

# 缬沙坦胶囊灌胃给药后在兔眼组织的分布规律研究<sup>Δ</sup>

李志金<sup>1\*</sup>, 李 静<sup>2</sup>, 张 越<sup>3</sup>, 杨赞章<sup>1#</sup>(1.河北省眼科医院药剂科/河北省眼科学重点实验室, 河北 邢台 054001; 2.邢台市人民医院儿科, 河北 邢台 054001; 3.河北省眼科医院眼科/河北省眼科学重点实验室, 河北 邢台 054001)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)34-4808-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.34.14

**摘 要** 目的:研究缬沙坦胶囊灌胃给药后在兔眼组织的分布规律。方法:取兔3只(6只眼),ig缬沙坦溶液,每次7.5 mg,每日2次,连用6 d。于末次给药后1 h处死兔,采集角膜、虹膜、房水、晶状体、玻璃体液、视网膜组织,采用高效液相色谱法测定各组织中缬沙坦的含量。结果:缬沙坦在视网膜、虹膜、角膜、房水、玻璃体液、晶状体中的含量依次为(4.274 ± 1.75)、(2.233 ± 0.72)、(0.871 ± 0.66)、(0.713 ± 0.49)、(0.177 ± 0.07)、(0.083 ± 0.06) μg/g。结论:连续多次给药后缬沙坦在兔眼内各组织中分布不均匀,以视网膜中的含量为最高,虹膜次之,晶状体、玻璃体液中的含量最低。

**关键词** 缬沙坦;高效液相色谱法;眼组织;兔;分布

## Study on the Distribution Law of Valsartan Capsules in the Ocular Tissue of Rabbit Eyes after Intragastric Administration

LI Zhijin<sup>1</sup>, LI Jing<sup>2</sup>, ZHANG Yue<sup>3</sup>, YANG Zanzhang<sup>1</sup>(1.Dept. of Pharmacy, Hebei Eye Hospital/Hebei Key Laboratory of Ophthalmology, Hebei Xingtai 054001, China; 2.Dept. of Pediatrics, Xingtai People's Hospital, Hebei Xingtai 054001, China; 3.Dept. of Ophthalmology, Hebei Eye Hospital/Hebei Key Laboratory of Ophthalmology, Hebei Xingtai 054001, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the distribution law of Valsartan capsules in the ocular tissue of rabbit eyes after intragastric administration. METHODS: 3 rabbits (6 eyes) were intragastrically administrated Valsartan solution, 7.5 mg every time, twice a day, for 6 d. Rabbits were executed after last administration, and the cornea, iris, aqueous humor, lens, vitreous and retina tissues were collected. HPLC was used to determine the content of valsartan in each tissue. RESULTS: Content of valsartan in retina, iris, cornea, aqueous humor, vitreous and lens were (4.274 ± 1.75), (2.233 ± 0.72), (0.871 ± 0.66), (0.713 ± 0.49), (0.177 ± 0.07), (0.083 ± 0.06) μg/g, respectively. CONCLUSIONS: After multiple administrations, valsartan distributes unevenly in each tissue of eyes, showing highest distribution content in retina, followed by iris, and lowest content in lens and vitreous.

**KEYWORDS** Valsartan; HPLC; Ocular tissue; Rabbit; Distribution

血管紧张素 II 受体阻滞药(Angiotensin II receptor blocker, ARB)是经典的抗高血压药。从20世纪80年代开始,国外即有人将ARB用于治疗糖尿病视网膜病变、青光眼等多种眼病<sup>[1]</sup>。大量研究证实,ARB对糖尿病视网膜病变、葡萄膜炎、角膜新生血管、青光眼、年龄相关性黄斑变性、早产儿视网膜病变具有一定的治疗效果<sup>[2]</sup>。但上述研究大多数针对药效学或作用机制方面,而对于ARB在眼部的分布情况尚未见报道。药物在靶部位达到一定的分布浓度是产生药理效应的物质基础,在一定范围内,药物的效应与靶部位的浓度存在着量-效关系,而后者取决于靶部位的药物浓度。血管紧张素受体在眼内分布非常广泛,定量分析药物在眼内各组织的分布

浓度,有助于预测药物的药效和潜在毒性,也有助于探索药物的作用机制。因此,笔者以ARB的代表药物缬沙坦为研究对象,对缬沙坦灌胃给药后在健康兔眼各组织中的分布规律进行研究,为缬沙坦相关药理机制研究提供实验基础。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

LC-2010A HT 高效液相色谱仪,包括SPD-10A紫外检测器(日本岛津公司);TGL-16gR 低温高速离心机(上海安亭科学仪器厂)。

#### 1.2 药品与试剂

缬沙坦对照品(批号:100651-201203,纯度:98.9%)、螺内酯对照品(批号:100193-201203,纯度:99.8%)均购自中国食品药品检定研究院;缬沙坦胶囊(北京诺华制药有限公司,批号:S0350,规格:80 mg/粒);乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

<sup>Δ</sup> 基金项目:邢台市科技计划项目(No. 201422048-1)

\* 主管药师。研究方向:医院药学。电话:0319-3237661。E-mail:15512850698@163.com

# 通信作者:主管药师,硕士。研究方向:临床药学。电话:0319-3237663。E-mail:yangzanzhang@163.com

### 1.3 动物

新西兰白兔3只,♀,体质量2~2.5 kg,均购自河北医科大学实验动物中心,动物合格证号:1505014。

## 2 方法与结果

### 2.1 给药方法及样本采集

兔适应性饲养2周,禁食不禁水12 h后,ig缬沙坦溶液(由缬沙坦胶囊内容物溶于适量聚山梨酯80和硼砂的混合水溶液制成),每次7.5 mg(依据体表面积法计算,按照成人常用剂量折合<sup>[3]</sup>),每日2次,连续给药6 d。白兔在此期间对缬沙坦表现出良好的耐受性,无任何异常表现。

于末次ig结束1 h后采用空气栓塞法处死动物,迅速摘取2只眼球。用注射器抽取房水60 mg、玻璃体液200 mg(相应体积为房水60 mL、玻璃体液200 mL);并在冰上小心剪取角膜、虹膜等组织,夹取晶状体,仔细剥取视网膜等组织,滤纸吸干水分,精密称量各眼组织质量。

### 2.2 样本处理

房水中加入内标溶液(100 μg/mL 螺内酯)12 μL、乙腈240 μL,涡旋振荡1 min,以离心半径为6.1 cm、8 000 r/min离心10 min,取上清液,60 ℃氮气吹干,50%乙腈溶液60 μL复溶。玻璃体液中加入内标溶液12 μL、乙腈1 200 μL,后续处理过程同房水的操作方法,最后用50%乙腈溶液60 μL复溶。角膜、虹膜、视网膜、晶状体分别剪碎匀浆,分别加入内标溶液12 μL、乙腈1 mL(晶状体匀浆后加入内标溶液12 μL、乙腈1.5 mL),涡旋振荡1 min,以离心半径为8 cm、8 000 r/min离心10 min,取上清液,60 ℃氮气吹干后,加入50%乙腈60 μL复溶。

### 2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取缬沙坦对照品10 mg,置于50 mL量瓶中,加入50%乙腈溶液40 mL,振摇使之溶解,用50%乙腈溶液定容,即得质量浓度为0.2 mg/mL的缬沙坦对照品溶液,2 ℃保存,备用。

2.3.2 内标溶液的制备 精密称取螺内酯(内标)对照品10 mg,置于50 mL量瓶中,用50%乙腈溶液溶解并定容,即得质量浓度为0.2 mg/mL的内标溶液,2 ℃保存,备用。

2.3.3 质控样品的制备 取角膜、虹膜、视网膜和晶状体组织样品,精密称取质量后,分别制备组织匀浆,备用。精密量取房水、玻璃体液及角膜、虹膜、视网膜、晶状体的空白匀浆液200 μL,加入不同体积的缬沙坦对照品溶液,涡旋混匀,按“2.2”项下方法预处理后,制成低、中、高浓度质控样品(缬沙坦终质量浓度为0.20、1.56、12.50 μg/mL),-70 ℃保存,备用。

### 2.4 色谱条件

色谱柱:Hypersil GOLD ODS C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水-磷酸(550:450:1, V/V/V);流速:1 mL/min;检测波长:215 nm;柱温:20 ℃;进样量:20 μL。

### 2.5 方法学考察

2.5.1 方法的专属性 取空白组织样品、空白组织样品+缬沙坦对照品(1.56 μg/mL)、兔ig缬沙坦后的各组织样品,按“2.2”项下方法预处理后,再按“2.4”项下色谱条件进样测定。结果,缬沙坦分离度良好,各组织的内源性物质与缬沙坦的可能代谢物对测定无干扰。色谱图见图1(仅列出房水样品的色谱图,其余图略)。

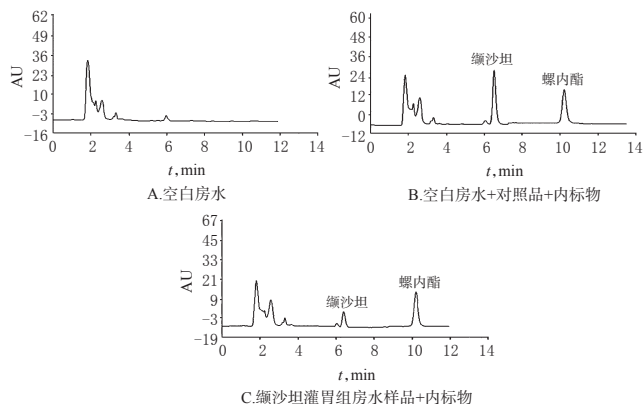


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.5.2 标准曲线与定量下限 取角膜、虹膜、视网膜和晶状体空白组织样品,精密称取质量后,分别制备组织匀浆,备用。精密量取房水、玻璃体液及角膜、虹膜、视网膜、晶状体的空白匀浆液200 μL,加入不同体积的缬沙坦对照品溶液,涡旋混匀。按“2.2”项下方法预处理,制成质量浓度分别为0.019 5、0.039、0.078、0.391、0.781、1.562、3.125、12.50 μg/mL的对照品溶液。再按“2.4”项下色谱条件进样测定。以缬沙坦质量浓度为横坐标(x)、缬沙坦各质量浓度的色谱峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标(y)进行线性回归,回归方程与线性范围见表1。结果表明,兔眼各组织中缬沙坦质量浓度在0.078~12.5 μg/mL范围内线性关系良好,定量下限均为0.078 μg/mL。

表1 缬沙坦在兔眼各组织中的回归方程与线性范围(n=6)

Tab 1 Regression equation and linear range of valsartan in each tissue of rabbit eyes(n=6)

组织	回归方程	r	线性范围, μg/mL
角膜	$y=4.689 2x+0.004 1$	0.999 9	0.078~12.5
房水	$y=4.521 3x+0.043 4$	0.999 8	0.078~12.5
虹膜	$y=4.617 8x+0.052 2$	0.999 6	0.078~12.5
晶状体	$y=4.721 0x-0.018 7$	0.999 9	0.078~12.5
玻璃体液	$y=4.687 0x+0.037 1$	0.999 8	0.078~12.5
视网膜	$y=5.055 3x-0.084 4$	0.999 8	0.078~12.5

2.5.3 日内、日间精密度及提取回收率考察 取“2.3.3”项下低、中、高浓度质控样品,按“2.4”项下色谱条件进样测定。日内测定5次,连续进样5 d。计算日内精密度和日间精密度,同法考察每种样品的提取回收率。结果,各质量浓度质控样品的日内精密度RSD<11%(n=5),

日间精密密度 RSD < 12% (n=5), 提取回收率为 54.3% ~ 69.6% (RSD < 11.1%, n=5), 均符合相关要求, 详见表 2。

表 2 精密度和提取回收率试验结果 (n=5)

Tab 2 Results of precision test and extraction recovery test (n=5)

组织	质量浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$	日内 RSD, %	日间 RSD, %	提取回收率 ( $\bar{x} \pm s$ ), %
角膜	0.20	8.21	9.94	63.3 $\pm$ 5.1
	1.56	4.98	6.79	64.5 $\pm$ 6.8
	12.50	3.64	7.34	66.1 $\pm$ 5.2
房水	0.20	8.62	10.67	69.6 $\pm$ 5.9
	1.56	6.32	6.39	66.8 $\pm$ 5.3
	12.50	5.98	7.48	69.4 $\pm$ 5.5
虹膜	0.20	6.27	10.31	66.4 $\pm$ 6.8
	1.56	6.22	5.91	66.9 $\pm$ 6.3
	12.50	3.67	5.87	68.4 $\pm$ 5.9
晶状体	0.20	10.64	12.04	59.4 $\pm$ 6.6
	1.56	8.64	7.64	54.3 $\pm$ 5.1
	12.50	6.47	8.97	54.9 $\pm$ 4.9
玻璃体液	0.20	7.51	11.34	62.4 $\pm$ 6.2
	1.56	8.97	9.25	60.3 $\pm$ 5.2
	12.50	5.55	7.64	61.4 $\pm$ 5.6
视网膜	0.20	6.98	8.92	66.8 $\pm$ 6.5
	1.56	6.18	7.84	68.2 $\pm$ 6.3
	12.50	4.91	5.97	68.7 $\pm$ 5.9

2.5.4 准确度试验 按“2.3.3”项下方法分别制备 6 个组织的低、中、高浓度质控样品, 按“2.2”项下方法处理后, 再按“2.4”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以实测药物浓度与理论浓度之比表示方法回收率, 考察各种组织样品含量测定的准确度。结果, 各质控样品的方法回收率均为 91.3% ~ 103.0% (RSD < 15%, n=5), 表明本方法的准确度良好。

2.5.5 稳定性试验 按“2.3.3”项下方法制备低、中、高浓度质控样品各 6 份, 分别考察室温放置 24 h、2  $^{\circ}\text{C}$  放置 24 h、-70  $^{\circ}\text{C}$  保存 30 d、-70  $^{\circ}\text{C}$  与室温反复冻融 3 次的样品稳定性。结果, 各浓度质控样品在上述条件下的实际测得值均在理论值的 85% ~ 115% 范围内, 所有稳定性试验的 RSD 均小于 10% (n=6), 表明缬沙坦在上述条件下的稳定性良好。

## 2.6 兔眼各组织中药物含量测定

按“2.2”“2.4”项下方法对兔眼组织样本进行检测, 计算缬沙坦在健康兔眼内各组织的分布浓度。结果, 缬沙坦在兔角膜、房水、虹膜、晶状体、玻璃体液、视网膜的含量分别为 (0.871  $\pm$  0.66)、(0.713  $\pm$  0.49)、(2.233  $\pm$  0.72)、(0.083  $\pm$  0.06)、(0.177  $\pm$  0.07)、(4.274  $\pm$  1.75)  $\mu\text{g}/\text{g}$  (n=6)。

## 3 讨论

肾素-血管紧张素系统 (Renin angiotensin system, RAS) 是调控人体血压、水、电解质的体液调节系统。RAS 既存在于体循环系统中, 也存在于肾、肾上腺、心、脑和肺等组织中。近年来大量研究证实, 眼内组织中也存在着独立于全身循环系统的局部 RAS。人们已经在眼内组织中检测到了所有的 RAS 成员<sup>[2,4-6]</sup>。研究表明, 眼局部 RAS 在细胞增殖、血管新生、炎症反应、氧自由基

生成、泪液分泌、房水生成和排出等多个方面发挥着重要作用<sup>[1-2,7-11]</sup>。而 ARB 可通过抑制 RAS 的过度激活发挥治疗作用。RAS 成员在眼内各组织分布非常广泛, 因此 ARB 类药物在眼科有着广泛的治疗范围, 包括糖尿病视网膜病变、青光眼、葡萄膜炎和早产儿视网膜病变在内的多种眼病<sup>[1-2,10-15]</sup>。有人探讨了 ARB 类药物降眼压的机制, 发现血管紧张素 II 可减少房水经葡萄膜、巩膜途径的排出, 从而升高眼压。而该效应可被 ARB 类药物逆转: ARB 类药物可使经葡萄膜巩膜-途径房水的外排率增加 24%, 产生剂量依赖性降低眼压的效应<sup>[7-9]</sup>。Choudhary R 等<sup>[9]</sup>研究发现, 奥美沙坦可通过逆转高血压患者晶状体氧化应激状态、恢复钠-钾-三磷酸腺苷酶和钙-三磷酸腺苷酶的活性来抑制高血压患者白内障的形成。另外, ARB 类药物还能提高视网膜中脑源性神经营养因子、睫状神经营养因子、酪氨酸羟化酶等神经营养因子水平, 提高抗氧化剂谷胱甘肽的含量, 并降低凋亡因子半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 的活性<sup>[10]</sup>, 对年龄相关性黄斑变性等退行性神经病变有一定的改善作用<sup>[15]</sup>。最新研究表明, ARB 类药物联合脑啡肽酶抑制剂能显著减少糖尿病视网膜病变大鼠的视网膜细胞凋亡数量<sup>[13]</sup>。

从本研究的结果来看, 连续给药 6 d 后, 缬沙坦已广泛地分布在眼内各组织中。其中, 视网膜中的药物含量最高, 其次是虹膜组织, 角膜与房水再次之。在玻璃体液与晶状体内的药物含量最低, 分别仅为视网膜内的 4% 和 2%。由于缬沙坦是一个脂溶性很强的药物, 具有良好的组织穿透性, 因此其在组织的分布浓度受组织的血运情况影响较大。与视网膜紧密相邻的脉络膜是一个血管密集的组织, 血流量很大, 约占眼球血液总量的 65%。一方面, 缬沙坦可直接从脉络膜扩散到视网膜; 另一方面, 脉络膜内层的毛细血管通透性很高, 小分子的缬沙坦很容易渗漏至视网膜。因此, 视网膜中的药物含量最高。虹膜亦分布很多血管, 与此相应, 虹膜中的药物含量也较高。而角膜无血管, 其营养主要靠角膜缘血管网和房水供应, 故缬沙坦在角膜中含量较低。玻璃体液和晶状体均无血管, 且其内容物为半固态或固态, 缬沙坦不容易向其中扩散, 故药物含量最低。

本研究首次报道了缬沙坦在正常兔眼的前节及后节各组织的分布规律, 可为缬沙坦治疗各种眼病的药效学及药理机制研究提供实验基础。

## 参考文献

- [1] Kaufman PL, Barany EH. Adrenergic drug effects on aqueous outflow facility following ciliary muscle retrodisplacement in the cynomolgus monkey[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1981, 20(5): 644-651.
- [2] 杨赞章, 李志金, 张铭连. 肾素-血管紧张素与眼科疾病[J]. *中国实用眼科杂志*, 2014, 32(12): 1410-1413.
- [3] 赵伟, 孙国志. 不同种实验动物间用量换算[J]. *畜牧兽医科技信息*, 2010, 27(5): 52-53.

# 葡萄籽原花青素对肾缺血再灌注损伤大鼠肾组织中 Caspase-3 和 TRAF6 表达的影响<sup>Δ</sup>

宋云梅\*(南阳医学高等专科学校基础部,河南 南阳 473000)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)34-4811-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.34.15

**摘要** 目的:研究葡萄籽原花青素对肾缺血再灌注损伤(RIRI)大鼠肾组织中半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(Caspase-3)和肿瘤坏死因子相关受体(TRAF6)表达的影响,探讨葡萄籽原花青素对RIRI的保护机制。方法:将50只大鼠随机分为假手术组、模型组、肾复康胶囊组(阳性对照,600 mg/kg)和葡萄籽原花青素低、高剂量组(100、150 mg/kg),每组10只。每天ig给药1次,连续7 d。给药结束后,除假手术组的其余各组大鼠均复制RIRI模型。造模成功24 h后,检测各组大鼠血清中肌酐(Cr)、尿素氮(BUN)水平以及肾组织中Caspase-3、TRAF6蛋白表达,并测定肾小管上皮细胞凋亡率。结果:与假手术组比较,模型组大鼠血清中Cr、BUN水平明显升高( $P<0.05$ ),肾组织中Caspase-3、TRAF6蛋白表达明显增强( $P<0.05$ ),肾小管上皮细胞凋亡率明显升高( $P<0.05$ );与模型组比较,各给药组大鼠血清中Cr、BUN水平均明显降低( $P<0.05$ ),肾组织中Caspase-3、TRAF6蛋白表达均明显减弱( $P<0.05$ ),肾小管上皮细胞凋亡率均明显降低( $P<0.05$ ),且葡萄籽原花青素高剂量组作用优于葡萄籽原花青素低剂量组和肾复康胶囊组( $P<0.05$ )。结论:葡萄籽原花青素能减轻大鼠RIRI,这可能是通过下调肾组织中Caspase-3、TRAF6蛋白的表达,从而抑制肾小管上皮细胞凋亡来实现的。

**关键词** 葡萄籽原花青素;肾缺血再灌注损伤;半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3;肿瘤坏死因子相关受体;大鼠

## Effect of Grape Seed Procyanidins on Protein Expressions of Caspase-3 and TRAF6 in Renal Tissue of Rats with Renal Ischemia-reperfusion Injury

SONG Yunmei(Dept. of Basic, Nanyang Medical College, Hennan Nanyang 473000, China)

- [4] 李静,杨赞章,李志金.肾素-血管紧张素-醛固酮系统与早产儿视网膜病变[J].中华眼底病杂志,2014,30(1):100-103.
- [5] Yaguchi S, Ogawa Y, Shimmura S, *et al.* Presence and physiologic function of the renin-angiotensin system in mouse lacrimal gland[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(9):5416-5425.
- [6] White AJ, Cheruvu SC, Sarris M, *et al.* Expression of classical components of the renin-angiotensin system in the human eye[J]. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2015, 16(1):59-66.
- [7] Inoue T, Yokoyama T, Koike H. The effect of angiotensin II on uveoscleral outflow in rabbit[J]. *Curr Eye Res*, 2001, 23(2):139-143.
- [8] Vaajanen A, Vapaatalo H, Kautiainen H, *et al.* Angiotensin (1-7) reduces intraocular pressure in the normotensive rabbit eye[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49(6):2557-2562.
- [9] Choudhary R, Bodakhe SH. Olmesartan, an angiotensin II receptor blocker inhibits the progression of cataract formation in cadmium chloride induced hypertensive albino rats [J]. *Life Sci*, 2016, 167(15):105-112.
- [10] Ola MS, Ahmed MM, Abuhashish HM, *et al.* Telmisartan ameliorates neurotrophic support and oxidative stress in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Neurochem Res*, 2013, 38(8):1572-1579.
- [11] Yaguchi S, Ogawa Y, Shimmura S, *et al.* Angiotensin II type 1 receptor antagonist attenuates lacrimal gland, lung, and liver fibrosis in a murine model of chronic graft-versus-host disease[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6):e64724.
- [12] Hatzopoulos KM, Vessey KA, Wilkinson-Berka JL, *et al.* The vasoneuronal effects of AT<sub>1</sub> receptor blockade in a rat model of retinopathy of prematurity[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55(6):3957-3970.
- [13] Prasad T, Roksnoer LC, Zhu P, *et al.* Beneficial effects of combined AT<sub>1</sub> receptor/neprilysin inhibition (ARNI) versus AT<sub>1</sub> receptor blockade alone in the diabetic eye[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(15):6722-6730.
- [14] Chaturvedi N, Porta M, Klein R, *et al.* Effect of candesartan on prevention (DIRECT-Prevent 1) and progression (DIRECT-Protect 1) of retinopathy in type 1 diabetes: randomised, placebo-controlled trials[J]. *Lancet*, 2008, 372(9647):1394-1402.
- [15] 骆挺,彭惠.肾素-血管紧张素系统在年龄相关性黄斑变性中的研究[J].国际眼科杂志,2015,15(6):997-999.

Δ 基金项目:南阳市科技攻关项目(No.2014GG040)

\* 讲师,硕士。研究方向:肾缺血再灌注。电话:0377-63526123。

E-mail: songsm@163.com

(收稿日期:2017-03-05 修回日期:2017-09-27)

(编辑:刘明伟)