

精炼工艺对浸出油茶籽油化学成分及抑菌活性的影响

段彦¹, 黄丹¹, 周炎辉², 杨富茗², 周婷婷², 李顺祥^{1,3}, 李娟^{1,3}

(1. 湖南中医药大学药学院, 长沙 410208; 2. 湖南奇异生物科技有限公司, 长沙 410208;
3. 湖南省中药活性物质筛选工程技术研究中心, 长沙 410208)

摘要:为阐明浸出油茶籽油精炼前后化学成分和抑菌活性的变化规律,采用甲醇对不同精炼阶段油茶籽油进行萃取,通过打孔法研究了不同精炼阶段的油茶籽油及其甲醇萃取液和甲醇萃取余相的抑菌活性,采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS)对精炼前后油茶籽油甲醇萃取液化学成分进行了定性分析,以SIMCA 16.1软件进行主成分分析(PCA)、正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)、变量重要性投影分析(VIP)和 t 检验,寻找显著变化的差异性成分。结果表明,不同精炼阶段的油茶籽油及其甲醇萃取液具有较好的抑菌作用,且甲醇萃取液的抑菌活性优于相应油茶籽油,而甲醇萃取余相没有抑菌活性,此外,油茶籽油及其甲醇萃取液抑菌活性随着精炼程度的加深呈减弱的趋势。浸出油茶籽油甲醇萃取液中鉴定出47个化学成分,包括油酸、亚油酸等不饱和脂肪酸和以3-对香豆酰基奎宁酸为主的酚类成分,其中油酸、亚油酸、儿茶素类化合物、绿原酸、葛根素、 α -生育酚和胡萝卜素等20个成分在精炼后明显降低或者消失。油茶籽油精炼前后化学成分变化明显,抑菌活性也显著降低,根据成分分析结果和抑菌活性考察推测油茶籽油中的抑菌活性物质可能是儿茶素衍生物、绿原酸、葛根素、胡萝卜素、 α -生育酚和3-对香豆酰基奎宁酸等成分。

关键词:油茶籽油;精炼;化学成分;UPLC-Q-TOF-MS;抑菌活性

中图分类号:TS224;TS201.2 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2022)07-0045-07

Effect of refining process on chemical components and antibacterial activity of solvent extracted oil - tea camellia seed oil

DUAN Yan¹, HUANG Dan¹, ZHOU Yanhui², YANG Fuming²,
ZHOU Tingting², LI Shunxiang^{1,3}, LI Juan^{1,3}

(1. College of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2. Hunan Amazing Grace Biotechnology Co., Ltd., Changsha 410208, China; 3. Hunan Province Engineering Research Center of Bioactive Substance Discovery of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

Abstract: In order to elucidate the change rule of chemical components and antibacterial activity of solvent extracted oil - tea camellia seed oil before and after refining, methanol was used to extract the

收稿日期:2021-12-09;修回日期:2022-03-17

基金项目:湖南省重点领域研发计划项目(2019NK2091);湖南省自然科学基金项目(2019JJ60018);长沙市科学技术局重点研发项目(kh1902128);湖南中医药大学中药学一流学科项目(校行科字[2018]3号)

作者简介:段彦(1996),男,在读硕士,研究方向为中药作用物质基础与机制(E-mail)2711930981@qq.com。

通信作者:李顺祥,教授(E-mail)lishunxiang@hotmail.com;李娟,副教授(E-mail)forever_lijuan@163.com。

oil - tea camellia seed oil prepared with different refining processes. The punch method was used to analyze the antibacterial activity of oil - tea camellia seed oil prepared with different refining processes, its methanol extract and methanol extraction raffinate. Ultra performance liquid chromatography - quadrupole - time of flight - mass spectrometry (UPLC - Q - TOF - MS) was used for the qualitative analysis of chemical components in the methanol extract of oil - tea

camellia seed oil before and after refining. SIMCA 16.1 software was used for principal component analysis (PCA), orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA), variable importance projection analysis (VIP) and *t*-test to identify the components with significant changes. The results showed that the oil-tea camellia seed oil and its methanol extracts of different refining stages had good antibacterial effects, and the antibacterial activity of the methanol extract was better than that of oil-tea camellia seed oil, while the methanol extraction raffinate had no antibacterial activity. In addition, the antibacterial activity of oil-tea camellia seed oil and its methanol extract tended to weaken as the degree of refining deepening. A total of 47 chemical components were characterized in the methanol extract of solvent extracted oil-tea camellia seed oil, including unsaturated fatty acids such as oleic acid and linoleic acid and phenols mainly 3-*p*-coumaroyl quinic acid. A total of 20 components like the oleic acid and linoleic acid, catechin compounds, chlorogenic acid, puerarin, α -tocopherol and carotene decreased significantly or disappeared after refining. The research found that there were significant differences in the chemical components of oil-tea camellia seed oil before and after refining, and its antibacterial activity was also obviously diminished. It is speculated that catechin derivatives, chlorogenic acid, puerarin, carotene, α -tocopherol and 3-*p*-coumaroyl quinic acid might be the antibacterial active substances of oil-tea camellia seed oil according to the results of the components analysis and the examination of the antibacterial activity.

Key words: oil-tea camellia seed oil; refining; chemical component; UPLC-Q-TOF-MS; antibacterial activity

油茶籽油是山茶科山茶属植物油茶 (*Camellia oleifera* Abel.) 成熟种子经提取所得。研究表明,油茶籽油中富含不饱和脂肪酸,还含有茶皂苷、茶多酚、维生素 E、角鲨烯和类胡萝卜素等多种生物活性物质^[1],长期食用可降血脂、降血压、延缓动脉粥样硬化、降低心血管疾病的发生率^[2]。油茶籽油除食用外,还可外涂于烫烧伤、湿疹等患处,有效治疗皮炎、压疮、烧伤、新生儿红臀、尿布皮炎和小儿尿布疹等^[3-4]。

油茶籽油因具有与皮肤良好的亲和性,对脂溶性物质良好的促渗性^[5],有效抑制皮脂分泌、改善皮肤代谢状况等优点,常被作为化妆品和医药产品的基质辅料,但临床应用发现,未经精炼的油茶籽油易发生氧化酸败变质,从而引起皮肤瘙痒,甚至诱发皮肤炎症^[6]。因此,工业上油茶籽油作为化妆品等外用产品的基质时,需经过脱酸、脱色和脱臭等精炼工艺处理。但有研究^[7-8]报道,油茶籽油经不同精炼工艺精制后,虽降低了其不良反应,但其抗菌消炎活性显著降低,甚至消失。为此,本文以不同精炼阶段的油茶籽油样品为研究对象,运用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱 (UPLC-Q-TOF-MS) 监测油茶籽油化学成分的变化规律,并结合体外抑菌实验,分析不同精炼工艺对油茶籽油抗菌活性物质的影响规律,以进一步科学指导油茶籽油的精炼

工艺,为医药产品、防护化妆品领域开发质优稳定的油茶籽油基料提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

油茶籽油样品〔浸出油茶籽原油 (JCCY),批号为 20201028;脱酸油茶籽油 (TUCY),批号为 20201028-1;脱色油茶籽油 (TECY),批号为 20201028-2;脱臭油茶籽油 (TCCY),批号为 20201028-3〕,由湖南奇异生物科技有限公司提供。阿莫西林胶囊(珠海联邦制药股份有限公司,批号为 90305002),氟哌酸胶囊(河南天方药业股份有限公司,批号为 190410132),氟康唑胶囊(广东逸舒制药股份有限公司,批号为 202000204),营养肉汤琼脂培养基(青岛高科园海博生物技术有限公司,批号为 20191126),改良马丁琼脂培养基(广东环凯微生物科技有限公司,批号为 1073301),氯化三苯基四氮唑试剂(国药集团化学试剂有限公司,批号为 20191203),分析级乙醇(国药集团化学试剂有限公司,批号为 20210514),甲酸(德国 CNW 公司,批号为 N030K060),色谱级甲醇(德国 MERCK 公司,批号为 1746030430),色谱级乙腈(德国 MERCK 公司,批号为 1746030430),超纯水(实验室超纯水机自制)。

1.1.2 菌株

大肠杆菌 (*Escherichia coli*, ATCC44102)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, ATCC26003)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, ATCC90271)、白色念珠菌 (*Candida albicans*, ATCC10231), 均购自南京便诊生物科技有限公司。

1.1.3 仪器与设备

SPX-70B III型生化培养箱; SW-CJ-1FD型净化工作台; BKQ-B50 II型压力蒸汽灭菌器; BSA124S-CW型电子天平; HH-600型水浴锅; MassHunter 质谱工作站、Agilent 1290UPLC-6540 accurate mass Q-TOF 超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱、Acquity 超高效液相色谱仪、双源电喷雾离子源, 美国 Waters 公司; Mini-Q Intergal 纯水系统, 美国 Millipore 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 不同精炼阶段油茶籽油样品的前处理

分别称取 JCCY、TUCY、TECY 和 TCCY 各 100 g, 置于 500 mL 分液漏斗中, 加入甲醇萃取 5 次, 每次 100 mL, 合并萃取液, 50 °C 减压浓缩至无甲醇滴出, 冷却, 称量质量, 得 4 种不同精炼阶段油茶籽油的甲醇萃取液 (JCCY-M、TUCY-M、TECY-M 和 TCCY-M) 和油茶籽油甲醇萃取余相 (JCCY-O、TUCY-O、TECY-O 和 TCCY-O), 4 °C 保存。

1.2.2 不同油茶籽油样品供试品溶液的制备

取 JCCY、TUCY、TECY、TCCY、JCCY-O、TUCY-O、TECY-O 和 TCCY-O 各 5 g, 置于 10 mL 容量瓶中, 用无水乙醇溶解并定容, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得 500 mg/mL 的母液, 密封, 4 °C 保存。另取 JCCY-M、TUCY-M、TECY-M 和 TCCY-M 各 1.0 g, 置于 10 mL 容量瓶中, 用无水乙醇溶解并定容, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得 100 mg/mL 的母液, 密封, 4 °C 保存。

1.2.3 阳性对照溶液的配制

取阿莫西林 (Amoxicillin, AMC) 胶囊、氟哌酸 (Norfloxacin, NFX) 胶囊、氟康唑 (Fluconazole, FLU) 胶囊各 1 粒, 用无菌生理盐水溶解, 并稀释成 5 μg/mL 的溶液, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得阳性对照溶液, 临配临用。

1.2.4 抑菌活性考察

1.2.4.1 菌株的复苏、培养及菌混悬液制备

将不同菌株分别接种于相应的琼脂平板上, 置 37 °C 恒温箱中培养, 细菌培养 18~24 h, 真菌培养 48 h, 挑取单个纯菌落接种于无菌营养肉汤培养基

中, 用无菌营养肉汤稀释, 通过麦氏比浊管调节菌液浓度至 1×10^5 CFU/mL。

1.2.4.2 不同油茶籽油样品抑菌圈的测定

采用打孔法测定油茶籽油供试品的抑菌圈^[9]。取 24 cm × 12 cm 无菌琼脂平板, 接种 1.0 mL 浓度为 1×10^5 CFU/mL 的菌混悬液, 用涂布棒涂布均匀后, 用孔径为 6 mm 的打孔器打孔, 每孔间隔 4 cm, 用接种针挑出琼脂块, 每孔加入相应油茶籽油供试品溶液 (JCCY、TUCY、TECY、TCCY、JCCY-O、TUCY-O、TECY-O 和 TCCY-O, 工作质量浓度均为 100 mg/mL; JCCY-M、TUCY-M、TECY-M 和 TCCY-M, 工作质量浓度均为 50 mg/mL) 各 200 μL 作为给药组, 无水乙醇为空白对照组, 以阿莫西林作为 *S. aureus* 的阳性对照药物, 氟哌酸作为 *E. coli* 和 *P. aeruginosa* 的阳性对照药物, 氟康唑作为 *C. albicans* 的阳性对照药物, 置 37 °C 恒温箱中培养, 细菌培养 18~24 h, 真菌培养 48 h, 实验重复 3 次, 游标卡尺检测抑菌圈直径, 取平均值。

1.2.5 不同精炼阶段油茶籽油甲醇萃取液的化学成分分析

取 JCCY-M、TUCY-M、TECY-M 和 TCCY-M 各 5.0 mg, 置于 50 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 摇匀, 15 000 r/min 离心 10 min 后, 取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜, 上机待测。

液相色谱条件: ACQUITY UPLC-BEH C18 色谱柱 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm); 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B); 洗脱程序为 0~2 min 70%~50% A, 2~8 min 50%~30% A, 8~16 min 30%~20% A, 16~28 min 20%~10% A, 28~30 min 10% A; 流速 0.3 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 1 μL。

质谱条件: 应用电喷雾正、负离子模式进行检测, 扫描方式为 MRE 扫描, 使用 ESI-L Low Concentration Tuning Mix (G1969-8500) 对准确质量数进行矫正。一级全扫质量扫描范围 (m/z) 100~1 200, 分辨率 30 000, 除溶剂气体为氮气, 干燥气流速 6.8 L/min, 毛细管电压 4.0 kV, Fragment 电压 110 V, 鞘气温度 350 °C。二级质谱使用依赖性扫描, 在一级扫描基础上选择前三强进行诱导碰撞解离 (CID) 获取二级质谱数据。

1.2.6 数据统计与分析

采用 SPSS 25.0 进行统计分析, 结果以 " $\bar{x} \pm s$ " 表示, $p < 0.05$ 表示差异显著, $p < 0.01$ 表示差异极显著。通过 MassLynx 4.1 工作站对各正离子模式

基峰总离子流图进行逐个核对,结合化合物裂解规律对碎片离子进行信息推导,参考 Chemspider, Chemical Book 和 TCMS 等网站明确化合物结构式。数据经 MassLynx 4.1 工作站处理后导入 SIMCA 16.1 软件,采用主成分分析(PCA)表征样本组间的分离趋势,用正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)和变量重要性投影(VIP)筛选组间有差异的成分,结果以 S-plot 图来表征。

2 结果与分析

2.1 不同油茶籽油样品抑菌活性比较

以抑菌圈大小衡量油茶籽油样品的抑菌活性,不同油茶籽油样品的抑菌圈直径见表 1。由表 1 可见:不同精炼阶段油茶籽油的甲醇萃取液和乙醇空白对照无抑菌作用,说明溶剂无干扰;4 个不同精

炼阶段的油茶籽油样品及其甲醇萃取液对 *E. coil*、*S. aureus*、*P. aeruginosa* 和 *C. albicans* 有一定的抑制作用;不同精炼阶段的油茶籽油的抑菌活性依次为 JCCY > TUCY > TECY > TCCY,不同精炼阶段油茶籽油的甲醇萃取液的抑菌活性依次为 JCCY-M > TUCY-M > TECY-M > TCCY-M,甲醇萃取液的抑菌趋势与各精炼阶段油茶籽油的抑菌趋势相同,说明浸出油茶籽原油经脱酸、脱色和脱臭等精炼工艺后,其抑菌活性依次降低,在不同的精炼过程中均去除了一定量的抑菌活性物质。不同精炼阶段油茶籽油的甲醇萃取液的抑菌活性显著高于相对应的精制油茶籽油,说明以甲醇为溶剂,采用萃取的方法可以有效地将油茶籽油中的抑菌成分富集在甲醇萃取液中。

表 1 不同油茶籽油样品的抑菌圈直径 ($n=3$)

样品	<i>E. coil</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	mm
AMC		25.25 ± 0.34			
NFX	29.29 ± 0.77		29.74 ± 0.92		
FLU				27.85 ± 0.35	
乙醇	-	-	-	-	
JCCY	16.72 ± 0.34	20.01 ± 0.65	20.42 ± 0.99	16.20 ± 0.21	
TUCY	15.44 ± 0.42 *	18.74 ± 0.92 *	18.43 ± 0.77 **	15.17 ± 0.43 *	
TECY	14.22 ± 0.11 **	14.27 ± 1.03 **	18.23 ± 0.56 **	15.03 ± 0.93 **	
TCCY	11.69 ± 0.76 **	12.33 ± 0.17 **	14.32 ± 0.87 **	12.41 ± 0.13 **	
JCCY-M	24.36 ± 0.78	23.36 ± 0.34	24.17 ± 0.54	25.11 ± 0.84	
TUCY-M	22.71 ± 0.46 ^{&&}	20.94 ± 0.32 ^{&&}	22.63 ± 0.32 ^{&&}	22.46 ± 0.24 ^{&&}	
TECY-M	22.38 ± 0.73 ^{&&}	20.28 ± 0.67 ^{&&}	21.11 ± 0.76 ^{&&}	21.73 ± 1.01 ^{&&}	
TCCY-M	21.47 ± 0.98 ^{&&}	19.26 ± 0.56 ^{&&}	20.43 ± 0.35 ^{&&}	21.45 ± 0.56 ^{&&}	
JCCY-O	-	-	-	-	
TUCY-O	-	-	-	-	
TECY-O	-	-	-	-	
TCCY-O	-	-	-	-	

注: - 表示无抑菌圈;与 JCCY 相比, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$;与 JCCY-M 相比, & $p < 0.05$, && $p < 0.01$

2.2 不同精炼阶段油茶籽油甲醇萃取液成分变化规律

2.2.1 UPLC-Q-TOF-MS 成分分析

应用正、负离子模式对油茶籽油甲醇萃取液供试品溶液进行检测,不同精炼阶段油茶籽油的甲醇萃取液在正离子模式下的总离子流图(正离子模式下检测出的化合物数量大于且包括负离子模式下的所有化合物)见图 1。由图 1 可见,不同精炼阶段油茶籽油的甲醇萃取液供试品溶液的总离子流图存在较大差异,说明浸出油茶籽原油在经过脱酸、脱色和脱臭工艺后,其化学成分发生了

显著的变化。在 JCCY-M 中共鉴定出 47 个化合物, TUCY-M、TECY-M 和 TCCY-M 中化学成分依次减少, JCCY-M 的化学成分组成多为脂肪酸,如油酸、亚油酸、棕榈酸、硬脂酸、山萘酸和花生酸等,以及脂肪酸酯和脂肪酸酰胺等衍生物,还含有根皮素、葛根素、绿原酸、儿茶素衍生物、 α -生育酚和 3-对香豆酰基奎宁酸等酚类化合物,除此之外,还含有芳樟醇-3-鼠李糖基-(1 \rightarrow 6)-葡萄糖苷、2,8-二氢喹啉- β -D-葡萄糖苷、茶碱、叶黄素和胡萝卜素等成分。

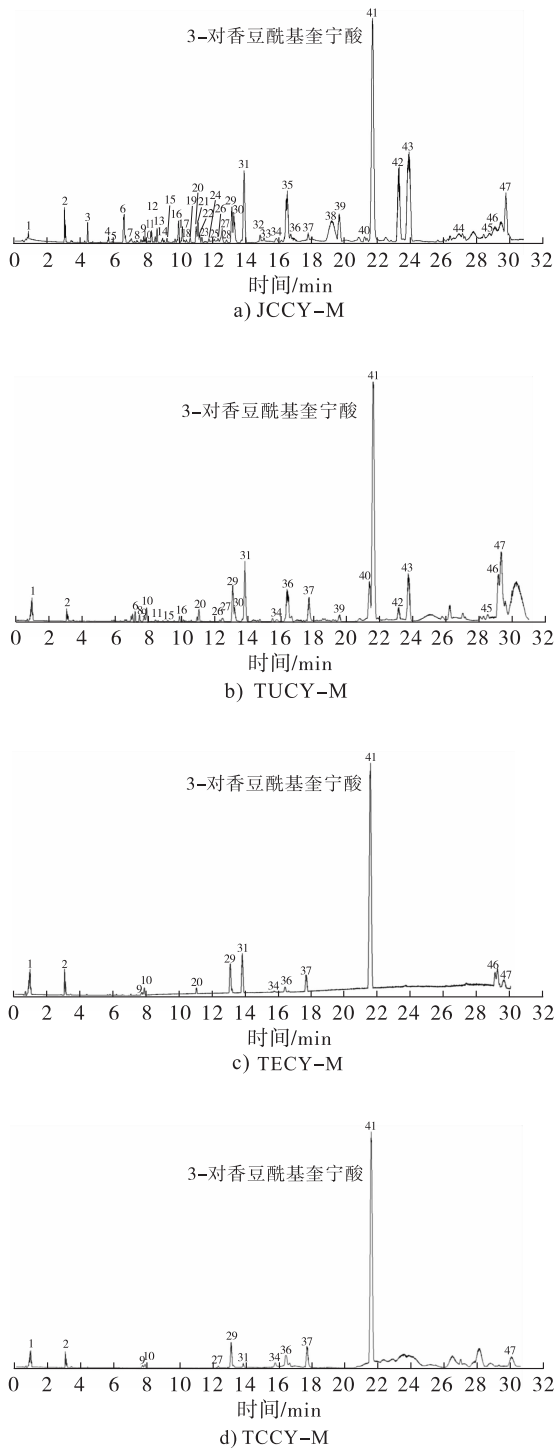


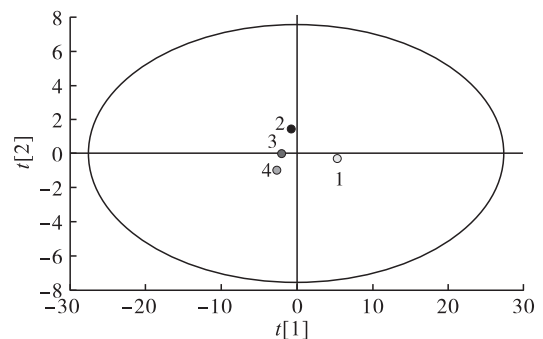
图1 油茶籽油甲醇萃取液在正离子模式下的总离子流图

2.2.2 差异性化学成分的筛选与比较

借助 MassLynx 4.1 工作站,将 UPLC-Q-TOF-MS 数据在正离子模式下选择合适的加合离子,把 4 种不同精炼阶段油茶籽油的甲醇萃取液分为 4 组,进行峰对齐、峰提取、归一化和多元统计分析,筛选出符合要求的化合物。将各化合物的数据信息导入 SIMCA 16.1 软件,进行主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA),得到 4 种油茶籽油甲醇萃取液的 OPLS-DA 图,见图 2。由图 2

可见, JCCY-M 与其他 3 种油茶籽油甲醇萃取液 (TUCY-M、TECY-M 和 TCCY-M) 分为 2 类,同时 TUCY-M、TECY-M 和 TCCY-M 之间也有一定的差距,说明油茶籽油精炼前后化学成分存在明显差异。4 种油茶籽油甲醇萃取液的 S-plot 图见图 3。如图 3 所示,在 S-plot 图中一个点代表一个成分, S 曲线两端的成分即为差异性成分,越靠近两端表示差异越明显, VIP 值大于 1.0 即认为具有显著性差异,以此筛选 4 种油茶籽油甲醇萃取液差异性成分,结合 4 种油茶籽油甲醇萃取液 UPLC-Q-TOF-MS 分析结果,共筛选出 20 个差异性成分,见表 2。由表 2 可知,油茶籽油精炼后甲醇萃取液中具有显著差异的化合物包括油酸、亚油酸及其衍生物,儿茶素衍生物、 α -生育酚、葛根素和绿原酸等多酚类化合物,叶黄素和胡萝卜素等色素成分。

由表 2 还可知:在经过脱酸工艺后,20 个变化显著的成分中 13 个成分未检出,包括葛根素、表没食子儿茶素、没食子儿茶素、儿茶素没食子酸酯、2,8-二氢喹啉- β -D-葡萄糖糖苷、二十一烷酸、十八胺、十五酸乙酯、茶碱、2,4,12-十八碳三烯酸异丁酰胺、绿原酸、油酸正丁酯和 α -生育酚,7 个成分显著减少;在脱酸基础上,经过脱色和脱臭工艺,7 个减少的成分均未检出,分别是十五酰甘氨酸、亚油酸、叶黄素、油酸、9-羟基亚油酸、棕榈油酰乙醇胺和 3,6-环氧基-5,5',6,6'-四氢-3',5,5',6'-四羟基-b,b-胡萝卜素。



注:1. JCCY-M; 2. TUCY-M; 3. TECY-M; 4. TCCY-M

图2 4种油茶籽油甲醇萃取液的 OPLS-DA 图

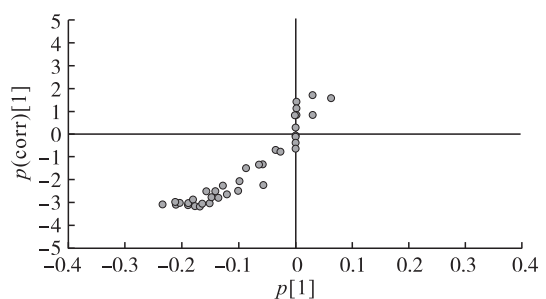


图3 4种油茶籽油甲醇萃取液的 S-plot 图

表2 油茶籽油精炼后甲醇萃取液中具有显著差异的化合物

峰号	时间/ min	化合物	变化趋势		
			TUCY - M	TECY - M	TCCY - M
3	4.46	葛根素 Puerarin	N/A	N/A	N/A
4	5.76	表没食子儿茶素(-) - Epigallocatechin	N/A	N/A	N/A
5	5.97	没食子儿茶素(+) - Gallic acid	N/A	N/A	N/A
7	7.44	儿茶素没食子酸酯(+) - Catechin gallate	N/A	N/A	N/A
8	7.68	十五酰甘氨酸 Pentadecanoylglycine	↓ **	N/A	N/A
11	8.33	亚油酸 Linoleic acid	↓ **	N/A	N/A
15	9.26	叶黄素 Flavochrome	↓ **	N/A	N/A
19	10.66	2,8 - 二氢喹啉 - β - D - 葡糖糖苷 2,8 - Dihydroxyquinoline - β - D - glucuronide	N/A	N/A	N/A
21	11.24	二十一烷酸 Heneicosanoic acid	N/A	N/A	N/A
22	11.37	十八胺 Octadecylamine	N/A	N/A	N/A
24	11.93	十五酸乙酯 Ethyl pentadecanoate	N/A	N/A	N/A
25	12.10	茶碱 Etamiphylline	N/A	N/A	N/A
27	12.59	油酸 Oleic acid	↓ **	N/A	N/A
28	12.86	2,4,12 - 十八碳三烯酸异丁酰胺 2,4,12 - Octadecatrienoic acid isobutylamide	N/A	N/A	N/A
32	14.89	绿原酸 Chlorogenic acid	N/A	N/A	N/A
33	15.15	油酸正丁酯 <i>n</i> - Butyl oleate	N/A	N/A	N/A
38	19.22	α - 生育酚 α - Tocopherol	N/A	N/A	N/A
39	19.66	9 - 羟基亚油酸 α - Dimorphecolic acid	↓ **	N/A	N/A
43	23.88	棕榈油酰乙醇胺	↓ **	N/A	N/A
45	28.74	3,6 - 环氧基 - 5,5',6,6' - 四氢 - 3',5,5',6' - 四羟基 - b,b - 胡萝卜素 3,6 - Epoxy - 5,5',6,6' - tetrahydro - b,b - carotene - 3',5,5',6' - tetrol	↓ **	N/A	N/A

注: N/A 表示未检出; ↓ 表示下降趋势; 与 JCCY - M 相比 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

2.3 分析与讨论

油茶籽油主要成分是不饱和脂肪酸,其他活性成分含量均较低,通过常规分析检测手段如 HPLC、GC - MS,许多成分难以检出,这对油茶籽油化学成分的表征有较大的限制,故本实验采用萃取的方法对油茶籽油中低含量成分进行富集,同时采用高分辨率、高灵敏度的 UPLC - Q - TOF - MS 对甲醇萃取液进行分析鉴定,以求全面系统地分析油茶籽油中的化学成分。进行抑菌圈实验时,要求供试品溶液在培养基中能够均匀扩散,故实验选择乙醇为溶剂,设置溶剂空白,排除乙醇对实验结果的干扰,同时在前期实验中进行了最低抑菌浓度(MIC)的测定,确定抑菌圈实验中不同油茶籽油样品的最适浓度。

本实验通过打孔法对不同精炼阶段油茶籽油及其甲醇萃取液,以及甲醇萃取余相的抑菌活性进行考察,综合比较不同油茶籽油样品的抑菌圈直径,确定其抑菌活性物质主要存在于甲醇萃取液,后续采用 UPLC - Q - TOF - MS 技术分析 4 种油茶籽油甲醇萃取液的化学成分,通过 SIMCA 16.1 软件筛选显著变化的成分,发现油茶籽油在经过不同的精炼工艺后,其中的部分化学成分显著减少。经过水化

脱胶和碱炼脱酸后,油酸、亚油酸及其他游离脂肪酸含量显著减少,可以有效降低油茶籽油的酸值,提高油茶籽油品质和保存时间,同时没食子儿茶素、表没食子儿茶素、儿茶素没食子酸酯和绿原酸等酚类化合物未检出,推测此类成分含有多元酚、不饱和酯键,结构不稳定,在水化高温和碱性条件下易分解或生成酚盐,其分解产物以及酚盐为水溶性化合物,易溶于水相中而被除去,可能是导致上述成分在脱胶脱酸后未检出的主要原因;油脂中的色素主要包括有机色素、有机降解物和色原体等 3 类,本研究中油茶籽油是以正己烷冷浸制得,故其中的色素类成分主要是胡萝卜素(使油脂呈红色)和叶黄素(使油脂呈黄色)等脂溶性植物色素,在经过活性炭与硅藻土吸附脱色后二者均未检出,故油脂呈透明状;在真空脱臭后油茶籽油中引起臭味的组分如低级醛、酮、游离脂肪酸、不饱和碳氢化合物等均被除去,在油茶籽油中未检出,但 α - 生育酚等低沸点物质也在此过程中损失。

化学成分的变化影响油茶籽油样品的抑菌活性,在油茶籽油精炼后除去的成分中,许多成分具有较好的抑菌作用,如没食子儿茶素、表没食子儿茶素

和儿茶素没食子酸酯等儿茶素衍生物具有较好的抑菌效果,能有效抑制细菌和真菌^[10-12],绿原酸作为广谱抑菌活性物质,对多种病原微生物有抑制作用^[13],葛根素、胡萝卜素和 α -生育酚也被证明具有一定的抑菌活性^[14-16],此外,有研究显示奎宁酸的衍生物同样具有较好的抑菌作用^[17-18],故油茶籽油中3-对香豆酰基奎宁酸也可能是潜在的抑菌物质。随着油茶籽油精炼程度的加深,一些化学成分不断减少或者消失,其抑菌活性也不断降低,但精炼后的油茶籽油仍具有一定抑菌作用,这可能与3-对香豆酰基奎宁酸的存在相关。通过比较分析油茶籽油精炼前后的化学成分变化及对抑菌活性的影响,初步推测油茶籽油中的抑菌活性物质是儿茶素衍生物、绿原酸、葛根素、胡萝卜素、 α -生育酚和3-对香豆酰基奎宁酸等成分。

3 结论

本实验通过测定油茶籽油在精炼过程中化学成分与抑菌活性的变化,将油茶籽油的抑菌活性与其化学成分关联起来,推测出油茶籽油中的主要抑菌活性物质为儿茶素衍生物、绿原酸、葛根素、胡萝卜素、 α -生育酚和3-对香豆酰基奎宁酸等成分。研究结果可为油茶籽油精炼工艺的优化提供部分参考依据,能提高油茶籽油的附加值,对油茶籽油产业的发展有一定的推动作用。本实验油茶籽油主要作为外用油脂原料和基质,适用于化妆品、外用膏剂等产品,在满足其使用要求的同时,欲保留其中的抑菌活性成分,根据上述推测抑菌成分的性质,可对精炼工艺进行改进。一是采用更加温和的精炼技术,如采用改性膨润土无水精炼技术、膜分离技术以及分子蒸馏技术等,这些新型技术反应条件温和,对油茶籽油中的活性成分影响较小;二是结合活性成分的理化性质,采用合适的手段如萃取、结晶和蒸馏等,将油茶籽油中的活性成分优先分离保存,精炼完成后再重新添加。

参考文献:

- [1] 冯秋瑜,宋宁,黄慧学,等.山茶油的药用研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(10):215-220.
- [2] AKKARACH B, PATCHARANC P, KALPRAVDH W. Camellia oil - enriched diet attenuates oxidative stress and inflammatory markers in hypercholesterolemic subjects[J]. J Med Food, 2016, 19(9):895-898.
- [3] 邹清容, 禚丽萍. 茶油抗炎、抗菌作用的临床应用进展[J]. 中国民族民间医药, 2013, 22(12):12-13.
- [4] 杨嵘, 邱赛红, 杨蓉, 等. 油茶籽的食用和药用价值研究进展[J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2019, 21(12):2770-2774.
- [5] KANLAYAVATTANAKUL M, LOURITH N. Therapeutic agents and herbs in topical application for acne treatment [J]. Int J Cosmet Sci, 2011, 33(4):289-297.
- [6] 黄永辉, 郑小严, 黄红霞, 等. 化妆品用茶油光谱特性分析[J]. 福建分析测试, 2008(1):7-9.
- [7] 聂根新, 吴玲, 胡丽芳, 等. 油茶籽油氧化稳定性研究进展[J]. 江西农业学报, 2021, 33(3):101-105.
- [8] 叶敏倩. 产地、微波预处理和精炼工艺对红花山茶油品质的影响[D]. 杭州:浙江农林大学, 2021.
- [9] 李艳秋, 任永申, 王丽君, 等. 香薷挥发油纳米乳喷雾的制备及其抗菌活性的研究[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(19):4986-4992.
- [10] ZHAO B H, DENG S X, LI J C, et al. Green synthesis, characterization and antibacterial study on the catechin - functionalized ZnO nanoclusters [J/OL]. Mater Res Express, 2021, 8(2):025006[2021-12-01]. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/abe255>.
- [11] DIBYAJIT L, MOUPRIYA N, BANDITA D, et al. Catechin as the most efficient bioactive compound from *Azadirachta indica* with antibiofilm and anti - quorum sensing activities against dental biofilm: an in vitro and in silico study [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2021, 193(6):1617-1630.
- [12] SIMRAN S, VELLIPINGIRA V. Catechin isolated from cashew nut shell exhibits antibacterial activity against clinical isolates of MRSA through ROS - mediated oxidative stress [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2020, 104(19):8279-8297.
- [13] WU Y, LIANG S, ZHANG M, et al. The effect of chlorogenic acid on *Bacillus subtilis* based on metabolomics [J/OL]. Molecules, 2020, 25(18):24434[2021-12-01]. <https://doi.org/10.3390/molecules25184038>.
- [14] 范好, 郭东艳, 宋强, 等. 葛根素的体外抑菌作用[J]. 陕西中医学院学报, 2013, 36(6):104-105.
- [15] 郑光耀, 何玲, 薄采颖, 等. 松针叶绿素 - 胡萝卜素软膏的体外抗菌活性研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(9):2100-2101.
- [16] ULUSOY S, BOSGELMEZ G, SECILMIS H. Tocopherol, carotene, phenolic contents and antibacterial properties of rose essential oil, hydrosol and absolute [J]. Curr Microbiol, 2009, 59(5):554-558.
- [17] REZENDE C O, OLIVEIRA L A, OLIVEIRA B A, et al. Synthesis and antibacterial activity of alkylated diamines and amphiphilic amides of quinic acid derivatives [J]. Chem Biol Drug Des, 2015, 86(3):344-350.
- [18] BAI J R, WU Y P, ZHONG K, et al. A comparative study on the effects of quinic acid and shikimic acid on cellular functions of *Staphylococcus aureus* [J]. J Food Prot, 2018, 81(7):1187-1192.