloxacin; HPLC; blood concentration; two-compartment model; mice

第一作者:郭茂华,女,大学本科,副主任药师,研究方向为临床药学,(电子信箱)406188730@qq.com。

△通信作者:姚高琼,女,硕士研究生,副主任药师,研究方向为临床药学,(电话)023-89012401(电子信箱)284895434@qq.com。

- [16] SCHINDLER YL, GARSKE KM, WANG J, et al. Hand elevates cardiomyocyte production during zebrafish heart development and regeneration[J]. Development, 2014, 141(16):3112-3122.
- [17] SERRANO F, CALATAYUD CF, BLAZQUEZ M, et al. Gata4 blocks somatic cell reprogramming by directly repressing Nanog[J]. Stem Cells, 2013, 31(1):71-82.
- [18] DELGADO I, CARRASCO M, CANO E, et al. GATA4 loss in the septum transversum mesenchyme promotes liver fibrosis in mice[J]. Hepatology, 2014, 59(6):2358-2370.

- [19] ISHIDA M, SELARU FM. miRNA-Based Therapeutic Strategies[J]. Current Pathobiology Reports, 2013, 1(1):63-70.
- [20] CREAMERS EE, TIJSEN AJ, PINTO Y M. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease?[J]. Circulation Research, 2012, 110(3):483.
- [21] HEYN J, HINSKE C, MHNLE P, et al. MicroRNAs as potential therapeutic agents in the treatment of myocardial infarction[J]. Current Vascular Pharmacology, 2011, 9(6):733-740.

(收稿日期:2019-03-03;修回日期:2019-06-04)

目前,临床治疗重症肺炎的方法主要为抗感染、祛痰、机械通气、营养支持等,但抗菌药物长期大量使用易产生较多的不良反应。血必净注射液联合抗菌药物使用可起协同作用^[1-3],能改善重症肺炎患者机体免疫功能及预后。血必净注射液具有解毒散结、活血化瘀、通经活络之功效,可改善机体微循环,抑制血小板黏附、聚集,改善机体凝血功能障碍^[4-8]。本研究中探讨了血必净注射液联合左氧氟沙星(LVFX)静脉注射后在小鼠血液、肺组织中药物质量浓度的变化情况,现报道如下。

1 动物、仪器与试药

1.1 动物

SPF级KM小鼠108只,雌雄各半,体质量为18~22g,由重庆医科大学实验动物中心提供,动物生产许可证号为SCXK(渝)2012-0001。

1.2 仪器

SPD-20A型高效液相色谱仪,包括紫外检测器,自动进样系统和Labsolutions工作站(日本Shimadzu公司);R81型高速冷冻医用离心机(北京白洋医疗器械有限公司);MX-S型可调式混匀仪(大龙兴创实验仪器<北京>有限公司);BP61型电子分析天平(德国Sartorius公司);组织匀浆机(江苏其林医用仪器厂);2E-223590型涡旋器(美国Scientific公司)。

1.3 试药

血必净注射液(天津红日药业股份有限公司,批号为1709052,规格为每支10mL);LVFX(上虞京新药业有限公司,批号为DK24-1707062-VI,纯度为80.6%);环丙沙星对照品(CF,中国食品药品检定研究院,批号为130451-201203,含量84.2%);0.9%氯化钠注射液(西南药业有限公司,批号为18011028,规格为每瓶500mL);甲醇为色谱纯,二氯甲烷为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:InertSustain C₁₈柱(150mm×4.6mm,5μm);流动相:甲醇-0.02mol/L磷酸盐缓冲液(30:70,V/V,pH3.15);流速:1mL/min;检测波长:290nm;柱温:30℃;进样量:10μL;内标:环丙沙星(临配33.6μg/mL)。

2.2 样品采集

将108只小鼠随机分为实验组(血必净注射液联合LVFX)及对照组(0.9%氯化钠注射液联合LVFX),各54只,雌雄各半。两组小鼠分别腹腔注射血必净注射液(22mL/kg)或等体积0.9%氯化钠注射液,末次腹腔注射1h后均静脉注射LVFX(132mg/kg,1.32%)。静脉注射3,5,10,30,60,120,240,480,720min后将各组小鼠分为9组,各6只。分别于各时间点采集血液和肺组织,血液经肝素抗凝,取血浆;肺组织称定质量,匀

浆,均置-20℃保存。血必净注射液成人1d常规剂量为100mL,小鼠剂量为成人的11倍,则为22mL/kg;左氧氟沙星成人治疗肺部感染1d剂量为600mg,折算成小鼠剂量为132mg/kg。

2.3 样品处理

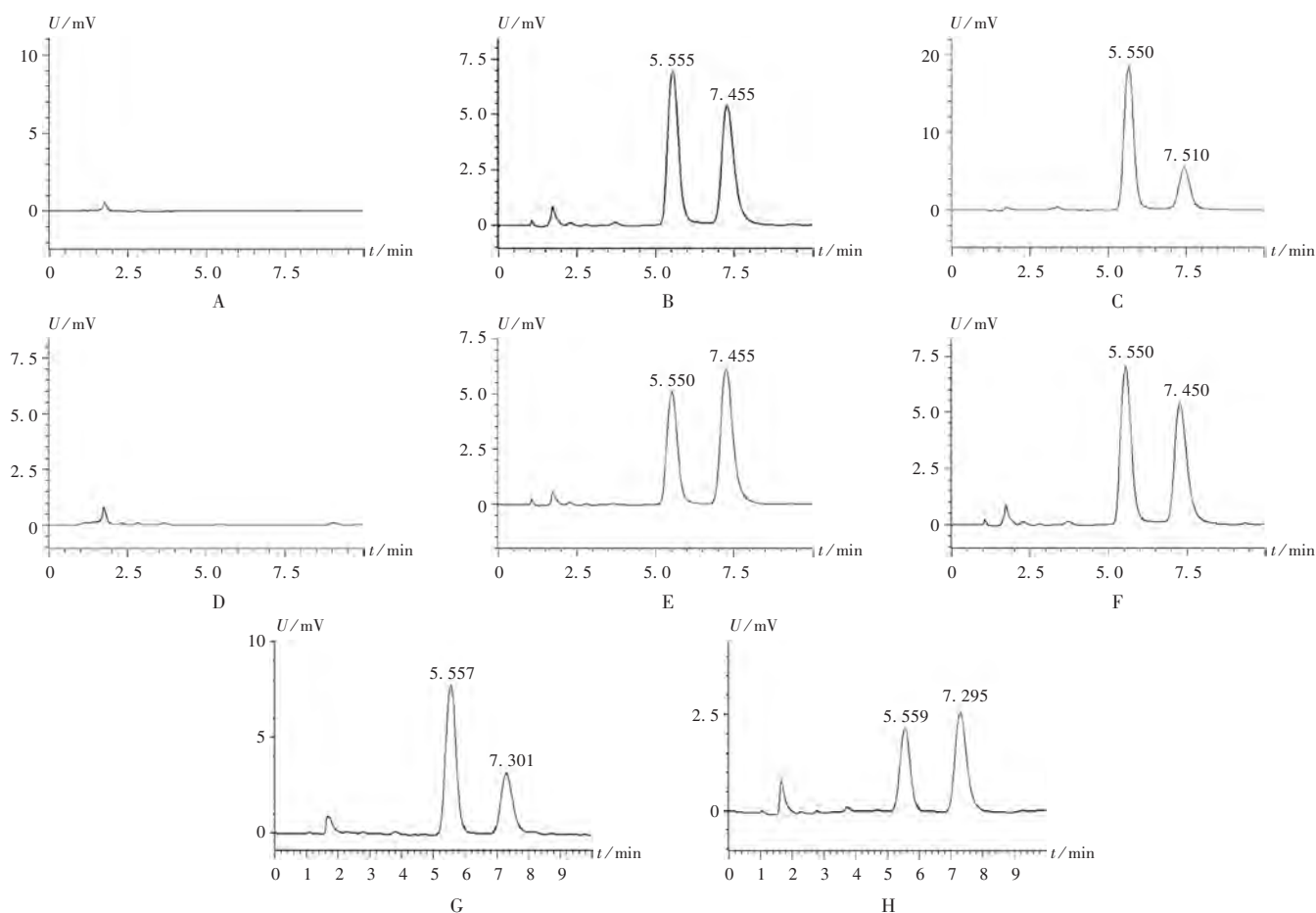
血样:取小鼠血浆100μL,加33.6μg/mL CF 40μL,二氯甲烷800μL,涡旋提取1min,12000r/min离心10min,静置分层,取下层有机相600μL;残液中加二氯甲烷800μL,涡旋提取1min,12000r/min离心10min,取下层有机相600μL;合并2次提取液,氮气吹干,以甲醇200μL复溶,12000r/min离心10min,取上清液10μL测定药物质量浓度。肺组织:取小鼠肺组织匀浆200μL,加33.6μg/mL CF 40μL,二氯甲烷1.5mL,涡旋提取1min,12000r/min离心10min,静置分层,取下层有机相1mL;残液中加二氯甲烷1.5mL,涡旋提取1min,12000r/min离心10min,取下层有机相1mL;合并2次提取液,氮气吹干,以甲醇200μL复溶,12000r/min离心10min,取上清液10μL测定药物质量浓度。

2.4 方法学考察

专属性试验与系统适用性试验:在拟订色谱条件下,小鼠血浆、肺组织匀浆中LVFX的保留时间均为5.5min左右,内标CF保留时间为7.5min左右,二者峰形良好,不受血浆和组织匀浆中内源性物质干扰,药物及内标达基线分离,分离度良好($R > 2.7$)。详见图1。

线性关系考察:在空白血浆和肺组织匀浆中添加LVFX,使其质量浓度分别为0.05,0.10,0.50,1.00,2.00,4.00,8.00,16.00,20.00μg/mL,0.08,0.15,0.30,0.60,1.20,2.50,5.00,10.00μg/mL,依法处理,按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积。以LVFX质量浓度(X ,ng/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得血浆和肺组织匀浆中LVFX的回归方程分别为 $Y_1 = 0.2378X - 0.0044$ ($r_1 = 0.9989$, $n = 9$), $Y_2 = 0.1896X - 8.8403 \times 10^{-4}$ ($r_2 = 0.9971$, $n = 8$)。结果表明,血浆和肺组织匀浆中LVFX的质量浓度线性范围分别为0.05~20μg/mL和0.08~10μg/mL。

定量限与检测限考察:在空白血浆和肺组织匀浆中添加LVFX,使其质量浓度约为0.05μg/mL和0.02μg/mL,倍比稀释,并按拟订色谱条件进样测定,以信噪比(S/N)10:1和3:1分别计算定量限、检测限。结果血浆和肺组织匀浆中LVFX的检测限分别为0.05μg/mL和0.02μg/mL,定量限分别为0.050μg/mL和0.080μg/mL,其回归方程在所测质量浓度范围内线性关系良好。最低定量质量浓度分别为50ng/mL($n = 3$)和80ng/mL($n = 3$),RSD均小于10%,符合生物样本的测定要求。



A. 空白血浆 B. 空白血浆 + LVFX + CF C. 给药 10 min 后的血浆 + CF
D. 空白肺组织匀浆 E. 空白肺组织匀浆 + LVFX + CF F. 给药 10 min 后的肺组织匀浆 + CF
G. 空白血浆 + 血必净注射液 + LVFX + CF H. 空白肺组织匀浆 + 血必净注射液 + LVFX + CF

图 1 高效液相色谱图

精密试验:以空白配置成低、中、高质量浓度的供试品(血浆:1, 4, 16 $\mu\text{g/mL}$;肺组织匀浆:0.3, 1.2, 5.0 $\mu\text{g/mL}$),各 3 份,按拟订色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果血浆和肺组织匀浆中 LVFX 峰面积的 RSD 均小于 7.1% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取上述供试品适量,反复冷冻(-20°C)、融化(60°C 内)3 次;分别于 4°C 条件下和室温下放置 24 h;于室温下放置 2, 10 h 时按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积。结果血浆和肺组织匀浆中 LVFX 峰面积的 RSD 均小于 8.0% ($n=6$),表明供试品在上述条件下均基本稳定。

提取回收试验:同“精密试验”项下方法操作,记录峰面积并计算提取回收率。结果见表 1。

2.5 药物质量浓度及药代动力学参数

采用 DAS 2.0 药代动力学分析软件计算药代动力学参数。采用 SPSS 18.0 统计学软件分析,计量数据以 $\bar{X} \pm s$ 表示,行 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。静脉注射 LVFX 后血浆和肺组织匀浆药物质量浓度见表 2,药代动力学参数见表 3。

表 1 提取回收试验结果($n=9$)

样品含量($\mu\text{g/mL}$)		测得量($\mu\text{g/mL}$)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD (%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
16	5.0	14.38	5.18	89.88	103.60				
16	5.0	14.02	5.05	87.62	101.00				
16	5.0	14.32	5.07	89.50	101.40				
4	1.2	3.85	1.41	96.25	117.50				
4	1.2	3.43	1.12	85.75	93.33	87.86	100.39	6.15	8.37
4	1.2	3.79	1.28	94.75	106.67				
1	0.3	0.85	0.29	85.00	96.67				
1	0.3	0.80	0.27	80.00	90.00				
1	0.3	0.82	0.28	82.00	93.33				

注:A 为血浆,B 为肺组织匀浆。

3 讨论

检测 LVFX 在血浆和组织中的药物质量浓度可采用高效液相色谱(HPLC)–荧光法、高效液相色谱–紫外吸收光谱(HPLC–UV)法或气相色谱–质谱联用(LC–MS)法。本研究中参照罗成等^[9]的研究,采用 HPLC–UV 法检测 LVFX 质量浓度,以 CF 为内标,相同波长下各种物质的出峰互不干扰,检测结果稳定可靠。

表2 小鼠血浆和肺组织匀浆中药物质量浓度($\bar{X} \pm s, \mu\text{g/mL}, n=6$)

时间 (min)	血浆		肺组织匀浆	
	对照组	实验组	对照组	实验组
3	255.39 ± 2.64	245.02 ± 8.44*	232.66 ± 13.04	255.76 ± 16.09*
5	215.10 ± 16.99	197.35 ± 11.81	200.97 ± 11.64	217.35 ± 10.05*
10	162.51 ± 7.96	154.51 ± 14.13	146.54 ± 16.08	173.22 ± 18.03*
30	79.58 ± 10.01	84.81 ± 8.26	85.31 ± 16.46	107.67 ± 11.87*
60	44.80 ± 5.39	44.70 ± 7.68	48.85 ± 9.56	60.73 ± 5.72*
120	12.28 ± 4.02	14.30 ± 3.05	21.28 ± 7.81	35.59 ± 10.03*
240	6.90 ± 2.13	10.59 ± 1.44*	8.76 ± 3.49	13.74 ± 3.17*
480	3.04 ± 1.26	3.55 ± 2.18	5.00 ± 1.75	7.40 ± 1.17*
720	1.39 ± 0.48	1.48 ± 0.64	2.20 ± 1.11	2.73 ± 1.29

注:与对照组比较,* $P < 0.05$ 。表3同。

表3 小鼠血液和肺组织匀浆中药物动力学参数($\bar{X} \pm s, n=6$)

药代动力学参数	血液		肺组织	
	对照组	实验组	对照组	实验组
$t_{1/2\alpha}$ (h)	0.31 ± 0.07	0.30 ± 0.02	0.37 ± 0.10	0.35 ± 0.08
$t_{1/2\beta}$ (h)	3.79 ± 0.67	3.08 ± 0.58	5.25 ± 2.09	5.30 ± 3.03
V_d (L/kg)	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.04
CL [L/(h·kg)]	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.07 ± 0.01*
AUC_{0-12h} [mg/(L·h)]	223.57 ± 23.42	192.02 ± 20.34*	218.48 ± 31.05	283.66 ± 21.53*
$AUC_{0-\infty}$ [mg/(L·h)]	243.96 ± 22.12	211.14 ± 22.60	246.32 ± 34.95	305.78 ± 25.66*
k_{10} (1/h)	1.22 ± 0.13	1.11 ± 0.12	0.91 ± 0.15	0.81 ± 0.10
k_{12} (1/h)	1.01 ± 0.38	1.05 ± 0.13	1.00 ± 0.67	0.97 ± 0.38
k_{21} (1/h)	0.31 ± 0.10	0.43 ± 0.08	0.31 ± 0.13	0.58 ± 0.26

一次进样,约8 min完成,省时省力。

当前,根据各类抗菌药物对细菌的杀菌活性大致分时间依赖型和浓度依赖型,前者药物质量浓度超过细菌最低抑菌浓度(MIC)4~5倍以上时杀菌活力不再增强,如 β -内酰胺类、部分大环内酯类、酰胺醇类等,其评价指标为药物浓度高于MIC的时间($T > MIC$)和半衰期($t_{1/2}$);后者杀菌活力在很大范围内随药物质量浓度的增加而增强,其评价指标为 AUC_{0-24h}/MIC [即抑菌曲线下面积(AUC)]和峰质量浓度(C_{max})/MIC,属于此类者有氨基苷类、氟喹诺酮类及硝咪唑类等。LVFX治疗严重感染时与AUC密切相关。本研究结果显示,实验组小鼠肺组织的 AUC_{0-12h} ,显著高于对照组。肺部细菌感染常见菌为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、肺炎球菌、铜绿假单胞菌^[10],临床分离株对LVFX的MIC₅₀分别为0.31,0.62,1.25 mg/L,而MIC₉₀分别为0.62,1.25,2.50 mg/L,氟喹诺酮类药物对革兰阴性杆菌的AUC应至少为125 SIT⁻¹h,对革兰阳性球菌为30 SIT⁻¹h(SIT为血清抑制滴度)^[11-12]。因本研究中LVFX给药剂量为成人治疗重症肺炎时常用剂量600 mg(每日1次),结果表明,在12 h内两组均超过要求,但实验组超过更多;同时可推导,血必净注射液与LVFX联用,需减少

LVFX的用量。这对于降低当前氟喹诺酮类的用量、提高治疗的敏感性及减少耐药具有重要意义。

此外,血必净还可改变LVFX的组织分布。实验组LVFX广泛分布于外周组织中,血浆质量浓度较低,而对照组则较少分布在组织中,LVFX质量浓度低于实验组,表明血必净同LVFX联用可产生协同作用,与其改变药物的分布有一定关系。

血必净提高LVFX在肺组织中的质量浓度,可能与其组分中红花、赤芍、当归、川芎、丹参等成分有关。该类药物均具有活血化瘀、扶正祛邪、通经活络、行气活血作用,从而改善微循环,使发炎的组织通透性改变,痉挛的血管扩张,使血流动力学发生改变。

综上所述,血必净注射液可降低LVFX在血液中的质量浓度,而升高其在肺组织中的质量浓度。

参考文献:

- [1] 徐明,血必净联合抗菌药物治疗ICU重症肺炎患者的临床疗效分析[J]. 江西医药,2017,52(6):509-510.
- [2] 张雪姣,血必净联合抗生素治疗重症肺炎的临床效果研究[J]. 河南医学研究,2017,26(3):425-426.
- [3] 潘伟军,血必净注射液治疗重症肺炎的效果分析[J]. 慢性病学杂志,2017,18(4):420-424.
- [4] 陈贤坤,血必净治疗重症肺炎临床效果[J]. 临床合理用药,2015,8(6):131-133.
- [5] 刘斌强,董玉进,血必净注射液联合抗菌药物治疗重症肺炎的疗效观察[J]. 中国药物与临床,2017,17(6):861-863.
- [6] 姚兰,刘亚男,侯果,等. 血必净注射液在重症肺炎中对机体免疫功能的调控研究[J]. 湖北中医药大学报,2017,5(19):35-38.
- [7] SRINIVAS N, NARASU L, SHANKAR BP, et al. Development and validation of a HPLC method for simultaneous quantitation of gatifloxacin, sparfloxacin and moxifloxacin using levofloxacin as internal standard in human plasma: application to a clinical pharmacokinetic study[J]. Biomed Chrom, 2008, 22(11):1288-1295.
- [8] 赵军,肖明朝,周远大,等. 特拉唑嗪对左氧氟沙星在大鼠细菌性前列腺炎组织中分布的影响[J]. 中国新药与临床,2010,29(3):199-202.
- [9] 罗成,孔令希,何海霞. 痰热清注射液对左氧氟沙星在大鼠血液和肺组织中分布的影响[J]. 中国抗生素杂志,2014,39(4):53-58.
- [10] 唐映红,伍参荣,魏云,等. 盐酸左氧氟沙星体内外抗菌作用研究[J]. 医药导报,2007,26(9):983-986.
- [11] SCHENTAG JJ. Antimicrobial action and pharmacokinetics/pharmacodynamics: the use of AUC to improve efficacy and avoid resistance[J]. Chemother, 1999, 11(6):426-439.
- [12] LISTER PD, SANDERS CC. Pharmacodynamics of levofloxacin and ciprofloxacin against Streptococcus pneumoniae[J]. Antimicrob Chemother, 1999, 43(1):79-86.

(收稿日期:2019-03-28;修回日期:2019-06-27)