

卡托普利片灌胃后在兔眼组织的分布*

李静¹, 杨赞章², 张越², 高飞萌², 贾佩佩², 李志金²

(1. 河北省邢台市人民医院儿三科, 邢台 054001; 2. 河北省眼科医院药剂科、河北省眼科学重点实验室, 邢台 054001)

摘要 **目的** 观察卡托普利片给兔连续多次灌胃后, 药物在眼内各组织中的分布规律。**方法** 健康新西兰白兔灌胃给予卡托普利片 5 mg, 每天 2 次, 连用 6 d。于末次给药后 1 h 时处死白兔, 迅速采集角膜、虹膜、房水、晶状体、玻璃体、视网膜组织。采用高效液相色谱-紫外(HPLC-UV)法定量检测各组织中卡托普利的含量。**结果** 卡托普利在兔视网膜、虹膜、房水、玻璃体、晶状体、角膜中含量依次为(111.0±15.6), (61.1±28.6), (35.7±18.5), (16.6±2.4), (8.6±4.0), (4.1±1.4) $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。**结论** 连续多次给药后, 卡托普利在眼内各组织中分布存在差异, 以视网膜中分布浓度为最高, 虹膜次之, 晶状体、角膜中的浓度最低。

关键词 卡托普利; 色谱-紫外法, 高效液相; 眼组织

中图分类号 R972.4; R965 **文献标识码** A

文章编号 1004-0781(2019)01-0018-04

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2019.01.004

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Distribution of Captopril Tablet in the Ocular Tissue of Rabbit Eye After Intragastrical Administration

LI Jing¹, YANG Zanzhang², ZHANG Yue², GAO Feimeng², JIA Peipei², LI Zhijin² (1. The Third Department of Paediatrics, the People's Hospital of Xingtai City, Hebei Province, Xingtai 054001, China; 2. Key Laboratory of Ophthalmology Characteristics, Department of Pharmacy, Eye Hospital of Hubei Province, Xingtai 054001, China)

ABSTRACT Objective To investigate the distribution of captopril tablet in the ocular tissue of rabbit eye after intragastrical administration. **Methods** Captopril tablet was administrated to rabbits intragastrically, 5 mg for every time, twice a day, for 6 days running. Rabbits were sacrificed 1 h after the last administration, and the tissues including cornea, iris, aqueous humor, lens, vitreous and retina were collected. Captopril in the tissues were determined by HPLC-UV. **Results** The content of captopril in retina, iris, aqueous humor, vitreous, lens, cornea were(111.0±15.6), (61.1±28.6), (35.7±18.5), (16.6±2.4), (8.6±4.0), (4.1±1.4) $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively. **Conclusion** After continuous administration of captopril, there were difference in the distribution of captopril in various tissues of the eye, with the highest concentration in the retina, the second in the iris, the lowest in the lens and cornea.

KEY WORDS Captopril; Chromatography-ultraviolet, high performance liquid; Ocular tissue

血管紧张素转化酶抑制剂(angiotensin converting enzyme inhibitors, ACEI)是经典的抗高血压药物。从 20 世纪 70 年代开始, 国外即有人尝试将 ACEI 用于治疗眼病^[1]。四十多年来, 大量研究证实 ACEI 对早产儿视网膜病变^[2-4]、糖尿病视网膜病变^[5-7]、葡萄膜炎^[8]、青光眼^[9]、年龄相关性黄斑变性^[10]等眼病具有一定的治疗效果。但以往研究均针对 ACEI 类药物治疗眼病的药效学或作用机制方面, 而对 ACEI 类药物

在眼内组织中分布规律笔者尚未见文献报道。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。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强度和潜在毒性, 也有助于探索药物的作用机制。本实验以 ACEI 的代表药物卡托普利为研究对象, 研究卡托普利灌胃后在兔眼内的分布规律, 为卡托普利治疗各种眼病的药效学及药理机制研究提供实验基础。

1 仪器与试剂

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); 氮吹仪(上海极恒实业有限公司); TGL-16gR 型低温高速离心机(上海安亭科学仪器厂, 2 号和 3 号角转子有效离心半径分别为 6.1 和 8.0 cm)。

收稿日期 2017-10-26 **修回日期** 2017-12-13

基金项目 * 邢台市科技人才资助计划项目(201422048-1)

作者简介 李静(1983-), 女, 河北邢台人, 主治医师, 硕士, 研究方向: 小儿神经科。ORCID: 0000-0002-3342-0891。电话: 0319-3286439, E-mail: zgztj@163.com。

通信作者 杨赞章(1981-), 男, 河北邢台人, 副主任药师, 硕士, 研究方向: 眼科药学, 临床药学。电话: 0319-3237663, E-mail: yangzanzhang@163.com。

1.2 试剂 卡托普利对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100318-201103);卡托普利片(常州制药厂有限责任公司,规格:每片 25 mg,批号:15102911);乙腈和甲醇为色谱纯(美国 Fisher Scientific 公司),其他试剂均为分析纯,水为 Millipore 超纯水。

2 方法与结果

2.1 给药方法及标本采集 清洁级雌性新西兰白兔,体质量约 2 kg,均购自河北医科大学实验动物中心,动物生产许可证号:SCXK(冀)2013-1-003;实验动物合格证号:1505014。购买后动物饲养于河北省眼科医院动物室,环境温度为 20~25 ℃,相对湿度 45%~65%,自然昼夜节律光照,适应性饲养 2 周。实验前禁食不禁水 12 h。卡托普利灌胃液用现配,灌胃前将卡托普利片研末,超纯水充分混合,配制成含量为 0.5 mg·mL⁻¹的混悬液,每次灌胃体积为 10 mL(含卡托普利 5 mg),每天 2 次(依据体表面积法计算,按照成人常用剂量折合^[11]),连续灌胃 6 d。

于末次灌胃结束 1 h 后处死动物,迅速摘取眼球。用注射器抽取房水 60 μL、玻璃体液 200 mg。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,精密称定质量。分别在房水、玻璃体液中加入 0.1 mol·L⁻¹维生素 C 和 0.1 mol·L⁻¹依地酸二钠混合溶液 20 μL,角膜、晶状体、虹膜、视网膜加入 0.1 mol·L⁻¹维生素 C 和 0.1 mol·L⁻¹依地酸二钠混合液 30 μL,以防止卡托普利被氧化破坏。

2.2 标本处理 房水中加入乙腈 240 μL,涡旋震荡 1 min,8000 r·min⁻¹离心 10 min($r=8$ cm),取上清液,50 ℃下氮气吹干,用 55%甲醇溶液 60 μL 复溶。玻璃体匀浆后加入乙腈 1200 μL,后续处理过程同房水的操作方法。剪碎角膜、虹膜、视网膜、晶状体,匀浆后分别加入乙腈 1 mL(晶状体匀浆后加入乙腈 1.5 mL),涡旋震荡 1 min,8000 r·min⁻¹($r=8$ cm),离心 10 min,取上清液,50 ℃下氮气吹干后,各标本均加 55%甲醇 60 μL 复溶。

2.3 色谱条件 色谱柱:Thermo Scientific 公司 Hypersil GOLD ODS(C₁₈)(250 mm×4.6 mm,5 μm)。流动相:甲醇:水:磷酸(550:450:1)。检测波长为 215 nm,柱温 20 ℃,流速 1 mL·min⁻¹,20 μL 定量阀进样。

2.4 溶液的制备

2.4.1 对照品溶液的制备 精密称取卡托普利对照品 10.0 mg,置于 25 mL 量瓶中,加入 55%甲醇溶液 20 mL,加入 0.1 mol·L⁻¹的维生素 C 和 0.1 mol·L⁻¹

依地酸二钠混合液 500 μL,振摇使溶解,用 55%甲醇溶液稀释至刻度,即得 0.4 mg·mL⁻¹卡托普利对照品储备液,置于 2 ℃冰箱中保存备用。

2.4.2 质量控制样品的制备 取角膜、虹膜、玻璃体、视网膜和晶状体共 5 种空白组织样品,精密称定质量后,分别制备组织匀浆,备用。量取房水及玻璃体、角膜、虹膜、视网膜、晶状体的空白匀浆液 200 μL,加入不同体积的卡托普利对照品溶液,涡旋混匀。按照“2.2”项下方法进行组织样品的预处理,制备成高、中、低 3 个浓度的生物质量控制样品(0.78,12.50,100 μg·mL⁻¹),-70 ℃保存,备用。

2.5 方法学验证

2.5.1 方法专属性 取空白组织标本、空白组织标本+卡托普利对照品、兔灌胃卡托普利后的组织标本,依据“2.2”项下方法预处理后,按照“2.3”项下的色谱条件进行测定。结果显示,卡托普利的分离度良好,各组织中内源性物质与卡托普利可能代谢物对测定无干扰。

2.5.2 标准曲线的绘制及定量下限的考察 量取房水及玻璃体、角膜、虹膜、视网膜和晶状体的空白组织匀浆液,分别加入不同体积的卡托普利对照品溶液,涡旋混匀。按“2.2”项下组织样品的预处理方法进行处理,制成 0.195,0.391,0.781,1.562,3.125,12.50,50,100,200 μg·mL⁻¹的卡托普利标准溶液。依据“2.3”项下色谱条件进样测定。以卡托普利各浓度的色谱峰面积对浓度进行线性回归,得各组织的回归方程,见表 1。结果表明,各种组织中卡托普利均在 0.391~12.5 μg·mL⁻¹浓度范围内线性良好。各标本的定量下限均为 0.391 μg·mL⁻¹(RSD<20%)。

表 1 卡托普利在兔眼各组织中的回归方程

Tab.1 Regression equation of captopril in each tissue of rabbit eyes		
组织	回归方程	相关系数(r)
角膜	$Y=21.077X+7.619$	0.998 9
房水	$Y=19.922X+24.894$	0.999 6
虹膜	$Y=20.870X+27.476$	0.999 3
晶状体	$Y=26.422X-15.211$	0.999 1
玻璃体	$Y=19.150X+65.843$	0.997 8
视网膜	$Y=26.246X-15.567$	0.999 1

2.5.3 日内、日间精密密度及提取回收率 取“2.4.2”项下低、中、高浓度质量控制样品,按照“2.3”项下的色谱条件进行测定。每种组织的每个浓度日内精密密度一天测量 5 次,日间精密密度连续测量 5 d。计算日内精密密度和日间精密密度。同法进行每种标本的提取回收率实

验。结果见表 2。各质量浓度质量控制样品的日内精密度 $RSD < 10\%$, 日间精密度 $RSD < 12\%$, 提取回收率 $74.9\% \sim 88.2\%$ 。精密度均符合相关要求。

表 2 质量控制样品的精密度和提取回收率实验结果

Tab.2 Results of precision test and extraction recovery test on quality control sample $n=5$

组织	质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	日内精密度	日间精密度	提取回收率
		%		
角膜	0.78	8.91	10.36	82.6 ± 6.7
	12.50	5.88	7.73	84.5 ± 6.9
	100.00	4.87	7.94	85.1 ± 7.7
房水	0.78	7.88	11.26	87.2 ± 6.7
	12.50	6.94	7.59	82.8 ± 8.3
	100.00	6.38	8.28	86.4 ± 6.9
虹膜	0.78	5.67	9.34	80.2 ± 7.3
	12.50	6.37	6.86	85.5 ± 8.3
	100.00	5.87	7.65	87.4 ± 6.9
晶状体	0.78	7.49	11.78	74.9 ± 7.9
	12.50	8.94	9.84	77.3 ± 5.9
	100.00	6.88	8.04	80.9 ± 6.9
玻璃体	0.78	8.98	11.17	77.8 ± 8.9
	12.50	9.14	9.66	80.3 ± 5.8
	100.00	5.93	7.97	61.4 ± 5.6
视网膜	0.78	8.45	10.29	85.3 ± 6.5
	12.50	7.28	7.74	86.5 ± 6.9
	100.00	6.97	5.63	88.2 ± 7.9

2.5.4 准确度实验 按照“2.4.2”项方法分别制备角膜、晶状体等 6 种组织的低、中、高浓度 ($0.78, 12.50, 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的生物质量控制样品, 按“2.3”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相比较, 计算出方法回收率, 考察各种组织样品含量测定的准确度。结果显示, 各种质量控制样品的方法回收率均在 $92.4\% \sim 103.1\%$ ($RSD < 15\%, n = 5$), 表明本方法的准确度良好。

2.5.5 稳定性实验 按照“2.4.2”项方法分别制备角膜、晶状体等 6 种组织的低、中、高浓度 ($0.78, 12.50, 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的生物质量控制样品各 6 份, 分别于室温密闭放置 24 h, $2 \text{ }^\circ\text{C}$ 下放置 24 h, $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存 30 d, 经 $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ 与室温反复冻融 3 次。精密吸取样品 $20 \mu\text{L}$, 按“2.3”项下色谱条件进样测定, 考察样品的稳定性。结果显示, 质量控制样品在上述保存条件下的实际测得值均在理论值的 $85\% \sim 115\%$ 范围内, 所有稳定性实验的 RSD 均小于 10% ($n = 6$), 表明卡托普利在各样品中的稳定性良好。

2.6 眼各组织中药物含量测定 按照“2.2”和“2.3”项的

方法对兔眼组织标本进行预处理和检测, 计算各组织匀浆液中卡托普利的浓度。然后根据匀浆液的浓度、体积及标本质量计算出药物在各组织中的含量。结果表明, 卡托普利在多次灌胃后药物在角膜、房水、虹膜、晶状体、玻璃体等组织的含量分别为: 视网膜的药物含量最高, 为 $(111.0 \pm 15.6) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 虹膜 $(61.1 \pm 28.6) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 房水 $(35.7 \pm 18.5) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 玻璃体 $(16.6 \pm 2.4) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 晶状体 $(8.6 \pm 4.0) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 角膜 $(4.1 \pm 1.4) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

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, 也存在于肾脏、肾上腺、心脏、脑和肺等组织中。近年来大量研究证实, 眼组织中也存在着独立于全身循环系统的局部 RAS。有人已经在眼内组织中检测到所有的 RAS 成员^[12-14]。研究表明, 眼部 RAS 在细胞增殖、新生血管、炎症反应、泪液分泌、房水生成和排出等多个方面发挥着重要作用^[2-10, 15], 而 ACEI 可以通过抑制 RAS 的过度激活发挥治疗作用。ACEI 类药物在眼科的治疗范围非常广泛, 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^[2-10]。MEHTA 等^[4] 研究发现 ACEI 类药物具有良好的降眼压效果, 培哚普利可显著降低慢性兔高眼压模型的眼压, 其效果与硝酸毛果芸香碱的效果相当; 依那普利拉在使用 3 h 后降低眼压幅度可达 20.3% , 其降眼压的机制除了抑制 ACE 之外, 可能还与抑制胆碱酯酶、调节基质金属蛋白酶和细胞因子活性有关^[4, 9]。另有两项大型临床试验结果表明, ACEI 类药物卡托普利、依那普利均可延缓患者糖尿病视网膜病变的发生和进展, 改善黄斑水肿状况^[5-6]。

从本研究的结果来看, 连续 6 d 灌服卡托普利后, 卡托普利已广泛地分布在眼内各组织中。其中, 视网膜中的药物浓度最高, 其次是虹膜组织和房水, 玻璃体的分布浓度再次之, 晶状体和角膜的分布浓度最低。笔者推测卡托普利在眼内各组织的分布浓度差异与其血流量有关。由于卡托普利为小分子物质 (相对分子质量约为 217), 容易透过毛细血管的膜孔向周围组织扩散; 而与视网膜紧邻的脉络膜是一个血管密集的组织, 其血流量约占眼球血液总量的 65% , 这与卡托普利在视网膜中的高分布浓度相吻合。虹膜亦分布很多微血管, 故虹膜中的卡托普利浓度也较高。玻璃体、晶状体和角膜均无血管, 且其内容物为半固态或固态, 流动性很差, 卡托普利不容易向其中扩散, 从而导致卡托普利在这些组织中的浓度很低。另外, 角膜的内皮细

胞层作为脂质屏障阻挡了水溶性的卡托普利透过,使得卡托普利在角膜的分布浓度最低。

本文报道了卡托普利在正常兔眼的前节及后节各组织的分布规律,可为卡托普利治疗眼病的药效学及药理机制研究提供基础数据。

参考文献

- [1] IGIC R, ROBINSON C J, MILOSEVIC Z, et al. Activity of renin and angiotensin I converting enzyme in retina and ciliary body (author's transl) [J]. *Lijec Vjesn*, 1977, 99(8):482-484.
- [2] 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.
- [3] LI H, WANG Y S. An angiotensin-converting enzyme inhibitor modulates stromal-derived factor-1 through CD26/dipeptidyl peptidase IV to inhibit laser-induced choroidal neovascularization [J]. *Mol Vis*, 2013, 19(22): 1107-1121.
- [4] MEHTA A, IYER L, PARMAR S, et al. Oculohypotensive effect of perindopril in acute and chronic models of glaucoma in rabbits [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2010, 88(5): 595-600.
- [5] WANG N, ZHENG Z, JIN H Y, et al. Treatment effects of captopril on non-proliferative diabetic retinopathy [J]. *Chin Med J(Engl)*, 2012, 125(2): 287-292.
- [6] HARINDHANAVUDHI T, MAUER M, KLEIN R, et al. Benefits of renin-angiotensin blockade on retinopathy in type 1 diabetes vary with glycemic control [J]. *Diabetes Care*, 2011, 34(8): 1838-1842.
- [7] CHATURVEDI N, SJOLIE A K, STEPHENSON J M, et al. Effect of lisinopril on progression of retinopathy in normotensive people with type 1 diabetes. The EUCLID Study Group. EURODIAB Controlled Trial of Lisinopril in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus [J]. *Lancet*, 1998, 351(9095): 28-31.
- [8] ILIEVA I, OHGAMI K, JIN X H, et al. Captopril suppresses inflammation in endotoxin-induced uveitis in rats [J]. *Exp Eye Res*, 2006, 83(3): 651-657.
- [9] AGARWAL R, KRASILNIKOVA A V, RAJA I S, et al. Mechanisms of angiotensin converting enzyme inhibitor-induced IOP reduction in normotensive rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 730(1): 8-13.
- [10] 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.
- [11] 赵伟,孙国志. 不同种实验动物间用药量换算 [J]. *畜牧兽医科技信息*, 2010, 27(5): 52-53.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] WHITE A J, CHERUVU S C, 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.
- [15] CHOUDHARY R, BODAKHE S H. 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.