

咖啡因的大鼠在体肠吸收动力学研究

张 娴, 邹 豪, 高 申*

(第二军医大学药学院药剂学教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的:**探讨咖啡因在大鼠各肠段的吸收动力学特征。**方法:**采用大鼠在体小肠回流装置,在浅麻醉状态下,主要从吸收部位、药物浓度、pH值等3方面对咖啡因的肠段吸收特性进行研究。以UV法和HPLC法分别测定酚红和咖啡因的含量。**结果:**咖啡因在小肠的吸收速率常数(K_a)在药物浓度为2.5、5、10、25 mg/L时分别为0.252、0.247、0.304、0.232 h^{-1} ;在pH值为7.8、6.8、5.4时分别为0.267、0.274、0.247 h^{-1} ;在十二指肠、空肠、回肠和结肠时分别为0.112 0、0.099 6、0.095 5、0.069 5 h^{-1} 。**结论:**一定范围的药物浓度对咖啡因 K_a 无影响;在pH7.8~5.4范围内,药物的 K_a 无显著变化;药物在十二指肠、空肠和回肠的吸收较好,在结肠的吸收较差;咖啡因在肠道的吸收呈一级动力学过程,吸收机制为被动扩散。

[关键词] 咖啡因;肠吸收;药代动力学

[中图分类号] R 971.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)03-0318-04

In vivo intestinal absorption kinetics of caffeine in rats

ZHANG Xian, ZOU Hao, GAO Shen* (Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the *in vivo* absorption kinetics of caffeine at different intestine segments in rats. **Methods:** The rat intestine was cannulated for *in situ* recirculation. The absorption kinetics of caffeine, including the absorption segments of intestine, drug concentration and pH value, were investigated in all the rats under light anesthesia. Ultraviolet light spectrometry and high-performance liquid chromatography were used to determine the concentrations of phenol red and caffeine, respectively. **Results:** The absorption rate constants (K_a) of caffeine in the small intestine at the concentrations of 2.5, 5, 10 and 25 $mg \cdot L^{-1}$ were 0.252, 0.247, 0.304 and 0.232 h^{-1} , respectively. The K_a values at pH of 7.8, 6.8, and 5.4 were 0.267, 0.274 and 0.247 h^{-1} , respectively. The K_a values in the duodenum, jejunum, ileum, and colon were 0.112, 0.099, 0.095 and 0.069 5 h^{-1} , respectively. **Conclusion:** Concentration and pH value have no obvious effect on the absorption kinetics of caffeine. Caffeine can be better absorbed in the duodenum, jejunum and ileum than in the colon. The absorption of caffeine in the intestine is a first-order process through passive diffusion mechanism.

[KEY WORDS] caffeine; intestinal absorption; pharmacokinetics

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(3): 318-321]

咖啡因(caffeine)为中枢兴奋药,能提高细胞内环磷腺苷的含量^[1]。其作用包括:(1)兴奋大脑皮质,振奋精神,提高其注意力、自信心以及工作效率和积极性;(2)增强警觉性和减少疲乏感,提高警惕性和维持持久的工作能力;(3)增强识别能力,缩短快速与选择反应时间,并能提高瞬时口头记忆力。英、美、法等国空军飞行人员在近几次高技术条件下的局部战争中(马岛战争、海湾战争等)均使用了咖啡因等中枢兴奋药以抗疲劳,这已成为战时卫生保障的一项重要措施。由于咖啡因体内消除半衰期较短(4~5 $h^{[2]}$),口服需1 d内多次给药,目前国外已有咖啡因口服缓释制剂的报道^[3]。但有关咖啡因的动物肠吸收动力学研究尚未见有报道。本研究选用大鼠在体灌流的方法建立了咖啡因大鼠肠吸收模型,采用HPLC法测定咖啡因含量,并对其吸收特性进行研究,以期对咖啡因制剂的研究提供生物药剂学依据。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂、动物 高效液相色谱仪(包括515泵、916二极管阵列检测器、Millennium工作站,美国Waters公司);CARY 100紫外分光光度仪(美国Varianc公司);CS501型超级恒温水浴(上海浦东荣丰科学仪器有限公司);HL-2B数显恒流泵(上海精科实业有限公司)。

咖啡因原料药(山东新华制药股份有限公司,批号:0507448);酚红(国药集团上海化学试剂有限公司);Kreb-ringer营养液(简称K氏液,自制,每

[基金项目] 军队特需药品临床前研究(2006军新034)。Supported by Fund for Preclinical Study on Military Drugs (2006PLA034).

[作者简介] 张 娴,硕士生。

* Corresponding author. E-mail: liullk@online. sh. cn

1 000 ml内含氯化钠 7.80 g,氯化钾 0.35 g,碳酸氢钠 1.37 g,磷酸二氢钠 0.32 g,氯化镁 0.02 g,葡萄糖 1.40 g);乙腈和四氢呋喃为色谱纯试剂,其他试剂均为分析纯。

雄性 SD 大鼠,体质量(250±20) g,由第二军医大学实验动物研究中心提供[动物许可证号:SCXK(沪)2003-0003]。

1.2 肠循环液中酚红的含量测定^[4] 酚红标准曲线的建立:精密吸取用 K 氏液配制的浓度分别为 10、20、30、40、50 mg·L⁻¹的酚红对照品溶液各 0.5 ml,分别加 0.2 mol·L⁻¹氢氧化钠溶液 5 ml。以 0.2 mol·L⁻¹氢氧化钠溶液为参比,在 558 nm 处测定光密度,以光密度 *D* 对酚红浓度 *C*(mg·L⁻¹)进行线性回归,得标准曲线方程: $D=0.0176C-0.01$, $r=0.9999$ ($n=5$),结果表明酚红 10~50 mg·L⁻¹的浓度范围内线性关系良好。

1.3 肠循环液中咖啡因浓度测定

1.3.1 色谱条件^[5] Kromasil C18 色谱柱(4.6 mm×150 mm,5 μm);流动相为 0.01 mol/L 醋酸钠-乙腈-四氢呋喃(体积比为 955:25:20),用冰醋酸调节 pH=4.5;流速 1.0 ml/min;检测波长 275 nm;进样量 20 μl。分别取咖啡因对照液及供试液,在色谱条件下测定,色谱图见图 1。

试液的主峰保留时间与咖啡因对照液一致,空白肠液对测定无干扰。

1.3.2 咖啡因肠循环液标准曲线的绘制 精密称取咖啡因原料药,用含酚红 20 mg·L⁻¹的 K 氏液溶解并稀释成含咖啡因 0.25、0.5、1.0、2.5、10.0、25.0 mg·L⁻¹的系列溶液,于上述色谱条件下测定,以峰面积 *S* 对浓度 *C* 进行线性回归,得标准曲线方程: $S=53312C+14674$, $r=0.9995$ ($n=6$),表明咖啡因在 0.25~25.0 mg·L⁻¹的浓度范围内线性关系良好。

1.3.3 回收率实验 精密称取咖啡因原料药,用含酚红 20 mg·L⁻¹的 K 氏液溶解并稀释成含咖啡因 0.25、2.5、25.0 mg·L⁻¹的溶液,于上述色谱条件下测定。低(0.25 mg·L⁻¹)、中(2.5 mg·L⁻¹)、高(25.0 mg·L⁻¹)3 个浓度的方法回收率分别为 98.75%、99.26%、99.37%($n=3$)。

1.3.4 精密度实验 精密称取咖啡因原料药,用含酚红 20 mg·L⁻¹的 K 氏液溶解并稀释成含咖啡因 0.25、2.5、25.0 mg·L⁻¹的溶液,于 1 d 内分别连续测定 3 次,计算日内精密度,于 3 d 内分别测定 1 次,计算日间精密度。低(0.25 mg·L⁻¹)、中(2.5 mg·L⁻¹)、高(25.0 mg·L⁻¹)3 个浓度的日内 RSD 分别为 1.32%、1.01%、1.08%,日间 RSD 分别为 1.63%、1.31%、2.16%($n=3$)。

1.3.5 检测限 本法测定肠循环液中咖啡因的最低定量限为 50.6 ng/ml,最低检测限为 1.012 ng($S/N=3$)。

1.4 大鼠在体肠吸收实验

1.4.1 肠吸收实验^[6,7] 将实验前禁食 18 h 的大鼠称重后,按 4 ml/kg 的剂量腹腔注射戊巴比妥钠溶液(10 g·L⁻¹)麻醉大鼠,麻醉后将大鼠背位固定于手术台板上,保持 37℃ 体温,沿腹部正中线切开腹部(约 3 cm)。对需要考察的部位,在两端剪切后插管,结扎,先用少量 37℃ 的生理盐水冲洗肠段,再用空气将生理盐水排净。取供试液(预热至 37℃)100 ml,以 5 ml·min⁻¹循环 10 min 后,将流速调为 2.5 ml·min⁻¹,分别于回流 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h 取样 2 ml,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,同时补充等量的等温酚红溶液,分别测定咖啡因和酚红的浓度。吸收百分率通过测定实验前后供试液中药物浓度的变化计算药物总量的减少值,求算小肠对药物的吸收量。由于小肠在吸收药物的同时也吸收水分,因此在供试液中加入不被肠壁吸收的酚红后,根据酚红浓度的变化校正供试液体积的变化。公式如下:

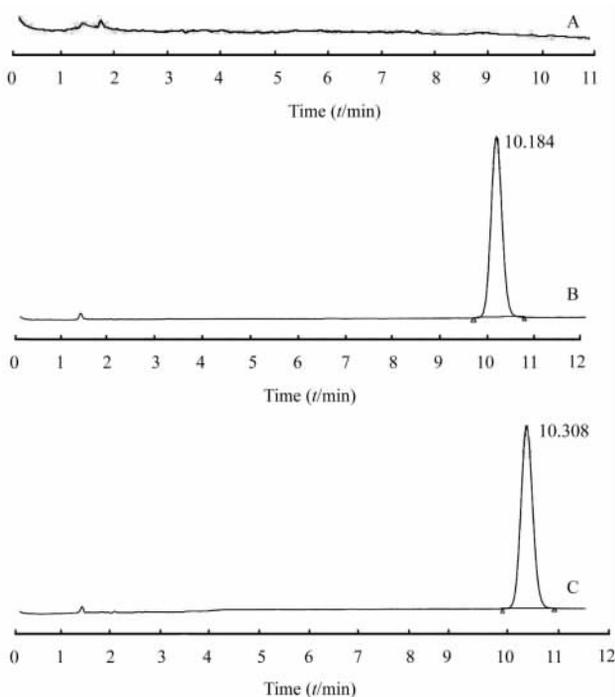


图 1 空白肠液(A)、咖啡因对照液(B)和供试液(C)的色谱图
Fig 1 HPLC chromatograms of blank circulation solution(A), caffeine(B) and sample solution(C)

结果表明,咖啡因的保留时间约为 10.2 min,供

$$\text{吸收百分率} = \frac{C_0 V_0 - (C_0' V_0 / C_1') \times C_1}{C_0 V_0} \times 100\%$$

式中: C_0 为药物的初始浓度; C_1 为不同时间回流液中的药物浓度; C_0' 为酚红的初始浓度; C_1' 为不同时间回流液中的酚红浓度; V_0 为供试液初始体积。根据酚红浓度计算出供试液的体积, 根据每一时间段药物浓度和供试液体积的变化计算出肠循环中的剩余药量 X , 以 $\ln X$ 对取样时间作图得一直线, 由直线的斜率求出吸收速率常数 (K_a)。

分段考察的各肠段区间如下: 十二指肠段自幽门 1 cm 处开始往下 10 cm 止; 空肠段自幽门 15 cm 起往下 10 cm 止; 回肠段自盲肠上行 20 cm 开始往下 10 cm 止; 结肠段从盲肠后端开始往下 10 cm 止。整肠段考察自十二指肠上端起至回肠下端止。

1.4.2 药物浓度对肠吸收的影响 精密量取咖啡因标准储备液 ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 适量, 精密加入酚红标准储备液 ($0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 20 ml, 用 K 氏液稀释至 100 ml, 得 2.5、5.0、10.0、25.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的供试液, 分别进行整肠段回流实验。

1.4.3 介质 pH 值对肠吸收的影响 分别用稀盐酸和稀氢氧化钠调节 25.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 供试液的 pH 值为 7.8、6.8、5.4, 进行整肠段回流实验。

1.4.4 大鼠肠道各区段吸收情况的考察 用 25.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 供试液分别在十二指肠、空肠、回肠和结肠 4 个肠段回流, 考察大鼠各肠段的吸收情况。

1.5 统计学处理 测定结果以及计算结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用方差分析 (One-Way ANOVA) 比较咖啡因在不同剂量之间、不同吸收部位之间、不同 pH 之间是否存在显著性差异。当总体上存在显著性差异, 通过 SNK- q 法检验来确定显著性差异具体存在于哪个吸收部位之间。

2 结果

2.1 药物浓度对吸收的影响 结果见表 1、表 2。结果表明, 不同药物浓度下的 K_a 值差异无显著性, 在 2.5~25.0 mg/L 浓度范围内药物在小肠的 K_a 值没有影响。以小肠内剩余药量的对数 $\ln X$ 对取样时间 t 作线性回归, 所得直线的相关系数 r 值均大于 0.99。

2.2 pH 值对药物吸收的影响 咖啡因分别在 pH 为 5.4、6.8、7.8 肠循环液中的 K_a 值和吸收百分率结果见表 3, 不同 pH 条件下 K_a 值的方差分析结果见表 4。结果表明 3 种 pH 值的肠循环液的 K_a 值差异无显著性, pH 值在 5.4~7.8 对药物在小肠的 K_a 值没有影响。

表 1 药物浓度对咖啡因小肠 K_a 值和吸收百分率的影响

Tab 1 Effects of caffeine concentrations on K_a and absorption rate in rat small intestine

($n=3, \bar{x} \pm s$)			
Concentration ($\rho_B/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	$K_a (\text{h}^{-1})$	r	Absorption rate (%)
25	0.232±0.045	0.998 0	48.76±7.10
10	0.304±0.109	0.998 8	57.98±14.46
5.0	0.247±0.088	0.997 1	50.30±12.47
2.5	0.252±0.021	0.996 0	52.77±4.22

表 2 不同浓度咖啡因的小肠 K_a 值的方差分析结果

Tab 2 ANOVA result of absorption rate constant of caffeine at different concentrations

Source of variance	SS	df	MS	F	P
Treatment	0.008 675	3	0.002 892	0.517 826	>0.05
Individual	0.044 672	8	0.005 584		
Total	0.053 347	11			

$$F_{1-0.05(3,8)} = 4.07$$

表 3 不同 pH 值对咖啡因小肠 K_a 值和吸收百分率的影响

Tab 3 Effects of different pH values on K_a and absorption rate of caffeine in rat small intestine

($n=3, \bar{x} \pm s$)			
pH	$K_a (\text{h}^{-1})$	r	Absorption rate (%)
6.8	0.274±0.024	0.998 7	55.89±2.16
7.8	0.267±0.018	0.998 9	54.05±3.58
5.4	0.247±0.050	0.998 8	52.28±5.42

表 4 不同 pH 下咖啡因的小肠 K_a 值的方差分析结果

Tab 4 ANOVA result of absorption rate constant of caffeine at different pH values

Source of variance	SS	df	MS	F	P
Treatment	0.001 136	2	0.000 568	0.498 155	>0.05
Individual	0.006 843	6	0.001 14		
Total	0.007 979	8			

$$F_{1-0.05(2,6)} = 5.14$$

2.3 各肠段药物吸收能力的比较 大鼠在体肠回流 3 h 后, 不同肠段的 K_a 值和吸收百分率结果见表 5, 对各肠段 K_a 值的方差分析结果见表 6, 各肠段两两比较 q 检验结果见表 7。结肠段的 K_a 值与其他肠段比较显著减小 ($P < 0.05$), 十二指肠、空肠和回肠的 K_a 值之间无显著性差异。

表5 咖啡因在大鼠不同肠段的 K_a 值和吸收百分率Tab 5 K_a and absorption rate of caffeine at various intestinal segments in rats $(n=6, \bar{x} \pm s)$

Different intestine segments	$K_a(h^{-1})$	r	Absorption rate(%)
Duodenum	0.112 0±0.027	0.959 6	31.62±6.72
Jejunum	0.099 6±0.020	0.997 1	24.94±4.86
Ileum	0.095 5±0.018	0.994 2	26.05±3.89
Colon	0.069 5±0.008	0.997 2	19.55±3.62

表6 咖啡因在不同肠段的小肠

 K_a 值的方差分析结果

Tab 6 ANOVA result of absorption rate constant of caffeine at different intestine segments

Source of variance	SS	df	MS	F	P
Treatment	0.005 76	3	0.001 920	5.077 7	<0.01
Individual	0.007 562	20	0.000 378		
Total	0.013 322	23			

 $F_{1-0.01(3,20)}=4.94$

表7 不同肠段两两比较的 SNK 检验结果

Tab7 SNK result of absorption rate constant of caffeine at different intestine segments

Comparison between different groups	a	q	$q_{0.05}$	P
1,2	2	1.562	2.95	>0.05
1,3	3	2.091	3.58	>0.05
1,4	4	5.361	3.96	<0.05
2,3	2	0.529	2.95	>0.05
2,4	3	3.799	3.58	<0.05
3,4	2	3.269	2.95	<0.05

1: Duodenum; 2: Jejunum; 3: Ileum; 4: Colon

3 讨论

据文献^[8]报道,大鼠肠分泌液成分复杂,且随时间延长其分泌液成分含量有增高的趋势,本文采用 HPLC 法测定肠循环液中咖啡因的含量,肠循环液中的其他组分不干扰咖啡因的测定。

不同药物浓度条件下,小肠的 K_a 值无显著性差异,且以小肠内剩余药量的对数 $\ln X$ 对取样时间 t 作线性回归,所得直线的相关系数均大于 0.99,在 2.5~25.0 mg/L 浓度范围内药物的吸收量与浓度成线性关系,即吸收与浓度呈近似正比例关系,符合

Ficks 扩散原理。所以初步确定咖啡因在小肠的吸收属于一级动力学过程,吸收机制为被动扩散。文献^[9-10]报道咖啡因脂溶性高,吸收主要以简单扩散方式,本研究结果与其一致。药物在结肠段的 K_a 值与其他三段肠段具有显著性差异,但是咖啡因在整个肠段仍有较好的吸收。在 pH 为 5.4~7.8 时咖啡因均有良好的溶解性,胃肠道内 pH 值变化对咖啡因的亲水亲油性并无明显改变。所以不同 pH 条件下,小肠的 K_a 值无显著性变化。

了解药物在胃肠道的吸收特性,可以减少剂型设计的盲目性,为剂型的开发提供科学依据。本研究证实咖啡因在结肠以上部位皆有良好吸收,吸收窗较长,适于制备成缓释制剂。但由于咖啡因在结肠的吸收速度明显下降,故在设计缓释制剂时,应考虑延长药物在主要吸收部位小肠的滞留时间,以提高其生物利用度。

[参考文献]

- [1] 易超然,卫中庆. 咖啡因的药理作用和应用[J]. 医学研究生学报,2005,18:270-272.
- [2] Mandel H G. Update on caffeine consumption, disposition and action [J]. Food Chem Toxicol,2002,40:1231-1234.
- [3] Beaumont M, Batéjat D, Coste O, et al. Recovery after prolonged sleep deprivation: residual effects of slow-release caffeine on recovery sleep, sleepiness and cognitive functions[J]. Neuropsychobiology,2005,51:16-27.
- [4] 宋洪涛,谢 彤,康鲁平,等. 川芎嗪大鼠在体肠吸收动力学[J]. 中国医院药学杂志,2005,25:905-907.
- [5] United States Pharmacopeia Committee. USP [S]. New York: New York Publishing Company,2000:272-273.
- [6] Lane M E, Levis K A, Corripan O I. Effect of intestinal fluid flux on ibuprofen absorption in the rat intestine [J]. Int J Pharm,2006,309:60-66.
- [7] Svensson U S, Sandstrom R, Carlborg O, et al. High *in situ* rat intestinal permeability of artemisinin unaffected by multiple dosing and with on evidence of P-glycoprotein involvement[J]. Drug Metab Dispos,1999,27:227-232.
- [8] 游本刚,杨明世,范玉玲,等. 尼群地平大鼠在体肠吸收动力学研究[J]. 中国药理学杂志,2004,39:214-217.
- [9] 陈 莹,魏尔清. 中枢兴奋药咖啡因的再评价[J]. 国外医学·生理、病理科学与临床分册,1997,17:375-378.
- [10] Meadows K C, Dressman J B. Mechanism of acyclovir uptake in rat jejunum [J]. Pharmaceut Res,1990,7:299-303.

[收稿日期] 2006-11-28

[修回日期] 2007-01-22

[本文编辑] 尹 茶