

伏立康唑在新西兰白兔眼组织中的浓度测定及眼组织分布研究

刘楚乔^{1, 2, 3}, 缪峰^{3, 4}, 张鹏^{2, 3}, 谢金华², 陶巧玉^{1, 2, 3}, 付莉莉^{1, 2, 3}, 季金凤³, 邱云良^{3, 4*}

1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230013

2. 南通市海门长三角药物高等研究院, 江苏 南通 226133

3. 益诺思生物技术南通有限公司, 江苏 南通 226000

4. 上海益诺思生物技术股份有限公司, 上海 201203

摘要: **目的** 建立新西兰白兔眼组织中伏立康唑浓度的测定方法, 并应用于玻璃体腔注射伏立康唑的眼组织分布研究。**方法** 采用高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)法测定兔眼组织中伏立康唑浓度。以甲苯磺丁脲为内标, 色谱柱为Waters X-Bridge BEH C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 2.5 μm), 流动相A: 0.2%甲酸-水溶液; 流动相B: 0.2%甲酸-乙腈溶液; 梯度洗脱程序: 0~0.30 min, 30%B; 0.30~1.81 min, 30%→90%B; 1.81~2.30 min, 90% B; 2.30~2.31 min, 90%→30%B; 2.31~2.60 min, 30% B; 体积流量为0.5 mL·min⁻¹, 柱温30℃, 进样量1 μL。使用电喷雾离子源, 以多重反应监测方式进行正离子扫描, 用于定量分析的离子对分别为*m/z* 350.1→281.1 (伏立康唑)、*m/z* 271.1→155.0 (内标)。新西兰白兔按照体重、性别随机区间分成5组, 每组6只, 雌雄各半。无菌条件下, 新西兰白兔眼部散瞳, im 氯胺酮12 mg·kg⁻¹、赛拉嗪3 mg·kg⁻¹麻醉动物, 玻璃体腔注入伏立康唑眼用注射剂, 分别在行玻璃体腔注射术后的0.5、1.0、4.0、24.0、48.0 h, 过量麻醉后放血处死试验兔。冰浴条件下分离兔眼组织(结膜、角膜、房水、虹膜、晶体、玻璃体、视网膜、脉络膜、巩膜), 采用建立的HPLC-MS/MS测定各组织中伏立康唑浓度。**结果** 伏立康唑质量浓度在0.5~500.0 ng·mL⁻¹, 线性关系良好(*R*²>0.98), 定量下限为0.5 ng·mL⁻¹。批内精密度(RSD)和准确度(RE)均小于15%, 伏立康唑各眼组织的提取回收率均大于85%; 新西兰白兔单眼单次给予伏立康唑后, 其主要在眼后段分布, 且视网膜浓度相对玻璃体、脉络膜更高。**结论** 建立的伏立康唑测定方法分析时间短, 能够快速检测眼组织中的药物, 准确度和灵敏度高, 适用于伏立康唑在眼组织的分布研究。

关键词: LC-MS/MS; 眼组织; 玻璃体腔注射; 伏立康唑; 眼内分布

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)06-1239-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.06.010

Determination of voriconazole and its distribution of ocular tissues in New Zealand white rabbits by LC-MS/MS

LIU Chuqiao^{1, 2, 3}, MIAO Feng^{3, 4}, ZHANG Peng^{2, 3}, XIE Jinhua², TAO Qiaoyu^{1, 2, 3}, FU Lili^{1, 2, 3}, JI Jinfeng³, QIU Yunliang^{3, 4}

1. School of Pharmacy, Anhui University Of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230013, China

2. Yangtze Delta Pharmaceutical College, Nantong 226133, China

3. Innostar Biotechnology Nantong Co., Ltd., Nantong 226000, China

4. China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai InnoStar Bio-Tech Co., Ltd., Shanghai 201203, China

Abstract: Objective To establish a method for determining the concentration of voriconazole in the ocular tissue of white rabbit in New Zealand, and to apply it to the study of the distribution of ocular tissue of intravitreal injection of voriconazole. **Methods** Determination by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Tolbutamide was used as the internal standard, the chromatographic column was Waters X-Bridge BEH C₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 2.5 μm), the mobile phase was gradient elution with 0.2% formic acid-acetonitrile (A) and 0.2% formic acid-water (B), gradient elution procedure 0—0.30 min, 30% B, 0.30—1.81 min, 30%→90% B, 1.81—2.30 min, 90% B, 2.30—2.31 min, 90%→30% B, 2.31—2.60 min, 30% B, the flow rate

收稿日期: 2022-10-28

基金项目: 江苏省新药一站式高效非临床评价公共服务平台建设(BM2021002)

第一作者: 刘楚乔,女,研究生,研究方向药理学。E-mail:cqliu17@163.com

*通信作者: 邱云良,男,研究员,主要从事药物毒理学研究。E-mail:ylqiu@innostar.cn

was 0.5 mL·min⁻¹, and 1 μL was injected. The sample size, the column temperature was 30 °C, and the electrospray ion source was used for positive ion scanning in the multiple reaction monitoring mode. The ion pairs used for quantitative analysis were *m/z* 350.1 → 281.1 (voriconazole), *m/z* 271.1 → 155.0 (internal standard). New Zealand white rabbits were randomly divided into five groups according to body weight and gender, with six rabbits in each group, half male and half female. Under sterile conditions, the eyes of New Zealand white rabbits were dilated, and the animals were anesthetized by intramuscular injection ketamine 12 mg·kg⁻¹ and xylazine 3 mg·kg⁻¹, and voriconazole ophthalmic injection was injected into the vitreous cavity. At 0.5, 1.0, 4.0, 24.0, and 48.0 h, the rabbits were sacrificed by bleeding after excessive anesthesia. Rabbit ocular tissues (conjunctiva, cornea, aqueous humor, iris, lens, vitreous, retina, choroid, sclera) were separated under ice bath conditions, and the concentration of voriconazole in each tissue was determined by established HPLC-MS/MS. **Results** Voriconazole had a good linear relationship between 0.5—500.0 ngmL⁻¹ ($R^2 > 0.98$), the lower limit of quantification was 0.5 ngmL⁻¹. The intra-batch precision (RSD) and accuracy (RE) were less than 15 %, and the extraction recoveries of voriconazole in all ocular tissues were greater than 85%. The drug concentration in rabbit ocular tissues was successfully detected by this method after single dose unilateral administration of voriconazole in New Zealand white rabbits, which was mainly distributed in the posterior segment of the eye, and the retinal concentration was higher compared to the vitreous and choroid. **Conclusion** The method has short analysis time, high accuracy and sensitivity, and can rapidly detect the drug in ocular tissues, which is suitable for the distribution study of voriconazole in ocular tissues.

Key words: LC-MS/MS; ocular tissues; intravitreal injection; voriconazole; intraocular distribution

伏立康唑是新型的三唑类抗真菌药,对曲霉菌、念珠菌属、足放线菌属和镰刀菌属等临床重要病原体具有强大抑菌活性^[1-2]。作为氟康唑的衍生物,经结构修饰后伏立康唑抗菌谱更广、抗菌效力更强、耐受性更好^[3],2002年3月12日美国食品药品监督管理局(FDA)批准其用于侵袭性曲霉病、足放线菌和镰刀菌感染的治疗^[4]。因该药物具有良好的组织穿透力和角膜渗透性^[2,5],也被应用于治疗眼部真菌感染。血液-视网膜屏障的存在导致全身给药无法在眼部蓄积至起效浓度,且抗真菌药物安全治疗窗狭窄,大剂量使用易产生毒性,引起并发症。临床上有研究将该药物玻璃体腔注射用于眼后段真菌感染的治疗^[6-8]。目前,伏立康唑已有啮齿类、猴、人的药动学数据,但关于其在眼部的组织分布规律及眼部药动学研究却很有限。鉴于人体试验的医学伦理学及样本采集问题,选择兔作为组织分布研究的试验动物^[9],考察玻璃体腔注射伏立康唑后该药物在兔眼各组织的分布情况,以期为伏立康唑临床眼科用药方案的制定提供用药指导,同时也弥补伏立康唑在实验兔眼内分布这一研究空白,为伏立康唑眼后段给药相关研究提供数据支持,也为该药物眼用相关制剂的开发提供参考。

由于目前尚未有高效、快速的眼组织中伏立康唑的定量方法的相关报道,本研究建立并验证一种专属性强、灵敏和快速的方法用于测定兔眼组织(包括结膜、角膜、房水、虹膜、晶体、玻璃体、视网膜、脉络膜和巩膜)中的伏立康唑,以满足新西兰白兔玻璃体腔注射伏立康

唑的眼内分布研究需求。

1 材料

1.1 仪器

SL-8E型裂隙灯显微镜(重庆康华瑞明科技股份有限公司);2266生物安全柜(上海拜艾斯净化设备有限公司);AB SCIEX TRIPLE QUAD™ 6500 plus液质联用仪(美国AB SCIEX公司);美国MPFastPrep-24 5G匀浆均质仪(美国MP Biomedicals公司);Heraeus Fresco17高速冷冻离心机(美国Thermo Fisher公司);Milli-Q IQ 7000超纯水仪(美国Millipore公司);VORTEX 3涡旋混匀器(艾卡广州仪器有限公司);DW-86L626超低温冰箱(青岛海尔生物医疗股份有限公司);DMT-2500多管涡旋混合仪(中国杭州米欧仪器有限公司);MS3_digital数显圆周振荡器(德国IKA公司);XPE56微量分析天平(中国梅特勒公司);单道移液器、多道移液器、电动移液器(艾本德中国有限公司);数据采集和处理系统:Analyst 1.7.0。

1.2 试剂

伏立康唑对照品(批号NU62Y93,质量分数99.8%),长沙欣瑞标物科技有限公司;甲苯磺丁脲对照品[批号SLB24843,质量分数99.9%,默克生命科学(上海)有限公司];盐酸赛拉嗪注射液(批号20200308),吉林省华牧动物保健品有限公司;盐酸氯胺酮注射液(批号20201023),江苏省中牧倍康药业有限公司;复方托吡卡胺滴眼液(批号MP2198),参天制药有限公司;盐酸丙美卡因滴眼液(批号20D24HA):s.a.ALCON-COUVREUR n.v.;左氧氟

沙星滴眼液(批号 CV1992),参天制药有限公司;氧氟沙星眼膏(批号 H10940177),沈阳兴齐眼药股份有限公司;0.9%氯化钠注射液(批号 U20092602),四川科伦药业股份有限公司;1%聚维酮碘溶液(批号 191101),西安康华药业有限公司。甲醇、乙腈均为色谱纯,购自德国默克公司;甲酸(色谱纯),美国 Aladdin 公司;水为超纯水。

1.3 试验动物及空白基质

30只新西兰白兔,4~5月龄,体质量3~4 kg,购自青岛康大生物科技有限公司,动物质量合格证号:370823210100095361,动物使用许可证编号:SYXK(苏)2018-0033。饲养温度20~26℃,空气湿度:40%~70%,每小时换气次数 ≥ 8 次,使用100%的全新风,自动光照,每12小时明暗交替,自由取食和饮水。本实验的动物管理和使用申请得到益诺思生物技术南通有限公司动物管理和使用委员会(IACUC)的批准(IACUC批准号:2021-671),并在实验过程中严格遵守动物福利。实验期间动物管理和使用遵照美国国家研究委员会颁布的《Guide for the Care and Use of Laboratory Animals》(2011)、中国科学技术委员会2017年颁布的《实验动物管理》(第2版)和江苏省2008年颁布的《江苏省实验动物管理办法》的相关要求。

6个不同来源的新西兰白兔空白眼组织基质(包括结膜、房水、角膜、虹膜、晶体、玻璃体、视网膜、脉络膜、巩膜)均由益诺思生物技术南通有限公司提供。

2 方法

2.1 动物分组

使用裂隙灯观察所有待筛选动物的角膜、虹膜、晶体等结构是否存在病变,对眼球有病变的予以剔除,裂隙灯显微镜检查结果选择眼前节形态、功能均正常的新西兰白兔。新西兰白兔经检疫期3 d、适应期7 d后称体质量,按照体质量、性别随机区间分成5组(术后0.5、1.0、4.0、24.0、48.0 h组),每组6只,雌雄各半。

2.2 伏立康唑注射剂的制备及制剂分析

2.2.1 伏立康唑眼用注射剂配制 称取适量伏立康唑对照品,加入0.9%氯化钠注射液,配制成 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的母液,涡旋混匀后用0.9%氯化钠注射液稀释成 $1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的伏立康唑溶液,使用 $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ 过滤器滤过即得。

2.2.2 伏立康唑眼用注射剂分析 无菌条件下,分别在制剂配制完成的0 h和24 h平行吸取4份注射

剂中层液体进样分析,要求样品测定质量浓度均值在标定质量浓度($1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的85%~115%内,4份平行样本的相对偏差(RSD)不超过5%。

2.3 动物给药

无菌条件下,新西兰白兔眼部滴加复方托吡卡胺滴眼液充分散瞳,im 氯胺酮 $12 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (质量浓度 $25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)、赛拉嗪 $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (质量浓度 $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)麻醉动物,确认动物深度麻醉(四肢肌肉松弛、皮肤掐捏反射消失、呼吸平稳)。将试验兔以侧卧位置于手术台上,聚维酮碘溶液冲洗结膜囊,再用0.9%氯化钠注射液冲洗,并多次消毒眼周区域。使用眼科规尺在角巩膜缘后2~2.5 mm处轻压做好标记,于此处进针(注射器针头规格为 $32 \text{ G}\times 13 \text{ mm}$),至针头在玻璃体腔中清晰可见,注入伏立康唑眼用注射剂并停留至少10 s后缓慢拔出,立即用眼科显微镊按压注射点至少10 s,防止药液渗漏。仅于左眼给药,右眼不给药,作为自身对照。术后双眼给予左氧氟沙星滴眼液和氧氟沙星眼膏,立即将动物放于电热毯上保暖(温度 $36.5\sim 38.0 \text{ }^\circ\text{C}$),待其苏醒后送回正常饲养环境即可。

2.4 样本采集

分别在行玻璃体腔注射术后的0.5、1.0、4.0、24.0、48.0 h,耳缘静脉iv 盐酸氯胺酮注射液 $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (质量浓度 $50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)和盐酸塞拉嗪注射液 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (质量浓度 $50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)过量麻醉后放血处死试验兔。迅速摘取兔双侧眼球,用0.9%氯化钠注射液冲洗,并去除多余肌肉组织,置于含0.9%氯化钠注射液的离心管中, $2\sim 8 \text{ }^\circ\text{C}$ 暂存。冰浴条件下分离兔眼组织(结膜、角膜、房水、虹膜、晶体、玻璃体、视网膜、脉络膜、巩膜),滤纸吸干水分,眼组织称质量后于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下保存。

2.5 眼组织匀浆上清液的制备

根据样本的成分、质地适当剪碎处理,后用50%甲醇-水溶液按照组织质量与稀释液 $10 \text{ mg} : 100 \text{ }\mu\text{L}$ 的比例稀释,加入研磨珠置于匀浆均质仪,以 $6\sim 8 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ 研磨40~60 s,重复研磨3~4次,直至组织充分破碎,在 $2\ 000\sim 3\ 000\times \text{g}$ 、 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下离心10 min后提取上清液分装至离心管,保存于超低温冰箱。

2.6 色谱及质谱条件

2.6.1 色谱条件 色谱柱为X-Bridge BEH C_{18} ($50 \text{ mm}\times 2.1 \text{ mm}$, $2.5 \text{ }\mu\text{m}$, Waters公司);流动相A:0.2%甲酸-水溶液;流动相B:0.2%甲酸-乙腈溶液;梯度洗脱程序:0~0.30 min, 30% B; 0.30~

1.81 min, 30%→90% B; 1.81~2.30 min, 90% B; 2.30~2.31 min, 90%→30% B; 2.31~2.60 min, 30% B; 体积流量为0.5 mL·min⁻¹; 柱温30 °C, 进样量1 μL。

2.6.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI)在正离子模式下以多反应监测模式(MRM)扫描; 定量分析离子对: 伏立康唑 m/z 350.100→281.100, 甲苯磺丁脲(内标) m/z 271.100→155.000; 扫描间隔均为100 ms。质谱仪参数: 离子化电压(IS) 5 500 V; 温度(TEM) 500 °C; 碰撞气(CAD) 48.265 kPa(7 psi); 气帘气(CUR) 275.80 kPa(40 psi); 喷雾气(GS 1) 344.75 kPa(50 psi); 辅助气(GS 2) 344.75 kPa(50 psi); 碰撞能(CE) 25 V; 入口电压(EP) 10 V; 去簇电压(DP): 伏立康唑 65 V、甲苯磺丁脲 60 V; 碰撞室出口电压(CXP): 伏立康唑 15 V、甲苯磺丁脲 10 V。

2.7 溶液配制

伏立康唑对照品溶于甲醇, 配制成质量浓度为1.000 mg·mL⁻¹的储备液。并用50%甲醇-水溶液稀释成质量浓度为10.000、25.000、100.000、500.000、1 000.000、2 000.000、5 000.000、10 000.000 ng·mL⁻¹的系列标准曲线工作液和10.000、30.000、1 000.000、7 500.000 ng·mL⁻¹的质控(QC)工作液。100.000 ng·mL⁻¹的标准曲线工作液稀释至25.000 ng·mL⁻¹即为系统适应性工作液。甲苯磺丁脲对照品溶于乙腈配制成质量浓度为1.000 mg·mL⁻¹的内标储备液, 继续用乙腈稀释制成内标工作液(400.000 ng·mL⁻¹), 所有溶液均保存于-70~-90 °C备用。

2.8 眼组织样品配制

用兔眼组织空白基质稀释相应的工作液, 分别制备标准曲线样品、质控样品及眼组织系统适应性样品。伏立康唑眼组织标准曲线样品质量浓度分别为0.500(定量下限, LLOQ)、1.250、5.000、25.000、50.000、100.000、250.000、500.000(定量上限, ULOQ) ng·mL⁻¹, 眼组织系统适应性样品质量浓度为1.250 ng·mL⁻¹。眼组织质控样品质量浓度分别为0.500(LLOQ)、1.500、50.000、375.000 ng·mL⁻¹。

2.9 样品前处理

样品室温融化后2 000 r·min⁻¹下涡旋10 min, 吸取20 μL样品转移至96孔板中, 加入同体积内标工作液及蛋白沉淀剂乙腈160 μL, 1 000 r·min⁻¹涡旋10 min, 在4 °C、4 700×g条件下离心10 min。取上清液100 μL加入100 μL 20%乙腈-水溶液复溶, 封膜, 1 000 r·min⁻¹下涡旋10 min即可, 处理后样品放

置于2~8 °C暂存待测, 按上述色谱质谱条件进样分析。

2.10 方法学考察

2.10.1 系统适应性 系统适应性样品按色谱质谱条件连续进样多次, 取最后3次进样来评估系统适用性。要求保留时间的相对标准偏差(RSD)不超过5.0%, 待测物与内标色谱峰面积比值的RSD不超过15.0%。

2.10.2 残留 在标准曲线定量上限样品后随一个双空白眼组织(20 μL空白眼组织基质与同体积20 μL内标工作液稀释液乙腈混合制得)样品, 以考察进样过程中的残留情况。计算双空白组织样品中待测物峰面积与LLOQ浓度下待测物平均峰面积比值, 要求不超过20.0%; 计算内标峰面积与标准曲线样品和质控样品内标峰面积均值的比值, 要求不超过5.0%。

2.10.3 选择性 选择性是区分目标分析物和内标与基质的内源性组分的能力。通过测定6份不同来源的双空白眼组织样本与LLOQ水平样本评估分析物与基质间的选择性, 测定ULOQ水平样本(不含内标)及空白样本(含内标)以评估待测物与内标的相互干扰。

2.10.4 基质效应 制备适量与前处理后的低、中、高浓度质控样品进样浓度相当的质控溶液(质量浓度分别为0.150、5.000、37.500 ng·mL⁻¹)及内标纯溶液(40.000 ng·mL⁻¹)。取6份不同来源的空白眼组织基质, 通过比较由空白眼组织基质前处理后加入低、高质量浓度(0.150、37.500 ng·mL⁻¹)伏立康唑质控溶液测得的峰面积, 与不含眼组织基质在相应质量浓度测得的峰面积, 计算内标归一化的基质效应因子, 考察基质效应, 要求各质量浓度的内标归一化的基质效应因子的RSD≤15.0%。

内标归一化的基质效应因子=有基质存在的待测物与内标峰面积比值/无基质存在的待测物与内标峰面积比值

2.10.5 标准曲线及定量限 按“2.8”项下方法操作, 配成质量浓度为0.500、1.250、5.000、25.000、50.000、100.000、250.000、500.000 ng·mL⁻¹的伏立康唑眼组织标准曲线样品, 经处理后进样分析, 提取MRM色谱图, 以伏立康唑质量浓度为横坐标(X), 待测物与内标峰面积比值为纵坐标(Y), 设置权重因子为 $1/X^2$, 进行线性最小二乘法回归, 要求 $R^2 \geq 0.98$ 。

2.10.6 批内及批间准确度、精密度 新鲜配制4个不同质量浓度的QC样品(0.500、1.500、50.000、

375.000 ng·mL⁻¹),每批次每浓度平行处理6份,连续测定4 d,考察批内/批间准确度和精密度。要求批内和批间准确度偏差应在±15.0%范围内(LLOQ的偏差在±20.0%范围内),批内和批间精密度应不超过15.0%(LLOQ样品不超过20.0%)。

2.10.7 提取回收率 将低、中、高质量浓度(1.500、50.000、375.000 ng·mL⁻¹)的眼组织样品分别平行制备6份,经“2.9”项前处理后取上清液加内标溶液(40.000 ng·mL⁻¹)复溶,即为伏立康唑提取回收率样品,分析得相应峰面积响应值(A)。另取空白眼组织基质经前处理,制成与上述提取回收率样品理论进样质量浓度相当的样品,平行制备6份,分析后得相应峰面积响应值(B)。平行制备经前处理的内标提取回收率样品6份,取上清液加入中质量浓度水平(5.000 ng·mL⁻¹)的伏立康唑质控溶液,分析得峰面积(C),另取空白眼组织基质前处理后制成与内标提取回收率样品进样质量浓度相当的样品,平行制备6份,分析后峰面积(D)。伏立康唑的提取回收率为A/B,内标提取回收率为C/D,要求伏立康唑各质量浓度水平质控样品及内标回收率的RSD在15.0%以内。

2.10.8 质控样品稳定性 取空白基质,配制低、中、高3个质量浓度各6份平行样品,分别在室温避光下放置48 h、5个冻(-70~-90℃,至少12 h)融(室温避光至少12 h,首次至少24 h)循环周期、超低温(-70~-90℃)储存57 d测定样品稳定性,分别计算3个质控浓度中不同储存条件下稳定性样品伏立康唑质量浓度的RSD,当其在15%以内时,分析

物被认为是稳定的。

2.11 统计学分析

采用统计分析软件SPSS 23.0对数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA)。使用Graphpad prism 9.0.4对数据作图。统计结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 方法学验证

3.1.1 系统适应性 系统适应性结果见表1,说明系统的分离度及重现性能满足当前眼组织样品的分析需求。

3.1.2 残留 要求考察的双空白样品中伏立康唑在保留时间处的平均峰面积不超过该批次LLOQ处峰面积均值的20.0%,内标平均峰面积在该批次LLDQ内标平均峰面积5.0%以内,表2结果显示本分析方法残留符合要求。

表1 系统适应性考察结果

Table 1 Results of system suitability test

组织	RSD/%		
	化合物保留时间	内标保留时间	待测物与内标色谱峰面积比值
结膜	0.3	0.0	1.6
房水	0.0	0.3	5.4
角膜	0.0	0.3	7.1
虹膜	0.0	0.3	7.9
晶体	0.3	0.3	4.0
玻璃体	0.0	0.0	12.6
视网膜	0.3	0.0	12.8
脉络膜	0.3	0.3	7.4
巩膜	0.3	0.3	5.3

表2 伏立康唑及内标的残留率

Table 2 Residual rates of voriconazole and internal standards

样品	残留率/%								
	结膜	房水	角膜	虹膜	晶体	玻璃体	视网膜	脉络膜	巩膜
伏立康唑	0.0	0.0	0.0	17.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	16.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
内标	4.6	0.0	4.3	3.9	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3
	3.2	1.3	4.6	3.9	1.4	0.0	0.0	0.0	3.2

3.1.3 选择性 对于所有6个不同来源的兔眼组织的基质,在伏立康唑和内标的保留时间处均未观察到明显干扰,各基质样品中分析物的色谱图如图1(A-玻璃体、B-视网膜、C-脉络膜、D-巩膜)所示,与空白基质的色谱图相比,分析物与内标之间不存在干扰,同时未观察到内源性物质的干扰。总运行时间为每个样品2.60 min,分析时间短,显示该方法较好地满足了生物分

析中样品通量高的要求。

3.1.4 基质效应 玻璃体、视网膜、脉络膜、巩膜基质各浓度的内标归一化的基质效应因子见表3,满足接受标准,表明生物基质中存在的组份对分析物的离子化无影响。

3.1.5 标准曲线及定量限 各眼部亚组织的回归方程和线性范围见表4,结果发现,兔眼组织中伏立

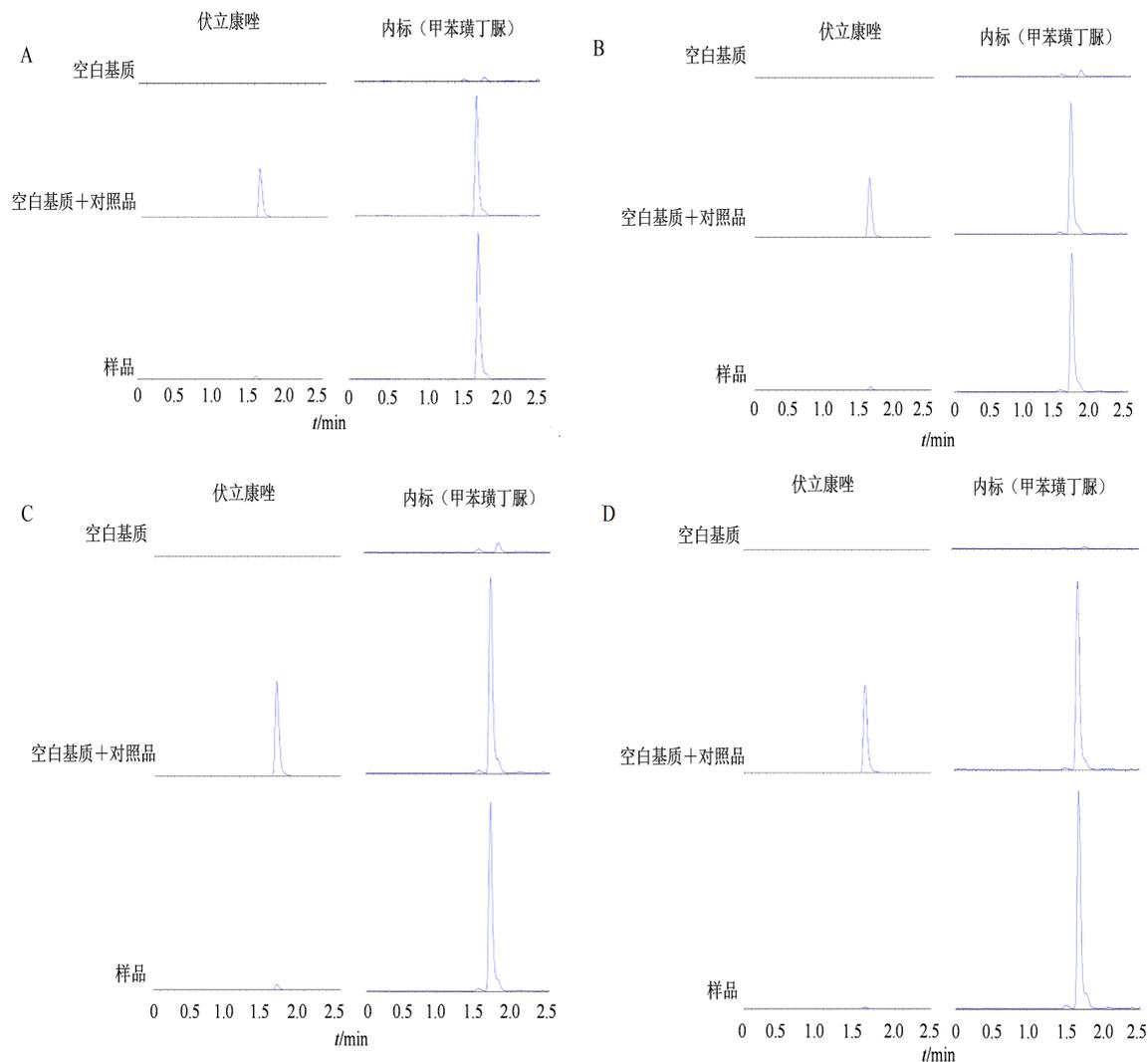


图 1 玻璃体(A)、视网膜(B)、脉络膜(C)和巩膜(D)基质样品色谱图

Fig. 1 Chromatogram of vitreous (A), retinal (B), choroidal (C), and scleral (D) matrix sample

表 3 各眼组织在低、高质量浓度的基质效应

Table 3 Matrix effects of each ocular tissue at low and high concentrations

组织	质量浓度/ (ng·mL ⁻¹)	内标归一化基质效应因子/%	RSD/%
房水	1.500	94.0±6.0	6.4
	375.000	99.0±2.0	2.0
角膜	1.500	92.0±11.0	12.0
	375.000	99.0±1.0	1.0
虹膜	1.500	89.0±5.0	5.6
	375.000	99.0±1.0	1.0
晶体	1.500	93.0±8.0	8.6
	375.000	97.0±4.0	4.1
玻璃体	1.500	101.0±4.0	4.0
	375.000	101.0±2.0	2.0
视网膜	1.500	96.0±4.0	4.2
	375.000	101.0±1.0	1.0
脉络膜	1.500	104.0±6.0	5.8
	375.000	104.0±1.0	1.0
巩膜	1.500	99.0±1.0	1.0
	375.000	101.0±2.0	2.0

表 4 伏立康唑在兔眼各组织的回归方程与线性范围

Table 4 Regression equation and linear range of voriconazole in various tissues of rabbit eyes

眼组织	回归方程	R ²	线性范围/ (ng·mL ⁻¹)
结膜	Y=0.031 1 X+0.001 30	0.995 2	0.500~500.000
房水	Y=0.029 9 X+0.001 27	0.998 2	0.500~500.000
角膜	Y=0.030 8 X+0.003 50	0.996 0	0.500~500.000
虹膜	Y=0.030 7 X+0.001 61	0.998 4	0.500~500.000
晶体	Y= 0.009 31 X+0.000 766	0.996 0	0.500~500.000
玻璃体	Y=0.030 8 X+0.002 64	0.997 2	0.500~500.000
视网膜	Y=0.030 3 X+0.002 48	0.998 4	0.500~500.000
脉络膜	Y=0.029 9 X+0.002 83	0.998 0	0.500~500.000
巩膜	Y=0.030 6 X+0.001 56	0.997 8	0.500~500.000

康唑质量浓度在 0.500~500.000 ng·mL⁻¹ 线性关系良好, LLOQ 均为 0.500 ng·mL⁻¹。

3.1.6 批内及批间准确度、精密度 通过分析每种生物基质的3种不同浓度的QC样品, 确定了该方法的批内及批间精密度和准确性, 结果见表5。该方法可靠且可重现, 批内及批间RSD<15%, RE≤±14.10%。

3.1.7 提取回收率 结果见表6, 在房水、角膜、虹膜、晶体、玻璃体、视网膜、脉络膜及巩膜组织中提取回收率良好, 均≥85%。

3.1.8 稳定性 结果见表7, 房水、晶体、玻璃体、巩膜的质控样品可在室温避光条件下放置至少48 h, 在-70~-90 °C放置至少57 d, 玻璃体、巩膜的质控

表5 各眼组织中伏立康唑的批内、批间准确度和精密度结果

Table 5 Result of accuracy and precision of intra-batch inter-batch in each ocular tissue

眼组织	质量浓度/ (ng·mL ⁻¹)	批内			批间		
		测得质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	RSD/%	RE/%	测得质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	RSD/%	RE/%
结膜	0.500	0.50±0.02	3.51	0.80	0.51±0.02	0.04	2.65
	1.500	1.66±0.06	3.85	10.33	1.60±0.08	0.05	6.50
	50.000	54.95±1.06	1.93	9.90	56.65±3.96	0.07	13.30
	375.000	397.50±3.54	0.89	6.00	393.50±5.20	0.01	4.93
房水	0.500	0.49±0.03	6.82	-2.60	0.49±0.02	0.04	-1.20
	1.500	1.59±0.01	0.89	6.00	1.57±0.08	0.05	4.80
	50.000	57.00±0.28	0.50	14.00	56.12±2.25	0.04	12.24
	375.000	401.00±4.24	1.06	6.93	392.40±15.06	0.04	4.64
角膜	0.500	0.49±0.02	3.74	-1.60	0.50±0.02	0.04	-0.25
	1.500	1.43±0.04	2.97	-4.67	1.60±0.17	0.10	6.67
	50.000	54.20±0.14	0.26	8.40	54.98±2.85	0.05	9.96
	375.000	369.50±10.61	2.87	-1.47	389.00±9.90	0.03	3.73
虹膜	0.500	0.48±0.01	1.91	-3.60	0.49±0.02	0.03	-2.55
	1.500	1.58±0.12	7.58	5.67	1.61±0.13	0.08	7.20
	50.000	50.75±2.05	4.04	1.50	52.44±4.05	0.08	4.88
	375.000	406.00±14.14	3.48	8.27	414.20±11.58	0.03	10.45
晶体	0.500	0.49±0.07	14.43	-1.00	0.49±0.06	0.12	-1.10
	1.500	1.49±0.01	0.47	-0.33	1.46±0.07	0.05	-2.53
	50.000	54.30±1.14	2.60	8.60	54.32±1.00	0.02	8.64
	375.000	369.00±11.31	3.07	-1.60	369.00±8.00	0.02	-1.60
玻璃体	0.500	0.48±0.03	6.85	-3.00	0.45±0.06	0.13	-9.00
	1.500	1.48±0.04	2.38	-1.00	1.49±0.14	0.09	-0.93
	50.000	53.40±1.27	2.38	6.80	52.16±3.25	0.06	4.32
	375.000	383.00±5.66	1.48	2.13	384.20±17.63	0.05	2.45
视网膜	0.500	0.43±0.03	7.69	-13.60	0.46±0.04	0.08	-8.70
	1.500	1.49±0.04	2.36	-0.33	1.37±0.13	0.09	-8.40
	50.000	57.05±1.48	2.60	14.10	54.58±3.44	0.06	9.16
	375.000	407.50±10.61	2.60	8.67	391.20±12.15	0.03	4.32
脉络膜	0.500	0.47±0.03	5.53	-5.40	0.49±0.04	0.09	-2.70
	1.500	1.47±0.04	2.40	-1.67	1.55±0.10	0.07	3.47
	50.000	55.35±2.76	4.98	10.70	54.26±4.42	0.08	8.52
	375.000	402.50±4.95	1.23	4.33	377.60±40.26	0.11	0.69
巩膜	0.500	0.49±0.04	8.00	-1.00	0.49±0.03	0.05	-1.95
	1.500	1.47±0.00	0.00	2.00	1.44±0.07	0.05	-3.73
	50.000	54.10±0.71	1.31	8.20	54.48±0.52	0.01	8.96
	375.000	382.50±17.68	4.62	2.00	389.20±36.59	0.09	3.79

表6 眼部各组织的提取回收率

Table 6 Extraction recoveries of each tissue of eye

眼组织	指标	伏立康唑			内标
		1.500 ng·mL ⁻¹	50.000 ng·mL ⁻¹	375.000 ng·mL ⁻¹	
房水	提取回收率/%	96.6±12.0	111.8±3.8	104.3±2.5	96.6±5.0
	RSD/%	12.4	3.4	2.4	5.2
角膜	提取回收率/%	103.5±11.0	102.8±9.3	100.2±4.8	108.8±3.6
	RSD/%	10.6	9.0	4.8	3.3
虹膜	提取回收率/%	86.1±8.4	92.0±6.9	95.4±3.9	102.1±5.4
	RSD/%	9.8	7.5	4.1	5.3
晶体	提取回收率/%	85.9±11.9	95.9±7.4	105.8±3.9	104.6±4.9
	RSD/%	13.9	7.7	3.7	4.7
玻璃体	提取回收率/%	101.0±4.5	97.9±3.2	105.7±2.4	105.6±3.4
	RSD/%	4.5	3.3	2.3	3.2
视网膜	提取回收率/%	110.3±5.5	107.2±2.7	106.3±4.8	101.1±2.6
	RSD/%	5.0	2.5	4.5	2.6
脉络膜	提取回收率/%	113.5±15.1	107.6±3.8	88.0±4.4	105.3±4.5
	RSD/%	13.3	3.5	5.0	4.4
巩膜	提取回收率/%	90.4±4.8	104.8±3.3	97.7±3.2	108.3±3.6
	RSD/%	5.3	3.1	3.3	3.3

样品经历至少5次冻(-70~-90 °C)融(室温避光)循环下保持性质稳定。

3.2 注射剂制剂分析

基于LC-MS/MS法检测伏立康唑注射液制备后0 h、24 h的质量浓度,测得的质量浓度均在标定质量浓度的±15.0%之内,其RSD小于3.0%,结果

见表8,符合给药制剂要求。

3.3 玻璃体腔注射伏立康唑的组织分布

计算伏立康唑在各眼组织中的分布质量浓度,结果见表9,给药眼部分组织检测到药物,对照眼各眼组织均无药物检出。经统计学分析雌雄动物之间分布质量浓度无显著差异($P>0.05$),在眼后段的

表7 质控样品稳定性考察结果

Table 7 Results of stability examination of quality control samples

眼组织	质量浓度/ (ng·mL ⁻¹)	室温避光放置48 h		-70~-90 °C放置57 d		5次冻融循环	
		测得质量浓度/ (ng·mL ⁻¹)	RSD/%	测得质量浓度/ (ng·mL ⁻¹)	RSD/%	测得质量浓度/ (ng·mL ⁻¹)	RSD/%
房水	1.500	1.533±0.103	6.7	1.632±0.049	3.0	—	—
	375.000	373.500±12.740	3.4	384.167±19.292	5.0	—	—
晶体	1.500	1.430±0.149	10.4	1.383±0.071	5.1	—	—
	375.000	355.000±19.970	5.6	352.667±14.569	4.1	—	—
玻璃体	1.500	1.573±0.103	6.5	1.592±0.103	6.5	1.568±0.118	7.5
	375.000	417.000±18.011	4.3	428.750±16.741	3.9	408.000±17.181	4.2
巩膜	1.500	1.555±0.037	2.4	1.597±0.081	5.1	1.512±0.099	6.5
	375.000	392.333±11.219	2.9	422.833±19.477	4.6	403.167±7.111	1.8

表8 注射液制剂分析结果

Table 8 Formulation analysis results of injection

时间/h	n	测得质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	RSD/%	准确度/%	准确度偏差/%
0	4	1 140.0±24.5	2.1	114.0	14.0
24	4	949.0±26.3	2.8	94.9	-5.1

表9 新西兰白兔玻璃体腔内注射伏立康唑1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 后不同时间眼组织的药物质量浓度结果Table 9 Results of drug concentrations in ocular tissues of New Zealand white rabbits at different times after intravitreal injection of voriconazole 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

时间/h	玻璃体伏立康唑/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	伏立康唑/($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)	
		视网膜	脉络膜
0.5	11.73±3.05 (n=5)	19.55±3.55 (n=6)	11.60±3.98 (n=6)
1.0	10.70±7.44 (n=6)	18.15±8.47 (n=6)	14.24±9.87 (n=6)
4.0	BQL	BQL	BQL
24.0	BQL	BQL	BQL
48.0	BQL	BQL	BQL

BQL-药物质量浓度低于检测限

BQL-drug concentration is below the detection limit

玻璃体、视网膜、脉络膜组织中检测到药物伏立康唑,其分布情况为视网膜>玻璃体、脉络膜,其他组织中暂未检测到分布浓度。

4 讨论

伏立康唑为高亲脂性小分子药物,具有良好的组织穿透性,该药物在眼内分布情况主要与相对分子质量、理化性质有关^[10]。玻璃体是晶状体和视网膜之间的半固体结构,由99%的水以及少量胶原蛋白和透明质酸组成,呈黏性水凝胶状态,药物在其中扩散缓慢且不均匀,分布和消除主要取决于药物在玻璃体的扩散速率及其半衰期^[11-12],小分子药物伏立康唑在其中能更相对自由地扩散。研究表明,经玻璃体腔注射后,药物在玻璃体腔分布达平衡后,存在前路与后路2个清除路径:前路经房水循环、葡萄膜血流清除;后路则通过视网膜血管系统运送至眼后区经脉络膜、体循环或淋巴消除^[10]。脉络膜为高度血管化的纤维组织,其血流量高,血管壁通透性强,在脉络膜与视网膜之间存在血-视网膜屏障(BRB),由视网膜色素上皮(RPE)和视网膜血管壁组成。内界膜限制了药物从玻璃体向视网膜的扩散^[13],而RPE的存在,导致药物从玻璃体腔向脉络膜的渗透缓慢。伏立康唑亲脂性高、相对分子质量小,可沿视网膜被动扩散并穿过BRB进入脉络膜^[14],因此在脉络膜中也有较高分布浓度。先前研究^[15]在玻璃体及房水中观察到伏立康唑的分布,本研究仅在眼后段呈现分布趋势,眼前节部分无发现,导致该结果的原因可能有以下4方面:一是本研究使用原料药经生理盐水配制而成,而文献报道中则应用上市伏立康唑粉针剂,其辅料为磺丁倍他

环糊精钠,考虑辅料及其制剂工艺影响药物的眼部吸收、分布;二是给药浓度低导致其分布浓度处于检测下限而未被检测到;三是采样点设置需进一步优化;四是样本采集涉及眼部解剖生理学,专业要求度较高,过程中也容易发生药物的再分布和样品间的交叉污染,增加了人为操作带来的误差。此外,该药物个体差异大,且试验样本量较少,整体分布趋势并不明显。伏立康唑在眼内的分布情况可为其临床治疗眼部真菌感染提供用药参考,其分布规律及机制有待进一步研究。

本研究建立伏立康唑的LC-MS/MS定量方法时,综合色谱质谱响应值、峰形和保留时间进行色谱、质谱参数优化,以获得最佳检测条件。结合伏立康唑的化学结构及理化性质,经色谱柱筛选使用X-Bridge BEH C18 (Waters)色谱柱,分析物响应高、峰形好、保留时间适宜、分离度高,有效避免了内源性物质的干扰。流动相组成影响分析物电离及响应,考察不同有机溶剂及不同浓度的酸作流动相,发现0.2%甲酸-水溶液与0.2%甲酸-乙腈溶液,采用梯度洗脱后峰分离度佳,离子化效率高,在所用色谱柱上以良好的峰形洗脱2种化合物,显示出优秀的色谱性能。样本前处理过程中,由于各组织的成分、质地、质量不同,需经过较繁琐的提取过程,将结膜、角膜、虹膜、巩膜等致密且坚韧的组织剪碎后充分匀浆以利于药物的有效、快速提取,而对于玻璃体、晶体此类具黏性的胶状物质,需剪断组织间的连接以便提取。经验证,该法用于测定新西兰白兔眼部亚组织中伏立康唑浓度具有显著优势,其灵敏度高($0.5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$),可用于眼各亚组织内极低浓度药物的检测;分析运行时间短(2.6 min),可用于快速定量检测样本以及进样体积小($1 \mu\text{L}$),可降低取样量,适用于微量分析。根据兔眼组织的验证参数和药物含量结果,可以得出,该方法可用于研究新西兰白兔玻璃体腔注射伏立康唑的眼内分布情况。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Scott L J, Simpson D. Voriconazole: A review of its use in the management of invasive fungal infections [J]. *Drugs*, 2007, 67(2): 269-298.
- [2] Hariprasad S M, Mieler W F, Lin T K, et al. Voriconazole in the treatment of fungal eye infections: A review of current literature [J]. *Br J Ophthalmol*, 2008, 92(7): 871-878.
- [3] 封宇飞,雷静,傅德兴. 新一代三唑类抗真菌药物伏立

- 康唑 [J]. 中国新药杂志, 2003, 12(1): 27-29.
- Feng Y F, Lei J, Fu D X. Voriconazole(UK109, 496), a new triazole antifungal drug [J]. Chin New Drugs, 2003, 12(1): 27-29.
- [4] Saravolatz L D, Johnson L B, Kauffman C A. Voriconazole: A new triazole antifungal agent [J]. Clin Infect Dis, 2003, 36(5): 630-637.
- [5] Job K M, Olson J, Stockmann C, et al. Pharmacodynamic studies of voriconazole: Informing the clinical management of invasive fungal infections [J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2016, 14(8): 731-746.
- [6] Kramer M, Kramer M R, Blau H, et al. Intravitreal voriconazole for the treatment of endogenous *Aspergillus* endophthalmitis [J]. Ophthalmology, 2006, 113(7): 1184-1186.
- [7] Ferreira T B, Vaz F, Rodrigues A, et al. Intravitreal voriconazole as primary treatment for endogenous *Aspergillus* endophthalmitis [J]. BMJ Case Rep, 2009, 2009: bcr1020081110.
- [8] Mehta H, Mehta H B, Garg P, et al. Voriconazole for the treatment of refractory *Aspergillus fumigatus* keratitis [J]. Indian J Ophthalmol, 2008, 56(3): 243-245.
- [9] del Amo E M, Urtti A. Rabbit as an animal model for intravitreal pharmacokinetics: Clinical predictability and quality of the published data [J]. Exp Eye Res, 2015, 137: 111-124.
- [10] Whitcup S M, Azar D T. *Handbook of Experimental Pharmacology* [M]. Cham: Springer International Publishing, 2016.
- [11] Smith D W, Lee C J, Gardiner B S. No flow through the vitreous humor: How strong is the evidence? [J]. Prog Retin Eye Res, 2020, 78: 100845.
- [12] Ferroni M, de Gaetano F, Cereda M G, et al. A drug delivery analysis of large molecules in ocular vitreous chamber: Dependency on saccadic movements after intravitreal injection [J]. Med Eng Phys, 2020, 82: 49-57.
- [13] Urtti A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2006, 58(11): 1131-1135.
- [14] Toda R, Kawazu K, Oyabu M, et al. Comparison of drug permeabilities across the blood-retinal barrier, blood-aqueous humor barrier, and blood-brain barrier [J]. J Pharm Sci, 2011, 100(9): 3904-3911.
- [15] Shen Y C, Wang M Y, Wang C Y, et al. Clearance of intravitreal voriconazole [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48(5): 2238-2241.

[责任编辑 刘东博]