

止血带下克林霉素在兔肌肉组织中的分布特性

叶冬梅, 孙可, 陈晓宇(广西壮族自治区人民医院, 南宁 530021)

摘要: 目的 建立高效液相色谱法测定兔肌肉组织中的克林霉素, 并对止血带下肌肉组织中克林霉素的分布特征进行研究。方法 色谱条件为乙腈-四氢呋喃-磷酸盐缓冲液(30:1:70, pH=5)为流动相; 柱温: 40℃; 流速: 0.8 mL·min⁻¹; 替硝唑为内标, Luna C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)进行分离, 检测波长为 205 nm。测定静脉注射克林霉素 30, 60, 90, 120 min 后上止血带分别阻断血液循环 30, 60, 90 min 实验组与未止血对照组的肌肉组织中药物含量。结果 克林霉素在 10.58~264.5 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好, 日内 RSD≤2.58%, 日间 RSD≤4.20%。实验组克林霉素含量与对照组比较, $P<0.01$; 相同止血时机, 不同止血时间药物含量比较, $P>0.05$; 不同止血时机(30, 60, 90, 120 min)药物含量比较, $P<0.01$; 给药后 60 min 上止血带阻断肢体血液循环, 克林霉素在肌肉组织的含量最高, 为 39.30 μg·g⁻¹。结论 方法准确可靠、简便、重复性好; 实验组克林霉素含量与对照组有显著性差异; 围手术期预防感染, 上止血带时机是影响克林霉素组织分布的主要因素, 给药后 60 min 止血, 药物可充分分布到肌肉软组织中, 提高预防感染效果。

关键词: 克林霉素; 止血带; 高效液相色谱法; 分布

中图分类号: R965.1; R973.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2010)07-0584-04

Distribution of Clindamycin in Muscle of Rabbit with Tourniquet

YE Dongmei, SUN Ke, CHEN Xiaoyu(People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method to determine the content of clindamycin in muscle of rabbits, and to study its characteristics of distribution in muscle tissue of rabbits which were stopped bleeding by tourniquet. **METHODS** The mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile-tetrahydrofuran-phosphoric acid(30:1:70, pH=5) with a flow rate of 0.8 mL·min⁻¹. Tinidazole was used as an internal standard, the analytical column was packed with 5 μm C₁₈ at 40℃, and the detection wavelength was 205 nm. Experiment groups were stopped bleeding for 30, 60, 90 min after drug administration at 30, 60, 90, 120 min, respectively. Then, clindamycin in muscle of experiment and control groups were determined by HPLC. **RESULTS** The calibration curve of clindamycin was linear in the range of 10.58~264.5 μg·mL⁻¹. The RSD of intra and inter-day were smaller than 2.58% and 4.20%, respectively. The concentration of clindamycin in experiment group compared with that in control group was significant different($P<0.01$). In the same stopped bleeding occasion groups, multiple comparison among the different time length of stopping bleeding groups was not significant different ($P>0.05$), multiple comparison among the different occasion of stopping bleeding groups (30, 60, 90, 120 min) was significant different ($P<0.01$). The concentration of clindamycin was 39.30 μg·g⁻¹ in the group stopped bleeding after drug administration at 60 min, it is the highest content in experiment groups. **CONCLUSION** This method is accurate, reliable, simple and reproducible. The difference of concentrations of clindamycin in experiment groups compared with that in control groups is significant. Preventing infection in perioperative period, the occasion of stopping bleeding is the principal factor to affect the distribution of clindamycin in muscle tissue, stopping bleeding after drug administration at 60 min can make medicine distribute to muscle tissue completely, and enhance the efficiency of infection prevention.

KEY WORDS: clindamycin; tourniquet; HPLC; distribution

研究证实, 围手术期预防性应用抗生素对预防术后感染是肯定有效的, 应用抗生素的时机对防止骨科术后感染极为重要。抗生素在细菌感染之前就在组织中达到一定水平, 可以大大增强组织抗感染的能力^[1]。克林霉素常用于金葡菌、链球菌、肺炎球菌等革兰氏阳性菌和部分革兰氏阴性厌氧菌感染, 可进入大多数体液和组织中, 在多数组织中可达到有效水平^[2], 是骨科手术中青霉素

过敏患者的常用预防感染药物。骨科四肢手术通常需要使用止血带阻断肢体的血液循环, 同时也阻断了药物代谢的通道, 这种情况下药物浓度是否达到抑菌要求, 组织中药物浓度是否有变化, 尚未见文献报道。为充分了解阻断肢体血液循环克林霉素在肌肉组织中的分布特征, 本试验使用高效液相色谱法测定给药 30, 60, 90, 120 min 后分别阻断肢体血液循环 30, 60, 90 min 兔肌肉组

基金项目: 广西科学基金项目(桂科青 0542042)

作者简介: 叶冬梅, 女, 硕士, 副主任药师

Tel: (0771)2186165

E-mail: yedsm@sina.com

组织中克林霉素的含量, 研究局部阻断血液循环时机对兔肌肉组织中克林霉素分布特性的影响, 为临床药物应用提供参考依据。

1 仪器与试剂

1.1 试剂

克林霉素对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 130422-200404, 供含量测定用); 注射用克林霉素磷酸酯(珠海亿邦制药有限公司, 批号: 20070903, 600 mg·瓶⁻¹); 替硝唑对照品(湖北广济药业股份有限公司, 批号: 20070713, 纯度>99.5%); 甲醇、乙腈、四氢呋喃为色谱纯, 磷酸二氢钠、氢氧化钠、乙酸乙酯等试剂为分析纯。

1.2 仪器

Waters 600 高效液相色谱仪: 600 泵, 996 二极管阵列检测器(PDA), 7725i 进样阀; XW-80A 旋涡混合器(上海医科大学仪器厂); LDZ4-0.8 型离心机(北京医用离心机厂)。

1.3 实验动物

新西兰兔, 广西医科大学实验动物中心提供, 合格证号: SCXKG 桂 2003-0005。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 克林霉素对照品溶液 取克林霉素对照品 5 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 摇匀, 得浓度为 0.5 mg·mL⁻¹ 的克林霉素对照品贮备液, 置 4 °C 冰箱中冷藏备用。

2.1.2 内标溶液 取替硝唑对照品 5 mg, 精密称定, 置 5 mL 量瓶中, 加入适量甲醇溶解并定容, 摇匀, 得浓度为 1 mg·mL⁻¹ 内标溶液, 置 4 °C 冰箱中冷藏备用。

2.2 色谱条件

色谱柱为 Luna C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);

流动相为乙腈-四氢呋喃-磷酸缓冲溶液(30:1:70, pH=5); 柱温: 40 °C; 流速: 0.8 mL·min⁻¹; 检测波长: 205 nm; 进样量 10 μL。

2.3 分组给药及生物样品采集

新西兰兔 20 只, ♂, (2.5±0.5)kg, 分 4 组, 每组 5 只, A, B, C, D 组分别于给药 30, 60, 90, 120 min 后上止血带阻断双上肢(左上 E, 右上 F)及左下肢(G)血液循环为实验组, 右下肢(H)不上止血带为对照组。克林霉素剂量按 20 mg·kg⁻¹, 经兔耳缘静脉注射, 时间 1 min, 分别止血 30, 60, 90 min 后处死, 取每侧肢体肌肉, -20 °C 冷藏, 待测。另取未给药的相同饲养条件、同一批新西兰兔 3 只, 处死后立即取四肢上肌肉, 做空白肌肉, -20 °C 冷藏, 备用。

2.4 生物样品的处理

肌肉剔除脂肪和结缔组织取 0.5 g, 精密称定, 置匀浆管中, 加入灭菌生理盐水 2 mL, 匀浆。将匀浆液全部转移入尖底离心管中, 加入内标溶液 100 μL, 涡旋混匀 2 min, 加乙酸乙酯 2 mL, 涡旋 1 min, 离心 5 min(4 000 r·min⁻¹)。取乙酸乙酯层, 氮气吹干, 加入流动相 200 μL 重溶, 涡旋 1 min, 离心 5 min(10 000 r·min⁻¹), 取上清液 10 μL 进样分析。

2.5 方法专属性

取空白肌肉 0.5 g, 除不加内标液外, 其余按“2.4”项下“样品处理”依法操作, 得空白样品色谱图; 将一定浓度的克林霉素对照液和替硝唑内标液加入空白匀浆中, 同法操作, 获得相应的色谱图, 图中克林霉素与替硝唑完全分离。同样方法获得静脉注射克林霉素 60 min 后兔肌肉样品色谱图。结果表明, 肌肉中内源性物质对样品无干扰。理论板数按克林霉素计为 5 000, 按替硝唑计为 3 000, 分离度为 4.5, 见图 1。

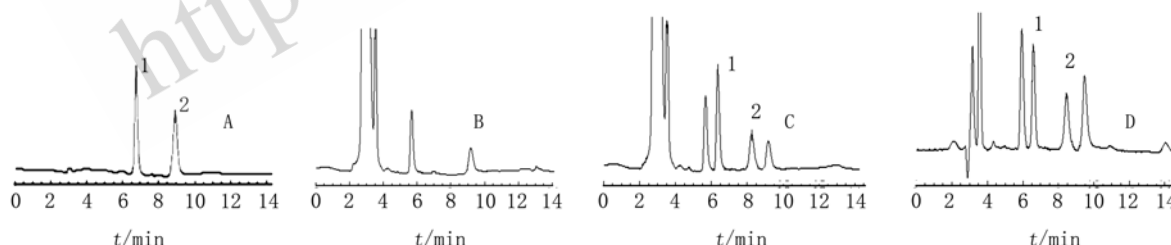


图 1 高效液相色谱图

A-混合对照品; B-空白组织; C-空白+克林霉素+替硝唑; D-样品(给药后 60 min); 1-替硝唑; 2-克林霉素

Fig 1 HPLC chromatograms

A-mingled control substance; B-blank tissue; C-blank tissue+clindamycin+tinidazole; D-sample (60 min after administration); 1-tinidazole; 2-clindamycin

2.6 标准曲线

取空白肌肉 0.5 g, 精密称定, 置匀浆管中, 加入灭菌生理盐水 2 mL, 匀浆, 分别加入克林霉素系列对照品溶液 200 μL , 使终浓度分别为 10.58, 21.16, 52.90, 105.8, 264.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。按“2.4”项下方法处理, 以克林霉素峰面积与内标峰面积的比值(A_s/A_i)为纵坐标, 浓度(C)为横坐标进行线性回归, 得直线回归方程, $A_s/A_i=0.009\ 0C+0.043$, $r=0.999\ 3$, 在 10.58~264.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好, 定量下限为 10.58 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (RSD=2.93%, $n=5$)。

2.7 精密度和回收率

按“2.4”项下配制 10.58, 105.8, 264.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

低、中、高浓度含药组织样品, 每个浓度 5 份, 以当天回归方程计算得到的浓度与加样浓度比较, 计算方法回收率($n=5$)和日内精密度($n=5$), 同法配制的样品连续测定 3 d, 得日间精密度($n=3$), 结果见表 1。

2.8 提取回收率

上述方法配制低、中、高浓度(10.58, 105.8, 264.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)含药组织样品, 每种浓度平行 5 份, 提取、进样分析, 记录色谱峰面积为 A_1 ; 另取以甲醇稀释的相应浓度对照品溶液进样, 峰面积为 A_2 。按公式: $F=(A_1/A_2)\times 100\%$ 计算得提取回收率, 结果见表 1。

表 1 克林霉素回收率及精密度($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Recovery rate and precision of clindamycin ($\bar{x}\pm s$)

加样浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	日内测定值/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	日内精密度/%	日间测定值/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	日间精密度/%	方法回收率/%	提取回收率/%
10.58	10.55 $\pm$ 0.27	2.56	10.17 $\pm$ 0.33	3.24	99.7 $\pm$ 1.4	67.1 $\pm$ 6.2
105.8	105.87 $\pm$ 2.87	2.71	102.46 $\pm$ 2.99	2.92	100.1 $\pm$ 2.7	73.7 $\pm$ 3.2
264.5	265.87 $\pm$ 6.85	2.58	262.46 $\pm$ 11.03	4.20	100.5 $\pm$ 2.6	78.2 $\pm$ 2.1

2.9 稳定性试验

2.9.1 对照品贮备液的稳定性 分别于 0, 1, 2, 3, 7, 15, 30, 60 d 取克林霉素对照品和替硝唑内标 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷藏的贮备液, 同法稀释进样, 记录峰面积, 结果克林霉素和替硝唑峰面积 RSD 分别是 1.1%, 1.4%, 未出现明显杂质峰。因此, 克林霉素对照品和替硝唑内标 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷藏的贮备液在 60 d 能保持稳定。

2.9.2 样品的稳定性 取低、中、高 3 种浓度(10.58, 105.8, 264.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的含药组织样品, 分别置室温(25 $^{\circ}\text{C}$)24 h, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存 15 d 及连续冻融 3 次(24, 48, 72 h), 测定各样品浓度。结果表明: 生物样品室温、-20 $^{\circ}\text{C}$ 放置及连续冻融 3 次的结果 RSD ($n=3$) 分别为 3.3%, 4.1%, 2.6%。表明克林霉素含药组织样品室温放置 24 h, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存 15 d、连续冻融 3 次能保持稳定。

2.9.3 样品处理后分析液室温稳定性 低、中、高 3 种浓度(10.58, 105.8, 264.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的含药组织样品, 按“2.4”项下处理, 分析液室温下分别于 0, 1, 2, 4, 8 h 进样测定, 结果, 8 h 内测得值的 RSD 为 2.6%, 表明克林霉素在分析液中 8 h 内稳定。

2.10 克林霉素在兔肌肉组织中的分布

按“2.4”项下方法处理, 测定待测肌肉中克林

霉素含量, 结果, 经统计学软件 SPSS 分析, 阻断循环肢数据(E, F, G)在相同止血时机、相同止血时间组中, $P>0.05$, 表明药物在各肢体分布无显著性差异; 与对照组(H)比较, $P<0.01$, 有统计学差异, 表明上止血带阻断肢体循环对克林霉素肌肉组织分布有显著性影响。不同止血时机组(A, B, C, D)之间比较, $P<0.01$, 有极显著性差异; 相同止血时机组中, 不同止血时长(30, 60, 90 min)之间比较, $P>0.05$, 无显著性差异, 表明止血时机是影响克林霉素肌肉组织分布的主要因素。给药后 60 min 上止血带阻断肢体血液循环, 克林霉素在肌肉组织的含量最高。见表 2。

3 讨论

本试验建立的检测方法, 兔肌肉中克林霉素在 10.58~264.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好, 方法准确可靠, 简便, 重复性好。

中国药典 2005 版二部中盐酸克林霉素含量测定流动相为磷酸二氢铵溶液-甲醇(210:300)^[3]。应用该流动相进行实验时, 克林霉素和内标物替硝唑峰分离不完全, 经多次试验, 改用乙腈-四氢呋喃-磷酸缓冲溶液(30:1:70, pH=5)为流动相, 可使克林霉素和内标物替硝唑峰完全分离, 峰形改善, 对称性较好, 保留时间适宜。

文献[4]在组织样品预处理时, 对提取溶剂、提

表 2 肌肉组织中克林霉素的含量($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 The content of clindamycin in muscle tissues ($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

编号	E/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	F/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	G/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$\bar{x} \pm s$ ($n=15$)	H/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
A30	30.06 $\pm$ 2.37 ¹⁾	28.61 $\pm$ 2.78 ¹⁾	29.54 $\pm$ 2.84 ¹⁾	28.74 $\pm$ 3.26 ²⁾	39.11 $\pm$ 2.99
A60	28.41 $\pm$ 2.80 ¹⁾	27.43 $\pm$ 3.13 ¹⁾	27.89 $\pm$ 3.50 ¹⁾	27.91 $\pm$ 2.95 ²⁾	20.22 $\pm$ 3.40
A90	29.12 $\pm$ 3.90 ¹⁾	29.20 $\pm$ 3.11 ¹⁾	26.81 $\pm$ 4.14 ¹⁾	28.38 $\pm$ 3.65 ²⁾	13.49 $\pm$ 2.01
$\bar{x} \pm s$	28.50 $\pm$ 3.11 ⁶⁾ , ($n=45$, E, F, G)				
B30	40.91 $\pm$ 2.95 ¹⁾	39.61 $\pm$ 3.35 ¹⁾	38.81 $\pm$ 3.21 ¹⁾	39.56 $\pm$ 2.96 ³⁾	19.64 $\pm$ 2.29
B60	39.44 $\pm$ 3.06 ¹⁾	38.65 $\pm$ 3.83 ¹⁾	37.82 $\pm$ 2.58 ¹⁾	38.64 $\pm$ 3.04 ³⁾	14.06 $\pm$ 2.02
B90	38.42 $\pm$ 4.00 ¹⁾	37.80 $\pm$ 2.18 ¹⁾	38.63 $\pm$ 4.50 ¹⁾	38.28 $\pm$ 3.44 ³⁾	5.05 $\pm$ 0.76
$\bar{x} \pm s$	38.83 $\pm$ 3.13 ⁶⁾ , ($n=45$, E, F, G)				
C30	22.39 $\pm$ 1.63 ¹⁾	20.83 $\pm$ 1.14 ¹⁾	21.60 $\pm$ 1.23 ¹⁾	21.61 $\pm$ 1.42 ⁴⁾	14.91 $\pm$ 0.66
C60	21.86 $\pm$ 1.78 ¹⁾	21.61 $\pm$ 1.78 ¹⁾	22.35 $\pm$ 1.63 ¹⁾	21.94 $\pm$ 1.63 ⁴⁾	6.19 $\pm$ 0.90
C90	22.29 $\pm$ 1.59 ¹⁾	22.16 $\pm$ 2.03 ¹⁾	20.55 $\pm$ 1.20 ¹⁾	21.67 $\pm$ 1.72 ⁴⁾	4.13 $\pm$ 1.05
$\bar{x} \pm s$	21.74 $\pm$ 1.57 ⁶⁾ , ($n=45$, E, F, G)				
D30	14.77 $\pm$ 0.95 ¹⁾	15.33 $\pm$ 0.97 ¹⁾	15.14 $\pm$ 1.35 ¹⁾	15.08 $\pm$ 1.05 ⁵⁾	6.83 $\pm$ 1.08
D60	15.64 $\pm$ 1.28 ¹⁾	15.21 $\pm$ 1.10 ¹⁾	16.16 $\pm$ 1.03 ¹⁾	15.67 $\pm$ 1.13 ⁵⁾	5.30 $\pm$ 0.67
D90	15.19 $\pm$ 1.07 ¹⁾	14.73 $\pm$ 0.97 ¹⁾	15.56 $\pm$ 1.08 ¹⁾	14.96 $\pm$ 0.91 ⁵⁾	3.94 $\pm$ 0.35
$\bar{x} \pm s$	15.24 $\pm$ 1.07 ⁶⁾ , ($n=45$, E, F, G)				

注: 同组实验肢与对照肢比较, ¹⁾ $P<0.01$; 相同止血时机组中, 不同止血时间(30, 60, 90 min)两两比较, ²⁾ P , ³⁾ P , ⁴⁾ P , ⁵⁾ $P>0.05$; 不同止血时机组(A, B, C, D)实验肢两两比较, ⁶⁾ $P<0.01$

Note: Experiment limbs compared with the control in the same groups, ¹⁾ $P<0.01$, in the same occasion of stopping bleeding groups, multiple comparison among the different time length of stopping bleeding groups, ²⁾ P , ³⁾ P , ⁴⁾ P , ⁵⁾ $P>0.05$, multiple comparison among the different occasion of stopping bleeding groups(A, B, C, D), ⁶⁾ $P<0.01$

取次数进行选择, 用乙醚提取率较低, 用二氯甲烷提取 2 次, 每次用量 2 mL 时, 易产生乳化现象。本实验用乙酸乙酯提取, 避免了乳化现象, 样品峰、内标峰和内源性杂质峰分离良好, 稳定性好, 药物检出灵敏度较高。

本实验以替硝唑作为内标物, 在优化的色谱条件下, 内标物与样品的内源性物质以及克林霉素均能实现较好的分离, 保留时间短。药典检测波长为 214 nm, 本试验经紫外扫描, 205 nm 处吸收较 214 nm 处的吸收强, 为提高检测灵敏度, 选择 205 nm 作为检测波长。

本试验首次对止血带下肌肉组织中克林霉素的分布特征进行了研究, 结果, 模拟临床手术模型, 分别于给药后 30, 60, 90, 120 min 上止血带阻断肢体血液循环, 分别止血 30, 60, 90 min 后, 实验组克林霉素含量与对照组有统计学差异($P<0.01$), 给药后 60 min 上止血带阻断肢体血液循环, 克林霉素在肌肉组织的含量最高。对克林霉素的抗菌作用

研究表明克林霉素对金葡菌 MIC_{90} 为 $32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 表葡菌 $>32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 溶血性链球菌 $>32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ [5]。提示手术中使用克林霉素进行围手术期预防感染, 予止血时间应在给药后 60 min, 以便药物充分分布到肌肉软组织中, 提高预防感染效果。

REFERENCES

[1] HE L M, XIANG Z Y, CHEN X R, et al. Guidelines on anti-infection medicine in clinical application(抗感染药物临床应用指南) [M]. Zhengzhou: Henan University Publishing House, 2001: 173.

[2] WANG F, ZHANG Y Y. Practical antibacterial therapeutics (实用抗感染治疗学) [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 2004: 278-279.

[3] Ch.P(2005)Vol II (中国药典 2005 年版.二部) [S]. 2005: 515.

[4] GONG H M, QIN Q, MIN H, et al. Determination of clindamycin in human plasma by high performance liquid chromatography [J]. Cent South Pharm(中南药学), 2008, 6(5): 536-538.

[5] ZHANG Y X, WU Y L, WU J F, et al. Antibacterial activity and clinical effect of domestic clindamycin [J]. Shanghai Med Pharm (上海医药), 1998, 19(9): 8-11.

收稿日期: 2009-09-07