

绿茶中咖啡因在正常和糖尿病认知功能障碍大鼠体内的药代动力学及药效学分析

刘国旗¹, 刘声菊¹, 王娇², 李莉¹, 李兴¹, 伍庆^{2*}, 潘卫^{1,3*}

(1. 贵州医科大学 医学检验学院, 贵阳 550004;

2. 贵州师范大学 山地环境重点实验室, 贵阳 550001;

3. 贵州医科大学 附属医院 贵州省产前诊断中心, 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 在建立气相色谱法(GC)方法学的基础上, 比较绿茶中咖啡因在正常和糖尿病认知功能障碍大鼠体内的血药浓度, 并验证其对糖尿病认知功能障碍的影响。方法: 采用链脲佐菌素(STZ)一次性腹腔注射(剂量 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)复制糖尿病模型, 模型复制成功后灌胃咖啡因和绿茶浸出液进行干预, 并且每 3 周测定 1 次血糖值, 诱导第 12 周时 Morris 水迷宫试验检测认知功能, 选择 HP-5 色谱柱, 二阶升温程序, 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 分流比 10:1, 氢火焰离子化检测器(FID), 检测器温度和进样口温度均为 $250 \text{ }^\circ\text{C}$, 载气为氮气的色谱条件进行咖啡因在正常和糖尿病认知功能障碍大鼠体内的药代动力学研究, 运用透射电镜观察神经元细胞的超微结构。结果: 咖啡因的线性范围 $1.28 \sim 128 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($R^2 = 0.998$), 最低检测限和最低定量限分别为 $0.7, 1.28 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 日内和日间精密度均 $< 8.0\%$, 提取回收率和方法回收率均 $> 90\%$ 。咖啡因在正常和糖尿病认知功能障碍大鼠体内的药时曲线下面积 (AUC_{0-t}) 分别为 $(46.71 \pm 4.25), (61.2 \pm 5.44) \text{ mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$, 半衰期 ($t_{1/2}$) 分别为 $(2.82 \pm 0.38), (3.71 \pm 0.13) \text{ h}$, 药峰浓度 (C_{max}) 分别为 $(13.25 \pm 2.02), (17.12 \pm 1.08) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 清除率 (CL) 分别为 $(0.43 \pm 0.08), (0.33 \pm 0.07) \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。与模型组比较, 咖啡因组和绿茶组血糖下降、认知能力和神经元细胞超微结构得到改善。结论: 咖啡因在正常和糖尿病认知功能障碍大鼠体内的代谢存在差异, 且具有改善糖尿病认知功能障碍的功效, 这为绿茶和咖啡因临床用于防止糖尿病认知障碍提供了一定理论依据。

[关键词] 绿茶; 咖啡因; 糖尿病认知功能障碍; 药代动力学; 药效学; 盐酸伪麻黄碱; 血脑屏障

[中图分类号] R22; R24; R289; R969.1; R284; R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)11-0099-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181090

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180309.1030.027.html>

[网络出版时间] 2018-3-9 11:55

Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Caffeine from Green Tea in Normal and Diabetic Cognitive Dysfunction Rats

LIU Guo-qi¹, LIU Sheng-ju¹, WANG Jiao², LI Li¹, LI Xing¹, WU Qing^{2*}, PAN Wei^{1,3*}

(1. School of Clinical Laboratory Science, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China;

2. Key Laboratory for Mountainous Environment, Guizhou Normal University,

Guiyang 550001, China; 3. Guizhou Prenatal Diagnostic Center, The Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a gas chromatography (GC) method for comparison of drug

[收稿日期] 20170926(008)

[基金项目] 国家自然科学基金地区基金项目(81560720,81560138);喀斯特地区生物与信息技术协同创新中心项目(黔教合协同创新字[2014]04)

[第一作者] 刘国旗,在读硕士,从事临床检验诊断学生物化学研究,E-mail:794104973@qq.com

[通信作者] *潘卫,博士,教授,从事临床检验诊断学生物化学研究,E-mail:pw6602@sina.com;

*伍庆,硕士,教授,从事分析化学研究,E-mail:wq0851@126.com

concentration in plasma of caffeine in normal and diabetic cognitive dysfunction rats after intragastric administration of green tea extract, and further validate its influence on diabetic cognitive dysfunction. **Method:** Diabetic models were copied by one-time intraperitoneal injection streptozotocin (STZ) with dose of $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, after successful replication of the model, diabetic rats were intervened by gavage of caffeine and green tea extract, respectively; blood glucose value was determined once every three weeks, cognitive function was analyzed with Morris water maze experiment at the 12 week, and then GC was used to study on pharmacokinetics of caffeine in normal and diabetic cognitive dysfunction rats, and transmission electron microscopy was employed to observe ultrastructure of neurons. **Result:** The linear range of caffeine was $1.28\text{-}128 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($R^2 = 0.998$), the minimum test limit and the minimum quantitative limit were $0.7, 1.28 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. The RSD of inter-day and intra-day precision were less than 8.0% , the average method and extraction recoveries were more than 90% . The area under the curve ($\text{AUC}_{0\text{-}t}$) of caffeine in normal and diabetic cognitive dysfunction rats were (46.71 ± 4.25), (61.2 ± 5.44) $\text{mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$, the half-life ($t_{1/2}$) were (2.82 ± 0.38), (3.71 ± 0.13) h, the peak plasma concentration (C_{max}) were (13.25 ± 2.02), (17.12 ± 1.08) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, the clearance (CL) were (0.43 ± 0.08), (0.33 ± 0.07) $\text{L} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, respectively. Compared with the model group, the blood glucose of caffeine group and green tea extract group dropped, their cognitive ability and ultrastructure of neurons were improved. **Conclusion:** Metabolism of caffeine in normal and diabetic cognitive dysfunction rats has difference, and it can improve the diabetic cognitive dysfunction. This study provides a theoretical basis for clinical use of green tea and caffeine in preventing diabetic cognitive dysfunction.

[**Key words**] green tea; caffeine; diabetic cognitive dysfunction; pharmacokinetics; pharmacodynamics; pseudoephedrine hydrochloride; blood-brain barrier

糖尿病脑病是由糖尿病引起的严重慢性并发症,临床上以认知功能障碍为主要表现,轻者学习记忆能力明显下降,重者可发展为痴呆^[1-2]。目前中药治疗糖尿病慢性并发症具有安全有效的优势,且相关机制研究日益广泛且深入,但由于糖尿病脑病的病理生理机制尚不十分清楚,也缺乏明确的药物干预方法,因此积极寻找糖尿病脑病的药物已不容忽视。

我国是茶叶的资源大国,且茶叶一直作为药用植物被人们广泛应用^[3]。现代研究表明饮茶可以降低老年性痴呆的发病率,降低认知能力损伤^[4-5],而咖啡因是茶叶中所含的多种嘌呤碱中最主要的一种,其在茶叶中的质量分数 $1\% \sim 5\%$,并且随着市场经济的深入发展,咖啡因制品在中国也将具有广阔的应用前景^[6]。有研究表明茶叶中咖啡因具有促胰岛素分泌^[7]、降低糖尿病的发生率^[8]等功效。Zeitlin 等^[9]通过研究咖啡因对阿尔茨海默氏症小鼠纹状体和额叶皮层中蛋白激酶 A (PKA),磷酸化环磷腺苷效应元件结合蛋白 (p-CREB),磷酸化细胞外调节蛋白激酶 (p-ERK) 和磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶 (p-JNK) 的影响,发现咖啡因能刺激 PKA 的活性、增加 p-CREB 水平、降低 p-ERK 和 p-JNK 表达,而这些都认为是对大脑有益的变化,表明咖啡因

能改变神经退化和神经元存活之间的平衡,防止认知功能障碍。也有研究表明小剂量的咖啡因能增加海马区 CREB 的表达,提高小鼠认知能力^[10],并且咖啡因能自由通过血脑屏障^[11]。

目前,国内外主要集中在茶叶中咖啡因的含量测定^[12-13]及其单一成分的药理学研究^[9-10,14],关于咖啡因在糖尿病认知功能障碍大鼠体内药代动力学及其与正常大鼠药代动力学差异的研究尚未见报道。故本实验在考察了咖啡因在正常和糖尿病认知功能障碍大鼠体内药代动力学差异的基础上,进一步探讨其在糖尿病认知功能障碍发生与发展过程中的药效学作用,为临床用药提供理论依据。

1 材料

H39424E 型移液枪, H39212E 型移液枪和 I28407E 型移液枪(德国 Eppendorf 公司); HP-6890 型气相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司), AL-204 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司), 稳豪倍易型血糖仪[强生(中国)医疗器材有限公司], VORTEX-5 型涡旋振荡器(海门市其林贝尔有限公司), ALZ15H006 型低温冷冻高速离心机(美国 Beckman 公司), Morris 水迷宫(中国医学科学院药物研究所)。

咖啡因、盐酸伪麻黄碱对照品(中国食品药品

检定研究院,批号分别为 171215-201211, 171237-201510,纯度均 $\geq 99.6\%$),链脲佐菌素(STZ,美国 Sigma 公司),绿茶粉末(贵州省分析测试研究院,批号 FT1522003,过 60 目筛),水为蒸馏水,甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

雄性 SPF 级 SD 大鼠 48 只,体质量(200 ± 10) g,由贵州医科大学动物中心提供,合格证号 SCXK(黔)2012-0001,经贵州医科大学实验动物伦理委员会批准,批准编号 1702093。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 HP-5 色谱柱(0.32 mm \times 30 m, 0.25 μm),程序升温(初始温度 100 $^{\circ}\text{C}$ 保持 5 min,以速率 30 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至 220 $^{\circ}\text{C}$,保持 5 min;以速率 30 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至 250 $^{\circ}\text{C}$,保持 10 min),进样口温度 250 $^{\circ}\text{C}$,流速 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,分流比 10:1,氢火焰离子化检测器(FID),检测器温度 250 $^{\circ}\text{C}$,载气为氮气,进样量 1 μL 。

2.2 样品制备 称取绿茶粉末 10.0 g,加入 20 倍量 80 $^{\circ}\text{C}$ 的水,摇匀,待冷却,过滤,摇匀,取续滤液供大鼠灌胃使用,取滤液 1 mL 挥干,残渣用甲醇溶解并定容至 1 mL,过 0.45 μm 微孔滤膜,取 1 μL 进样分析^[15-16]。

2.3 对照品溶液配制 称取咖啡因对照品适量,加甲醇稀释成质量浓度为 1.28 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的贮备液,取该贮备液适量,用甲醇稀释成质量浓度分别为 128.00, 64.00, 25.60, 12.80, 6.40, 2.56, 1.28, 0.64, 0.256 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列对照品溶液。

2.4 内标溶液配制 称取盐酸伪麻黄碱对照品适量,加甲醇稀释成 1.02 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 内标母液,精密吸取该母液 200 μL 置于 2 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,得 0.102 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 内标液。

2.5 样品的前处理

2.5.1 血浆样品 取血浆 100 μL 于离心管中,加入内标液 10 μL 及 4 倍量甲醇沉淀蛋白,涡旋 2 min,离心(12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min,下同),取上清

液,40 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干,加入甲醇 100 μL 复溶,离心,取上清液 1 μL 直接进样分析。

2.5.2 脑组织样品 取脑组织 0.6 g,加乙酸乙酯 2.0 mL 制备匀浆,涡旋混匀,离心后取上清液,加入甲醇 2.0 mL 及内标液 10 μL ,涡旋混匀,离心后取上清液,40 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干,残渣加甲醇 100 μL 复溶,离心后取上清液 1 μL 直接进样分析。

2.6 糖尿病认知功能障碍模型的复制及药物干预

2.6.1 糖尿病模型复制 将 SD 大鼠适应性饲养 1 周,禁食 12 h,随机分为正常组($n = 16$)与糖尿病组($n = 32$),模型组大鼠一次性腹腔注射 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液(pH 4.2,下同)溶解的 STZ(给药剂量 50 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)^[17-18],正常组大鼠则注射等量 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液,72 h 后取尾静脉血测定血糖并持续测定 3 周,72 h 后空腹血糖值 $\geq 16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 且连续 3 周空腹血糖值 $\geq 16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,视糖尿病大鼠模型复制成功^[19]。

2.6.2 药物干预 糖尿病大鼠模型建立成功后,将糖尿病组大鼠分为模型组($n = 16$),咖啡因组($n = 8$)和绿茶组($n = 8$),第 4 周至第 12 周,咖啡因组灌胃咖啡因溶液(按咖啡因计,剂量 20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),绿茶组灌胃绿茶浸出液(按咖啡因计,剂量 20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),正常组和模型组灌胃等量的生理盐水。

2.6.3 血糖值测定 药物干预后每 3 周测定血糖值 1 次,见表 1,结果表明与模型组比较,绿茶组随着时间的延长血糖下降效果更加显著;咖啡因组至第 6 周降糖效果不明显,至第 9 周血糖下降明显,并且随着时间的延长降血糖效果更显著。

2.6.4 Morris 水迷宫试验 诱导第 12 周时采用 Morris 水迷宫试验检测认知功能,见表 1。结果与正常组比较,模型组大鼠的逃避潜伏期时间明显延长,穿越次数明显减少;与模型组比较,咖啡因组和绿茶组大鼠的逃避潜伏期缩短,穿越次数增加。

2.6.5 透射电镜观察 Morris 水迷宫试验检测后

表 1 药物干预后大鼠空腹血糖的测定及各组大鼠的 Morris 水迷宫试验($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Fasting blood glucose after drug intervention in rats and Morris water maze test of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	空腹血糖/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$			潜伏期/s	穿越数/次
			第 6 周	第 9 周	第 12 周		
正常	16	-	4.31 \pm 0.40	4.11 \pm 0.36	4.07 \pm 0.41	11.22 \pm 3.98	8.04 \pm 1.95
模型	16	-	26.79 \pm 0.77 ¹⁾	25.66 \pm 1.46 ¹⁾	26.49 \pm 1.03 ¹⁾	38.76 \pm 13.05 ¹⁾	2.49 \pm 1.06 ¹⁾
咖啡因	8	20	25.25 \pm 1.95	20.52 \pm 1.89 ²⁾	15.12 \pm 2.11 ³⁾	18.55 \pm 4.19 ³⁾	6.33 \pm 1.57 ³⁾
绿茶	8	20	22.69 \pm 2.33 ²⁾	13.94 \pm 2.22 ³⁾	8.25 \pm 1.90 ³⁾	17.26 \pm 6.26 ³⁾	7.61 \pm 2.01 ³⁾

注: ¹⁾ 与同时点正常组比较 $P < 0.01$; ²⁾ 表示与同时点模型组比较 $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ 。

将正常组和模型组各自平均分为 2 组, 每组 8 只, 其中各 1 组分别正常组和模型组, 另 1 组正常组和模型组用于咖啡因药代动力学研究。咖啡因组和绿茶组采用 4% 多聚甲醛心脏灌注固定取脑组织, 2.5% 戊二醛固定脑组织, 制作超薄组织切片, 利用透射电子显微镜观察神经元细胞超微结构, 见图 1。

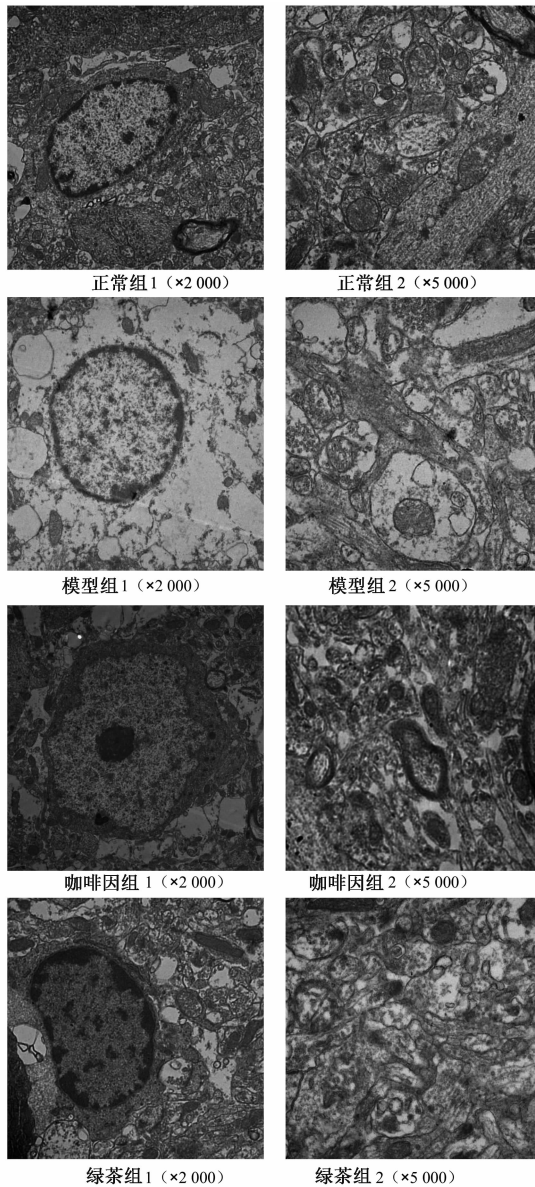
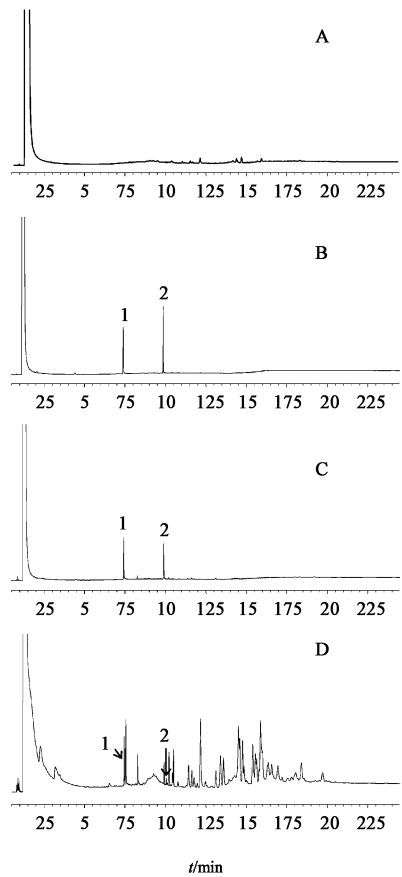


图 1 药物干预后各组大鼠海马神经元的透射电镜
Fig. 1 Transmission electron microscopy of hippocampal neurons in rats from each group after drug intervention

由图 1 可知, 结果表明正常组大鼠海马神经元细胞核形态规则, 核内染色质丰富且分布均匀, 胞浆内细胞器丰富, 内质网分布规则, 线粒体数量较多且排列紧密, 突触数量较多且形态完整, 突触小泡丰富; 与正常组大鼠比较, 模型组大鼠海马神经元细胞核形态不规则, 核内染色质分布不均、颗粒化, 内质

网呈囊泡化扩张, 线粒体肿胀呈空泡化状, 神经元突触数量明显减少, 突触前后膜肿胀, 突触间隙模糊不清, 突触小泡稀疏; 与模型组比较, 咖啡因组和绿茶组大鼠神经元细胞结构有所改善, 细胞形态结构较完整, 核内染色质均匀, 胞浆内细胞器较多, 内质网分布规则, 线粒体数量较多, 而突触数量增多且结构较完整, 突触小泡增多。

2.7 专属性试验 分别取空白血浆 100 μL , 空白血浆 100 μL 加适量咖啡因对照品溶液及内标液, 糖尿病认知功能障碍大鼠血浆样品 (1.5 h) 100 μL , 3 份样品均按 2.5.1 项下方法操作, 脑组织样品按 2.5.2 项下方法操作, 分别吸取 1 μL 进样分析, 见图 2。结果表明在本实验条件下可见内标物质、血浆中内源性物质及其代谢物均不干扰咖啡因的检测。



A. 空白血浆; B. 空白血浆 + 对照品 + 内标; C. 1.5 h 血浆样品 + 内标物; D. 脑组织 + 内标物; 1. 盐酸伪麻黄碱 (内标物); 2. 咖啡因
图 2 绿茶浸出液灌胃后血浆和脑组织的 GC

Fig. 2 GC chromatograms of rat plasma and brain tissue after intragastric administration of green tea extract

2.8 线性关系考察及最低定量限 取空白血浆 100 μL 共 7 份, 分别加入 2.3 项下咖啡因系列对照品溶液 (128.00 ~ 1.28 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 100 μL , 按 2.5.1 项下方法操作, 得 7 个不同质量浓度的空白血浆质控

样品,分别吸取 1 μL 进样分析,记录峰面积,以待测物与内标物峰面积比为纵坐标,质量浓度为横坐标,采用 SPSS 17.0 软件中加权最小二乘法计算,得线性回归方程 $Y = 0.037X + 0.027$ ($R^2 = 0.998$),线性范围 1.28 ~ 128 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,最低检测限 ($S/N = 3$) 和最低定量限分别为 0.7, 1.28 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.9 精密度试验和准确度试验 精密吸取空白血浆 100 μL , 分别加入质量浓度为 2.56, 25.60, 102.40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的咖啡因对照品溶液 100 μL , 得低、中、高不同质量浓度血浆质控样品,按 2.5.1 项下方法处理,每个浓度平行制备 6 份,进样分析,连续测定 3 d,计算精密度和准确度,得咖啡因日内精密度 RSD 0.8% ~ 3.1%, 日间精密度 RSD 1.2% ~ 5.0%, 准确度 97.5% ~ 101.2%, 表明本方法的精密度和准确度均符合生物样品检测要求。

2.10 稳定性试验 按 2.9 项下步骤操作,将所得的血浆质控样品在室温放置 2 d 后放入 14 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱 2 d, 待冷却至室温后再转入 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻 2 d, 取出冷却至室温,进样分析,通过与新配制血浆质控样品比较,计算待测物与内标物峰面积比的 RSD 1.1% ~ 3.5%, 结果表明咖啡因在此实验条件下稳定性良好。

2.11 回收率考察 按 2.9 项下步骤制备血浆质控样品,另取相应质量浓度的混合对照品溶液,进样分析,通过咖啡因与内标物峰面积比计算提取回收率,根据标准曲线计算实际测定药物质量浓度,计算方法回收率。结果咖啡因的提取回收率 95.5% ~ 98.1%, 方法回收率 96.3% ~ 100.2%, 表明回收率符合生物样品检测要求。

2.12 药代动力学分析 将用于药代动力学研究的模型组和正常组大鼠灌胃绿茶浸出液(按咖啡因计,给药剂量 20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 灌胃前给大鼠进行编号,并分别在给药前和给药后 0.167, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3.5, 5, 7, 9 h 经眼后静脉丛取血 0.3 mL 置于肝素抗凝管中,经 3 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后取上层血浆, -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用,血浆样品按 2.5.1 项下方法处理,采用 GC 测定正常组和模型组大鼠各时间点血浆样品中咖啡因的质量浓度,经 GraphPad Prism 7 软件分析得到咖啡因的平均血药浓度-时间曲线,见图 3。利用 DAS 2.0 软件计算咖啡因的药代动力学参数,见表 2。

3 讨论

3.1 实验条件的优化 在色谱柱的选择上,本实验考察了 HP-1, HP-INNOWax, HP-5 共 3 种毛细管色

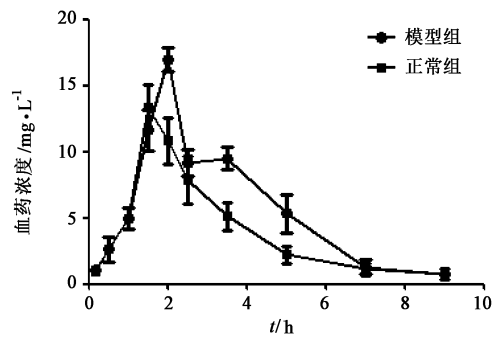


图 3 绿茶浸出液灌胃后血浆中咖啡因的平均血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 3 Mean plasma concentration-time curves of caffeine after intragastric administration of green tea extract ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

表 2 绿茶浸出液灌胃后血浆中咖啡因的药代动力学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Table 2 Pharmacokinetic parameters of caffeine in plasma after intragastric administration of green tea extract ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

参数	正常组	模型组
$AUC_{0-4} / \text{mg}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$	46.71 \pm 4.25	61.20 \pm 5.44 ¹⁾
$AUC_{0-\infty} / \text{mg}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$	48.22 \pm 2.97	64.20 \pm 3.13 ¹⁾
$t_{1/2} / \text{h}$	2.82 \pm 0.38	3.71 \pm 0.13 ¹⁾
$C_{\text{max}} / \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	13.25 \pm 2.02	17.12 \pm 1.08 ¹⁾
$T_{\text{max}} / \text{h}$	1.5	2.0 ¹⁾
V_d / L	1.74 \pm 0.19	1.75 \pm 0.23
$CL / \text{L}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	0.43 \pm 0.08	0.33 \pm 0.07 ¹⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

谱柱,结果表明使用 HP-5 色谱柱时待测物质及内标物的峰形、分离效果和响应值均优于 HP-INNOWax 和 HP-1。在内标物的选择上,本实验考察了盐酸小檗碱、水杨酸甲酯和盐酸伪麻黄碱,结果在本实验色谱条件下盐酸伪麻黄碱与咖啡因及血浆中内源性物质能达到很好的分离。

3.2 实验剂量的选择 在灌胃剂量的选择上,有研究表明每天给予剂量分别为 20, 60 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的咖啡因灌胃 18 d 后观察大鼠海马神经元形态学的变化^[20], 咖啡因按剂量 20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃后大鼠海马神经髓鞘结构致密完整,而 60 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 咖啡因灌胃后神经髓鞘发生轻微松懈与破坏,故本实验选择咖啡因剂量为 20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

3.3 样品前处理方法 本课题前期研究发现咖啡因入血后主要以原型存在,不需要复杂的步骤进行处理,故本实验采用甲醇直接去蛋白。

3.4 药代动力学 由图 3 可知,咖啡因口服后可在胃肠道快速吸收入血,并且在实验剂量下咖啡因表现出了非线性药动学的特征,在糖尿病认知障碍大鼠体内 2.5 ~ 4 h 出现清除延迟,而导致这一变异的

原因可能是胃排空延迟^[21]。药动学参数显示,与正常大鼠比较,糖尿病大鼠的药时曲线下面积(AUC_{0-t}),半衰期($t_{1/2}$),达峰时间(T_{max})和药峰浓度(C_{max})增加,并且清除率(CL)降低,这与文献[22-23]报道一致,而出现这些差异的原因可能是由于糖尿病是代谢性疾病,机体代谢出现紊乱,而在机体代谢紊乱时肝脏中代谢药物的酶活性降低,肝血流量减少,首过效应减弱,生物利用度提高;线粒体功能障碍,肠道菌群结构改变,导致药物吸收消化减慢;另外糖尿病常伴随不同程度的肾损伤,导致药物排泄减慢,药物清除率下降。

3.5 血脑屏障 本实验结果显示咖啡因可经过血脑屏障,与文献[21]报道一致,因为咖啡因首过消除效应较弱,所以吸收后能完全地进入全身组织并且自由通过血脑、胎盘、血脑屏障。另外也有报道显示糖尿病状态下肝血流量减少,也可使首过效应减弱^[23]。虽然本实验结果显示咖啡因可经过血脑屏障并改善糖尿病认知功能障碍,但这不足以说明只是茶叶中咖啡因发挥了神经保护作用,因为中药是一个复杂的体系,其药效是多种化学成分相互作用而产生的综合效果,因此,探讨是茶叶中咖啡因或是咖啡因与其他成分联合改善认知障碍,其他成分是否可以通过血脑屏障,这些将是下一步需要研究的内容。

[参考文献]

[1] DONG S, LI G, ZHENG D, et al. A novel role for the calcium sensing receptor in rat diabetic encephalopathy [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35(1): 38-50.

[2] Samarghandian S, Azimi-Nezhad M, Samini F. Ameliorative effect of saffron aqueous extract on hyperglycemia, hyperlipidemia, and oxidative stress on diabetic encephalopathy in streptozotocin induced experimental diabetes mellitus [J]. *Biomed Res Int*, 2014, doi:10.1155/2014/920857.

[3] Yuvaraja M, Reddy N R, Kumar P M, et al. Thermoreversible gel for intrapocket delivery of green tea catechin as a local drug delivery system: an original research [J]. *J Adv Pharm Technol Res*, 2016, 7(4): 139-143.

[4] 丁辉, 史丽颖, 陈瑶, 等. 葫芦茶叶抗过敏性哮喘组分分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(9): 30-35.

[5] CHEN Z M, LIN Z. Tea and human health: biomedical functions of tea active components and current issues [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2015, 16(2): 87-102.

[6] 徐帅, 李焰, 王莹莹, 等. 实验室中一种高纯度咖啡因

提取方法的研究 [J]. *当代化工*, 2013, 43(10): 1364-1366.

[7] 陈琳, 喻明, 夏娟, 等. 咖啡对糖尿病大鼠胰岛素分泌、敏感性及氧化应激影响 [J]. *中南药学*, 2013, 11(6): 424-428.

[8] Salazar-Martinez E, Willett W C, Ascherio A, et al. Coffee consumption and risk for type 2 diabetes mellitus [J]. *Ann Intern Med*, 2004, 140(1): 1-8.

[9] Zeitlin R, Patel S, Burgess S, et al. Caffeine induces beneficial changes in PKA signaling and JNK and ERK activities in the striatum and cortex of Alzheimer's transgenic mice [J]. *Brain Res*, 2011, 1417: 127-136.

[10] 周赛君, 何金彩, 王小同, 等. 咖啡因对小鼠空间学习记忆能力及有关脑区记忆相关蛋白 CREB 表达的影响 [J]. *中国临床神经科学*, 2008, 16(2): 139-144.

[11] CHEN X, Ghribi O, Geiger J D, et al. Caffeine protects against disruptions of the blood-brain barrier in animal models of Alzheimer's and Parkinson's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2010, 20(Suppl 1): S127-S141.

[12] 陈鹤立. 高校液相色谱法测定茶叶中茶多酚及咖啡因含量 [J]. *福建医药杂志*, 2006, 28(1): 80-81.

[13] 邱涤非, 肖晓瑶, 李东. 超临界流体萃取和气相色谱质谱法测定中国茶中咖啡因含量 [J]. *色谱*, 1995, 13(6): 450-452.

[14] 李海霞, 陈榕, 周丹, 等. 咖啡因的合成及其药理作用的研究进展 [J]. *华西药学杂志*, 2011, 26(2): 182-187.

[15] 周志. 茶叶有效成分复合提取工艺研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2001.

[16] 李再兵. 绿茶主要品质成分的浸出动态及其与滋味感官评分的相关性研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2002.

[17] 潘卫, 吴松, 李兴, 等. 糖尿病大鼠胰腺差异表达蛋白质组分析 [J]. *基础医学与临床*, 2009, 29(1): 38-41.

[18] 赵芳, 蒋朝晖, 杨国珍, 等. 不同剂量链脉佐菌素建立 1 型糖尿病大鼠模型 [J]. *贵阳医学院学报*, 2010, 35(1): 22-25.

[19] 汪峰, 杨国珍, 刘宓, 等. 链脉佐菌素诱导的糖尿病大鼠模型稳定性观察 [J]. *贵阳医学院学报*, 2012, 37(1): 40-42.

[20] 黄旭, 李晨曦, 汪越, 等. 咖啡因对大鼠海马神经元形态学的影响 [J]. *解剖科学进展*, 2014, 20(1): 5-8.

[21] 陈尧, 周宏灏. 咖啡因体内代谢及其应用的研究进展 [J]. *生理科学进展*, 2010, 41(4): 256-260.

[22] 刘晓, 汤道权, 印晓星, 等. 芦丁在正常及糖尿病肾病大鼠体内药代动力学研究 [J]. *徐州医学院学报*, 2009, 29(11): 708-712.

[23] 李晶晶, 谈景福, 杨杰, 等. LC-MS 法研究科罗索酸在正常及糖尿病模型大鼠血浆中的药代动力学 [J]. *中国医科大学学报*, 2014, 45(1): 84-87.

[责任编辑 刘德文]