

## 8-氧化咖啡因和嘧啶类生物碱在普洱熟茶中的存在\*

折改梅<sup>1,2</sup>, 陈可可<sup>1</sup>, 张颖君<sup>1\*\*</sup>, 杨崇仁<sup>1\*\*</sup>

(1 中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室,  
云南 昆明 650204; 2 北京中医药大学, 北京 100029)

**摘要:** 应用柱层析分离技术, 从普洱熟茶中首次分离到 8-氧化咖啡因, 嘧啶类生物碱 (胸腺嘧啶脱氧核苷、胸腺嘧啶和尿嘧啶), 黄酮类配糖体 (黄杞甙), 以及简单酚类化合物 (1, 2, 4-苯三酚、1, 3-苯二酚和 4-甲基-1, 2-二苯酚)。由于普洱熟茶是由大叶茶经微生物后发酵生产的, 8-氧化咖啡因显然是茶叶中的咖啡因在微生物作用下形成的转化产物。胸腺嘧啶脱氧核苷亦可能是茶叶中的嘧啶类生物碱与微生物中的核苷类化合物在后发酵过程中缩合形成的。二者均为新发现的普洱熟茶的特征性成分。

**关键词:** 普洱熟茶; 8-氧化咖啡因; 嘧啶类生物碱

中图分类号: Q 946

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700 (2007) 06-713-04

## The Occurrence of 8-oxocaffeine and Pyrimidine Alkaloids in Pu-Er Ripe Tea

SHE Gai-Mei<sup>1,3</sup>, CHEN Ke-Ke<sup>1</sup>, ZHANG Ying-Jun<sup>1\*\*</sup>, YANG Chong-Ren<sup>1\*\*</sup>

(1 State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China;  
2 Beijing University of Chinese Traditional Medicine, Beijing 100029, China)

**Abstract:** By means of column chromatographic techniques, 8-oxocaffeine, together with pyrimidine alkaloids (deoxythymidine, thymine and uracil), flavonoidal glycoside (engeletin) and simple phenols (1, 2, 4-benzenetriol, 1, 3-benzenediol and 4-methyl-1, 2-benzenediol) were isolated for the first time from Pu-Er ripe tea. Since Pu-Er ripe tea is produced from the leaves of *Camellia sinensis* var. *assamica* by the post microbial fermentation process, the formation of 8-oxocaffeine should be due to the biotransformation of caffeine. On the other hand, deoxythymidine might be derived from the combination of pyrimidine alkaloid in tea leaves with microbial secondary metabolite. Both of them were found to be the new characteristic principles of Pu-Er ripe tea.

**Key words:** Pu-Er ripe tea; 8-oxocaffeine; Pyrimidine alkaloids

普洱茶是以云南大叶茶 [*Camellia sinensis* (Linn.) var. *assamica* (Masters) Kitamura] 为原料制作的茶类。普洱茶可分为普洱生茶 (Pu-Er raw tea), 普洱陈茶 (Pu-Er aging tea) 和普洱熟茶 (Pu-Er ripe tea) 等三大系列 (杨崇仁等, 2006)。普洱生茶是未经过发酵生产的晒青毛茶, 既可作

为绿茶饮用又可通过后发酵过程转化为普洱陈茶或普洱熟茶。普洱熟茶则是由普洱生茶经过微生物参与的后发酵过程生产得到的。

我们曾对普洱茶的化学成分进行研究, 从普洱生茶中分离到大量的酚类成分, 包括: (+) 儿茶素、(-) 表儿茶素 (EC)、(±) 没食子儿茶

\* 基金项目: 云南省科技厅省院省校合作项目和云南省生物创新办公室专项基金支持

\*\* 通讯联系人 Corresponding author, E-mail: zhangyj@mail.kib.ac.cn, cryang@mail.kib.ac.cn

收稿日期: 2007-08-03, 2007-08-17 接受发表

作者简介: 折改梅 (1976-) 女, 博士研究生, 主要从事药用和茶用植物资源与化学研究。

素 (GC)、(-) 表没食子儿茶素 (EGC)、(-) 表儿茶素-3-O-没食子酸酯 (ECG)、(-) 表没食子儿茶素-3-O-没食子酸酯 (EGCG)、(-) 表阿福豆素-3-O-没食子酸酯、槲皮素、槲皮素-3-O- -D-葡萄糖吡喃糖甙、芦丁、山奈酚、山奈酚-3-O- -D-葡萄糖吡喃糖甙、山奈酚-3-O-芦丁糖甙、小木麻黄素 (saictinin)、1, 6-O-二没食子酰基- -D-葡萄糖吡喃糖、茶倍素、绿原酸、3, 5-二羟基-4- -O-咖啡酰基金鸡纳酸、松柏醇甙、没食子酸; 以及咖啡因 (周志宏和杨崇仁, 2000)。

普洱熟茶的化学成分与普洱生茶有显著的差别, 我们曾报道金鸡纳素 (cinchonain) 型的酚类化合物, 包括普洱茶素 (puerin) A (1) 和 B (2), 以及 epicatechin -[7, 8-bc]-4-(4-hydroxyl-phenyl)-dihydro-2(3H)-pyranone (3) 和 cinchonain Ib (4),

为普洱熟茶的特征成分 (图 1)。其中, 化合物 1 和 2 为新化合物, 3~4 系首次从茶科植物中分离得到。从普洱熟茶中我们还分离到 (+)-儿茶素 (C)、(-) 表儿茶素 (EC)、(±) 没食子儿茶素 (GC)、(-) 表没食子儿茶素 (EGC)、(-)-表没食子酸葡萄糖甙、没食子酸、山奈酚、山奈酚-3-O- -D-葡萄糖吡喃糖甙、山奈酚-3-O-芦丁糖甙、槲皮素、槲皮素-3-O- -D-葡萄糖吡喃糖甙、杨梅素 (myricetin)、2, 2, 6, 6-四羟基二苯和 2, 5-二羟基苯甲酸等酚类化合物, 以及咖啡因 (Zhou 等, 2005; 林智等, 2006)。

为了进一步阐明普洱熟茶的物质基础, 系统的化学研究仍在深入进行中。本文在已有的工作基础上, 报道从云南省双江县产的普洱熟茶中新分离得到的生物碱和酚性化合物。

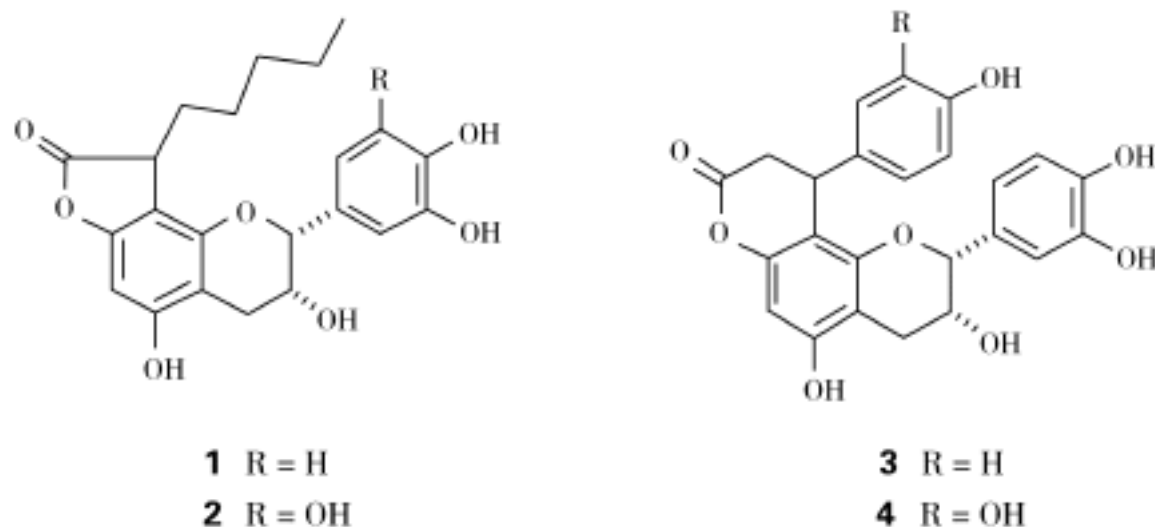


图 1 普洱熟茶中的特征成分

Fig. 1 Characteristic components 1-4 isolated from Pu-Er ripe tea

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与材料

1D, 2D-NMR 谱在氘代溶剂 ( $CD_3COCD_3 + D_2O$ ,  $CD_3OD$ ) 中用 Bruker AM-400 和 DRX-500 核磁共振仪测定, TMS 为内标, 化学位移用 ppm ( $10^{-6}$ ) 表示, 偶合常数 J 用 Hz 表示。质谱在 VG Auto Spec-3000 质谱仪上测定。柱层析用 Diaion HP20SS (Mitsubishi Chemical Co.), MCI-gel CHP-20 (75 ~ 150  $\mu m$ , Mitsubishi Chemical Co.), Sephadex LH-20 (25 ~ 100  $\mu m$ , Pharmacia Fine Chemical Co. Ltd.), Chromatorex ODS (100 ~ 200 mesh, Fuji Silysia Chemical Co. Ltd.) 和硅胶 H (青岛海洋化工厂), 薄层层析用预制硅胶板 H (0.20 ~ 0.25 mm, 青岛海洋化工厂), 薄层层析展开剂为苯-乙酸乙酯-甲酸或氯仿-甲醇-水, 显色剂为 5% 三氯化铁乙醇溶液或 5% 硫酸乙醇溶液, 加热显色。

普洱熟茶样品由云南省临沧市双江县双江勐库茶厂生产。

### 1.2 提取和分离

普洱熟茶 (10 kg) 用 60% 丙酮室温冷浸 3 次, 过滤, 合并滤液, 减压回收丙酮后通过 Sephadex LH-20 柱层析, 以 MeOH- $H_2O$  (1:0 ~ 0:1) 和 50% 丙酮梯度洗脱, 得到 11 个组分 (Fr.1-11)。Fr.1 经 MCI-gel CHP-20P, Sephadex LH-20 和 Chromatorex ODS 等柱层析反复分离, MeOH- $H_2O$  系统洗脱, 得到化合物 5 (7 mg), 6 (10 mg), 7 (54 mg) 和 8 (5 mg)。Fr.2 用 MCI-gel CHP-20P 和 Sephadex LH-20, Chromatorex ODS 等柱层析反复分离, 以 MeOH- $H_2O$  梯度洗脱, 纯化得到化合物 9 (2 mg) 和 12 (15 mg)。Fr.8 用 MCI-gel CHP-20P, Toyopearl HW-40F 和 Sephadex LH-20 柱层析反复分离, MeOH- $H_2O$  洗脱, 得到 10 (7 mg)。同样, 从 Fr.10 部分得到化合物 11 (11 mg)。

### 1.3 鉴定

胸腺嘧啶脱氧核苷 (deoxythymidine) (5), 白色粉末, FAB<sup>-</sup> MS  $m/z$  241 [M-H]<sup>-</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 8.33 (s, H-6), 1.85 (s, H-7), 6.55 (t,  $J=6.9, 6.7$  Hz, 1-H), 2.60 (m, 2-H), 4.75 (m, 3-H), 4.26 (m, 4-H), 4.06 (dd,  $J=11.8, 3.21$  Hz, 5-H) 和 <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 12.1 (C-7), 39.9 (C-2), 71.2 (C-3), 85.8 (C-1), 87.5 (C-4), 111.0 (C-5), 137.5 (C-6), 151.5 (C-2), 165.5 (C-4)。(崔征等, 1995)

胸腺嘧啶 (thymine) (6), 白色粉末, EI-MS  $m/z$  126; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 8.46 (s, H-6), 1.76 (s, H-7) 和 <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 153.6 (C-2), 166.6 (C-4), 109.0 (C-5), 138.9 (C-6), 12.5 (C-7)。

尿嘧啶 (uracil) (7), 白色粉末, 负离子, FAB<sup>+</sup>-MS  $m/z$  113 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 5.42 (d,  $J=7.6$  Hz, H-5), 7.36 (d,  $J=7.6$  Hz, H-6) 和 <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 151.5 (C-2), 164.4 (C-4), 110.0 (C-5), 142.2 (C-6)。

8-氧化咖啡因 (8-oxocaffeine) (8), 白色粉末, 负离子 FAB<sup>-</sup> MS  $m/z$  209 [M-H]<sup>-</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>) 3.17 (s, NMe), 3.32 (s, NMe), 3.34 (s, NMe)。 <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 28.2 (Me), 28.6 (Me), 31.2 (Me), 100.1 (C-4), 148.3 (C-5), 151.5 (C-2), 154.7 (C-6), 162.0 (C-8)。(Stadler and Fay, 1995)

黄杞甙 (engeletin) (9), 黄色粉末, 负离子, FAB<sup>-</sup> MS  $m/z$  431 [M-H]<sup>-</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) 6.27 (br s, H-6), 6.46 (br s, H-8), 6.88 (d,  $J=8.6$  Hz, H-2), 7.78 (d,  $J=8.6$  Hz, H-3), 7.78 (d,  $J=8.6$  Hz, H-5), 6.88 (d,  $J=8.6$  Hz, H-6), 5.01 (d, rha

H-1), 1.22 (d,  $J=6.0$  Hz, rha H-6)。(Krishnamachari 等, 2002)

1, 2, 4-苯三酚 (1, 2, 4-benzenetriol) (10), 白色粉末, 负离子 FAB<sup>-</sup> MS  $m/z$  125 [M-H]<sup>-</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 6.89 (H, br s, H-3), 7.07 (1H, d,  $J=8.2$  Hz, H-4), 6.05 (1H, d,  $J=8.2$  Hz, H-6)。

1, 3-苯二酚 (1, 3-benzenediol) (11), 白色粉末, 负离子 FAB<sup>-</sup> MS  $m/z$  109 [M-H]<sup>-</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD), 6.78 (2H, d,  $J=8.9$  Hz, H-2, 4), 8.35 (1H, d,  $J=8.9$  Hz, H-3), 7.35 (1H, br s, H-6)。

4-甲基-1, 2-二苯酚 (4-methyl-1, 2-benzenediol) (12), 白色粉末, 负离子 FAB<sup>-</sup> MS  $m/z$  124 [M-H]<sup>-</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 7.38 (1H, brs, H-3), 6.84 (1H, d,  $J=8.2$  Hz, H-5), 7.32 (1H, d,  $J=8.2$  Hz, H-6); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 149.6 (s, C-1), 144.5 (s, C-2), 115.5 (d, C-3), 123.9 (s, C-4), 123.4 (d, C-5), 117.2 (d, C-6), 50.2 (q, C-7)。

## 2 结果与讨论

云南省双江县产的普洱熟茶的丙酮提取物, 经 Sephadex LH-20, MCI-gel CHP-20P, Chromatorex ODS, 和 Toyopearl HW-40F 等柱层析反复分离, 得到 8 个化合物, 包括 8-氧化咖啡因 (8-oxocaffeine) (8) (Stadler and Fay, 1995), 以及嘧啶类生物碱: 胸腺嘧啶脱氧核苷 (deoxythymidine) (5), 胸腺嘧啶 (thymine) (6) 和尿嘧啶 (uracil) (7), 黄酮类配糖体: 黄杞甙 (engeletin) (9) (Krish-

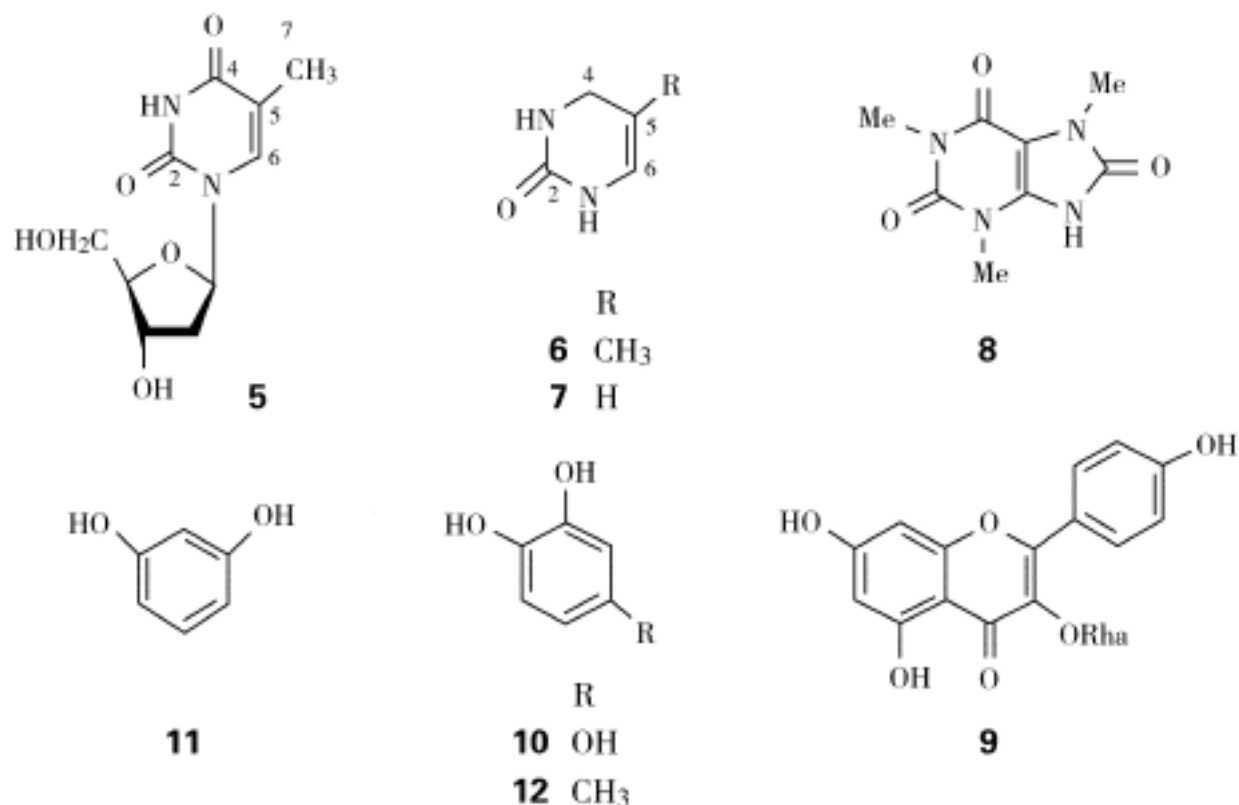


图 2 从云南省双江县产普洱熟茶中分离得到化合物 5~12

Fig. 2 Compounds 5 - 12 isolated from Pu-Er ripe tea

namachari, 2002), 以及简单酚类化合物: 1, 2, 4-苯三酚 (1, 2, 4-benzenetriol) (10)、1, 3-苯二酚 (1, 3-benzenediol) (11) 和 4-甲基-1, 2-二苯酚 (4-methyl-1, 2-benzenediol) (12) (图 2)。这些化合物均为首次从普洱熟茶中分离得到。

已知茶叶中富含嘌呤类生物碱类化合物, 如: 咖啡因、可可碱、茶碱、黄嘌呤、鸟嘌呤等。已报道 8-氧化咖啡因 (8) 为咖啡在炒制、磨碎和速溶等加工过程中由咖啡因氧化形成的, 是加工咖啡的标志性成分, 具有显著的抗氧化活性, 至今尚未从茶叶中分离到。我们从普洱熟茶中首次分离到 8-氧化咖啡因 (8), 显然是普洱茶在高温高湿的后发酵过程中, 在微生物的作用下经生物转化形成的产物, 对于普洱熟茶的品质和生理活性评价有着重要的意义。

嘧啶类生物碱 (如: 尿嘧啶、胸腺嘧啶和胞嘧啶等) 亦存在于茶叶等高等植物中。而核苷和脱氧核苷则是微生物和动物生殖细胞的构成成分, 极少在植物中发现。该类化合物参与 DNA 代谢过程, 是 DNA 和 RNA 的组成, 具有显著的生理活性 (Kinahan 等, 1981)。胸腺嘧啶脱氧核苷 (5) 主要存在于海洋生物中, 也有报道从贝母和竹叶菜 (*Smilacina atropurpurea*) 中分离得到 (崔征等, 1995; 饶志刚等, 1997; 严忠红等, 1999; 杨顺利和刘锡葵, 2003), 是抗 AIDS 病药物 Stavudine and Zidovudine (AZT) 合成的中间体。我们从普洱熟茶中首次分离到胸腺嘧啶脱氧核苷 (5), 有可能是茶叶中的嘧啶类生物碱与微生物中的核苷类化合物在后发酵过程中缩合形成的。

## 〔参 考 文 献〕

- 杨崇仁, 陈可可, 张颖君, 2006. 茶叶的分类与普洱茶的定义 [J]. 茶叶科学技术, 2: 854—855
- Cui Z (崔征), Yan D (袁丹), Jiang ZR (江泽荣) *et al.* 1995. Chemical constituents of the sponge *Tylotella* sp. [J]. *Chin J Nat Med* (中国药学杂志), 30 (9): 524—526
- Kinahan JJ, Kowal EP, Grindey GB, 1981. Biochemical antitumor effects of the combination of thymidine and 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine against leukemia L4210 [J]. *Cancer Res*, 41 (2): 445
- Krishnamachari V, Levine LH, Pare PW, 2002. Unified mechanism for quercetin radical scavenging [J]. *J Agric Food Chem*, 50 (15): 4357—4363
- Lin Z (林智), Lv HP (吕海鹏), Cui WR (崔文锐) *et al.* 2006. Study on antioxidative polyphenol compounds in Pu'er tea [J]. *J Tea Sci* (茶叶科学), 26 (2): 112—116
- Rao ZG (饶志刚), Deng SZ (邓松之), Li FY (李凤英), 1997. Studies on the chemical constituents of the soft coral *Sarcophyton molle* from South China Sea [J]. *Chin J Organic Chem* (有机化学), 17 (3): 252—255
- Stadler RH, Fay LB, 1995. Antioxidative reactions of caffeine formation of 8-oxocaffeine (1, 3, 7-trimethyluric acid) in coffee subjected to oxidative stress [J]. *J Agric Food Chem*, 43 (5): 1332—1338
- Yang SL (杨顺利), Liu XQ (刘锡葵), 2003. Nucleosides from *Smilacina atropurpurea* [J]. *Chin J Nat Med* (中国天然药物), 1 (4): 321—323
- Yan ZH (严忠红), Lu Y (陆阳), Ding WG (丁维功) *et al.* 1999. Studies on the chemical constituents of *Fritillaria cirrhosa* D. Don [J]. *Acta Universitatis Medicinalis Secundae Shanghai* (上海第二医科大学学报), 19 (6): 487—489
- Zhou ZH (周志宏), Yang CR (杨崇仁), 2000. Chemical constituents of crude green Tea, the material of Pu-er Tea in Yunnan [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 22 (3): 343—350
- Zhou ZH, Zhang YJ, Xu M *et al.* 2005. Puerins A and B, two new 8-C substituted flavan-3-ols from Pu-Er tea [J]. *J Agric Food Chem*, 53 (22): 8614—8617