

萘普生大鼠肠吸收动力学实验

一、实验目的

- 1、了解大鼠在体肠灌流吸收实验测定药物肠吸收动力学的方法；
- 2、考查萘普生钠在肠道空肠段和结肠段的吸收动力学特征；
- 3、分析萘普生钠在肠道的吸收机制。

二、实验指导

药物经口服给药的主要吸收部位是胃肠道。一种药物能否口服吸收，主要取决于自身的理化性质，其次是药物的膜转运和吸收机制、影响药物吸收的生理因素、物理化学因素和剂型因素。探明药物在肠道各区段的吸收动力学特征、吸收部位及吸收机制对于合理确定临床给药方案及指导各种制剂的处方设计，尤其是缓、控释制剂的处方设计具有重要意义，是口服药物开发的重要环节。吸收部位的研究可以通过离体、在体、体内、CaCo-2 细胞模型法等多种方法进行。人体内的研究最能说明药物吸收的实际情况，但人体内方法费用昂贵，测定设备要求高，目前不易做到；离体实验破坏了肠管真实的生存环境，结果与实际吸收可能产生较大误差；在体实验方法应用较多，已形成多种方案，如肠管插管、肠段结扎、肠血管灌流、肠肝血管灌流等，对于不同性质的药物可通过适当调整实验方案进行研究。本文采用大鼠在体肠灌流的方法，本实验采用在体肠灌流吸收实验考查萘普生钠在大鼠肠道的吸收动力学。研究萘普生钠的吸收部位和吸收动力学特征，希望能为口服制剂的设计提供生物药剂学依据。

三、材料与仪器

雄性 SD 大鼠，日立 U-2900 型紫外分光光度计和石英比色杯，蠕动泵，乳胶管，电热恒温水浴锅；100 ml 容量瓶 3 个，50 ml 容量瓶 6 个，10 ml 容量瓶 6 个，移液管 1、2、5、10 ml 若干，具塞试管若干，微孔滤膜若干，5 ml 注射器若干；大鼠固定装置一个；手术剪、手术镊、眼科剪、眼科镊各一把。

四、实验动物

雄性 SD 大鼠 3 只，**220-250g**

五、实验内容与操作

(一) 供试液的配制 精密吸取萘普生钠标准储备液 (**2000 $\mu\text{g/ml}$**) 5 ml 和酚红标准储备液 (**200 $\mu\text{g/ml}$**) 10 ml, 用生理盐水定容至 100 ml, 制得含有 **100 $\mu\text{g/ml}$** 萘普生钠和 **20 $\mu\text{g/ml}$** 酚红的供试液。

(二) 大鼠在体肠管回流

SD 大鼠于实验前禁食 18 h (自由饮水), 称重, 10% 水合氯醛溶液腹腔注射麻醉 (**0.5 ml/100 g** 大鼠体重), 并背部固定于手术台板上, 保持 **37 $^{\circ}\text{C}$** 体温, 沿腹部正中线切开腹部 (约 **3 cm**)。仔细辨认肠道各肠段, 取空肠段 **10cm** 左右, 在两端剪切后插管, 结扎, 先用 **37 $^{\circ}\text{C}$** 生理盐水以 **2 ml/min** 的流速冲洗肠管, 充分洗涤后, 再以空气排出生理盐水。

按图 21-1 装置进行肠管回流实验。用 50 ml 供试液以 **2.5 ml/min** 的速度回流, 分别于回流 **15、30、45、60、75 和 90 min** 后取回流液 **5 ml**, 同时补充等量的恒温供试液。回流液置于 EP 管中, 精吸 **0.5 ml** 置于 **10 ml 离心管**中按照酚红的定量检测法测定酚红的浓度; 回流液余 **4.5ml** 用于测定萘普生钠的浓度。

1、标准曲线的制备

(1) 酚红的标准曲线

精密吸取 **200 $\mu\text{g/ml}$** 的酚红溶液 **0 ml、0.5 ml、1.0 ml、2.0 ml、3.0 ml 和 4.0 ml** 于 **10 ml** 容量瓶中, 用生理盐水稀释至刻度。再分别精吸该稀释液 **0.5 ml** 于 **10 ml** 具塞试管中, 加入 **1 mol/L** 的 **NaOH 5 ml** 显色后, 在 **550 nm** 处测定吸收度, 以吸收度对浓度作线性回归, 即得酚红的标准曲线方程。

(2) 加入酚红的萘普生钠标准曲线

精密称定干燥至恒重的萘普生钠原料 **0.2g** 至 **100 ml** 容量瓶中, 用生理盐水溶解并定容, 配制成 **2000 $\mu\text{g/ml}$** 的溶液。

再分别精吸此溶液 **0ml、0.50 ml、1.25 ml、2.50 ml、3.75 ml、5.00 ml** 于 **50 ml** 容量瓶中, 并分别加入 **200 $\mu\text{g/ml}$** 酚红溶液 **5.0 ml**, 用生理盐水稀释至刻度, 于 **330 nm** 处测其吸收度, 以吸收度对浓度作线性回归, 得加入酚红的萘普生钠标准曲线方程。

2、萘普生钠及酚红的定量检测法

将待测样品 (**约 4.5ml**) 于 **330 nm** 处测其吸收度, 根据加入酚红的萘普生钠标准曲线方程计算样品中萘普生钠的浓度。空白校正采用“加入酚红的萘普生

钠标准曲线”中的空白。

在酚红待测样品 **0.5ml** 中加入 1 mol/L 的 NaOH 5ml 显色后, 在 550 nm 处测其吸收度, 根据测定得到的酚红标准曲线方程计算样品中酚红的浓度。空白校正采用“酚红的标准曲线”中的空白。

六、数据处理和计算

(一) 根据 t_n 时间点测得的循环液中酚红浓度 $C_{n\text{酚红}}$ ($\mu\text{g/ml}$), 按式 21-1 计算该时刻循环液体积 V_n (ml):

$$V_n(\text{ml}) = \frac{1000 - \sum_{i=1}^{n-1} C_{i\text{酚红}} \times 5 + 20 \times 5 \times (n-1)}{C_{n\text{酚红}}} \quad (\text{式}21-1)$$

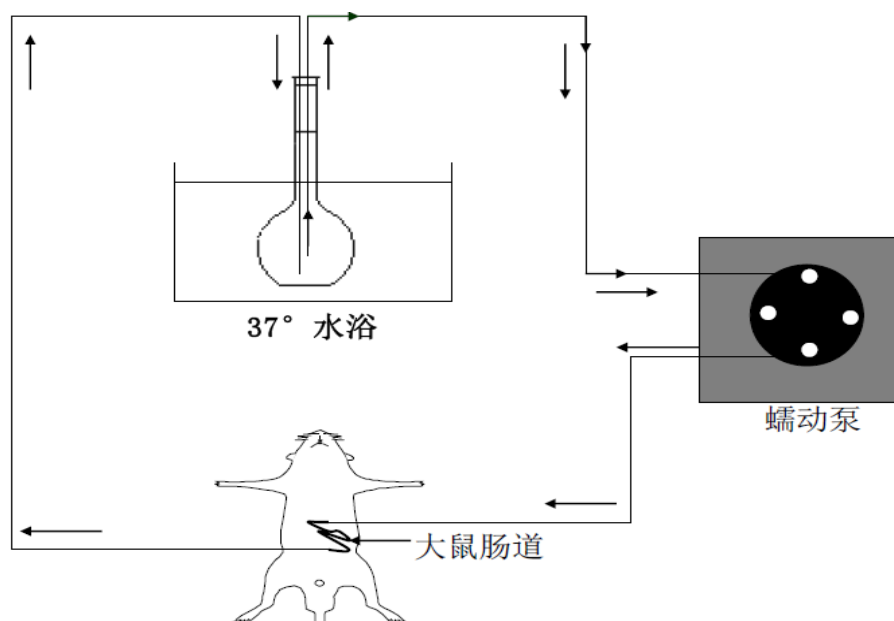


图 21-1 大鼠在体肠管回流装置

(二) 根据不同时间点测定的循环液中萘普生钠浓度 $C_{n\text{萘普生钠}}$ ($\mu\text{g/ml}$), 计算 $0-t_n$ 时间内萘普生钠的肠段吸收量 Q_n (μg):

$$Q_n = 5000 - C_{n\text{萘普生钠}} \times V_n - \sum_{i=1}^{n-1} C_{i\text{萘普生钠}} \times 5 + 100 \times 5 \times (n-1) \quad (\text{式}21-2)$$

(三) 以 $\ln Q_n$ 对 t_n 作图, 线性回归计算斜率, 即为萘普生钠吸收速率常数 K_a 。

(四) 实验数据记录与处理

1、酚红标准曲线

酚红 ($\mu\text{g/ml}$)	10	20	40	60	80
A550					

2、萘普生钠标准曲线

萘普生钠 ($\mu\text{g/ml}$)	10	25	50	75	100
A330					

3、循环液体积的计算

t (min)	样品	A550	C ($\mu\text{g/ml}$)	V_n (ml)
15	1			
30	2			
45	3			
60	4			
75	5			
90	6			

4、Ka 的计算

t (min)	样品	A330	C ($\mu\text{g/ml}$)	Q_n (ml)
15	1			
30	2			
45	3			
60	4			
75	5			
90	6			

七、思考题

- 1、酚红在整个实验过程中的作用。
- 2、推测分析萘普生钠在肠道的吸收机制？药物的理化性质对其吸收有何影响？胃肠道 pH 值对其吸收有何影响？
- 3、如果需要设计日服一次的萘普生钠口服缓控释制剂，根据萘普生钠在肠道中的吸收动力学特征，应作哪些方面的考虑？