维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)05－0625－04

左旋氧氟沙星滴眼及球结膜下注射的兔眼通透性比较

孙　航[1]，杨淑群[2]，周远大[3]，何海霞[3]

(1.重庆医科大学病毒性肝炎研究所，2.重庆医科大学第二临床学院眼科，重庆　400010；

3.重庆医科大学临床学院临床药理教研室，重庆　400016)

【摘　要】目的：比较左旋氧氟沙星(LVFX)点眼和球结膜下注射后家兔眼各组织的药物浓度及药代动力学参数。方法：将0.3% LVFX滴入或球结膜下注射入兔眼，在不同时点取角膜、房水、虹膜－睫状体、晶状体、玻璃体等组织，用高效液相色谱法测定组织中的药物浓度。结果：球结膜下注射LVFX后，不但在角膜、虹膜－睫状体中具有更高的药物浓度，而且在晶状体和玻璃体内也有较高的药物浓度，与滴眼组相比较，有显著差异($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结论：球结膜下注射LVFX较滴入法更有利于治疗严重的眼部感染。

【关键词】左旋氧氟沙星；药物分布；药代动力学；高效液相色谱法

【中国图书分类法分类号】R969.1　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2003－11－28

Intraocular penetration of levofloxacin in rabbit eyes following topical and subconjunctival administration

SUN Hang, et al

(*Institute of Viral Hepatitis, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To compare the ocular tissue concentrations and pharmacokinetic parameters in rabbit's eyes after topically and subconjunctivally administrated with levofloxacin (LVFX). *Methods*: The concentrations of LVFX in the cornea, aqueous humor, iris－ciliary body, lens and vitreous at different times were measured by high performance liquid chromatography after 0.3% LVFX were topically and subconjunctivally administrated into rabbits. *Results*: The penetration of LVFX into the cornea, iris－ciliary body, lens and vitreous after subconjunctival injection was significantly higher than that of topically applied one($P<0.01$ or $P<0.05$). *Conclusion*: Subconjunctival LVFX could be more effective than topical administration in the treatment of severe eye infection.

【Key words】Levofloxacin; Drug distribution; Pharmacokinetics; High performance liquid chromatography

左旋氧氟沙星(Levofloxacin，LVFX)是氧氟沙星的左旋光学异构体，是新一代喹诺酮类抗感染药物，它比氧氟沙星、环丙沙星等的抗菌谱更广，毒副反应更低，已被临床各科用于治疗感染性疾病[1]。但对其在眼科的应用报道甚少，国内仅有LVFX滴眼液治疗外眼感染的临床报道[2]，为进一步拓宽LVFX在眼科的应用，选用0.3% LVFX给家兔点眼或球结膜下注射，观察两种不同给药途径的兔眼内组织分布和有关药动学参数，供临床医师参考。

1　材料与方法

1.1　药品及试剂

LVFX由浙江新昌制药股份有限公司提供，批号970401，按照药物制剂手册配制为0.3%的滴眼液和注射液pH6.5，灭菌后置冰箱备用。乳酸环丙沙星由重庆制药六厂提供，批号920402，用5mmol/L磷酸盐缓冲液(pH 2.50)为溶剂配成16mg/L的内标稀释液[3]。乙腈为色谱纯，其余试剂均为分析纯。

1.2　仪器与色谱条件

日本岛津CTD－6A型高效液相色谱仪，SPD－6A紫外检测器，C－R3A色谱数据处理机，ODSC_{18}色谱柱(250mm×4.5mm，粒度10μm)。流动相为0.005mmol/L磷酸四丁基溴化铵：乙腈(450:50，pH2.5)，流速1.2ml/min，紫外检测波长为294nm，柱温30℃，纸速0.2cm/min。

1.3　动物和组织标本采集

选取42只健康合格的新西兰家兔，雌雄各半，体重2.5～3kg(由重庆医科大学实验动物中心提供)，随机分为

作者介绍：孙　航(1970－　)，女，讲师，硕士生，主要研究方向：临床药理。

维普资讯 http://www.cqvip.com

LVFX 点眼组和球结膜下注射组，每组 21 只。用微量进样器或 0.25ml 注射器分别给各组家兔双眼结膜囊内滴入或球结膜下注射 0.3% LVFX50μl，然后轻轻将双眼睑闭合 30s，再让其自由活动，分别于用药后 0.125、0.25、0.5、1、2、3 和 4h(每时点取 3 只兔，共 6 只眼测定)，用长 5mm、宽 2mm、重 1mg 的滤纸片，置于结膜囊下穹窿处吸取泪液，称重，滤纸前后重量之差即为泪液重量。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－睫状体和晶状体，经滤纸吸干后分别称重，置试管中剪碎、匀浆。取匀浆 1ml，置 10ml 离心管中，依次加入内标稀释液 25μl、0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)1.0ml、二氯甲烷 5.0ml，振荡 5min，离心 5min(4000r/min)，弃除水层，取二氯甲烷 3.0ml，置 5ml 离心管中，室温下氮气吹干，残留物用 100μl 流动相溶解，取 20μl 进样。每个标本进 2 针，取峰高的平均值。

1.4 统计学方法

所有实验数据均以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，统计方法采用成组设计的 t 检验。

2 结 果

2.1 LVFX 色谱图

眼各组织 LVFX 得到良好分离，保留时间为 7.2min，见图 1。

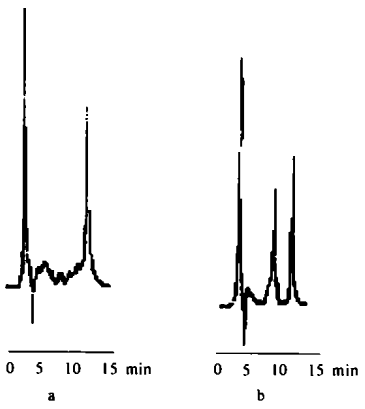


图 1 LVFX 色谱图

a. 空白匀浆 b. 空白匀浆加 LVFX 液 1. 内标 2. LVFX

2.2 标准曲线的制备

在眼组织(泪液、角膜、房水、虹膜－睫状体、晶状体、玻璃体)空白匀浆中加入不同浓度的 LVFX 标准溶液，使每管含 LVFX 分别为 0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、5.0μg/ml，按样品处理方法进行处理和进样，以 LVFX 峰高与内标峰高之比(Y)对 LVFX 浓度(X)进行线性回归，得回归方程：$Y = 10.3532X - 0.0225$，$r = 0.9999$。最低检测限为 0.005μg/ml。

2.3 回收率及精密度测定

分别对高、中、低三种浓度的 LVFX 匀浆按样品处理方法进行处理和进样，进行回收率、日内与日间(5 日内)精密度考察，结果见表 1。

表 1 兔眼组织中 LVFX 的回收率和精密度($n = 5$)

标准品浓度 (μg/ml)	回收率 (%)	日内误差 (%)	日间误差 (%)
0.05	92.40 ± 0.04	5.30	6.60
1.0	98.00 ± 1.73	1.04	1.53
5.0	95.96 ± 2.44	1.21	2.04
0.25	97.68 ± 1.56	1.18	3.61
5.0	95.28 ± 1.79	2.77	2.45
25.0	93.19 ± 2.84	1.97	4.81

2.4 稳定性试验

将标准曲线项下的 LVFX 标准溶液分别置于－20℃低温冰箱及 4℃普通冰箱中保存 1、3、5、7、9、11d，然后分别测定，其结果峰高值变化不大，CV < 3%，结果如表 2。

表 2 LVFX 的稳定性

温度	浓度 (μg/ml)	d(%) 1	3	5	7	9	11
4℃	0.5	98.4	99.2	93.2	96.2	92.8	95.6
	10	96.8	95.8	95.8	94.3	97.2	93.5
－20℃	0.5	96.8	95.6	93.2	98.0	94.0	94.2
	10	98.4	95.8	99.4	98.1	99.2	94.4

2.5 滴眼组和球结膜下注射组的组织分布及药动学参数比较

0.3% LVFX 滴入眼结膜囊内或注入球结膜下后，于不同时间分别测得泪液、角膜、房水、虹膜－睫状体、晶状体和玻璃体中 LVFX 的含量，结果见表 3。

由表 3 可以看出，LVFX 注入球结膜下后，在角膜获得的峰浓度值最高，以后依次为虹膜－睫状体、房水、晶状体和玻璃体，且与滴眼组相比均有显著性差异($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

将所测得各组织的药物浓度数据经实用药物动力学程序(3P87)进行最佳拟合，均符合二室药动学模型，其药动学参数见表 4。

3 讨 论

LVFX 是新一代喹诺酮类抗感染药物，由于它的分子量小 (361)，脂溶性高，血清蛋白结合率低，因此有很强的组织穿透性[4,5]。研究表明 0.3%

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 3 LVFX 两种不同给药后眼各组织中的浓度变化($n=6, \bar{x} \pm s$, μg/g 或 μg/ml)

时间 (h)		泪液	角膜	房水	虹膜－睫状体	晶状体	玻璃体
0.125	A	706.56±189.07	12.37±2.40	0.35±0.15	2.30±0.75	0.30±0.05	0.05±0.02
	B	69.97±4.43**	6.54±0.86**	0.31±0.05	4.86±0.31**	0.60±0.05**	0.14±0.02**
0.25	A	453.48±122.98	16.26±3.37	0.56±0.26	3.36±0.66	0.43±0.07	0.11±0.05
	B	149.23±20.00**	12.28±2.52*	0.87±0.08*	8.01±0.51**	0.86±0.06**	0.21±0.01**
0.5	A	269.58±44.79	13.16±2.72	1.05±0.47	5.93±1.58	0.95±0.24	0.21±0.08
	B	323.73±17.89*	24.54±2.24**	1.96±0.12**	12.51±0.36**	1.59±0.08**	0.34±0.02*
1	A	137.05±29.06	9.52±3.07	0.82±0.32	3.32±0.52	0.54±0.08	0.12±0.05
	B	160.42±22.24	17.94±1.29**	1.09±0.11	7.76±0.33**	2.41±0.10**	0.20±0.01*
2	A	82.71±11.38	6.15±1.53	0.62±0.23	2.18±0.30	0.32±0.06	0.06±0.02
	B	73.26±8.16	8.50±0.72**	0.55±0.03	4.62±0.42**	1.44±0.08**	0.16±0.01**
3	A	43.39±4.97	3.91±1.24	0.37±0.15	1.51±0.28	0.22±0.05	0.04±0.01
	B	47.00±4.64	5.79±0.49*	0.37±0.03	3.18±0.25**	0.85±0.05**	0.12±0.01**
4	A	31.11±4.90	2.76±0.65	0.26±0.09	1.06±0.30	0.16±0.07	0.03±0.01
	B	30.14±3.59	3.98±0.47**	0.29±0.03	2.00±0.21**	0.48±0.05**	0.09±0.01**

A:滴药;B:注射,* $P<0.05$;** $P<0.01$。

表 4 LVFX 两种不同给药方式兔眼各部位的药动学参数($n=6, \bar{x} \pm s$)

组织		α h^{-1}	$T_{1/2\alpha}$ h	β h^{-1}	$T_{1/2\beta}$ h	$T_{(peak)}$ h	$C_{(max)}$ μg/g.ml	AUC h.μg/g 或 h.μg/ml
泪液	A	4.84±1.60	0.15±0.04	0.49±0.10	1.48±0.31			648.39±91.03
	B	2.21±0.34*	0.32±0.05**	0.34±0.11*	2.14±0.46*			471.75±24.91**
角膜	A	4.12±1.94	0.19±0.06	0.37±0.10	2.12±1.04	0.28±0.06	15.32±3.00	35.57±7.21
	B	1.56±0.16*	0.45±0.04**	0.25±0.06*	2.88±0.84	0.54±0.24*	19.39±1.81*	50.87±3.28**
房水	A	1.71±0.84	0.54±0.36	0.38±0.16	2.34±1.64	0.74±0.12	0.94±0.41	2.96±1.05
	B	1.88±0.44	0.38±0.08	0.20±0.07*	3.89±1.38	0.56±0.05*	1.40±0.10*	3.72±0.43
虹膜－睫状体	A	1.93±0.90	0.41±0.13	0.24±0.14	4.34±3.67	0.57±0.11	4.10±0.64	12.84±1.91
	B	2.38±0.66	0.32±0.12	0.36±0.06	1.97±0.37	0.41±0.18	10.47±0.32**	26.20±1.33**
晶状体	A	1.57±0.23	0.45±0.08	0.52±0.18	1.58±0.88	0.58±0.02	0.73±0.11	2.01±0.67
	B	4.73±6.77	0.72±0.53	0.62±0.05	1.124±0.09	0.82±0.41	2.03±0.19**	6.07±0.24**
玻璃体	A	1.49±0.12	0.47±0.04	0.12±0.14	2.59±1.16	0.66±0.06	0.14±0.05	0.37±0.11
	B	2.55±0.22**	0.27±0.02**	0.20±0.04	3.57±0.65	0.49±0.03**	0.28±0.02**	0.99±0.05**

A:滴药;B:注射,* $P<0.05$;** $P<0.01$。

LVFX 滴入兔眼后,能在眼大部分组织中达到较高的药物浓度,尤其是在眼前部组织,可治疗眼内常见感染性疾病[6,7]。在严重的细菌性角膜炎、眼内炎时,为了能在眼部组织获得更高的药物浓度,常常将药物注射于球结膜下,结膜下药物主要通过巩膜直接透入眼前节段[8,9]。本实验研究结果,LVFX 注入球结膜下后,角膜、房水、虹膜－睫状体、晶状体和玻璃体中达峰浓度(C_{max})分别为 19.39μg/g、1.40μg/ml、10.47μg/g、2.03μg/g 和 0.28μg/g,均高于滴眼液($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。并且角膜、虹膜－睫状体、晶状体和玻璃体 AUC(0～4h)分别为 50.87μg/g·h、26.20μg/g·h、6.07μg/g·h 和 0.99μg/g·h,与滴眼液组相比,也有显著性差异($P<0.01$);仅房水的 AUC(0～4h)与滴眼液组相似($P>0.05$)。结果表明,球结膜下注射 LVFX 后,除在角膜、虹膜－睫状体获得更高的药物浓度外,在晶状体和玻璃体内也可获得较高的药物浓度。

治疗眼部感染性疾病时,宜选用在感染部位易达到有效治疗浓度并能存留较长时间的抗感染药物。本实验结果,LVFX 注入球结膜下后 4h,角膜、虹膜·睫状体、晶状体和玻璃体中的药物浓度分别为 3.98μg/g、2.00μg/g、0.48μg/g 和 0.09μg/g,均明显高于滴眼液($P<0.01$),表明 LVFX 注入球结膜下后,能在角膜、虹膜－睫状体、晶状体和玻璃体中较长时间的保持较高的药物浓度,这为 LVFX 注入球结膜下给药治疗严重的细菌性角膜炎提供了依

维普资讯 http://www.cqvip.com

据。

综上所述,LVFX 注入球结膜下,在眼各组织中的峰浓度高,存留时间长,较滴入法更有利于治疗严重的细菌性角膜炎。但是,球结膜下注射是一种有创性的用药方式,反复球结膜下注射 LVFX,在局部是否会产生坏死或更严重的组织损伤,还有待于今后进一步研究。

参 考 文 献

[1] 王洪权,郭惠元.喹诺酮研究新进展[J].国外医药抗生素分册,1996;17(5):367-379.

[2] 陈 樱,喻长泰,甘晓萍.左氧氟沙星治疗细菌性角结膜炎的疗效[J].中国新药杂志,2001;10(3):216-218.

[3] 雷嘉川,张如鸿,罗顺德,等.反相高效液相色谱法测定洛氟沙星的血药浓度[J].药物分析杂志,1997;17(5):295-297.

[4] Fu KP, Lafredo SC, Foleno B, et al. In vitro and in vivo antibacterial activities of levofloxacin(L-ofloxacin), an optically active ofloxacin[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1992;36(4):860-866.

[5] Fiscella RG, Nguyen TK, Cwik MJ, et al. Aqueous and vitreous penetration of levofloxacin after oral administration[J]. Ophthalmology, 1999;106(12):2286-2290.

[6] 孙 航,杨淑群,周远大,等.左旋氧氟沙星的兔眼通透性研究[J].重庆医学,1998;27(6):398-399.

[7] 陈 悦,张俊杰,陈祖基.左氧氟沙星滴眼液的兔眼内药代动力学研究[J].眼科研究,2001;19(5):429-431.

[8] Marrakchi-Benjaafar S, Cochereau I, D'Hermies F, et al. Tolerability, kinetics, and efficacy of subconjunctival pefloxacin in pigmented rabbits[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1995;39(4):834-838.

[9] Lee TW, Robinson JR. Drug delivery to the posterior segment of the eye: some insights on the penetration pathways after subconjunctival injection[J]. J Ocul Pharmacol Ther, 2001;17(6):565-572.

(上接第 590 页)疗的供体细胞,但是其在体内脑组织中的分化及作用机制显然有较大差异。因此,MSCs 在体内外的定向诱导及机制研究仍是未来干细胞研究的热点。

值得注意的是,本实验为同种异体移植,但在实验中没有使用免疫抑制剂,而大鼠在 MSCs 植入后并没有出现不适的症状,在脑组织切片中也没有发现明显的炎性反应和淋巴细胞浸润。本课题组曾将人的 MSCs 从尾静脉植入 BALB/c 小鼠体内,小鼠存活 1 月并未观察到任何异常症状(资料未列出)。以上提示 MSCs 引起的免疫排斥反应小,机体可以耐受,有望用于神经细胞替代治疗。

参 考 文 献

[1] Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, et al. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potemial applications[J]. Stem cells, 2001;19(3):180-192.

[2] Chen J, Li Y, Wang L, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats[J]. Stroke, 2001;32(4):1005-1011.

[3] Wang JS, hum-Tim D, Galipeau J, et al. Marrow stromal cells for celluar cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2000;120(5):999-1005.

[4] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989;20(1):84-91.

[5] Woodbury D, Schwardz EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differemiate into neurons[J]. J Neuronsci Res, 2000;61(4):364-370.

[6] Azizi SA, Strokes D, Augelli BJ, et al. Engraftment and migrate of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats similarities to astrocytes grafts[J]. Proc. Natl Acad SciUSA, 1998;95(7):3908-3913.

[7] Mahmood A, Lu D, Yi L, et al. Intracranial bone marrow transplantation after traumatic brain injury improving functional outcome in adult rats[J]. J Neurosurg, 2001;94(4):589-595.

[8] Chopp M, Zhang XH, Li Y, et al. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation[J]. Neuroreport, 2000;11(13):3001-3005.