

苦茶的急性毒性与神经药理活性初步研究*

王冬梅¹, 卢嘉丽¹, 程悦¹, 石祥刚², 宋晓虹², 叶创兴²
(1. 中山大学药学院, 广东 广州 510080; 2. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘要: 苦茶 *Camellia kucha* 是我国特有的一类野生茶树资源, 其化学成分上不同于其他茶树资源的特殊性在于富含 1, 3, 7, 9-四甲基尿酸(苦茶碱)。对苦茶的安全性及其对中枢神经系统的药理作用进行了初步探讨。结果表明, 小鼠每 kg 体质量苦茶急性毒性经口 LD₅₀ > 21.50 g, 按毒性分级标准判定属无毒级; 苦茶中的苦茶碱对戊巴比妥钠的中枢抑制有协同作用, 具有镇静催眠活性, 在苦茶中可以拮抗咖啡碱的中枢兴奋作用; 当这两种成分含量相当的时候, 苦茶没有表现出明显的催眠或兴奋作用; 但当苦茶碱的含量是咖啡碱的 3 倍时, 苦茶具有镇静催眠作用。

关键词: 苦茶; 1, 3, 7, 9-四甲基尿酸(苦茶碱); 咖啡碱; 急性毒性; 神经药理

中图分类号: R285.5; R931.71 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579(2010)01-0076-04

Primary Studies on Acute Toxicity and Sedative/hypnotic Activity of *Camellia kucha*

WANG Dongmei¹, LU Jiali¹, CHENG Yue¹, SHI Xianggang²,
SONG Xiaohong², YE Chuangxing²

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;
2. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: *Kucha* (*Camellia kucha*) is a special wild tea plant containing a great amount of theacrine (1, 3, 7, 9-tetramethyluric acid) besides caffeine and theobromine. Acute toxicity and sedative/hypnotic activity of *Kucha* were studied. The result showed that the LD₅₀ of *Kucha* was more than 21.50 g/kg bw, suggested that the water extract of *Kucha* had no toxicity under our experimental conditions. Theacrine could obviously prolong the sleeping time of mice induced by pentobarbital sodium, while caffeine had the opposite exciting effect. When the contents of these two components were about similar in *Kucha*, no significant sedative and hypnotic effects or exciting effect was observed. However, when the contents of theacrine was 3 fold higher than that of caffeine, *Kucha* showed potent sedative and hypnotic properties.

Key words: *Camellia kucha*; theacrine; caffeine; acute toxicity; sedative/hypnotic activity

苦茶 *Camellia kucha* 是山茶属茶组茶系的一个种, 其化学成分上不同于其他茶树资源的特殊性表现在嘌呤生物碱的构成模式上, 除了茶组植物中常见的咖啡碱、可可碱外, 苦茶中尚富含 1, 3, 7, 9-四甲基尿酸(苦茶碱, theacrine, 简称 TC)^[1]。

茶叶中咖啡碱能兴奋中枢神经, 提高思维效率, 消除疲劳感。苦茶中也含有咖啡碱, 预示苦茶也应该具有兴奋中枢神经的作用。但是, 最近一项研究发现, 苦茶碱具有镇静催眠的作用^[2]。苦茶中既含有咖啡碱, 又含苦茶碱, 为进一步研究与开发苦茶

* 收稿日期: 2009-02-17

基金项目: 中山大学张宏达科学研究基金资助项目

作者简介: 王冬梅(1968年生), 女, 副教授, 博士; 通信作者: 叶创兴; E-mail: lsswdm@mail.sysu.edu.cn

这一特殊野生茶树资源, 本论文在采用急性毒性实验对苦茶水提物的安全性进行考察的同时, 对其在神经药理方面的作用也进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 供试材料

野生苦茶叶 (采自云南省金平县铜厂乡瑶山村)。

苦茶鲜叶经隔水蒸青 5 min、摊晾、80 °C 干燥 24 h 后取出, 粉碎至 20 ~ 40 目, 置干燥器中备用。

1.2 实验动物

SPF 级昆明种 (KM) 小鼠, 由中山大学实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号为 SCXK (粤) 2004 - 0005, 使用许可证号为 SYXK (粤) 2004 - 0014。

1.3 实验试剂与仪器

咖啡碱 (纯度 > 98%, Sigma), 苦茶碱 (自制, 纯度 > 99% HPLC 法), 戊巴比妥钠 (纯度 > 99%, Sigma), 超纯水 (Millipore, USA), 甲醇 (色谱纯, Sigma)。其它试剂均为市售国产分析纯试剂。

Waters 600E 高效液相色谱仪, 2996 二极管阵列检测器, 717 plus 自动进样器, Empower 色谱工作站。色谱柱为 Phenomenex Gemini C18 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)。TU - 1801 紫外可见分光光度计 (北京普析通用)。

1.4 苦茶叶中常规生化成分及嘌呤生物碱的含量测定

按照国家标准对苦茶叶进行茶叶常规成分测定。水分含量测定: 103 °C 恒重法^[3]; 水浸出物测定: 沸水浴法^[4]; 咖啡碱含量测定: 高效液相色谱法^[5]; 茶多酚总量测定: 酒石酸亚铁比色法^[6]; 游离氨基酸总量测定: 茚三酮比色法^[7]。此外, 可可碱、苦茶碱的含量按上述咖啡碱含量测定的方法一并测定。

1.5 苦茶水提物的制备

取 100 g 苦茶叶碎样, 用沸水浸提 3 次, 过滤, 合并滤液后离心 (3 000 r/min, 10 min), 取上清液减压浓缩至干, 得 26.2 g 苦茶水提物, 实验时用蒸馏水配制成所需浓度。

1.6 急性毒性试验

按照国家《食品安全性毒理学评价程序和方法》^[8]中的小鼠急性毒性实验操作进行。体质量 18 ~ 22 g 小鼠, 雌雄各 25 只, 随机分为 5 组, 每组 10 只, 雌雄各半, 灌胃前禁食 (不禁水) 16 h。

设定 4 个剂量组为每 kg 体质量 2.15, 4.64, 10.00, 21.50 g 苦茶叶 (对应于苦茶水提物的质量浓度分别为 0.028, 0.13, 0.28 g/mL), 空白对照组给蒸馏水。以每 10 g 体质量 0.2 mL 的灌胃量对每只小鼠进行一次灌胃, 连续观察 14 d, 记录小鼠活动状况、体质量变化、中毒症状及死亡时间, 并对死亡动物进行剖检。根据死亡情况求出 LD₅₀。

1.7 对阈下催眠剂量戊巴比妥钠致小鼠入睡的影响

取 20 ~ 22 g 雄性小鼠 80 只, 随机分成 8 组, 每组 10 只。第 1 组为空白对照组, 灌胃给予生理盐水, 第 2, 3 组给予苦茶碱溶液, 第 4, 5 组给予咖啡碱溶液, 第 6, 7 组给予苦茶碱和咖啡碱混合溶液, 第 8 组给予苦茶水提液, 每 20 g 体质量给药体积均为 0.2 mL。给药 40 min 后, 分别按 0.2 mL 每 kg 体质量腹腔注射 25 mg 戊巴比妥钠 (90% 以上动物不出现睡眠的剂量), 观察给予戊巴比妥钠后 30 min 内各组小鼠入睡的只数 (以翻正反射消失达 1 min 以上者为入睡指标)。实验数据应用 *t* 检验进行统计学处理。

1.8 对阈上催眠剂量戊巴比妥钠致小鼠睡眠时间的影响

取 20 ~ 22 g 雄性小鼠 80 只, 分组及给药同 1.7, 于灌胃给药 40 min 后, 各组动物按每 kg 体质量分别腹腔注射催眠剂量 40 mg 戊巴比妥钠 (100% 动物入睡的剂量), 观察记录动物睡眠持续时间 (以翻正反射消失至恢复所需的时间)。实验数据应用 *t* 检验进行统计学处理。

2 结果与分析

2.1 苦茶叶中常规生化成分及各嘌呤生物碱的质量分数

苦茶叶样品的含水量为 6.79%, 水浸出物为 30.16%, 各嘌呤生物碱、茶多酚、游离氨基酸的质量分数如表 1 所示。

表 1 苦茶叶中嘌呤生物碱、茶多酚、游离氨基酸的含量测定结果

成分	苦茶碱	咖啡碱	可可碱	茶多酚	游离氨基酸
w / %	1.36	1.62	0.05	12.98	0.41

2.2 急性毒性试验

小鼠在观察期内未出现任何中毒症状及死亡, 故每 kg 体质量苦茶急性毒性经口 LD₅₀ > 21.50 g,

按毒性分级标准判定属无毒级^[8]。

2.3 对阈下催眠剂量戊巴比妥钠致小鼠入睡的影响

本研究采用翻正反射法利用受试药与戊巴比妥钠协同观察其对小鼠的睡眠作用的影响^[9], 结果如表 2 所示。与空白对照组比较, 苦茶碱 (TC) 的高、低剂量组均可明显增加阈下剂量戊巴比妥钠导致小鼠入睡的数目 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); 而咖啡碱 (CAF) 的高、低剂量组均没有小鼠入睡。TC-CAF 混合组 I (TC 剂量是 CAF 剂量的 3 倍) 可明显增加小鼠的入睡数目 ($P < 0.05$), 而 TC-CAF 混合组 II (TC 剂量与 CAF 剂量相近) 以及苦茶组 (其中 TC 与 CAF 含量与 TC-CAF 混合组 II 相当) 均没有小鼠入睡。

表 2 受试药物对阈下剂量戊巴比妥钠致小鼠入睡数目的影响

Table 2 Effect of experimental drugs on numbers of mice asleep induced by pentobarbital sodium

组别	剂量 ¹⁾ /mg	动物数 /只	睡眠鼠数 /只	睡眠 百分率/%
空白组		10	1	10
TC 低剂量组	20	10	4 ²⁾	40 ²⁾
TC 高剂量组	50	10	8 ³⁾	80 ³⁾
CAF 低剂量组	20	10	0	0
CAF 高剂量组	50	10	0	0
TC-CAF 混合组 I a	TC: 60, CAF: 20	10	6 ²⁾	60 ²⁾
TC-CAF 混合组 II b	TC: 50, CAF: 60	10	0	0
苦茶组 c	3 700	10	0	0

1) 以每 kg 体质量计; 2) $P < 0.05$; 3) $P < 0.01$, 与空白组比较; 以每 kg 体质量计;

a: 表示每 kg 体质量以苦茶碱 60 mg 与咖啡碱 20 mg 混合给药;

b: 表示每 kg 体质量以苦茶碱 50 mg 与咖啡碱 60 mg 混合给药;

c: 表示每 kg 体质量以相当于 50 mg 剂量的苦茶碱和 60 mg 剂量的咖啡碱混合给药

2.4 对阈上催眠剂量戊巴比妥钠致小鼠睡眠时间的的影响

结果如表 3 所示。与空白对照组比较, 苦茶碱 (TC) 的高、低剂量组均可明显延长阈上剂量戊巴比妥钠致小鼠睡眠的时间 ($P < 0.01$); 而咖啡碱 (CAF) 的高、低剂量组均可明显缩短小鼠睡眠的时间 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。TC-CAF 混合组 I (TC 剂量是 CAF 剂量的 3 倍) 可明显延长小鼠睡眠的时间 ($P < 0.01$), 而 TC-CAF 混合组 II (TC

剂量与 CAF 剂量相近) 以及苦茶组 (其中 TC 与 CAF 含量与 TC-CAF 混合组 II 相当) 的小鼠睡眠持续时间与空白组差异不大, 没有统计学意义。

表 3 受试药物对阈上剂量戊巴比妥钠致小鼠睡眠时间的的影响

Table 3 Effect of experimental drugs on sleeping time induced by pentobarbital sodium in mice

组别	剂量 ¹⁾ /mg	动物数 /只	睡眠持续时间 ($\bar{x} \pm s$) /min
空白组		10	20.59 \pm 7.51
TC 低剂量组	20	10	39.73 \pm 15.34 ²⁾
TC 高剂量组	50	10	56.40 \pm 18.03 ²⁾
CAF 低剂量组	20	10	11.55 \pm 7.59 ³⁾
CAF 高剂量组	50	10	7.73 \pm 7.22 ²⁾
TC-CAF 混合组 I a	TC: 60, CAF: 20	10	43.86 \pm 19.96 ²⁾
TC-CAF 混合组 II b	TC: 50, CAF: 60	10	18.19 \pm 9.77
苦茶组 c	3 700	10	20.14 \pm 12.82

1) 以每 kg 体质量计; 2) $P < 0.01$, 与空白组比较; 3) $P < 0.05$;

a: 表示每 kg 体质量以苦茶碱 60 mg 与咖啡碱 20 mg 混合给药;

b: 表示每 kg 体质量以苦茶碱 50 mg 与咖啡碱 60 mg 混合给药;

c: 表示每 kg 体质量以相当于 50 mg 剂量的苦茶碱和 60 mg 剂量的咖啡碱混合给药

3 讨论

为考察苦茶作为食品饮用时的安全性, 本研究根据《食品安全性毒理学评价程序和方法》中的急性毒性方法标准, 设定了 2.15、4.64、10.00、21.50 g (以每 kg 体质量计) 4 个剂量组。结果发现, 4 个剂量组的小鼠在观察期内均未出现任何中毒症状及死亡, 因此无法求得 LD_{50} 的确定值。但是由实验结果可以判断, 每 kg 体质量的苦茶急性毒性经口 $LD_{50} > 21.50$ g, 按毒性分级标准判定属无毒级。

在采用翻正反射法观察受试药物与戊巴比妥钠协同对小鼠的睡眠作用的影响时, 给药组设计了 7 个组, 分别为苦茶碱高、低剂量组, 咖啡碱高、低剂量组, 苦茶碱和咖啡碱混合组 I、II, 以及苦茶组。栽培苦茶芽叶中苦茶碱的含量一般为咖啡碱的 1~6 倍^[10], 因此混合组 I 把苦茶碱和咖啡碱的剂量比设为 3:1; 本实验中的苦茶组原料为野生苦茶叶, 苦茶碱和咖啡碱的含量相近, 分别为 1.36% 和 1.62%, 因此混合组 II 把苦茶碱和咖啡碱的剂

量比设为 1.36:1.62。关于苦茶组的给药剂量,要使该组中苦茶碱、咖啡碱的剂量与混合组 II 中基本相等,折算后剂量应约为 3.7 g/kg。综上所述,苦茶碱组和咖啡碱组是为了分别考察单一成分对中枢神经的作用;苦茶碱和咖啡碱混合组是考察两个成分按在苦茶叶中的含量比例混合后共同存在时对中枢神经的综合作用;苦茶叶中除嘌呤生物碱外,还含有大量茶多酚等其它化学成分,因此苦茶组是考察苦茶碱和咖啡碱在与茶多酚等成分共存时对中枢神经的综合作用。

戊巴比妥钠为中枢抑制药,能产生镇静催眠作用,使小鼠翻正反射消失。研究表明,苦茶碱的高、低剂量组均可明显增加阈下剂量戊巴比妥钠致小鼠入睡的数目,以及明显延长阈上剂量戊巴比妥钠致小鼠睡眠的时间,表明苦茶碱对戊巴比妥钠的中枢抑制有协同作用,再次证明其镇静催眠作用。咖啡碱的高、低剂量组均可明显缩短阈上剂量戊巴比妥钠致小鼠睡眠的时间,这与其确切的中枢神经兴奋作用是一致的。TC-CAF 混合组 I (苦茶碱的剂量是咖啡碱剂量的 3 倍) 可明显增加小鼠入睡的数目和延长小鼠睡眠的时间,而 TC-CAF 混合组 II (苦茶碱剂量与咖啡碱剂量相近) 以及苦茶组的小鼠睡眠持续时间均与空白组没有明显差异。由此可见,苦茶碱可以拮抗咖啡碱的中枢兴奋作用,当前者含量是后者的 3 倍时,苦茶具有镇静催眠作用;当这两种成分含量相当的时候,苦茶没有明显的催眠或兴奋作用。

临床上常用的具有镇静催眠作用的化学药物,如巴比妥钠、非巴比妥类(如水合氯醛)、苯二氮卓类(如安定)和非苯二氮卓类(如吡唑坦),这些药物或多或少都有成瘾性,极大地限制了其广泛使用。从苦茶中提取的天然苦茶碱经 Xu 等^[3]以及本研究实验证实确有镇静催眠活性,单独应用可望发展成为镇静催眠新药。

苦茶中含有与传统茶类似的茶多酚类化合物^[11],因而可预见其具有与传统茶相似的防癌抗癌、降血脂、抗氧化、抗菌等保健功能。传统茶中

的咖啡碱具有兴奋神经的作用,在夜晚喝茶过多或喝浓茶,往往影响睡眠,特别是对神经衰弱者、年老体弱者的影响更为明显。由于苦茶碱可以拮抗咖啡碱的中枢兴奋作用,因而,苦茶不具有像传统茶那样的兴奋神经的功能;而且当苦茶碱的含量是咖啡碱的 3 倍以上时,苦茶将表现出良好的镇静催眠的功效,是极具有开发潜力的新型茶叶饮料资源。

参考文献:

- [1] 石祥刚,郑新强,宋晓虹,等. 关于苦茶的新组合[J]. 中山大学学报:自然科学版,2008,47(6):129-130.
- [2] XU Jiekun, KURIHARA H, ZHAO Liang, et al. Theacrine, a special purine alkaloid with sedative and hypnotic properties from *Camellia assamica* var. *kucha* in mice [J]. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2007, 9(7):665-672
- [3] 中华人民共和国卫生部. GB/T 8304-2002 茶水测定[S]. 北京:中国标准出版社,2002.
- [4] 中华人民共和国卫生部. GB/T 8305-2002 茶水浸出物测定[S]. 北京:中国标准出版社,2002.
- [5] 中华人民共和国卫生部. GB/T 8312-2002 茶咖啡碱测定[S]. 北京:中国标准出版社,2002.
- [6] 中华人民共和国卫生部. GB/T 8313-2002 茶茶多酚测定[S]. 北京:中国标准出版社,2002.
- [7] 中华人民共和国卫生部. GB/T 8314-2002 茶游离氨基酸总量测定[S]. 北京:中国标准出版社,2002.
- [8] 中华人民共和国卫生部. GB15193.1-2003 食品安全性毒理学评价程序和方法[S]. 北京:中国标准出版社,2005.
- [9] 徐叔云,卞如廉,陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,2002:804.
- [10] YE Guangxing, ASHIHARA H, ZHENG Xinqiang, et al. New discovery of pattern of purine alkaloids in wild tea tree[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2003, 42(1):62-65.
- [11] 王冬梅,杜丽丽,卢嘉丽,等. 苦茶 *Camellia assamica* var. *kucha* 茶多酚的 HPLC-DAD/MS 分析[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(6):978-981.