

引文格式:陈艳,孙冰,唐丽琴.那他霉素粉剂和滴眼液在兔眼角膜和房水中表达的实验研究[J].眼科新进展,2015,35(7):626-629. doi:10.13389/j.cnki.rao.2015.0170

【实验研究】

那他霉素粉剂和滴眼液在兔眼角膜和房水中表达的实验研究[△]

陈艳 孙冰 唐丽琴

作者简介:陈艳,女,1979年1月出生,安徽合肥人,硕士,主治医师。
联系电话:13955162169; E-mail: chenyan122@126.com

About CHEN Yan: Female, born in January, 1979. Master degree. Tel: 13955162169; E-mail: chenyan122@126.com

收稿日期:2014-10-21

修回日期:2015-03-28

本文编辑:盛丽娜

[△]基金项目:安徽医科大学校科学研究基金资助(编号:2012xkj038)

作者单位:230001 安徽省合肥市,安徽省立医院眼科(陈艳,孙冰);

230001 安徽省合肥市,安徽省立医院药剂科(唐丽琴)

通讯作者:孙冰, E-mail: sysmsb@163.com

Received date: Oct 21, 2014

Accepted date: Mar 28, 2015

Foundation item: Research Foundation of Anhui Medical University (No: 2012xkj038)

From the Department of Ophthalmology, Anhui Provincial Hospital (CHEN Yan, SUN Bing), Hefei 230001, Anhui Province, China; Department of Pharmacy, Anhui Provincial Hospital (Tang Li-Qin), Hefei 230001, Anhui Province, China

Responsible author: SUN Bing, E-mail: sysmsb@163.com

Expression of natamycin eye drops and powder in rabbits cornea and aqueous humor

CHEN Yan, SUN Bing, TANG Li-Qin

[Key words] natamycin; high performance liquid chromatography; pharmacokinetics; cornea; aqueous humor

[Abstract] Objective To study the differences of pharmacokinetics in the rabbit cornea of natamycin powder administration directly and eye drops administration.

Methods Sixteen New Zealand rabbits were randomly divided into two groups, each group consisted of 8 rabbits. The left and right eye of every rabbit was administrated with natamycin eye drops (20 μ L per 5 minutes) and natamycin powder (once per 10 minutes) respectively. The corneal tissue in group A was taken, and the aqueous humor in group B was extracted. Natamycin content was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The column temperature was 30 $^{\circ}$ C, the mobile phase of ammonium acetate solution-acetonitrile-tetrahydrofuran, the flow rate was 1 mL \cdot min⁻¹, the detection wavelength was 303 nm.

Results Under the chromatographic conditions, natamycin retention time was 6.5 minutes, separation was good, standard curve within 0.05 - 50.00 mg \cdot L⁻¹ had good linear relationship ($r = 1.000$), limit of quantification was 0.05 mg \cdot L⁻¹. Natamycin concentration in cornea administrated with powder [(19.39 \pm 1.95) mg \cdot L⁻¹] was much higher than that administrated with eye drops [(10.34 \pm 3.02) mg \cdot L⁻¹] ($P < 0.001$); Natamycin concentration in aqueous humor administrated with powder [(1.67 \pm 0.15) mg \cdot L⁻¹] was also higher than that administrated with eye drops [(1.46 \pm 0.14) mg \cdot L⁻¹] ($P = 0.013$).

Conclusion The penetrability of natamycin powder in rabbit cornea is higher than that of eye drops.

【关键词】 那他霉素; 高效液相色谱法; 药代动力学; 角膜; 房水

【摘要】 目的 研究那他霉素粉末直接给药和滴眼液给药在兔眼角膜的药代动力学的差异。**方法** 将16只新西兰白兔随机分为A、B两组, 每组8只, 每只白兔左右眼分别使用那他霉素干粉(每10 min涂1次)和那他霉素眼液(每5 min滴20 μ L)。2 h后A组取其角膜, B组抽取房水。运用高效液相色谱法分别测定那他霉素含量, 柱温为30 $^{\circ}$ C, 流动相为乙酸铵溶液-乙腈-四氢呋喃, 流速为1 mL \cdot min⁻¹, 检测波长为303 nm。**结果** 在该色谱条件下, 那他霉素的保留时间为6.5 min, 分离度良好, 标准曲线在0.05 ~ 50.00 mg \cdot L⁻¹内线性关系良好($r = 1.000$), 最低定量限为0.05 mg \cdot L⁻¹。A组经那他霉素粉末给药的角膜中药物浓度为(19.39 \pm 1.95) mg \cdot L⁻¹, 较滴眼液给药组的(10.34 \pm 3.02) mg \cdot L⁻¹显著增高, 差异有显著统计学意义($P < 0.001$); B组经粉末给药的房水中药物浓度为(1.67 \pm 0.15) mg \cdot L⁻¹, 较滴眼液给药组的(1.46 \pm 0.14) mg \cdot L⁻¹明显增高, 差异有统计学意义($P = 0.013$)。

结论 那他霉素粉末在兔眼角膜的穿透性高于那他霉素滴眼液。

真菌性角膜炎是致盲率较高的感染性疾病, 近年来发病率呈逐年上升趋势。多数患者有发病诱因, 如植物性外伤史、滥用激素史、不合理使用抗生素病史等。治疗的主要手段有药物治疗、溃疡清创术联合抗真菌药物、板层角膜切除术联合抗真菌药物治疗、结膜瓣遮盖术等^[1-2]。有研究显示^[3], 镰孢菌属和曲霉菌属是真菌性角膜炎的主要致病菌, 那他霉素对镰孢菌属、曲霉菌属、青霉菌属和念珠菌属等均具有抗菌活性, 是治疗真菌性角膜炎的有效药物^[4]。本研究运用高效液相色谱法 (high performance

liquid chromatography, HPLC) 测定角膜和房水中那他霉素的浓度, 研究那他霉素粉末直接给药和滴眼液给药在兔眼角膜的药代动力学的差异, 探讨临床应用那他霉素粉剂给药的可能性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与主要试剂 健康成年新西兰白兔16只, 雌雄不限(安徽省立医院动物实验室提供), 体质量(1.6 \pm 0.5) kg。那他霉素滴眼液(批号

173525F,美国 Alcon 公司);那他霉素干粉(批号 C16208400,Dr. Ehrenstorfer GmbH,德国);那他霉素标准品(批号 C16208400,Dr. Ehrenstorfer GmbH,德国);乙腈为色谱纯(批号 091118,南通三余试剂厂生产);甲醇为色谱纯(批号 20120908,天津大茂化学试剂厂生产);四氢呋喃为分析纯(批号 20121106)、氯化铵(批号 20120625)、乙酸铵(批号 20121114,天津光复科技发展有限公司);盐酸(批号 1101068,无锡展望化学试剂厂);水为纯化水(安徽省立医院制剂室提供)。

1.1.2 主要仪器 Waters 515 高效液相色谱系统(美国 Waters 公司生产);SSI-525 紫外检测器(美国惠普公司生产);HT-130 柱温箱(天津市恒奥科技发展有限公司生产);TGL-16G 台式离心机(上海安亭科学仪器厂生产);微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂生产)。

1.2 方法

1.2.1 生物样品的获取方法与分组 将 16 只新西兰白兔随机分为 A、B 两组,每组 8 只。术前 $30\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 戊巴比妥钠按 $1\text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体质量静脉麻醉。A 组白兔待麻醉后,用圆刀片刮除左眼角膜上皮,将那他霉素干粉均匀涂抹在角膜上。每 10 min 涂抹 1 次直至 2 h,每 5 min 滴用 $10\text{ }\mu\text{L}$ 生理盐水,防止角膜干燥。同时用微量加液器将那他霉素滴眼液约 $20\text{ }\mu\text{L}$ 滴入同一白兔右眼结膜囊内,每 5 min 1 次直至 2 h,滴完后立即闭合眼睑。2 h 后,生理盐水冲洗结膜囊后,立即处死动物,分别取其角膜组织,用滤纸吸干后称质量。样品于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。B 组白兔待麻醉后,同 A 组方法处理角膜,左右眼分别涂抹那他霉素干粉和滴用那他霉素眼液,2 h 后生理盐水冲洗结膜囊,皮试针头分别抽取双眼房水 $200\text{ }\mu\text{L}$,立即处死动物,样品于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

1.2.2 样品提取方法 (1)房水:取房水 $100\text{ }\mu\text{L}$,置于 EP 管中,一边混悬一边逐滴加入甲醇 $100\text{ }\mu\text{L}$,旋涡混合 1 min , $10\text{ }000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min ,取上清液置于另外的干净 EP 管中,放于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中储存备用。(2)角膜:将角膜剪碎后,置玻璃匀浆器中,加入 $300\text{ }\mu\text{L}$ 甲醇,研磨 5 min ,再加入甲醇 $200\text{ }\mu\text{L}$ 冲洗黏附管壁的组织,全部转移至干净 EP 管中,并将 EP 管进行涡旋震荡 30 s , $10\text{ }000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min ,取上清液,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中储存备用。

1.2.3 标准品溶液配制方法 精密称取那他霉素标准品,用体积分数 1% 盐酸甲醇溶液配成 $1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的那他霉素溶液,作为储备液,将储备液分装后于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。用体积分数 1% 盐酸甲醇溶液按照比例稀释储备液,得到成比例的系列浓度标准品溶液($0.05\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.10\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.20\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.50\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.00\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $5.00\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10.00\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $50.00\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。

1.2.4 药物分析方法 HPLC 色谱柱为 kromasil

C18 柱,粒径为 $5\text{ }\mu\text{m}$,色谱柱长度为 250 mm ,直径为 4.6 mm ,柱温为 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$,流动相为乙酸铵溶液(醋酸铵 3.0 g 和氯化铵 1.0 g ,加水 760 mL 溶解)-乙腈-四氢呋喃($68.0:32.0:0.5$),流速为 $1\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长为 303 nm 。进样量为 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。采用外标法,将峰高与浓度进行线性回归分析,标准曲线浓度系列为 $0.05\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.10\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.20\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.50\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.00\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $5.00\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10.00\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $50.00\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,最低定量浓度为 $0.05\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.3 方法学考察

1.3.1 专属性考察 测定不同浓度的标准品溶液,对高峰面积及出峰时间进行观察。

1.3.2 标准曲线的制备 分别取 1.2.3 配制的系列浓度标准品液各 $20\text{ }\mu\text{L}$ 注入色谱仪,记录色谱图,量取峰高。以峰高(H)为纵坐标,浓度(C)为横坐标进行线性回归,得到那他霉素的线性回归方程为: $H = 1500.89 C + 20.37$, $r = 1.000$,对回归系数 b 进行 F 检验, $P = 0.000$ 。

1.3.3 精密度实验 配制浓度为 $0.05\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.00\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $50.00\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的那他霉素标准品溶液,每个浓度进行 6 样本分析,连续测定 5 d,对测定结果进行统计分析。

1.3.4 方法回收率实验 配制浓度为 $0.05\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.00\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $50.00\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的那他霉素标准品溶液,以当日标准曲线计算样品浓度,分别计算回收率:回收率 = (加入标品后含量 - 样品含量)/加入标品量 $\times 100\%$ 。

1.4 统计学分析 应用统计学软件 SPSS 17.0 分析数据,经那他霉素粉末给药和那他霉素眼液给药的房水药物浓度和角膜中药物浓度采用独立样本 t 检验进行统计学分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 方法学考察结果 结果表明在该色谱条件下,那他霉素的保留时间为 6.5 min ,分离度良好,无其他峰干扰(图 1-图 2)。那他霉素同其他物质能较好分离,标准曲线在 $0.05 \sim 50.00\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 内线性关系良好($r = 1.000$),最低定量限为 $0.05\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。精密度实验结果显示日内标准偏差(relative standard deviation, RSD)和日间 RSD 均小于 10%,准确度(即方法回收率)结果显示那他霉素的回收率为 $99.7\% \sim 106.7\%$,平均回收率为 102.3% (见表 1)。

2.2 样本测定结果 B 组经那他霉素粉末给药的房水中所测药物浓度为 $(1.67 \pm 0.15)\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,较滴眼液给药组的 $(1.46 \pm 0.14)\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 明显增高,差异有统计学意义($t = 2.859$, $P = 0.013$);A 组经那他霉素粉末给药的角膜中药物浓度为 $(19.39 \pm 1.95)\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,较滴眼液给药组的 (10.34 ± 3.02)

mg · L⁻¹ 显著增高,差异有显著统计学意义($t = 7.116, P < 0.001$)。

表 1 那他霉素精密度和回收率实验结果

Table 1 Natamycin precision and recovery results

Sample concentration	Precision results		Recovery results	
	Intraday precision RSD/%	Inter-day precision RSD/%	Measured values($\rho/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Percent recovery/%
0.05 mg · L ⁻¹	2.8	6.9	0.052 ± 0.009	103.0
1.00 mg · L ⁻¹	3.8	8.6	0.997 ± 0.032	99.7
50.00 mg · L ⁻¹	1.2	2.5	53.37 ± 0.972	106.7

Figure 1 0.05 mg · L⁻¹ natamycin chromatogram 0.05 mg · L⁻¹ 那他霉素色谱图

Figure 2 0.50 mg · L⁻¹ natamycin chromatogram 0.50 mg · L⁻¹ 那他霉素色谱图

3 讨论

目前 HPLC 法已经被用于食品中那他霉素残留量及高纯度那他霉素产品的检测分析^[5]。采用如实验所示的色谱条件,那他霉素含量在 0.05 ~ 50.00 mg · L⁻¹ 时与峰高呈现良好的线性关系,回收率高,方法的检出限和定量下限均比较低,说明实验采用 HPLC 法建立那他霉素测量方法是合理且有效的。

那他霉素在临床上限于局部使用,是唯一被美国 FDA 批准生产的眼局部用抗真菌药^[6]。有实验表明^[7] 结膜下、前房内、玻璃体内注射那他霉素来治疗角膜深部真菌感染并不能达到治疗目的,反而会增加眼部的刺激症状和毒性。注射给药具有较大的系统毒性且不能在眼组织内达到有效的药物浓度。市售 50 g · L⁻¹ 那他霉素眼液为乳白色混悬液体。由于它的独特制剂,滴眼后黏附于角膜溃疡表面,局

部浓度高,保留时间长,可以逐步渗透到角膜基质,有利于药物作用的发挥。本实验显示经那他霉素粉末给药后,角膜及房水中药物的富集程度要比经滴眼液给药后高,提示那他霉素粉末在兔眼角膜的穿透性高于那他霉素眼液。这可能与经那他霉素粉末给药后可延长药物与角膜组织的接触时间,降低结膜囊泪液的稀释作用有关。同时那他霉素粉末给药的兔眼用刀片刮除了角膜上皮,这也使得药物直接作用于病灶,有利于药物在组织内的渗透。目前研究表明^[8-9],角膜溃疡清创术联合抗真菌眼药是治疗中浅层真菌性角膜溃疡的有效方法,它可能使得那他霉素等眼表作用较强的抗真菌药物直接接触残余真菌,有利于药物在组织内的渗透,提高药物杀灭真菌的效用。对于深基质层和全层角膜感染的患者需要联合羊膜移植、板层或全层角膜移植术^[2,10]。

文献证明^[11],绝大多数霉菌在那他霉素浓度为 0.5 ~ 6.0 mg · kg⁻¹ 时即被抑制,个别菌种在那他霉素浓度为 10.0 ~ 25.0 mg · kg⁻¹ 时被抑制,多数酵母菌在那他霉素浓度为 1.0 ~ 5.0 mg · kg⁻¹ 时即被抑制。本实验中,用药物粉末以及滴眼液处理后,角膜中的药物基本上已经达到有效抑菌浓度。粉末给药的房水中药物浓度较滴眼液给药组有所提高,但两者都未达到有效抑菌浓度。这与 Lalitha 等^[12] 的研究结果一致:那他霉素眼液在眼内通透性差,局部应用可以很好地穿透角膜,在角膜基质层内达到有效浓度,但在眼内达不到有效浓度。目前研究^[4,13] 认为,伏立康唑局部应用在房水和玻璃体中均能达到较高的药物质量浓度,房水中的药物质量浓度超过绝大多数敏感真菌的最低抑菌浓度,可能是治疗常规治疗无效的真菌性角膜炎和真菌性眼内炎的有效药物,但目前还没有眼用制剂。

参考文献

1 姜剑,毕宏生,王兴荣,温莹,张建华. 中浅层真菌性角膜炎治疗方式选择分析[J]. 中国实用眼科杂志,2012,30(4):455-457.

2 曾庆延,蒋华,吴尚操,金晓丽,秦姣. 板层角膜切除术联合那他霉素治疗真菌性角膜溃疡的临床及病理研究[J]. 国际眼科杂志,2012,12(3):135-137.

3 鹿秀海,高彦,张莉,杜满,李素霞,王婷,等. 真菌性角膜炎 334 例的病原学分析[J]. 中华眼科杂志,2013,49(1):12-15.

4 Prajna NV, Mascarenhas J, Krishnan T, Reddy PR, Prajna L, Srinivasan M, et al. Comparison of natamycin and voriconazole for the treatment of fungal keratitis[J]. Arch Ophthalmol,2010,128(6):672-678.

5 魏红燕. HPLC 法测定那他霉素含量及有关物质[J]. 齐鲁药事,2009,28(3):150-152.

【实验研究】

魏红领 刘韶瑞 刘泗容

Establishment of chronic glaucoma rabbit model by injecting tunicamycin to anterior chamber

[Key words] tunicamycin; glaucoma animal model; anterior chamber injection

[Abstract] Objective To establish the chronic glaucoma rabbit model by injecting tunicamycin (Tm) to anterior chamber with excessive endoplasmic reticulum (ER) stress in trabecular cells. **Methods** An glaucoma animal model was established by anterior chamber injection in 22 healthy Wistar rabbits with six weeks to eight weeks old.

The right eyes were injected by 4 μ g Tm (experimental group), whereas the left eyes with same volume BBS as control. Intraocular pressure (IOP) was tested by TONO-PEN AVIA tonometer at postoperative 3 days, 5 days, 1 week, 2 weeks, 3 weeks, 4 weeks, 5 weeks, 6 weeks, anterior chamber flare and complications were observed at the same time. The rabbits selected randomly in every group were sacrificed. Tissue was harvested from the wall of the eyeball and pathological section was made, then was stained with HE to observe the layers of retinal structure. The data was analyzed statistically by

SPSS 14.0 for windows. **Results** There was no statistical difference in preoperative IOP between right eyes and left eyes ($P > 0.05$). The models in 8 rabbits were established after once injection, the successful rate was 36.36%; The successful rate of the secondary injection was 68.18%. IOP in right eyes were obviously higher than those in

left eyes at postoperative 3 days, 5 days, 1 week, 2 weeks, 3 weeks, 4 weeks (all $P < 0.01$). At postoperative 5 weeks, 6 weeks, IOP in left eyes were higher than that in the right eye (all $P < 0.05$). The pathological examination showed that the retinal ganglion cell-nerve fiber layer and optic nerve damaged in the rabbits with high IOP, which aggravated with the time prolonging, and these changes in the rabbits without high IOP

was not obvious. The retinal ganglion cell-inner plexiform layer thickness in the control group and experimental group were $(74.38 \pm 7.27) \mu\text{m}$ and $(58.41 \pm 8.29) \mu\text{m}$ ($P < 0.01$), retinal nerve fiber layer thickness were $(92.59 \pm 10.21) \mu\text{m}$ and $(74.62 \pm 11.65) \mu\text{m}$ ($P < 0.01$). **Conclusion** An elevated IOP animal model can be established by an-

terior chamber injection of Tm in rabbit. But the elevated IOP have the different values and maintained time with low successful rat, and the secondary injection can improve the successful rate; The elevated IOP can change the eyeball structure and damage the retinal nerve fiber layer and optic nerve.

【关键词】 衣霉素;青光眼模型;前房注射

【摘要】 目的 本实验采用衣霉素(tunicamycin, Tm)前房注射,利用其对大白兔小梁细胞的过度应激致凋亡作用,旨在建立一种新型的高血压模型。**方法** 选择6~8周健康新西兰兔建立慢性青光眼模型,将大鼠行右眼前房注射4 μg 衣霉素(实验组),其左眼前房注射等量生理盐水(对照组),2周、3周、4周、5周、6周用TONO-PEN AVIA 眼压计检测眼压,并观察眼部一般情况及术中石蜡切片并行HE染色观察视网膜各层结构改变。数据采用SPSS 14.0统计软件进行统计。

CJ, Cohen EJ. Alternaria and paecilomyces keratitis associated with soft contact lens wear[J]. *Cornea*, 2010, 29(5):564-568.

11 封安阳, 李松来, 苗苗, 郭旭, 邢雷. [J]. *河北化工*, 2009, 32(7): 47.

11 赵公阳. 多烯类抗菌剂那他霉素[J]. 河北化工, 2009, 32(7): 47-48.

(10):878-882.

联合药物治疗真菌性角膜

13 史伟云,王婷.我国真菌性角膜炎诊断和治疗中的几个问题[J].

KM, Eagle RC Jr, Rapuano 中华眼科杂志,2013,49(1):2-5.