不同产地花椒精油的化学成分分析及花椒精油固体制剂的抗真菌作用考察

周杰，刘璐，邱盛敏，杨熙贤，胡一晨*
（成都大学 农业农村部杂粮加工重点实验室，成都 610106）

［摘要］ **目的**：采用水蒸气蒸馏法提取花椒精油，制备花椒精油固体制剂，并对花椒精油固体制剂的抗真菌作用进行研究，以期为中草药及食品的储藏提供安全、绿色、高效的杀菌剂。**方法**：采用水蒸气蒸馏法提取花椒精油，利用气相色谱-质谱法（GC-MS）对不同产地花椒（甘肃大红袍花椒、韩城大红袍花椒、汉源红花椒和茂汶大红袍花椒）精油中化学成分及其相对质量分数进行分析，选用Agilent HP-5毛细管柱，程序升温进行分离（初始温度60 ℃，保持2 min，以10 ℃·min^{-1}上升至280 ℃，保持5 min），扫描范围*m*/*z* 35~590。利用纳米分子筛吸附法制备花椒精油固体制剂，考察花椒精油固体制剂对黄曲霉菌及其分生孢子的抑制作用；采用超高效液相色谱-荧光检测器（UPLC-FLD）分析花椒精油固体制剂对黄曲霉毒素的抑制作用，激发波长360 nm，发射波长440 nm。**结果**：4个不同产地花椒的平均精油提取率5.2%；（+）-柠檬烯、芳樟醇和乙酸芳樟酯是不同产地花椒精油的主要成分。含花椒精油体积分数为0.1%时，花椒精油固体制剂对黄曲霉菌分生孢子的抑制率（16.41±8.89）%；含花椒精油体积分数为0.2%时，花椒精油固体制剂对黄曲霉菌的生长抑制率（8.11±2.70）%；当花椒精油固体制剂含花椒精油体积分数为0.5%时，对黄曲霉菌的生长抑制率（21.62±5.41）%，对黄曲霉菌分生孢子的抑制率（45.43±5.67）%，对黄曲霉毒素的抑制作用可达（90.47±12.77）%。**结论**：不同产地花椒精油的化学成分存在一定差异。花椒精油对黄曲霉菌分生孢子的形成及黄曲霉毒素B_1的产生均有抑制作用，可将花椒精油开发成抑菌制剂，运用于中药材、食品的存储。

［关键词］ 花椒；精油；化学成分；固体制剂；抗真菌；黄曲霉毒素；气相色谱-质谱法
［中图分类号］ R22；Q946.85；R28；O657 ［文献标识码］ A ［文章编号］ 1005-9903（2021）02-0153-08
［doi］ 10.13422/j.cnki.syfjx.20201952
［网络出版地址］ https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200701.1202.004.html
［网络出版日期］ 2020-7-1 14:41

Analysis of Chemical Composition in Essential Oil of Zanthoxyli Pericarpium from Different Producing Areas and Investigation of Antifungal Effect of Zanthoxyli Pericarpium Essential Oil Solid Preparation

ZHOU Jie, LIU Lu, QIU Sheng-min, YANG Xi-xian, HU Yi-chen*
(*Key Laboratory of Coarse Cereal Processing*, *Ministry of Agriculture and Rural Affairs*, *Chengdu University*, *Chengdu* 610106, *China*)

［**Abstract**］ **Objective**: To extract essential oil of Zanthoxyli Pericarpium, to prepare Zanthoxyli Pericarpium essential oil solid preparation and investigate its anti-fungal effect, in order to provide safe, green and efficient fungicide for the storage of Chinese herbal medicine and food. **Method**: The essential oil of Zanthoxyli Pericarpium was extracted by steam distillation method, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was adopted to analyze the chemical compositions and their relative contents in essential oil of Zanthoxyli Pericarpium from different producing areas, Agilent HP-5 capillary column was used for separation at

［收稿日期］ 20200424（012）
［基金项目］ 国家自然科学基金青年科学基金项目（81603288）；四川省中医药管理局花椒专项（2018HJZX007）
［第一作者］ 周杰，在读硕士，从事中药质量控制研究，E-mail：1529716675@qq.com
［通信作者］ *胡一晨，博士，副教授，从事中药质量控制及活性成分研究，E-mail：huyichen0323@126.com

programmed temperature (the initial temperature was 60 ℃, kept for 2 min, then increased to 280 ℃ by 10 ℃·min^{-1}, kept for 5 min), the scanning range was *m/z* 35-590. Zanthoxyli Pericarpium essential oil solid preparation was prepared by nanomolecular sieve adsorption method, and its inhibitory effect on *Aspergillus flavus* and its conidia was investigated. Ultra-high performance liquid chromatography-fluorescence detector (UPLC-FLD) was used to analyze the inhibitory effect of Zanthoxyli Pericarpium essential oil solid preparation on aflatoxin under the conditions of excitation wavelength of 360 nm and emission wavelength of 440 nm. **Result**: The average extraction rate of essential oil in Zanthoxyli Pericarpium from four producing areas was 5.2%. (+)-Limonene, linalool and linalyl acetate were the main components of Zanthoxyli Pericarpium essential oil from different producing areas. When the volume fraction of essential oil in the solid preparation was 0.1%, the inhibition rate of the solid preparation on the conidia of *A. flavus* was (16.41±8.89)%. When the volume fraction of essential oil in the solid preparation was 0.2%, the inhibition rate for the growth of *A. flavus* was (8.11±2.70)%. When the volume fraction of essential oil in the solid preparation was 0.5%, the inhibition rate for the growth of *A. flavus* was (21.62±5.41)%, the inhibition rate for *A. flavus* conidia was (45.43±5.67)%, and the inhibition effect for the aflatoxin could reach (90.47±12.77)%. **Conclusion**: There are some differences in the chemical composition of essential oil of Zanthoxyli Pericarpium from different producing areas. Zanthoxyli Pericarpium essential oil has a certain inhibitory effect on the formation of *A. flavus* conidia and the production of aflatoxin B_1. It shows that Zanthoxyli Pericarpium essential oil can be developed into bacteriostatic preparation and used in the storage of Chinese medicinal materials and food.

[**Key words**] Zanthoxyli Pericarpium; essential oil; chemical composition; solid preparation; antifungal; aflatoxin; gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

花椒是芸香科、花椒属植物的干燥成熟果皮，全世界大约有250种，分布于亚洲、美洲、非洲及大洋洲的热带和亚热带地区。目前我国大约有39种花椒种植广泛[1-3]，主要分布在四川、贵州、甘肃、陕西等地，其中四川汉源是全国著名的花椒基地，素有“中国花椒之乡”之称[4]。花椒营养成分丰富，主要含有挥发油[5]、酰胺、生物碱[6]、类黄酮[7]、香豆素、木脂素、三萜类化合物[8-9]，目前已在食品行业中得到了广泛使用，但在医药方面还处于传统用药状态[10]。据《神农本草经》记载，花椒具有除风邪气，温中，去寒痹，坚齿发，明目，久服轻身好颜色，耐老增年通神的功效。《本草纲目》记载[11]：“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；入右肾补火，治阳衰溲数，足弱，久痢诸症”。现代研究表明，花椒具有镇痛、护肝、抑制血栓等作用[12]，同时花椒含有抑菌成分，具有抗菌消炎的作用，尤其是对于皮肤表面的细菌，具有很好的抑制作用[13]。另外，花椒精油对部分人体致病菌也有一定的抑制作用[14-15]，不仅能抑制革兰氏阴性菌，也能抑制革兰氏阳性菌，同时对霉菌、真菌也有抑制作用[16-18]。

黄曲霉菌是自然界中最常见的霉菌，其次生代谢产物——黄曲霉毒素具有高侵染性、高残留性、高毒性[19]，仅0.294 mg·kg^{-1}剂量就能引起敏感动物的急性中毒死亡，同时对肝、肾及机体免疫功能均表现出毒性[20-21]。经研究发现在潮湿环境储存的中药材、农作物、食品等都能检测到有产毒真菌的产生[22-23]，因此，寻找抗菌和抑菌新新方法、开发各种抗黄曲霉菌及黄曲霉毒素合成抑制剂显得尤为重要。近年来研究证明，姜黄、丁香、肉桂等多种植物挥发油可通过改变真菌细胞壁和细胞膜结构、影响真菌细胞核酸和蛋白质合成、影响真菌细胞内能量代谢及产毒基因表达等途径，从而有效抑制黄曲霉毒素合成，且安全性较好、耐药性小[24-25]。花椒精油具有强烈的抑制或杀死真菌等微生物的特性[26-28]，有望作为一种高效、安全的防霉药物(制剂)广泛用于食品、中药材及其制品等领域。但精油具有溶解度差、易挥发、不稳定等特点，实际应用时如何得到质量稳定的精油制剂是其推广应用的重要技术难题。本研究拟借鉴中药材与花椒对抗同贮的传统方式，将花椒精油开发制备为可控式固体制剂，考察固态化花椒精油抑制黄曲霉菌生长和毒素累积的作用，以期开发一种高效、绿色、安全的中药材、食品、农产品贮藏期抑菌产品，提升花椒的综合利用率。

1 材料

7890A-5975C型气相色谱-质谱联用仪[安捷伦科技(中国)有限公司],ACQUITY UPLC H-Class型超高效液相色谱仪[沃特世科技(上海)有限公司],BX43型正置显微镜(日本奥林巴斯公司),BJ-2CD型超净工作台(上海博迅医疗生物仪器股份有限公司),SF-TGL-16M型台式高速离心机(上海菲恰尔分析仪器有限公司),YP10002型电子天平(上海佑科仪器仪表有限公司),UP-I-10T型台上式超纯水机(四川优普超纯科技有限公司),RH-600A型粉碎机(浙江荣浩工贸有限公司),DH4000BⅡ型电热恒温培养箱(天津市泰斯特仪器有限公司),XB-K-25型血细胞计数板(上海市求精生化试剂仪器有限公司)。

无水硫酸钠(天津博迪化工股份有限公司,批号20141009),卡拉胶(山东西亚化学工业有限公司,批号W7294),沸石分子筛(国药集团化学试剂有限公司,批号20140220),聚山梨酯-80(tween-80,天津市科密欧化学试剂有限公司,批号20130317),马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基和薄荷香精油(上海源叶生物科技有限公司,货号分别为R30024,S24627),察氏琼脂培养基(北京奥博星生物技术有限责任公司,货号02-055),试剂均为分析纯。甘肃大红袍花椒(编号Y1),韩城大红袍花椒(编号Y2),汉源红花椒(编号Y3)和茂汶大红袍花椒(编号Y4)均于2019年9月4日购于四川省成都国际贸易城荷花池中药材专业市场,经成都大学刘涛研究员鉴定,均为芸香科植物花椒*Zanthoxylum bungeanum*的干燥成熟果皮;黄曲霉菌(*Aspergillus flavus*,中国普通微生物菌种保藏管理中心,CGMCC编号3.4410);黄曲霉毒素B_1,B_2,G_1,G_2(AFB_1,AFB_2,AFG_1,AFG_2)质量浓度分别为2,0.5,2,0.5 mg·L^{-1}的混合对照品溶液(新加坡PriboLab公司,编号STD# 1081)。

2 方法

2.1 不同产地花椒精油的成分差异分析

2.1.1 GC-MS检测条件 Agilent HP-5毛细管柱(0.25 mm×30 m,0.25 μm),进样量1 μL,流速1 mL·min^{-1},分流比10∶1,前进样口温度250 ℃,辅助加热温度290 ℃,程序升温(初始温度60 ℃,保持2 min,以10 ℃·min^{-1}上升至280 ℃,保持5 min),离子源温度230 ℃,四级杆温度150 ℃,扫描范围*m/z* 35~590,溶剂延迟时间4 min[29]。

2.1.2 花椒精油的提取及供试品溶液的制备 依据2015年版《中国药典》所载方法,采用水蒸气蒸馏法提取花椒精油,将提取到的花椒精油作为重要原料来制备固体制剂。分别精密移取样品Y1,Y2,Y3,Y4花椒精油各50 μL,精密移取十三烷100 μL至10 mL量瓶中,加无水乙醚溶解并定容至刻度,置于-20 ℃冰箱中备用,即得花椒精油供试品溶液。利用质谱数据处理系统处理谱图信息,运用面积归一化法计算各成分的相对含量。

2.2 花椒精油固体制剂制备及抗真菌作用评价

2.2.1 花椒精油固体制剂的制备 在250 mL的烧杯中加入去离子水100 mL,加入tween-80 3 mL,卡拉胶7 g和沸石分子筛3.0 g,95 ℃水浴加热,边加热边搅拌使体系温度逐渐升高,加热20 min至固体溶解后停止加热,形成均匀的透明溶胶。待混合物冷却至65~75 ℃,逐渐加入乙醇2 mL,搅拌均匀。待混合物降温至45~50 ℃,加入薄荷香精油1.0 mL,然后再加入不同体积分数(0,0.1%,0.2%,0.3%,0.4%,0.5%)的花椒精油,搅拌均匀;将分散后的混合物倒入模具中,自然冷却凝固后,制得含花椒精油体积分数为0%,0.1%,0.2%,0.3%,0.4%,0.5%的固体制剂[30],每粒固体制剂的体积1 cm^3。

2.2.2 黄曲霉菌的复苏 将黄曲霉菌冻干粉管外壁用酒精棉擦净。点燃酒精灯,将菌种管的封口一端在火焰上烧灼至红热,用无菌滴管吸取适量无菌水,滴在灼热的菌种管封口一端,使其骤冷而炸裂。取无菌镊子,在火焰旁将炸裂的管口打开,另取1支无菌滴管,在火焰旁吸取PDA培养基少许,加至菌种管底部,充分搅拌,随即吸出管内菌液,接种至PDA培养基斜面上,按编号标记后移入恒温培养箱内,在温度28 ℃,相对湿度90%条件下培养7 d。用无菌接种环挑取上述复苏后的黄曲霉菌分生孢子到察氏培养基平板上,置于温度28 ℃,相对湿度90%的电热恒温培养箱内培养7 d[31]。

2.2.3 花椒精油固体制剂抑菌起效体积分数的考察 将直径90 mm的一次性无菌三分格培养皿的其中一个分格加入灭菌的察氏培养基8.5 mL,在另外一个分格中加入1粒体积为1 cm^3的花椒精油固体制剂。其中加入含花椒精油体积分数为0.1%,0.2%,0.3%,0.4%,0.5%的固体制剂的培养皿为测试组,加入含花椒精油体积分数为0%的空白固体制剂的培养皿为控制组,以不加固体制剂的培养皿为空白组。轻轻刮取察氏培养基平板上少许黄曲霉菌孢子点样接种于培养基上,置于温度28 ℃,相对湿度90%的电热恒温培养箱中培养7 d,所有的

实验均重复 3 次。7 d 后测量黄曲霉菌的生长直径，考察花椒精油固体制剂对黄曲霉菌生长的抑制作用[32]，计算公式为生长抑制率=[(d_c–d_t)/d_c]×100%，式中 d_c 和 d_t 分别为控制组、测试组黄曲霉菌的直径。

2.2.4 花椒精油固体制剂对黄曲霉菌分生孢子形成的抑制作用 参考 HU 等[24]的方法，取 **2.2.3** 项下培养 7 d 后接种有黄曲霉菌的平板培养基，加入含 0.5% tween-80 的无菌水 5 mL。用无菌接种环轻轻刮取培养基表面的分生孢子，再用无菌移液器吸取分生孢子悬液，加入含 0.5% tween-80 的无菌水定容至 25 mL。运用血球计数板（25 格×16 格，计数区体积 0.1 mm^3）法计数，计算分生孢子形成的抑制率，计算公式为抑制率=[(N_c–N_t)/N_c]×100%，式中 N_c 和 N_t 分别为控制组、测试组黄曲霉菌的孢子数。

2.2.5 花椒精油固体制剂对黄曲霉毒素产生的抑制作用 超高效液相色谱串联荧光检测器（UPLC-FLD）的色谱条件为 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱（2.1 mm×50 mm，1.8 μm），流动相水-甲醇（50∶50），流速 0.2 mL·min^{-1}，柱温设定 30 ℃，进样量 1 μL，FLD 的激发波长 360 nm，发射波长 440 nm，UPLC-FLD 分析时间 6 min。将培养 7 d 后接种有黄曲霉菌的培养皿中的黄曲霉菌丝及培养基置于锥形瓶中，加入 50% 甲醇 50 mL，超声 20 min（功率 200 W，频率 40 kHz），用中速滤纸过滤，取续滤液，12 000 r·min^{-1} 离心 5 min（离心半径 10 cm）后取上清液，过 0.22 μm 微孔滤膜，置于进样瓶中，–20 ℃冰箱保存，备用[24,32]。计算花椒精油固体制剂对黄曲霉毒素的抑制率，计算公式为抑制率=(1–X/Y)×100%，式中 X 和 Y 分别为测试组、控制组的黄曲霉毒素含量。

3 结果

3.1 不同产地花椒精油的化学成分差异 甘肃大红袍花椒、韩城大红袍花椒、汉源红花椒、茂汶大红袍花椒的精油提取率分别为 5.16%，4.90%，5.50%，5.24%，4 个不同产地花椒精油的平均提取率 5.2%。各产地花椒精油的化学成分及其相对质量分数见表 1。从 4 个不同产地花椒精油中共鉴定出了 40 个成分，已鉴定成分的峰面积之和占花椒精油总峰面积的 97% 以上，其中不同产地花椒精油的共有成分 17 种，主要为单萜类、含氧单萜类、倍半萜类和含氧倍半萜类化合物。

由表 1 可知，韩城大红袍花椒的单萜类化合物和倍半萜类化合物在 4 个不同产地花椒中含量最高，相对质量分数分别为 52.320% 和 6.709%；汉源红花椒的含氧单萜类化合物和含氧倍半萜类化合物含量在 4 个不同产地花椒中含量最高，相对质量分数分别为 56.331% 和 3.376%，其总离子流图见图 1。从甘肃大红袍花椒精油中共鉴定出 34 种成分，其中相对质量分数最高的为（+）-柠檬烯（14.130%），其次为乙酸芳樟酯（11.463%）和芳樟醇（10.168%）。从韩城大红袍花椒精油中共鉴定出 34 种成分，其中相对质量分数最高的为（+）-柠檬烯（13.710%），其次为桉油精（10.539%）和 β-月桂烯（8.810%）。从汉源红花椒精油中共鉴定出 28 种成分，其中相对质量分数最高的为芳樟醇（22.121%），其次为（+）-柠檬烯（19.044%）和乙酸芳樟酯（15.442%）。从茂汶大红袍花椒精油中共鉴定出 26 种成分，其中相对质量分数最高的为（+）-柠檬烯（16.831%），其次为乙酸芳樟酯（14.017%）和芳樟醇（11.694%）。（+）-柠檬烯、芳樟醇和乙酸芳樟酯这 3 种成分在 4 个不同产地花椒精油中含量均较高，说明这 3 种成分是不同产地红花椒精油的主要成分。汉源和茂汶同属四川省内产地，但是花椒精油成分含量之间依然存在差异，如汉源红花椒精油中含氧倍半萜类物质相对质量分数 3.376%，而在茂汶大红袍花椒精油中其仅为 0.545%，且汉源红花椒和甘肃大红炮花椒、韩城大红袍花椒的花椒精油各成分之间都有很大差距，说明产地差异会对花椒精油的化学成分产生较大的影响，即使在同一省份，花椒精油的成分也会因环境和品种的影响而有所不同。相关研究表明（+）-柠檬烯、芳樟醇和乙酸芳樟酯具有抗菌杀虫的功效[33-34]，比较这 3 种主要成分在 4 个不同产地花椒中的含量，发现这 3 种成分在汉源红花椒中的含量最高，且汉源为红花椒的道地产区，所产红花椒具有产量大、质量好、精油含量高等优点。故后续选择以汉源红花椒的花椒精油为原料开展抗真菌作用研究。

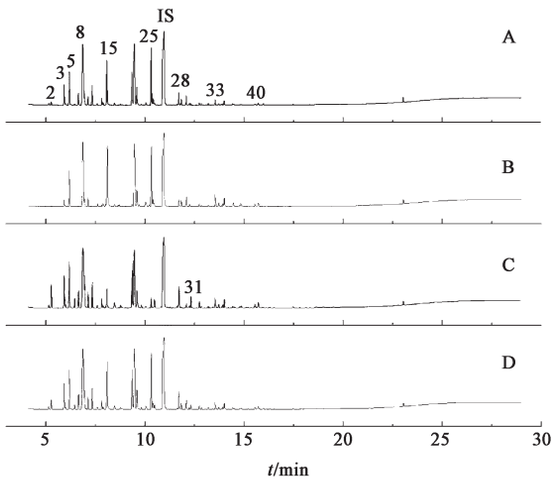
3.2 花椒精油固体制剂抗黄曲霉菌作用评价 空白组和控制组黄曲霉菌的生长直径分别为（3.9±0.2），（3.7±0.2）cm，提示薄荷香精油对黄曲霉菌的生长有轻微的抑制作用；比较控制组与测试组可知，当固体制剂中花椒精油体积分数为 0.1% 时，黄曲霉菌的生长直径（3.7±0.1）cm，无显著抑菌效果；当固体制剂中花椒精油体积分数为 0.2% 时，黄曲霉菌的生长直径（3.4±0.1）cm，其对黄曲霉菌的生长抑制率（8.11±2.70）%；当固体制剂中花椒精油体积分数为 0.3% 时，黄曲霉菌的生长直径（3.3±0.1）cm，其对黄曲霉菌的生长抑制率（10.81±2.70）%；当固体

表 1　不同产地花椒精油的化学成分及其相对质量分数

Table 1　Chemical compositions and their relative contents in essential oil of Zanthoxyli Pericarpium from different producing areas　%

峰号	t_R/min	化合物	分子式	CAS 号	Y1	Y2	Y3	Y4
1	5.131	α-蒎烯 α-pinene	$C_{10}H_{16}$	80-56-8	0.474	0.515	–	–
2	5.266	3-蒈烯 3-carene	$C_{10}H_{16}$	13466-78-9	1.825	4.354	–	0.942
3	5.93	β-水芹烯 β-phellandrene	$C_{10}H_{16}$	555-10-2	5.296	6.089	–	4.993
4	5.991	β-蒎烯 β-pinene	$C_{10}H_{16}$	127-91-3	–	0.537	1.555	–
5	6.175	β-月桂烯 β-myrcene	$C_{10}H_{16}$	123-35-3	7.192	8.810	7.764	7.393
6	6.446	α-水芹烯 α-phellandrene	$C_{10}H_{16}$	99-83-2	0.742	1.595	–	–
7	6.642	2-蒈烯 2-carene	$C_{10}H_{16}$	554-61-0	2.466	2.709	–	2.362
8	6.863	(+)-柠檬烯(+)-limonene	$C_{10}H_{16}$	5989-27-5	14.130	13.710	19.044	16.831
9	6.900	桉油精 eucalyptol	$C_{10}H_{18}O$	470-82-6	7.778	10.539	2.126	6.880
10	6.949	反式-β-罗勒烯 *trans*-β-ocimene	$C_{10}H_{16}$	3779-61-1	2.729	4.813	1.274	1.868
11	7.121	β-罗勒烯 β-ocimene	$C_{10}H_{16}$	13877-91-3	1.807	2.362	1.345	1.540
12	7.330	γ-松油烯 γ-terpinene	$C_{10}H_{16}$	99-85-4	3.758	4.075	–	3.620
13	7.576	异蒲勒醇 isopulegol	$C_{10}H_{18}O$	89-79-2	0.526	0.423	1.632	–
14	7.809	4-蒈烯 4-carene	$C_{10}H_{16}$	29050-33-7	1.294	1.300	–	1.187
15	8.067	芳樟醇 linalool	$C_{10}H_{18}O$	78-70-6	10.168	3.483	22.121	11.694
16	8.460	顺式-2-孟烯醇 *cis*-2-menthenol	$C_{10}H_{18}O$	29803-82-5	0.928	1.452	0.669	0.664
17	8.755	反式-2-孟烯醇 *trans*-2-menthenol	$C_{10}H_{18}O$	29803-81-4	0.382	0.531	–	–
18	9.344	4-萜烯醇 terpinen-4-ol	$C_{10}H_{18}O$	562-74-3	7.909	8.737	0.691	7.826
19	9.578	α-松油醇 *L*-α-terpineol	$C_{10}H_{18}O$	10482-56-1	4.226	4.000	4.145	4.346
20	9.700	反式-异薄荷烯(–)-*trans*-isopiperitenol	$C_{10}H_{16}O$	74410-00-7	–	–	0.585	–
21	9.811	反式-薄荷醇 *trans*-piperitol	$C_{10}H_{18}O$	16721-39-4	0.351	0.515	–	–
22	10.020	反式-香芹醇 *trans*-carveol	$C_{10}H_{16}O$	1197-07-5	–	–	1.990	–
23	10.032	橙花醇 nerol	$C_{10}H_{18}O$	106-25-2	0.641	0.467	–	0.713
24	10.204	*L*-香芹醇 carveol	$C_{10}H_{16}O$	99-48-9	–	–	0.479	–
25	10.302	乙酸芳樟酯 linalyl acetate	$C_{12}H_{20}O_2$	115-95-7	11.463	1.678	15.442	14.017
26	10.401	香叶醇 geraniol	$C_{10}H_{18}O$	106-24-1	1.253	–	2.609	1.596
27	10.474	胡椒酮 piperitone	$C_{10}H_{16}O$	89-81-6	0.803	1.609	–	0.581
28	11.703	乙酸松油酯 α-terpinyl acetate	$C_{12}H_{20}O_2$	80-26-2	2.779	3.555	1.371	2.391
29	11.825	乙酸橙花酯 nerol acetate	$C_{12}H_{20}O_2$	141-12-8	0.830	–	1.077	1.099
30	12.071	乙酸香叶酯 geranyl acetate	$C_{12}H_{20}O_2$	105-87-3	1.496	0.637	2.063	1.810
31	12.317	β-榄香烯 β-elemene	$C_{15}H_{24}$	515-13-9	0.718	1.835	–	–
32	12.734	1-石竹烯 1-caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	87-44-5	0.522	0.858	0.507	0.443
33	13.533	大根香叶烯 D germacrene D	$C_{15}H_{24}$	23986-74-5	1.061	1.501	2.336	1.151
34	13.717	α-衣兰油烯 α-muurolene	$C_{15}H_{24}$	31983-22-9	0.483	0.701	0.836	0.457
35	13.926	γ-衣兰油烯 γ-muurolene	$C_{15}H_{24}$	30021-74-0	–	0.445	0.487	–
36	14.000	Δ-杜松烯 Δ-cadinene	$C_{15}H_{24}$	483-76-1	1.018	1.368	1.792	0.932
37	14.454	橙花叔醇 nerolidol	$C_{15}H_{26}O$	142-50-7	–	–	1.004	–
38	14.859	氧化石竹烯 caryophyllene oxide	$C_{15}H_{24}O$	1139-30-6	0.360	0.617	0.806	–
39	15.535	杜松醇 *T*-cadinol	$C_{15}H_{26}O$	5937-11-1	0.483	0.885	0.748	–
40	15.707	α-毕橙茄醇 α-cadinol	$C_{15}H_{26}O$	481-34-5	0.584	1.122	0.818	0.545

注：Y1. 甘肃大红袍花椒；Y2. 韩城大红袍花椒；Y3. 汉源红花椒；Y4. 茂汶大红袍花椒。



A.甘肃大红袍花椒;B.韩城大红袍花椒;C.汉源红花椒;D.茂汶大红袍花椒

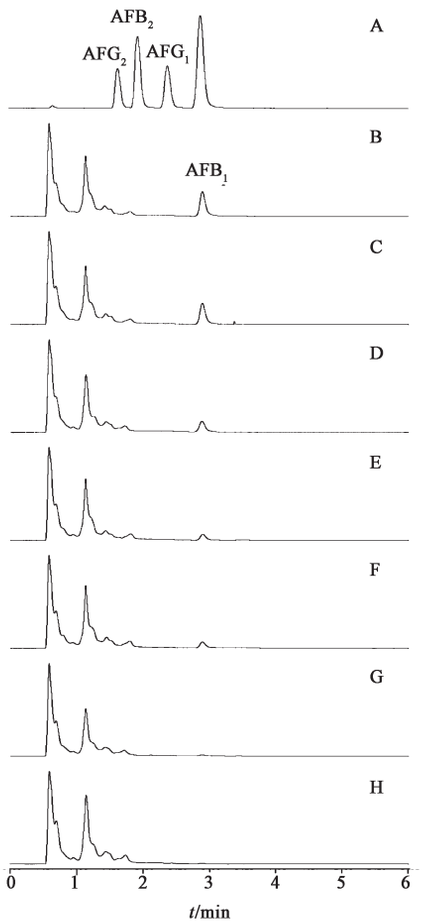
图1 不同产地花椒精油的GC-MS总离子流

Fig. 1 Total ion chromatograms of essential oil of Zanthoxyli Pericarpium from different producing areas by GC-MS

制剂中花椒精油体积分数为0.4%时,黄曲霉菌的生长直径(3.1±0.1) cm,其对黄曲霉菌的生长抑制率(16.22±2.70)%;当花椒精油固体制剂的体积分数为0.5%时,黄曲霉菌的生长直径(2.9±0.2) cm,对黄曲霉菌的生长抑制率(21.62±5.41)%。

3.3 花椒精油固体制剂对黄曲霉菌分生孢子形成的抑制作用 通过对控制组与测试组中黄曲霉菌分生孢子进行考察,结果表明加入含花椒精油体积分数为0.1%,0.2%,0.3%,0.4%,0.5%的固体制剂,对黄曲霉菌分生孢子形成的抑制率分别为(16.41±8.89)%,(21.26±8.21)%,(30.28±17.81)%,(41.80±8.47)%,(45.43±5.67)%。

3.4 花椒精油固体制剂对黄曲霉毒素产生的抑制作用 通过对已培养7 d的控制组与测试组中黄曲霉毒素进行测定,结果表明加入含花椒精油体积分数为0.1%,0.2%,0.3%,0.4%,0.5%的固体制剂时,对AFB_1形成的抑制率分别为(50.39±6.02)%,(53.49±11.48)%,(59.69±9.07)%,(84.34±18.73)%,(90.47±12.77%)%。说明花椒精油的加入量与花椒精油固体制剂对黄曲霉菌的抑制作用呈剂量相关性,当固体制剂中花椒精油体积分数为0.5 %时,其对AFB_1的抑制作用达到最大。见图2。



A.黄曲霉毒素混合对照品;B.空白组;C.控制组;D~H.花椒精油体积分数分别为0.1%,0.2%,0.3%,0.4%,0.5%的固体制剂

图2 不同体积分数花椒精油固体制剂对AFB_1产量的影响

Fig. 2 Effect of Zanthoxyli Pericarpium essential oil solid preparation with different concentration on content of aflatoxin B_1

4 讨论

花椒精油具有挥发性,化学成分复杂,是天然的防霉剂。本研究采用水蒸气蒸馏法得到花椒精油,经GC-MS对4个不同产地的花椒精油进行分析,共鉴定出40个成分,主要成分为单萜类、含氧单萜类、倍半萜类和含氧倍半萜类化合物等化合物,其中(+)-柠檬烯、芳樟醇和乙酸芳樟酯是不同产地花椒精油的主要成分,但在4个不同产地花椒精油的成分之间又有较大的差异,说明产地对花椒精油化学成分具有较大影响。花椒精油的化学成分与其生物活性联系紧密[35],本研究发现原料来源的差异会导致花椒精油成分的差异,因此寻找最优产地花椒,明确抑菌作用活性物质是进一步研究的重点。

黄曲霉菌是一类广泛存在于中药材、农产品中的真菌,其次级代谢产物黄曲霉毒素可致畸、致癌、致突变,其中又以AFB_1危害最为严重。AFB_1是现今污染范围最广、毒性最大、致癌性最强的一种真菌毒素。本实验所选黄曲霉菌主要产生的次级代谢产物为AFB_1。因此,研究花椒精油固体制剂对黄曲霉毒素产生的抑制作用时只考察了AFB_1。目前,

中药材、食品、农产品等主要通过人工合成的化学防腐剂来控制黄曲霉及其毒素的污染，虽然效果较好，但容易产生抗药性，且易造成环境污染，已逐渐被限制使用[36-37]。因此，采用高效、安全的天然防霉剂替代传统常见的化学防霉剂已经成为一种新趋势[38-39]。

在天然防霉剂中，具有芳香成分和药用价值的挥发油更是受到了极大关注。花椒精油具有良好的防霉抑菌作用，可作为天然防霉剂的原料资源。大量研究表明，花椒精油可增加受试菌细胞壁的通透性，从而导致细胞内K^+，Mg^{2+}，碱性磷酸酶(AKP)及DNA等物质渗出，进而影响受试菌的生长代谢[40]。为了更好地保存花椒精油的芳香气味，增加花椒精油的稳定性和应用可行性，本研究将花椒精油与沸石分子筛结合，利用沸石分子筛对小分子物质的吸附作用，制备出一种可控式的固体制剂。本课题组前期采用单因素试验考察了花椒精油固体制剂的制备工艺，优化了卡拉胶，tween-80，沸石分子筛，乙醇及花椒精油的用量，利用薄荷香精油对花椒精油刺激性气味的掩盖作用，探索花椒精油与薄荷香精油联合应用后花椒精油固体制剂的刺激气味及其抑菌作用，发现花椒精油对黄曲霉菌生长、黄曲霉菌分生孢子、黄曲霉毒素的产生都有抑制作用，可将花椒精油固体制剂应用于易生长霉菌的中药材和食品中，以防霉抗菌。但本研究中考察的花椒精油用量对黄曲霉菌生长直径和黄曲霉菌分生孢子形成的抑制率均不高，说明这些用量尚不足以完全抑制黄曲霉菌的生长，后续将继续考察花椒精油用量对黄曲霉菌生长的抑制作用，找出花椒精油固体制剂的最小抑菌浓度。另外，花椒精油固体制剂中花椒精油的挥发时长对黄曲霉菌生长的影响还有待考察。花椒精油作为天然的防霉剂和保鲜剂在肉类制品及果蔬等食品领域有一定的应用价值，但由于精油本身的特性，导致花椒精油在中药材中的应用仍然存在许多问题，释放的挥发性成分是否会残留于药材表面以致改变中药材的性味功效亟待深入研究。后续将继续考察花椒精油对中药材、食品等的防霉抗菌作用，以期为花椒精油的工业化应用提供方向，保障中药材和食品的安全。

[参考文献]

[1] 张仁凤，陈光静，屈立武，等. 不同产地红花椒籽油脂肪酸组成的比较研究[J]. 中国调味品，2017，42(6)：1-4.
[2] 王纪辉，陈应福，侯娜，等. 源自不同产地青花椒主要特征品质分析[J]. 食品工业，2018，39(8)：322-325.
[3] GUO T，DENG Y X，XIE H，et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of ethyl acetate fraction from *Zanthoxylum armatum* in mice[J]. Fitoterapia，2011，82(3)：347-351.
[4] 吴振，李红，杨勇，等. 基于无机元素的花椒产地溯源和品种聚类分析[J]. 食品科学，2019，40(16)：213-219.
[5] 李倩，蒲彪. 不同产地青花椒主要营养成分的比较研究[J]. 中国调味品，2011，36(10)：13-17.
[6] 边甜甜，辛二旦，张爱霞，等. 花椒生物碱提取、含量测定及药理作用研究概述[J]. 中国中医药信息杂志，2018，25(11)：135-137.
[7] 张宇思，龚祝南，石雪萍. 花椒总黄酮的抗氧化作用[J]. 食品科学，2011，32(15)：70-73.
[8] 娄京荣. 花椒化学成分及药理活性研究[D]. 济南：济南大学，2019.
[9] 张玉霖，周亮，陈莉，等. 顶空固相微萃取结合GC-MS分析花椒油香气成分[J]. 食品研究与开发，2019，40(1)：173-178.
[10] ZHANG M M，WANG J L，ZHU L，et al. *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. (Rutaceae)：a systematic review of its traditional uses，botany，phytochemistry，pharmacology，pharmacokinetics，and toxicology[J]. Int J Mol Sci，2017，18(10)：2172.
[11] 赵秀玲. 花椒的化学成分、药理作用及其资源开发的研究进展[J]. 中国调味品，2012，37(3)：1-5.
[12] TSUNOZAKI M，LENNERTZ R C，VILCEANU D，et al. A 'toothache tree' alkylamide inhibits Aδ mechanonociceptors to alleviate mechanical pain[J]. J Physiol，2013，591(13)：3325-3340.
[13] 赵二劳，徐未芳，刘乐，等. 花椒抑菌作用研究进展[J]. 中国调味品，2019，44(3)：185-188.
[14] 干信，吴士筠，高雯琪. 花椒挥发油抑菌作用研究[J]. 食品科学，2009，30(21)：128-130.
[15] LEI H，WU J，WANG Q，et al. Inhibitory effect of *Zanthoxylum bungeanum* essential oil (ZBEO) on *Escherichia coli* and intestinal dysfunction[J]. Food Funct，2017，8(4)：1569-1576.
[16] 边甜甜，司昕蕾，曹瑞，等. 花椒挥发油提取、成分分析及药理作用研究概述[J]. 中国中医药信息杂志，2018，25(8)：129-132.
[17] 熊李波，秦强，胡培芳，等. 混料设计优化孜然、花椒、芥子混合精油对4种果蔬采后真菌的抑菌效果[J]. 食品科学，2019，40(3)：208-216.
[18] TIAN J，ZENG X B，FENG Z Z，et al. *Zanthoxylum*

molle Rehd. essential oil as a potential natural preservative in management of *Aspergillus flavus*[J]. Ind Crop Prod, 2014, 60: 151-159.

[19] TIAN F, LEE S Y, CHUN H S, et al. Comparison of the antifungal and antiaflatoxigenic potential of liquid and vapor phase of *Thymus vulgaris* essential oil against *Aspergillus flavus*[J]. J Food Protect, 2019, 82(12): 2044-2048.

[20] 宋蓉, 贾晓娟, 邵彦春, 等. 花椒精油的提取、抗菌活性研究及GC-MS分析[J]. 中国农学通报, 2014, 30(21): 263-270.

[21] 王秋亚, 景晓卉. 花椒精油化学成分、提取方法及抑菌活性研究进展[J]. 中国调味品, 2018, 43(12): 187-190, 195.

[22] SILVA P D C E, PEREIRA L A S, DE REZENDE É M, et al. Production and efficacy of neem nanoemulsion in the control of *Aspergillus flavus* and *Penicillium citrinum* in soybean seeds[J]. Eur J Plant Pathol, 2019, 155(4): 1105-1116.

[23] 陈媛媛, 李蕊蕊, 董志昊, 等. 黄曲霉毒素B_1研究进展[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2019, 31(1): 28-32.

[24] HU Y C, LUO J Y, KONG W J, et al. Uncovering the antifungal components as fumigants in turmeric (*Curcuma longa* L.) essential oil against *Aspergillus flavus* by partial least squares[J]. RSC Adv, 2015, 5(52): 41967-41976.

[25] 李红玲, 高微微. 植物挥发油对黄曲霉毒素产生菌及其毒素合成的影响[J]. 中国食品卫生杂志, 2012, 24(6): 590-595.

[26] 徐坤. 花椒油抑菌效果探讨[J]. 中国调味品, 2011, 36(5): 25-27, 31.

[27] DA COSTA J G M, BRITO S A, ALMEIDA T S, et al. Chemical composition and antibacterial evaluation of the essential oil of *Zanthoxylum articulatum*[J]. J Essent Oil Bear Pl, 2010, 13(6): 767-773.

[28] 祝瑞雪, 曾维才, 赵志峰, 等. 汉源花椒精油的化学成分分析及其抑菌作用[J]. 食品科学, 2011, 32(17): 85-88.

[29] 边甜甜, 辛二旦, 张爱霞, 等. GC-MS法分析花椒清炒法炮制前后挥发性成分变化[J]. 中国新药杂志, 2019, 28(15): 1871-1875.

[30] 安徽唯诗杨信息科技有限公司. 一种新型固体空气清新剂及空气清新剂盒: 中国, CN201711065838.9[P]. 2018-03-06.

[31] 胡一晨, 孔维军, 杨美华. 姜黄挥发油脂质体制备及其抗黄曲霉菌评价研究[J]. 世界中医药, 2015, 10(8): 1157-1162.

[32] HU Y C, ZHANG J M, KONG W J, et al. Mechanisms of antifungal and anti-afatoxigenic properties of essential oil derived frome turmeric (*Curcuma longa* L.) on *Aspergillus flavus*[J]. Food Chem, 2016, 220: 1-8.

[33] 张智敏, 聂莼, 李亚梅, 等. 枳壳挥发油中柠檬烯含量与麸炒炮制及抑菌活性的关系[J]. 亚太传统医药, 2019, 15(6): 30-33.

[34] 郭俸钰, 陈文学, 陈海明, 等. 芳樟醇对大肠杆菌的抑菌作用机制[J]. 现代食品科技, 2020, 36(4): 113-118.

[35] NOGUEIRA J, MOURÃO S C, DOLABELA I B, et al. *Zanthoxylum caribaeum* (Rutaceae) essential oil: chemical investigation and biological effects on *Rhodnius prolixus* Nymph[J]. Parasitol Res, 2014, 113(11): 4271-4279.

[36] SHAO S, CAI J, DU X, et al. Biotransformation and detoxification of aflatoxin B_1 by extracellular extract of *Cladosporium uredinicola*[J]. Food Sci Biotechnol, 2016, 25(6): 1789-1794.

[37] 徐丹, 郭芮, 贺竹梅, 等. 九种植物精油对黄曲霉抑制作用的比较[J]. 保鲜与加工, 2020, 20(2): 79-84.

[38] WANG Y, ZHANG L T, FENG Y X, et al. Insecticidal and repellent efficacy against stored-product insects of oxygenated monoterpenes and 2-dodecanone of the essential oil from *Zanthoxylum planispinum* var. *dintanensis*[J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2019, 26(24): 24988-24997.

[39] 李婷, 姜丹, 常晓茜, 等. 16种植物挥发油对柏子仁黄曲霉菌的抑制作用考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(5): 132-136.

[40] 王瑶, 陈宇航, 庞雯文, 等. 花椒提取物对致痤疮菌的抑菌活性研究及机制初探[J]. 现代预防医学, 2017, 44(9): 1692-1697.

[责任编辑 刘德文]