

• 研究论文 •

孜然种子中杀菌活性成分分离及结构鉴定

胡林峰, 冯俊涛*, 张兴, 张应烙

(西北农林科技大学 无公害农药研究服务中心 陕西省生物农药工程技术研究中心, 陕西 杨凌 712100)

摘要:以小麦白粉病菌 *Blumeria graminis*、黄瓜霜霉病菌 *Pseudoperonospora cubensis*、杨树溃疡病菌 *Dothiorella gregaria*、棉花枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum、白菜黑斑病菌 *Alternaria oleracea* 和稻瘟病菌 *Pyricularia grisea* 6种病原菌为指示菌种, 对孜然种子中的杀菌活性成分进行了跟踪分离及活性测定。采用柱层析分离技术, 从孜然种子乙醇浸膏石油醚萃取液中分离得到两个具有杀菌活性的化合物, 其结构经质谱、核磁共振氢谱及碳谱等分析确定其分别为枯茗酸(对异丙基苯甲酸, *p*-isopropyl benzoic acid)和枯茗醛(对异丙基苯甲醛, *p*-isopropyl benzaldehyde)。采用菌丝生长速率法测定了两化合物对油菜菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum* 和辣椒疫霉 *Phytophthora capsici* 的毒力, 其中枯茗醛对两种病原菌的 EC_{50} 值分别为 2.093 和 15.40 mg/L, 枯茗酸的 EC_{50} 值分别为 7.298 和 19.66 mg/L。

关键词: 孜然; 杀菌活性; 枯茗酸; 枯茗醛; 植物源杀菌剂

中图分类号: S482.292

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2007)04-0330-05

Isolation and Structure Detection of Fungicidal Components from *Cuminum cyminum* Seed

HU Lin-feng FENG Jun-tao*, ZHANG Xing ZHANG Ying-ho

(Research and Development Center of Rational Pesticide /Shanxi Research Center of Biopesticide Engineering and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, Shaanxi Province, China)

Abstract Six plant pathogens (*Pyricularia grisea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phytophthora capsici*, etc.) were used to screen fungicidal components from *Cuminum cyminum* L. seed. *Cuminum* seeds were distilled by alcohol and then extracted by petroleum ether, chloroform, ethyl ester and *n*-butanol in sequence. Two compounds were isolated from petroleum ether extract by column chromatography. Their structures were identified as *p*-isopropyl benzoic acid and *p*-isopropyl benzaldehyde by MS and NMR. The inhibitive rate against the mycelial growth of *S. sclerotiorum*, *P. capsici* were tested. The EC_{50} of *p*-isopropyl benzaldehyde against *S. sclerotiorum* and *P. capsici* were 2.093 and 15.40 mg/L, respectively. The EC_{50} of *p*-isopropyl benzoic acid against *S. sclerotiorum* and *P. capsici* were 7.298 and 19.66 mg/L, respectively.

Key words *Cuminum cyminum* L.; fungicidal activity; *p*-isopropyl benzoic acid; *p*-isopropyl benzaldehyde; botanic fungicide

收稿日期: 2007-10-25 修回日期: 2007-11-12

作者简介: 胡林峰(1981-), 男, 湖北天门人, 博士研究生, E-mail: wood9818@sina.com; * 通讯作者(Author for correspondence): 冯俊涛(1967-), 男, 河南登封人, 博士, 副教授, 主要从事农药学与植物保护学方面的教学与研究工作, E-mail: jtfeng@126.com

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(2002BA516A04); 陕西省攻关项目(2001K04-G3-02); 西北农林科技大学校科研专项。

孜然 *Cuminum cyminum* L. 又名孜然芹、安息茴香、安息孜然、小茴香、香旱芹等, 为伞形科 (*Umbelliferae*) 孜然芹属 (*Cuminum* L.) 植物, 一年或两年生草本。原产埃及、埃塞俄比亚, 现在俄罗斯、地中海地区、伊朗、印度、北美地区及我国均有分布, 在我国主要在新疆有栽培^[1]。

长期以来, 孜然主要作为调味品应用, 也可入药, 用于治疗消化不良、胃寒腹痛、口疮等疾病^[2]; 对皮肤真菌如皮癣也有活性^[3]。相关研究表明, 孜然种子中含有杀虫、杀菌成分^[4~9]。作者在前期研究的基础上, 对孜然种子提取物的杀菌活性成分进行了跟踪分离, 以柱层析为分离手段, 从孜然种子乙醇浸膏石油萃取部分最终分离得到两个活性化合物, 其结构经质谱、NMR 等分析确定为枯茗酸 (对异丙基苯甲酸, *p*-isopropyl benzoic acid) 和枯茗醛 (对异丙基苯甲醛, *p*-isopropyl benzaldehyde), 并初步测定了两种化合物的杀菌活性。

1 材料和方法

1.1 供试材料和仪器

1.1.1 植物 孜然种子采于甘肃张掖地区, 经西北农林科技大学生命科学院慕小倩教授予以鉴定, 确定为孜然 *Cuminum cyminum* L. 种子。采回后置于阴凉处晾干、粉碎, 过 40 目筛后于 -40℃ 冰箱中保存备用。

1.1.2 病原菌 小麦白粉病菌 *Blumergraminis*、杨树溃疡病菌 *Dothiorella gregaria*、稻瘟病菌 *Pyricularia grisea*、棉花枯萎病菌 *Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum*、白菜黑斑病菌 *Alternaria oleracea*、辣椒疫霉 *Phytophthora capsici*、油菜菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum* 均由西北农林科技大学无公害农药研究服务中心提供。黄瓜霜霉病菌 *Pseudoperonospora cubensis* 为从田间采集、鉴定、纯化及繁殖后待用。

1.1.3 寄主植物 黄瓜 (津研七号); 小麦 (陕-225)。

1.1.4 药剂及仪器 64% 恶霜·锰锌 (oxadixyl + mancozeb) 可湿性粉剂 (诺华农化江苏有限公司); 15% 三唑酮 (triazinofen) 可湿性粉剂 (湖北天门农药有限公司)。硅胶 (青岛海洋物理化学研究所), 柱层析所用溶剂均为市售分析纯。

层析柱 (内径 100 mm, 长度 1400 mm); X-5

显微熔点测定仪; UV-8 三用紫外分析仪; HP-5988 质谱仪; Bruker DPX 300MHz 核磁共振谱仪。

1.2 试验方法

1.2.1 样品提取及分离 15 kg 孜然种子粉碎物经工业乙醇渗滤, 浓缩, 得孜然种子乙醇浸膏。将其均匀悬浮于水中, 依次以石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取、浓缩, 分别得各溶剂萃取物和相应水相浸膏。用于生物活性跟踪试验。

采用硅胶柱层析对石油醚相浸膏中的活性成分进行分离。4 kg 硅胶干法装柱, 将石油醚相浸膏 266 g 溶于 266 mL 石油醚中, 加粗孔硅胶 (60~100 目) 400 g 拌样, 减压脱溶。加样于柱顶, 以氯仿-乙酸乙酯 (24:1 体积比) 为洗脱剂进行洗脱, 当溶剂前沿到达层析柱底端时停止洗脱。按每 4 cm 为一段将硅胶掏出, 各段分别再以甲醇洗脱, 通过薄层层析 (TLC) 检测, 合并 R_f 值相同的馏份, 减压浓缩得到 A (25.6 g)、B (15.6 g)、C (20.8 g)、D (30.2 g)、E (21.2 g)、F (66.5 g) 和 G (18.7 g) 共 7 个馏份。

同法对 F 段中活性成分进行柱层析分离。2 kg 硅胶干法装柱, F 段 60 g 样品溶于 60 mL 石油醚中, 粗硅胶拌样, 脱溶。加样, 以氯仿-石油醚 (4:6 体积比) 洗脱, 当溶剂前沿到达底端时停止洗脱。按 4 cm 为一段将硅胶掏出, 各段分别以甲醇洗脱, 通过 TLC 检测、合并, 共得到 6 段馏份, 由第 4 段馏份中得到一黄色液体样品 3.87 g 其 R_f 值为 0.59 [展开剂为石油醚-乙酸乙酯 (10:1 体积比), 紫外灯 256 nm 显色], 略有拖尾。将此样品置于 4℃ 冰箱中保存, 2 d 后析出晶体。分离上层液体与下层晶体, 分别得到淡黄色油状液体 (ZR1 2.05 g) 和无色晶体 (ZR2 1.20 g)。

1.2.2 活性化合物结构鉴定 对分离得到的化合物通过熔点及 TLC 检测, 质谱 (MS)、氢谱 (^1H NMR)、碳谱 (^{13}C NMR) 等谱图数据分析, 确定其分子结构。

1.2.3 杀菌活性测定方法 采用菌丝生长速率法^[10~11]测定孜然浸膏粗提物、各溶剂萃取物以及柱层析各馏份对几种病原菌的抑制作用, 以进行活性跟踪实验。将供试样品以丙酮溶解配制成适当浓度, 与 PDA 培养基混匀制成含药平板。设丙酮对照, 每处理重复 3 次。用打孔器打取直径 4 mm 的菌饼, 菌丝面向下接种于含药平板上。于

28℃下培养数天,待对照菌落长至平板边缘时测量菌落直径,计算菌丝生长抑制率。

各提取物对小麦白粉病和黄瓜霜霉病的防治作用采用盆栽法^[10]测定。

1)对小麦白粉病的防效测定:以陕-255高感品种为寄主植物材料,将小麦种子种植在小盆中,每盆播种 15 粒左右,待小麦长至一心一叶时供

$$\text{发病指数} = \frac{\sum(\text{各级病叶数} \times \text{该级级别值})}{\text{总检查叶数} \times \text{最高级别值}} \quad (1)$$

$$\text{防治效果}(\%) = \frac{\text{对照区发病指数} - \text{处理区发病指数}}{\text{对照区发病指数}} \times 100 \quad (2)$$

2)对黄瓜霜霉病的防效测定:以津研七号为寄主植物材料,采用盆栽育苗,待幼苗长至两片真叶时喷药,24 h后采用常规喷雾法接种,接种浓度为显微镜 10×10倍下每视野 10~15个孢子囊,同时设丙酮、单接菌和标准药剂对照。每盆为一处理,每处理设 3个重复。接种后保湿 24 h后转入温室中进行常规管理,待对照充分发病后进行病情调查(黄瓜霜霉病分级标准参照余国辉方法^[12]),由(2)式计算防治效果。

2 结果与分析

2.1 粗提物及各馏份的杀菌活性

2.1.1 孜然浸膏不同溶剂萃取物的杀菌活性 生长速率法测定结果表明,石油醚萃取物具有较好的抑菌活性,在 1 000 mg/L 浓度(以浸膏质量计,下同)下,其对杨树溃疡病菌、棉花枯萎病菌、白菜黑斑病菌、稻瘟病菌等病原菌的抑制率分别为 99.1%、67.6%、100.0%、96.9%。而在相同浓度下,氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取物以及各水相对 4种病原菌的抑制率均在 15%~45%之间,说明主要活性成分集中在石油醚萃取部分,因此进一步对其进行了活体试验研究。

盆栽试验结果表明,当提取物的浓度为 5 000 mg/L 时,石油醚萃取物对黄瓜霜霉病和小麦白粉病表现出较好的防治效果。在供试浓度下,其对黄瓜霜霉病的保护作用效果为 67.2%,而相应的对照药剂恶霜·锰锌为 76.9%;石油醚萃取物对小麦白粉病的保护作用和治疗作用效果分别为 63.7%和 75.0%。对照药剂粉锈宁则分别为

试。保护作用的测定于喷药 24 h后接菌种,治疗作用的测定于接菌后常规培养 24 h后喷药。采用孢子抖落法接种,接种后置于人工气候箱(温度:昼 22℃、夜 18℃,相对湿度 70%)中培养,待对照完全发病时开始调查病情指数(参考方中达^[10]的方法分级),按式(2)计算防治效果。

92.1%和 75.8%。

试验中发现,经石油醚萃取物处理的黄瓜幼苗出现轻微药害,这可能与提取物浓度太高有关,也可能是在石油醚萃取物中含有对黄瓜生长不利的物质。

2.1.2 石油醚萃取物柱层析各馏分段的杀菌活性 石油醚萃取物柱层析各馏份段(A~G段)对 3种病原菌的杀菌活性测定结果表明,E段和F段表示出较宽的杀菌谱及较好的杀菌活性,在浓度为 1 000 mg/L时,对棉花枯萎病菌、杨树溃疡病菌、稻瘟病菌 3种病原菌的抑制率分别为 95.9%、100.0%、76.7%和 100.0%、99.5%、78.3%。其余馏份段对病原菌的抑制率均在 35%~70%之间。

盆栽试验结果表明,当浓度为 5 000 mg/L 时,E、F段馏分对小麦白粉病的治疗作用的效果分别为 71.3%和 69.3%,其余馏份段的防效均在 16.1%~51.2%之间。

离体和盆栽试验结果均表现为 E、F段馏份活性最高,所以对 F段的杀菌成分进行了进一步分离,分别得到 ZR1和 ZR2。

2.1.3 ZR1和 ZR2对两种病原菌的杀菌活性 初步测定了在浓度为 400 mg/L 时,两化合物对油菜菌核病菌、辣椒疫霉、杨树溃疡病菌、棉花枯萎病菌、白菜黑斑病菌和稻瘟病菌的抑菌活性。其中,两化合物在供试浓度下能够完全抑制油菜菌核病菌和辣椒疫霉菌丝的生长,进而测定了其对上述两种病原菌的毒力曲线。结果见表 1。

2.2 ZR1和 ZR2的结构鉴定

ZR1:浅黄色液体, $n_D^{20} = 1.5329$, $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 148.133$, 119.105, 103.91, 79.77, 63.51, 39.

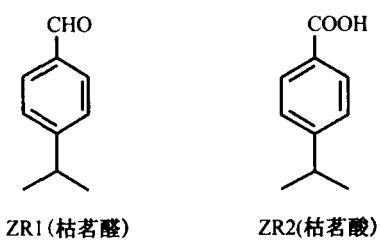
^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz), δ 1.20 (6H, d J = 6.9 Hz, M e-1', H 3-2'), 3.00 (1H, m, H-1'), 7.29 (2H, d, J = 7.8 Hz, H-3, H-5), 7.73 (2H, d, J = 7.8 Hz, H-2, H-6), 9.89 (CHO-, s); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3), δ 23.51 (C-2'), 34.36 (C-1'), 127.05 (C-3, C-5), 129.54 (C-2, C-6), 134.58 (C-4), 156.04 (C-1), 191.71 (CHO-)。以上数据参考文献 [13] 数据进行归属, 确定其结构为对-异丙基苯甲醛 (p-isopropyl benzaldehyde)——枯茗醛。

表 1 枯茗醛和枯茗酸对油菜菌核病菌和辣椒疫霉病菌的毒力曲线

Table 1 Regression equation of p-isopropyl benzaldehyde and p-isopropyl benzoic acid on Sclerotinia sclerotiorum and Phytophthora capsici				
供试样品 Samples	病原菌 Fungi	毒力曲线 Regression equation	相关系数 (r) Coefficient of correlation	EC ₅₀ (95% CL) /(mg/L)
ZR1	油菜菌核病菌 Sclerotinia sclerotiorum	$Y = 3.7178 + 0.5525x$	0.9645	2.093 (0.656 ~ 6.677)
	辣椒疫霉 Phytophthora capsici	$Y = -0.4185 + 1.6999x$	0.9772	15.40 (10.91 ~ 21.76)
	油菜菌核 Sclerotinia sclerotiorum	$Y = -1.7813 + 2.3684x$	0.9785	7.298 (6.089 ~ 8.746)
ZR2	辣椒疫霉 Phytophthora capsici	$Y = -1.0238 + 1.8290x$	0.9911	19.66 (14.08 ~ 27.44)

ZR2 无色晶体, m. p. 115.7℃ ~ 117.0℃; E M S, m / z 164, 149, 131, 119, 105, 103, 91, 79, 77, 65, 51, 45, 39, ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz), δ 1.45 (6H, d J = 6.9 Hz, M e-1', H 3-2'), 3.00 (1H, m, H-1'), 7.35 (2H, d, J = 7.8 Hz, H-2, H-6), 8.02 (2H, d, J = 7.8 Hz, H-3, H-5); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3), δ 23.67 (C-2'), 34.36 (C-1'), 126.62 (C-3, C-5), 127.00 (C-2, C-6), 130.44 (C-4), 155.38 (C-1), 172.60 (COOH)。以上数据参考文献 [14] 中进行归属, 确定其结构为对-异丙基苯甲酸 (p-isopropyl benzoic acid)——枯茗酸。

ZR1和 ZR2的结构式如下:



3 小结与讨论

孜然种子中的杀菌活性成分有待于进一步分离。韩建华等人在筛选杀菌植物时, 发现孜然种子提取物对小麦赤霉病菌、玉米大斑病菌、辣椒疫霉、番茄灰霉病菌、苹果霉心病等病原菌具有较好

的杀菌活性^[9]。本研究以 6 种植物病原菌作为活性筛选菌种, 从孜然种子乙醇浸膏中分离得到两个具有农用杀菌活性的化合物——枯茗醛和枯茗酸。本研究仅选取了部分病原菌跟踪分离高活性馏份段的杀菌活性化合物, 其他馏份段可能因为活性成分含量低而表现出较差的杀菌活性, 因此有必要对这些馏份段进行继续分离。

枯茗醛和枯茗酸的杀菌作用值得进一步研究。Singh 等人发现枯茗醛对曲霉具有较好的杀菌活性^[5], De 等人发现枯茗醛对细菌及真菌酵母均有杀菌活性^[13], 其中包括植物病原菌水稻胡麻斑病菌 Helminthosporium oryzae、白绢病菌 Sclerotium rolfsii 和镰刀病菌 Fusarium sp.; Jayasinghea 等人在研究 Brisleia retusa 茎皮的杀菌活性成分时发现枯茗酸对唐菖蒲枝孢叶枯病菌 Cladosporium cladosporioides 有抑制作用^[14]。可见这两种化合物的杀菌活性具有一定的广谱性, 有必要深入研究, 以广泛探索其应用价值。

参考文献:

[1] Chinese Academy of Sciences (中国科学院). The Plant Index of China Vol 155 (中国植物志第五十五卷) [M]. Beijing (北京): Science Press (科学出版社), 1985: 4-6.
[2] NORMAN J The Complete Book of Spices [M]. London Doerling K in dersley, 1990: 34-38.

- [3] EL-KADY I A, EL-MARAGHY S S M, MOSTAFA M E. Antibacterial and Antilematophyte Activities of Some Essential Oils from Spices [J]. Qatar University Science Journal, 1993, 13(1): 63-69.
- [4] TUNC I, BERGER B M, ERLER F, et al. Ovicidal Activity of Essential Oils from Five Plants against Two Stored-product Insects [J]. Journal of Stored Products Research, 2000, 36(2): 161-168.
- [5] SINGH G, UPADHYAY R K. Fungitoxic Activity of Cumaldehyde Main Constituent of the Cumimum cyminum oil [J]. Fitoterapia, 1991, 61(1): 86.
- [6] PUROHIT P, NUSTAFA M, OSMANIZ. Insecticidal Properties of Plant Extract of Cumimum cyminum L [J]. Science and Culture, 1983, 49(4): 101-103.
- [7] ÖZCAN M, ERKMEN O. Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Turkish Plant Spices [J]. Eur Food Res Technol, 2001, 212(6): 658-660.
- [8] SAGDİC O, KUSCU A, OZCAN M, et al. Effects of Turkish Spice Extracts at Various Concentrations on the Growth of Escherichia coli O157: H7 [J]. Food Microbiology, 2002, 19(5): 473-480.
- [9] HAN Jian-hua(韩建华), FENG Jun-tao(冯俊涛), ZHANG Xing(张兴), et al. 孜然在农业植物病原真菌上的抑菌活性研究 [J]. Modern Agrochemicals (现代农药), 2007, 6(1): 42-43, 50.
- [10] FANG Zhong-da(方中达). Research Method of Plant Pathology(植病研究方法) [M]. Beijing(北京): China Agricultural Press(中国农业出版社), 1998.
- [11] MU Li-yi(慕立义). Research Methods of Chemical Protection of Plant(植物化学保护研究方法) [M]. Beijing(北京): China Agricultural Press(中国农业出版社), 1994.
- [12] YU Guo-hui(余国辉). 灭克防治黄瓜霜霉病田间药效 [J]. Chin J Pestic (农药), 2002, 41(2): 27-27.
- [13] DE M, DE A, MUKHOPADHYAY R, et al. Antimicrobial Activity of Cumimum cyminum L [J]. Ars Pharmaceutica, 2003, 44(3): 257-269.
- [14] JAYASINGHE L, KUMARHAMY B M M, JAYARATHNA K H R N, et al. Antifungal Constituents of the Stem Bark of Bridelia Retusa [J]. Phytochemistry, 2003, 62(4): 637-641.

(Ed. JIN SH)

中国农药工业协会会刊 中国农药网网刊 欢迎订阅 2008年《农药市场信息》

《农药市场信息》是由中国农药工业协会主办的国内创刊最早的一份报道科技、经济、市场动态及农药应用知识等内容的大型农药(农资)专业类综合信息刊物。自1986年创刊以来,一直深受广大读者喜爱和欢迎,已成为农药生产企业、科研院所、经营应用推广部门从事农药生产、科研、开拓市场的必备资料,也是农药(农资)行业中影响最大、发行量最大的刊物之一。是《中国知识资源总库》和《中国期刊全文数据库》全文收录期刊。

主要内容: 重点宣传国家的政策法规; 报道科技、经济、市场动态; 探讨营销新理念、新模式; 发布供求信息; 推广新产品、新技术、新成果; 传播实用农业技术以及农作物病虫害防治的新经验、新方法; 介绍农药知识及加工使用知识等; 评述农药行业现状及前景; 反映农药行业热点及难点。

主要栏目有: 开卷寄语、要闻快报、经贸动态、农药管理、本期专稿、焦点关注、农药论坛、营销策略、市场纵横、世界农药、科技与产品、农药应用、植保资讯、病虫预报、咨询服务、物资总汇、小资料等。

本刊自办发行,半月刊,全年24期,大16开本,约90页(含广告),全铜版纸印刷,全年订价200元(含邮寄咨询费);新订户如需索取样刊,我们接到来函来电即赠送近期刊物一份,并可免费试登一次供求信息。

地 址: 江苏南通市姚港路35号《农药市场信息》编辑部(226006)

网 址: <http://www.pesticide.com.cn>

电 话: 0513-83511907(传真) 83558239 13706298456

联系人: 顾旭东 E-mail gxdt@info.net.cn