

可可茶嘌呤生物碱的分离和分析^{*}

叶创兴¹⁾ 林永成²⁾ 周海云³⁾ 陈 芬³⁾ 李晓燕³⁾

(1) 中山大学生命科学学院; 2) 化学系; 3) 测试中心, 广州 510275)

摘 要 采用重量法对可可茶 (*Camellia ptilophylla* Chang) 嫩芽的嘌呤生物碱进行了分离和测定, 用硅胶薄层层析 TLC, 对所得产物与咖啡碱、可可碱和茶叶碱的标准品比较, 表明重量法分离得到的是咖啡碱和可可碱, 且纯度甚高. 又用核磁共振 ¹H NMR 对所得的产品进行了化学结构的测定, 也证明它们分别与标准品咖啡碱和可可碱的完全一致. 由此再一次证实纯系可可茶嘌呤生物碱以可可碱为主. 研究还从原生地移植的 2 株可可茶进行了种内个体嘌呤生物碱表现的研究, 结果表明 2 株茶树中有 1 株嘌呤生物碱以可可碱为主, 不含咖啡碱, 另外 4 株则以咖啡碱为主, 也含少量的可可碱.

关键词 可可茶 (*Camellia ptilophylla*), 嘌呤生物碱, 分离, 分析

分类号 Q 946.88

可可茶 (*Camellia ptilophylla* Chang) 是新发现的茶树资源^[1-3], 它和传统的栽培茶树 (*C. sinensis* (L.) O. Ktze) 和 *C. assamica* (Mast.) Chang 有密切的亲缘关系, 均具有被毛、室的子房, 但是已知可可茶嘌呤生物碱的主要成分是可可碱, 而咖啡碱则处于次要地位, 与栽培茶树以咖啡碱为主, 可可碱则处于从属地位恰恰相反. 饮茶有强烈兴奋神经的作用, 但近年来无兴奋作用的饮料受到人们越来越多的欢迎. 可可茶不但不会兴奋神经, 还具有强心、降低胆固醇、减肥、抗衰老等作用^[4,5]. 为了开发和利用可可茶这一珍贵的茶树资源, 必须对其种的稳定性、迁地移植、有性繁殖对可可碱含量的影响, 药理和生理的作用进行综合评价. 本文是关于可可茶种内个体生物碱动态研究的部分工作.

1 嘌呤生物碱的分离、鉴定

1.1 材 料

样品采自某国营林场栽培茶园及附近的野生茶树. I 号样品是红茶, II 号炒青茶样品是来自原生地的可可茶群体, III 号样品是蒸青茶. I 号和 III 号样品采自茶园的杂合群体种, I 号样品是大生产的产物, III 号样品是按照形态学标准, 在栽培茶园经过选择采摘的 1 芽 2 叶经隔水蒸青 15 min, 在 80℃ 的烘箱中烘干而成.

1.2 方 法

应用重量法单离出茶叶样品中嘌呤生物碱各组分, 用硅胶薄层层析进行检验, 同时应

* 国家自然科学基金 (3570081) 资助项目

收稿日期: 1997-02-28, 叶创兴, 男, 5 岁, 教授

用核磁共振技术, 测定分离产品的化学结构.

1.3 生物碱的分离过程

10 g 茶样加入 500 mL 水后, 加热浸提 30 min, 过滤后滤渣再加入 500 mL 水加热 30 min, 过滤. 2 次滤液合并, 加入醋酸铅溶液, 直至溶液不出现混浊为止 (约需醋酸铅 3 g), 静置, 过滤, 以除去茶多酚对嘌呤生物碱分析的影响. 将滤液浓缩到 80 mL, 趁热过滤, 用少量沸水洗涤滤渣. 待浓缩滤液冷却后, 析出粉状白色晶体, 过滤, 用少量冷水洗涤滤纸上产品, 经干燥, 得产品 A. 浓缩滤液经真空干燥后, 在分液漏斗中用 (15 mL × 3) 氯仿萃取, 将萃取液合并后过滤. 滤渣溶于热水, 过滤液蒸干后, 得到产品 C. 氯仿溶液浓缩至 15 mL 过滤, 滤纸上得物即为产品 B. 将最后的氯仿溶液蒸干, 得到白色晶体产品 D.

1.4 分析结果

合并产品 A、B 和 C 作为单离的可可碱, D 为单离的咖啡碱. 表 1 是 3 个样品嘌呤生物碱的分析结果.

1.5 单离产品的鉴定

应用荧光硅胶薄层析 TLC 对所得产品进行分离, 并与咖啡碱、可可碱、茶叶碱的标准品进行比较. 展开剂为乙酸乙酯-石油醚 ($v(\text{乙酸乙酯}):v(\text{石油醚})=3:7$). A、B、C 3 个产品的迁移率 R_f 值为 0.30, D 的 R_f 值为 0.48, 分别与标准品的咖啡碱和可可碱的迁移率完全一致.

A、B、C 的 $^1\text{H NMR}$ (90 FT, DM SO , TMS) δ 3.5, 4.0 为 2 个甲基, δ 7.0 为烯质子; D 的 $^1\text{H NMR}$ (90 FT, CDCl_3 , TMS) δ 3.4, 3.6, 4.0 为 3 个甲基, δ 7.8 为烯质子, 与标准品可可碱和咖啡碱的图谱完全一致. 证明它们是可可碱和咖啡碱.

2 种内个体嘌呤生物碱的分析

2.1 材料

从原生地移植到中山大学校园的可可茶树, 共调查 2 株, 茶样按 1 芽 2 叶采摘, 经隔水蒸青 15 min 后在 80°C 烘箱中干燥备用. 每棵茶树间隔 1 个月采样, 采 2 次样.

2.2 样品制备

称取样品 (0.500 ± 0.0005) g, 研磨成粉末后置于 250 mL 三角瓶中, 加入 50 mL 沸水, 在水浴中保持沸腾 30 min, 然后趁热过滤, 滤渣用 (50 mL × 2) 沸水浸提. 过滤后合并 3 次滤液, 滴加 4 mL 20% 的醋酸铅溶液, 以除去茶叶多酚类物质, 过滤, 在滤液中加入数滴 $v=70\%$ 的硫酸以除去多余的醋酸铅, 过滤液用水稀释到 250 mL.

分析条件: 荧光铝板硅胶薄层购自德国 Whatman 公司. 展开剂为氯仿-酒精 ($v(\text{氯仿}):v(\text{酒精})=3:7$), 用微量进样器吸取 $2\mu\text{L}$ 样品液点样. 标准品的迁移率可可碱 $R_f=0.7$, 咖啡碱 $R_f=0.86$.

高压液相色谱仪是具有资料处理系统的 Varian 5060, 样品液量为 $10\mu\text{L}$, 由进样器加到反相 ODS 柱 (250 mm × 4.6 mm, 粒径 $5\mu\text{m}$), 在波长 280 nm 处测量吸光度, 流动相为甲醇- H_2O ($v(\text{甲醇}):v(\text{H}_2\text{O})=8:20$), 流动速率为 1.0 mL/min .

表 1 3 个样品嘌呤生物碱重量法分析结果

样品	w(可可碱)	w(咖啡碱)	w(茶叶碱)
I	2.65	1.65	0
II	3.35	0.08	0
III	2.88	1.22	0

采用标准加入法, 通过计算峰面积作出标准曲线. 可可碱在浓度为 0.015 2, 0.023 2, 0.044 0, 0.076 0, 0.116 0, 0.132 0 mg/L 时, 峰面积对浓度的线性回归方程为 $y = 48.43x + 0.11$, $r = 0.99$; 咖啡碱在浓度为 0.020, 0.052, 0.084, 0.100 mg/L 时的线性回归方程是 $y = 46.44x + 0.08$, $r = 0.99$.

2.4 测定结果

荧光硅胶薄层析结束后, 置于紫外光下照射显影, 与可可碱、咖啡碱的标准品对照, 每株 2 个样品的结果完全一致. 22 株茶树中, 有 18 株以可可碱为主, 4 株以咖啡碱为主. 高压液相色谱定量测定各茶样, 其结果与薄层析结果完全一致 (见表 2).

表 2 22 株异地移植的可可茶树嘌呤生物碱 HPLC 分析结果

Tab. 2 Survey of purine alkaloids in 22 transplanted trees $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

样品编号	可可碱	茶叶碱	咖啡碱	样品编号	可可碱	茶叶碱	咖啡碱		
1	a	51.8	2.8	-	2	a	65.1	2.3	-
	b	59.9	3.6	-		b	65.6	2.4	-
3	a	47.4	0.014	-	4	a	8.2	4.1	42.1
	b	45.3	-	-		b	19.5	3.6	31.9
5	a	11.7	3.5	49.4	6	a	61.8	2.6	-
	b	20.3	3.1	43.9		b	64.2	2.4	-
7	a	17.6	3.4	41.5	8	a	51.5	3.8	-
	b	25.4	3.8	40.4		b	54.6	3.8	-
9	a	58.6	5.1	-	10	a	63.8	3.2	-
	b	63.0	3.3	-		b	58.7	3.3	-
11	a	51.4	4.5	-	12	a	60.0	4.1	-
	b	61.4	3.2	-		b	59.0	3.0	-
13	a	66.3	2.8	-	14	a	55.4	2.4	-
	b	62.4	2.3	-		b	54.6	1.8	-
15	a	49.3	2.9	-	16	a	55.7	3.7	-
	b	52.3	3.4	-		b	55.5	4.3	-
17	a	9.9	1.4	35.6	18	a	50.2	2.9	-
	b	5.7	-	30.2		b	55.7	2.5	-
19	a	59.2	2.9	-	20	a	55.9	3.7	-
	b	68.4	5.1	-		b	52.8	4.7	-
21	a	53.6	2.7	-	22	a	49.7	3.2	-
	b	58.4	3.6	-		b	51.4	2.7	-

采样时间: a 为 1995 年 7 月, b 为 1995 年 8 月; 样品 3a 为 1992 年 7 月, 3b 为 1992 年 8 月

3 讨论

(1) 传统的茶叶嘌呤生物碱以咖啡碱为主, 而可可茶以可可碱为主, 本文以重量法分析, 单离出各嘌呤碱, 并以 TLC 和 $^1\text{H NMR}$ 检测各产物, 再次证实可可茶含可可碱为主.

采用重量法系基于茶叶中各嘌呤碱在冷、热水中及氯仿中溶解度不同. 首先用较大量的沸水经两次浸提, 无论咖啡碱、可可碱、茶叶碱均完全溶于热水. 可可碱在冷水和热水的溶解度差别很大, 而咖啡碱和茶叶碱在冷热水中的溶解度均很大, 因此浓缩至 80 mL 再经冷却的滤液, 大部分的可可碱首先析出. 以 III 号样品为例, A 得可可碱 261 mg, B 得 9 mg, C 得 18 mg, 由此可见, 经 2 次浸提茶样后, 在 A 中获得的可可碱, 占所获得可可碱总量 288 mg 的 90.6%. 咖啡碱易溶于氯仿, 而可可碱和茶叶碱则难溶于氯仿, 这样用水提取可可碱

后的咖啡碱和茶叶碱溶液, 再用氯仿萃取可单独分离出咖啡碱. TLC和¹H NMR检测表明用重量法分离茶叶嘌呤碱是可行的, 误差亦较小.

(2) 用重量法分析的 3 个样品, II 号炒青茶主要含可可碱, 含微量的咖啡碱, 说明该原产地的可可茶种群比较纯. I 号红茶与 III 号蒸青茶系来自栽培茶园可可茶与普洱茶的混合群体种, 采摘时虽依据一定的形态学标准进行, 但不是纯的可可茶种群. 其结果正是这种混合情况的反映, 虽然样品测试结果表明可可碱的含量较高.

(3) 2 株从野外引种至中山大学的可可茶经薄层析与高压液相色谱分析的结果表明, 其中 4 株茶树其嘌呤生物碱以咖啡碱为主, 占总株数的 18%, 其余 1 株以可可碱为主. 4 株含可可碱为主的茶树, 其中 3 株在外形上与其他含可可碱的茶树几不可分. 这种情况与文献 [6] 的情况有相似之处. 经连续 7 个月茶样分析结果表明, 含可可碱为主的茶树含可可碱的性质未改变. 当然种内个体嘌呤生物碱的稳定性需要更多的研究资料来加以说明.

致谢: 本研究部分工作是在加拿大不列颠哥伦比亚大学植物系完成的, 对 Iain E P Taylor 教授和 Ray Kline 先生提供的帮助谨表深深的谢忱.

参 考 文 献

- 1 张宏达. 山茶属植物的系统研究. 中山大学学报论丛, 1981 (1): 122~ 123
- 2 张宏达, 叶创兴, 张润梅, 等. 中国发现新的茶叶资源——可可茶. 中山大学学报 (自然科学版), 1988 (3): 131~ 133
- 3 张宏达, 张润梅, 叶创兴. 山茶属系统发育诠释 (IV). 中山大学学报 (自然科学版), 1996, 35 (3): 11~ 18
- 4 许实波, 何北兴, 冯建林, 等. 毛叶茶提取物的急性毒性、降血压和心脏生理效应的研究. 中山大学学报 (自然科学版), 1990, 29 (增刊): 178~ 184
- 5 许实波, 王向谊, 郭文成, 等. 毛叶茶提取物的药理作用. 中山大学学报 (自然科学版), 1990, 29 (增刊): 185~ 189
- 6 叶创兴, 刘称心, 张润梅. 可可茶易地移植后可可碱的变化. 中山大学学报 (自然科学版), 1996, 35 (增刊 2): 58~ 60

Isolation and Analysis of Purine Alkaloids from *Camellia ptilophylla* Chang

Ye Chuangxing* Lin Yongcheng Zhou Haiyun Cheng Feng Li Xiaoyan

Abstract Purine alkaloids from flushed shoots of *Camellia ptilophylla* Chang and other tea trees were isolated and analyzed by exhaustive extraction. The products were detected by TLC and ¹H NMR and are identical to the standards of caffeine and theobromine respectively. It shows that *C. ptilophylla* is different from cultivated tea trees with containing mainly caffeine. Twenty-two trees were surveyed by TLC and HPLC, eighteen of them mainly contained theobromine ranging from 4.97% to 6.84% and without caffeine; and four of them not only contained predominant caffeine but also theobromine. It is necessary to continue studying the stability that *C. ptilophylla* contains predominant theobromine from heredity.

Keywords *Camellia ptilophylla*, purine alkaloids, isolation, analysis

* School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275