

花椒挥发油的提取、分离和抗菌实验

弭向辉¹ 龚祝南¹ 张卫明² 张锡然¹

(1. 南京师范大学生命科学学院 210097 江苏 南京)

(2. 南京野生植物综合利用研究院 210042 江苏 南京)

[摘要] 研究花椒(*Zanthoxylum Bungeanum Maxim*)挥发油的抗菌作用.超临界 CO₂ 萃取法(CO₂-SFE)和乙醇回流法提取花椒挥发油及硅胶柱分离乙醇回流法所得挥发油,适当处理后共得到 8 个样品,用滤纸片和试管法分别测定其抗菌活性和最低抑菌浓度(MIC).结果表明,试验中 8 个样品分别对 8 种受试菌种有不同的抑制作用,说明花椒挥发油有明显的抑菌作用.挥发油中极性相对较小的成分主要对真菌起抑制作用,而极性相对较大的样品主要对细菌起抑制作用.

[关键词] 花椒 挥发油 抗菌 最低抑菌浓度(MIC)

[中图分类号] Q944.93, [文献标识码] A, [文章编号] 1001-4616(2004)04-0063-04

花椒(*Zanthoxylum Bungeanum Maxim*)属芸香科(rutaceae)花椒属(*Zanthoxylum Linn*)植物,在我国分布非常广泛.我国花椒资源丰富,品种多,产量大,是世界花椒栽培面积、产量的第一大国.花椒不仅可作为调味品,还可作药用,具有镇痛、镇静、活血散瘀及治疗呕吐、腹泻等功效^[1],另外在抗炎、抑菌杀虫、抗肿瘤等方面也具有较强的药理活性^[2,3].花椒的化学成分主要有挥发油、生物碱、黄酮类、香豆素等^[4],其中挥发油含量高,具有重要的药理作用,且不同种类的花椒挥发油的组分及其相对含量有很大差别^[5].本文就陕西“大红袍”种进行挥发油有效成分提取、分离并对其抗菌作用进行初步研究.

1 材料与仪器

1.1 材料

陕西“大红袍”品种花椒(*Zanthoxylum Bungeanum Maxim*)的果皮,凭证标本保存在南京野生植物综合利用研究院.

试验菌种:

① 细菌:大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*);

② 真菌:啤酒酵母(*Saccaromyces cerevisiae*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)3042、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、叶点霉(*Phyllosticta maydis*)和刺盘孢霉(*Colletotrichum musae*).以上菌种由南京师范大学生命科学院微生物组提供.

培养基:细菌培养采用肉汤培养基,真菌培养采用马铃薯培养基.

1.2 仪器

HA121-50-01 型超临界 CO₂ 萃取装置(江苏南通华安实业公司生产),6890-5973N 型 GC-MS 计算机联用仪(美国 Aligent 公司生产),RE-52 型旋转蒸发器(上海青浦沪西仪器厂生产),LB-50 型制备色谱仪(天津兴科科技有限公司生产).

2 方法

2.1 样品制备

2.1.1 超临界 CO₂ 萃取法提取花椒挥发油

花椒去梗、粉碎,用 40 目筛子过筛,用超临界 CO₂ 萃取装置,采用动态萃取的操作方式,参照文献^[6],

收稿日期:2004-05-25.

基金项目:国家农业领域十五攻关重点项目“辛香料资源的高效利用及产业化技术研究”资助项目(2001BA502B05).

作者简介:弭向辉,1979- ,南京师范大学生命科学学院硕士研究生,主要从事生物化学的学习与研究,E-mail:mxh.jm@163.com

通讯联系人:龚祝南,1963- ,南京师范大学生命科学学院副教授,主要从事中药及天然产物的研究开发和教学.

万方数据 gongzhunan@pine.njnu.edu.cn

通过正交试验方法找出本试验条件下的最佳萃取条件(压力 33 MPa,温度 55℃,萃取时间 1.0 h),并在最佳萃取条件下萃取花椒挥发油,得到的挥发油呈黄绿色,有芳香味,得率 10.2%.GC-MS 分析表明其中单萜成分及其衍生物(如 γ -萜品烯 13.21% β -萜烯 10.67%)含量占 70% 以上,倍半萜及其衍生物(如 α -萜荜烯 1.52%)含量在 20% 左右,其它成分含量在 10% 左右.用 30~60℃石油醚萃取挥发油,减压过滤回收石油醚后得到 1 号样品.

2.1.2 乙醇回流法提取花椒挥发油

以 95%乙醇回流^[7,8]提取花椒 3~4 h,重复 3 次,合并粗提液,减压回收溶剂,得到挥发油浸膏,呈深褐色,有芳香油香味,得率 7.9%.用 30~60℃石油醚萃取,减压过滤回收石油醚后得到 8 号样品.

2.1.3 利用制备色谱柱对乙醇回流提取法所得挥发油浸膏做进一步分离

为了更深入地研究挥发油不同成分的抗菌作用,我们对乙醇回流提取法所得挥发油浸膏做了进一步分离.在挥发油浸膏中加入硅胶(用 100~200 目筛子过筛),使浸膏与硅胶比例在 1:3 左右,挥干溶剂,制成金黄色均匀硅胶颗粒.上硅胶(硅胶 H)制备色谱柱,分别用石油醚、乙酸乙酯梯度洗脱,用薄层层析(TLC)法分析收集液,浓缩后得不同极性的花椒挥发油组分如下:2%乙酸乙酯石油醚液洗脱部分为 2 号样品,5%乙酸乙酯石油醚液洗脱部分为 3 号样品,10%乙酸乙酯石油醚液洗脱第一部分为 4 号样品,10%乙酸乙酯石油醚液洗脱第二部分为 5 号样品,15%乙酸乙酯石油醚液洗脱部分为 6 号样品,20%乙酸乙酯石油醚液洗脱部分为 7 号样品.

以上各样品用滤膜孔径为 0.22 μ m 的滤器过滤除菌,4℃冰箱保存,备抗菌实验用.

2.2 抑菌实验方法

2.2.1 抑菌圈测定

在超净台里将转接后生长良好的菌种试管斜面注入适量无菌水(约 5 mL),制成菌悬液,取 0.1 mL 菌悬液注入平板(直径 9 mm,约含 15 mL 培养基),涂布均匀.将平板平均分为 6 个区,对角设置平行组,同时用无菌水做对照组.用两张已灭菌的圆形滤纸片(直径 1.1 cm)为一贴,在样品原液中轻轻蘸一下后,取出贴在平板的指定位置,轻摁一下使滤纸片牢固,每个样品设 2 个平行组,然后放入温箱中,细菌 30℃,真菌 27℃,细菌培养 24 h,真菌 72 h 后观察结果.记录抑菌圈大小:“+”表示样品对受试菌有抑制作用,括号内为形成抑菌圈的直径,单位为 cm;“-”表示样品对受试菌无抑制作用.

2.2.2 试管法测定 MIC

根据抑菌圈测定结果,采用试管法^[9]测定各样品 MIC.样品与培养基在试管中(18 mm×180 mm)充分混匀,倍比稀释成(体积比)5%、2.5%、1.25%、0.625%、0.312 5%、0.156 25%系列浓度,用无菌水作阴性对照,终体积为 5 mL,分别制成斜面.取受试菌液划线接种于斜面上.细菌 30℃培养 24 h,真菌 27℃培养 72 h 后观察结果.目测并以下列标准记录:菌完全无生长“-”;菌生长迟缓,形成的菌落很小“+”;菌生长比较快,形成菌落较大“++”;菌生长迅速,但菌落比正常对照小“+++”;菌生长迅速,与正常对照相同“++++”.取完全不生长管的最低样品浓度为最低抑菌浓度(MIC).

3 结果

花椒挥发油 8 种样品对 8 种受试菌种作用的结果见表 1.

表 1 不同提取方法得花椒挥发油的抑菌活性比较

编号	1 [#]	2 [#]	3 [#]	4 [#]	5 [#]	6 [#]	7 [#]	8 [#]
大肠杆菌	-	+(1.15)	-	-	-	-	-	+(2.35)
枯草杆菌	-	-	-	-	-	+(1.60)	+(2.90)	-
金黄葡萄球菌	-	-	-	-	-	-	-	-
酵母菌	-	-	-	-	+(1.30)	-	-	-
米曲霉 3042 [★]	+(1.25)	-	-	-	+(1.85)	-	-	+(1.30)
黑曲霉 [★]	+(1.20)	-	-	-	+(1.90)	-	-	+(1.30)
叶点霉	+(2.45)	-	-	-	-	-	-	+(1.70)
刺盘孢霉	+(1.40)	-	-	-	-	-	-	+(1.50)

“★”表示样品对受试菌有抑制孢子生成作用,括号内为形成抑制孢子生成圈的直径/cm.

表 1 中看出:1 号(超临界 CO₂ 萃取法)和 8 号(乙醇回流萃取法)样品在抑菌作用上基本一致,都对霉

菌有抑制作用,只是8号样品对大肠杆菌有抑制作用,且抑制能力很强,而1号没有抑制作用.色谱柱分离后得到的极性相对较小的5号样品对真菌有较强的抑制作用,而极性相对较大的6号和7号样品则对细菌(枯草杆菌)有抑制作用,且7号样品的抑制能力很强.

根据抑菌圈测定结果,对各受试菌种有作用的样品进一步做试管法试验.结果见表2,表3,表4.

表2 大肠杆菌、枯草杆菌、酵母的试管法测定结果

样品质量分数		5%	2.5%	1.25%	0.625%	0.3125%	0.15625%
大肠杆菌	2 [#]	-	+	++	+++	++++	++++
	8 [#]	-	-	-	+	++	+++
枯草杆菌	6 [#]	-	-	+	++	+++	++++
	7 [#]	-	-	-	-	+	+++
酵母菌	5 [#]	-	+	++	+++	++++	++++
	无菌水	++++	++++	++++	++++	++++	++++

表2中表明:对于大肠杆菌,2号样品MIC为5%,8号样品MIC为1.25%;对于枯草杆菌,6号样品MIC为2.5%,7号样品MIC为0.625%;对于酵母菌,5号样品MIC为5%.

表3 米曲霉、黑曲霉的试管法测定结果

样品质量分数		5%	2.5%	1.25%	0.625%	0.3125%	0.15625%
米曲霉 3042	1 [#]	-	-	++	++	+++	++++
	5 [#]	-	-	-	++	+++	++++
	8 [#]	-	+	++	+++	++++	++++
黑曲霉	1 [#]	-	-	-	++	+++	++++
	5 [#]	-	-	-	+	+++	++++
	8 [#]	-	+	++	+++	++++	++++
无菌水		++++	++++	++++	++++	++++	++++

表3中表明:对于米曲霉3042,1号样品MIC为2.5%,5号样品MIC为1.25%,8号样品MIC均为5%;对于黑曲霉,1、5号样品MIC均为1.25%,8号样品MIC为5%.

表4 试管法测定不同样品对叶点霉、刺盘孢霉作用结果

样品质量分数		5%	2.5%	1.25%	0.625%	0.3125%	0.15625%
叶点霉	1 [#]	-	-	-	+	++	++++
	8 [#]	-	-	-	++	+++	++++
刺盘孢霉	1 [#]	-	-	-	+	+++	++++
	8 [#]	-	-	+	++	+++	++++
无菌水		++++	++++	++++	++++	++++	++++

表4中表明:对于叶点霉,1、8号样品MIC均为1.25%;对于刺盘孢霉,1号样品MIC为1.25%,8号样品MIC为2.5%.

4 讨论

通过本试验结果可以看出,陕西‘大红袍’种花椒的挥发油对受试菌种有明显的抑菌作用.两种方法提取的挥发油经石油醚萃取后其抑菌作用基本一致,都对真菌作用抑制较强,只是乙醇回流萃取法的挥发油对大肠杆菌有抑制作用,且抑制能力很强,而乙醇回流法所得挥发油继续经柱层析分离后的样品对细菌的抑制作用较强.所有样品对金黄色葡萄球菌均无抑制作用,这与赵良忠等的^[10]报道的结果不一致,其原因可能与挥发油提取的方法和条件不同有关.

采用柱层析进一步分离乙醇回流提取法所得挥发油后得到的各个样品,随着洗脱液极性梯度增加,样品极性不断变大,抑菌试验结果表明对真菌起抑制作用的主要是挥发油中的极性相对较小,对热、有机溶剂敏感的单萜及倍半萜类物质,而对细菌起抑制作用的主要是挥发油中的极性相对较大,对热、有机溶剂有一定耐受性的大分子物质,以前文献^[11,12]有过类似报道,因此可以根据不同的需要,对花椒采用不同的提取方法,为我们的生产和研究工作更好的服务.

[参考文献]

- [1] 佟如新,王普民,尹远平. 花椒温通散结作用初探[J]. 时珍国医国药,1999,10(12):897—898.
- [2] Yasuhiro T,Shiho I,Takuji K, 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(2—3):209—217.
- [3] 王宇,巨勇,王钊. 花椒属植物中生物活性成分研究近况[J]. 中草药,2002,33(7):666—670.
- [4] 詹亚华. 药用植物学[M]. 北京:中国医药科技出版社,1998.
- [5] 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,2003,2003(4):83—85.
- [6] 陈振德,许重远,谢力. 超临界流体萃取花椒挥发油化学成分的研究[J]. 中国中药杂志,2001,26(10):687—688.
- [7] 肖崇厚,杨松松,洪筱坤,等. 中药化学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999.
- [8] 刘巨涛,赵智蕴,刘晓伟. 裂叶荆芥中非挥发油化学成分的提取和分离[J]. 解放军医学高等专科学校学报,1998,26(3):47—49.
- [9] 付爱华,张宏贵,张林,等. 东北刺人参挥发油抗真菌实验及临床研究[J]. 中华皮肤科杂志,1997,30(5):310—311.
- [10] 赵良忠,段林东,余有贵,等. 金银花抗菌物质的提取及其抑菌作用的研究[J]. 邵阳高等专科学校学报,2001,14(3):204—209.
- [11] 余德顺,李金华,万固存,等. 珊瑚姜精油的超临界萃取及其真菌和细菌活性[J]. 化学研究与应用,2003,15(5):678—679.
- [12] 谢小梅,陈资文,陈和利,等. 花椒、肉豆蔻防霉作用的研究[J]. 时珍国医国药,2001,12(2):100—101.

Study on the Extraction , Separation and Antimicrobial Effect of Volatile Oil from *Zanthoxylum Bungeanum Maxim*

Mi Xianghui¹, Gong Zhunan¹, Zhang Weiming², Zhang Xiran¹

(1. School of Life Science, Nanjing Normal University, 210097, Nanjing, China)

(2. Nanjing Institute for Comprehensive Utilization of Wild Plants, 210042, Nanjing, China)

Abstract :The volatile oil from *Zanthoxylum Bungeanum Maxim* have been associate with various pharmacological activities. Here an investigation on the antimicrobial effects of the volatile oil has been tested. The volatile oil were prepared by Supercritical CO₂ fluid extraction(SFE) and alcohol reflux respectively , and then further separated to 8 sample parts by silica-gel chromatography based their chemical solubility. Bacteria *Escherichia coli* , *Bacillus subtilis* , *Staphylococcus aureus* and fungi *Saccharomyces cerevisiae* , *Aspergillus oryzae* (3042) , *Aspergillus niger* , *Phyllosticta maydis* , *Colletotrichum musae* were used to determine their antimicrobial activity and minimum inhibitory concentration(MIC) by methods of filter paper mensuration and tube culture. The results show good antimicrobial effects. But the different parts of the volatile oil have the varied activity to 8 tested germs. The components with relatively weak polarity of the volatile oil extracted by SFE mainly inhibit fungi ,while the components with relatively strong polarity of the volatile oil by alcohol reflux chiefly inhibit bacteria.

Key words :*Zanthoxylum Bungeanum Maxim* , volatile oil ;antimicrobial effect , minimum inhibitory concentration(MIC)

[责任编辑 孙德泉]