

汉源花椒精油的化学成分分析及其抑菌作用

祝瑞雪¹, 曾维才¹, 赵志峰^{1,*}, 高 鸿¹, 闫志农²

(1.四川大学轻纺与食品学院, 四川 成都 610065;

2.四川省绿色食品发展中心, 四川 成都 610041)

摘 要:目的: 分析汉源花椒精油的化学成分, 评价其对常见食品腐败菌的抑制作用。方法: 采用气相色谱-质谱法(GC-MS)对汉源花椒精油的挥发性成分进行分析, 通过抑菌圈实验和试管二倍稀释法对其抑菌效果、最低抑菌浓度(MIC 值)和最低杀菌质量浓度(MBC 值)进行测定。结果: 汉源花椒精油主要含 *D*-柠檬烯(26.55%)、芳樟醇(22.11%)、乙酸芳樟酯(14.71%)、 β -蒎烯(7.39%)等成分。不同抑菌方法均表明, 汉源花椒精油对供试细菌有较明显的抑制作用, 其中, 对金黄色葡萄球菌的抑制作用最强(MIC 值和 MBC 值分别为 1.25mg/mL 和 2.5mg/mL), 大肠杆菌最弱(MIC 值和 MBC 值分别为 5.0mg/mL 和 20.0mg/mL)。结论: 汉源花椒精油具有良好的抑菌作用, 可作为一种天然食品防腐剂资源。

关键词: 汉源花椒; 精油; 化学成分; 抑菌作用

Chemical Components and Antibacterial Activity of Hanyuan *Zanthoxylum bungeanum* Seed Oil

ZHU Rui-xue¹, ZENG Wei-cai¹, ZHAO Zhi-feng^{1,*}, GAO Hong¹, YAN Zhi-nong²

(1.College of Light Industry, Textile and Food Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China ;

2. Sichuan Green Food Development Center, Chengdu 610041, China)

Abstract : Objective: To analyze the chemical composition and evaluate the antibacterial activity of Hanyuan *Zanthoxylum bungeanum* seed oil. Methods: The chemical composition of Hanyuan *Zanthoxylum bungeanum* seed oil was determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Its minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were also determined by agar diffusion method and tube double dilution method. Results: The major components of Hanyuan *Zanthoxylum bungeanum* seed oil were *D*-limonene (26.55%), linalool (22.11%), linalyl acetate (14.71%) and β -pinene (7.39%). Meanwhile, the essential oil revealed strong antibacterial activity. Its MIC and MBC were 1.25 mg/mL and 5.0 mg/mL against *Staphylococcus aureus*, and 2.5 mg/mL and 20.0 mg/mL against *Escherichia coli*, respectively. Conclusion: Hanyuan *Zanthoxylum bungeanum* seed oil has excellent antibacterial activity so that it can be used as a resource of natural food preservatives.

Key words : *Zanthoxylum bungeanum* ; essential oil ; chemical components ; antibacterial activity

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)17-0085-04

花椒(*Zanthoxylum bungeanum*.)是芸香科花椒属植物, 其成熟果皮富含挥发油和脂肪, 是著名的香料和油料。我国花椒资源广、产量大, 主要分布在四川、山西、山东及秦岭以南等地区^[1]。花椒在我国的使用有着悠久的历史, 它不仅是常用的食品调味料也是一种传统的中药材。明李时珍《本草纲目》记载:“椒, 纯阳之物, 其味辛而麻, 其气温以热。入肺散寒, 治咳嗽; 入脾除湿, 治风寒湿痹, 水肿泻痢; 入肾补火, 治阳衰洩数, 足弱久痢诸症”^[2]。《中华人民共和国药典》亦记载:“花椒具有温中止痛、杀虫止痒”

的功效, 可用于治疗“脘腹冷痛、呕吐泄泻、虫积腹痛、湿疹瘙痒”等病症^[3]。现代研究表明, 花椒主要由挥发油、酰胺类物质、生物碱、香豆素、木脂素等物质组成^[4], 具有镇痛平喘、止咳祛痰、抗炎、抑制血小板凝结、抗腹泻、抗溃疡等医学药理活性^[5,8]和降血压、保肝利胆、抗氧化、改善肠胃状况等保健功能^[7-8]。

目前, 对花椒的研究主要集中在根、叶、籽、果皮的化学成分^[9-11]分析, 生物药理活性^[12-14]及花椒的加工应用^[15-16]等方面, 对花椒精油的抑菌作用^[17-18]研究较

收稿日期: 2010-11-22

作者简介: 祝瑞雪(1988—), 女, 硕士研究生, 主要从事食品生物活性物质研究。E-mail: zhu_ruixue@126.com

* 通信作者: 赵志峰(1980—), 男, 讲师, 硕士, 主要从事食品加工与保藏研究。E-mail: zhaozhifeng_scu@126.com

少,更未见研究不同方法对其抑菌效果影响的报道。四川汉源县花椒的著名产地,汉源花椒以皮厚肉丰、色艳味浓而闻名全国,有“贡椒”之称,其精油含量较高,是同地区其他花椒的两倍。本实验针对汉源花椒精油进行研究,通过分析其挥发性成分的组成,对食品腐败菌的抑制作用及不同抑菌方法对其抑菌效果的影响,为汉源花椒精油在食品防腐和医药卫生等方面的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与菌种

大红袍花椒:产自四川汉源,含水量为11%,由汉源五丰黎红食品有限公司提供。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、侧孢芽孢杆菌(*Bacillus laterosporus*)、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) 四川大学食品科学与技术四川省重点实验室。

1.2 培养基与仪器

细菌固体培养基(营养琼脂):营养琼脂33g、蒸馏水1000mL, pH7.2~7.4;细菌液体培养基(肉汤蛋白胨培养基):牛肉膏3g、蛋白胨10g、氯化钠5g、蒸馏水1000mL, pH7.2~7.4。

DL-1型可控温电炉 北京市永光明医疗仪器厂; B24-29型挥发油测定仪 东莞市创瑞工业试验设备有限公司; LDZX-50FB型立式压力蒸汽灭菌器 上海申安医疗器械厂; PYX-DHS型隔水式电热恒温培养箱 上海跃进医疗器械厂; SW-CJ-IBV型超净工作台 苏州安泰空气技术有限公司; PolarisQ型气相色谱质谱联用仪 美国Thermo Fisher公司。

1.3 方法

1.3.1 原料预处理

将干花椒用粉碎机粉碎,过40目筛,于阴凉干燥处保藏,备用。

1.3.2 花椒精油的提取^[19]

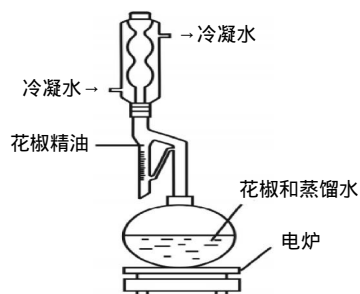


图1 水蒸气蒸馏法提取装置图

Fig. 1 Schematic diagram of steam distillation device

称取干花椒粉末20g放入500mL圆底烧瓶,按固液比1:10添加蒸馏水。采用图1所示实验装置进行花椒精油的提取。待圆底烧瓶中溶液加热至沸腾,调节电炉功率,控制冷凝液的下滴速率为2滴/s,回流提取4h。实验完毕,关闭电炉,待装置冷却至室温,收集花椒精油。于其中加入少量无水硫酸钠,干燥过夜,冷藏备用。

1.3.3 花椒精油挥发性成分的GC-MS分析

采用GC-MS计算机联机分析法,结合相关文献资料鉴定各成分^[1,20-21]。通过归一化积分法确定各组分的相对含量。GC-MS的分析条件如下:

样品处理:经干燥处理的花椒精油溶于正己烷(色谱纯),体积分数1%。

色谱条件:采用美国Thermo公司的气相色谱质谱联用仪。毛细管色谱柱(30m × 0.25mm, 0.25 μm),升温程序:60 保持4min,以4 /min升至240 ,保持15min;进样口温度:250 ;分流比:20:1;进样体积:1.0 μL;检样器温度:280 ;载气为高纯氮,流速:1.0mL/min。

质谱条件:电离方式为电子轰击(EI),电子能量为70eV;离子源温度为200 ;扫描范围:40~500u。

1.3.4 抑菌实验

1.3.4.1 含菌双碟平板的制备

先将供试菌种在斜面培养基上进行活化,然后挑取菌苔用无菌水进行稀释,配制成含菌数在 10^8 个/mL左右的菌悬液。待预先准备好,并经高温高压(121 , 20min)灭菌的培养基温度降到50~60 时,将制备好的菌悬液倒入培养基中(菌悬液和培养基的体积比为1:10),充分混合均匀,制成含菌双碟平板,冷却备用。

1.3.4.2 不同抑菌方法对花椒精油抑菌作用的影响

滤纸片法:取10 μL花椒精油(经0.22 μm滤膜过滤)吸附于灭菌滤纸片上($d=6$ mm),用无菌镊子置于含菌平板表面。平板放入冰箱冷藏30min,置于37 条件下恒温培养18~24h,观察并记录抑菌圈直径。每组3个平板,每个平板放置3片滤纸,重复3次,抑菌圈直径取平均值。

培养基打孔法:用无菌打孔器在含菌琼脂上打孔($d=6$ mm),每孔添加10 μL花椒精油。平板放入冰箱冷藏30min,置于37 条件下恒温培养18~24h,观察并记录抑菌圈直径。每组3个平板,每个平板3孔,重复3次,抑菌圈直径取平均值。

1.3.4.3 最低抑菌质量浓度(MIC)及最低杀菌质量浓度(MBC)的测定

采用试管二倍稀释法,依次配成含精油(50%甲醇溶解)40、20、10、5、2.5、1.25、0.63、0.31、

0.16mg/mL 的肉汤培养基试管, 向各管中添加菌悬液 50 μ L, 将各管置于 37 条件下恒温培养。18~24h 后, 根据试管内液体的浑浊度判定精油的 MIC 值(无细菌生长, 液体澄清)。以 50% 甲醇做对照实验。

在 MIC 值的基础上, 分别将无细菌生长试管的肉汤培养基划线接种于琼脂平板上, 置于 37 条件下恒温培养 18~24h, 以琼脂平板上无菌落生长的精油浓度为 MBC 值。

2 结果与分析

2.1 汉源花椒精油的挥发性成分分析

对花椒精油进行 GC-MS 分析, 经数据库检索, 并

表 1 汉源花椒精油化学成分及相对含量

Table 1 Chemical components and their relative content in Hanyuan *Zanthoxylum bungeanum* seed oil

序 号	保留时 间/min	化合物名称	分子式	相对分 子质量	相对 含量/%
1	7.96	β -蒎烯(β -pinene)	C ₁₀ H ₁₆	136	7.39
2	9.50	D-柠檬烯(D-limonene)	C ₁₀ H ₁₆	136	26.55
3	10.10	3,7-二甲基-1,3,6-辛三烯 (3,7-dimethyl-1,3,6-octatriene)	C ₁₀ H ₁₆	136	1.68
4	12.26	芳樟醇(linalool)	C ₁₀ H ₁₈ O	154	22.11
5	13.14	1,2,6,6-四甲基-1,3-环己二烯 (1,2,6,6-tetramethyl-1,3-cyclohexadiene)	C ₁₀ H ₁₆	136	0.83
6	15.15	4-萜烯醇(terpinen-4-ol)	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.29
7	15.78	α -萜品醇(α -terpineol)	C ₁₀ H ₁₈ O	154	3.04
8	16.68	香叶醇(geraniol)	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.76
9	17.50	乙酸芳樟酯(linalylacetate)	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	196	14.71
10	17.63	2-乙烯基-6-甲基-5-庚烯-1-醇 (2-ethenyl-6-methyl-5-hepten-1-ol)	C ₁₀ H ₁₈ O	154	1.39
11	17.89	醋酸-2-苯乙酯 (2-phenylethylester-aceticacid)	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	164	0.76
12	20.83	乙酸松油酯(terpinylacetate)	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	196	1.17
13	21.19	乙酸橙花酯(nerylacetate)	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	196	1.43
14	21.87	乙酸香叶酯(geranylacetate)	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	196	2.77
15	23.10	石竹烯(caryophyllene)	C ₁₅ H ₂₄	204	0.67
16	23.40	广藿香烯(patchoulene)	C ₁₅ H ₂₄	204	0.52
17	24.27	α -石竹烯(α -caryophyllene)	C ₁₅ H ₂₄	204	0.26
18	25.09	D-大根香叶烯(germacrene-D)	C ₁₅ H ₂₄	204	1.33
19	26.20	4,7-二甲基-1-(1-甲基乙基)-1,2,3,5,6,8, α -六氢化萘(1,2,3,5,6,8, α -hexahydro-4, 7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-naphthalene)	C ₁₅ H ₂₄	204	0.97
20	27.20	4-乙烯基- α , α -4-三甲基-3-(1-甲基 乙基)-环己烯醇(4-ethenyl- α , α -4-trimethyl- 3-(1-methylethyl)-cyclohexenemethanol)	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.14
21	27.48	3,7-三甲基-1,6,10-十二烷三烯-3-醇 (3,7-trimethyl-1,6,10-dodecatrien-3-ol)	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.13
22	28.09	斯巴醇(spathulenol)	C ₁₅ H ₂₄ O	220	0.22
23	28.25	环氧化马兜铃烯(aristoleneepoxide)	C ₁₅ H ₂₄ O	220	0.15
24	29.70	喇叭烯醇(ledenealcohol)	C ₁₅ H ₂₄ O	220	0.11
25	29.97	epizonarene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.19
26	30.38	α -杜松醇(α -cadinol)	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.23
合计					91.22

核对质谱标准图谱, 鉴定出相对含量在 0.1% 以上的有 26 种, 占总量的 91.22%, 通过归一化计算, 得到化合物的相对含量如表 1 所示。

由表 1 可知, 汉源花椒精油中, 烃类含氧有机化合物有 16 种, 相对含量为 47.98%, 主要为醇类和酯类化合物, 其中醇类相对含量为 28.42%, 而醇类化合物中芳樟醇含量最高, 相对含量为 22.11%, 其次为 α -萜品醇(3.04%)。此外, 还含有大量的酯类物质, 相对含量为 19.56%, 其中以乙酸芳樟酯的含量最高, 相对含量为 14.71%, 其次为乙酸香叶酯(2.77%)。不含氧的烃类组分中, 含量最高的为 D-柠檬烯(26.55%), 其次为 β -蒎烯(7.39%)。芳樟醇、柠檬烯等化合物均是重要的香料或香料合成中间体, 同时又具有多种有益的生物活性, 因此汉源花椒具有极大的利用价值。

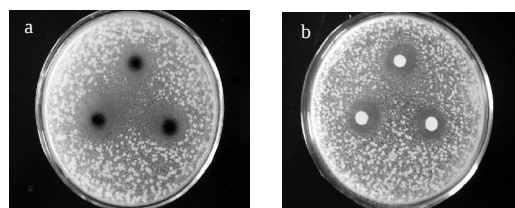
2.2 汉源花椒精油的抑菌作用

表 2 汉源花椒精油抑菌圈实验结果

Table 2 Antibacterial activity of Hanyuan *Zanthoxylum bungeanum* seed oil

供试菌株	抑菌圈直径/mm	
	滤纸片法	培养基打孔法
大肠杆菌	2.3	5.4
金黄色葡萄球菌	15.0	19.5
枯草芽孢杆菌	5.1	8.9
侧孢芽孢杆菌	6.4	10.3
蜡状芽孢杆菌	5.2	8.1

由表 2 可知, 汉源花椒精油对供试菌株的生长具有较好的抑制作用。其中, 对金黄色葡萄球菌的抑制作用最好, 对大肠杆菌的抑制作用较弱。由表 1 可知, 汉源花椒精油含有大量的柠檬烯、芳樟醇、 β -蒎烯及 α -萜品醇等具有抑菌作用的活性成分, 这可能是其具有较好抑菌生物活性的原因。



a. 培养基打孔法; b. 滤纸片法。

图 2 不同抑菌方法对汉源花椒精油抑制枯草芽孢杆菌效果的影响

Fig. 2 Anti-*Bacillus subtilis* effects of Hanyuan *Zanthoxylum bungeanum* seed oil evaluated by different methods

由图 2、表 2 可知, 不同的抑菌实验方法对汉源花椒精油的抑菌作用影响的差别较为明显。不同的供试菌种, 在相同的实验条件下, 培养基打孔法的抑菌效果均强于滤纸片法。抑菌圈的大小与微生物在培养基中的密度、生长速率及受试物在培养基中的扩散程度有关。

花椒精油是一种具有较强挥发性的物质。在培养过程中,吸附于滤纸片上的花椒精油易于挥发,不易渗透入培养基;而注入培养基小孔中的花椒精油,较易渗透进入培养基作用于供试菌种。因此,在实验条件相同的条件下,采用培养基打孔法,汉源花椒精油的抑菌作用更为明显。

2.3 汉源花椒精油对供试菌株的 MIC 和 MBC 值

MIC 值是测定抗菌物质抗菌活性大小的一个指标。经实验测定,汉源花椒精油对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、侧孢芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌的 MIC 值分别为 1.25、5.0、2.5、1.25、2.5mg/mL。对照组 50% 乙醇对各供试微生物无抑制作用。

在 MIC 值的基础上,通过平板划线培养获得汉源花椒精油对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、侧孢芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌的 MBC 值分别为 2.5、20.0、10.0、5.0、5.0mg/mL。汉源花椒精油的 MBC 值较小,在低质量浓度下即能有效抑制供试食品腐败菌的生长,具有较强的抑菌生物活性。

3 结 论

经 GC-MS 分析,汉源花椒精油中相对含量在 1% 以上的化合物有 26 种,占总量的 91.22%,主要成分有 *D*-柠檬烯(26.55%)、芳樟醇(22.11%)、乙酸芳樟酯(14.71%)、 β -蒎烯(7.39%)、 α -蒎醇(3.04%)。在较低质量浓度下,汉源花椒精油对常见食品腐败菌具有明显的抑制作用,对金黄色葡萄球菌抑制作用较好,对大肠杆菌较弱。较之滤纸片法,培养基打孔技术能更好地体现汉源花椒精油的抑菌生物活性。

参考文献:

- [1] 赵志峰,雷鸣,雷绍荣,等. 两种四川花椒挥发油的成分分析[J]. 中国调味品, 2004(10): 39-42.
- [2] 李时珍. 本草纲目: 下册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982.
- [3] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 广州: 广东科技出版社, 1995.
- [4] 付陈梅, 阚建全, 陈宗道, 等. 花椒的成分研究及其应用[J]. 中国食品添加剂, 2003(4): 83-85.
- [5] 袁娟丽, 王四旺. 花椒的化学成分及其药效学研究[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(3): 552-554.
- [6] 吴素蕊, 阚建全, 刘春芬. 花椒的活性成分与应用研究[J]. 中国食品添加剂, 2004(2): 75-78.
- [7] 朱雪, 王亮. 花椒药理作用研究进展[J]. 社区医学杂志, 2010, 8(7): 43-45.
- [8] 尹靖先, 彭玉华, 张三印. 花椒药用的研究进展[J]. 四川中医, 2004, 22(12): 29-31.
- [9] 周向军, 高义霞, 呼丽萍, 等. 刺异叶花椒叶挥发性成分 GC-MS 分析研究[J]. 资源开发与市场, 2009, 25(6): 490-543.
- [10] WANG Lu, WANG Ziming, LI Xueyuan, et al. Analysis of volatile compounds in the pericarp of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. by ultrasonic nebulization extraction coupled with headspace single-drop microextraction and GC-MS[J]. Chromatographia, 2010, 71: 455-459.
- [11] JANG K H, CHANG YH, KIM D D, et al. New polyunsaturated fatty acid amides isolated from the seeds of *Zanthoxylum piperitum*[J]. Archives of Pharmacal Research, 2008, 31(5): 569-572.
- [12] TEZUKA Y, IRIKAWA S, KANEKO T, et al. Screening of Chinese herbal drug extracts for inhibitory activity on nitric oxide production and identification of an active compound of *Zanthoxylum bungeanum*[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2001, 77: 209-217.
- [13] YAMAZAKI E, INAGAKI M, KURITA O, et al. Antioxidant activity of Japanese pepper (*Zanthoxylum piperitum* DC.) fruit[J]. Food Chemistry, 2007, 100: 171-177.
- [14] LEE S J, LIM K T. Glycoprotein of *Zanthoxylum piperitum* DC. has a hepatoprotective effect via anti-oxidative character *in vivo* and *in vitro*[J]. Toxicology in Vitro, 2008, 22(2): 376-385.
- [15] ZHANG Junhua, JIANG Lifeng. Acid-catalyzed esterification of *Zanthoxylum bungeanum* seed oil with high free fatty acids for biodiesel production[J]. Bioresource Technology, 2008, 99: 8995-8998.
- [16] 王家良, 赵大庆, 陈龙. 花椒油树脂微胶囊的制备[J]. 农业工程学报, 2008, 24(4): 275-278.
- [17] 干信, 吴世筠, 高雯琪. 花椒挥发油抑菌作用研究[J]. 食品科学, 2009, 30(20): 128-130.
- [18] CHOI S I, CHANG K M, LEE Y S, et al. Antibacterial activity of essential oils from *Zanthoxylum piperitum* AP DC. and *Zanthoxylum schinifolium*[J]. Food Science and Biotechnologh, 2008, 17(1): 195-198.
- [19] 贾利蓉, 赵志峰, 雷绍荣, 等. 汉源青花椒挥发油的成分分析[J]. 食品与机械, 2008, 24(3): 105-108.
- [20] ADAMS R P. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy[M]. 4th ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007.
- [21] 赵志峰, 雷鸣, 雷绍荣, 等. 不同溶剂提取花椒精油的试验研究[J]. 中国食品添加剂, 2004(4): 18-21.