

· 实验研究 ·

布替萘芬纳米胶束兔眼局部点眼药代动力学研究

卢萍 梁珍 张振 杨晶晶 宋菲 李景果 周天洋 张俊杰

河南省立眼科医院 河南省眼科研究所 河南省人民医院 郑州大学人民医院 河南大学人民医院, 郑州 450003

通信作者: 张俊杰, Email: zhangjj66@126.com

【摘要】 目的 研究广谱抗真菌药物布替萘芬纳米胶束(BTF-NM)兔眼局部点眼后的药代动力学。**方法** 采用自组装法制备 BTF-NM, 利用纳米粒度-Zeta 电位分析仪测定 BTF-NM 的粒径、多分散系数(PDI)和 Zeta 电位; 采用高效液相色谱法(HPLC)测定包封率。取健康无眼疾新西兰白兔 42 只, 采用随机数字表法将实验兔分为 BTF-NM 组和布替萘芬混悬剂(BTF-S)组, 2 个组均采用相应药物双眼结膜囊内点眼, 单次点眼 50 μ l。分别于点眼后 5、15、30、60、120、180 和 240 min 将直径 7.5 mm 滤纸片置于兔眼结膜囊内, 停留 1 min 后取出, 以收集泪液样品, 然后经兔耳缘静脉注射质量分数 4% 戊巴比妥钠溶液处死实验兔, 抽取房水, 剖取角膜组织, 利用 HPLC 检测各样本组中布替萘芬(BTF)药物浓度。**结果** BTF-NM 的粒径为 (15.65 ± 0.04) nm, PDI 为 0.11 ± 0.01 , Zeta 电位为 (-0.29 ± 0.36) mV, 包封率为 $(98.38 \pm 0.29)\%$ 。BTF-NM 组单次点眼后泪液和角膜组织中药物达峰时间(T_{max})均为 5 min, 药物峰质量分数分别为 (485.21 ± 66.29) μ g/g 和 (12.53 ± 2.32) μ g/g, 分别是 BTF-S 组的 5.6 倍和 78 倍, 在观察时间内, BTF-NM 组泪液和角膜中各时间点的药物质量分数显著高于对应时间点 BTF-S 组的药物质量分数, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。BTF-NM 组泪液和角膜的药物浓度-时间曲线下面积(AUC) $_{0-240 \text{ min}}$ 分别为 7488.90 (μ g/g) $\cdot$ min 和 829.01 (μ g/g) $\cdot$ min, 分别是 BTF-S 组的 7.2 倍和 52 倍。BTF-NM 组和 BTF-S 组的房水中均未检测到药物。**结论** BTF-NM 的制备工艺简单, 包封率高, 粒径小。与 BTF-S 相比, BTF-NM 制剂可明显提高 BTF 在兔眼角膜中的生物利用度。

【关键词】 布替萘芬; 纳米胶束; 眼药代动力学; 兔; 高效液相色谱法

基金项目: 国家自然科学基金联合重点项目(U1704283); 河南省科技厅基础与前沿项目(142300410057)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200526-00374

Ocular pharmacokinetics of topical administration of butenafine nanomicelles in rabbit eyes

Lu Ping, Liang Zhen, Zhang Zhen, Yang Jingjing, Song Fei, Li Jingguo, Zhou Tianyang, Zhang Junjie

Henan Eye Institute, Henan Eye Hospital, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou University People's Hospital, Henan University People's Hospital, Zhengzhou 450003, China

Corresponding author: Zhang Junjie, Email: zhangjj66@126.com

[Abstract] Objective To study the pharmacokinetics of the broad-spectrum antifungal drug butenafine nanomicelles (BTF-NM) after topical instillation. **Methods** The self-assembly method was used to prepare BTF-NM. The particle size, Zeta potential, and polydispersity index (PDI) of BTF-NM were measured by a nano-particle size-Zeta potential analyzer, and the encapsulation efficiency was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). Forty-two healthy New Zealand white rabbits without eye disease were randomly divided into the BTF-NM group and the BTF suspension (BTF-S) group. The corresponding drugs were instilled in the conjunctival sac with a single instillation of 50 μ l. The 7.5 mm filter paper was placed in the conjunctival sac of rabbit eye for 1 minute at 5, 15, 30, 60, 120, 180, 240 minutes after the administration. Then the rabbits were sacrificed by intravenous injection of 4% sodium pentobarbital solution through the ears of the rabbits. The aqueous humor was extracted and the corneal tissue was dissected. The drug concentration of BTF in different tissues was measured by HPLC. The study was approved by the Life Science Ethics Review Committee of Henan Eye Hospital (No. HNEECA-

2019-01). **Results** The particle size and PDI of BTF-NM were (15.65 ± 0.04) nm and 0.11 ± 0.01 , respectively, the Zeta potential was (-0.29 ± 0.36) mV, the encapsulation rate was $(98.38 \pm 0.29)\%$. The peak time of the drug both in tears and corneal tissues after BTF-NM application was 5 minutes. The peak concentrations of the drug in tears and corneas of the BTF-NM group were (485.21 ± 66.29) $\mu\text{g/g}$ and (12.53 ± 2.32) $\mu\text{g/g}$, which were 5.6 and 78 times than that of the BTF-S group, respectively. Within the observation time, the mass fractions of the drug in tears and corneas of the BTF-NM group at each time point were significantly higher than those of BTF-S group at corresponding time points (all at $P < 0.01$), respectively. The area under the concentration-time curve (AUC)_{0-240 minutes} in tears and corneas of the BTF-NM group was 7488.90 ($\mu\text{g/g}$) $\cdot$ minute and 829.01 ($\mu\text{g/g}$) $\cdot$ minute, which was 7.2 and 52 times than that of the BTF-S group, respectively. No drugs were detected in the aqueous humor of the BTF-NM group and the BTF-S group. **Conclusions** BTF-NM is an ideal agent with a simple preparing process, high drug encapsulation efficiency and small particle size. Compared with BTF suspension, BTF-NM can significantly improve the bioavailability of BTF in rabbit corneas.

[Key words] Butenafine; Nanomicelles; Ocular pharmacokinetics; Rabbits; High-performance liquid chromatography

Fund program: Joint Key Project of National Natural Science Foundation of China (U1704283); The Bureau of Science and Technology of Henan Province (142300410057)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200526-00374

真菌性角膜炎是致盲率较高的感染性眼病,引起眼部感染的常见菌种是镰刀菌和曲霉菌,近年来研究表明曲霉菌属引起的真菌性角膜炎比例逐渐升高,而镰刀菌属所占比例呈下降趋势,这可能与抗生素和糖皮质激素的广泛使用导致真菌出现耐药性有关^[1-3]。真菌性角膜炎的治疗方法主要有药物和手术治疗,常用的抗真菌药物有三唑类的伏立康唑、氟康唑和多烯类的那他霉素、两性霉素 B 等,但这些药物多是疏水性药物,角膜渗透性差,生物利用度低,治疗效果不佳^[4]。因此开发新的眼局部药物传递系统和增强药物的角膜渗透力是眼科抗真菌药物研究的重要任务之一。布替萘芬(butenafine, BTF)是丙酰胺类抗真菌药物,可选择性抑制真菌的角鲨烯环氧化酶,致真菌麦角固醇合成障碍,真菌细胞膜合成受阻,导致真菌死亡,目前多用于皮肤真菌感染^[5-7]。研究证实, BTF 对眼部真菌具有广谱抗菌活性,对曲霉菌属、互隔交链孢霉及新月弯孢霉的抗菌活性尤强,但该药是疏水性药物,渗透性差,生物利用度低,目前尚无在眼科应用的研究报道^[8-9]。D- α -生育酚聚乙二醇琥珀酸酯(D- α -tocopheryl polyethylene glycol succinate, TPGS)是一种安全、可降解的生物材料,可用于制备载体前体药物、胶束和固体分散体,修饰脂质体,并作为增溶剂、渗透促进剂、乳化剂、吸收促进剂等应用于药物制剂研究中^[10-12]。药物材料研究表明,纳米胶束(nanomicelles, NM)可增大疏水性药物的溶解度,从而提高药物的生物利用度,且 NM 粒径约为 20 nm,可通过人角膜上皮^[13-14]。因此推测如果将 BTF 药物制备成 NM 制剂

则有望成为临床上用于真菌性角膜炎局部治疗的有效药物。本研究拟探讨布替萘芬纳米胶束(butenafine nanomicelles, BTF-NM)的制备及其点眼后在眼组织中的药代动力学变化,为 BTF-NM 在真菌性角膜炎治疗中的应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂及仪器 TPGS、盐酸布替萘芬(大连美伦生物技术有限公司);聚乙二醇 400(polyethylene glycol 400, PEG400)(郑州派尼化学试剂厂);甲醇(德国 Merck 公司)。2695 型高效液相色谱分析系统(high performance liquid chromatography, HPLC)(美国 Waters 公司);JA5003 电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);LD5-2A 低速离心机(北京医用离心机厂);MiniSpin plus 离心机(德国 Eppendorf 公司);HGC-24A 氮吹仪(天津市恒奥科技发展有限公司);纳米粒度-Zeta 电位分析仪(英国马尔文公司)。

1.1.2 实验动物 普通级健康无眼疾新西兰白兔 42 只(购自郑州市惠济区华兴实验动物养殖场,合格证号:2019120659),体质量 2.0~2.5 kg,饲养于河南省食品药品检验所动物房,实验期间实验兔自由进食和饮水。实验前经外观检查、荧光素钠染色、在钴蓝光下用手持裂隙灯显微镜检查兔眼角膜上皮的完整性,角膜结构完整者可进行实验。本研究方案经河南省立眼科医院生命科学伦理审查委员会审核批准(批文号:HNEECA-2019-01)。

1.2 方法

1.2.1 实验药物的制备 (1) BTF-NM 的制备 称取 TPGS 3.00 g、盐酸布替萘芬 0.30 g 和 PEG400 5.00 g, 加水 45 ml, 加热搅拌至药物完全溶解, 用 1 mol/ml NaOH 溶液调节 pH 至 6.8, 定容至 50 ml, 得到质量分数 0.6% BTF-NM 溶液。(2) 布替萘芬混悬剂 (BTF suspension, BTF-S) 的制备 称取玻璃酸钠 0.05 g, 加水 45 ml, 加热搅拌溶解, 冷却至室温, 加入盐酸布替萘芬 0.30 g, 搅拌 30 min, 用 1 mol/ml NaOH 溶液调节 pH 至 6.8, 加水定容至 50 ml, 得到质量分数 0.6% BTF-S。利用纳米粒度-Zeta 电位分析仪并采用动态光散射原理测定胶束的粒径、电位和多分散系数 (polydispersity index, PDI), 采用 HPLC 测定包封率。

1.2.2 实验兔点眼及标本采集 采用随机数字表法将实验动物分为 BTF-NM 组和 BTF-S 组, 每组 21 只, 按照点眼后采集标本和实施实验的时间不同将 2 个组实验兔随机分为 7 个时间亚组, 每组 3 只。采用单次给药的方式点眼, BTF-NM 组双眼结膜囊内各滴入 BTF-NM 溶液 50 μ l, BTF-S 组双眼结膜囊内各滴入 BTF-S 50 μ l; 分别于点眼后 5、15、30、60、120、180、240 min 将直径 7.5 mm 滤纸片置于兔眼结膜囊内, 停留 1 min 后取出, 以收集泪液样品, 滤纸片使用前后的称量差值为泪液质量。然后立即用质量分数 0.9% 氯化钠溶液冲洗兔眼, 用过量质量分数 4% 戊巴比妥钠行兔耳缘静脉注射处死实验兔, 在距角膜缘 1 mm 处用 1 ml 注射器刺入前房抽取房水约 200 μ l, 剖取角膜组织, 生理盐水冲洗, 滤纸吸干后作为角膜样品。以上样本均放置在 -80 $^{\circ}$ C 冰箱内保存备用。

1.2.3 样品分析方法的建立 取出角膜和泪液标本, 室温下将角膜标本均剪成 1~2 mm 小块, 分别置于 200 μ l 甲醇中, 振荡 1 min, 密封, 4 $^{\circ}$ C 放置 24 h。取出样品, 离心半径 9.5 cm, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液进行 HPLC 检测。

1.2.3.1 色谱条件 色谱柱: Waters X Terra[®] MS C18, 3.0 $\times$ 150 mm, 3.5 μ m; 流动相: $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=90:10$; 流速: 0.4 ml/min; 检测波长: 282 nm; 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 进样量: 10 μ l。

1.2.3.2 工作曲线的配制 (1) 泪液工作曲线的配制 分别取 10.00、5.00、2.50、1.25、0.50、0.25、0.10 μ g/ml BTF 标准溶液各 100 μ l, 置于 5 ml 尖头玻璃试管中, 氮气吹干, 分别加入空白泪液 100 μ l (轻轻拉开未给药的实验兔眼睑, 将滤纸片放入眼表, 1 min 后取出, 将滤纸片置于 200 μ l 甲醇中浸泡 24 h), 涡旋振荡 1 min, 离心半径 3.5 cm, 3 000 r/min 离心 6 min,

取上清液 90 μ l, 分别得到 10.00、5.00、2.50、1.25、0.50、0.25、0.10 μ g/ml 泪液工作液, 进行 HPLC 分析。以药物质量浓度为横坐标 (X)、色谱峰面积 (Y) 为纵坐标, 求得泪液的线性回归方程。(2) 角膜工作曲线的配制 分别取 5.00、2.50、1.00、0.50、0.20、0.10、0.04 μ g/ml BTF 标准溶液各 100 μ l, 置于 5 ml 尖头玻璃试管中, 氮气吹干, 分别加入空白角膜浸出液 100 μ l (将空白角膜标本剪成 1~2 mm 的小块, 置于 200 μ l 甲醇中, 浸泡 24 h), 涡旋振荡 1 min, 离心半径 3.5 cm, 3 000 r/min 离心 6 min, 取上清液约 90 μ l, 分别得到 5.00、2.50、1.00、0.50、0.20、0.10、0.04 μ g/ml 角膜工作液, 进行 HPLC 分析。以药物质量浓度为横坐标 (X)、色谱峰面积 (Y) 为纵坐标, 得到角膜的线性回归方程。

1.2.3.3 精密度和准确度实验 (1) 泪液样品精密度和准确度分析 分别取 5.00、1.25、0.25 μ g/ml BTF 标准液各 100 μ l, 按照 1.2.3.2 中泪液工作曲线的制备方法制备 5.00、1.25、0.25 μ g/ml 泪液样本各 3 份, 测定并计算回收率, 求得批内相对标准差 (relative standard deviation, RSD), 每日固定时间点测定 1 次, 连续测量 3 d, 求得批间 RSD。(2) 角膜样品精密度和准确度分析 分别取 2.50、0.50、0.10 μ g/ml BTF 标准液各 100 μ l, 按照 1.2.3.2 中角膜工作曲线的制备方法制备 2.50、0.50、0.10 μ g/ml 角膜液样本各 3 份, 测定并计算回收率, 求得批内 RSD, 3 d 内连续测定 3 次, 求得批间 RSD。

1.2.3.4 提取回收率实验 (1) 泪液样品回收率测定 分别取 5.00、1.25、0.25 μ g/ml BTF 标准液各 100 μ l, 加入空白泪液, 密封, 2~8 $^{\circ}$ C 浸泡过夜, 离心半径 9.5 cm, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清约 90 μ l, 得到提取回收率样品 (extraction recovery sample, ES), 每个浓度平行制备 3 份。另取相对应质量分数的标准液各 100 μ l, 加入相对应泪液质量的生理盐水, 混匀, 得到提取回收率的对照样品 (extraction recovery contrast, EC), 每个浓度平行制备 3 份。用 HPLC 对 ES 和 EC 样品进行检测。对比 ES 样品与 EC 样品峰面积计算提取回收率。提取回收率 (%) = $(A_{\text{ES}}/A_{\text{EC}}) \times 100\%$ 。(2) 角膜样品回收率测定 分别取 2.50、0.50、0.10 μ g/ml BTF 标准液各 100 μ l, 加入剪碎的空白角膜组织块约 0.015 g, 密封, 2~8 $^{\circ}$ C 浸泡过夜, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清得到 ES, 每个浓度平行制备 3 份。另取相对应浓度的标准液各 100 μ l, 加入相对应角膜质量的生理盐水, 混匀, 得到 EC, 每个浓度平行制备 3 份。用 HPLC 对 ES 和 EC 样品进行检

测。对比 ES 样品与 EC 样品峰面积计算提取回收率。
提取回收率(%) = $(A_{ES}/A_{EC}) \times 100\%$ 。

1.2.3.5 样品稳定性实验 (1) 泪液样品稳定性分析 按照 1.2.3.2 中泪液工作曲线的制备方法制备 5.00、1.25、0.25 $\mu\text{g/ml}$ 泪液样本,各 3 份,室温下分别放置 0、12、24 h,行样品测定并记录峰面积。(2) 角膜样品稳定性分析 按照 1.2.3.2 中角膜工作曲线制备方法制备 2.50、0.50、0.10 $\mu\text{g/ml}$ 角膜样本各 3 份,室温下分别放置 0、12、24 h,行样品测定并记录峰面积。
1.2.4 药代动力学参数测定 采用 DAS 2.1.1 药代动力学软件计算各组单次点眼后各组织中药物达峰时间(peak time, $T_{\max}$)、药物达峰质量分数(peak concentrations, $C_{\max}$)、消除半衰期(half time, $T_{1/2}$)、药物浓度-时间曲线下面积(area under the content-time curve, AUC)。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析。计量资料经 W 检验证实呈正态分布,以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示,组间数据资料经 Levene 检验方差齐($P > 0.05$)。2 个组给药后不同时间点泪液和角膜组织中的药物质量分数比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BTF-NM 的粒径、Zeta 电位和包封率

不同粒径胶束的光散射强度分布见图 1, BTF-NM 粒径为 10~40 nm, 平均 $(15.65 \pm 0.04) \text{ nm}$, PDI 为 0.11 ± 0.01 , 表明制备的胶束粒径分布均匀(图 1)。BTF-NM 的 Zeta 电位为 $(-0.29 \pm 0.36) \text{ mV}$, 接近电中性, 包封率为 $(98.38 \pm 0.29) \%$ 。

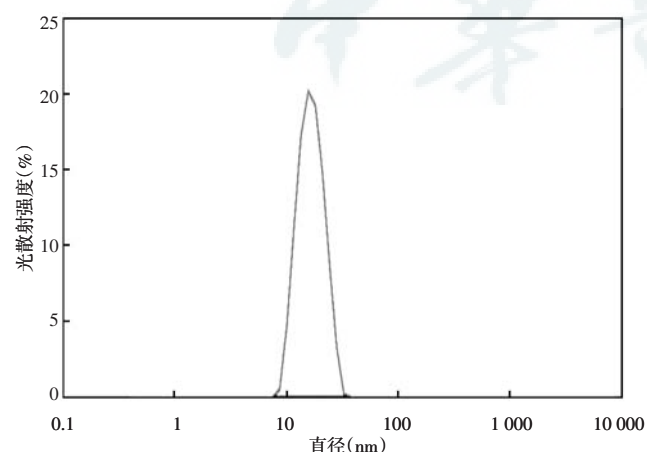


图 1 BTF-NM 的粒径分布图 BTF-NM: 布替萘芬纳米胶束

Figure 1 Size distribution of the BTF-NM BTF-NM: butenafine nanomicelles

2.2 样品分析

2.2.1 不同样品的标准回归方程 泪液、角膜的线性回归方程分别为 $Y_{\text{泪液}} = 585.99X + 0.51$ ($R^2 = 0.9999$)、 $Y_{\text{角膜}} = 492.01X + 2.54$ ($R^2 = 0.9996$), 结果均表明在设定浓度范围内的线性关系良好, 满足实验测定要求。

2.2.2 不同样品中药物精密度和准确度 5.00、1.25、0.25 $\mu\text{g/ml}$ 泪液模拟样品和 2.50、0.50、0.10 $\mu\text{g/ml}$ 角膜模拟样品的准确度和精密度结果见表 1、2。泪液中样品平均回收率为 98%~102%, 各浓度批内、批间 RSD 均小于 10%。角膜中样品平均回收率为 96%~102%, 各浓度批内、批间 RSD 均小于 10%。

表 1 泪液中药物的精密度与准确度
Table 1 Precision and accuracy of drugs in tears

药物质量 浓度($\mu\text{g/ml}$)	样本量	平均回收率(%)	批内 RSD(%)	批间 RSD(%)
0.25	3	102.04 $\pm$ 6.79	5.49	8.27
1.25	3	98.09 $\pm$ 4.35	4.72	3.44
5.00	3	101.11 $\pm$ 1.98	1.28	4.12

注: RSD: 相对标准差

Note: RSD: relative standard deviation

表 2 角膜组织中药物的精密度与准确度
Table 2 Precision and accuracy of drugs in corneal tissue

药物质量 浓度($\mu\text{g/ml}$)	样本量	平均回收率(%)	批内 RSD(%)	批间 RSD(%)
0.10	3	102.02 $\pm$ 10.62	6.18	9.41
0.50	3	96.74 $\pm$ 6.97	7.16	7.21
2.50	3	96.84 $\pm$ 6.34	6.34	6.79

注: RSD: 相对标准差

Note: RSD: relative standard deviation

2.2.3 不同样品中药物的提取回收率 5.00、1.25、0.25 $\mu\text{g/ml}$ 泪液模拟样品和 2.50、0.50、0.10 $\mu\text{g/ml}$ 角膜模拟样品的提取回收率结果见表 3、4, 泪液中样品的提取回收率为 92%~102%, 角膜组织中样品的提取回收率为 90%~96%, 表明 BTF 在泪液和角膜组织中的提取回收率可满足实验要求。

表 3 泪液中药物的提取回收率
Table 3 Recovery rate of drugs in tears

药物质量 浓度($\mu\text{g/ml}$)	样本量	平均回收率(mean $\pm$ SD, %)	RSD(%)
0.25	3	92.76 $\pm$ 6.02	6.75
1.25	3	102.30 $\pm$ 4.39	4.59
5.00	3	101.77 $\pm$ 5.23	4.31

注: RSD: 相对标准差

Note: RSD: relative standard deviation

表 4 角膜组织中药物的提取回收率
Table 4 Recovery rate of drugs in corneal tissue

药物质量 浓度 (μg/ml)	样本量	平均回收率 (mean±SD, %)	RSD (%)
0.10	3	90.97±2.18	7.75
0.50	3	95.36±2.91	3.29
2.50	3	96.65±4.03	3.97

注: RSD: 相对标准差
Note: RSD: relative standard deviation

2.2.4 不同样品中药物的稳定性分析 5.00、1.25、0.25 μg/ml 泪液模拟样品和 2.50、0.50、0.1 μg/ml 角膜模拟样品在室温放置 0、12、24 h 后的稳定性结果见表 5、6, 各样品 RSD 值均小于 10%, 说明样品在室温条件下储存药物的含量未发生明显变化。

表 5 泪液中药物的稳定性
Table 5 The stability of drugs in tears

药物质量 浓度 (μg/ml)	样本 量	平均回收率 (mean±SD, %)			RSD (%)
		0 h	12 h	24 h	
0.25	3	102.38±6.98	98.67±4.67	103.21±6.09	2.38
1.25	3	97.01±3.74	100.60±4.43	101.82±3.76	2.51
5.00	3	96.45±10.46	101.45±8.31	100.96±8.54	2.77

注: RSD: 相对标准差
Note: RSD: relative standard deviation

表 6 角膜组织中药物的稳定性
Table 6 The stability of drugs in corneal tissue

药物质量 浓度 (μg/ml)	样本 量	平均回收率 (mean±SD, %)			RSD (%)
		0 h	12 h	24 h	
0.10	3	90.98±6.01	96.96±9.92	103.31±9.02	6.35
0.50	3	96.01±5.79	101.10±5.93	102.82±8.48	3.54
2.50	3	94.45±10.46	97.60±10.48	102.96±9.89	4.35

注: RSD: 相对标准差
Note: RSD: relative standard deviation

2.3 BTF-NM 在兔眼泪液和角膜中药代动力学参数

BTF-NM 组单次点眼后泪液和角膜组织中 BTF 的 T_{max} 均为 5 min, 其 C_{max} 分别是 BTF-S 组的 5.6 倍和 78 倍。BTF-NM 组泪液和角膜中各时间点的药物质量分数均高于对应时间点 BTF-S 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$) (图 2)。BTF-NM 组单次点眼后 BTF 在泪液和角膜的 $AUC_{0-240 min}$ 分别是 BTF-S 组的 7.2 倍和 52 倍 (表 7、8)。BTF-NM 组和 BTF-S 组的房水中均未检测到药物。

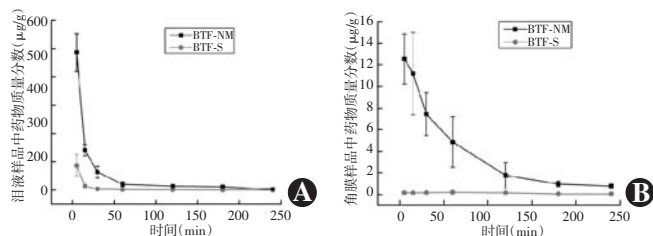


图 2 BTF-NM 组与 BTF-S 组兔眼单次点眼后 BTF 在泪液和角膜中不同时间点的药物质量分数-时间曲线 ($n=6$) A: 泪液 B: 角膜
BTF-NM: 布替萘芬纳米胶束; BTF-S: 布替萘芬混悬剂

Figure 2 Concentration-time curve of BTF in tears and corneas following topical instillation of the BTF-NM and BTF-S in rabbit eyes ($n=6$) A: tears B: corneas BTF-NM: butenafine nanomicelles; BTF-S: butenafine suspension

表 7 兔眼单次点眼后 BTF 在泪液中的药代动力学参数
Table 7 The pharmacokinetic parameters of BTF in tears after a single instillation of rabbit eyes

组别	样本量	C_{max} (mean±SD, μg/g)	T_{max} (min)	$T_{1/2}$ (min)	$AUC_{0-240 min}$ [(μg/g)·min]
BTF-NM 组	6	485.21±66.29	5	6.18	7 488.90
BTF-S 组	6	85.89±39.59	5	3.69	1 040.10

注: BTF-NM: 布替萘芬纳米胶束; BTF-S: 布替萘芬混悬剂; C_{max} : 药物达峰质量分数; T_{max} : 药物达峰时间; $T_{1/2}$: 消除半衰期; $AUC_{0-240 min}$: 药时曲线下面积

Note: BTF-NM: butenafine nanomicelles; BTF-S: butenafine suspension; C_{max} : peak concentration; T_{max} : peak time; $T_{1/2}$: half life; $AUC_{0-240 min}$: area under the content-time curve

表 8 兔眼单次点眼后 BTF 在角膜中的药代动力学参数
Table 8 The pharmacokinetic parameters of BTF in corneas after a single instillation of rabbit eyes

组别	样本量	C_{max} (mean±SD, μg/g)	T_{max} (min)	$T_{1/2}$ (min)	$AUC_{0-240 min}$ [(μg/g)·min]
BTF-NM 组	6	12.53±2.32	5	51.06	829.01
BTF-S 组	6	0.16±0.06	5	80.76	15.90

注: BTF-NM: 布替萘芬纳米胶束; BTF-S: 布替萘芬混悬剂; C_{max} : 药物达峰质量分数; T_{max} : 药物达峰时间; $T_{1/2}$: 消除半衰期; $AUC_{0-240 min}$: 药时曲线下面积

Note: BTF-NM: butenafine nanomicelles; BTF-S: butenafine suspension; C_{max} : peak concentration; T_{max} : peak time; $T_{1/2}$: half life; $AUC_{0-240 min}$: area under the content-time curve

3 讨论

角膜是真菌性角膜炎的主要病灶部位, 也是局部点眼后药物在眼表的主要吸收部位。影响药物经角膜途径进入眼内的主要因素是角膜屏障, 角膜上皮是一种疏水性生物膜, 对亲水性药物是一种屏障作用, 而角膜基质层由亲水性胶原组成, 亲水性药物更容易通过, 因此药物分子需同时具有亲水和亲脂的特性, 才能很好地经角膜渗透^[15]。将疏水性药物制备成微粒、纳米

粒、水包油乳剂、脂质体、混悬剂、NM 等载药体系可提高药物在眼内的生物利用度^[16]。NM 是目前提高疏水性药物溶解度较好的方法,其在眼内传递药物具有粒径小、药物溶液澄清透明、包封率高和药物生物利用度高等优点^[17]。

本研究中制备的 BTF-NM 粒径约为 15 nm, PDI < 0.5, 分散性好。NM 渗透角膜上皮层的方式主要通过细胞内吞途径,人角膜上皮可允许约 20 nm 的药物分子通过^[14,18]。研究报道 NM 点眼后在眼内的传递和处置主要受 NM 粒径的影响,粒径越小则经角膜渗透效率越高^[19-20]。此外,NM 的表面电荷也是影响药物在眼内传递的一个主要影响因素,角膜细胞表面和黏液层带负电荷,本研究中制备的 BTF-NM 表面电荷接近电中性,相比于带正电荷的 NM,电中性的 NM 在角膜组织中的滞留时间更短,但是电中性的 NM 更容易向角膜上皮内部迁移,同时不易受细胞外基质各种带负电荷大分子的影响^[21-22]。真菌性角膜炎一般会累及角膜深层组织,BTF-NM 粒径小且几乎呈电中性,有利于其向角膜基质层和内皮层渗透,对真菌性角膜炎的治疗非常有优势。

本研究中药代动力学结果显示,角膜组织中 BTF-NM 组药物达峰质量分数是 BTF-S 组的 78 倍,极大地促进了 BTF 在角膜中的吸收; $AUC_{0-240\text{ min}}$ 是 BTF-S 组的 52 倍,提高了 BTF 在角膜中的生物利用度。另外,BTF-NM 组在给药后 4 h 角膜组织中 BTF 药物质量分数是 $(0.71 \pm 0.20) \mu\text{g/g}$, 高于 BTF 对曲霉菌属的 $MIC_{90} 0.063 \mu\text{g/ml}^{[9]}$; 因此,推测 BTF-NM 对曲霉菌属引起的真菌性角膜炎具有良好的治疗效果。尽管 BTF-NM 可以提高药物经角膜的渗透率,但并未在房水中检测到 BTF,主要原因是 BTF-NM 点眼后经泪液到角膜上皮层、基质层、内皮层,最后到达房水中,该过程中泪液的快速冲刷、结膜血流、鼻泪管等动态屏障使大部分药物进入全身吸收,角膜上皮细胞的紧密连接限制了药物从泪液到眼内的吸收,眼前节的血-眼屏障(葡萄糖血流)阻碍了血浆白蛋白到达房水中,从而限制了药物从血浆进入房水中^[23-25]。

本研究利用自组装法制备了 TPGS 载药 NM,该载药系统可以有效负载疏水性抗真菌药物 BTF,与 BTF-S 相比,BTF-NM 制剂可明显提高 BTF 在兔眼角膜中的生物利用度,增加药物经角膜的渗透力。该研究制备成的 BTF-NM 制剂有望在临床上用于真菌性角膜炎的局部治疗。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Bourcier T, Sauer A, Dory A, et al. Fungal keratitis [J]. J Fr Ophthalmol. 2017, 40 (9): e307-e313 [2020-03-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28987448/>. DOI: 10.1016/j.jfo.2017.08.001.
- [2] Niu L, Liu X, Ma Z, et al. Fungal keratitis: pathogenesis, diagnosis and prevention [J/OL]. Microb Pathog, 2020, 138: 103802 [2020-03-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31626916/>. DOI: 10.1016/j.micpath.2019.103802.
- [3] Sharma N, Sahay P, Maharana PK, et al. Management algorithm for fungal keratitis: the TST (topical, systemic, and targeted therapy) protocol [J]. Cornea, 2019, 38 (2): 141-145. DOI: 10.1097/ICO.0000000000001781.
- [4] Mahmoudi S, Masoomi A, Ahmadikia K, et al. Fungal keratitis: an overview of clinical and laboratory aspects [J]. Mycoses, 2018, 61 (12): 916-930. DOI: 10.1111/myc.12822.
- [5] Iwatani W, Arika T, Yamaguchi H. Two mechanisms of butenafine action in *Candida albicans* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1993, 37 (4): 785-788. DOI: 10.1128/aac.37.4.785.
- [6] Porras A, Terra BS, Braga TC, et al. Butenafine and analogues: an expeditious synthesis and cytotoxicity and antifungal activities [J]. J Adv Res, 2018, 14: 81-91. DOI: 10.1016/j.jare.2018.06.004.
- [7] Singal A, Pandhi D, Agrawal S, et al. Comparative efficacy of topical 1% butenafine and 1% clotrimazole in tinea cruris and tinea corporis: a randomized, double-blind trial [J]. J Dermatolog Treat, 2005, 16 (5-6): 331-335. DOI: 10.1080/09546630500375783.
- [8] Pillai AB, Nair JV, Gupta NK, et al. Microemulsion-loaded hydrogel formulation of butenafine hydrochloride for improved topical delivery [J]. Arch Dermatol Res, 2015, 307 (7): 625-633. DOI: 10.1007/s00403-015-1573-z.
- [9] 徐岩, 庞广仁, 赵东卿, 等. 布替奈芬体外抗眼部致病真菌活性研究 [J]. 中华眼科杂志, 2010, 46 (1): 38-42. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2010.01.010.
Xu Y, Pang GR, Zhao DQ, et al. Activity of butenafine against ocular pathogenic filamentous fungi *in vitro* [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2010, 46 (1): 38-42. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2010.01.010.
- [10] Caruso C, Porta A, Tosco A, et al. A novel vitamin E-TPGS-based formulation enhances chlorhexidine bioavailability in corneal layers [J/OL]. Pharmaceutics, 2020, 12 (7): 642 [2020-03-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7407793/>. DOI: 10.3390/pharmaceutics12070642.
- [11] Sun J, Li J, Liu Q, et al. Tuning mPEG-PLA/vitamin E-TPGS-based mixed micelles for combined celecoxib/honokiol therapy for breast cancer [J/OL]. Eur J Pharm Sci, 2020, 146: 105277 [2020-03-13]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S092809872030066X?via%3Dihub>. DOI: 10.1016/j.ejps.2020.105277.
- [12] Yang C, Wu T, Qi Y, et al. Recent advances in the application of vitamin E-TPGS for drug delivery [J]. Theranostics, 2018, 8 (2): 464-485. DOI: 10.7150/thno.22711.
- [13] Joseph RR, Venkatraman SS. Drug delivery to the eye: what benefits do nanocarriers offer? [J]. Nanomedicine (Lond), 2017, 12 (6): 683-702. DOI: 10.2217/nnm-2016-0379.
- [14] Vaishya RD, Khurana V, Patel S, et al. Controlled ocular drug delivery with nanomicelles [J]. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol, 2014, 6 (5): 422-437. DOI: 10.1002/wnan.1272.
- [15] 李景果, 周天洋, 栗占荣, 等. 聚合物载体对环孢素 A 角膜通透性的促进作用 [J]. 中华实验眼科杂志, 2018, 36 (12): 914-919. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095.0160.2018.12.005.
Li JG, Zhou TY, Li ZR, et al. The facilitation of corneal permeability of cyclosporine A loaded on chitosan-graft-cyclodextrin copolymers vector [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2018, 36 (12): 914-919. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095.0160.2018.12.005.

- [16] Gote V, Sikder S, Sicotte J, et al. Ocular drug delivery: present innovations and future challenges [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2019, 370(3): 602–624. DOI: 10.1124/jpet.119.256933.
- [17] Wang X, Wang S, Zhang Y. Advance of the application of nano-controlled release system in ophthalmic drug delivery [J]. Drug Deliv, 2016, 23(8): 2897–2901. DOI: 10.3109/10717544.2015.1116025.
- [18] Vercauteren D, Rejman J, Martens TF, et al. On the cellular processing of non-viral nanomedicines for nucleic acid delivery: mechanisms and methods [J]. J Control Release, 2012, 161(2): 566–581. DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.05.020.
- [19] Amrite AC, Kompella UB. Size-dependent disposition of nanoparticles and microparticles following subconjunctival administration [J]. J Pharm Pharmacol, 2005, 57(12): 1555–1563. DOI: 10.1211/jpp.57.12.0005.
- [20] Li J, Li Z, Zhou T, et al. Positively charged micelles based on a triblock copolymer demonstrate enhanced corneal penetration [J]. Int J Nanomedicine, 2015, 10: 6027–6037. DOI: 10.2147/IJN.S90347.
- [21] 周天洋, 夏慧芸, 何继军, 等. 15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯胶束对盐酸特比萘芬滴眼液角膜吸收的促进作用 [J]. 中华实验眼科杂志, 2017, 35(11): 1009–1013. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.11.011.
- Zhou TY, Xia HY, He JJ, et al. Promoting effects of macrogol 15 hydroxystearate micelles on corneal absorption of terbinafine hydrochloride [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2017, 35(11): 1009–1013. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.11.011.
- [22] De Campos AM, Sánchez A, Gref R, et al. The effect of a PEG versus a chitosan coating on the interaction of drug colloidal carriers with the ocular mucosa [J]. Eur J Pharm Sci, 2003, 20(1): 73–81. DOI: 10.1016/S0928-0987(03)00178-7.
- [23] Urtti A, Pipkin J, Rork G, et al. Controlled drug delivery devices for experimental ocular studies with timolol 2. Ocular and systemic absorption in rabbits [J]. Int J Pharmaceut, 1990, 61(3): 241–249.
- [24] Durairaj C. Ocular pharmacokinetics [J]. Handb Exp Pharmacol, 2016, 242: 31–55. DOI: 10.1007/164_2016_32.
- [25] Urtti A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2006, 58(11): 1131–1135. DOI: 10.1016/j.addr.2006.07.027.

(收稿日期: 2020-05-26 修回日期: 2020-11-05)

(本文编辑: 尹卫靖 刘艳)

读者 · 作者 · 编者

眼科常用英文缩略语名词解释

AMD: 年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration)

ANOVA: 单因素方差分析 (one-way analysis of variance)

BUT: 泪膜破裂时间 (breakup time of tear film)

DR: 糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy)

EAU: 实验性自身免疫性葡萄膜炎 (experimental autoimmune uveitis)

EGF: 表皮生长因子 (epidermal growth factor)

ELISA: 酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay)

ERG: 视网膜电图 (electroretinogram)

FFA: 荧光素眼底血管造影 (fundus fluorescein angiography)

FGF: 成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor)

GFP: 绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein)

IFN- γ : γ 干扰素 (interferon- γ)

IL: 白细胞介素 (interleukin)

IOL: 人工晶状体 (intraocular lens)

IRBP: 光间受体视黄类物质结合蛋白 (interphotoreceptor retinoid binding protein)

LASIK: 准分子激光角膜原位磨镶术 (laser in situ keratomileusis)

ICGA: 吲哚菁绿血管造影 (indocyanine green angiography)

LECs: 晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells)

miRNA: 微小 RNA (microRNA)

MMP: 基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase)

mTOR: 哺乳动物类雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin)

MTT: 四甲基偶氮唑盐 (methyl thiazolyl tetrazolium)

NF: 核转录因子 (nuclear factor)

OCT: 光相干断层扫描 (optical coherence tomography)

OR: 优势比 (odds ratio)

PACG: 原发性闭角型青光眼 (primary angle-closure glaucoma)

PCR: 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction)

RGCs: 视网膜节细胞 (retinal ganglion cells)

POAG: 原发性开角型青光眼 (primary open angle glaucoma)

RB: 视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma)

RPE: 视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium)

RNV: 视网膜新生血管 (retinal neovascularization)

RP: 视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa)

S I t: 基础泪液分泌试验 (Schirmer I test)

shRNA: 小发夹 RNA (short hairpin RNA)

siRNA: 小干扰 RNA (small interfering RNA)

α -SMA: α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin)

TAO: 甲状腺相关眼病 (thyroid-associated ophthalmopathy)

TGF: 转化生长因子 (transforming growth factor)

TNF: 肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor)

UBM: 超声生物显微镜 (ultrasound biomicroscope)

VEGF: 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor)

VEP: 视觉诱发电位 (visual evoked potential)

(本刊编辑部)