

文章编号: 1674-7054(2018)01-0081-09

肉桂精油主要活性成分对芒果 胶孢炭疽菌的抑制

李秀竹¹, 陈婷婷², 刘佳怡², 宋海超¹, 史学群²

(1. 海南大学 热带农林学院, 海口 570228; 2. 海南大学 食品学院, 海口 570228)

摘要: 利用正相硅胶、凝胶 Sephadex LH-20 和高效液相色谱法 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 等多种色谱手段进行分离纯化, 借助质谱 (Mass Spectrometry, MS) 和核磁共振 (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR) 等波谱学方法进行结构鉴定。从肉桂精油中分离鉴定了 5 个化合物, 分别为反式肉桂酸 (1)、反式邻甲氧基肉桂醛 (2)、反式肉桂醛 (3)、1,4-二苯基-1,4-丁二酮 (4)、香豆素 (5)。在抑制芒果胶孢炭疽菌的抑菌活性测试中, 化合物 1、2 和 3 均对芒果胶孢炭疽菌有很好的抑菌活性, 活性从大到小依次为: 反式肉桂酸 > 反式肉桂醛 > 反式邻甲氧基肉桂醛。

关键词: 肉桂精油; 分离纯化; 结构鉴定; 抑菌活性

中图分类号: S 482.2⁺92

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2018.01.011

芒果 (*Mangifera indica* L.) 是主要的热带水果之一, 因其独特的风味和丰富的营养价值而深受人们的喜爱^[1]。然而, 由芒果胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) 导致的芒果炭疽病, 是一种主要的采后病害, 给芒果造成巨大的经济损失。目前, 主要是使用多菌灵、代森锰锌^[2] 等农药来进行防治, 长期使用此类农药, 不但会导致病原菌产生抗药性^[3], 同时还会对环境造成污染。因此, 从可食用材料中研发防治芒果采后炭疽病的天然、有机、无公害、对环境和人体友好型的新型抗菌杀菌剂, 已成为国内外食品科学研究领域的热点和共同目标。近年来, 植物精油作为一种天然提取物, 以其良好的抑菌^[4-5]、防腐^[6-7] 和抗氧化^[8] 特性被大量研究和应用, 在果蔬采后贮藏和保鲜方面也有较好的进展^[9-10]。肉桂精油是从肉桂中提取出的挥发性成分, 是世界范围内广泛使用的食品香料, 并通过了美国食品药品监督管理局的安全性 (Generally Recognized as Safe, GRAS) 认证^[11-12]。据文献报道, 肉桂精油对柑橘酸腐病^[13]、苹果黑星病^[14]、烟曲霉^[15] 等多种常见水果病原真菌具有很好的抑菌活性, 且肉桂精油中的主要抑菌活性成分是反式肉桂醛^[16]; 何衍彪等学者发现 20% 肉桂醛乳油可以显著减轻芒果采后病害的发生^[17]; 柳凤等学者对肉桂醛防治芒果炭疽病的作用机制进行了研究, 发现当肉桂醛质量浓度大于 0.04 g · L⁻¹ 时, 可导致芒果炭疽病菌分子孢子的消解^[18]。笔者在研究肉桂精油的分离组分与肉桂醛纯品对芒果胶孢炭疽菌的抑制活性比较时发现, 其中有 1 个分离组分的抑菌效果比纯品肉桂醛好。据此推测, 肉桂精油中抑菌活性成分不仅只有肉桂醛, 肉桂精油中应该还存在尚未发现的、抑菌活性比肉桂醛好的活性成分, 或此组分的抑菌活性是肉桂醛与多种抑菌活性成分共同作用的结果。因此, 笔者采用多种色谱手段对显示具有很好抗菌活性的分离组分进行了系统分离纯化, 借助波谱学方法对分离得到的化学成分进行了结构鉴定, 并对分离得到的 5 个化合物进行了抑制芒果胶孢炭疽菌的活性测试, 旨在探索肉桂精油中抑制芒果胶孢

收稿日期: 2017-11-23

修回日期: 2017-12-30

基金项目: 海南省重点研发计划项目 (省国际科技合作方向 S100007); 2014 年海南省高等学校科学研究项目 (HNKY2014-01); “十三五”国家重点研发项目 (2016YFD0400904)

作者简介: 李秀竹 (1993-) 女, 海南大学热带农林学院 2015 级硕士研究生. E-mail: 1043602381@qq.com

通信作者: 史学群 (1972-) 男, 副教授. 研究方向: 果蔬采后病理学. E-mail: shixuequn@163.com

炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) 的主要活性成分, 为开发绿色农药提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌种与培养基 供试病原菌为芒果胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) ,按文献 [19] 的方法, 从自然发病的芒果果实中分离、接种于马铃薯葡萄糖培养基 (Potato Dextrose Broth, PDB) (马铃薯 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 葡萄糖 $18 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 蒸馏水定容至 1 L), 保存在海南大学热带农林学院植物病理实验室。

1.2 精油 供试精油由广西平南金华工艺厂提供, 采用水蒸气蒸馏法萃取肉桂 (*Cinnamomum cassia*) 的桂皮、桂枝、桂叶中的成分, 制得的肉桂精油中肉桂醛含量超过 75%。

1.3 填料与试剂 柱色谱硅胶 (160 ~ 200 目); 薄层色谱硅胶 GF254 (青岛海洋化工厂)。Sephadex LH-20 (美国 Pharmacia 公司)。石油醚、氯仿、丙酮、甲醇、乙醇及硫酸等试剂 (分析纯, 北京化学试剂厂)。HPLC (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 用溶剂为色谱纯 (美国 Fisher 公司)。试验用水为超纯水。

1.4 仪器与设备 Waters 600 高效液相色谱仪 (Alltima C18 制备柱 $22 \text{ mm} \times 250 \text{ mm} \times 5 \mu\text{m}$, Waters 2996 型检测器, Alltech 公司); Waters 2545 二元高压液相色谱仪 (SunFire C18 制备柱, $19 \text{ mm} \times 250 \text{ mm} \times 5 \mu\text{m}$, Waters 2998 型检测器, 2767 型自动纯化进样器兼馏分收集器, Waters 公司); Inova 500 核磁共振仪; Agilent 7890B-7000B 气相色谱-质谱联用仪 (美国安捷伦公司); PALL 纯水机 (美国 Pall 公司); 紫外灯等。

1.5 化合物制备方法 将肉桂精油 500 g 进行硅胶柱色谱, 石油醚-丙酮 [(100 : 0) ~ (0 : 100)] 梯度洗脱, 薄层色谱检识, 合并相似流分, 得到 Y-1 ~ Y-6, 共计 6 个组分。对上述 6 个组分进行抑制芒果胶孢炭疽菌的活性测试, 实验表明: Y-3 和 Y-4 组分具有较强的抑制胶孢炭疽菌的活性 (表 1)。Y-3 组分 (310 g) 经正相硅胶柱色谱, 石油醚-丙酮 [(100 : 0) ~ (0 : 100)] 梯度洗脱, 薄层色谱检识, 合并相似流分, 得到 Y-3-1 ~ Y-3-5。Y-3-2 亚组分经 Sephadex LH-20 柱色谱, 流动相为石油醚-氯仿-甲醇 (体积比 5 : 5 : 1) 反复洗脱, 再经制备型薄层色谱, 丙酮洗脱, 制得反式肉桂醛 (94.5 mg)。Y-3-3 亚组分在甲醇溶剂下, 析出白色晶体, 经重结晶制得 1- β -二苯基-1- β -丁二酮 (63.6 mg)。Y-3-4 组分经 Sephadex LH-20 柱色谱, 流动相为石油醚-氯仿-甲醇 (体积比 5 : 5 : 1) 反复洗脱, 再经制备型薄层色谱, 丙酮洗脱, 制得反式邻甲氧基肉桂醛 (68.3 mg)。Y-3-5 组分经 Sephadex LH-20 柱色谱, 流动相为石油醚-氯仿-甲醇 (体积比 5 : 5 : 1) 洗脱, 得 Y-3-5-1 ~ Y-3-5-3。将 Y-3-5-3 经硅胶柱色谱, 石油醚: 丙酮 [(30 : 1) ~ (5 : 1)] 梯度洗脱, 得 Y-3-5-3-1 ~ Y-3-5-3-4, 其中 Y-3-5-3-3 析出白色晶体, 经重结晶制得香豆素 (56.2 mg)。Y-4 组分经 Sephadex LH-20 柱色谱, 流动相为石油醚-氯仿-甲醇 (体积比 5 : 5 : 1) 反复洗脱, 薄层色谱检识, 合并相似流分, 得到 Y-4-1 ~ Y-4-6, 其中 Y-4-2 组分在石油醚-丙酮系统下析出白色晶体, 经重结晶, 得到反式肉桂酸 (82.7 mg)。

1.5 抑菌活性试验

1.5.1 不同极性组分抑菌活性试验 将前述分离得到的 Y-1 ~ Y-6 共计 6 个不同极性的组分, 与肉桂精油和反式肉桂醛作对照, 进行抑制芒果胶孢炭疽菌活性测试。采用悬滴法^[19], 观测各组分对芒果胶孢炭疽菌孢子的萌发的影响。将 10 mg 各组分分别溶于 200 μL 的无水乙醇中, 配成质量浓度为 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的样品母液, 取 2 μL 的样品母液 (无水乙醇做对照), 分别加入 300 μL PDB 和 198 μL 的孢子悬浮液 (经血球计数板在显微镜下计数, 孢子浓度为 $1 \times 10^6 \text{ spores} \cdot \text{mL}^{-1}$) 配成质量浓度为 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的孢子液体培养基, 充分混合后, 取 200 μL 的孢子悬浮液滴分别加到 2 个灭过菌的载玻片上, 保持 75% 的相对湿度, 贮藏于 $(26 \pm 1) ^\circ\text{C}$, 分别于 4, 6, 8, 10 和 12 h 定时取出含孢子悬浮液的载玻片进行孢子萌发的测定, 实验重复 3 次, 每次随机统计 200 个孢子, 计算孢子的萌发率。

$$\text{孢子萌发率}(\%) = \text{孢子萌发数} / \text{调查孢子总数} \times 100\%$$

1.5.2 不同单体抑菌活性试验 将从活性组分中分离得到的 5 个化合物分别进行抗菌活性检测, 观测各化合物对胶孢炭疽菌孢子的萌发的影响。实验样品取样量减少, 操作步骤同上。

1.6 数据处理 实验数据统计采用 SPSS (Version 19.0) 进行方差分析, 采用 LSD 法进行显著性分析 ($P <$

0.05 差异显著; $P < 0.01$ 差异极显著)。

2 结果与分析

2.1 化合物结构鉴定

2.1.1 反式肉桂酸的结构鉴定 白色针晶。该化合物的 $^1\text{H-NMR}$ 谱显示 5 个芳香质子信号,分别为 δ_{H} 7.56(2H, m); 7.42(3H, m), 推测该化合物结构是单取代苯环;在低场处还显示了 1 个羧基质子信号 δ_{H} 11.71(1H, s)。通过分析该化合物的 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱,得知该化合物有 9 个碳原子,结合化合物氢谱和碳谱数据,推测化合物 1 是反式肉桂酸,其与文献[20]报道的数据完全一致。

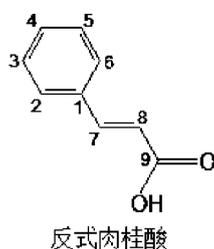


图 1 反式肉桂酸的结构

Fig. 1 Chemical structure of trans-cinnamic

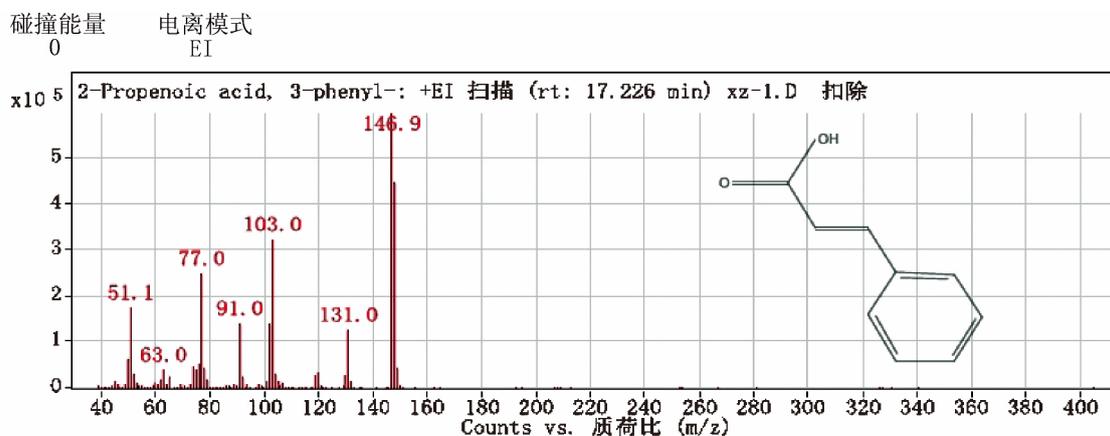


Fig. 2 EI-MS of trans-cinnamic

2.1.2 反式肉桂醛的结构鉴定 淡黄色稠状液体。该化合物的 $^1\text{H-NMR}$ 谱显示 5 个芳香质子信号,分别为 δ_{H} 7.67(2H, dd, $J = 3.5, 1.9$ Hz); 7.45(3H, m), 该化合物是苯环的单取代结构;在低场处还显示了 1 个醛基质子信号 δ_{H} 9.67(1H, d, $J = 7.75$ Hz, -CHO)。 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱显示该化合物含有 9 个碳原子,结合该化合物的氢谱和碳谱的数据,与文献[21]报道的反式肉桂醛数据一致。



图 3 反式肉桂醛的结构

Fig. 3 Chemical structure of trans-cinnamaldehydem

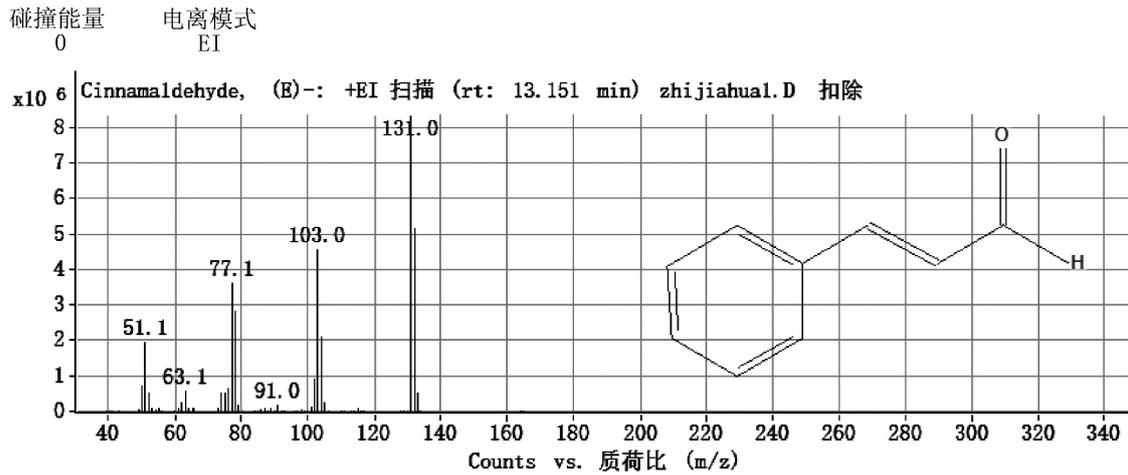


图 4 反式肉桂醛的 EI-MS 图

Fig. 4 EI-MS of trans-cinnamaldehydem

2.1.3 反式邻甲氧基肉桂醛的结构鉴定 黄色针状晶体,该化合物的¹H-NMR 谱低场区显示有 4 个芳香氢 2 个烯键质子,一个醛基氢;¹³C-NMR 谱显示 10 个碳,包括 6 个芳环上碳,一个甲氧碳,一个醛基碳 2 个双键碳 结合氢谱碳谱和质谱的数据进行分析,与文献[22]报道的反式邻甲氧基肉桂醛数据一致。

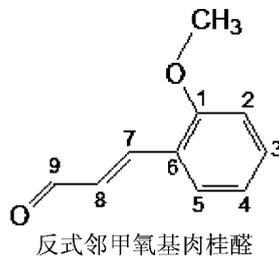


图 5 反式邻甲氧基肉桂醛的结构

Fig. 5 Chemical structure of 2'-methoxycinnamaldehyde

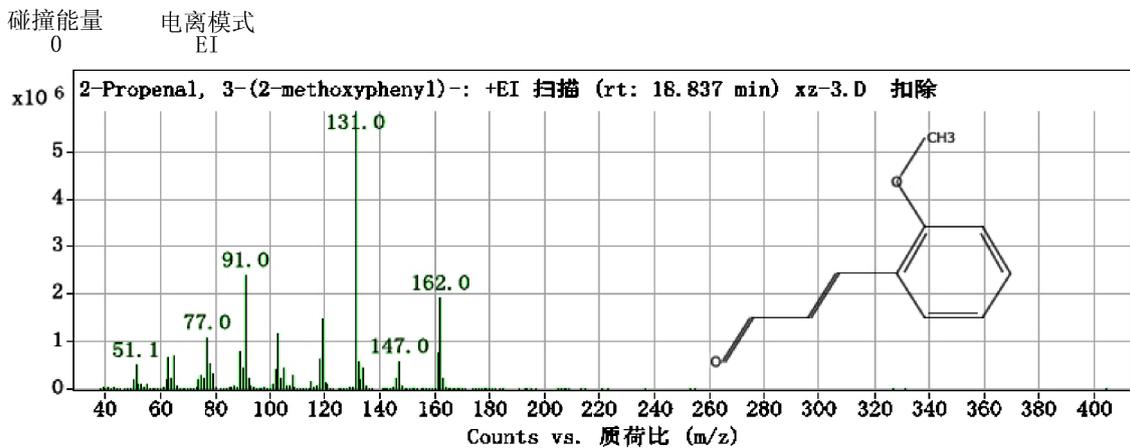
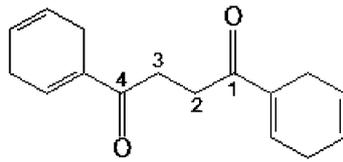


图 6 反式邻甲氧基肉桂醛的 EI-MS 图

Fig. 6 EI-MS of 2'-methoxycinnamaldehyde

2.1.4 1,4-二苯基-1,4-丁二酮的结构鉴定 无色晶体,该化合物的¹H-NMR 谱低场处显示 5 个质子信号,分别为 δ_H 8.08(2H, m), 7.64(1H, m), 7.49(2H, m), 高场区显示一个单峰质子信号 δ_H 3.48(2H, s)。¹³C-NMR 谱显示该化合物含有一个羰基信号和一个对称的苯环信号。结合氢谱碳谱和质谱的数据进行分析,其与文献[23]报道的 1,4-二苯基-1,4-丁二酮的数据一致。



1, 4-二苯环-1,4-丁二酮

图 7 1,4-二苯基-1,4-丁二酮的结构

Fig. 7 Chemical structure of 1,4-diphenyl-1,4-butanedione

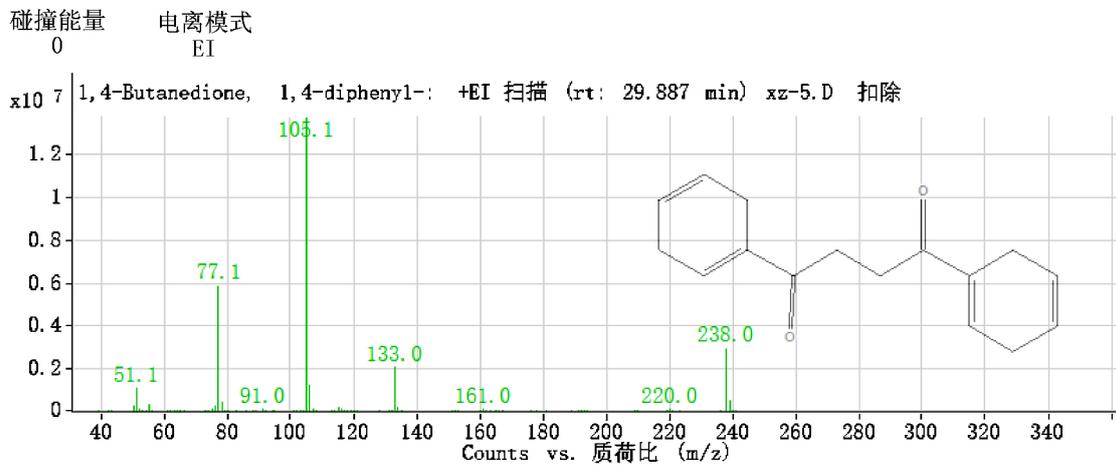
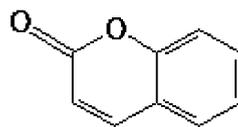


图 8 1,4-二苯基-1,4-丁二酮的 EI-MS 图

Fig. 8 EI-MS of 1,4-diphenyl-1,4-butanedione



香豆素

图 9 香豆素的结构

Fig. 9 Chemical structure of coumarin

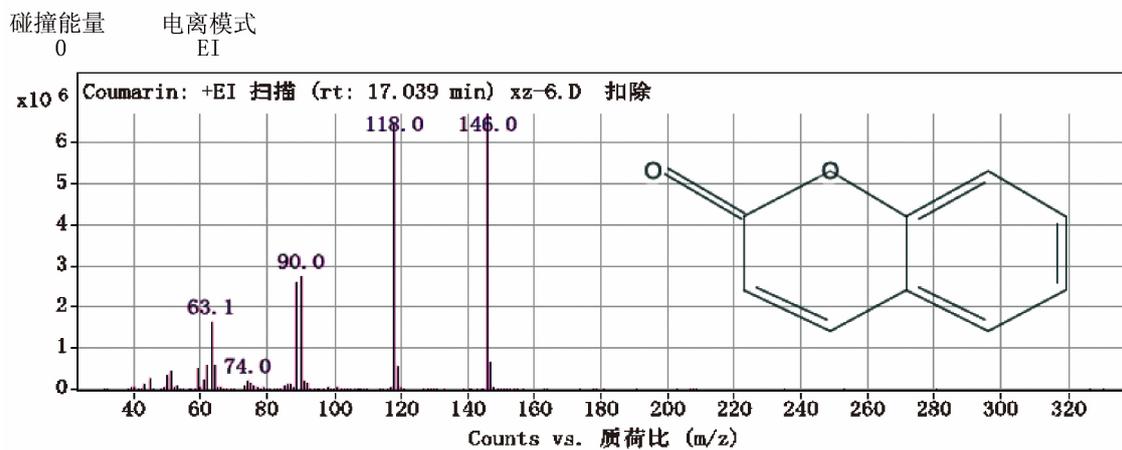


图 10 香豆素的 EI-MS 图

Fig. 10 EI-MS of coumarin

2.1.5 香豆素的结构鉴定 白色晶体,该化合物的 $^1\text{H-NMR}$ 谱在低场处显示6个质子信号,分别为 δ_{H} 7.98 (1H, d, $J = 9.5$ Hz), 7.64 (2H, m), 7.34 (2H, t, $J = 16.2$ Hz) 和 6.42 (1H, d, $J = 9.5$ Hz)。 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱显示该化合物含有9个碳原子,对氢谱碳谱和质谱的数据进行分析,该化合物与文献[21]报道的香豆素的数据一致。

2.2 化合物波谱数据

2.2.1 反式肉桂酸的核磁数据 白色针晶, $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3) δ : 7.57 (2H, m, H-2, 6), 7.42 (3H, m, H-3, 4, 5), 7.82 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7), 6.47 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8); $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, CDCl_3) δ : 134.3 (C-1), 128.6 (C-2, 6), 129.2 (C-3, 5), 130.9 (C-4), 147.3 (C-7), 117.6 (C-8), 172.7 (C-9)。

2.2.2 反式肉桂醛的核磁数据 淡黄色稠状液体, $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, MeOD) δ : 9.67 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, CHO), 7.68 (3H, m, H-2, 6, 7), 7.45 (3H, m, H-3, 4, 5), 6.78 (1H, dd, $J = 16.0, 8.0$ Hz, H-8); $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, MeOD) δ : 135.6 (C-1), 130.1 (C-2, 6), 129.5 (C-3, 5), 129.7 (C-4), 154.9 (C-7), 132.3 (C-8), 195.9 (C-9)。

2.2.3 反式邻甲氧基肉桂醛的核磁数据 淡黄色针状晶体, $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, MeOD) δ : 9.61 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-9), 7.92 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7), 7.63 (1H, br d, $J = 7.5$ Hz, H-6), 7.44 (1H, br t, $J = 7.5$ Hz, H-4), 7.01 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-5), 7.07 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-3), 6.82 (1H, dd, $J = 16.0, 8.0$ Hz, H-8), 3.92 (3H, s, H-10); $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, MeOD) δ : 160.1 (C-2), 112.7 (C-3), 130.0 (C-4), 122.0 (C-5), 134.1 (C-6), 150.4 (C-7), 130.3 (C-8), 196.7 (C-9), 56.2 (C-10)。

2.2.4 1,4-二苯基-1,4-丁二酮的核磁数据 无色针晶, $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, Acetone) δ : 8.08 (2H, m, H-6, 10), 7.64 (1H, m, H-8), 7.55 (2H, m, H-7, 9), 3.48 (2H, s, H-2, 3); $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, Acetone) δ : 198.9 (C-1, 4), 33.1 (C-2, 3), 138.0 (C-5), 129.5 (C-6, 10), 133.8 (C-8), 128.8 (C-7, 9)。

2.2.5 香豆素的核磁数据 白色晶体, $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, Acetone) δ : 6.42 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-3), 7.98 (1H, br d, $J = 9.5$ Hz, H-4), 7.68 (2H, br d, $J = 7.5$ Hz, H-5, 8), 7.61 (2H, br t, $J = 7.5$ Hz, H-6, 7); $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, Acetone) δ : 160.6 (C-2), 117.3 (C-3), 144.6 (C-4), 132.7 (C-5), 125.3 (C-6), 129.2 (C-7), 117.4 (C-8), 155.1 (C-9), 120.0 (C-10)。

2.3 化合物抑菌活性筛选结果

2.3.1 不同极性组分抑菌活性与肉桂精油反式、肉桂醛的比较 将分离得到的Y-1 ~ Y-6 共计6组分,用肉桂精油和肉桂醛作对照,进行抗菌活性的筛选,观测各组分在 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 质量浓度处理下,对胶孢炭疽菌孢子的萌发率的影响(见表1)。由10 h的数据可知,Y-1 ~ Y-6 组分中,Y-3 和 Y-4 组分的孢子萌发率低于肉桂精油,说明相比肉桂精油,这2个组分中含有主要的抑菌活性物质。从12 h的结果可以看出,Y-4 组分的抑菌活性高于反式肉桂醛,推测肉桂精油中还存在尚未发现的、抑菌活性比肉桂醛好的活性成分存在,因此,还需进一步分离纯化,明确抑菌活性成分的组成。

2.3.2 单体化合物与肉桂精油的抑菌活性比较 用肉桂精油作对照,检测从强抑菌活性组分分离纯化得到的5个化合物的抑菌活性。观测各组分在 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 质量浓度处理下,对芒果胶孢炭疽菌孢子的萌发率的影响,结果见表2。在 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 质量浓度处理下,放置6 h的数据说明,1,4-二苯基-1,4-丁二酮和香豆素处理,对芒果胶孢炭疽菌基本没有抑制作用,而反式肉桂醛、反式肉桂酸、反式邻甲氧基肉桂醛处理对芒果胶孢炭疽菌均有很好的抑菌活性,且抑菌效果远较肉桂精油的好。而放置12 h时的数据说明,在此浓度下,3种物质均可在一定程度上延缓孢子的萌发,其抑菌效果为:反式肉桂酸 > 反式邻甲氧基肉桂醛 > 反式肉桂醛。

表 1 0.2 g · L⁻¹质量浓度不同组分处理对胶孢炭疽菌孢子萌发率的影响Tab.1 Effects of different components of cinnamon essential oil at 0.2 g · L⁻¹ on spore germination rate of *C. gloeosporioides*

样品 Sample	孢子萌发率 Spore germination rate/%				
	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h
Y-1	0 Aa	1.92 ± 0.18 Aa	51.98 ± 0.14 Aa	99.34 ± 0.33 Aa	100 ± 0 Aa
Y-2	0 Aa	0 Bb	15.84 ± 0.14 Bb	77.03 ± 0.09 Bb	100 ± 0 Aa
Y-3	0 Aa	0 Bb	0 Cc	3.78 ± 0.07 Cc	56.46 ± 0.18 Bb
Y-4	0 Aa	0 Bb	0 Cc	0 Dd	31.22 ± 0.13 Cc
Y-5	10.10 ± 0.16 Bb	65.06 ± 0.25 Cc	100 ± 0 Dd	100 ± 0 Ee	100 ± 0 Aa
Y-6	0 Aa	10.11 ± 0.30 Dd	80.61 ± 0.43 Ee	100 ± 0 Ee	100 ± 0 Aa
肉桂精油 Cinnamon essential oil	0 Aa	0 Bb	13.43 ± 0.15 Ff	75.03 ± 0.21 Ff	100 ± 0 Aa
CK	31.22 ± 0.13 Cc	97.91 ± 0.14 Ee	100 ± 0 Dd	100 ± 0 Ee	100 ± 0 Aa
反式肉桂醛 Trans - cinnamaldehyde	0 Aa	0 ± 0 Bb	0 ± 0 Cc	0 Dd	42.53 ± 0.17 Dd

注:CK 是用 2 μL 无水乙醇替代样品配成的孢子悬浮液;各数据为“平均值 ± 标准误” $n=6$ 表中不同的大小写字母分别表示各处理在 0.01 和 0.05 水平上的差异显著性

Note: CK was the spore suspension prepared with 2 μL anhydrous ethanol in place of the sample; each value was “mean value + standard error”, $n=6$. Different uppercase and lowercase letters in the Table show significant difference at the 0.01 and 0.05 levels, respectively, similarly hereinafter

表 2 0.2 g · L⁻¹质量浓度不同样品处理对胶孢炭疽菌孢子萌发率的影响Tab.2 Effects of different samples at 0.2 g · L⁻¹ on spore germination rate of *C. gloeosporioides*

样品名称 Sample	孢子萌发率 Spore germination rate/%				
	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h
反式肉桂酸 Trans-cinnamic acid	0 ± 0 Aa	0 ± 0 Aa	0 ± 0 Aa	0 ± 0 Aa	23.54 ± 0.15 Aa
反式邻甲氧基肉桂 醛 2'-methoxy cinnamaldehyde	0 ± 0 Aa	0 ± 0 Aa	0 ± 0 Aa	0 ± 0 Aa	34.40 ± 0.25 Bb
反式肉桂醛 Trans-cinnamic acid	0 ± 0 Aa	0 ± 0 Aa	0 ± 0 Aa	0 ± 0 Aa	42.53 ± 0.17 Cc
1,4-二苯基-1,4- 丁二酮 1,2- dibenzoyl ethane	39.92 ± 1.98 Bb	99.75 ± 1.17 Bb	100 ± 0 Bb	100 ± 0 Bb	100 ± 0 Dd
香豆素 Coumarin	18.73 ± 1.15 Cc	89.39 ± 0.76 Cc	100 ± 0 Bb	100 ± 0 Bb	100 ± 0 Dd
肉桂精油 Cinnamon essential oil	0 ± 0 Aa	33.43 ± 0.15 Dd	95.03 ± 0.21 Cc	100 ± 0 Bb	100 ± 0 Dd
CK	33.29 ± 0.53 Dd	98.38 ± 0.39 Ee	100 ± 0 Bb	100 ± 0 Bb	100 ± 0 Dd

注:CK 为由 2 μL 无水乙醇配成的孢子悬浮液;各数据为“平均值 ± 标准误” $n=6$ 表中不同的大小写字母分别表示各处理在 0.01 和 0.05 水平上的差异显著性

Note: CK was the spore suspension prepared with 2 μL anhydrous ethanol in place of the sample; the values were “mean value + standard error” $n=6$

3 讨论

由于分离和鉴定工作量巨大,本次仅从强抑菌活性组分 Y-3 和 Y-4 中分离得到了含量较大的化合物,组分中也许存在抑菌或抗菌效果更好,但含量较小或微量的成分没有被分离出来。芒果炭疽病主要是潜伏侵染,在果实后熟前,主要以菌丝和孢子在果皮和果肉中存活。本课题组采用孢子萌发法来推断分离得到的化合物是否具有抑菌活性,找到了3个有较好抑菌效果的单体,并发现反式肉桂酸的抑菌效果略胜于反式肉桂醛,此结果对肉桂精油抑菌化学成分筛选作了补充。查阅文献发现,肉桂醛和肉桂酸对意大利青霉菌的抑菌机理,主要是因为破坏了细胞膜,使内含物外渗,且阻碍菌体能量代谢过程,从而抑制孢子、菌丝正常生长发育^[24],而邻甲氧基肉桂醛的抑菌机理还未有明确报道,可进行进一步研究。

在实际生产中,反式肉桂酸与反式肉桂醛已实现工业化生产,广泛应用于香精香料中,在食品工业方面已作为食品添加剂,用于防腐保鲜方面,而且,二者均具有一定的药用价值。反式邻甲氧基肉桂醛也用于香料、医药的生产,但用量没有前两个广泛。今后还有待于对3种化合物进行一定的配比实验,检测其对胶孢炭疽菌的抑制效果,以期开发出无毒、高效、对环境和人体友好型的新型强效抑制胶孢炭疽菌的抑菌剂。

参考文献:

- [1] 黄铭慧,冯舒涵,冯颜,等. 采前喷洒赤霉素对‘红贵妃’芒果贮藏品质和采后生理的影响[J]. 食品科学, 2015, 36(10): 239-244.
- [2] 邵明英. 芒果炭疽病防治技术研究进展[J]. 农家顾问, 2015(2): 62-63.
- [3] 徐大高,潘汝谦,郑仲,等. 芒果炭疽病菌对多菌灵的抗药性监测[J]. 华南农业大学学报, 2004, 25(2): 34-36.
- [4] Ramadan M M, Yehia H A, Shaheen M S, et al. Aroma volatiles, antibacterial, antifungal and antioxidant properties of essential oils obtained from some spices widely consumed in Egypt[J]. Am-Euras. J. Agric. & Environ. Sci., 2014, 14(6): 486-494.
- [5] 李亚茹,周林燕,李淑荣,等. 植物精油对果蔬中微生物的抑菌效果及作用机理研究进展[J]. 食品科学, 2014, 35(11): 325-329.
- [6] 张鹏禹,任小云,肖作兵,等. 植物精油在肉制品中的抑菌应用研究进展[J]. 食品研究与开发, 2013(2): 107-110.
- [7] 顾仁勇,刘洪,傅伟昌. 香辛料精油用于猪肉保鲜的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(8): 498-500.
- [8] Nanasombat S, Wimuttigol P. Antimicrobial and antioxidant activity of spice essential oils[J]. Food Science & Biotechnology, 2011, 20(1): 45-53.
- [9] 段伟丽,包怡红. 植物精油在食品保鲜中的应用研究[J]. 中国林副特产, 2015(1): 94-97.
- [10] 周晓薇,王静,顾镍,等. 植物精油对果蔬防腐保鲜作用研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(21): 427-430.
- [11] 杨继章,刘红森,李艳玲. 肉桂油的研究进展[J]. 中国药房, 2011(27): 2579-2581.
- [12] 何艳,应梦超,王韵,等. O/W型肉桂精油微乳液对灰葡萄孢的抑菌效果[J]. 食品科学, 2013, 34(15): 87-90.
- [13] Xu S X, Li Y C, Liu X, et al. In vitro and in vivo antifungal activity of a water-dilutable cassia oil microemulsion against *Geotrichum citri-aurantii* [J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2012, 9(13): 2668.
- [14] Nagy G, Hochbaum T, Sárosi S, et al. In vitro and in planta activity of some essential oils against *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter. [J]. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 2014, 42(1): 109-114.
- [15] Khan M S, Ahmad I. In vitro antifungal, anti-elastase and anti-keratinase activity of essential oils of *Cinnamomum*, *Syzygium* and *Cymbopogon*-species against *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum* [J]. Phytomedicine, 2011, 19(1): 48.
- [16] Naveed R, Hussain I, Tawab A, et al. Antimicrobial activity of the bioactive components of essential oils from Pakistani spices against *Salmonella* and other multi-drug resistant bacteria [J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2013, 13(1): 265.
- [17] 何衍彪,吕德强,柳凤,等. 肉桂醛乳油防治芒果炭疽病及对芒果保鲜的效果[J]. 广东农业科学, 2012, 39(1): 85-86.
- [18] 柳凤,詹儒林,何衍彪,等. 抑菌物质肉桂醛防治芒果炭疽病机制研究[J]. 果树学报, 2011, 28(4): 651-656.
- [19] 方中达. 植病研究方法[M]. 3版. 北京:中国农业出版社, 1998: 122-145, 195.

- [20] 羊晓东. 藏药云南兔耳草的化学成分研究[D]. 昆明: 云南大学 2003.
- [21] 陈邦姣. 肉桂和黄樟化学成分研究[D]. 济南: 山东中医药大学 2015.
- [22] 曾俊芬. 肉桂皮及叶化学成分和生物活性研究[D]. 武汉: 华中科技大学 2014.
- [23] 朱珠, 马琳, 朱海燕, 等. 民族药珠芽艾麻化学成分研究[J]. 中药材 2011, 34(2): 223 - 225.
- [24] 陈玉环. 桂枝主要抑菌活性成分对‘新余蜜橘’青霉病抑菌机理及其保鲜效果的研究[D]. 南昌: 江西农业大学 2016.

Effect of Antifungal Components of Cinnamon Essential Oil on *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.

LI Xiuzhu¹, CHEN Tingting², LIU Jiayi², SHI Xuequn²

(1. Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan570228, China; 2. College of Food Science and Technology, Hainan University, Haikou, Hainan570228, China)

Abstract: The cinnamon essential oil was purified by using chromatography on silica gel, C18-reversed phase silica gel, Sephadex LH-20 column and High Performance Liquid Chromatography (HPLC), and its components were identified by using Mass Spectrometry (MS) and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) and tested to analyze their antifungal activities against *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. From the cinnamon essential oil 5 major components, e. g. trans-cinnamic acid, 2'-methoxycinnamaldehyde, trans-cinnamaldehyde, 1,2-dibenzoyl ethane and coumarin, were identified. The antifungal activity inhibition test showed that the first three components had a high antifungal activity against *C. gloeosporioides* Penz. which was in the order of trans-cinnamic acid > 2'-methoxy cinnamaldehyde > trans-cinnamaldehyde.

Keywords: Cinnamon essential oil; isolation and purification; structure identification; antifungal activity

(责任编辑: 潘学峰)