

· 实验研究 ·

益康唑固体脂质纳米粒滴眼液兔眼单次点眼的眼部药代动力学研究

梁珍 张振 李景果 杨晶晶 卢萍 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 观察益康唑固体脂质纳米粒(E-SLN)滴眼液在兔眼单次点眼后的眼部药代动力学。

方法 采用微乳法制备质量分数 0.2% 的 E-SLN, 采用微量稀释法评估其在体外抑制镰刀菌的最小抑菌浓度(MIC)并与那他霉素滴眼液进行比较。取健康无眼疾新西兰大白兔 25 只, 任取 4 只作为空白对照组, 未给予药物干预; 采用随机数字表法将另 21 只实验兔依据处理时间点不同随机分为 7 个组, 每组 3 只。双眼均用 E-SLN 滴眼液点眼, 分别于点眼后不同时间点采用滤纸收集泪液, 处死动物后剖取角膜, 采用高效液相色谱分析法测定泪液和角膜样品中的药物含量, 并对样品药物的精密性、回收率、稳定性及药物抑菌能力进行评估。**结果** 泪液及角膜样品药物精密性的相对标准偏差(RSD)为 2.34%~4.04%; 稳定性分析结果显示, 各样品中药物 RSD 均小于 10%。E-SLN 的半数抑菌浓度(MIC₅₀)和 90% 抑菌浓度(MIC₉₀)分别为 0.37 μg/ml 和 0.89 μg/ml, 那他霉素滴眼液的 MIC₅₀ 和 MIC₉₀ 分别为 1.15 μg/ml 和 1.70 μg/ml。E-SLN 滴眼液兔眼单次点眼后, 泪液、角膜中的药物质量分数达峰时间均为 5 min, 峰值质量分数分别为 597.64 μg/g 和 33.15 μg/g。

结论 E-SLN 滴眼液兔眼单次点眼后在泪液及角膜中可获得远高于对致病镰刀菌 MIC 的药物质量浓度。

【关键词】 固体脂质纳米粒; 益康唑; 眼部药代动力学

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.cn115989-20191008-00429

Ocular pharmacokinetics of econazole solid lipid nanoparticle eye drops after single dose topical administration in rabbits

Liang Zhen, Zhang Zhen, Li Jingguo, Yang Jingjing, Lu Ping, 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 investigate the pharmacokinetics of econazole solid lipid nanoparticles (E-SLN) after administration of one single dose in rabbit eyes. **Methods** E-SLN with 0.2% econazole was prepared by microemulsion method. Its antifungal activity against *Fusarium* isolated from the eyes of patients with fungal keratitis was evaluated *in vitro* and was compared with natamycin eye drops. Four healthy New Zealand white rabbits were assigned to the blank control group without any drug interference during the experimental period, and other matched 21 rabbits were randomized into 7 groups according to the specimen-collected time, with 3 rabbits in each group. E-SLN of 50 μl was singly applied to conjunctival sac in both eyes in the 21 rabbits, and tear was collected using a filter paper at 5, 15, 30, 60, 90, 120 and 180 minutes following administration of the drug. The cornea specimen was collected at above-mentioned time points respectively. The drug levels in each sample were assayed by high performance liquid chromatography. The accuracy, recovery rate, stability and antifungal activity of the drugs in tear fluid and cornea were detected. This study protocol was approved by the Life Science Ethics Review Committee of Henan Eye Hospital (No. HENNCA-2017-22). **Results** For the tear samples and corneal tissue samples, the

relative standard deviation (RSD) of the accuracy of the drug was 2.34%–4.04%; the stability analysis result showed that the RSD of the drugs was less than 10%. The 50% minimum inhibitory concentration (MIC_{50}) and 90% minimum inhibitory concentration (MIC_{90}) of E-SLNs were 0.37 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 0.89 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively. The MIC_{50} and MIC_{90} of natamycin were 1.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 1.70 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively. After one single dose application of E-SLNs eye drops, the peak time of the drug in tears fluids and cornea of rabbits were 5 minutes and maximum concentrations in tears and cornea were 597.64 $\mu\text{g}/\text{g}$ and 33.15 $\mu\text{g}/\text{g}$, respectively. **Conclusions** The drug levels in tears and cornea achieved are higher than MIC against *Fusarium*.

[Key words] Solid lipid nanoparticles; Econazole; Ocular pharmacokinetics

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.cn115989-20191008-00429

真菌性角膜炎 (fungal keratitis, FK) 是一种由致病真菌引起的、致盲率极高的感染性角膜病, 主要致病因素有植物性角膜损伤、佩戴角膜塑形镜、长期使用糖皮质激素和抗生素等^[1], 中国 FK 致病菌主要为镰刀菌属和曲霉属^[2]。由于眼部的泪液屏障、角膜和结膜屏障、血-眼屏障结构的作用, 眼局部给药的生物利用度往往小于 5%, 且有效治疗 FK 的药物种类极少^[3-5]。质量分数 5% 那他霉素混悬液是目前唯一经美国食品药品监督管理局批准的眼用抗真菌制剂, 但价格昂贵, 眼部生物利用度低, 临床效果并不理想^[6-8]。与细菌不同, 真菌能穿透角膜基质层及完整的后弹力层, 因此 FK 的治疗周期长达 80 d 以上, 给患者带来较大的经济负担^[9]。研发经济有效的抗真菌药物是眼科研究者亟需解决的问题。前期的体外抑菌实验结果显示, 硝酸益康唑对烟曲霉和镰刀菌具有良好的抑菌效果^[10], 但因其溶解度低及刺激性强, 限制了其在眼科临床的应用^[11]。固体脂质纳米粒 (solid lipid nanoparticles, SLNs) 是新型纳米给药系统, 采用天然、合成类脂作为载体, 将药物包裹或分散于类脂核中制成固体胶粒结构体系^[12], 具有可提高生物利用度、表面可修饰、较好地控制活性药物释放、稳定性好、能保护不稳定的活性药物、无毒性、易于扩大生产等优势^[13-14]。研究表明, 阳离子修饰的汉防己甲素 SLNs 和未经修饰的汉防己甲素 SLNs 均具有缓释能力, 并且能显著提高汉防己甲素在眼部的生物利用度^[15]; 那他霉素 SLNs 提高了那他霉素抑制真菌的能力, 并增强了角膜对他那霉素的吸收^[16]。因此, SLNs 在眼科药物传递系统研究领域的优势越来越受到关注^[17]。本研究以三棕榈酸甘油酯为脂质载体制备微乳法制备益康唑固体脂质纳米粒 (econazole solid lipid nanoparticles, E-SLNs) 滴眼液, 研究其对致病镰刀菌的抑菌能力及其单次给药后在兔眼部的药代动力学, 为

眼科临床用药和新剂型的研发提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 普通级健康雄性新西兰大白兔 25 只 (购自南京市青龙山动物繁殖场, 合格证编号: 201818458), 体质量 (2.5±0.5) kg, 饲养于河南省食品药品检验所动物房, 实验期间自由进食和饮水。实验前大体检查外眼并行结膜囊荧光素钠染色, 在手持裂隙灯显微镜钴蓝光下检查角膜上皮的完整性, 剔除角膜上皮缺损者。本研究方案经河南省立眼科医院实验动物伦理委员会审核批准 (批文号: HENNCA-2017-22)。

1.1.2 菌株来源 致病镰刀菌菌株共 30 株, 由河南省眼科研究所微生物室 2018 年从 FK 患者角膜刮片标本中分离。

1.1.3 主要试剂及仪器 RPMI1640 培养基 (河南省眼科研究所微生物室制); 益康唑 (本实验室自制, 由硝酸益康唑利用酸碱中和法去除硝酸根而获得); 硝酸益康唑对照品、三棕榈酸甘油酯 (北京百灵威科技有限公司); 甘油 (浙江遂昌惠康药业有限公司); 吐温 80 (四川金山制药有限公司); 甲醇 (德国 Merck 公司); 乙腈 (美国 Tidea 公司); 其余试剂均为分析纯。纳米粒度-Zeta 电位分析仪 (英国马尔文公司); 2695 型高效液相色谱分析 (high performance liquid chromatography, HPLC) 系统 (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)。

1.2 方法

采用高效液相色谱分析法测定兔眼泪液和角膜中

药物含量。

1.2.1 色谱条件 流动相: $V_{\text{甲醇}} : V_{\text{水}} = 80 : 20$, 色谱柱: Waters X-Bridge C18 (3.5 μm , 3.0 mm \times 150.0 mm), 进样量为 10 μl , 流速为 0.5 ml/min, 柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长为 210 nm。

1.2.2 E-SLNs 的制备 称取处方量的益康唑 (0.06 g)、三棕榈酸甘油酯 (0.06 g)、吐温 (0.6 g) 为油相, 甘油水溶液为水相。在搅拌状态下将水相注入油相。最后总体积定为 30 ml。采用纳米粒度仪测定 E-SLNs 粒径、分散指数 (polymer dispersity index, PDI)、Zeta 电位, 采用高效液相色谱分析法测定 E-SLNs 中益康唑含量。

1.2.3 动物分组给药及取样 健康无眼疾新西兰雄性白兔 25 只, 体质量 (2.5 \pm 0.5) kg, 任取 4 只作为空白对照组, 未给予药物处理。按处理时间点不同, 采用随机数字表法将另 21 只实验兔随机分为 7 个组, 每组 3 只。双眼分别用微量加样器将 50 μl 含质量分数 0.2% 益康唑的 E-SLNs 滴眼液点入结膜囊, 轻轻闭合眼睑 30 s, 使药物均匀分布眼球。分别于点眼后 5、15、30、60、90、120、180 min 将滤纸片放入上结膜囊内 1 min 以收集泪液标本。精密称量吸取泪液前后的滤纸片质量, 其差值即为泪液质量^[18]。采用耳缘静脉注射过量戊巴比妥钠处死实验兔, 用生理盐水充分冲洗眼球表面, 迅速用 1 ml 注射器吸取房水, 精密吸取 100 μl 分装; 剖取角膜并吸干滤纸称量。将角膜置于 EP 管中, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.2.4 样品处理 (1) 泪液处理 取出泪液样本, 室温平衡 30 min, 剪开吸取泪液的滤纸片, 用 200 μl 甲醇浸泡过夜。离心半径 3.5 cm, 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清进行 HPLC 分析。(2) 角膜处理 取出角膜样本, 待角膜解冻后, 将角膜剪碎, 用 200 μl 甲醇浸泡过夜。离心半径 3.5 cm, 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清进行 HPLC 分析。

1.2.5 样品分析方法的建立

1.2.5.1 标准曲线的配制 (1) 泪液标准曲线的配制 分别取 100 μl 质量浓度为 32、16、8、4、2、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 标准溶液于 5 ml 具塞管中, 氮气吹干, 加入空白对照组泪液滤纸片, 按照 1.2.4 的方法进行泪液处理。以药物含量为自变量 (X)、益康唑色谱峰面积 (Y) 为因变量获得线性回归方程。(2) 角膜标准曲线的配制 分别取 200 μl 质量浓度为 1.60、0.80、0.40、0.20、0.10、0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的标准溶液于 1.5 ml 的 EP 管中, 将未处理的角膜剪碎后分别加入上述标准溶液中, 按照 1.2.4 的方法进行角膜处理。以药物浓度为自变量 (X)、益康唑色谱峰面积 (Y) 为因变量获得线性回归方程。

1.2.5.2 药物精密度实验 (1) 泪液中药物的精密度分析 取 16、4、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 标准溶液, 按 1.2.5.1 中泪液标准曲线的配制方法配制 16、4、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的样品测定日内和日间的精密度。(2) 角膜中药物的精密度分析 取 0.8、0.2、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 标准溶液, 按 1.2.5.1 中角膜标准曲线的配制方法配制 0.8、0.2、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 样品测定日内和日间的精密度。

1.2.5.3 回收率分析 (1) 泪液中药物回收率 取 16、4、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 标准溶液, 按 1.2.5.1 中泪液标准曲线的配制方法配制 16、4、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 样品, 测定泪液样品中药物回收率。(2) 角膜中药物回收率分析 取 0.8、0.2、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 标准溶液, 按 1.2.5.1 中角膜标准曲线的配制方法配制 0.8、0.2、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 样品, 测定角膜中样品药物的回收率。

1.2.5.4 样品中药物稳定性实验 (1) 泪液样品中药物稳定性分析 取 16、4、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 标准溶液, 按 1.2.5.1 中泪液标准曲线的配制方法配制 16、4、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 样品, 室温下分别放置 0、12、24 h, 进样并记录峰面积, 评估泪液样品放置的稳定性。(2) 角膜样品中药物稳定性分析 取 0.8、0.2、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的标准溶液, 按 1.2.5.1 中角膜标准曲线的配制方法配制 0.8、0.2、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的样品, 分别室温放置 0、12、24 h 进样并记录峰面积。考察泪液样品放置的稳定性。

1.2.6 E-SLNs 抑菌能力分析 按照美国国家临床实验室标准化委员会公布的 M38-A2, 采用微量稀释法检测 E-SLNs 的 MIC^[19]。96 孔无菌微量板中, 每孔加入稀释的药物 100 μl , 再加入菌液 100 μl , E-SLNs 的终质量浓度为 0.25~32.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 市售那他霉素滴眼液的终质量浓度为 0.0625~8.0000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 10.0 统计学软件计算 MIC; 以药物含量为自变量, 益康唑色谱面积为因变量拟合不同样品中药物的标准回归方程。药代动力学参数计算采用 DAS 2.0 药代动力学计算软件计算 AUC。

2 结果

2.1 E-SLNs 的粒径、PDI、Zeta 电位

E-SLNs 的粒径为 (15.41 \pm 1.44) nm, PDI 为 0.300 \pm 0.013, 粒径分布范围较窄, 说明粒径均一; E-SLNs 的 Zeta 电位为 (-1.21 \pm 0.24) mV, 接近中性, 其不同电荷粒子衍射光强度约为 75 000 keps (图 1)。药物质量浓度为 2.04 mg/ml。

2.2 不同样品的标准回归方程

泪液和角膜的线性回归方程分别为 $Y_{\text{泪液}} =$

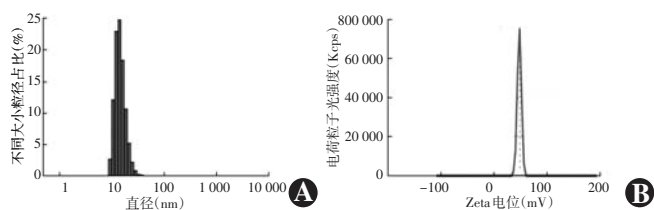


图 1 E-SLNs 的粒径及 Zeta 电位 A: E-SLNs 的粒径为 (15.41 ± 1.44) nm, PDI 为 0.300 ± 0.013, 粒径分布范围较窄; B: Zeta 电位为 (-1.21 ± 0.24) mV, 接近中性 E-SLNs: 益康唑固体脂质纳米粒

Figure 1 Particle size distribution and Zeta potential of E-SLNs

A: The particle size and PDI of E-SLNs was (15.41 ± 1.44) nm and 0.300 ± 0.013, respectively, and the distribution range of particle size was relatively narrow B: The Zeta potential of E-SLNs was (-1.21 ± 0.24) mV, close to neutral E-SLNs: econazole solid lipid nanoparticles

45 137X - 232.49 ($R^2 = 0.9998$)、 $Y_{角膜} = 61.261X + 487.18$ ($R^2 = 1.0000$), 结果均满足实验定量分析要求。

2.3 不同样品中药物精密度分析

泪液、角膜分析方法的相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 在 2.34% ~ 4.04%, 说明测定过程随机误差较小, 方法可靠。

2.4 不同样品回收率

泪液及角膜样品中药物回收率见表 1, 2, 符合《中国药典》对生物样品回收率的要求, 可用于泪液、角膜样品的分析。

表 1 泪液中药物回收率测定结果
Table 1 Drug recovery rate of tear sample

样品质量浓度 (μg/ml)	样本量	回收率 (mean ± SD, %)	RSD (%)
16	3	104.76 ± 6.02	5.75
4	3	105.30 ± 5.07	4.82
2	3	110.77 ± 5.22	4.71

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

表 2 角膜中药物回收率测定结果
Table 2 Drug recovery rate of cornea sample

样品质量浓度 (μg/ml)	样本量	回收率 (mean ± SD, %)	RSD (%)
0.8	3	101.57 ± 3.33	3.28
0.2	3	97.30 ± 2.84	2.91
0.1	3	103.21 ± 8.62	8.35

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

2.5 不同样品的稳定性分析

16、4、2 μg/ml 泪液样品和 0.8、0.2、0.1 μg/ml 角膜样品在 0、12、24 h 的 RSD 均小于 10% (表 3, 4)。

表 3 泪液中药物的稳定性
Table 3 The stability of drugs in tears

药物质量浓度 (μg/ml)	样本量	不同时间点平均回收率 (mean ± SD, %)			RSD (%)
		0 h	12 h	24 h	
16	3	99.60 ± 3.91	100.40 ± 0.84	102.76 ± 7.11	1.22
4	3	99.16 ± 5.76	104.41 ± 5.36	102.17 ± 6.22	1.80
2	3	104.43 ± 3.39	93.12 ± 7.47	108.38 ± 7.49	5.79

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

表 4 角膜组织中药物的稳定性
Table 4 The stability of drugs in corneal tissue

药物质量浓度 (μg/ml)	样本量	不同时间点平均回收率 (mean ± SD, %)			RSD (%)
		0 h	12 h	24 h	
0.8	3	100.46 ± 2.56	101.70 ± 3.02	101.52 ± 3.20	0.51
0.2	3	102.03 ± 1.64	104.24 ± 1.20	100.11 ± 8.20	1.38
0.1	3	101.37 ± 0.95	102.27 ± 1.01	96.24 ± 9.49	2.48

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

2.6 E-SLNs 的兔眼药代动力学参数

2.6.1 E-SLNs 在泪液中的药物浓度及药动力学参数
50 μl 质量分数 0.2% 的 E-SLNs 滴眼液点眼后 5 min 药物在泪液的质量分数达到最高, 为 597.64 μg/g, 且随着时间的延长, 其药物质量分数降低, 点眼后 2 h 药物在泪液中完全测不到, 消除半衰期为 31.74 min, 血浆药物含量-时间曲线下面积 (area under the curve, AUC_{0-180 min}) 为 13 787.91 (μg/g) · min (图 2, 表 5)。

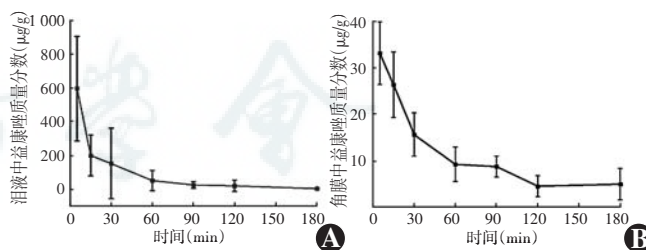


图 2 E-SLNs 点眼后兔眼泪液、角膜中益康唑的含量-时间曲线 (n=6) 点眼后 5 min 药物质量分数达峰, 随着时间的延长, 药物质量分数逐渐降低, 在角膜中药物质量分数趋于稳定 A: 泪液中药物含量-时间曲线 B: 角膜中药物含量-时间曲线 E-SLNs: 益康唑固体脂质纳米粒

Figure 2 Econazole content-time curve in tear film, cornea of rabbits after a single instillation of E-SLNs (n=6) After a single dose of topical eye drops of E-SLNs, the content of econazole reached the peak value in cornea and tear at 5 minutes and then decreased gradually with the prolong of time A: The pharmacokinetic profiles in tear specimens B: The pharmacokinetic profiles in cornea specimens E-SLNs: econazole solid lipid nanoparticles

2.6.2 E-SLNs 在角膜中的药物含量及药代动力学参数 E-SLNs 滴眼液点眼后 5 min 药物质量分数达峰, 为 33.15 $\mu\text{g/g}$, 随着时间的延长, 药物质量分数逐渐降低, 2 h 后趋于稳定, 消除半衰期为 88.65 min, $\text{AUC}_{0 \rightarrow 180 \text{ min}}$ 为 1 644.81 ($\mu\text{g/g}$) \cdot min (图 2, 表 5)。

表 5 兔眼单次点眼后益康唑在泪液、角膜中的药代动力学参数
Table 5 Pharmacokinetic parameters of E-SLNs in tear and cornea specimens after a single instillation of E-SLNs

样品	样本量	$T_{1/2}$ (min)	T_{max} (min)	C_{max} ($\mu\text{g/g}$)	$\text{AUC}_{0 \rightarrow 180 \text{ min}}$ [($\mu\text{g/g}$) \cdot min]
泪液	6	31.74	5.00	597.64	13 787.91
角膜	6	88.65	5.00	33.15	1 644.81

注: E-SLNs: 益康唑固体脂质纳米粒; $T_{1/2}$: 消除半衰期; T_{max} : 药物达峰时间; C_{max} : 药峰浓度; $\text{AUC}_{0 \rightarrow 180 \text{ min}}$: 药时曲线下面积

Note: E-SLNs: ecoazazole solid lipid nanoparticles; $T_{1/2}$: half-life; T_{max} : time of peak; C_{max} : peak concentration; $\text{AUC}_{0 \rightarrow 180 \text{ min}}$: area under the curve

2.7 E-SLNs 点眼后与那他霉素滴眼液 MIC_{50} 比较

E-SLNs 与市售那他霉素滴眼液对 30 株致病镰刀菌的抑制情况分析结果显示, E-SLNs 的 MIC_{90} 为 0.89 $\mu\text{g/ml}$, 约为那他霉素滴眼液 MIC_{90} 的 1/2, E-SLNs 的 MIC_{50} 为 0.37 $\mu\text{g/ml}$, 为那他霉素滴眼液 MIC_{50} 的 3/10 (表 6)。

表 6 E-SLNs 滴眼液与那他霉素滴眼液的 MIC 比较
Table 6 Comparison of MIC between E-SLNs and natamycin eye drops ($\mu\text{g/ml}$)

药物	MIC_{50}	MIC_{90}
E-SLNs	0.37	0.89
市售那他霉素滴眼液	1.15	1.70

注: E-SLNs: 益康唑固体脂质纳米粒; MIC: 最小抑菌浓度; MIC_{50} : 抑制 50% 细菌生长的最低药物浓度; MIC_{90} : 抑制 90% 细菌生长的最低药物浓度

Note: E-SLNs: ecoazazole solid lipid nanoparticles; MIC: minimal inhibitory concentration; MIC_{50} : 50% minimum inhibitory concentration; MIC_{90} : 90% minimum inhibitory concentration

3 讨论

本研究制备的 E-SLNs 粒径约为 15 nm, 小于 100 nm, 具有穿透角膜屏障的能力^[20]。PDI 在 0.01 ~ 0.50, 说明 E-SLNs 是一个均匀的体系^[21]。E-SLNs 呈现电中性的状态, 与角膜表面的负电荷之间无电荷间的排斥作用, 更易于向角膜上皮内部迁移, 有利于真菌性角膜炎的治疗^[22-23]。

E-SLNs 滴眼液滴入结膜囊后, 被泪液稀释、冲刷, 3 h 后在泪液、角膜中基本检测不到药物。滴眼液滴入结膜囊后, 随着药物的扩散, 克服泪膜屏障进入角膜, 2 h 后趋于稳定^[24-25]。然而, 房水中的药物浓度很低,

低于定量检测限, 这一现象可从以下几个方面来解释: (1) E-SLNs 滴眼液以水为介质, 黏度很低, 仅为 0.59 cP, 药物在结膜囊内的滞留时间短, 可通过添加具有生物黏附性的壳聚糖、透明质酸、聚丙烯酸等物质使制剂的黏度增加, 增加滴眼液在眼表的滞留时间, 从而提高滴眼液在泪液、角膜中的药物含量^[4, 26-27]; (2) 滴眼液穿透泪膜屏障后, 需要再穿透角膜屏障才能进入房水。角膜屏障由上皮、基质、内皮组成^[28]。粒径较小的药物可通过角膜上皮间紧密连接的孔隙自由扩散进入上皮, 或者由上皮细胞表达的主动转运蛋白, 如多药耐药相关蛋白 1 (multidrug resistance-associated protein 1, MRP1)、MRP5 等转运至上皮^[29], 但进入上皮的药物能否克服基质对疏水性药物, 如益康唑的屏障作用进入内皮, 穿越重重屏障进入内皮的药物能否克服角膜-房水屏障进入房水, 这些因素决定了房水中的药物含量^[30-31]。所以如何提高房水中的药物浓度, 使其达到能抑制致病真菌生长的浓度, 仍需要进一步研究。

E-SLNs 滴眼液的 MIC_{90} 为 0.89 $\mu\text{g/ml}$, 低于市售那他霉素滴眼液的 MIC_{90} 。局部点眼后 3 h 的角膜药物质量分数为 4.4 $\mu\text{g/g}$, 约为益康唑的 MIC_{90} 值的 5 倍, 说明局部点眼 3 h 内, 角膜的药物质量浓度均大于 MIC_{90} , 理论上均可抑制致病镰刀菌, 提示 E-SLNs 滴眼液治疗 FK 给药间隔可在 3 h 以上^[31]。并且, E-SLNs 滴眼液的成本低于市售那他霉素滴眼液, 有望减轻 FK 患者的经济负担, 具有一定的社会意义。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 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.

[2] 王丽娅. 我国真菌性角膜炎的研究现状 [J]. 眼科, 2005, 14(3): 143-144.
Wang LY. Progress of diagnosis and treatment of fungal keratitis in China: current status [J]. Ophthalmol CHN, 2005, 14(3): 143-144.

[3] Bachu RD, Chowdhury P, Al-Saedi Z, et al. Ocular drug delivery barriers-role of nanocarriers in the treatment of anterior segment ocular diseases [J/OL]. Pharmaceutics, 2018, 10(1): 28 [2020-05-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5874841/>. DOI: 10.3390/pharmaceutics10010028.

[4] 游巍, 钱峰, 吴诚. 眼部的给药屏障和给药途径 [J]. 国际药学研究杂志, 2008, 35(4): 284-287.
You W, Qian F, Wu C. Barriers and methods of ocular drug delivery [J]. Int J Pharm Res, 2008, 35(4): 284-287.

[5] 钟文贤, 谢立信. 真菌性角膜炎的药物治疗 [J]. 国际眼科纵览, 2006, 30(5): 332-336.
Zhong WX, Xie LX. Drug treatment of fungal keratitis [J]. Int Rev Ophthalmol, 2006, 30(5): 332-336.

- [6] Qiu S, Zhao GQ, Lin J, et al. Natamycin in the treatment of fungal keratitis: a systematic review and Meta-analysis [J]. *Int J Ophthalmol*, 2015, 8(3) : 597-602. DOI: 10. 3980/j. issn. 2222-3959. 2015. 03. 29.
- [7] Behrens-Baumann W. Topical antimycotics in ophthalmology [J]. *Ophthalmologica*, 1997, 211 Suppl 1: 33-38. DOI: 10. 1159/000310884.
- [8] Chang HY, Chodosh J. Diagnostic and therapeutic considerations in fungal keratitis [J]. *Int Ophthalmol Clin*, 2011, 51(4) : 33-42. DOI: 10. 1097/IIO. 0b013e 31822d64dc.
- [9] Yildiz EH, Abdalla YF, Elsahn AF, et al. Update on fungal keratitis from 1999 to 2008 [J]. *Cornea*, 2010, 29(12) : 1406-1411. DOI: 10. 1097/ICO. 0b013e 3181da571b.
- [10] 周静, 张俊杰. 硝酸益康唑纳米乳滴眼剂的制备及理化性质研究 [J]. *中国医院药学杂志*, 2012, 32(16) : 1269-1273.
Zhou J, Zhang JJ. Preparation and physico-chemical property of econazole nitrate nanoemulsion [J]. *Chin J Hosp Pharm*, 2012, 32(16) : 1269-1273.
- [11] Li J, Li Z, Liang Z, et al. Fabrication of a drug delivery system that enhances antifungal drug corneal penetration [J]. *Drug Deliv*, 2018, 25(1) : 938-949. DOI: 10. 1080/10717544. 2018. 1461278.
- [12] 严义, 薛伟明, 任含玉, 等. 环孢素 A 固体脂质纳米粒制备工艺优化 [J]. *化工进展*, 2012, 31(4) : 878-883.
Yan Y, Xue WM, Ren HY, et al. Optimization of the preparation of cyclosporine SLN [J]. *Chem Ind Eng Prog*, 2012, 31(4) : 878-883.
- [13] Shanmukhi P. Solid lipid nanoparticles-a novel solid lipid based technology for poorly water soluble drugs: a review [J]. *Int J Pharm Technol*, 2013, 5(2) : 2645-2674.
- [14] Seyfoddin A, Shaw J, Al-Kassas R. Solid lipid nanoparticles for ocular drug delivery [J]. *Drug Deliv*, 2010, 17(7) : 467-489. DOI: 10. 3109/10717544. 2010. 483257.
- [15] Li J, Guo X, Liu Z, et al. Preparation and evaluation of charged solid lipid nanoparticles of tetrandrine for ocular drug delivery system: pharmacokinetics, cytotoxicity and cellular uptake studies [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2014, 40(7) : 980-987. DOI: 10. 3109/03639045. 2013. 795582.
- [16] Khames A, Khaleel MA, El-Badawy MF, et al. Natamycin solid lipid nanoparticles-sustained ocular delivery system of higher corneal penetration against deep fungal keratitis: preparation and optimization [J/OL]. *Int J Nanomedicine*, 2019, 14: 2515-2531 [2020-05-27]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6459158/>. DOI: 10. 2147/IJN. S190502.
- [17] Chetoni P, Burgalassi S, Monti D, et al. Solid lipid nanoparticles as promising tool for intraocular tobramycin delivery: pharmacokinetic studies on rabbits [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2016, 109 : 214-223. DOI: 10. 1016/j. ejpb. 2016. 10. 006.
- [18] 王博, 王丽娅, 陈鹏, 等. 硝酸益康唑纳米粒在兔眼内的药代动力学研究 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2012, 30(8) : 677-680. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2012. 08. 002.
Wang B, Wang LY, Chen P, et al. Pharmacokinetics of topically applied econazole nitrate nanoparticles in rabbit eye [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2012, 30(8) : 677-680. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2012. 08. 002.
- [19] 徐岩, 庞广仁, 吕雪芳, 等. 没食子酸丙酯对抗真菌药体外抗丝状真菌活性的影响 [J]. *中华眼科杂志*, 2006, 42(4) : 309-312.
Xu Y, Pang GR, Lü XF, et al. The effect of propyl gallate on the activity of various antifungal drugs against filamentous fungi *in vitro* [J]. *Chin J Ophthalmol*, 2006, 42(4) : 309-312.
- [20] Nagarwal RC, Kant S, Singh PN, et al. Polymeric nanoparticulate system: a potential approach for ocular drug delivery [J]. *J Control Release*, 2009, 136(1) : 2-13. DOI: 10. 1016/j. jconrel. 2008. 12. 018.
- [21] Kumar R, Sinha VR. Solid lipid nanoparticle: an efficient carrier for improved ocular permeation of voriconazole [J/OL]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2016, 42(12) : 1956-1967 [2020-06-26]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27143048/>. DOI: 10. 1080/03639045. 2016. 1185437.
- [22] Bron AJ, Tiffany JM, Gouveia SM, et al. Functional aspects of the tear film lipid layer [J]. *Exp Eye Res*, 2004, 78(3) : 347-360. DOI: 10. 1016/j. exer. 2003. 09. 019.
- [23] 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.
- [24] McCulley JP, Shine WE. The lipid layer: the outer surface of the ocular surface tear film [J]. *Biosci Rep*, 2001, 21(4) : 407-418. DOI: 10. 1023/a: 101798 7608937.
- [25] de la Fuente M, Raviña M, Paolicelli P, et al. Chitosan-based nanostructures: a delivery platform for ocular therapeutics [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2010, 62(1) : 100-117. DOI: 10. 1016/j. addr. 2009. 11. 026.
- [26] Thernes F, Rozier A, Plazonnet B, et al. Bioadhesion: the effect of polyacrylic acid on the ocular bioavailability of timolol [J]. *Int J Pharm*, 1992, 81(1) : 59-65.
- [27] Barbault-Foucher S, Gref R, Russo P, et al. Design of poly-epsilon-caprolactone nanospheres coated with bioadhesive hyaluronic acid for ocular delivery [J]. *J Control Release*, 2002, 83(3) : 365-375. DOI: 10. 1016/s0168-3659(02)00207-9.
- [28] Kim J, Schlesinger EB, Desai TA. Nanostructured materials for ocular delivery: nanodesign for enhanced bioadhesion, transepithelial permeability and sustained delivery [J]. *Ther Deliv*, 2015, 6(12) : 1365-1376. DOI: 10. 4155/tde. 15. 75.
- [29] Zhou T, Zhu L, Xia H, et al. Micelle carriers based on macrogol 15 hydroxystearate for ocular delivery of terbinafine hydrochloride: *in vitro* characterization and *in vivo* permeation [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2017, 109: 288-296. DOI: 10. 1016/j. ejps. 2017. 08. 020.
- [30] Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell [J]. *Nature*, 2003, 422(6927) : 37-44. DOI: 10. 1038/nature01451.
- [31] 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]. *中华实验眼科杂志*, 2001, 19(5) : 429-431.
Chen Y, Zhang JJ, Chen ZJ. Pharmacokinetics of topically applied levofloxacin in the rabbit eye [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2001, 19(5) : 429-431. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2001. 05. 013.

(收稿日期:2020-07-13 修回日期:2020-11-06)

(本文编辑:尹卫靖 刘艳)