

芒果核仁的化学成分及其抑菌活性

梁耀光¹, 徐巧林¹, 谢海辉^{1*}, 周艳阳², 魏孝义¹

(1. 中国科学院华南植物园, 广州 510650; 2. 日本丸善制药株式会社, 广岛 729-3102)

摘要: 从芒果(*Mangifera indica* L.)果实核仁中分离得到6种化合物。经光谱分析及与文献对照,分别鉴定为没食子酸(1)、没食子酸甲酯(2)、没食子酸乙酯(3)、间-二没食子酸甲酯(4)、对羟基苯甲酸(5)和丁二酸单甲酯(6),它们均为首次从芒果核中获得。用琼脂平板稀释法测定了化合物1~5对7种细菌和4种真菌生长的抑制活性。结果表明,化合物1对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*)、干燥棒状杆菌(*Corynebacterium xerosis*)和藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)的最小抑制浓度(MIC)为50~100 $\mu\text{g mL}^{-1}$,化合物4对绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)有抑制活性。

关键词: 芒果; 核仁; 抑菌活性; 没食子酸; 间-二没食子酸甲酯

中图分类号: Q946

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2010)04-0445-04

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2010.04.020

Chemical Constituents from Mango Seed Kernels and Their Antimicrobial Activity

LIANG Yao-guang¹, XU Qiao-lin¹, XIE Hai-hui^{1*}, ZHOU Yan-yang², WEI Xiao-yi¹

(1. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China;

2. Maruzen Pharmaceuticals Co., Ltd, Hiroshima 729-3102, Japan)

Abstract: Six compounds were isolated from mango (*Mangifera indica* L.) seed kernels. On the basis of spectral data and references, they were identified as gallic acid (1), methyl gallate (2), ethyl gallate (3), methyl *m*-digallate (4), *p*-hydroxybenzoic acid (5), and succinic acid monomethyl ester (6), which were obtained from mango seeds for the first time. Antimicrobial activity of compounds 1~5 against seven bacterial and four fungal strains was determined by using the agar plate dilution method. The results showed that the minimal inhibitory concentration (MIC) values of compound 1 against *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Corynebacterium xerosis*, and *Micrococcus luteus* were 50~100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and compound 4 exhibited inhibitory activity against *Pseudomonas aeruginosa*.

Key words: *Mangifera indica* L.; Seed kernel; Antimicrobial activity; Gallic acid; Methyl *m*-digallate

漆树科(Anacardiaceae)植物芒果(*Mangifera indica* L.)分布于全球70多个国家和地区,其果实是著名的热带亚热带水果,年产量近 2.0×10^7 t,我国有 1.0×10^6 t。芒果果肉鲜美可口、营养丰富,深受消费者喜爱。芒果鲜食或加工后产生大量的果核,它们被作为薪材或废弃物,未能得到有效利用。

芒果核能行气散结,化痰消滞;用于外感食滞

引起的咳嗽痰多、胃脘饱胀和疝气痛^[1]。芒果核提取物在体外对志贺痢疾杆菌、福氏痢疾杆菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、伤寒沙门菌等肠道与呼吸道致病细菌有抑制作用^[2-3];此外,还对香蕉黑星病菌、番木瓜疫霉病菌和番木瓜炭疽病菌等水果真菌显示抑制活性^[4]。

在对南方水果生物活性评价过程中,芒果核仁

收稿日期:2009-12-15 接受日期:2010-02-05

基金项目:中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-YW-R-218)资助

作者简介:梁耀光,2007级硕士研究生, email: liangyaog07@mails.gucas.ac.cn

* 通讯作者 Corresponding author, email: xiehaih@scbg.ac.cn

甲醇提取物对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、干燥棒状杆菌和藤黄微球菌的生长显示抑制活性(表 1)。为阐明其抑菌作用的化学物质基础,应用色谱方法从中分离获得了没食子酸(1)、没食子酸甲酯(2)、没食子酸乙酯(3)、间-二没食子酸甲酯(4)、对羟基苯甲酸(5)和丁二酸单甲酯(6)。活性测定结果表明,1 为芒果核仁的主要抑菌活性物质。

1 材料和方法

1.1 材料

杧果(*Mangifera indica* L.)果实于 2008 年 7 月采自广州市果树科学研究所。人工取出核仁,切成薄片,60°C 烘干,粉碎。

1.2 仪器

柱色谱用硅胶(100~200 目)为青岛海洋化工有限公司产品;十八烷基硅醚(ODS)为日本野村化学株式会社产品(粒径 10 μm);薄层色谱(TLC)板为烟台江友硅胶开发有限公司产品;反相(RP-18)TLC 板为德国默克公司产品。

高效液相色谱分析与制备采用日本岛津公司 LC-6AD 型液相色谱仪与 RID-10A 视差检测器,色谱柱为 YMC-Pack ODS (250 \times 4.6 mm, 250 \times 20 mm i.d.);电喷雾质谱(ESIMS)测定采用美国应用生物系统公司 MDS Sciex API 2000 LC/MS/MS 质谱仪;核磁共振波谱测定采用瑞士布鲁克公司 DRX-400 型核磁共振仪,化学位移值(δ , ppm)以溶剂残留峰(CD_3OD : $\delta_{\text{H}}=3.31$; $\text{DMSO}-d_6$: $\delta_{\text{H}}=2.50$; $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$: $\delta_{\text{H}}=8.71$, $\delta_{\text{C}}=149.9$)为参照^[5]。

1.3 提取和分离

芒果核仁粉末(7250 g)用甲醇加热回流提取 3 次,减压浓缩后得棕褐色固形物 1168 g(得率 16.11%)。取其中 1150 g 溶于 5500 mL 水中,依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,减压浓缩各萃取液,分别得到石油醚溶解部位(88.66 g)、乙酸乙酯溶解部位(538.82 g)、正丁醇溶解部位(123.51 g)。

取乙酸乙酯溶解部位 192.30 g 进行硅胶(3 kg)柱色谱,以三氯甲烷-甲醇(95:5~65:35)洗脱,收集各流份,浓缩后用 TLC 板检查,合并主点相同流份,得到 8 个组份(Frs. E1~E8)。Fr. E1(0.91 g)进行 ODS(10 g)柱色谱,以甲醇-水(10:90~70:30)洗脱,经 TLC 检查后合并为 6 个亚组份(Frs. E1-1~E1-6);Fr. E1-2(72.4 mg)经 HPLC 纯化,以甲醇-水

(32:68)为流动相,得到化合物 3(21.8 mg, 0.00086%)。Fr. E2(15.98 g)用三氯甲烷热溶,放置后析出化合物 2(10.75 g, 0.42%);其母液经 ODS 柱色谱,再经 HPLC 纯化,以甲醇-水(38:62)为流动相,得到化合物 4(59.2 mg, 0.0023%)。Fr. E3(36.61 g)用三氯甲烷热溶,放置后析出化合物 1(19.28 g, 0.76%);其母液再行硅胶柱色谱,以石油醚-丙酮(20:80~40:60)洗脱,亚组份 Fr. E3-2(282.6 mg)经 HPLC 纯化,以甲醇-水(35:65)为流动相,得到化合物 5(107.6 mg, 0.0042%)和 6(71.2 mg, 0.0028%)。

1.4 结构鉴定

没食子酸(Gallic acid, 1) 白色粉末状晶体;正离子 ESIMS m/z 363 $[2\text{M} + \text{Na}]^+$, 193 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 171 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 负离子 ESIMS m/z 339 $[2\text{M} - \text{H}]^-$, 169 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 据此判断其分子量为 170; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 7.06 (2H, s, H-2, H-6), 显示有 1 个 1,3,4,5-四取代苯环;结合质谱,确定化合物 1 为没食子酸^[6]。

没食子酸甲酯(Methyl gallate, 2) 白色粉末状晶体;正离子 ESIMS m/z 391 $[2\text{M} + \text{Na}]^+$, 185 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 负离子 ESIMS m/z 367 $[2\text{M} - \text{H}]^-$, 183 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 据此判断其分子量为 184; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 3.73 (3H, s, CH_3), 6.92 (2H, s, H-2, H-6), 显示有 1 个 1,3,4,5-四取代苯环和 1 个连氧甲基;结合质谱,确定化合物 2 为没食子酸甲酯^[6]。

没食子酸乙酯(Ethyl gallate, 3) 白色无定形粉末;正离子 ESIMS m/z 199 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 负离子 ESIMS m/z 233 $[\text{M} + \text{Cl}]^-$, 197 $[\text{M} + \text{H}]^-$, 169 $[\text{M} - \text{CH}_2\text{CH}_3]^-$, 据此判断其分子量为 198; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 7.01 (2H, s, H-2, H-6), 1.29 (3H, t, $J=7.0$ Hz, CH_3), 4.21 (2H, q, $J=7.0$ Hz, CH_2), 显示有 1 个 1,3,4,5-四取代苯环和 1 个连氧乙基。结合质谱,确定化合物 3 为没食子酸乙酯^[7]。

间-二没食子酸甲酯(Methyl *m*-digallate, 4) 白色无定形粉末;正离子 ESIMS m/z 695 $[2\text{M} + \text{Na}]^+$, 359 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 337 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 负离子 ESIMS m/z 671 $[2\text{M} - \text{H}]^-$, 335 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 183 $[\text{M} - \text{Galloyl} - \text{H}]^-$, 据此判断其分子量为 336; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 3.84 (3H, s, CH_3), 7.22 (2H, s, H-2, H-6), 7.26 (1H, d, $J=2$ Hz, H-2'), 7.39 (1H, d, $J=2$ Hz, H-6'), 显示有 2 个 1,3,4,5-四取代苯环和 1 个连氧

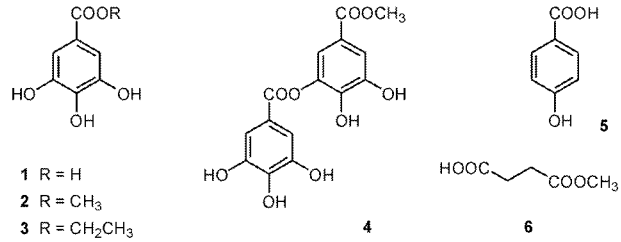
甲基,其中 1 个苯环中的 2 个质子的化学位移值不同,说明 2 个苯环通过间位连接;结合质谱,确定化合物 4 为间-二没食子酸甲酯^[8]。

对羟基苯甲酸(*p*-Hydroxybenzoic acid, 5)

白色无定形粉末;负离子 ESIMS m/z 311 [2M + Cl]⁻, 275 [2M-H]⁻, 137 [M-H]⁻, 据此判断其分子量为 138; ¹H NMR (400 MHz, C₅D₅N): δ 8.45 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-2, H-6), 7.26 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-3, H-5); ¹³C NMR (100 MHz, C₅D₅N): δ 169.2 (s, COOH), 163.3 (s, C-4), 132.8 (d, C-2, C-6), 123.9 (s, C-1), 116.2 (d, C-3, C-5), 显示有 1 个对位取代苯环。结合质谱,确定化合物 5 为对羟基苯甲酸^[9]。

丁二酸单甲酯 (Succinic acid monomethyl ester, 6)

白色无定形粉末;正离子 ESIMS m/z 287 [2M + Na]⁺, 155 [M + Na]⁺, 133 [M + H]⁺, 负离子 ESIMS m/z 263 [2M-H]⁻, 167 [M + Cl]⁻, 131 [M-H]⁻, 据此判断其分子量为 132; ¹H NMR (400 MHz, C₅D₅N): δ 2.78 (2H, br t, J = 7.0 Hz, H₂-2), 2.87 (2H, br t, J = 7.0 Hz, H₂-3), 3.58 (3H, s, CH₃), 显示有 1 个“-CH₂CH₂-”片段和 1 个连氧甲基。结合质谱,确定化合物 6 为丁二酸单甲酯^[10]。



1.5 抑菌活性测定

采用琼脂平板稀释法,以最小抑制浓度(MIC)表示^[11]。将测试样品用 50% 乙醇配制成 20 mg mL⁻¹ 溶液,依次倍比稀释,取各样品溶液 0.5 mL 与 Muller-Hinton 琼脂培养基(美国 Difco 公司产品) 9.5 mL 在平皿中混匀,甲醇提取物的最终稀释浓度分别为 1000、500、250、125、62.5 μg mL⁻¹, 化合物的最终稀释浓度分别为 100、50、25、12.5 μg mL⁻¹。革兰阳性菌与阴性菌以标准琼脂培养基(日本制药株式会社)、酵母和丝状真菌以马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基(日本制药株式会社)在 30℃ 培养 2 d 后转至 10℃ 保存 7 d。取各受试菌,以生理盐水配成菌悬液,用接种环分别接种 1 μL 于含药平皿上,以不含药平皿作对照,每个浓度设置 3 个重复,30℃ 培养 2 d。将抑制受试菌生长的样品最低浓度确定为 MIC 值。

表 1 芒果核仁甲醇提取物与化合物 1~5 的抑菌活性

Table 1 Antimicrobial activity of the methanolic extract of mango seed kernels and compounds 1~5

菌类 Microorganism	MIC (μg mL ⁻¹)					MeOH extract
	1	2	3	4	5	
革兰阳性菌 Gram positive bacteria						
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i> NBRC 12732	100	>100	>100	>100	>100	250
表皮葡萄球菌 <i>S. epidermidis</i> IFO 12993	100	>100	>100	>100	>100	250
干燥棒状杆菌 <i>Corynebacterium xerosis</i> JCM 1971	50	>100	>100	(>100)*	>100	125
藤黄微球菌 <i>Micrococcus luteus</i> JCM 1464	100	>100	>100	(>100)*	>100	125
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i> JCM 1465	>100	>100	>100	>100	>100	1000
革兰阴性菌 Gram negative bacteria						
大肠埃希菌 <i>Escherichia coli</i> JCM 1649	>100	>100	>100	>100	>100	1000
绿脓杆菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> JCM 2776	(>100)*	>100	>100	100	>100	500
酵母 Yeasts						
酿酒酵母菌 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 203	>100	>100	>100	>100	>100	(>1000)*
白色念珠菌 <i>Candida albicans</i> JCM 1542	>100	>100	>100	>100	>100	(>1000)*
丝状真菌 Filamentous fungi						
黑曲霉 <i>Aspergillus niger</i> IFO 4343	>100	>100	>100	>100	>100	>1000
微小毛霉 <i>Mucor pusillus</i> HUT 1185	>100	(>100)*	>100	(>100)*	>100	(>1000)*

* 在此浓度下观察到静菌效果,即与对照比较受试菌生长无明显变化。Effect of static strain was observed at the concentration, i.e. no visible change of the tested microbe's growth compared with the control.

2 结果和讨论

2.1 化学成分

利用色谱分离技术从芒果核仁中首次获得了 6 种单体化合物:没食子酸(1)、没食子酸甲酯(2)、没食子酸乙酯(3)、间-二没食子酸甲酯(4)、对羟基苯甲酸(5)和丁二酸单甲酯(6),其中化合物 1 和 2 的含量较高。鉴于芒果核仁的提取使用了甲醇加热回流方法,化合物 2 很可能是化合物 1 的酯化产物。如此,芒果核仁中化合物 1 的含量在 1% 以上,可作为天然抗氧化剂没食子酸^[12]的生产原料。

2.2 抑菌活性

芒果核仁提取物对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、干燥棒状杆菌和藤黄微球菌的生长显示出较强的抑制活性。化合物 1 对上述 4 种革兰阳性菌的抑制活性均强于提取物,是芒果核仁抑菌的主要活性成分;化合物 4 对革兰阴性菌绿脓杆菌显示抑制活性(表 1)。表皮葡萄球菌是一种人体皮肤常见菌,干燥棒状杆菌与藤黄微球菌则与人的体臭相关。芒果核仁对这些菌株的抑制作用,预示其具有作为抑菌活性剂进行开发的價值。

致谢 中国科学院华南植物园李月标高级工程师联系采样,丸善制药株式会社综合研究所大塚百合女士帮助测定抑菌活性,在此表示感谢!

参考文献

- [1] Wang Y S(王玉生), Cai Y W(蔡跃文). *An Illustrated Handbook of Medicines in South China* [M]. Shantou: Shantou University Press, 2005: 140.(in Chinese)
- [2] Mo W G(莫武桂), Liu H G(刘华刚), Zheng C G(郑陈光), et al. Study on bacteriostasis and acute toxicity of mango seed extract *in vitro* [J]. *Lishizhen Med Mat Med Res*(时珍国医国药), 2009, 20

(8): 1932-1933.(in Chinese)

- [3] 莫武桂, 黄维真, 贝为武. 芒果核提取物体外抑菌作用的研究 [J]. *第四军医大学学报*, 2008, 29(5): 417.
- [4] Yang X J(杨秀娟), Wu L(吴莉), Xu Z(徐志), et al. Study on antibacterial activity of crude extractions of mango nucleolus on several kinds of plant pathogen [J]. *J Anhui Agri Sci*(安徽农业科学), 2009, 37(6): 2585-2586, 2591.(in Chinese)
- [5] Gottlieb H E, Kotlyar V, Nudelman A. NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities [J]. *J Org Chem*, 1997, 62: 7512-7515.
- [6] Xie X Q(谢贤强), Wu P(吴萍), Lin L D(林立东), et al. Identification of chemical constituents from *Polygonum chinense* Linn. [J]. *J Trop Subtrop Bot*(热带亚热带植物学报), 2007, 5(5): 450-454.(in Chinese)
- [7] Baderschneider B, Winterhalter P. Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids, and lignans from riesling wine and screening for antioxidant activity [J]. *J Agri Food Chem*, 2001, 49: 2788-2798.
- [8] Yang X F(杨小凤), Fu H Z(付宏征), Lei H M(雷海民), et al. Chemical constituents from the leaves of *Koeleruteria paniculata* Laxm [J]. *Acta Pharm Sin*(药学学报), 1999, 34(6): 457-462.(in Chinese)
- [9] Zhang H Y(张慧晔), Xie H H(谢海辉), Lin L D(林立东), et al. Phenolic metabolites of an *Ampelomyces* fungus [J]. *J Trop Subtrop Bot*(热带亚热带植物学报), 2009, 17(1): 77-79.(in Chinese)
- [10] Xiong Y(熊英), Deng K Z(邓可众), Gao W Y(高文远), et al. Studies on chemical constituents of *Ranunculus ternatus* [J]. *China J Chin Mat Med*(中国中药杂志), 2008, 33(8): 909-911.(in Chinese)
- [11] Nie W M(聂为民), Qu F(曲芬), Zhao M(赵敏). Study on antibacterail activities *in vitro* of common bacteria [J]. *Chin J Health Lab Technol*(中国卫生检验杂志), 2007, 17(6): 1059-1061.(in Chinese)
- [12] Zheng G M, Xu L X, Xie H H, et al. Polyphenols from longan seeds and their radical-scavenging activity [J]. *Food Chem*, 2009, 116: 433-436.