文章编号:1673-1689(2008)02-0047-05

油茶树嫩枝挥发油 GC-MS 分析及其体内外抗菌作用

龙正海[1]， 杨再昌[2]， 杨雄志[3]

(1. 浙江医药高等专科学校 应用生物系，浙江 宁波 315100；2. 贵州大学 化学工程学院，贵州 贵阳 550003；3. 浙江医药高等专科学院 中药系，浙江 宁波 315100)

摘 要：分析了油茶树嫩枝挥发油的化学成分，研究了其体内外抗菌活性，比较其与民间所用“刀烟”和油茶籽油之间的抗菌效果。采用水蒸气蒸馏法提取，运用毛细管气相色谱-质谱联用法结合计算机检索对其化学成分进行分析和鉴定，用气相色谱面积归一化法测定各组分的相对百分含量，用 NCCLS 肉汤稀释法测定 MIC 值，并依照中药药理研究方法建立了小鼠皮肤感染模型，进行体表抗感染试验。结果检出并鉴定了 35 个峰的相对分子质量、分子式及相对含量，表明该挥发油和“刀烟”均具有一定的体外抗菌活性，且对体表感染金黄色葡萄球菌的小鼠具有显著的保护作用。

关键词：油茶树；挥发油；化学成分；气相色谱-质谱联用；抗菌活性

中图分类号：TS 201.3 **文献标识码**：A

Analysis of the Volatile oil of Tender Branchers from *Camellia oleifera* by GC-MS and Study on Anti-Microbial Activities

LONG Zheng-hai[1]， YANG Zai-chang[2]， YANG Xiong-zhi[3]

(1. Department of Applied Biology, Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315100, China; 2. College of Chemistry Engineering, Giuzhou University, Guiyang 550003, China; 3. Department of Chinese Traditional Medicine, Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315100, China)

Abstract: The chemical constituents of the volatile oil of tender branches from Camellia oleifera were analyzed. The antimicrobial activities of the branches were also studied compared with "Dao Yan". The volatile oil was extracted by stream－stilling, analyzed by capillary GC－MS and elucidated based on the standard mass spectral data. The relative content of each component was calculated by area normalization method. The MICs of the volatile oil were determined by the NCCLS M38－P broth microdilution susceptibility test and traditional Chinese medicine mechanism test on animal skin infection models. The 35 peaks were isolated and identified from the volatile oil of tender branches. The test also showed that the volatile oil had antimicrobial activities in vitro and in vivo. The chemical constituents and antimicrobial activities of the volatile oil of tender branches were reported for the first time. The result here provided scientific proof for the further development of the volatile oil as a kind of medical material.

Key words: *Camellia oleifera*; volatile oil; chemical constituents; GC-MS; anti-microbial activities

收稿日期：2007-05-13.

基金项目：浙江省教育厅科研项目(20050325).

作者简介：龙正海(1963-)，男，贵州锦屏人，副教授，农学硕士，主要从事生物技术药学研究.

Email: longzh2007@yahoo.com.cn

万方数据

油茶树 *Camellia oleifera* 又名茶籽树、油茶，是我国重要的木本油料树种。民间用茶籽饼治疗烫伤、挫伤[1]，但其医药价值尚未受到足够重视。在我国南方，苗族等少数民族将其嫩枝点燃后置于刀面，得到油状液体，俗称“刀烟”，用于治疗刀伤、烫伤、烧伤、急性炎症、皮肤癌等，其疗效远远超过茶油。在地理、文化长期被隔绝的少数民族地区，“刀烟”成为重要的外用药物。从刀烟制作的方法看，得到的油状液体应为挥发油。嫩枝点燃后，挥发油及水分被蒸发出来，刀面温度较低，挥发油及水分在刀面凝结，于是形成“刀烟”。我国油茶树资源极为丰富，长期以来主要利用茶籽榨油，有关嫩枝挥发油我们曾就其透皮吸收作用进行探讨[2]，但其化学成分及其抗菌等药理活性的研究未见报道。为了进一步开发油茶树资源，作者提取了油茶树嫩枝挥发油，用 GC-MS 分析了化学组成，并与传统“刀烟”做比较，对常见耐药菌株进行了体内外抗菌试验。

1 材料与方法

1.1 实验材料

山茶科山茶属植物油茶 *Camellia oleifera* 嫩枝采自贵阳市郊，经贵州省、中科院天然产物化学重点实验室杨小生博士鉴定，拣选剪碎后依照中国药典 2005 年版提取植物精油的方法提取挥发油，用乙醚溶解成一定浓度的待测溶液。“刀烟”按照民间制作方法用油茶树嫩枝制备，油茶籽油为食用级压榨初油，阳性对照药物为红霉素软膏批号为 040702，规格为 10 mg/g（安徽新和皖南药业有限公司生产）。

1.2 仪器与设备

HP6890/HP5973 型气相色谱-质谱计算机联用仪（美国惠普公司产品）。色谱柱为 HP-5MS 5% Phenyl Methyl Siloxane (30 m×0.25 mm×0.25 μm)弹性石英毛细管柱，柱温 60 ℃(保留 2 min)，以 6 ℃/min 升温至 280 ℃，保持 2 min；汽化室温度 250 ℃；载气为高纯 He(99.999%)；柱前压 52.55 kPa，载气流量 1.0 mL/min；进样量 1 μL(用乙醚将 L01 挥发油稀释的溶液)；分流比 40∶1。质谱条件：离子源为 EI 源；离子源温度 230 ℃；四极杆温度 150 ℃；电子能量 70 eV；发射电流 34.6 μA；倍增器电压 2 000 V；接口温度 280 ℃；溶剂延迟 3 min；扫描质量范围 10～550 Amu。

1.3 GC-MS 定性分析

通过 HPMSD 化学工作站，结合 Nist98 标准质谱谱库和 WILEY 质谱谱库，鉴定 35 个化合物，按峰面积归一化法计算求得各化学成分在挥发油中的相对含量，检出率为 78%。

1.4 体外抗菌试验

用大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC 25922、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 25923、铜绿假单胞菌 (*Pseudomona saeruginosa*) ATCC27853、白色念珠菌 (*Candida albicans*) ATCC10231、假丝酵母(*Candida* spp)作试验菌株，采用肉汤稀释法分别测定挥发油、“刀烟”和茶籽油的 MIC 值[3]。试验菌株除假丝酵母(*Candida* spp)系作者临床分离外，其余均由中国普通微生物菌种保藏中心(CGMCC)提供。

1.5 小鼠皮肤感染模型和挥发油的抗感染实验

1.5.1 菌液制备方法 用金黄色葡萄球菌 ATCC25923 菌株接种于 2 mL 营养肉汤培养基中，37 ℃培养 6 h，取 0.1 mL 菌液转接到 10 mL 同一培养基中再培养 12 h，制成含菌量约 10^7 cfu/mL 菌原液备用。

1.5.2 小鼠感染保护实验 取昆明种小鼠 80 只，雌雄各半，随机分为 8 个组，每组 10 只，其中正常对照组不用菌液进行感染，空白对照组不给药，以生理盐水代替，阳性对照组为红霉素软膏，挥发油、刀烟和茶籽油用 75%乙醇稀释，刀烟和茶籽油稀释为 65%，挥发油稀释为 80%、65%、40% 3 个浓度梯度[4]。

将各组小鼠用脱毛剂硫化钠在背部脊柱两侧脱毛约 40 cm^2，于表皮内各注射 0.2 mL 菌液，24 h 后可见背部皮肤感染，与正常对照组比较，伴有活动迟缓、食欲减低等毒性症状。此时各组即可开始进行抗感染治疗处理，分别将 3 个浓度挥发油、一个浓度“刀烟”和茶籽油均匀涂布在感染部位皮肤，空白对照组涂布无菌生理盐水，阳性对照组使用红霉素软膏。每日各给药 3 次，连续给药 3 天，观察记录动物死亡数和存活数，实验结果用方差分析 LSD 检验法进行数据统计处理。

2 结果与讨论

2.1 油茶树嫩枝挥发油 GC-MS 分析

本实验通过 GC-MS 联用仪首次分析了油茶树嫩枝挥发性成分，结果见表 1、图 1 所示。

对其中 35 个峰的化学结构，进行了分析和鉴定，并按面积归一化法计算各组分的相对百分含量，分析鉴定结果表明：35 种化合物中 α-萜品醇、芳樟醇、Vitispirane、反式香叶醇、α-紫罗兰醇、橙花叔

万方数据

醇的相对含量较高，而芳樟醇氧化物、1-十八烯、β-紫罗酮、萜品烯-4-醇、雪松醇等成分的相对含量较低。

2.2 油茶树嫩枝挥发油体外抗菌活性

采用肉汤稀释法测定嫩枝挥发油、"刀烟"、茶籽油的 MIC 值，结果见表 2。实验表明，油茶树嫩枝挥发油对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌、假丝酵母等菌株均有一定的抑菌效果，抗菌活性均比茶籽油高。研究还表明，民间所用"刀烟"的抗菌效果与嫩枝挥发油相当，对铜绿假单胞菌的抑菌活性略强，但与抗菌药物的 MIC 值比较，抗菌作用均显得较弱。说明刀烟和油茶树嫩枝挥发油用于治疗刀伤、烫伤、火伤、急性炎症的作用机理比较复杂，除抗菌作用外可能还与它们能激发人体局部组织的免疫活性等方面有关，这一点还有待进一步探讨。

表 1　油茶树嫩枝挥发油的化学成分及相对质量分数

Tab. 1　Chemical constituents and relative contents of the volatile oil of tender branches from *Camellia oleifera*

序号	保留时间/min	化合物名称	分子式	相对分子质量	符合度/%	相对质量分数/%
1	4.02	Z-3-己烯醇	$C_6H_{12}O$	100	95	0.551
2	8.69	1-辛醇	$C_8H_{18}O$	130	92	1.398
3	8.76	顺式芳樟醇氧化物	$C_{10}H_{18}O_2$	170	93	0.324
4	9.14	反式芳樟醇氧化物	$C_{10}H_{18}O_2$	170	94	0.402
5	9.42	芳樟醇	$C_{10}H_{18}O$	154	94	12.959
6	9.50	壬醛	$C_9H_{18}O$	142	90	2.213
7	11.34	萜品烯-4-醇	$C_{10}H_{18}O$	154	96	0.694
8	11.50	萘	$C_{10}H_8$	128	95	1.383
9	11.67	α-萜品醇	$C_{10}H_{18}O$	154	99	13.179
10	11.75	水杨酸甲酯	$C_8H_8O_3$	152	98	2.435
11	12.36	β-环柠檬醛	$C_{10}H_{16}O$	152	98	0.786
12	12.51	顺式香叶醇	$C_{10}H_{18}O$	154	97	1.349
13	13.10	反式香叶醇	$C_{10}H_{18}O$	154	93	6.172
14	13.26	E-2-癸烯醛	$C_{10}H_{18}O$	154	90	1.010
15	13.74	葡萄螺环烷	$C_{13}H_{20}O$	192	99	4.550
16	14.53	E,E-2,4-癸二烯醛	$C_{10}H_{16}O$	152	94	1.115
17	15.94	α-紫罗兰醇	$C_{13}H_{22}O$	194	93	3.779
18	18.23	β-紫罗酮	$C_{13}H_{20}O$	192	91	0.758
19	18.40	正十五烷	$C_{15}H_{32}$	212	91	0.535
20	19.76	橙花叔醇	$C_{15}H_{26}O$	222	91	3.309
21	20.66	雪松醇	$C_{15}H_{26}O$	222	96	0.545
22	22.27	正十七烷	$C_{17}H_{36}$	240	90	0.639
23	23.41	二苯并噻吩(硫芴)	$C_{12}H_8S$	184	95	1.079
24	23.90	蒽	$C_{14}H_{10}$	178	93	4.021
25	24.06	正十八烷	$C_{18}H_{38}$	254	92	0.565
26	24.87	6,10,14-三甲基-2-十五烷酮	$C_{18}H_{36}O$	268	94	0.622
27	25.77	正十九烷	$C_{19}H_{40}$	268	92	0.413
28	27.31	1-十八烯	$C_{18}H_{36}$	252	95	0.475
29	27.41	正二十烷	$C_{20}H_{42}$	282	92	0.658
30	27.82	异丙基棕榈酸酯	$C_{19}H_{38}O_2$	298	98	0.686
31	28.89	正二十一烷	$C_{21}H_{44}$	296	97	0.824
32	30.41	1-十九烯	$C_{19}H_{38}$	266	97	1.278
33	30.49	正二十二烷	$C_{22}H_{46}$	310	96	1.028
34	31.94	正二十三烷	$C_{23}H_{48}$	324	96	1.403
35	33.36	正二十四烷	$C_{24}H_{50}$	338	94	0.749

万方数据

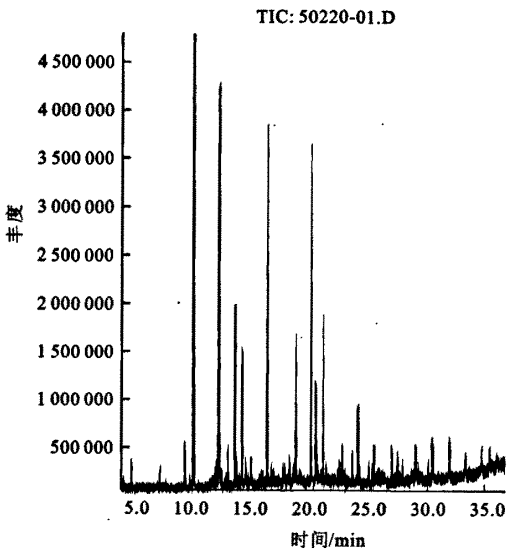


图1 油茶树嫩枝挥发油总离子流色谱图

Fig. 1 TIC of the volatile oil of tender branches from *Camellia oleifera*

表2 油茶树嫩枝挥发油的MIC值

Tab. 2 The MIC of the volatile oil of tender branches from *Camellia oleifera*. $n=5$, $\bar{x}\pm s$

实验菌株	最低抑菌浓度 MIC/(mg/mL)		
	挥发油	刀烟	茶籽油
大肠杆菌 ATCC25922	5±0.20	4±0.10	7±0.10
金葡球菌 ATCC25923	2±0.10	2±0.25	5±0.05
铜绿假单胞菌 ATCC27853	5±0.25	3±0.05	6±0.05
白色念珠菌 ATCC10231	2±0.10	2±0.20	4±0.20
假丝酵母菌株 *Candida* spp	4±0.25	4±0.05	6±0.25

2.3 油茶树嫩枝挥发油对小鼠皮肤感染的保护作用

作者选择对油茶树嫩枝挥发油最敏感的金黄色葡萄球菌ATCC25923作为感染菌株，建立了小鼠皮肤感染模型，体表抗感染试验的研究结果见表3。研究表明：经使用油茶树嫩枝挥发油抗感染治疗后，可明显降低因感染金黄色葡萄球菌所导致的死亡率，与空白对照组比较，80%高剂量和65%中剂量挥发油均具有显著差异($P<0.01$)，用民间方法自制的"刀烟"也具有较好的感染保护作用，而茶籽油的抗感染效果不明显($P>0.05$)，说明体内抗菌结果与体外抑菌试验基本一致。

作者首次采用气相色谱-质谱联用法分析了油茶树嫩枝挥发油的化学成分，从中分离并鉴定出35个化合物，为进一步开发该医药资源提供一定的科学依据。

表3 油茶树嫩枝挥发油对小鼠皮肤感染的保护作用

Tab. 3 The anti-infection effect of the volatile oil of tender branches from *Camellia oleifera* on mice skin

组别	动物数/只	死亡数/只	存活数/只	死亡率/%	存活率/%	P值
空白对照组	10	7	3	70	30	
阳性对照组	10	0	10	0	100	<0.01
油茶籽油组	10	6	4	60	40	>0.05
挥发油高剂量组	10	0	10	0	100	<0.01
挥发油中剂量组	10	0	10	0	100	<0.01
挥发油低剂量组	10	2	8	20	80	<0.05
刀烟组	10	1	9	10	90	<0.01

采用蒸馏法提取的油茶树嫩枝挥发油，与民间的"刀烟"比较，对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌、白色念珠菌、假丝酵母所进行的体外抑菌结果表明，两者具有相同的抑菌谱，最小抑菌浓度也基本一致。从民间应用和实验结果看，油茶树嫩枝挥发油的抑菌作用是治疗外伤的药理依据之一。

在实验中，作者把"刀烟"用乙醚溶解稀释后同法进行GC-MS分析，但由于"刀烟"中除精油外尚含有大量的其他类型化合物，杂质较多，对图谱干扰较大，因此作者未作图谱对比分析。从理论上推测，制作"刀烟"的温度比蒸馏法高，萜类氧化物种类应该更多、含量应该更高，因此，如何较好地消除干扰，准确分析"刀烟"的挥发性成分，是值得进一步研究的重要课题。然而，中药的精髓就在于其活性成分的复杂性和多种物质的综合作用，因此，从中草药中筛选抗感染药物时，既要重视以实验为基础的新发现，又要注意传统的配伍用法，成分研究与药效评价并重。

3 结 语

研究结果表明，油茶树嫩枝挥发油和民间所用"刀烟"均具有一定的体外抑菌活性，但作用不强。而动物体表感染模型和抗感染实验却显示其显著的抗感染效果与感染保护作用，说明中草药抗菌成分在离体和活体状态下的抗菌活性并非呈现正比关系。该挥发油除抗菌外，还具有抗炎、镇痛等作用。有报道指出，芳樟醇、E-2-癸烯醛、α-萜品醇具有抗菌作用[5-7]，可能也是该挥发油的主要活性成分。山茶科[8]和其他药用植物如姜黄[9]、丁香、肉桂[10]、人参[11]等挥发油的抗菌活性也曾有报道，但

万方数据

体外抗菌作用都不够明显。另外，许多中草药或方剂体外抗菌作用弱甚至无明显的抑菌作用，但对细菌感染却有很好的疗效，显示了中药抗感染机制的复杂性[12]。因此，该挥发油用于刀伤、烫伤、烧伤等外伤感染的治疗可能是抗炎、镇痛、抗菌、免疫效应等综合作用的结果，其抗菌活性之外的作用机制尚有待进一步研究证实。

综合有关实验结果进行分析，“刀烟”与蒸馏工艺所得挥发油比较，体外抗菌活性和抗菌谱基本一致，小鼠体表抗感染效果也没有明显差异，而且“刀烟”的成分比较复杂，质量可控性差。因此，作者认为蒸馏工艺所得挥发油较之民间传统“刀烟”而言，质量可控，在外伤抗感染方面，应该更具优势。中国油茶树资源极为丰富，活性成分复杂，作用广泛[13]，值得进一步研究其药理活性。

参考文献(References)：

[1] 王永奇，吴小娟，李红冰，等. 药用山茶植物的研究[J]. 大连大学学报，2006，27(4)：47－55.
WANG Yong-qi, WU Xiao-juan, LI Hong-bing, et al. Research of *Camellia linn* on the used to drugs[J]. **Journal of Daliang University**, 2006, 27(4): 47－55, 58. (in Chinese)

[2] 龙正海，杨再昌，杨雄志. 油茶树嫩枝挥发油皮肤毒理及其促透作用研究. 中国中药杂志，2007，45(17)：50－53.
LONG Zheng-hai, YANG Zai-chang, YANG Xiong-zhi. Study on skin toxicology and penetration enhancement of skin absorption of volatile oil extracted from the tender branchers of *Camellia oleifera*[J]. **China Journal of Chinese Materia Medica**, 2007, 45(17): 50－53. (in Chinese)

[3] 龙正海，杨再昌，杨小生. 三组中药对耐药菌株的联合作用研究[J]. 中国药学杂志，2007，42(2)：104－107.
LONG Zheng-hai, YANG Zai-chang, YANG Xiao-shen. Study on synergistic activity of three groups of traditional Chinese medicines against drug-resistant strains of Bacterias[J]. **Chinese Pharmaceutical Journal**, 2007, 42(2): 104－107. (in Chinese)

[4] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京：人民卫生出版社，1996：166.

[5] Narusuye, Kawai F, Matsuzaki K. Linalool suppresses voltage-gated currents in sensory neurons and cerebellar Purkinje cells[J]. **J neural transm**, 2005, (112): 193－203.

[6] Elisabetsky, Marschner J, Souza D O. Effects of *Linalool* on glutamatergic system in the rat cerebral cortex[J]. **Neurochem Res**, 1995, (20): 461－465.

[7] Tobin T, Swerczek T W, Blake J W. Pine oil toxicity in the horse: drug detection, residues and pathological changes[J]. **Res Commun Chem Pathol Pharmacol**, 1976, (15): 291－301.

[8] 李 斌，罗永明. 山茶属植物化学成分及生物活性研究[J]. 江西中医学院学报，2000，12(1)：44－47.
Li Bing, Luo Yong-ming. Studies on the chemical constituents and bioactivities of *Camelliaceous* plants[J]. **Journal of Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine**, 2000, 12(1): 44－47. (in Chinese)

[9] 杜青云，胡永狮. 姜黄挥发油洗剂对家兔石膏样毛癣菌感染模型的作用研究[J]. 药学实践杂志，2003，21(2)：90－91，99.
Du qing-yun, Hu yong-shi. Study on treatment of rabbit dermatophtosis model caused by trich-ophytion mentagrophytes with turmeric volentil oil lotion[J]. **The Journal of Pharmaceutical Practice**, 2003, 21(2): 90－91, 99. (in Chinese)

[10] 李京晶，籍保平，周峰，等. 丁香和肉桂挥发油的提取、主要成分测定及其抗菌活性研究[J]. 食品科学，2006，27(8)：64－68.
Li Jing-jing, Ji Bao-ping. Zhou Feng. Study on extraction of two essential oils, analysis of major components and antimicrobial activities[J]. **Food science**, 2006, 27(8): 64－68. (in Chinese)

[11] 张宏桂，刘松艳，付爱华，等. 野生东北刺人参茎挥发油成分及其抗皮肤癣菌作用[J]. 中国药学杂志，1999，34(6)：369－371.
Zhang Hong-gui, Liu Song-yan, Fu Ai-hua, et al. Chemical constituents of essential oil in stem of *Oplopnex elatus* and the antifungal action[J]. **Chinese Pharmaceutical Journal**, 1999, 34(6): 369－371. (in Chinese)

[12] 王 嵩. 中草药抗细菌感染的研究[J]. 北京中医杂志，2002，21(4)：249－251.
Wang Song. Study on Chinese herbs against bacteria-infection[J]. **Beijing Journal of Tridtional Chinese Medicine**, 2002, 21(4): 249－251. (in Chinese)

[13] 罗永明，李斌，谢一辉. 油茶化学成分的研究[J]. 中草药，2003，34(2)：117－118.
Luo Yong-ming, Li Bing, Xie Yi-hui. The study on chemical constituents of *Camellia oleifera*[J]. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, 2003, 34(2): 117－118. (in Chinese)

(责任编辑：李春丽)

万方数据