

对乙酰氨基酚家兔体内药物动力学研究的实验教学改革

樊莉, 华俊杰, 卢光照, 孙治国, 陈佩, 张翮, 鲁莹*

海军军医大学药学院药剂学教研室, 上海

收稿日期: 2021年12月3日; 录用日期: 2021年12月31日; 发布日期: 2022年1月7日

摘要

对乙酰氨基酚家兔体内药物动力学研究是我校药学、中药学专业药物动力学课程主要实验内容之一。实验目的是让学生理解和掌握通过测定家兔血药浓度来计算药物药动学参数。现有的实验方法测得的血药浓度数据存在波动范围大等现象, 导致实验结果不理想。笔者经过查阅文献、预实验, 对实验方法进行了改进, 改进后实验方法重现性、稳定性好, 适合学生实验教学。

关键词

对乙酰氨基酚, 家兔, 药物动力学, 实验教学

Experiment Teaching Reform of Pharmacokinetics of Acetaminophen in Rabbits

Li Fan, Junjie Hua, Guangzhao Lu, Zhiguo Sun, Pei Chen, He Zhang, Ying Lu*

Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai

Received: Dec. 3rd, 2021; accepted: Dec. 31st, 2021; published: Jan. 7th, 2022

Abstract

The pharmacokinetics of Acetaminophen in rabbits is one of the important courses of pharmacokinetics in Pharmacy and Traditional Chinese Medicine major. It's important for the students to understand and master how to get the pharmacokinetics parameters of drugs by determining the

*通讯作者。

文章引用: 樊莉, 华俊杰, 卢光照, 孙治国, 陈佩, 张翮, 鲁莹. 对乙酰氨基酚家兔体内药物动力学研究的实验教学改革[J]. 教育进展, 2022, 12(1): 71-75. DOI: 10.12677/ae.2022.121014

blood drug concentration. The blood drug concentration presented a large fluctuation range, leading to unsatisfactory experimental results. The author revised the experiment, determined a new way to take blood and improvement HPLC method. The experimental results showed good stability and reproducibility. It is suitable for students experiment teaching.

Keywords

Acetaminophen, Rabbits, Pharmacokinetics, Experiment Teaching

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

药物动力学是应用动力学的原理与数学处理方法, 研究药物在体内的吸收、分布、代谢和排泄过程(即 ADME 过程)量变规律的学科, 即研究药物体内过程动态变化规律的一门学科。药物动力学阐明药物在体内量变的规律, 为新药、新剂型、新型递药系统的研发以及药物的临床合理应用提供科学依据[1]。药物动力学是我校药学和中药学专业三年级本科生的必修课, 是一门实践性、应用性非常强的课程[2]。现今, 国内药学高等院校均开设了药理学实验课。开设目的是为了使学生学员在理论课的基础上, 通过药理学实验课进一步掌握药物的 ADME 过程和特点, 明确药理学参数的意义, 系统地掌握药理学研究的方法与程序。使学生认识到药理学是为新药设计、临床合理用药及药物制剂生物等效性等提供理论依据的一门科学[3] [4]。

为使药理学实验更加系统和实用, 我校从学科内涵入手, 对现有的教学模式进行改革, 突破传统的实验教学模式, 使实验教学具有验证、综合和探索三大功能。在药学本科教学中, 建立了药理学模拟实验(体外循环法)、基础实验(大鼠在体小肠吸收实验)和综合性实验(血药实验)三个实验教学层次, 构建以创新能力培养为主线的实验教学新模式[3] [4]。

其中对乙酰氨基酚家兔体内药物动力学研究是我校药理学综合性(血药实验)实验内容。通过该实验教学, 可让学生理解和掌握测定动物血药浓度计算药物药理学参数方法。实验内容包括血样采集、血样处理、血药浓度测定、数据处理、模型判断和参数计算。笔者在实验教学过程中发现现有的实验方法测得的血药浓度数据存在波动范围大等现象, 导致药理学参数不准确。经过查阅文献和预实验, 对实验方法进行了改进, 改进后的实验方法重现性、稳定性好, 适合学生实验教学。

2. 对乙酰氨基酚家兔体内药物动力学实验现状

我校现有药物动力学实验讲义中, 用家兔作为实验动物, 给家兔静脉注射对乙酰氨基酚溶液, 定时静脉取血, 对血样进行处理后用高效液相测定血药浓度后, 进行数据处理, 曲线拟合, 隔室判断。求算消除速率常数 k 、半衰期 $t_{1/2}$ 等参数。动物实验影响因素多, 血样处理较为复杂, 特别是高效液相条件对数据的稳定性影响较大。因此我们对高效液相条件和取血方法进行了改进。

3. 改进后的实验方法

3.1. 对乙酰氨基酚标准曲线的制备

3.1.1. 对乙酰氨基酚储备液和标准工作液的制备

精密称取 105℃干燥至恒重的对乙酰氨基酚标准品 20.0 mg, 置于 10 mL 容量瓶中, 加超纯水溶解,

摇匀、定容，得对乙酰氨基酚对照品贮备液(2 mg/ml)。

精密吸取对乙酰氨基酚标准储备液 0.05、0.1、0.2、0.4、1.0、2.0、4.0 mL，于 10 mL 容量瓶中，加超纯水定容，配成 10、20、40、80、200、400、800 $\mu\text{g/ml}$ 的对乙酰氨基酚标准工作液。

3.1.2. 对乙酰氨基酚标准曲线的制备

吸取各工作液和贮备液各 20 μL ，分别加兔空白血浆 180 μL 于 1.5 ml 离心管中。配制成对乙酰氨基酚 1、2、4、8、20、40、80、200 $\mu\text{g/ml}$ 的含药血浆。

取各浓度含药血浆 100 μL 于新离心管，每管加入甲醇 300 μL ，此时对乙酰氨基酚浓度为 0.25、0.5、1、2、5、10、20、50 $\mu\text{g/ml}$ ，涡旋 2 min，12,000 r/min 离心 10 min，取上清液二次离心。将二次离心上清液按照 1:3 的比例用纯水稀释，涡旋混匀，进样。以峰面积 - 药物浓度，绘制标准曲线图，得回归方程，标准曲线方程 $A = 6646C + 31019$ ， $R^2 = 0.999$ ，见图 1。

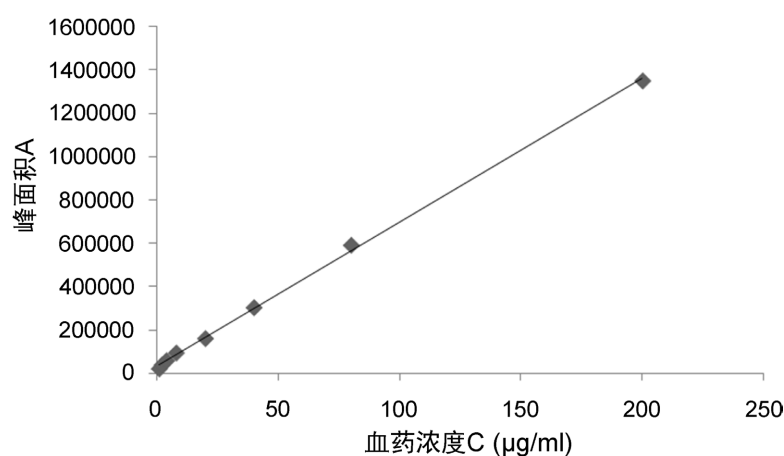


Figure 1. Standard curve of Acetaminophen
图 1. 对乙酰氨基酚标准曲线

3.2. 家兔体内血药浓度的测定

3.2.1. 家兔给药及血样采集

家兔称重，固定于兔架，耳动脉埋置留置针。按照 100 mg 剂量于家兔另一只耳朵耳缘静脉注射给药。分别于给药后 5、10、20、30 min 及 1、1.5、2、2.5、3、3.5 h 取血 1 mL 置于肝素化离心管中，编号待测。留置针中注射肝素氯化钠溶液封管，防止凝血。

3.2.2. 血浆样品处理及测定

血样 3500 r/min 离心 10 min，取 100 μL 血浆置于离心管中。血浆中加入甲醇 300 μL ，涡旋 2 min，12 000 r/min 离心 10 min。取上清液二次离心。将二次离心上清液按照 1:3 的比例用纯水稀释，涡旋混匀，吸取 150 μL 加入进样瓶，进样。

液相条件为：C18 色谱柱(4.6 mm \times 150 mm)，流动相甲醇:水(25:75)，流速 1 ml/min，检测波长 242 nm。

3.2.3. 数据处理

将测定峰面积带入标准曲线方程计算出血药浓度。绘制药时曲线、判断隔室模型，求算消除速率常数 k 、半衰期 $t_{1/2}$ 等药动参数。

4. 结果与讨论

4.1. 实验测定结果

用改进后的实验方法，测得对乙酰氨基酚血药浓度结果，见表 1。

Table 1. Plasma concentration of Acetaminophen

表 1. 对乙酰氨基酚血药浓度测定结果

T (min)	5	10	20	30	60	90	120	150	180	210
C ($\mu\text{g/ml}$)	57.46	43.38	28.52	26.89	13.06	6.85	5.11	3.41	2.85	2.72

4.2. 实验数据处理

绘制药时曲线，见图 2，判别隔室模型，将测得的血药浓度代入药动公式求算消除速率常数 k 、半衰期 $t_{1/2}$ 等药动参数。经过数据分析，用作图法和 AIC 法可以判断在 100 mg 给药剂量下，对乙酰氨基酚溶液家兔静脉给药后血药浓度符合单室模型。

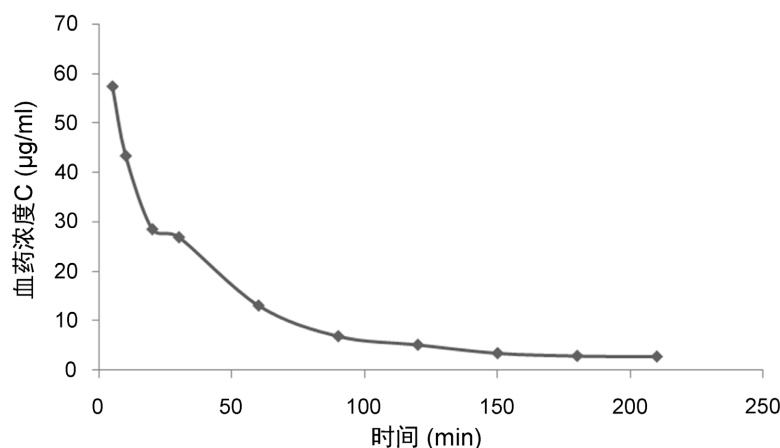


Figure 2. Plasma drug-time curve of Acetaminophen

图 2. 对乙酰氨基酚血药浓度 - 时间曲线

4.3. 讨论

家兔给药后在准确时间点顺利取血，以及血药浓度的准确测定是实验成功的关键。本次实验给家兔耳缘动脉预先埋置留置针，通过留置针快速放血，大大提高了取血操作的速度和简便性，减少血样溶血。而从家兔另一只耳朵耳缘静脉给药，避免了留置针管内残留药物对取样时血药浓度的影响，取样时先舍弃前 5~10 滴血，再将血液留于试管，可避免滞留在留置针中的含药血液对后续样品的影响。摸索改进了血液样品处理方法，舍弃氮气吹干，流动相复溶的方法，采用甲醇两次沉淀血浆蛋白，取上清，加流动相同比例水相稀释，更加简便快捷，便于学生实验操作。最后优化了对乙酰氨基酚血样液相检测条件，提高了液相结果分离度，相对于以前的实验，对乙酰氨基酚血药样品数据稳定性与重现性均显著提高，适合学生实验教学。

本实验后续还有很大的可改进空间。比如筛选对科研兴趣浓厚的同学，在专业教师的指导带教下进行开放性、设计性实验，增加口服给药动物组，计算对乙酰氨基酚的生物利用度。学生自己制订实验方案，可选择家犬、Beagle 犬等非草食动物作为实验动物，撰写实验心得体会，分析实验成败原因。这样

可以充分调动学生的科研兴趣和实验积极性，培养了他们主动学习和团队协作能力，有效激发了学生独立思考、敢想敢为和勇于创新的能力，达到了实验教学培养药学生综合素质和科研创新能力的目的，最终培养科研创新型高水平药学专业人才，使他们在新药研发和药学服务等工作中发挥重要作用[5]。

参考文献

- [1] 刘建平. 生物药剂学与药物动力学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2016.
- [2] 邹豪, 陈琰, 鲁莹. 药物动力学教学实践中常见问题的探讨[J]. 药学实践杂志, 2008, 26(3): 226-227.
- [3] 邹豪, 鲁莹, 陈琰. 构建系统性药动学实验教学体系及实施体会[J]. 药学实践杂志, 2007, 25(2): 107-120.
- [4] 王锐利, 张淑秋, 张丽锋. 生物药剂学与药物动力学实验教学的改革与实践[J]. 山西医科大学学报: 基础医学教育版, 2007, 9(1): 47-49.
- [5] 杨婷婷, 鲁茜, 周雪妍. 生物药剂学与药物动力学实验教学改革探索[J]. 基础医学教育, 2021, 23(2): 101-104.