

蚬壳花椒中性亲脂性成分的抑菌活性及其化学成分*

马英姿¹ 王 平¹ 袁 园² 韦熹苑² 裴 刚² 何桂霞²

(1. 中南林业科技大学生命科学与技术学院 长沙 410004; 2. 湖南中医药大学 长沙 410208)

关键词: 蚬壳花椒; 亲脂性; 抑菌活性; 化学成分; 光谱分析

中图分类号: S763.1 文献标识码: A 文章编号: 1001-7488(2010)02-0162-04

Bacteriostasis and Chemical Components of the Neutral Lipophilic Components in *Zanthoxylum dissitum*

Ma Yingzi¹ Wang Ping¹ Yuan Yuan² Wei Xiyuan² Pei Gang² He Guixia²

(1. School of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology Changsha 410004;

2. Hunan University of Chinese Medicine Changsha 410208)

Abstract: Effects of bacteriostasis of the Neutral Lipophilic Components in *Zanthoxylum dissitum* were studied. The neutral lipophilic extract was fractionated through SiO₂ column and the products were identified by ¹H-NMR, ¹³C-NMR and MS. The results showed that the fraction exhibited strong bacteriostasis activity to *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* sp. and also showed more or less inhibition on *Escherichia coli*. Six components were obtained, namely triacontane, 1-hexadecanol, β -sitosterol, ursolic acid, isopimpinellin and bergapten. Except for β -sitosterol, the others were isolated from the plant for the first time. After the preliminary analysis, the coumarins were considered as the active components of bacteriostasis activity.

Key words: *Zanthoxylum dissitum*; lipophilic property; bacteriostasis activity; chemical components; spectral analysis

芸香科(Rutaceae)花椒属(*Zanthoxylum*)植物,全世界约有 250 种,分布于亚洲、非洲、美洲及大西洋热带和亚热带地区,我国有 39 种 14 变种(孙小文等,1996)。花椒属植物的药用成分与食用价值及其开发利用一直是该属植物研究的重点。蚬壳花椒(*Z. dissitum*)为花椒属木质藤本,中药名为单面针,别名山枇杷、大叶花椒、蚌壳花椒等,分布于我国西南、广东、广西、湖南、湖北、陕西的山地林中。根、茎及叶均供药用,能祛风活络、散瘀止痛、解毒消肿(全国中草药汇编编写组,1975),是许多中成药组方中的主要成分,如妇科千金片,妇科外用洗液等。针对其资源短缺状况,本课题组已经对其进行了人工快繁技术的系统研究(马英姿等,2007;2009;王平等,2008a,2008b),但目前对于蚬壳花椒的化学成分的研究还很少,已报道的成分仅有白藜碱、 γ -花椒碱、茵芋碱等生物碱类,及合帕洛平、 β -谷甾醇、胡萝卜苷、一个以 C₂₆H₅₂O₂ 为主的混合长链脂肪酸等(汤俊等,1995;Tang et al.,2003)。迄今为止,国内外尚未见对蚬壳花椒中亲脂性成分的抑菌活性及

其成分研究的相关报道。为了更好地开发和高效利用蚬壳花椒有限的资源,本文以湖南张家界林区的蚬壳花椒为材料,对其非生物碱类中性亲脂性成分的抑菌活性进行了研究,并对其成分进行了分析,以期对蚬壳花椒的进一步开发和利用提供科学的参考依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料与仪器 生药材料(单面针):来源于湖南省张家界林区产的蚬壳花椒茎,由湖南省株洲市千金药业股份有限公司提供。供试菌种:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),大肠杆菌(*Escherichia coli*),沙门氏菌(*Salmonella* sp.),以上菌种均由中国药品生物制品检定所提供。仪器:美国 INOVA-400 核磁共振, MAT-711 型质谱仪, X-4 型显微熔点测定仪(温度计未校正),索氏提取器。试剂:95%乙醇、甲醇、丙酮、乙酸乙酯、异丙醇、氯仿、石油醚氨水、氢氧化钠、盐酸、硫酸、氯化铵、三氯化铝、羧甲基纤维素钠盐、硅胶(100~150

收稿日期:2009-05-19。

基金项目:湖南省科技厅科技计划项目(2008JT3017);湖南省教育厅项目(08A087);中南林业科技大学青年科技基金重点项目(07001A)。

*裴刚为通讯作者。

目)、硅胶 G(200 目)、氧化铝(100~150 目)均为分析纯。

1.2 试验方法 1) 蚬壳花椒中性亲脂性提取物的制备 取药材粗粉 4 kg, 95% 乙醇回流提取 3 次, 共 4 h, 得到醇浸膏 300 g。醇浸膏用 0.5% HCl 溶液超声溶解 3 次后, 残渣用水洗至中性, 该残渣再用 1% NaOH 溶液超声溶解 3 次后, 水洗至中性, 60 °C 干燥残渣。用氯仿连续回流提取, 得到备用氯仿浸膏 115 g, 供抑菌实验及成分分析用。

2) 菌板的制备 供试菌种经牛肉膏蛋白胨斜面培养基接种、培养后, 采用比浊法和血球计数板法制得含量为 $10^4 \sim 10^6$ cfu·mL⁻¹ 的菌悬液。从稀释好的供试菌液种分别取出 100 μL 的菌悬液, 均匀涂布在牛肉膏蛋白胨平板培养基表面, 制成含菌平板。

3) 中性亲脂性提取物的抑菌性能测定方法 取一定量的备用浸膏, 用少量无水乙醇(占溶剂总体积分数的 10%)溶解后, 加入一定量的灭菌蒸馏水, 配成 20.0 mg·mL⁻¹ 的供试溶液。参照文献(郭道森等, 2004), 将定量体积的溶液加入到定量的灭菌后冷却但未凝固(45 °C 左右)的牛肉膏蛋白胨培养基中, 充分摇匀, 同时以相同体积的体积分数为 10% 的乙醇加入到相同培养基中作为空白对照, 然后倒入直径为 90 mm 的培养皿内制成平板, 待培养基凝固以后, 接入菌饼(直径 5 mm), 菌面向下, 重复 3 组, 置于 35 °C 下培养 96 h 后, 用十字交叉法测量菌落的 2 个直径, 取其平均值作为代表菌落的直径, 以下式得出抑菌率(陈春年, 1990):

$$\text{菌落净生长直径(mm)} = \text{测量直径(mm)} - 5 \text{ mm}$$

$$\text{抑菌率(\%)} = [(\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}) / \text{对照菌落直径}] \times 100$$

4) 半抑菌浓度(EC₅₀)的测定 将供试样品溶液采用倍半稀释法, 分别配制成含样品质量浓度为 10.0, 5.0, 2.5, 1.25 mg·mL⁻¹ 的培养基进行抑菌活性试验。所得数据经 Finney 机率值分析法用 DPS 统计软件求得毒力回归方程和 EC₅₀ 值(耐芹, 2008), 以 EC₅₀ 作为衡量样品对细菌生长抑制活性大小的指标。

5) 中性亲脂性成分的分离鉴定 将备用浸膏硅胶拌样, 上硅胶柱, 依次用石油醚、石油醚: 乙酸乙酯(99:1, 98:2, 97:3)、乙酸乙酯洗脱, TLC 检识[硅胶 G 板, 环己烷: 氯仿(7:3)为展开剂, 10% 硫酸为显色剂], 从石油醚: 乙酸乙酯(99:1)中, 合并具有相同 R_f 值的流分, 挥干溶剂后, 甲醇重结晶, 得到化合物 I、化合物 II。从石油醚: 乙酸乙酯(98:2)中,

甲醇反复重结晶得到化合物 III。合并乙酸乙酯洗脱部分, 回收溶剂, 得到浸膏 10 g。将该浸膏硅胶拌样, 上硅胶柱再次进行分离, 依次用氯仿、氯仿: 丙酮(100:1)、氯仿: 丙酮(98:2)、氯仿: 丙酮(96:4)洗脱, TLC 检识[硅胶 G 板, 氯仿: 乙酸乙酯(8:2)为展开剂, 10% 硫酸为显色剂], 合并具有相同 R_f 值的流分, 从氯仿洗脱部分, 挥干溶剂后, 甲醇重结晶, 得到化合物 IV; 从氯仿: 丙酮(98:2)中, 挥干溶剂后, 乙酸乙酯重结晶, 分别得到化合物 V 和化合物 VI。

2 结果与分析

2.1 中性亲脂性成分的抑菌活性试验 1) 中性亲脂性成分对不同细菌的抑菌率 蚬壳花椒中性亲脂性成分对金黄色葡萄球菌(抑菌率为 87.2%)和沙门氏菌(抑菌率为 85.4%)具有明显的抑制作用, 对大肠杆菌抑制作用相对较小(抑菌率为 58.6%); 平均抑菌率为 77.1%。

2) 中性亲脂性成分的 EC₅₀ 测定结果 蚬壳花椒中性亲脂性成分对细菌的毒力测定结果见表 1。结果表明, 测试样品对金黄色葡萄球菌抑制作用较强, EC₅₀ 为 1.58 mg·mL⁻¹; 其次为沙门氏菌, EC₅₀ 为 2.79 mg·mL⁻¹; 对大肠杆菌的抑制作用较弱, EC₅₀ 为 5.41 mg·mL⁻¹。此外, 从毒力回归方程和相关系数 r 值可以看出, 中性亲脂性成分对细菌的抑菌活性和浓度呈正相关, 即蚬壳花椒中性亲脂性成分对细菌的毒力随着浓度的增高而增强。

表 1 蚬壳花椒中性亲脂性成分对不同细菌生长抑制的毒力回归结果

Tab. 1 Toxicity to the growth of the bacteria of neutral lipophilic components in *Z. dissitum*

菌种 Species	毒力回归方程 Toxicity regression	r	EC ₅₀ / (mg·mL ⁻¹)
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	$Y = 1.487 1X + 3.784 2$	0.978 2	1.58
沙门氏菌 <i>Salmonella</i> sp.	$Y = 2.679 3X + 4.822 1$	0.963 8	2.79
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	$Y = 1.911 6X + 4.337 5$	0.972 4	5.41

2.2 化合物结构鉴定结果 化合物 I 的鉴定: 白色固体(甲醇), 硅胶板上展开后, 10% 硫酸喷雾后, 烘烤显黑色斑点。易溶于石油醚、氯仿、苯、丙酮、热甲醇, 不溶于水。¹H-NMR(CD₃OD)δ: 0.8(6H, t), 1.19(48H, m)。¹³C-NMR(CD₃OD)δ: 14.45, 23.75, 30.48, 30.76, 33.09。EI-MS m/z: 366, 323, 171, 145, 97, 69, 55, 43。¹³C-NMR 图谱、¹H-NMR 图谱显示无不饱和碳的吸收峰、不饱和氢质子

的吸收峰,表明化合物 I 为饱和烃类化合物。¹H - NMR 图谱中 δ 0.8 处显示 1 个扭变的 3 重峰,这往往是长链烷烃中,由于次级效应导致的末端甲基峰。 δ 1.1 的积分面积与 δ 0.8 处的积分面积比值为 8:1。EI-MS 图谱 m/z 43, 57, 69, 83 等碎片峰佐证了化合物为饱和脂肪烃类化合物。最大 m/z 碎片峰为 366,为分子离子峰。查阅文献,数据与文献报道基本一致(申秀民等,2004),鉴定该结晶为正三十烷。

化合物 II 的鉴定:白色结晶(甲醇),m. p. 47 ~ 48 °C。易溶于石油醚、氯仿、苯、甲醇,不溶于水。¹H - NMR($CDCl_3$) δ : 0.88(3H, t), 1.25(22H, bs), 1.58(2H, m), 3.58(2H, t)。¹³C - NMR($CDCl_3$) δ : 63.11, 32.82, 31.93, 29.70, 29.43, 25.74, 22.69, 14.09。EI - MS m/z : 224, 168, 151, 140, 125, 111, 97, 83, 69, 57, 43, 29。¹H - NMR 图谱、¹³C - NMR 图谱显示无不饱和碳的吸收峰、不饱和氢质子的吸收峰,表明化合物 II 为饱和烃类化合物。¹H - NMR 图谱中 δ 0.88 处吸收峰为 $-CH_3$, 受到相邻的 $-CH_2$ 的影响,裂分为 3 重峰($J = 6.8$ Hz),由 δ 1.25 和 1.58 两处的氢积分面积,可推算出该分子含有 14 个 $-CH_2$, 3.64 ppm(2H, t, $J = 6.4$ Hz)为连接氧亚甲基峰。EI - MS 图谱 m/z 43, 57, 69, 83 等碎片峰佐证了化合物 II 为饱和脂肪烃类化合物。最大 m/z 碎片峰为 224,为分子离子峰脱水而成($M - H_2O$),推测分子量为 242。查阅文献,数据与文献报道基本一致(邓松之,2007),鉴定该结晶为正十六烷醇。

化合物 III 的鉴定:为白色片状结晶(甲醇) m. p. 136 ~ 138 °C(温度未经校正), Liebermann - Burchard 反应呈红、蓝、绿、污绿等颜色变化。易溶于石油醚、氯仿、苯、丙酮、热甲醇,不溶于水。¹H - NMR(CD_3COCD_3) δ : 5.17(1H, d), 3.35(1H, m), 2.12(2H, m)。¹³C - NMR(CD_3COCD_3) δ : 12.01, 12.65, 18.99, 19.41, 19.87, 19.99, 22.86, 24.06, 25.86, 28.37, 31.31, 31.62, 31.74, 31.90, 33.59, 33.81, 36.05, 36.42, 37.35, 39.78, 42.20, 42.46, 45.82, 50.33, 56.04, 56.77, 70.83, 120.67, 141.47。EI - MS m/z : 414, 381, 329, 303, 273, 43。根据¹H - NMR 图谱中 δ 在 0.6 ~ 2.0 之间有大量的甲基、亚甲基、次甲基质子峰,¹³C - NMR 图谱显示分子中共含有 29 个碳,且 δ 0 ~ 60 之间有大量的伯仲叔季碳,这些均表明化合物结构中含有甾核。¹³C - NMR 图谱显示无羰基碳。综上所述,可知化合物为植物甾醇类化合物。另外, EI - MS 图谱示化合

物相对分子质量 414(M^+ , m/e 414),这与 β -sitosterol 的分子式给出的相对分子质量 414.39 相符。TLC 用 3 种不同的溶剂系统(乙酸乙酯 - 石油醚,丙酮 - 氯仿,氯仿 - 甲醇,硅胶 H)展开化合物 III 和 β -谷甾醇样品, R_f 相同,将 2 者混合点样展开为一圆整斑点。将其与 β -谷甾醇对照品混合熔点不下降。根据以上数据与文献(陈德昌,1991)对照,鉴定该晶体为 β -谷甾醇。

化合物 IV 的鉴定:白色粉末(甲醇),m. p. 284 ~ 287 °C(温度计未校正),在甲醇和氯仿中易溶,水中不溶,10% H_2SO_4 烘烤显紫红色斑点。¹³C - NMR($CDCl_3$) δ : 15.98, 17.04, 17.04, 18.00, 21.34, 22.89, 23.79, 27.00, 27.49, 28.31, 30.21, 32.78, 36.32, 38.02, 38.39, 38.48, 38.48, 39.47, 39.83, 39.86, 40.00, 41.64, 46.82, 47.00, 52.38, 54.77, 76.67, 124.44, 138.06, 178.19。EI - MS m/z : 456(M , $C_{30}H_{48}O_3$), 438, 423, 395, 302, 287, 273, 248, 203, 189。化合物 IV Liebermann - Burchard 反应阳性,¹H - NMR 谱低场存在 1 个羧基氢信号 δ 11.41(1H, s), 1 个烯氢信号 δ 5.10(1H, m, 12-H) 为烯氢信号,在高场可观察到 5 个叔碳上的甲基质子信号。¹³C - NMR^h 显示 30 个碳原子, δ 138.06 和 124.44 两个信号峰,表明该化合物是乌苏烷型五环三萜。综合以上信息并对照参考文献(龚运淮等,2006;刘锡葵等,1998),确定化合物为熊果酸。

化合物 V 的鉴定:淡黄色粉末(乙酸乙酯), m. p. 170 °C ~ 172 °C(温度计未校正)。易溶于乙酸乙酯,热甲醇,难溶于石油醚;异羟肟酸铁反应呈阳性,三氯化铁反应阴性。¹H - NMR($CDCl_3$) δ : 8.13(1H, d, $J = 9.6$ Hz), 7.63(1H, d, $J = 2.4$ Hz), 6.99(1H, d, $J = 2.4$ Hz), 6.31(1H, d, $J = 9.6$ Hz), 4.12(3H, s, H-10), 4.11(3H, s, H-9)。¹³C - NMR($CDCl_3$) δ : 160.48, 150.00, 145.12, 144.29, 143.68, 139.40, 128.21, 114.79, 112.86, 107.63, 105.08, 61.72, 60.83。异羟肟酸铁反应呈阳性,预示该化合物可能为香豆素类化合物。¹H - NMR 图谱 δ 8.13 和 6.31 的 2 个氢为吡喃环酮上的 H-4 和 H-3。 δ 7.63 和 6.99 的 2 个氢为呋喃环上的 2 个氢。¹³C - NMR 图谱显示该化合物有 13 个碳原子,其中 11 个碳原子为不饱和碳原子, δ 160.48 为酯羰基,结合¹H - NMR 图中 δ 4.12 的 6 个氢,可以确定 δ 61.72 和 60.83 的碳原子为 2 个 $-OCH_3$ 。将化合物 VI 数据与文献(龚运淮等,2006)中角型呋喃香豆素异茴芹素(异虎耳草素)的碳核磁共振谱数据相对比确定化合物结构为异茴芹

素(异虎耳草素)。

化合物 VI 的鉴定: 黄色结晶(乙酸乙酯), *m. p.* 184 ~ 187 °C(温度计未校正)。易溶于乙酸乙酯, 热甲醇, 难溶于石油醚; 异羟肟酸铁反应呈阳性, 三氯化铁反应阴性。¹H - NMR(CDCl₃) δ: 8. 13(1H, *d*, *J* = 9. 6 Hz), 7. 63(1H, *d*, *J* = 2. 4 Hz), 6. 99(1H, *d*, *J* = 2. 4 Hz), 6. 31(1H, *d*, *J* = 9. 6 Hz), 4. 121(3H, *s*, H - 10), 4. 116(3H, *s*, H - 9); ¹³C - NMR(CDCl₃) δ: 160. 50, 158. 40, 152. 23, 149. 41, 145. 86, 138. 84, 113. 92, 112. 02, 106. 56, 104. 93, 95. 48, 60. 14。异羟肟酸铁反应呈阳性, 预示该化合物可能为香豆素类化合物。¹H - NMR 图谱 δ 7. 33 和 6. 25 的 2 个氢为吡喃环上的 H - 4 和 H - 3。δ 7. 04 和 7. 90 的 2 个氢为呋喃环上的 2 个氢。与化合物(异虎耳草素) 相比, 多了 1 个 δ 7. 13 的单峰。¹³C - NMR 图谱显示该化合物有 12 个碳原子, 其中 11 个碳原子为不饱和碳原子, δ 160. 50 为酯羰基, 结合¹H - NMR 图中 δ 4. 21 的 3 个氢, 可以确定 δ 60. 14 的碳原子为一 OCH₃。其氢谱数据与文献报道基本一致(陈志霞等, 2004)。将化合物数据与文献(龚运准等, 2006) 中角型呋喃香豆素佛手内酯的碳核磁共振谱数据相对比, 确定化合物结构为佛手内酯。

3 结论与讨论

蚬壳花椒中性亲脂性成分具有良好的抑菌作用。对金黄色葡萄球菌、沙门氏菌有明显的抑制作用, EC₅₀ 分别为 1. 58 和 2. 79 mg · mL⁻¹, 对大肠杆菌有一定的抑制作用。

从蚬壳花椒中性亲脂性成分中分离得到了 6 个化合物: 正三十烷、正十六烷醇、β - 谷甾醇、熊果酸、异虎耳草素、佛手内酯。除 β - 谷甾醇外, 其余 5 个化学成分都是首次从蚬壳花椒中分离得到。

以上分离得到的 6 个化合物中, 其中的异虎耳草素和佛手内酯属于香豆素类, 香豆素类为一类小分子化合物, 具有多种生物活性, 如抗癌、抗 HIV、抗凝血、抗真菌等作用(Sardari *et al.* 2000; Ojala *et al.*, 2000)。其中的熊果酸也具有镇静、抗炎、抗菌和抗癌等作用(Rhy 2000)。这表明, 蚬壳花椒中的香豆素类及熊果酸可能是中性亲脂性成分中起抗菌消炎作用的主要成分种类。究竟是哪种物质起主要作用, 或是哪几种物质共同起作用, 相关研究还有待深入。

参 考 文 献

- 陈春年. 1990. 农药生物测定技术. 北京: 北京农业大学出版社, 98 - 112.
- 陈德昌. 1991. 碳谱及其在中草药化学中的应用. 北京: 人民卫生出版社, 254 - 257.
- 陈志霞, 林 励. 2004. 化橘红药材中香豆素类成分的研究. 中药材, 27(8): 577 - 578.
- 邓松之. 2007. 海洋天然产物的分离纯化与结构鉴定. 北京: 化学工业出版社.
- 郭道森, 杜桂彩, 李 丽, 等. 2004. 迷迭香酸对几种植物病原真菌的抗菌活性. 微生物学通报, 31(4): 71 - 76.
- 龚运准, 丁立生. 2006. 天然产物核磁共振碳谱分析. 昆明: 云南科技出版社.
- 刘锡葵, 李 薇. 1998. 马钱子果化学成分分析. 中草药, 29(7): 435 - 438.
- 马英姿, 王 平, 王 晓明, 等. 2009. 药用植物蚬壳花椒的离体培养及再生体系的建立. 湖南师范大学学报: 自然科学版, 32(1): 106 - 111.
- 马英姿, 王 平, 王 晓明, 等. 2007. 蚬壳花椒组培苗的增殖研究. 湖南农业大学学报, 33(5): 552 - 556.
- 《全国中草药汇编》编写组. 1975. 全国中草药汇编(上下册). 北京: 人民卫生出版社.
- 孙小文, 段志兴. 1996. 花椒属药用植物研究进展. 药学报, 31(3): 231 - 240.
- 申秀民, 王竹红, 陈 程, 等. 2004. 广西血竭化学成分的研究. 中草药, 35(7): 728 - 730.
- 汤 俊, 朱 卫, 屠治本. 1995. 蚬壳花椒化学成分的研究. 中草药, 26(11): 563 - 565.
- 王 平, 马英姿, 王 晓明, 等. 2008a. 药用植物单面针离体胚组织培养研究. 中南林业科技大学学报: 自然科学版, 28(1): 130 - 133.
- 王 平, 王海霞, 马英姿, 等. 2008b. 蚬壳花椒叶片不定芽诱导与内源激素变化规律的研究. 中草药, 39(9): 1400 - 1403.
- 尉 芹, 马希汉, 徐明霞. 2008. 杨树木醋液的化学成分分析及抑菌试验. 林业科学, 44(10): 98 - 102.
- Ojala T, Remes S, Haansuu P, *et al.* 2000. Antimicrobial activity of some coumarin. J Ethnopharmacol, 73 : 299 - 305.
- Sardari S, Nishibe S, Daneshlatab M. 2000. Coumarins, the bioactive structures with antifungal property. Studies in Nature Products Chemistry, 23 : 335 - 393.
- Tang Jun, Supinya T, Wang Zhengtao, *et al.* 2003. Aurantiamide Acetate from stems of *Zanthoxylum dissitum* Hemsley. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 12(4): 231.
- Ryu S Y, Oak M H, Yoon S K, *et al.* 2000. Anti-allergic and anti-inflammatory triterpenes from the herb of *Prunella vulgaris*. Planta Med, 66(4): 358 - 360.

(责任编辑 朱乾坤)