

高速逆流色谱分离制备苦茶中的苦茶碱*

程悦¹, 严志勇¹, 卢嘉丽¹, 叶创兴², 王冬梅¹

(1. 中山大学药学院, 广东 广州 510006;

2. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘要: 应用高速逆流色谱法分离制备了苦茶中的苦茶碱。以正己烷-二氯甲烷-甲醇-水 (体积比为 1:5:4:2) 为两相溶剂系统, 在主机转速 800 r/min、流速 2.0 mL/min、检测波长 278 nm 条件下进行分离制备。所得流分经高效液相色谱法检测, 与对照品进行比较, 并通过质谱、核磁共振氢谱、碳谱鉴定化合物的结构。结果表明, 从 2.22 g 苦茶总生物碱提取物中分离得到了 3 个化合物, 分别为可可碱 5 mg, 苦茶碱 389 mg, 咖啡碱 41 mg, 纯度均在 99% 以上, 系首次采用高速逆流色谱法对苦茶中的苦茶碱进行分离。该法具有简便、快速的优点。

关键词: 高速逆流色谱; 苦茶; 嘌呤生物碱; 苦茶碱

中图分类号: R285.5; R931.71 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579 (2010) 03-0065-05

Isolation and Preparation of Theacrine by High-Speed Counter-Current Chromatography from *Camellia assamica* var. *kucha*

CHENG Yue¹, YAN Zhiyong¹, LU Jiali¹, YE Chuangxing², WANG Dongmei¹

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

2. School of Life Sciences, Sun Yet-san University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Theacrine was prepared, isolated and purified from *Camellia assamica* var. *kucha* by high-speed counter-current chromatography. A two-phase solvent system composed of hexane-dichloromethane-methanol-water (1:5:4:2, *v/v/v/v*) was selected with comprehensive analysis of the settling time, the ratio of up and down phase's volume and the *K* value. Five mg of theobromine, 389 mg of theacrine and 41 mg of caffeine with their purities over 99% were obtained from 2.22 g of the crude extract of *Camellia assamica* var. *kucha* under the condition of a flow rate of 2.0 mL/min, 800 r/min and the detection wavelength of 278 nm. The obtained fractions were analyzed by high perform liquid chromatography, compared with standard substance and identified by MS, ¹H NMR and ¹³C NMR methods. Theacrine was the first time isolated from *Camellia assamica* var. *kucha* by HSCCC, which is a simple, rapid and effective method.

Key words: HSCCC; *Camellia assamica* var. *kucha*; purine alkaloid; theacrine

苦茶 (*Camellia assamica* var. *kucha* Chang et Wang) 是山茶属茶亚属茶组茶系普洱茶的变种, 为张宏达先生 1984 年发表的茶的新变种, 集中分布在云南省金平县铜厂乡瑶山村附近的山坡上, 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^[1], 苦茶中尚富含苦茶碱 (1, 3, 7, 9-四甲基尿酸, theacrine, 简称 TC)^[2-3], 经最新研究表明其具有镇静、催眠的药理活性^[4]。本文是建立从苦茶中提取制备其特征性成分苦茶碱的新方法, 为其进一步的生物活性研究提供必要的物质基础。

* 收稿日期: 2009-09-07

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: 程悦 (1987 年生), 女, 研究生; 通讯作者: 王冬梅; E-mail: lsswdm@mail.sysu.edu.cn

传统的苦茶碱分离方法有柱层析法和溶剂法^[5-7], 耗时较长、步骤繁多, 且在多次反复的柱层析过程中, 样品有较大的损失, 得率较低, 而且流动相的选择比较局限。高速逆流色谱 (high-speed counter-current chromatography, 简称 HSCCC) 是一种液-液分配色谱技术, 由于其无固态支撑体, 消除了由于样品在固相载体上的不可逆吸附和降解造成的损失, 与一般的色谱分离方式不同, 利用不对称离心力场, 实现两相溶剂体系的充分保留和有效混合及分配, 可以在短时间内实现高效分离和制备, 能实现梯度洗脱和反相洗脱, 亦能进行重复进样, 使其特别适用于制备性分离, 其产品纯度高, 制备量大, 节约溶剂, 因而近 10 年来被广泛应用于各个领域^[8-12]。本文首次采用 HSCCC 从苦茶中分离得到苦茶碱, 此外还分离到咖啡碱和可可碱等其它嘌呤类生物碱。

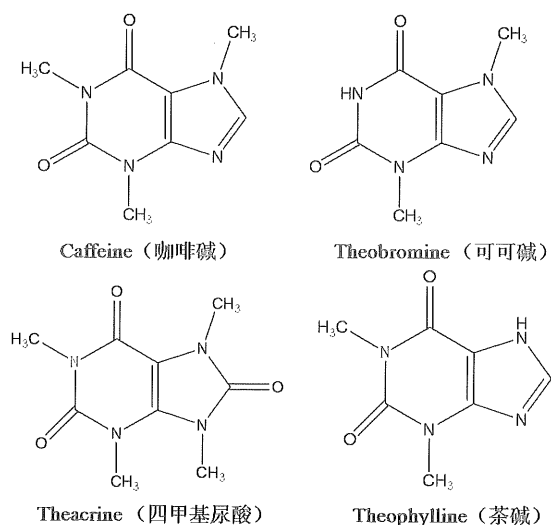


图1 苦茶中嘌呤生物碱的化学结构式

Fig. 1 Chemical structures of purine alkaloids in *Camellia assamica* var. *kucha*

1 实验部分

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 实验仪器与试剂

QuilPrep™ Chassis MK V 500/Series II HPLC Pump 高速逆流色谱仪 (英国/AECS 美国 SSI), 包括 N2000 型色谱工作站 (浙江大学), 高压输液泵, 紫外检测器 (岛津公司 日本); Waters 600 高效液相色谱仪 (Waters 公司 美国), 包括 Waters

2487 紫外检测器, Waters 717 plus 自动进样器, Breeze 色谱工作站软件; Phenomenex Security Guard 保护柱和 Phenomenex Gemini C18 柱 (250 mm × 4.6 mm i. d., 5 μm); GB204 电子天平 (METTLER TOLEDO); Labconco centriVap 离心浓缩仪 (美国 Labconco 公司); MTN-2800D 氮吹蒸缩装置 (天津奥特赛恩斯仪器有限公司); EYELAN 旋转蒸发装置 (上海爱朗仪器有限公司); DZF-6051 真空干燥箱 (上海一恒科技有限公司); X-4 数字显示显微熔点测定仪 (北京泰克仪器有限公司); Finnigan Trace Ultra/DSQ 气质联用仪 (Thermo, USA); Mercury-Plus 300 核磁共振波谱仪 (VARIAN, USA)。

咖啡碱、可可碱标准品 ($w > 98\%$, 美国 Sigma 公司); 苦茶碱 ($w > 99\%$ HPLC 法, 实验室自制); 正己烷、二氯甲烷、甲醇、乙酸乙酯均为分析纯 (天津市红岩化学试剂厂); 乙腈为色谱纯 (美国 Sigma 公司); 水为超纯水 (Millipore 超纯水仪, Milford, MA); 氘代氯仿 (ARMAR, Switzerland)。

1.3 苦茶氯仿萃取物的制备

以 m (沸水) : m (苦茶叶) = 12:1 提取 250 g 苦茶叶中水溶性成分, 超声过滤 3 次, 合并滤液, 将水提液浓缩至 1 L。浓缩后的水提液用氯仿萃取浓缩后, 将氯仿萃取物置于真空干燥箱干燥 3 h, 乙醚脱色, 得苦茶氯仿萃取物 2.22 g。

1.4 溶剂体系的选择

配制各种比例的溶剂体系, 记录测定两相溶剂系统的“平衡时间”, 即: 当上相与下相溶剂混合时, 两相系统达到完全分层的时间。再称取苦茶氯仿萃取物约 2 mg 置于试管中, 分别取上相、下相溶液各 2 mL 溶解样品, 充分震荡溶解, 记录分层时间。待两相平衡后, 分别精确取上相、下相溶液各 1 mL, 挥干, 再用 0.6 mL 纯水溶解, 进行 HPLC 分析。计算不同溶剂系统中, 目标化合物的分配系数 K 值。

$$K = \frac{\text{目标化合物在上相溶液中的峰面积值 } A_1}{\text{目标化合物在下相溶液中的峰面积值 } A_2}$$

1.5 溶剂体系和样品溶液的配制

将溶剂体系在分液漏斗中充分摇匀, 静置分层, 分别将上下两相超声脱气 30 min。将苦茶氯仿萃取物 2.22 g 用 10 mL 上相和 10 mL 下相溶解, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

1.6 高速逆流色谱法的分离制备过程

先将固定相泵入 HSCCC, 流速可达 8 mL/min, 待聚四氟乙烯线圈内充满固定相后, 开动旋转, 调

转速至 800 r/min; 再将流动相泵入 HSCCC, 流速为 4 mL/min, 至流出流动相, 上下相达到平衡后, 将 20 mL 样品溶液注入 HSCCC。流速调整为 2 mL/min, 转速为 800 r/min。紫外检测器的检测波长为 278 nm, 在此波长下检测并记录色谱图。流分由自动接收器收集, 每 2 min 15 s 收集一管。

1.7 HPLC 检测分析

所得各流分经 HPLC 检测后, 减压回收溶剂后, 真空干燥得到粉末。取各粉末及可可碱、苦茶碱和咖啡碱的标准品少量, 加纯水溶解后进行 HPLC 分析, 采用峰面积归一化法计算其纯度。

色谱柱: Phenomenex Gemini C18 柱 (250 mm × 4.6 mm i. d., 5 μm, Waters 公司), 保护柱: Phenomenex Security Guard (Waters 公司), 柱温为 28 °C, 流动相为 $v(\text{乙腈}) : v(\text{水}) = 20 : 80$, 等度洗脱, 检测波长为 278 nm, 流速为 1.0 mL/min, 进样量为 10 μL。

2 结果与讨论

2.1 HSCCC 溶剂体系的选择

因目标化合物为生物碱类化合物, 根据文献 [13] 报道, 分离生物碱成分常用的溶剂体系是正己烷-乙酸乙酯-甲醇 (或者乙醇、正丁醇) - 水体系及三氯甲烷-甲醇-水体系。所以本实验分别对溶剂系统: 正己烷-乙酸乙酯-甲醇-蒸馏水、正己烷-二氯甲烷-甲醇-蒸馏水、乙酸乙酯-正己烷-蒸馏水、乙酸乙酯-二氯甲烷-蒸馏

水、二氯甲烷-正己烷-蒸馏水进行了筛选。

HSCCC 两相溶剂系统选择应符合以下原则:

① 溶剂不造成样品的分解和变性; ② 为保证固定相保留值合适, 溶剂体系的分层时间小于 30 s; ③ 目标样品在上下两相溶剂中分配均匀, 分配系数 K 接近于 1; ④ 上下两相体积大致相等, 以免浪费溶剂; ⑤ 尽量采用挥发性溶剂, 以方便后续处理, 易于物质纯化。

在不同组成比例的不同溶剂系统中, 两相溶液的平衡时间以及目标化合物在上相、下相中的分配系数情况见表 1 所示。正己烷-二氯甲烷-甲醇-水体系的 K_2 和 K_3 值十分接近而导致其不易分离, 其中只有体积比为 $v(\text{正己烷}) : v(\text{二氯甲烷}) : v(\text{甲醇}) : v(\text{水}) = 1 : 5 : 4 : 2$ 的 K_2 和 K_3 值较为合适。正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水和乙酸乙酯-正己烷-水体系的 K 值较小将会导致出峰时间提前, 分离效果差。而二氯甲烷-正己烷-水体系的 K_1 和 K_2 值均较小。

除了 $v(\text{正己烷}) : v(\text{二氯甲烷}) : v(\text{甲醇}) : v(\text{水}) = 1 : 5 : 4 : 2$ 和乙酸乙酯-正己烷-水体系的分层时间合适外, 正己烷-二氯甲烷-甲醇-水, 乙酸乙酯-二氯甲烷-水, 二氯甲烷-正己烷-水和正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水体系的分层时间过久或上下相体积比不理想。

综合各种因素, 溶剂系统 $v(\text{正己烷}) : v(\text{二氯甲烷}) : v(\text{甲醇}) : v(\text{水}) = 1 : 5 : 4 : 2$ 是最为理想的, 选定为 HSCCC 的溶剂系统。

表 1 溶剂系统的平衡时间及目标化合物在溶剂中的 K 值

Table 1 Settling time of solvent systems and the K values

溶剂系统	组成比例 (体积比)	平衡时间/s		上下相溶 剂体积比	目标化合物的 K 值		
		$ST_0^1)$	ST_1		1	2	3
正己烷-二氯甲烷 - 甲醇-水	1:5:4:2	16	20	1	4.81	1.01	0.77
	1:2:2:1	22	27	1.23	4.18	0.41	0.34
	1:4:3:2	18	27	1	2.97	0.62	0.54
	1:4:4:2	21	36	1.26	1.72	0.69	0.56
	1:4:4:2	35	36	0.13	0.077	0.10	0.15
正己烷-乙酸乙酯 - 甲醇-水	1:2:2:1	15	23	0.26	0.041	0.057	0.065
	1:1:2:1	14	55	0.29	0.026	0.021	0.027
	1:4:2:4	33	28	1.2	0.070	0.14	0.16
	1:2:1:2	30	32	1	0.051	0.69	2.56
	1:4:2:3	39	33	1.22	0.12	0.21	0.20
1:5:2:4	43	37	1.18	0.11	0.21	0.24	
乙酸乙酯-正己烷-水	1:1:2	8	8	1	0.013	0.035	0.161
乙酸乙酯-二氯甲烷-水	1:1:2	26	30	1	7.83	1.36	0.69
二氯甲烷-正己烷-水	1:1:2	31	40	1	0.007	0.35	1.02

1) ST_0 为加入样品前溶剂系统分层时间; ST_1 为加入样品后溶剂系统分层时间; 1 为可可碱; 2 为苦茶碱; 3 为咖啡碱

2.2 HSCCC 分离制备的结果

按“1.6”节操作, 在 120 min 内经 HSCCC 分离制备得到 3 个流分, 即图 2 中的 I、II、III。

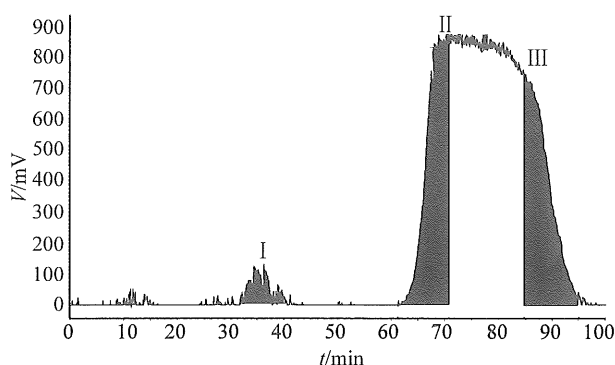


图 2 苦茶氯仿萃取物的 HSCCC 分离色谱图

Fig. 2 HSCCC chromatogram of Kucha Chloroform extract

2.3 HPLC 检测分析

对高速逆流色谱所得到的流分 I、II、III (Fraction I、II、III) 进行检测分析, 与可可碱、苦茶碱和咖啡碱的标准品对照所得 HPLC 色谱图见图 3。

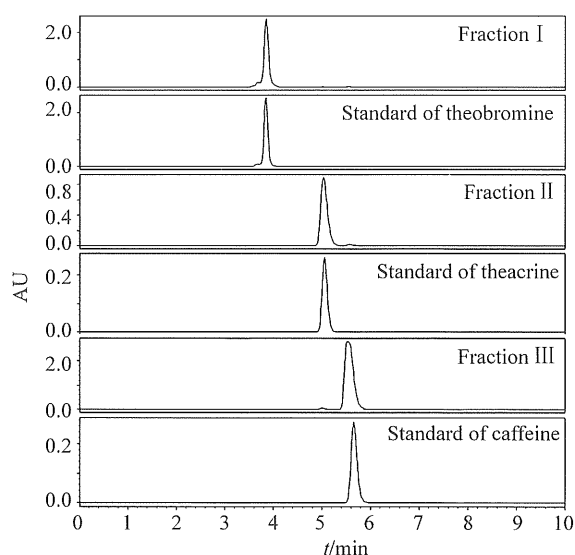


图 3 HSCCC 分离得到的 3 个流分的 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of three fractions obtained by HSCCC

Fr. I 为可可碱 (5 mg, 收率 0.23%), HPLC 峰面积归一化法计算其纯度为 99.94%; Fr. II 为苦茶碱 (389 mg, 收率 17.52%), HPLC 峰面积归一化法计算其纯度为 99.11%; Fr. III 为咖啡碱 (41 mg, 收率 1.85%), HPLC 峰面积归一化法计算其纯度为 99.58%。

2.4 苦茶碱的结构鉴定

2.4.1 熔点测定 取 Fr. II 的结晶粉末在显微熔点测定仪上测定熔点 3 次, 求平均值熔点测定结果显示熔点为 226 ~ 229 °C, 与文献 [3] 报道的苦茶碱的熔点 (228 °C) 一致。

2.4.2 核磁共振氢谱和碳谱分析 取 Fr. II 的 CDCl₃ 溶液进行 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 分析, 信号归属如表 2 所示, ¹H NMR 中 4 个甲基峰信号符合苦茶碱的结构, 且化学位移值与文献报道的基本一致^[3]。¹³C NMR 4 个甲基碳, 2 个氮杂环烯碳, 以及 3 个羰基碳信号, 均符合苦茶碱的结构。

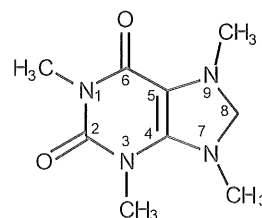
表 2 Fr. II 的核磁共振氢谱、碳谱数据及归属 (CDCl₃, TMS)

Table 2 ¹H NMR and ¹³C NMR data of Fr. II

No.	¹ H NMR Chemical shift, δ	¹³ C NMR Chemical shift, δ
1		153.4 (C ₆ = O, s)
2		151.7 (C ₂ = O, s)
3		150.5 (C ₈ = O, s)
4		99.3 (C ₅ = C, s)
5		96.1 (C ₄ = C, s)
6	3.72 (3H, N ₁ -CH ₃ , s)	31.7 (N ₁ -CH ₃ , s)
7	3.62 (3H, N ₇ -CH ₃ , s)	30.6 (N ₇ -CH ₃ , s)
8	3.57 (3H, N ₃ -CH ₃ , s)	29.4 (N ₃ -CH ₃ , s)
9	3.36 (3H, N ₉ -CH ₃ , s)	28.3 (N ₉ -CH ₃ , s)

2.4.3 质谱分析 对 Fr. II 进行质谱 (EI-MS) 分析, 分子离子峰 *M* 为 224, 其与 NIST 质谱库中 1, 3, 7, 9-苦茶碱的标准质谱图基本一致。

通过熔点测定和 ¹H NMR、¹³C NMR、EI-MS 分析, 证明从 HSCCC 中分离制备得到的 Fr. II 为苦茶碱。



3 结论

应用高速逆流色谱法从苦茶中分离制备了 3 个嘌呤生物碱类化合物, 分别为可可碱, 苦茶碱和咖啡碱, 纯度均在 99% 以上, 其中, 苦茶碱系首次采用 HSCCC 从苦茶中分离得到。与常规的柱层析

方法相比, HSCCC 简便、快速、节省溶剂和时间,基本上实现了短时间内高纯度、高得率产品的制备,具有较好的实际应用价值。此外,本方法所得苦茶碱纯度高,可为其进一步的生物活性研究提供必要的物质基础。

参考文献:

- [1] ASHIHARA H, KATO M, YE C X, et al. Biosynthesis and metabolism of purine alkaloids in leaves of cocoa tea [J]. *J Plant Research*, 1998, 111(4): 599 - 604.
- [2] ZHENG X Q, YE C X, KATO M, et al. Theacrine (1, 3, 7, 9-tetramethyluric acid) synthesis in leaves of a Chinese tea, kucha (*Camellia assamica* var. *kucha*) [J]. *Phytochemistry*, 2002, 60(2): 129 - 134.
- [3] 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.
- [4] XU J K, KURIHARA H, ZHAO L, 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.
- [5] 叶创兴, 林永成, 苏建业, 等. 苦茶的嘌呤生物碱 [J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 1999, 38(5): 82 - 86.
- [6] YANG X R, YE C X, XU J K, et al. Simultaneous analysis of purine alkaloids and catechins in *Camellia sinensis*, *Camellia ptilophylla* and *Camellia assamica* var. *kucha* by HPLC [J]. *Food Chemistry*, 2007, 100(3): 1132 - 1136.
- [7] XU J K, ZHANG W K, SU Y B, et al. Chemical constituents from the leaves of *Camellia assamica* var. *kucha* Chang et Wang [J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2009, 7(2): 111 - 114.
- [8] 戴德舜, 王义明, 罗国安, 等. 高速逆流色谱研究进展 [J]. *分析化学*, 2001, 29(5): 586 - 591.
- [9] 袁黎明, 傅若农, 张天佑, 等. 高速逆流色谱在植物有效成分分离中的应用 [J]. *药物分析杂志*, 1998, 18(1): 60 - 65.
- [10] 胡江涌, 梁勇, 谢亚, 等. 土豆叶中茄尼醇的高速逆流色谱法分离纯化及质谱解析 [J]. *色谱*, 2007, 25(4): 528 - 531.
- [11] 刘云, 俞桂新. 高速逆流色谱法分离制备乌药叶中的黄酮类成分 [J]. *色谱*, 2007, 25(5): 735 - 739.
- [12] 孙印石, 刘政波, 王建华, 等. 高速逆流色谱分离制备陈皮中的黄酮类化合物 [J]. *色谱*, 2009, 27(2): 244 - 247.
- [13] 李艳, 肖凯军, 郭祀远, 等. 高效逆流色谱研究进展——在天然产物有效成分分离方面的应用 [J]. *现代食品与药品杂志*, 2006, 16(4): 78 - 80.

(上接第64页)

- [3] PRASAD B B, SHARMA P S, LAKSHMI D. Molecularly imprinted polymer-based solid-phase extraction combined with molecularly imprinted polymer-based sensor for detection of uric acid [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1173(1-2): 18 - 26.
- [4] SCHWEITZ L, ANDERSSON L I, NILSSON S. Rapid electrochromatographic enantiomer separations on short molecularly imprinted polymer monoliths [J]. *Anal Chim Acta*, 2001, 435(1): 43 - 47.
- [5] 何建峰, 刘岚, 杨桂兰, 等. 水相中奎宁分子印迹聚合物的制备、表征及识别性质的研究 [J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2005, 44(3): 58 - 62.
- [6] 钱倩, 王伯瑶. 纳米药物载体在医药领域中的研究进展 [J]. *济宁医学院学报*, 2006, 29(2): 82 - 84.
- [7] 田威, 范晓东, 陈卫星, 等. 药物控制释放用高分子载体的研究进展 [J]. *高分子材料科学与工程*, 2006, 22(4): 19 - 23.
- [8] FRANCESCO P, FRANCESCA I, GIUSEPPE C. New restricted access materials combined to molecularly imprinted polymers for selective recognition/release in water media [J]. *European Polymer J*, 2009, 45(6): 1634 - 1640.
- [9] SAMBE H, HOSHINA K, MOADDEL R, et al. Uniformly-sized molecularly imprinted polymers for nicotine by precipitation polymerization [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1134(1-2): 88 - 94.
- [10] CHAITIDOU S, KOTROTSIOU O, KOTTI K, et al. Precipitation polymerization for the synthesis of nanostructured particles [J]. *Materials Science and Engineering B*, 2008, 152(1-3): 55 - 59.