

文章编号: 0529-6579 (1999) 05-0082-05

苦茶 *Camellia assamica* var. *kucha* Chang et Wang 的嘌呤生物碱^{*}

叶创兴¹, 林永成², 苏建业², 宋晓虹², 张宏达¹

(1. 中山大学生命科学学院, 广州 510275; 2. 中山大学化学与化学工程学院)

摘 要: 用重量法和柱层析法从苦茶 *Camellia assamica* var. *kucha* Chang et Wang 的嫩梢中分离出 3 种嘌呤生物碱, 经薄层层析、熔点测定、元素分析、核磁共振和质谱等对其结构的测定, 鉴定为咖啡碱、1, 3, 7, 9-四甲基尿酸和可可碱, 其百分含量分别为 0.88%, 0.84% 和 0.29%。样品水提物经氯仿萃取后直接由高压液相色谱分析, 测得苦茶含咖啡碱 1.932 9%, 四甲基尿酸 1.294 1%, 可可碱 0.585 5%, 茶叶碱 0.012 8%。这是茶组植物中嘌呤生物碱新的分布模式。

关键词: 苦茶 *Camellia assamica* var. *kucha* Chang et Wang; 嘌呤生物碱; 1, 3, 7, 9-四甲基尿酸; 咖啡碱

中图分类号: Q 946.88 文献标识码: A

山茶属 *Camellia* 约 280 种, 其中茶组 *Camellia* Sect. *Thea* L. 有 32 种, 著名的饮料茶叶就是来自茶组植物的茶 *C. sinensis* (L.) O. Ktze 和普洱茶 *C. assamica* (Mast.) Chang. 茶叶含有复杂的化学成分, 其中嘌呤生物碱是茶最重要的化学成份之一, 其他的化学成份尚有茶氨酸、儿茶素、芳香油、色素、糖类、有机酸、维生素类、酶类、水浸出物和矿质元素等。在茶叶商品流通中, 把咖啡碱、锰、儿茶素和茶氨酸列为辨别真假茶必检的项目。可见咖啡碱在茶叶中生化成份检测中的地位^[1]。茶叶的生物碱主要为嘌呤碱, 也有少量的嘧啶碱。在茶叶中发现的嘌呤碱有咖啡碱、可可碱、茶叶碱、腺嘌呤、鸟便嘌呤、黄嘌呤、次黄嘌呤和拟黄嘌呤等。其结构特点系以嘌呤环为基本骨架, 不同种类的嘌呤碱取决于嘌呤环上甲基的位置和个数。茶叶生物碱中, 咖啡碱占干质量 2%~4%, 可可碱约 0.05%, 茶叶碱约 0.002%。目前在茶组植物中, 已经发现了和茶不同的嘌呤碱分布模式, 这就是以可可碱为主要成份的缅甸茶 *C. irrawadiensis* Barua、紫果茶 *C. purpurea* Chang et Chen 和可可茶 *C. pilophylla* Ching^[2] 的芽叶含可可碱为主, 其中可可茶含可可碱超过干质量的 4%, 最高达 6.84%^[13~7]。最近在研究苦茶 *C. assamica* var. *kucha* Chang et Wang 时, 分离出具有意义的较高含量的 1, 3, 7, 9-四甲基尿酸。下面是研究的初步结果。

* 基金项目: 国家自然科学基金 (39570081) 资助项目

收稿日期: 1998-10-13 作者简介: 叶创兴, 男, 1946 年生, 教授。

1 样品和试剂、仪器

1.1 供试样品

采摘 1 芽 2 叶苦茶鲜样, 经隔水蒸 15 min, 在 80 °C 烘箱中烘干, 置于放有硅胶的干燥器中备用。栽于中山大学实验园地的苦茶是 1986 年由采自原产地的种子实生苗成长的, 树高 2 m 左右。

1.2 试剂

醋酸铅、氯仿、乙酸乙酯, 标准品: 咖啡碱、茶叶碱、可可碱, 均为分析纯以上, 咖啡碱和可可碱购自上海, 茶叶碱购自美国 Sigma 公司。

薄层析硅胶 GF254, 颗粒活度 160 ~ 200; 柱层析拌样用硅胶 300 目, 装柱用硅胶 60-100 目, 均购自青岛。

1.3 仪器

显微镜熔点仪, 500 MHz 核磁共振仪, ZAB-HS 质谱仪, 240 型元素分析仪, SP 8800 高压液相色谱仪。

2 实验部分

2.1 苦茶嘌呤生物碱的分离和鉴定

(1) 准确称取 5 g (精确到 0.01 g) 苦茶样品, 加入 500 mL 水, 加热浸提 30 min, 过滤后, 滤渣再用 500 mL 水加热浸提 30 min, 合并 2 次的滤液。在滤液中加入醋酸铅溶液, 出现絮状沉淀, 一直到滤液不再出现沉淀为止 (约需醋酸铅 2 g)。过滤后将滤液浓缩至 80 mL, 并用少量沸水洗涤滤渣。滤液经冷却后过滤, 滤出的固体为产品 C, 蒸干得 0.29%。滤液再在分液漏斗中用 15 mL 氯仿 × 3 萃取, 水相用 TLC 检测, 与标准品对照未发现茶叶碱。将萃取液合并, 氯仿蒸干后, 得到灰白色的固体。将固体溶于氯仿, 用 300 目以上的细硅胶拌样, 用 60 ~ 100 目的粗硅胶装柱层析, 以乙酸乙酯作洗脱剂。分离得 2 个纯的产品 A 和 B, 其含量分别占干质量 0.88% 和 0.84%。 θ_{mp} A 为 238 °C, B 为 226 ~ 228 °C, C 为 357 °C。

(2) 荧光硅胶薄层层析: 以乙酸乙酯为展开剂, 咖啡碱、可可碱和茶叶碱标准品与 A、B、C 对照, 表明 A 是咖啡碱, C 是可可碱, B 是嘌呤碱, 它们的 R_f 分别为 0.31、0.48 和 0.38。

(3) 产品 B 核磁共振: δ (500 FT, $CDCl_3$, TMS) 为 3.39 (S, 3H), 3.59 (S, 3H), 3.64 (S, 3H), 3.74 (S, 3H)。

(4) 产品 B 的质谱: m/e (FAB) 为 225 ($M^+ + 1$), 209, 194, 180, 167, 139。

(5) 产品 B 元素分析 ($C_9H_{12}N_4O_3$, w/% , 括号里为计算值): C 0.481 (0.482), H 0.052 (0.054), N 0.243 (0.250)。结合熔点测定与文献报道一致, 可确定产品 B 为 1, 3, 7, 9-四甲基尿酸。

2.2 应用高压液相色谱对苦茶的分析

(1) 内标溶液: 称取愈甘醚, 溶解成 2.5 mg/mL 溶液。

(2) 标准溶液配制及分析: 称取一定量的标准品咖啡碱、茶叶碱、可可碱以及由 2.1 分离提纯的 1, 3, 7, 9-四甲基尿酸, 加入 10 mL 内标溶液, 100 mL 沸水, 并保温 30 min,

取完全溶解的混合液 10 mL, 加入 20 mL 的氯仿萃取, 静止分层后取氯仿溶液进样, 依据标准品的含量与峰面积加以对照。

(3) 试样处理: 将干燥的茶样磨碎后准确称取 1 g, 加内标溶液 10 mL, 加沸水 90 mL, 在水浴中保温 1 h, 趁热过滤, 取滤液 10 mL, 加 20 mL 氯仿萃取, 取氯仿液进样。

(4) 流动相为 $V(\text{甲醇}) : V(\text{磷酸缓冲液}(\text{pH}=6)) = 70 : 30$, 流动速度为 1 mL/min。

(5) 分析结果: 经与标准品比较, 苦茶样品质量分数平均值 ($\bar{x} \pm \text{SD}$) / %, $n=4$: 咖啡碱 1.932 9 $\pm$ 0.12, 1, 3, 7, 9-四甲基尿酸为 1.294 1 $\pm$ 0.11, 可可碱 0.585 5 $\pm$ 0.11, 茶叶碱 0.012 8 $\pm$ 0.001。图 1 是茶样和标准化合物的高压液相色谱谱图。

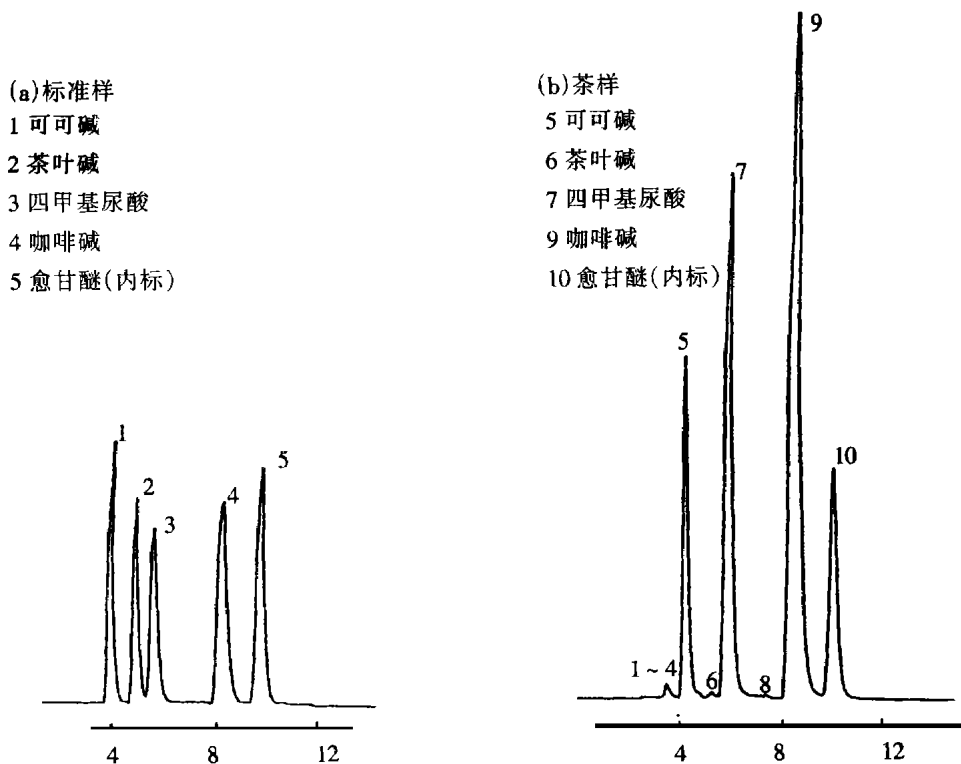


图 1 苦茶样嘌呤碱高压液相分离色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatography

3 讨 论

(1) 用 2 次较大量的水浸提, 苦茶嘌呤生物碱绝大部分已经溶解在沸水中, 滤液浓缩到 80 mL, 因可可碱在冷热水中的溶解度显著不同, 经冷却析出的固体为可可碱。茶叶碱易溶于冷水而难溶于氯仿, 因此用氯仿萃取浓缩液, 茶叶碱应留在水相, 但蒸干水相后并未得到茶叶碱, 这是因为茶叶碱含量太低, 从高压液相色谱分析仅为 0.012 8%, 咖啡碱和四甲基尿酸溶于氯仿, 蒸干氯仿便是除去了大部分可可碱和茶叶碱的咖啡碱和四甲基尿酸的混合物。

(2) B 的结构鉴定, 根据 B 的核磁共振、质谱和元素分析得出 B 的化学式为 $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_3$, 但符合此式的除 1, 3, 7, 9-四甲基尿酸外, 还有 8-甲氧基咖啡碱和 O^2 , 1, 7, 9-

四甲基尿酸. 由于 8-甲氧基咖啡碱的熔点为 176°C , O^2 , 1, 7, 9-四甲基尿酸的熔点为 $207.3 \sim 208.4^{\circ}\text{C}$, 而 B 的熔点为 $226 \sim 228^{\circ}\text{C}$, 因此与 1, 3, 7, 9-四甲基尿酸^[7]相符, B 的核磁共振谱的分析也能完全解释该结构.

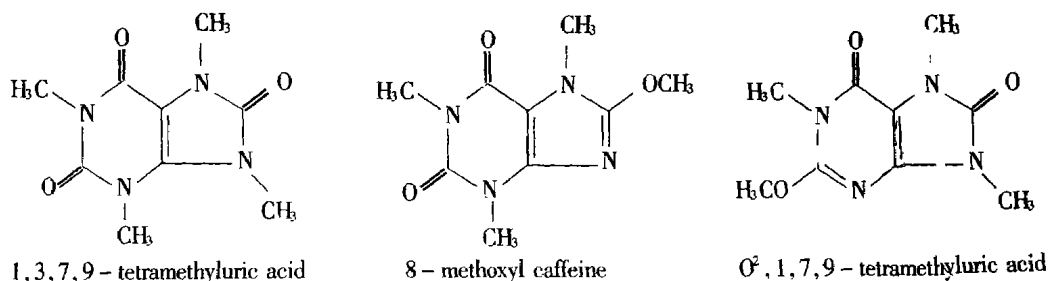


图 2 四甲基尿酸的几种同分异构体

Fig. 2 Varies chemical structure of tetramethyluric acids

(3) 虽然 Johnson 首次报道了茶叶中含有微量的 1, 3, 7, 9-四甲基尿酸^[8], 但他是从数百万磅茶叶中经提取咖啡碱后的废弃物中分离出这一合物, 并测定了它的结构. 此前只是人工合成出四甲基尿酸, 从未在植物中分离出它. 此后虽然在咖啡中检测到了微量的四甲基尿酸存在, 但在茶叶生化的常规检测中未见测得它的报道, 显系由于茶叶中含四甲基尿酸非常低的缘故. 现在苦茶中由重量法和高压液相色谱法分离和检测出占茶叶干质量 0.84% 和 1.29% 的四甲基尿酸, 含量如此之高, 在茶组植物中还是首次发现.

(4) 用质量法分离出的四甲基尿酸的质量分数为 0.84%, 咖啡碱为 0.88%, 两者之间仅有万分之四的差别. 应用高压液相色谱测得苦茶含四甲基尿酸的质量分数为 1.29%, 咖啡碱为 1.93%, 两者之间仍然是比较接近的. 这显然和以咖啡碱含量占第 1 位, 可可碱含量占第 2 位, 但后者含量仅占咖啡碱的 $1/40 \sim 1/20$, 茶叶碱含量占第 3 位的茶叶模式不同, 我们把它作为茶组植物嘌呤碱组成的第 3 种模式提出来, 这不仅仅是在苦茶中四甲基尿酸达到非常有意义的含量; 而且还因为从茶叶中, 我们已经知道, 咖啡碱 $\rightarrow$ 可可碱 $\rightarrow$ 茶叶碱含量次第迅速降低的组成模式不因种植地域, 茶叶采摘时间以及植株的生理年龄而改变; 更进一步, 还因为我们对可可茶的研究中也表明, 可可碱含量在嘌呤碱组成中占主要地位这种模式也不因迁地移植, 季节而改变, 针对苦茶嘌呤碱的分离测定结果, 我们认为这是茶组植物中嘌呤碱组成的新模式.

(5) 四甲基尿酸可能作为咖啡碱的伴生碱而存在, 对嘌呤生物碱的代谢过程及代谢的最终产物形成的了解将具有意义. 在可可茶中可可碱为嘌呤生物碱最终产物的原因可能是缺少一种甲基转移酶, 把本应是咖啡碱前体的可可碱继续合成为咖啡碱. 而苦茶中咖啡碱是否成为四甲基尿酸的前体, 是否存在一种甲基转移酶, 均值得加以探讨.

现在已经知道在茶组植物中, 嘌呤生物碱的主要成份有以咖啡碱为主的, 这就是茶、普洱茶、大理茶 *C. taliensis* (W W Sm.) Melch. 等, 有以可可碱为主的, 这就是缅甸茶、可可茶、紫果茶 *C. purpurea* Chang et Chen^[3,4]. 饮茶由于咖啡碱的存在而有兴奋神经的作用, 而可可茶由于含可可碱为主, 其药理和生理作用与传统茶叶存在着差异, 研究表明饮用可可茶没有兴奋神经的作用. 四甲基尿酸含量几乎与咖啡碱含量相当的苦茶, 其药理和生物作用表现有待进一步研究.

参考文献:

- [1] 王泽农. 中国农业百科全书 (茶业卷) [M]. 北京: 农业出版社, 1988. 136~137.
- [2] 张宏达. 山茶属植物的系统研究 [J]. 中山大学学报论丛, 1981 (1): 1~180.
- [3] 张宏达, 叶创兴, 张润梅, 等. 中国发现新的茶叶资源——可可茶 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 1988 (3): 131~133.
- [4] 张宏达, 张润梅, 叶创兴. 山茶科系统发育论析 V [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 1996 35 (3): 11~17.
- [5] 张宏达. 茶叶植物资源的订正 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 1984 (1): 10~11.
- [6] 张宏达, 任善相. 中国植物志, 第 49 卷, 第 3 册 [M]. 北京: 科学出版社, 1998. 136.
- [7] 叶创兴, 林永成, 同海云, 等. 可可茶嘌呤生物碱的分离和分析 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 1997, 36 (6): 30~33.
- [8] JOHNSON T W. Purine in the plant Kingdom: The discovery of a new purine in tea [J]. J Am Chem Soc, 1937 (59): 1261.

Purine Alkaloids in *Camellia assamica* var. *kucha* Chang et Wang

YE Chuang-xing^{*}, LIN Yong-cheng, SU Jian-ye, SONG Xiao-hong, ZHANG Hong-da

Abstract: Purine alkaloids in *Camellia assamica* var. *Kucha* Chang et Wang were investigated by extraction combined with silica gel column chromatography. Three products were isolated. Product A and C were determined as caffeine and theobromine by TLC and melting point compared with standards. The structure of product B were determined by MS and ¹HNMR, the element analysis and melting point for 1, 3, 7, 9-tetramethyluric acid. The purine alkaloids were consisted of caffeine, 1, 3, 7, 9-tetramethyluric acid, theobromine and theophylline in the leaves of *C. assamica* var. *kucha*, and their content was 1.932 9%, 1.294 1%, 0.585 5% and 0.012 8% respectively by HPLC. The distribution of new type of purine alkaloids and such high content of tetramethyluric acid in wild tea tree resources is firstly reported.

Keywords: *camellia assamica* var. *kucha*; dominant purine alkaloid; 1, 3, 7, 9-tetramethyluric acid; caffeine

^{*} School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China