文章编号:1001-6880(2018)Suppl-0044-06

四川茶树精油化学成分及其对痤疮丙酸杆菌的抑制作用研究

高永生[1],张淑雯[2],闵　烨[2],朱丽云[1,3]*,宋林珍[1],李素芳[1]

[1]中国计量大学芳香工程技术研发中心;[2]中国计量大学现代科技学院,杭州 310018;

[3]安徽汉芳生物科技有限公司,淮北 235000

摘　要:为研究中国产茶树精油的成分与医用功效,采用水蒸气蒸馏法从四川茶树叶和嫩枝中提取精油,以GC/MS技术对茶树精油进行化学成分分析,并考察了对痤疮丙酸杆菌的抑制作用。GC/MS测定结果表明,共分离出100余种化学成分,含量高于0.1%的成分有44种,占挥发油总量的95.75%。主要为萜烯和萜醇,其含量分别为60.14%和34.18%。萜醇中的松油烯-4-醇含量最高,达到了24.43%,其它含量较高的成分以萜烯类为主。抗菌实验发现,茶树精油对痤疮丙酸杆菌具有较强的抑制作用,且随着浓度增加而增强。高含量的单萜烯、倍半萜烯和松油烯-4-醇可能是茶树精油发挥功效的主要成分。

关键词:茶树精油;痤疮丙酸杆菌;成分分析;抑菌作用

中图分类号:R284.2　　**文献标识码**:A　　DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.S.006

Chemical Composition and Inhibitory Effect on *Propionibacterium acnes* of Sichuan Tea Tree Oil

GAO Yong-sheng[1],ZHANG Su-wen[2],MIN Ye[2],ZHU Li-yun[1,3]*,SONG Lin-zhen[1],LI Su-fang[1]

[1]*Aromatic Engineering Technology Research and Development Center,China Jiliang University*;

[2] *College of Modern Science and Technology,China Jiliang University,Hangzhou 310018,China*;

[3)] *Anhui Hanfang Biontechnology Co.,Ltd. Huaibei 235000,China*

Abstract:In order to study the chemical composition and medical efficacy of Tea tree oil produced in China,the essential oil of *Melaleuca ahemifolia* leaves and shoots from Sichuan was extracted by water vapor distillation,analyzed by GC/MS technology,and the antimicrobial activity against *Propionibacterium acnes* was analyzed by agar diffusion method. The results showed that more than 100 kinds of ingredients were identified and determined in the tea tree oil,including 44 kinds components more than 0.1%,accounted for 95.75% of total area of the peak,and the major components were terpene(60.14%) and terpene alcohol(34.18%). The terpinen-4-ol(24.43%) was the highest. Antimicrobial activity of tea tree oils was observed against *Propionibacterium acnes*,and the inhibition increased with concentration of oil increase. Having in account the important antimicrobial properties observed in present work,we consider that teatree oil might be useful on pharmaceutical as natural antibiotic,themonoterpene,sesquiterpene and Terpinen-4-ol may be important compositions.

Key words:tea tree oil,*propionibacterium acnes*,chemical composition,antimicrobial activity

茶树(*Camellia sinensis*),桃金娘科白干层属,原产澳洲东北部沿海地区南纬23.5度附近新南威尔士,现中国云南、广西、福建、四川等地均有大面积种植,是一种粗壮、生长速度快、抵抗力较强的常绿乔木。茶树精油(Tea tree oil),提取自茶树叶和嫩枝,属白干层4-松油醇型香精油[1],具有草本香、气味浓郁,其组分非常复杂,多达上百种。据报道,茶树精油具有抗菌抗病毒[2]、抗虫[3,4]、除螨[5]、消炎[6]、抗癌[7]等作用。对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、白色念珠菌、烟曲霉的杀灭率均为100%,具有较强的抗菌作用[8],其杀菌效果是石碳酸的11-13倍[9]。茶树精油可改善皮肤再生、促进复愈,对健康组织无伤害,对难以治愈的伤口效果显著[10],因此茶树精油广泛出现在各种皮肤疾病治疗的化妆品、外用药品和家用产品中。茶树精油因其抗菌除螨的功效出现在多种祛痘产品配方中,而痤

收稿日期:2017-09-06　　接受日期:2018-05-30

基金项目:国家自然科学基金(31571845);国际合作项目(40-16);浙江省重点科技创新团队项目(2010R50028)

*通信作者 Tel:86-571-86835703;E-mail:02a1803036@cjlu.edu.cn

天然产物研究与开发

疮(又称青春痘、暗疮、粉刺等)与痤疮丙酸杆菌极其相关[11],为分析国内四川产茶树精油的具体成分及其祛痘功效,采用琼脂扩散法考察茶树精油对痤疮丙酸杆菌的抑制作用,对茶树精油相关产品的开发提供理论基础。

1　材料与方法

1.1　实验材料

1.1.1　原料与菌株

茶树树叶和嫩枝,由南宁万家辉香料有限公司提供。

痤疮丙酸杆菌(*Propionibacterium acnes*),本校实验室提供。

克林霉素,购自上海纪宁。

1.1.2　仪器设备

气相色谱-质谱联用仪 Agilent 6890/5973(美国安捷伦)、油浴锅(浙江纳德)、挥发油提取仪(天宫玻璃仪器厂)、超净工作台(山东博科生物)、生化培养箱(上海时捷)。

1.2　方法

1.3.1　茶树精油的提取

称取 1000 克茶树树叶与嫩叶,以 1∶3料液比粉碎,加入 5 L 蒸馏烧瓶中,150 ℃油浴加热,沸腾后开始计时,蒸馏 2 h 停止,趁热收集精油,加无水亚硫酸钠脱水,称重,换算每 100 g 茶树叶与嫩枝中精油含量。

1.3.2　茶树精油的 GC-MS 分析[12,13]

气相色谱条件:载气为 He,分压阀压力为 0.5 Mpa;柱流量 1.2 mL/min,HP-5 毛细管柱(30 m × 250 μm × 0.25 μm)。程序升温条件:初始温度为 50 ℃,保持 3 min,以 8 ℃/min 升温至 250 ℃,保持 3 min。进样量 1 μL。进样口温度 280 ℃;分流比:40∶1,溶剂延迟 3 min。

质谱条件:电离方式为 EI,电子能量 70 eV;辅加热区 280 ℃;离子源温度 230 ℃,四级杆温度为 150 ℃,质量扫描模式全扫描,扫描范围:*m/z* 50-500。所得质谱图经 NIST 08 标准谱库进行检索,按峰面积归一化法计算各组分相对含量。

1.3.3　茶树精油的抑菌作用测定

将茶树精油用二甲基亚砜溶液分别稀释成为 0.2%、0.4%、0.8%、1.6%、3.2%、6.4% 的茶树精油梯度溶液。痤疮丙酸杆菌在硫乙醇盐液体培养基中活化后,制成 10^6 cfu/mL 的浓度,备用。硫乙醇盐液体培养基加 2% 琼脂制成固体培养基、灭菌,倒平板,冷却凝固。取 0.2 mL 痤疮丙酸杆菌悬液均匀涂布到于平板培养基。用镊子取直径 6 mm 的灭菌滤纸片,向滤纸片上分别滴加 100 μL 不同浓度的茶树精油溶液,37 ℃下厌氧培养 24 h,以不加精油的二甲基亚砜做空白对照,以与茶树精油相应浓度的克林霉素分别做阳性对照,每个浓度设 3 组平行。并采用硫乙醇盐液体培养基测定茶树精油对痤疮丙酸杆菌的最低抑菌浓度(MIC)。

2　结果与分析

2.1　茶树精油化学成分分析

采用 GC-MS 技术测定了茶树精油的化学成分,总离子流图见下图 1,

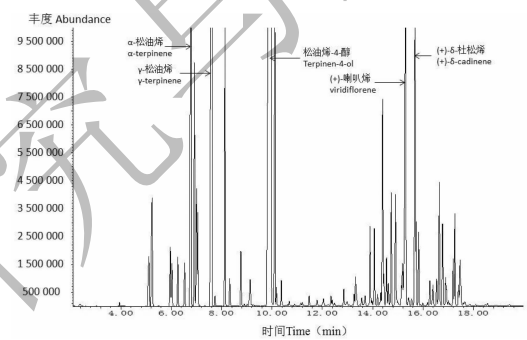

图 1　茶树精油的 GC-MS 测定总离子流图

Fig. 1　GC-MS Total ion current of tea tree oil

从图 1 可知,茶树精油组分出峰时间主要在 5-18 min 之间,含量最高的为保留时间接近 10 min 的一种成分,在离子流图中表现为平头峰,另有 7 ~ 8 种含量较高的成分,除此以外其他组分较多但含量较低。GC-MS 分析结果通过质谱碎片解离规律及数据库比对分析,鉴定茶树精油化学成分近 100 种,相对含量高于 0.1% 的成分 44 种,列于下表 1 中。

表 1 结果显示,茶树精油中相对含量高于 0.1% 的成分占总量的 95.75%,主要由萜烯(包括单萜烯 34.1% 和倍半萜烯 26.04%)与萜醇(单萜醇 31.54% 和和倍半萜醇 2.64%)组成,其中单萜醇中松油烯-4-醇含量最高,达到了 24.43%,国家标准(GB1886.270-2016)中对松油烯-4-醇和 1,8-桉叶素在茶树油中的含量有规定[14],要求松油烯-4-醇含量在 30% ~48% 之间,1,8-桉叶素含量小于 15%,四川产茶树油松油烯-4-醇含量偏低,此现象在王懿等人[15]报道国内精油松油烯-4-醇(25.74%)普遍偏低的结果一致。其它含量较高的成分除 α-松油醇

天然产物研究与开发

表 1　茶树精油的主要成分分析

Table 1　GC-MS analysis results of TTO

编号 No.	保留时间 t_R (min)	化合物 Compounds	分子式 Molecular formula	结构式 Structural formula	归类 Classify	相对含量 Relative contents (%)
1	5.11	α-Thujene 苧烯崖柏烯	$C_{10}H_{16}$		Monoterpene 单萜烯	0.94
2	5.242	(+)-α-Pinene, (+)-α-蒎烯	$C_{10}H_{16}$		Monoterpene 单萜烯	2.09
3	5.962	sabinene, 桧烯	$C_{10}H_{16}$		Monoterpene 单萜烯	0.8
4	6.028	(-)-β-Pinene, (-)-β-蒎烯	$C_{10}H_{16}$		Monoterpene 单萜烯	0.59
5	6.263	β-Myrcene, 月桂烯	$C_{10}H_{16}$		Monoterpene 单萜烯	0.6
6	6.532	α-Phellandrene, α-水芹烯	$C_{10}H_{16}$		Monoterpene 单萜烯	0.55
7	6.786	α-Terpinene, α-松油烯	$C_{10}H_{16}$		Monoterpene 单萜烯	7.6
8	6.923	o-Cymene 邻伞花烃	$C_{10}H_{14}$		Monoterpene 单萜烯	2.83
9	7.012	β-Phellandrene, β-水芹烯	$C_{10}H_{16}$		Monoterpene 单萜烯	2.47
10	7.054	1,8-Cineole, 1,8-桉叶素	$C_{10}H_{18}O$		Monoterpeol 单萜醇	0.96
11	7.615	γ-Terpinene; γ-松油烯	$C_{10}H_{16}$		Monoterpene 单萜烯	12.08
12	8.137	Terpinolene; 萜品油烯	$C_{10}H_{16}$		Monoterpene 单萜烯	3.55
13	8.321	Cyclohexanol, 1-Methyl-4-(1-methylethenyl)-, cis-; β-松油醇	$C_{10}H_{18}O$		Monoterpeol 单萜醇	0.47
14	8.768	1-methyl-4-(1-methylethyl)-2-cyclohexen-1-ol; 反式-4-(异丙基)-1-甲基环己-2-烯-1-醇	$C_{10}H_{18}O$		Monoterpeol 单萜醇	1.22
15	9.964	Terpinen-4-ol; 松油烯-4-醇	$C_{10}H_{18}O$		Monoterpeol 单萜醇	24.43
16	10.115	α-Terpineol; α-松油醇	$C_{10}H_{18}O$		Monoterpeol 单萜醇	3.95
17	10.374	(+/-)-cis-Piperitol; 薄荷醇	$C_{10}H_{18}O$		Monoterpeol 单萜醇	0.51
18	11.476	3-Amino-1H-pyrazole-4-carboxylic acid; 3-氨基吡嗪-4-羧酸	$C_4H_5N_3O_2$		Heterocycle 杂环类	0.13
19	12.342	(2*E*,4*E*)-Hexa-2,4-dienoic acid; 山梨酸	$C_6H_8O_2$		Acid 酸类	0.13
20	12.851	(-)-α-Cubebene; (-)-α-荜澄茄油烯	$C_{15}H_{24}$		Sesquiterpene 倍半萜烯	0.24
21	12.987	2,5-Dimethyl-2,4-hexadiene; 2,5-二甲基-2,4-己二烯	C_8H_{14}		Olefins 烯烃	0.11
22	13.322	α-Copaene; α-蒎烯	$C_{15}H_{24}$		Sesquiterpene 倍半萜烯	0.54
23	13.567	β-Elemene; β-榄香烯	$C_{15}H_{24}$		Sesquiterpene 倍半萜烯	0.14
24	13.703	O-Methyleugenol; 甲基丁香酚	$C_{11}H_{14}O_2$		Phenol 酚类	0.19
25	13.896	(-)-α-Gurjunene; (-)-α-古芸烯	$C_{15}H_{24}$		Sesquiterpene 倍半萜烯	1.19

天然产物研究与开发

续表 1(Continued Tab. 1)

编号 No.	保留时间 t_R (min)	化合物 Compounds	分子式 Molecular formula	结构式 Structural formula	归类 Classify	相对含量 Relative contents (%)
26	14.07	(-)-β-Caryophyllene;β-石竹烯	$C_{15}H_{24}$		Sesquiterpene 倍半萜烯	1
27	14.193	3,3,7,7-Tetramethyl-5-(2-methylprop-1-en-1-yl) tricyclo[4.1.0.02,4]heptane; 3,3,7,7-四甲基-5-(2-甲基-1-丙烯-1-基)三环[4.1.0.02,4]庚烷	$C_{15}H_{24}$		Sesquiterpene 倍半萜烯	0.15
28	14.32	Calarene 白菖烯	$C_{15}H_{24}$		Sesquiterpene 倍半萜烯	0.21
29	14.395	(?)-allo-Aromadendrene; 香树烯	$C_{15}H_{24}$		Sesquiterpene 倍半萜烯	4.34
30	14.442	(+)-Sativene; (+)-苜蓿烯	$C_{15}H_{24}$		Sesquiterpene 倍半萜烯	0.34
31	14.621	(1E,4E,8E)-α-Humulene; α-律草烯	$C_{15}H_{24}$		Sesquiterpene 倍半萜烯	0.34
32	15.144	α-Selinene; α-芹子烯	$C_{15}H_{24}$		Sesquiterpene 倍半萜烯	0.22
33	15.182	β-Cadinene; β-杜松烯	$C_{15}H_{24}$		Sesquiterpene 倍半萜烯	0.6
34	15.309	Viridiflorene; (+)-喇叭烯	$C_{15}H_{24}$		Sesquiterpene 倍半萜烯	6.59
35	15.544	(-)-α-Muurolene; (-)-α-衣兰油烯	$C_{15}H_{24}$		Sesquiterpene 倍半萜烯	0.13
36	15.685	(+)-δ-Cadinene; (+)-δ-杜松烯	$C_{15}H_{24}$		Sesquiterpene 倍半萜烯	4.96
37	16.646	(-)-Globulol,(-)-蓝桉醇	$C_{15}H_{26}O$		Sesquiterpenol 倍半萜醇	1.69
38	16.9	1-Butyl-4-methoxybenzene;4-丁基苯甲醚	$C_{11}H_{16}O$		Ether 醚类	0.57
39	17.197	(+)-Rosifoliol (+)-八氢四甲基萘甲醇	$C_{15}H_{26}O$		Sesquiterpenol 倍半萜醇	0.59
40	17.263	1,2,3,4,4a,7-Hexahydro-1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)-naphthalene 1,2,3,4,4a,7-六氢-1,6-二甲基-4-(1-甲基乙基)萘	$C_{15}H_{24}$		Sesquiterpene 倍半萜烯	2.0
41	17.404	(1aR,4aR,7S,7aR,7bR)-1,1,7-Trimethyl-4-methylenedecahydro-1H-cycl opropa[e]azulen-7-ol; 桉油烯醇	$C_{15}H_{24}O$		Sesquiterpenol 倍半萜醇	0.36
42	17.47	(-)-α-Cubebene; (-)-α-荜澄茄油烯	$C_{15}H_{24}$		Sesquiterpene 倍半萜烯	0.88
43	24.213	N-Tetratriacontane; 三十四烷	$C_{34}H_{70}$		Alkane 烷烃	0.19
44	24.721	Citronellol acetate; 乙酸香茅酯	$C_{12}H_{22}O_2$		Ether 酯类	0.11

3.95%为单萜醇外,其他均为萜烯类,由高到低含量依次为γ-松油烯 12.08% >α-松油烯 7.6% >(+)-喇叭烯 6.59% >香树烯 4.41% >萜品油烯 3.55% >邻伞花烃 2.83% >β-水芹烯 2.47% >α-蒎烯 2.09%。

2.2 茶树精油抑菌活性测定结果及分析

茶树精油对痤疮丙酸杆菌的抑制作用随着浓度的增加而增强,在 0.2% ~0.8%的低浓度范围内,克林霉素对痤疮丙酸杆菌的抑制作用显著优于茶树精油,而在 1.6% ~3.2%范围内克林霉素则与茶树精油的抑菌作用类似,在 6.4%浓度下,茶树精油对痤疮丙酸杆菌的抑菌作用显著优于克林霉素。经茶树精油对痤疮丙酸杆菌的最低抑菌浓度测定,其 MIC 为 0.55%,具有显著的痤疮丙酸杆菌抑菌作用。

天然产物研究与开发

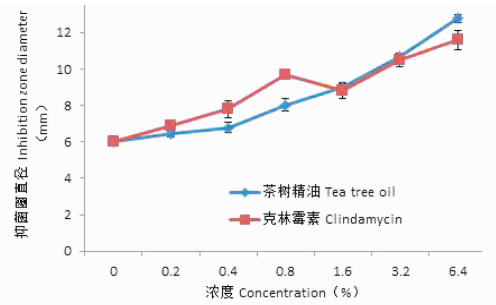

图 2 茶树精油对痤疮丙酸杆菌的抑菌作用

Fig. 2 Antimicrobial effect of tea tree oil on *Propionibacterium acnes*

3 讨论

3.1 从化学成分角度分析茶树精油质量

王懿等人对比分析了国内外茶树精油化学组成的异同,发现松油烯 4-醇是茶树精油中主要活性成分,其它活性成分还有 α-萜品醇(即 α-松油醇)、1,8-桉叶素等[15]。茶树(互叶白千层)原产澳大利亚,其精油中松油烯 4-醇(35.7% ~41.6%)含量远高于国内茶树精油,其他主要成分如 γ-松油烯(澳洲 17.8% ~21.5% > 国内 12.08%),α-松油烯(澳洲 9.6% ~10.2% > 国内 7.6%),萜品油烯和 α-松油醇则四川产精油略高于澳洲精油,在两种精油中含量分别在 2.9% ~3.95% 和 3.3% ~3.55% 之间。成分含量的高低是精油质量好差的评价指标,这些主要成分的差异可能是中国产茶树精油质量不及澳洲茶树精油的原因,使得其在使用疗效上也存在差异性。

3.2 茶树精油成分与痤疮丙酸杆菌的抑制相关性分析

钟振声等研究了广西、江西和广东三地的茶树精油,其化学成分存在显著不同(特征成分松油烯 4-醇在 0.78% ~43.59% 之间,1,8-桉叶素在 2.14% ~72.49% 之间),但对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均具有较强的抑菌活性,其主要抑菌物质为 1,8-桉叶素,而 4-松油醇,α-松油醇等能够协同促进 1,8-桉叶素的抑菌能力[16]。本文茶树精油中 1,8-桉叶素含量仅为 0.026%,但对痤疮丙酸杆菌的抑制作用较强,结合茶树精油的 GC-MS 分析结果,其抑菌作用的发挥与茶树精油中高含量的萜烯类化合物(相对含量达 60.14%)和松油烯-4-醇(24.43%)相关,根据资料[17,18],富含松油烯 4-醇(42%)的茶树精油具有抗炎和抗病毒活性,且将茶树油中的单组分进行试验,发现 40 h 后只有松油烯-4-醇减少体外肿瘤坏死。尽管能推测松油烯 4-醇对痤疮丙酸杆菌的重要作用,但精油中哪种成分起主要抑菌作用,以及各种成分之间是否存在相互协同等关系还有待于进一步深入研究。

参考文献

1 Liang ZY(梁忠云),Li GZ(李桂珍),Chang XM(常新民),*et al*. Selection of superior individual from terpinen-4-ol type *melaleuca*[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2014,26:1977-1981.

2 Nikolic M,Markovic T,Markovic D,*et al*. Screening of antimicrobial and antioxidant activity of commercial *Melaleuca alternifolia*(tea tree) essential oils[J]. *J Med Plants Res*,2012,6:3852-3858.

3 Liao M,Xiao JJ,Zhou LJ,*et al*. Insecticidal activity of *melaleuca alternifolia* essential oil and RNA-seq analysis of *sitophilus zeamais* transcriptome in response to oil fumigation[J]. *PloS One*,2016,11:e0167748.

4 Raut CP,Sethi KS. Comparative evaluation of co-enzyme Q10 and *Melaleuca alternifolia* as antioxidant gels in treatment of chronic periodontitis: A clinical study[J]. *Contemp Clinic Dent*,2016,7:377-381.

5 Thomas J,Carson CF. Therapeutic potential of tea tree oil for scabies[J]. *Am J Tr Med Hyg*,2016,94:258-266.

6 Nogueira MN,Aquino SG,Junior CR,*et al*. Terpinen-4-ol and alpha-terpineol(tea tree oil components) inhibit the production of IL-1β,IL-6 and IL-10 on human macrophages[J]. *Inflamm Res*,2014,63:769-778.

7 Greay SJ,Ireland DJ,Kissic HT,*et al*. Induction of necrosis and cell cycle arrest in murine cancer cell lines by *Melaleucaalternifolia*(tea tree) oil and terpinen-4-ol[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*,2010,65:877-888.

8 Cao W(曹维),Zhu JM(朱建梅),Yu LP(俞励平),*et al*. Experimental study on antimicrobial activity of *Melaleucaalternifolia*[J]. *J Chin Med Matl*(中药材),2013,36:988-991.

9 Wang G(黄戈),Wen XC(翁晓晨),Zhang F(张帆),*et al*. Research progress of planting and processing technology on the *Melaleuca Alternifolia*[J]. *Guangdong Chem Ind*(广东化工),2017,44(4):71-73.

10 CJ Lee,LW Che,LG Chen. Correlations of the components of tea tree oil with itsantibacterial effects and skin irritation[J]. *J Food Drug Anal*,2013,21:169-176.

11 TH Tsai,TH Tsai,WH Wu. In vitro antimicrobial and anti-inflammatory effects of herbs against *Propionib acterium acnes*[J]. *Food Chem*,2010,119:964-968.

(下转第 126 页)

天然产物研究与开发