

E Zusammenfassung / Summary

Zusammenfassung

Der Begriff Teebaumöl wird im weiteren Sinne für ätherische Öle aus verschiedenen Arten der Gattungen *Baeckea*, *Kunzea*, *Leptospermum* und *Melaleuca* (Myrtaceae) verwendet. Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag auf der vergleichenden Untersuchung von Handelsmustern von fünf Teebaumölen: Australisches Teebaumöl (gewonnen aus *Melaleuca alternifolia* Cheel), Manukaöl (*Leptospermum scoparium* J. R. et G. Forst.), Kanukaöl (*Kunzea ericoides* (A. Rich.) J. Thompson), Cajuputöl (*Melaleuca cajuputi* subsp. *cajuputi* Powell) und Niaouliöl (*Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S. T. Blake).

Die Ölzusammensetzung von Australischem Teebaumöl, dem kommerziell wichtigsten Öl, von Cajuput- und Niaouliöl ist weitgehend bekannt, so daß sich die chemisch-analytische Untersuchung auf Manukaöl und Kanukaöl fokussierte. Die Analyse der ätherischen Öle erfolgte im wesentlichen mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS-Kopplung). In Manukaöl wurden neben den bereits bekannten β -Triketonen Flaveson, Isoleptospermon und Leptospermon, acht neue Sesquiterpenkohlenwasserstoffe, β -Cubeben, Selina-4,11-dien, γ -Muurolen, Germacren D, Bicyclogermacren, γ -Cadinen, α -Calacoren und γ -Calacoren, sowie zehn sensorisch interessante Ester identifiziert. Die Identität der Ester wurde durch Synthese zusätzlich bestätigt. Im Kanukaöl war die Charakterisierung eines typischen Musters von vier Sesquiterpenalkoholen, Ledol, (E)-Nerolidol, Viridiflorol und Spathulenol, das wichtigste Ergebnis.

In bezug auf die Qualität der 97 in dieser Arbeit untersuchten Handelsmuster bot sich folgendes Bild: Die Australischen Teebaumöle (39 Muster) waren relativ einheitlich, wofür die Tatsache verantwortlich ist, daß internationale Qualitätsstandards den Markt regulieren. Manukaöle des Handels (18 Muster) ließen sich in zwei Gruppen einteilen, eine triketonreichere mit 25% β -Triketonen und eine triketonärmere mit 15% β -Triketonen. Möglicherweise werden durch diese Unterschiede regionale Variationen erfaßt. Die Kanukaöle des Handels (11 Muster) erwiesen sich als chemisch homogen. Cajuputöle (13 Muster) und Niaouliöle (16 Muster) waren chemisch uneinheitlicher, nicht zuletzt wegen der taxonomischen Unklarheiten in der *M. leucadendra*-Gruppe. Als Unterschied dieser beiden Öle wurde (E)-Nerolidol und der Gehalt an α -Pinen ermittelt. Insgesamt flossen die

Erkenntnisse aus diesen Untersuchungen in eine Formulierung von Grenzwerten für typische Haupt- und Nebenkompenten aller fünf Teebaumöle des Handels ein, die der Qualitätssicherung dienlich sind.

Des weiteren wurde fünf Handelsmuster anderer Deklaration untersucht und chemisch charakterisiert: *Leptospermum petersonii*, *Melaleuca linariifolia*, *M. uncinata* sowie Lema®-Öl (2 Muster). Letzteres stellt ein Gemisch aus Australischen Teebaumöl und einer aus Manukaöl gewonnenen Fraktion dar. Das Mischungsverhältnis ließ sich jedoch aus den quantitativen Daten nicht erkennen.

Um einen chemotaxonomischen Aspekt der Gattung *Leptospermum* näher zu beleuchten wurden 54 ätherische Öle aus Pflanzenmaterial selbst destilliert und analysiert. Die Wildpflückungen (40 Öle) von *L. scoparium* in Neuseeland ergaben, daß dort verschiedene Chemotypen, wie sie auch in der Literatur beschrieben sind, an einem Standort vorkommen und daß *L. scoparium* dort mit *Kunzea ericoides* vergesellschaftet ist. Die für Manukaöl so typischen β -Triketone wurde nur in einer einzigen Destillation gefunden. Die Kultivare aus dem Botanischen Garten in Marburg (10 Öle) ähnelten in ihrer Zusammensetzung den Wildpflückungen, wobei sie ebenfalls triketonfrei waren.

Vergleichende mikrobiostatische Untersuchungen an 16 Mikroorganismen zeigten, daß die drei Teebaumöle aus *Melaleuca*-Arten (Australisches Teebaumöl, Cajuputöl, Niaouliöl) über ein vergleichbares Aktivitätsmuster verfügen. Dennoch ist dem Australischen Teebaumöl den Vorzug zu geben, weil es eine stärkere Aktivität gegenüber Gram-negativen Keimen aufwies. Der Gebrauch von Kanukaöl, welches sich das schwächste Teebaumöl s.l. herausstellte, ist zu antimikrobiellen Zwecken nicht angezeigt. Für Manukaöl muß anhand der Ergebnisse ein hoher β -Triketon Gehalt gefordert werden.

Die Ergebnisse der Absterbekinetik bewiesen, daß die *Melaleuca*-Öle absolut bakterizid wirksam sind, denn sie töteten die untersuchten Keime auch während der stationären Phase. Kanuka- und Manukaöl, und ebenso der β -Triketon Komplex, das aktive Prinzip von Manukaöl, zeigten keinerlei bakterizide Eigenschaften, obwohl sie ebenfalls niedrige MHK-Werte aufwiesen. Diese niedrigen MHK-Werte gegen Gram-positive Bakterien können somit als bakteriostatische Effekte gedeutet werden.

Im Hinblick auf die angewandte Fragestellung, ob β -Triketone die antimikrobielle Aktivität von terpenreichen ätherischen Ölen aus der Familie der Myrtaceen erhöhen, und daher vorteilhaft gegenüber im Handel befindlichen Präparaten zur Behandlung von Infektionen des unteren Respirationstraktes sind, wie beispielsweise Eukalyptusöl oder Myrtol, zeigten die Untersuchungen, daß Teebaum- und Niaouliöl in Mischung mit dem β -Triketon Komplex

sich gleichwertig sind. Außerdem zeigten die Mischungen eine höhere antimikrobielle Aktivität, sowie vorteilhafte Absterbekinetiken gegenüber Myrtol.

Die *in vitro* Prüfung der β -Triketone auf ihre Hemmaktivität gegenüber dem Transkriptionsfaktor NF- κ B zeigte deutlich, daß die β -Triketone bis zur höchsten Konzentration von 200 μ L keinen hemmenden Effekt auf NF- κ B Aktivierung in TNF- α stimulierten Jurkat T Zellen aufwiesen.

Summary

The name „tea tee oil“ is used for the essential oils of different species of the genera *Baeckea*, *Kunzea*, *Leptospermum* and *Melaleuca* (Myrtaceae). Within this study the main emphasis was put on the investigation of commercial samples of five tea tree oils s.l., namely Australian tea tree oil from *Melaleuca alternifolia* Cheel, manuka oil from *Leptospermum scoparium* J. R. et G. Forst., kanuka oil from *Kunzea ericoides* (A. Rich.) J. Thompson, cajuput oil from *M. cajuputi* subsp. *cajuputi* Powell, and niaouli oil from *M. quinquenervia* (Cav.) S. T. Blake.

The composition of the Australian tea tree oil, commercially the most important, as well as that of cajuput oil and niaouli oil is well known. Due to the composition of manuka and kanuka oils not being as well known the chemical investigations focused on these two oils. Analysis of the oils was by gas chromatography and combined gas chromatography-mass spectrometry. In manuka oil eight new sesquiterpene hydrocarbons, namely β -cubebene, selina-4,11-diene, γ -muurolene, germacrene D, bicyclogermacrene, γ -cadinene, α -calacorene and γ -calacorene could be assigned in addition to the well-known β -triketones flavesone, isoleptospermone and leptospermone. Additionally ten olfactory esters could be identified which was confirmed by simultaneous synthesis. Concerning kanuka oil the characterization of a typical pattern of four sesquiterpene alcohols, namely ledol, (E)-nerolidol, viridiflorol and spathulenol was the main result.

With regard to the quality of 97 commercial samples analysed the following result was given: The Australian tea tree oils (39 samples) were relatively uniform due to the International Quality Standards which governs these products. The manuka oils could be divided into two groups concerning their triketone content, 25% vs. 15%, possibly due to regional differences. Commercial kanuka oils (11 samples) proved to be homogeneous. Cajuput oils (13 samples) and niaouli oils (16 samples) were chemically inhomogeneous due to taxonomic uncertainty within the *Melaleuca leucadendra* group. The presence of (E)-nerolidol and the concentration of α -pinene were the differentiating compounds. As a result the investigations of the commercial samples gave reason to define quality standards for all five tea tree oils using the

main compounds as well some typical minor compounds.

Further commercial oils (5 samples) with diverging labels were chemically characterized, namely *Leptospermum petersonii*, *Melaleuca linariifolia*, *M. uncinata* as well as Lema[®] oil (2 samples), the latter representing a blend of Australian tea tree oil and the polar fraction of manuka oil in an unknown ratio.

In order to elucidate chemotaxonomic aspects of the genus *Leptospermum* 54 lab-distilled essential oils were analysed. Wild plant material from *L. scoparium* (40 oils) revealed that in New Zealand different chemotypes described in literature co-occur within one population side by side, and that there *L. scoparium* is associated with *Kunzea ericoides*. The manuka oil characterizing triketones could be found only in one oil. Cultivars originating from the Botanic Garden in Marburg (10 samples) were similar concerning their essential oil compositions and in the fact that they were found to be free of triketones.

A comparative study of the in vitro antimicrobial activity of tea tree oil including 16 microorganisms showed that all three oils from *Melaleuca* species (Australian tea tree oil, cajuput oil, and niaouli oil) turned out to be similar in their range of action. Nevertheless, Australian tea tree oil should be preferred because of its higher activity against Gram-negative bacteria. The use of kanuka oil, which has turned out to be the weakest tea tree oil, being ineffective against Gram-negative bacteria and fungi, cannot be recommended for antimicrobial purposes. In the future it will be preferred to have manuka oil products with high contents of β -triketones.

The results of the death kinetic studies proved that the *Melaleuca* oils were absolutely bactericidal due to killing different type of bacteria during the stationary phase. Kanuka oil and manuka oil as well as the β -triketone complex, the active principle of manuka oil, lacked any bactericidal properties although they showed low MIC values in earlier studies. Their low MIC values against Gram-positive bacteria can be explained by bacteriostatic effects.

In an answer to the question on whether adding β -triketones will increase the antimicrobial activity of terpenoid myrtaceous oils, in vitro studies show that both, Australian tea tree oil and niaouli oil in mixtures with the β -triketones are competitive with eucalyptus oil or myrtol. Furthermore the mixtures showed higher antimicrobial activity as well as advantageous death kinetics when compared to myrtol.

The in vitro studies of the β -triketones concerning their inhibitory effect on the transcription factor NF- κ B revealed that the β -triketones lack any inhibitory activity up to a concentration of 200 μ L on NF- κ B activation in TNF- α stimulated Jurkat T cells.