

加替沙星眼用凝胶不同点眼频次兔眼组织药代动力学比较

王小桐 赵欣 祖薇 沈旭 陈世超 杨强

沈阳兴齐眼药股份有限公司, 沈阳 110164

通信作者: 杨强, Email: yangqiang@sinqi.com

【摘要】 目的 建立一种测定兔眼组织中加替沙星浓度的方法, 并比较加替沙星眼用凝胶兔眼单次和多次点眼后在眼组织及血浆中的药代动力学特征。方法 取 94 只健康新西兰兔。任意选取 10 只新西兰兔不给予任何药物用于空白组织获取, 将剩余 84 只按照随机数字表法随机分成单次给药组 36 只和多次给药组 48 只, 雌雄各半, 均取左眼为实验眼。单次给药组左眼给予 1 滴加替沙星眼用凝胶, 分别于点眼后 0.5、1、3、5、7、10 h 收集泪液后进行心脏取血并处死, 分别取房水、结膜、角膜、巩膜、虹膜-睫状体、晶状体、玻璃体、视网膜和脉络膜; 多次给药组左眼每次给予 1 滴加替沙星眼用凝胶, 每天 3 次, 分别于连续给药第 4 和第 6 天首次给药后 0.5 h, 第 7 天首次给药后 0.5、1、3、5、7、10 h 进行心脏取血和眼组织收集。采用甲醇沉淀蛋白法预处理各样本, 采用高效液相色谱串联质谱法测定并计算实验兔血浆及眼组织中加替沙星的达峰浓度 (C_{max})、达峰时间 (T_{max})、曲线下面积 (AUC) 等药代动力学参数, 流动相采用甲醇-0.1% 乙酸水溶液 (体积比 = 70:30), 采用正离子多反应检测模式, 以环丙沙星为内标物, 并参照《中国药典》(2020 年版) 9012 生物样品定量分析方法验证指导原则对方法的选择性、标准曲线和定量下限、准确度和精密度、提取回收率和基质效应、稳定性进行验证。结合加替沙星对眼部常见感染菌的最小抑菌浓度 (MIC_{90}), 计算各组织和血浆 C_{max}/MIC_{90} 和 AUC/MIC_{90} 值。结果 加替沙星在各眼组织和血浆中线性关系良好; 角膜组织中的日间准确度为 -1.5%~6.0%, 日间精密度 $\leq 15\%$; 角膜组织中的提取回收率为 92.0%~94.8%, 经内标归一化计算得到的低、中、高浓度的基质效应精密度均不大于 3.3%, 单次给药后加替沙星在眼前节和后节组织均有较高的药物浓度分布, AUC_{0-1} 从高到低分别为泪液、角膜、结膜、虹膜-睫状体、巩膜、房水、脉络膜、视网膜、晶状体和玻璃体, C_{max} 分别为 94.90 $\mu\text{g/g}$ 、7.34 $\mu\text{g/g}$ 、3.65 $\mu\text{g/g}$ 、1.81 $\mu\text{g/g}$ 、1.75 $\mu\text{g/g}$ 、1.31 $\mu\text{g/ml}$ 、0.86 $\mu\text{g/g}$ 、0.53 $\mu\text{g/g}$ 、0.13 $\mu\text{g/g}$ 、0.07 $\mu\text{g/ml}$, 除晶状体、脉络膜和玻璃体液中的 T_{max} 为 0.5 h, 其余各组织 T_{max} 均为 1 h。多次给药第 4、6、7 天的 0.5 h 各眼部组织中加替沙星浓度比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 且角膜、结膜和巩膜中 AUC_{0-1} 约为单次给药的 2.04、2.12 和 2.32 倍。单、多次给药后进入体循环的加替沙星浓度均低于 25.00 ng/ml。对于金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌, 加替沙星眼用凝胶连续用药后在眼前节结膜、角膜、巩膜、虹膜-睫状体、房水和脉络膜中的药代动力学/药效学均可满足 $C_{max}/MIC_{90} \geq 10$ 且 $AUC/MIC_{90} \geq 30$ 。结论 成功构建快速灵敏的眼组织加替沙星浓度测量方法。加替沙星眼用凝胶以每天 3 次点眼连续用药 3 d 后眼组织可达到稳态浓度, 且比单次给药在眼组织浓度升高。局部使用加替沙星眼用凝胶可实现眼部结膜、角膜、巩膜、虹膜-睫状体常见感染细菌的有效治疗。

【关键词】 加替沙星; 眼用凝胶; 高效液相色谱串联质谱法; 兔; 药代动力学

DOI: 10.3760/ema.j.cn115989-20220513-00215

Comparison of the pharmacokinetics of gatifloxacin ophthalmic gel in rabbit ocular tissues with different dosing frequencies

Wang Xiaotong, Zhao Xin, Zu Wei, Shen Xu, Chen Shichao, Yang Qiang

Shenyang Xingqi Pharmaceutical Co., Ltd., Shenyang 110164, China

Corresponding author: Yang Qiang, Email: yangqiang@sinqi.com

[Abstract] **Objective** To establish a method for determining the concentration of gatifloxacin in rabbit ocular tissue and compare the ocular pharmacokinetics of 0.3% gatifloxacin eye gel after a single and multiple topical instillations in rabbits. **Methods** Ninety-four healthy New Zealand rabbits were selected. Ten rabbits were randomly selected without any treatment for blank tissue collection, and the remaining 84 rabbits were randomly

divided into a single-dose group (36 rabbits) and a multiple-dose group (48 rabbits) equally between males and females using a random number table. The left eye was taken as the experimental eye. The single-dose group was given one drop of 0.3% gatifloxacin eye gel into the left eyes, and the rabbits were divided evenly into six subgroups. In each subgroup, tear specimens and blood specimens were collected at 0.5, 1, 3, 5, 7, 10 hours after gel application, then cardiac blood samples were taken, after which animals were sacrificed immediately to collect ocular tissue including aqueous humor, conjunctiva, cornea, sclera, iris-ciliary body, lens, vitreous body, retina, and choroid. The multiple-dose group was given 1 drop of gatifloxacin ophthalmic gel in the left eye three times a day. At 0.5 hour after the first administration days 4 and 6, and 0.5, 1, 3, 5, 7, and 10 hours after the first administration on day 7, the cardiac blood sampling and ocular tissue collection were performed. The methanol precipitation protein method was used to pretreat samples, and the concentration of gatifloxacin in rabbit plasma and eye tissue was measured and calculated by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method to obtain pharmacokinetic-related parameters such as peak concentration (C_{max}), peak time (T_{max}), and area under curve (AUC). The mobile phase was a methanol-0.1% acetic acid aqueous solution (volume ratio = 70:30), and a positive ion multiple reaction detection mode was used. Ciprofloxacin was used as the internal standard, the selectivity, standard curve and lower limit of quantification, accuracy and precision, extraction recovery rate, matrix effect, and stability of the method were validated in accordance with the 9012 Guidelines for Validation of Quantitative Analysis Methods for Biological Samples in *Chinese Pharmacopoeia (2020 edition)*. Combined with the minimum inhibitory concentration (MIC_{90}) of gatifloxacin on common ocular infectious bacteria, C_{max}/MIC_{90} and AUC/MIC_{90} were calculated. The study protocol was reviewed and approved by the Animal Ethics Committee of Shenyang Xingqi Pharmaceutical Co., Ltd. (No. XQ-2016-011).

Results Gatifloxacin has a good linear relationship in various eye tissues and plasma. The between-run precision in corneal tissue is within the range of -1.5% - 6.0%, and the daytime precision was not greater than 15%. The extraction recovery rate in corneal tissue ranged from 92.0% to 94.8%, and the precision of the matrix effect at low, medium, and high concentrations calculated by internal standard normalization was not greater than 3.3%. After a single topical instillation, gatifloxacin reached a high concentration in anterior and posterior segment ocular tissues and its distribution ranked in order from the highest to the lowest by AUC_{0-t} as follows, tears, cornea, conjunctiva, iris-ciliary body, sclera, aqueous humor, choroid, retina, lens and vitreous body, with the C_{max} of 94.90 $\mu\text{g/g}$, 7.34 $\mu\text{g/g}$, 3.65 $\mu\text{g/g}$, 1.81 $\mu\text{g/g}$, 1.75 $\mu\text{g/g}$, 1.31 $\mu\text{g/ml}$, 0.86 $\mu\text{g/g}$, 0.53 $\mu\text{g/g}$, 0.13 $\mu\text{g/g}$ and 0.07 $\mu\text{g/ml}$, respectively. T_{max} was 1 hour in all ocular tissues except in the lens, choroid, and vitreous body fluid, where T_{max} was 0.5 hour. There was no significant difference among the concentrations of gatifloxacin in ocular tissues at 0.5 hour on days 4, 6 and 7 after multiple dosing ($P > 0.05$), and the AUC_{0-t} in the cornea, conjunctiva, and sclera was approximately 2.04, 2.12, and 2.32 times that of the single dosing. The concentration of gatifloxacin released into the systemic circulation after single and multiple dosing was less than 25.00 ng/ml. For both *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*, pharmacokinetic/pharmacodynamics in the conjunctiva, cornea, sclera, iris-ciliary body, aqueous humor, and choroid were satisfied with $C_{max}/MIC_{90} \geq 10$ and $AUC/MIC_{90} \geq 30$ after continuous administration of gatifloxacin ophthalmic gel.

Conclusions A rapid and sensitive method for measuring gatifloxacin concentration in ocular tissues is successfully constructed. Gatifloxacin ophthalmic gel administered three times a day for three days can achieve stable concentrations in ocular tissues, and the concentration of gatifloxacin in ocular tissues is increased compared with a single dose. Effective treatment of common bacterial infections of the conjunctiva, cornea, sclera, and iris-ciliary body can be achieved with topical application of gatifloxacin ophthalmic gel.

[Key words] Gatifloxacin; Ocular administration, gels; Liquid chromatography-tandem mass spectrometry, high-performance; Rabbits; Pharmacokinetics

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20220513-00215

眼部感染如不及时治疗可导致不可逆转的视力丧失。局部使用抗生素,如喹诺酮类药物,是治疗眼部细菌感染的主要方式^[1-2]。加替沙星是一种第4代喹诺酮类抗菌药物,具有同时抑制细菌DNA回旋酶和拓扑

异构酶IV的双靶点作用,其在保留第3代对革兰阴性菌抗菌活性的基础上,增强了对革兰阳性菌、厌氧菌、支原体、衣原体的抗菌活性^[3]。临床研究也表明,加替沙星的抗革兰阳性菌眼部感染效果显著优于左氧氟

沙星,同时还能显著降低白内障围手术期眼内炎的发生率^[4-6]。Gao 等^[7]对从中国眼部细菌感染患者分离的 3 690 株细菌进行研究发现,这些病原菌对加替沙星的敏感性最高,达到 90.01%,而对左氧氟沙星的敏感性仅为 51.91%,因此加替沙星比左氧氟沙星更适合眼部感染的预防和治疗。局部点眼是治疗眼前节疾病的首选^[8]。滴眼液在临床上的应用较为广泛,但其药物吸收入眼的速度缓慢、程度不足,导致生物利用度仅为 1%~7%^[9-10]。凝胶是一种药物智能化运载系统,具有制备简单、使用方便、滞留时间长等优点,是特别适合眼部给药的载体^[11-12]。Ding 等^[13]研究发现,白内障超声乳化术前应用加替沙星眼用凝胶患者的房水中加替沙星浓度比术前应用加替沙星滴眼液的患者高,且作用时间长。还有研究表明,加替沙星眼用凝胶比加替沙星滴眼液免眼单次给药在角膜、结膜和房水中具有更高的药物浓度^[14]。目前,相关研究多采用液相色谱法对加替沙星进行检测,样品出峰时间长,且定量限较高,不适用于眼后段组织和体液循环浓度监测,且未对不同给药频次的眼组织药代动力学进行分析。本研究建立一种基于高效液相色谱串联质谱法(high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)的灵敏、专属的眼组织及血浆加替沙星浓度测定方法,并采用该方法对加替沙星眼用凝胶不同点眼频次兔眼组织药代动力学进行研究,为更合理的临床用药提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康成年新西兰兔 94 只,体质量 2.0~2.5 kg,雌雄各半,购自青岛康大生物科技有限公司[实验动物生产许可证号:SCXK(鲁)2012-0005]。在温度 18~22℃、相对湿度 40%~60%、12 h/12 h 明暗循环环境下饲养。本研究方案经沈阳兴齐眼药股份有限公司实验动物伦理审查委员会审核批准(批文号:XQ-2016-011)。

1.1.2 主要试剂及仪器 加替沙星眼用凝胶(沈阳兴齐眼药股份有限公司);加替沙星对照品(批号:130518-200402)、环丙沙星对照品(批号:130451-201203)(中国食品药品检定研究院);甲醇(色谱纯)、甲酸(色谱纯)(北京迪马科技有限公司);纯化水(Milli-Q 超纯水过滤系统,美国密理博公司)。Diamond C18 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm,北京迪马科技有限公司);配有 ESI 源以及 Analyst 1.6.1 数据处理软件的 Qtrap 5500 型质谱仪(美国 Applied

Biosystems 公司);岛津 LC-2010AHT 液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司);Allegra™ X-22R 低温高速离心机(美国 Beckman 公司);Precellys Evolution 匀浆机(法国 Bertin technologies 公司);XS105 电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);TurboVap LV 氮气吹干仪(瑞典 Biotage 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组处理及样本采集 10 只新西兰兔不给予任何药物用于空白组织获取。将剩余 84 只新西兰兔按照随机数字表法区组随机分为单次给药组 36 只和多次给药组 48 只。单次给药组再随机分成 6 个亚组,多次给药组分 8 个亚组,每个亚组 6 只,雌雄各半。单次给药组兔左眼给予 1 滴加替沙星眼用凝胶,分别于给药后 0.5、1、3、5、7、10 h 用已称重的滤纸片置于结膜囊穹隆处 30 s 吸取泪液后于心脏取血约 2 ml,过量麻醉法处死后分别取房水、结膜、角膜、前巩膜、虹膜-睫状体、晶状体、玻璃体、视网膜和脉络膜。多次给药组每天给药 3 次,每次 1 滴,分别于连续给药第 4 天、第 6 天首次给药后 0.5 h,以及第 7 天首次给药后 0.5、1、3、5、7、10 h 心脏取血并分离眼组织,所有生物样本于-80℃冻存。

1.2.2 标准溶液及内标溶液的配制 精密称定加替沙星对照品 10.0 mg,置于 10 ml 容量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,制得 1.00 mg/ml 加替沙星储备液 I。用甲醇稀释储备液 I,配制 5.00、10.0、20.0、50.0、200、500、1 000 ng/ml 加替沙星标准系列工作溶液和 10.0、100、800 ng/ml 质量控制溶液,并于 4℃冰箱保存备用。精密称定环丙沙星(内标)对照品 10.0 mg,置于 10 ml 容量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,制成浓度为 1.00 mg/ml 的内标储备液 I,用甲醇稀释内标储备液 I,配置成质量浓度为 200 ng/ml 的内标工作溶液,并于 4℃冰箱保存备用。

1.2.3 生物样品预处理 泪液样品按 1:50 加入双蒸水,超声 30 min;晶状体按照 1:3,其余各眼组织按 1:10 加入双蒸水,研磨处理;房水和玻璃体无需研磨处理。取泪液/血浆/各眼组织匀浆液 50 μl,置于 1.5 ml EP 管中,依次加入内标工作溶液 150 μl 和甲醇 50 μl,涡旋 1 min,12 000 r/min 离心 10 min 后,取 50 μl 上清液与 500 μl 甲醇涡旋混匀 30 s,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液进行后续 HPLC-MS/MS 分析。

1.2.4 HPLC-MS/MS 法测定生物样品中加替沙星质量浓度 取 10 μl 样本进行 HPLC-MS/MS 分析。色

谱条件:设置色谱柱柱温 40 ℃,流动相为甲醇-0.1% 甲酸水溶液(体积比=70:30),流速为 0.7 ml/min。质谱条件:ESI 源电压为 5 000 V, Gas1 (N₂) 为 65 psi, Gas2 (N₂) 为 65 psi, Curtain Gas (N₂) 为 30 psi; CAD Gas (N₂) 为 Medium, TEM 为 550 ℃,扫描方式为多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM);采用正离子检测模式,检测离子 m/z 376.2 → m/z 261.2(加替沙星)和 m/z 332.1 → m/z 288.1(环丙沙星)(图 1)。

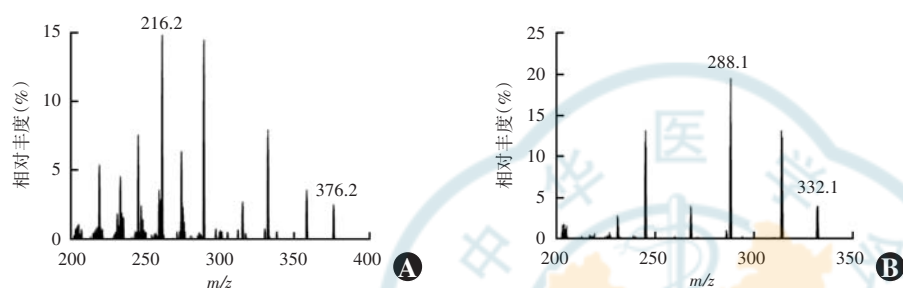


图 1 加替沙星和环丙沙星产物离子质谱图 A:加替沙星 B:环丙沙星
Figure 1 Mass spectrometry of gatifloxacin and ciprofloxacin A:Gatifloxacin B:Ciprofloxacin

1.2.5 标准曲线和质控样品的制备 取泪液/血浆/各眼组织匀浆液 50 μ l,置于 1.5 ml EP 管中,依次加入内标工作溶液 150 μ l,标准工作液或质控工作溶液 50 μ l,涡旋 1 min,12 000 r/min 离心 10 min,取 50 μ l 上清液与 500 μ l 甲醇混匀,涡旋 30 s,12 000 r/min 离心 10 min,取 10 μ l 进行 HPLC-MS/MS 分析,记录 MRM 检测的色谱图,应用 Analyst 1.6.1 数据处理软件,对待测物加替沙星和内标进行积分,得出峰面积。以待测物浓度为横坐标,待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标,用加权最小二乘法(权重为 $1/x^2$)进行标准曲线拟合。

1.2.6 方法学验证

1.2.6.1 选择性和最低定量限 取 6 批不同来源的空白生物样品 50 μ l,除内标工作溶液换成同体积的甲醇外,其余均按 1.2.3 部分进行预处理操作,进行 HPLC-MS/MS 分析,获得空白眼组织样品的色谱图;按 1.2.5 部分操作,获得模拟眼组织样品的定量下限样品色谱图;取实验兔给药后的眼组织样品,按 1.2.3 部分操作,获得实际生物样品的色谱图。

1.2.6.2 准确度和精密度 取空白生物样品 50 μ l,按照 1.2.5 部分制备定量下限以及低、中、高不同浓度水平的质控样品,进行 HPLC-MS/MS 分析,记录 MRM 检测的色谱图,每个浓度平行 6 样本,连续进行 3 个批次的样本分析。应用建立的当日校正曲线

计算出各质控样品的浓度,计算分析方法的准确度和精密度。

1.2.6.3 提取回收率和基质效应 将加替沙星 10.0、100、800 ng/ml 3 个质量浓度进行基质效应和回收率测定,每个浓度平均 6 个样本。样品 A:向 50 μ l 水溶液中加入 50 μ l 标准样品(加替沙星 10.0、100、800 ng/ml)和 150 μ l 内标涡旋混匀,取 50 μ l 加入 500 μ l 甲醇溶液涡旋混匀,10 μ l 进行 HPLC-MS/MS 分析测得加替沙星和内标峰面积。样品 B:向 50 μ l

空白生物样品中加入 200 μ l 甲醇,涡旋 1 min,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液 50 μ l,37 ℃ 水浴 N₂ 吹干。残留物用 200 μ l 样品 A 复溶,取 10 μ l 进行 HPLC-MS/MS 分析测得加替沙星和内标峰面积。样品 C:向 50 μ l 空白生物样品中加入 50 μ l 标准样品(加替沙星 10.0、100、800 ng/ml)和 150 μ l 内标,涡旋 1 min 后 12 000 r/min 离心

10 min,取上清液 50 μ l 加入 500 μ l 甲醇涡旋混匀,4 ℃ 下 12 000 r/min 离心 5 min,取 10 μ l 进行 HPLC-MS/MS 分析测得加替沙星和内标峰面积。基质效应 = $B/A \times 100\%$;回收率 = $C/B \times 100\%$ 。

1.2.6.4 稳定性试验 取 2 个 50 μ l 低(10.0 ng/ml)、高(800 ng/ml)浓度水平的质控样品,40 ℃ N₂ 吹干,加 50 μ l 空白样品匀浆液,涡旋复溶。达到各项考察条件时(室温放置 24 h、-80 ℃ 3 次冻融循环、-80 ℃ 长期冻存、样品处理后进样器 4 ℃ 放置 48 h),加入内标 150 μ l,甲醇 50 μ l,涡旋 1 min,4 ℃ 下 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液 50 μ l,加入 500 μ l 甲醇,涡旋 1 min,4 ℃ 下 12 000 r/min 离心 5 min 后,取 10 μ l 进行 HPLC-MS/MS 分析,每个浓度制备 3 个样本。

1.2.6.5 药代动力学/药效学指数计算 通常认为 C_{max} /最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC₉₀)和 AUC/MIC₉₀ 表示药代动力学/药效学(pharmacokinetics/pharmacodynamics, PK/PD)指数,根据加替沙星对眼部常见致病菌的体外抑菌活性 MIC₉₀ 值(对金黄色葡萄球菌的 MIC₉₀ = 0.31 μ g/ml;对表皮葡萄球菌的 MIC₉₀ = 0.44 μ g/ml),计算 PK/PD 指数^[15]。

1.3 统计学方法

采用 WinNonLin 8.1 软件对检测浓度进行统计分

析,得到主要药代动力学参数。不同时间点计量资料差异比较采用单因素方差分析。2 个组间计量资料差异比较采用独立样本 *t* 检验。采用双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 兔眼组织中加替沙星浓度

2.1.1 角膜组织中待测物和内标的 MRM 代表性色谱图 如图 2 所示,结果表明空白组织不干扰待测物加替沙星和内标的测定。

2.1.2 标准曲线和定量下限 各组织样本的标准曲线相关系数 *r* 均大于 0.99,线性关系良好,定量下限为 5.00 ng/ml(表 1)。

2.1.3 精密度和准确度 精密度和准确度结果表明,5.00、10.0、100 和 800 ng/ml 加替沙星在兔角膜组织中的检测日间准确度为 -1.5%~6.0%,在 ±15% 以内,日间精密度为 1.3%~5.0%,不大于 15%,符合有关生物样品分析方法确证的要求(表 2)。

2.1.4 提取回收率和基质效应 10.0、100、800 ng/ml 加替沙星以及内标在角膜组织中的基质效应分别为 (107.0±3.5)%、(106.0±1.8)%、(108.0±1.6)% 和 (110.0±2.3)% ,提取回收率分别为 (92.4±3.6)%、(92.0±2.7)%、(94.8±2.1)% 和 (85.5±2.0)%。

2.1.5 稳定性试验 应用当日随行曲线计算稳定性样品浓度,RE 均在 ±15% 以内,结果表明加替沙星在各存放条件下稳定(表 3)。

表 1 生物样品中加替沙星的标准曲线
Table 1 Standard curve for gatifloxacin in biological samples

组织样品	标准曲线	相关系数	线性范围
泪液	$y = 0.00017x - 0.00419$	0.9952	250-50000 ng/ml
血浆	$y = 0.00224x - 0.00609$	0.9939	5.00-1000 ng/ml
房水	$y = 0.00229x - 0.0025$	0.9948	5.00-1000 ng/ml
玻璃体	$y = 0.00389x - 0.00671$	0.9919	5.00-1000 ng/ml
角膜	$y = 0.0017x + 0.003$	0.9940	50.0-10000 ng/g
结膜	$y = 0.00171x - 0.000878$	0.9967	50.0-10000 ng/g
巩膜	$y = 0.00232x - 0.00216$	0.9917	50.0-10000 ng/g
虹膜-睫状体	$y = 0.00182x - 0.00361$	0.9923	50.0-10000 ng/g
脉络膜	$y = 0.00563x - 0.0219$	0.9908	50.0-10000 ng/g
视网膜	$y = 0.00253x - 0.000139$	0.9932	50.0-10000 ng/g
晶状体	$y = 0.00982x + 0.0158$	0.9933	15.0-3000 ng/g

表 2 HPLC-MS/MS 法测定兔角膜中加替沙星的精密度与准确度

Table 2 Precision and accuracy of gatifloxacin in rabbit cornea by HPLC-MS/MS method

结果	标示浓度 (ng/ml)			
	5.00	10.0	100	800
平均值	5.30	9.85	102	825
标准差	0.1	0.5	1.3	15.4
RE (%)	6.0	-1.5	1.6	3.1
批内 RSD (%)	3.4	2.8	1.5	1.0
批间 RSD (%)	2.5	5.0	1.3	1.9

注: HPLC-MS/MS: 高效液相色谱-串联质谱法; RE: 相对误差; RSD: 相对标准偏差

Note: HPLC-MS/MS: high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; RE: relative error; RSD: relative standard deviation

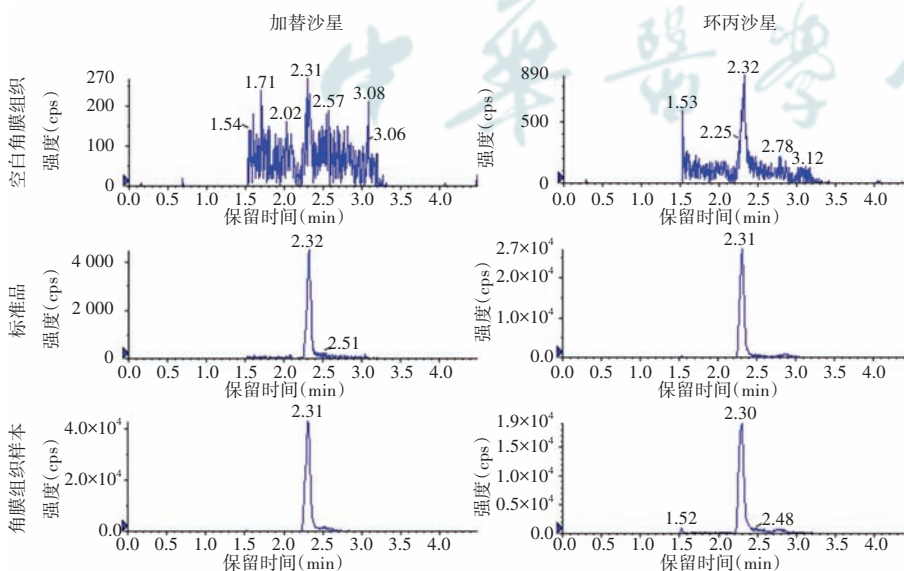


图 2 角膜组织中加替沙星和内标环丙沙星的典型 MRM 色谱图

Figure 2 MRM mass spectrum of gatifloxacin and internal standard ciprofloxacin in corneal tissue

2.2 眼组织和血浆中加替沙星的药代动力学研究

加替沙星眼用凝胶单次点眼后加替沙星在眼前节组织有较高的浓度分布,其中在泪液、角膜、结膜、巩膜、虹膜-睫状体、房水的 T_{max} 均为 1.0 h, C_{max} 分别为 94.9 $\mu\text{g/g}$ 、7.34 $\mu\text{g/g}$ 、3.65 $\mu\text{g/g}$ 、1.75 $\mu\text{g/g}$ 、1.81 $\mu\text{g/g}$ 、1.31 $\mu\text{g/ml}$;随后缓慢消除,点眼后 10 h 加替沙星浓度分别为各组织 C_{max} 的 8.6%、3.4%、11.1%、11.1%、6.7%、2.7%;加替沙星眼用凝胶单次点眼在晶状体中的 T_{max} 和 C_{max} 分别为 0.5 h 和 134 ng/g。加替沙星眼用凝胶

单次给药后在脉络膜、视网膜和玻璃体的 T_{max} 为 0.5、1.0 和 0.5 h, C_{max} 分别为 857 ng/g、529 ng/g、67.9 ng/ml。在血浆中检测到加替沙星浓度均小于 25.0 ng/ml。加替沙星眼用凝胶单次点眼后加替沙星在眼组织 AUC_{0-t} 从高到低为泪液>角膜>结膜>虹膜-睫状体>巩膜>房水>脉络膜>视网膜膜>晶状体>玻璃体(图 3)。

兔单眼连续给予加替沙星眼用凝胶第 4、6 和 7 天首次给药后 0.5 h 各眼部组织中加替沙星浓度比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), 提示连续给药 3 d 后各组织达到稳态浓度。连续给药 7 d 后各组织中加替沙星浓度较单次给药组均有所增加, 其在泪液、角膜、结膜、巩膜、房水的 T_{max} 为 0.5 h, C_{max} 分别为 148 $\mu\text{g/g}$ 、13.0 $\mu\text{g/g}$ 、10.6 $\mu\text{g/g}$ 、3.40 $\mu\text{g/g}$ 、2.22 $\mu\text{g/ml}$; 其在虹膜-睫状体、晶状体中的 T_{max} 为 1 h, C_{max} 分别为 2 387 ng/g 和 148 ng/g; 其在脉络膜、视网膜 T_{max} 均为 0.5 h, C_{max} 分别为 1.71 $\mu\text{g/g}$ 、619 ng/g(表 4)。多次给药后角膜、结膜和巩膜中药物 AUC_{0-t} 分别为单次给药的 2.04、2.12 和 2.32 倍。加替沙星在血浆中浓度

最低, 所有时间点均低于 25.0 ng/ml。

对于金黄色葡萄球菌, 加替沙星眼用凝胶多次给药后在泪液、角膜、结膜、巩膜、虹膜-睫状体、房水、脉络膜中的 C_{max}/MIC_{90} 值分别为 1 138、100、81.5、26.0、18.4、17.1、13.2, AUC/MIC_{90} 值分别为 5 453.0、331、

表 3 加替沙星兔角膜匀浆液样品不同条件下稳定性
Table 3 Stability of gatifloxacin rabbit cornea homogenate samples under different conditions

标示浓度 (ng/ml)	室温 24 h		处理后 48 h		3 次冻融循环		-80 °C 35 d	
	RE(%)	RSD(%)	RE(%)	RSD(%)	RE(%)	RSD(%)	RE(%)	RSD(%)
10.0	2.2	5.5	1.9	1.6	3.3	4.5	3.5	7.7
800	-2.8	1.7	2.6	2.0	10.2	1.1	10.2	3.6

注: RE: 相对误差; RSD: 相对标准偏差
Note: RE: relative error; RSD: relative standard deviation

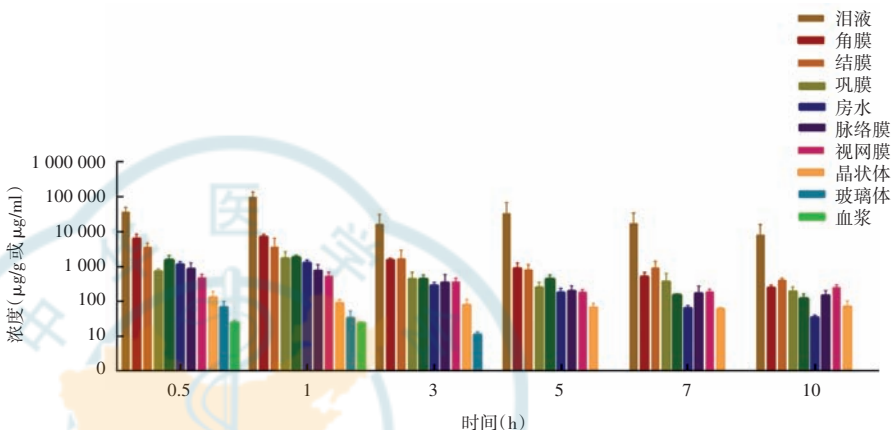


图 3 兔眼单次给予加替沙星眼用凝胶后不同时间眼组织和血浆中加替沙星分布图

Figure 3 Distribution of gatifloxacin in ocular tissue and plasma of rabbit at different time after a single dose of gatifloxacin ophthalmic gel

表 4 单次或多次给药后各兔眼组织及血液中加替沙星的药代动力学参数
Table 4 Pharmacokinetic parameters of gatifloxacin in ocular tissues and blood of rabbits after single or multiple administrations

生物样品	单次给药					多次给药				
	C_{max}	AUC_{0-t}	$AUC_{0-\infty}$	T_{max} (h)	MRT(h)	C_{max}	AUC_{0-t}	$AUC_{0-\infty}$	T_{max} (h)	MRT(h)
泪液	94.9 $\mu\text{g/g}$	293 $\mu\text{g} \cdot \text{h/g}$	322 $\mu\text{g} \cdot \text{h/g}$	1.0	3.4	148 $\mu\text{g/g}$	391 $\mu\text{g} \cdot \text{h/g}$	709 $\mu\text{g} \cdot \text{h/g}$	0.5	3.7
血浆	0.02 $\mu\text{g/ml}$	0.02 $\mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$	-	0.5	0.7	0.01 $\mu\text{g/ml}$	0.04 $\mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$	0.08 $\mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$	0.5	2.1
房水	1.31 $\mu\text{g/ml}$	3.37 $\mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$	3.48 $\mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$	1.0	2.1	2.22 $\mu\text{g/ml}$	5.54 $\mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$	5.62 $\mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$	0.5	2.2
玻璃体	0.07 $\mu\text{g/ml}$	0.09 $\mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$	-	0.5	1.1	0.05 $\mu\text{g/ml}$	0.16 $\mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$	0.19 $\mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$	0.5	3.2
角膜	7.34 $\mu\text{g/g}$	19.0 $\mu\text{g} \cdot \text{h/g}$	20.0 $\mu\text{g} \cdot \text{h/g}$	1.0	2.2	13.0 $\mu\text{g/g}$	38.8 $\mu\text{g} \cdot \text{h/g}$	43.1 $\mu\text{g} \cdot \text{h/g}$	0.5	3.2
结膜	3.65 $\mu\text{g/g}$	14.3 $\mu\text{g} \cdot \text{h/g}$	16.5 $\mu\text{g} \cdot \text{h/g}$	1.0	3.2	10.6 $\mu\text{g/g}$	30.2 $\mu\text{g} \cdot \text{h/g}$	104 $\mu\text{g} \cdot \text{h/g}$	0.5	4.3
巩膜	1.75 $\mu\text{g/g}$	5.18 $\mu\text{g} \cdot \text{h/g}$	7.25 $\mu\text{g} \cdot \text{h/g}$	1.0	3.3	3.40 $\mu\text{g/g}$	12.0 $\mu\text{g} \cdot \text{h/g}$	30.5 $\mu\text{g} \cdot \text{h/g}$	0.5	4.2
虹膜-睫状体	1.81 $\mu\text{g/g}$	5.33 $\mu\text{g} \cdot \text{h/g}$	5.90 $\mu\text{g} \cdot \text{h/g}$	1.0	2.6	2.39 $\mu\text{g/g}$	6.75 $\mu\text{g} \cdot \text{h/g}$	7.44 $\mu\text{g} \cdot \text{h/g}$	1.0	2.7
脉络膜	0.86 $\mu\text{g/g}$	3.16 $\mu\text{g} \cdot \text{h/g}$	5.64 $\mu\text{g} \cdot \text{h/g}$	0.5	3.3	1.71 $\mu\text{g/g}$	5.74 $\mu\text{g} \cdot \text{h/g}$	21.7 $\mu\text{g} \cdot \text{h/g}$	0.5	4.3
视网膜	0.53 $\mu\text{g/g}$	2.81 $\mu\text{g} \cdot \text{h/g}$	8.87 $\mu\text{g} \cdot \text{h/g}$	1.0	4.1	0.62 $\mu\text{g/g}$	2.88 $\mu\text{g} \cdot \text{h/g}$	4.34 $\mu\text{g} \cdot \text{h/g}$	0.5	4.2
晶状体	0.13 $\mu\text{g/g}$	0.73 $\mu\text{g} \cdot \text{h/g}$	3.01 $\mu\text{g} \cdot \text{h/g}$	0.5	4.7	0.15 $\mu\text{g/g}$	1.17 $\mu\text{g} \cdot \text{h/g}$	2.96 $\mu\text{g} \cdot \text{h/g}$	1.0	4.8

注: C_{max} : 达峰浓度; AUC_{0-t} : 0-t 小时曲线下面积; $AUC_{0-\infty}$: 0- ∞ 小时曲线下面积; T_{max} : 达峰时间; MRT: 药物在体内的平均滞留时间; -: 无数据

Note: C_{max} : peak concentration; AUC_{0-t} : area under the curve at 0-t hours; $AUC_{0-\infty}$: area under the curve at 0- ∞ hours; T_{max} : peak time; MRT: mean retention time of drugs in the body; -: no data

799、234、57.2、43.2、166.9。对于表皮葡萄球菌,加替沙星眼用凝胶多次给药后在泪液、角膜、结膜组织中的 C_{\max}/MIC_{90} 值分别为 336、29.5、24.1, AUC/MIC_{90} 在上述组织中的值分别为 1 611、98.0、236。

3 讨论

本研究首先建立测定兔眼组织和血浆中加替沙星浓度的 HPLC-MS/MS 法,灵敏度高且分析时间短。对该方法选择性、线性、准确度、精密性、稳定性、基质效应及回收率进行验证,均符合化学药物临床前药代动力学研究要求的参数。本研究比较加替沙星眼用凝胶单次和多次给药后在兔眼组织及血浆中的药代动力学参数,发现加替沙星眼用凝胶连续用药后 3 d 达稳态浓度,多次给药后的眼组织 AUC_{0-1} 为单次给药的 1.3~2.3 倍,提示多次给药后眼组织药物浓度分布增加。近十年,对于氟喹诺酮类药物抗菌有效性的评估普遍达成一种共识,即采用 PK/PD 理论预测氟喹诺酮药物清除细菌的情况,对于指导该类药物的合理临床应用发挥重要作用。通常认为 PK/PD 指数满足 $C_{\max}/MIC_{90} \geq 10$ 且 $AUC/MIC_{90} \geq 30$ 视为有效^[16-17]。中国近年来多家眼科机构的数据显示,眼部感染病原菌约 80% 为革兰阳性菌,以表皮葡萄球菌最常见,其次为金黄色葡萄球菌^[18-20]。故本研究分别选择加替沙星对以上 2 种眼部常见感染菌的 MIC_{90} 数据为依据,计算 PK/PD 指数。加替沙星眼用凝胶多次给药后兔泪液、角膜、结膜组织中对表皮葡萄球菌和金黄色葡萄球菌的 $C_{\max}/MIC_{90} \geq 10$ 且 $AUC/MIC_{90} \geq 30$,提示每天 3 次加替沙星眼用凝胶连续点眼后眼前节组织可实现对金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌的清除。药物局部点眼进入眼后节的途径可能包括经眼周/眼后节-巩膜、经玻璃体或者血管膜途径^[21]。本研究发现,加替沙星局部点眼后在眼后节组织中同样具有较高的浓度分布,特别是脉络膜,但在玻璃体浓度很低,故排除经玻璃体到达眼底途径,推测加替沙星可能通过眼周巩膜和血管膜途径到达眼后节组织。

角膜是一种亲脂-亲水-亲脂的多层生物膜,对强水溶性或较强脂溶性药物具有明显的屏障作用。传统的滴眼液点眼后,只有约 10% 药物进入眼内,其余大部分药液溢出眼外或经结膜、鼻腔黏膜吸收入血液系统等,导致其生物利用度低^[22]。眼用凝胶由于具有眼表滞留时间长、生物利用度高等优势已在临床上得到广泛应用^[23]。加替沙星眼用凝胶技术已同时获得中国国家知识产权局发明专利(专利号:CN102078284B)和美国专利(专利号:US8901131B2)^[24]。本研究结果

显示,加替沙星眼用凝胶给药后在各眼组织 T_{\max} 短, C_{\max} 高,且消除缓慢,单次给药后 10 h 各兔眼组织仍具有较高的药物浓度。在未来的研究中,可适当增加采集样品的时间点,以更好地寻找加替沙星在眼组织的消除特征。另外,加替沙星眼用凝胶单次给药在眼组织的浓度相当于加替沙星滴眼液多少给药频次仍是下一步需要探索的内容。

本研究同时考察了兔血浆中加替沙星的浓度,发现单次和多次给药后血浆中 C_{\max} 小于 25.00 ng/ml,且二者浓度无显著差异,提示加替沙星眼用凝胶局部多次用药后,人体循环量少,安全性高。

本研究对质谱条件进行优化时,分别对比加替沙星在 ESI 正、负离子 2 种扫描模式,发现正离子条件下加替沙星响应较好。对液相条件进行优化时,对比甲醇-水和乙腈-水系统的流动相,发现采用甲醇-水洗脱加替沙星峰型较好,保留时间合适且质谱响应更强,同时在水相中分别加入 0.1% 甲酸提高响应灵敏度。蛋白沉淀、液-液萃取、固相萃取是生物样品前处理的 3 种主要技术,均可用于眼组织和眼内液的处理,其中蛋白沉淀法是最简单快速的方法。本研究也发现,甲醇沉淀蛋白方法的提取回收率符合要求,内源性干扰小,故采用该法进行样本预处理。

综上所述,本研究成功建立 1 个快速灵敏的眼组织加替沙星浓度测定方法,通过单次或多次加替沙星眼用凝胶点眼对泪液、角膜、结膜、巩膜、虹膜-睫状体、房水、晶状体、视网膜、脉络膜、玻璃体眼组织以及血浆进行测定,发现局部给予加替沙星眼用凝胶不仅在角膜、结膜、房水等组织有分布,在玻璃体、视网膜、脉络膜等眼后节组织也有分布,且人体循环量少,安全性高。加替沙星眼用凝胶以每天 3 次点眼连续用药 3 d 后在眼组织可达到稳态浓度,且在眼组织的分布高于单次给药,可为临床用药方案提供数据支持。但本研究尚存在一些不足,如在解剖分离视网膜和脉络膜时,由于新西兰兔不存在色素膜,难以实现两者的完全分离,导致测量结果产生偏差,未来可更换实验动物进一步验证。

利益冲突 王小桐、赵欣、祖薇、沈旭、陈世超、杨强均为沈阳兴齐眼药股份有限公司职工;本文中提及获得中国国家知识产权局发明专利(专利号:CN102078284B)和美国专利(专利号:US8901131B2)的加替沙星眼用凝胶技术均由沈阳兴齐眼药股份有限公司申请

作者贡献声明 王小桐:参与选题、数据采集、分析/解释数据、起草及修改文章;赵欣:设计实验、分析/解释数据;祖薇:参与动物实验、样品前处理;沈旭:参与动物实验、数据采集/分析;陈世超:参与动物实验、数据采集及分析;杨强:酝酿/设计实验、对文章知识性内容做批评性审阅及文章定稿

参考文献

- [1] Pawar P, Katara R, Mishra S, et al. Topical ocular delivery of fluoroquinolones[J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2013, 10(5): 691-711. DOI: 10.1517/17425247.2013.772977.
- [2] Christopher KL, Hood CT, Mian SI, et al. Endophthalmitis in advanced microbial keratitis; risk factors and examination findings[J]. *Cornea*, 2020, 39(9): 1096-1101. DOI: 10.1097/ICO.0000000000002349.
- [3] Hezhen T, Shuying W, Xiaoli Z, et al. Effect of gatifloxacin in the treatment of ophthalmological diseases and continuous nursing intervention[J]. *Pak J Pharm Sci*, 2018, 31(4(Special)): 1707-1712.
- [4] Scoper SV. Review of third-and fourth-generation fluoroquinolones in ophthalmology: *in-vitro* and *in-vivo* efficacy[J]. *Adv Ther*, 2008, 25(10): 979-994. DOI: 10.1007/s12325-008-0107-x.
- [5] Mather R, Karenchak LM, Romanowski EG, et al. Fourth generation fluoroquinolones; new weapons in the arsenal of ophthalmic antibiotics[J]. *Am J Ophthalmol*, 2002, 133(4): 463-466. DOI: 10.1016/s0002-9394(02)01334-x.
- [6] Jensen MK, Fiscella RG, Moshirfar M, et al. Third- and fourth-generation fluoroquinolones: retrospective comparison of endophthalmitis after cataract surgery performed over 10 years[J]. 2008, 34(9): 1460-1467.
- [7] Gao W, Xia T, Chen HB, et al. Ocular bacterial infections at a tertiary eye center in China: a 5-year review of pathogen distribution and antibiotic sensitivity[J]. *Int J Ophthalmol*, 2020, 13(1): 54-60. DOI: 10.18240/ijo.2020.01.08.
- [8] Gaudana R, Ananthula HK, Parenky A, et al. Ocular drug delivery[J]. *AAPS J*, 2010, 12(3): 348-360. DOI: 10.1208/s12248-010-9183-3.
- [9] Durairaj C. Ocular pharmacokinetics[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2017, 242: 31-55. DOI: 10.1007/164_2016_32.
- [10] Urti 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.
- [11] Pandey M, Choudhury H, Binti Abd Aziz A, et al. Potential of stimuli-responsive in situ gel system for sustained ocular drug delivery: recent progress and contemporary research[J/OL]. *Polymers (Basel)*, 2021, 13(8): 1340 [2023-09-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33923900>. DOI: 10.3390/polym13081340.
- [12] Alkholief M, Kalam MA, Almomen A, et al. Thermoresponsive sol-gel improves ocular bioavailability of Dipivefrin hydrochloride and potentially reduces the elevated intraocular pressure *in vivo*[J]. *Saudi Pharm J*, 2020, 28(8): 1019-1029. DOI: 10.1016/j.jsps.2020.07.001.
- [13] Ding W, Ni W, Chen H, et al. Comparison of drug concentrations in human aqueous humor after the administration of 0.3% gatifloxacin ophthalmic gel, 0.3% gatifloxacin and 0.5% levofloxacin ophthalmic solutions[J]. *Int J Med Sci*, 2015, 12(6): 517-523. DOI: 10.7150/ijms.11376.
- [14] 孙飒, 周天洋, 夏慧云, 等. 加替沙星眼用凝胶制剂与加替沙星滴眼液兔眼药动学的比较[J]. *医学研究杂志*, 2017, 46(2): 116-119. DOI: 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.02.030.
- [15] Sun S, Zhou TY, Xia HY, et al. Comparison of the pharmacokinetics of gatifloxacin ophthalmic gel with gatifloxacin eye drops in rabbits[J]. *J Med Res*, 2017, 46(2): 116-119. DOI: 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.02.030.
- [16] Callegan MC, Ramirez R, Kane ST, et al. Antibacterial activity of the fourth-generation fluoroquinolones gatifloxacin and moxifloxacin against ocular pathogens[J]. *Adv Ther*, 2003, 20(5): 246-252. DOI: 10.1007/BF02849853.
- [17] Wright DH, Brown GH, Peterson ML, et al. Application of fluoroquinolone pharmacodynamics[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2000, 46(5): 669-683. DOI: 10.1093/jac/46.5.669.
- [18] Craig WA. Does the dose matter? [J]. *Clin Infect Dis*, 2001, 33 Suppl 3: S233-237. DOI: 10.1086/321854.
- [19] Gao W, Xia T, Chen HB, et al. Ocular bacterial infections at a tertiary eye center in China: a 5-year review of pathogen distribution and antibiotic sensitivity[J]. *Int J Ophthalmol*, 2020, 13(1): 54-60.
- [20] Liu C, Ding B, Ji J, et al. Microbial spectrum and resistance patterns in ocular infections: a 15-year review in East China[J]. *Infect Drug Resist*, 2021, 14: 2165-2171. DOI: 10.2147/IDR.S314647.
- [21] 孙声桃, 王丽娅, 张月琴, 等. 近六年眼部分离细菌及体外药物敏感性的变迁[J]. *中华眼科杂志*, 2012, 48(6): 542-547. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2012.06.013.
- [22] Sun ST, Wang LY, Zhang YQ, et al. The changes of ocular bacterial isolates and *in vitro* antimicrobial susceptibility in the past six years[J]. *Chin J Ophthalmol*, 2012, 48(6): 542-547. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2012.06.013.
- [23] Mizuno K, Koide T, Shimada S, et al. Route of penetration of topically instilled niprodrilol into the ipsilateral posterior retina[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50(6): 2839-2847. DOI: 10.1167/iovs.08-2922.
- [24] 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.
- [25] Khan S, Warade S, Singhvi DJ. Improvement in ocular bioavailability and prolonged delivery of tobramycin sulfate following topical ophthalmic administration of drug-loaded mucoadhesive microparticles incorporated in thermosensitive in situ gel[J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2018, 34(3): 287-297. DOI: 10.1089/jop.2017.0079.
- [26] Liu JD, Yang YC, Tang H. Gatifloxacin-containing ophthalmic gel and preparation method thereof; US8901131B2 [P/OL]. 2014-12-02 [2023-10-18]. <http://patents.google.com/patent/US8901131B2/en>.

(收稿日期: 2023-11-23 修回日期: 2024-06-04)

(本文编辑: 张宇 骆世平)

读者·作者·编者

欢迎订阅《中华实验眼科杂志》

《中华实验眼科杂志》为中国科技论文统计源期刊和中国中文核心期刊、中国科学引文数据库(CSCD)核心期刊,月刊,96面,每月10日出版,每期定价26元,邮发代号:36-13,国内外公开发行,欢迎到各地邮局订阅或直接与本刊编辑部联系订购。联系电话:0371-87160872。

(本刊编辑部)