

## 绿原酸及其 13 种体内主要代谢物的体外抗菌作用研究

樊 荣, 羿国娟, 鲁 兰, 曾 铭, 周杨杨, 程 强\*

成都大学, 四川抗菌素工业研究所, 抗生素研究与再评价四川省重点实验室, 四川 成都 610052

**摘要:** 目的 对绿原酸及其 13 种体内主要代谢物的体外抗菌作用进行比较研究。方法 选择临床分离的常见致病菌如甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌 (MSSA)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA)、 $\beta$ -内酰胺酶阴性大肠杆菌 (E<sup>-</sup>)、产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶大肠杆菌 (E<sup>+</sup>)、肺炎克雷伯菌 (E<sup>-</sup>/E<sup>+</sup>)、鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌等, 采用微量肉汤稀释法测定绿原酸代谢物的最低抑菌浓度, 并与绿原酸进行比较。结果 对大多数受试菌株, 部分主要代谢物抗菌作用与绿原酸比较有所增强, 可提高 4~66 倍, 以苯甲酸、对羟基苯甲酸、对香豆酸、二氢咖啡酸和没食子酸最佳, 其中二氢咖啡酸、没食子酸对 MSSA 和 MRSA 的抗菌作用提高了 33~66 倍。结论 与绿原酸相比, 绿原酸部分主要代谢产物抗菌活性增强, 绿原酸进入体内可能通过其某些代谢产物而发挥抗菌作用。

**关键词:** 绿原酸; 代谢产物; 最低抑菌浓度; 抗菌活性; 二氢咖啡酸; 没食子酸

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)24-6239-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.24.013

## Antimicrobial activities of chlorogenic acid and 13 main metabolites *in vitro*

FAN Rong, YI Guo-juan, LU Lan, ZENG Ming, ZHOU Yang-yang, CHENG Qiang

Antibiotics Research and Re-evaluation Key Laboratory of Sichuan Province, Sichuan Industrial Institute of Antibiotic, Chengdu University, Chengdu 610052, China

**Abstract:** **Objective** To compare with the antimicrobial activities of chlorogenic acid and its 13 main metabolites *in vivo*. **Methods** Main metabolites were detected by broth microdilution method against clinical isolated strains including methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), non ESBLs-producing *Escherichia coli* (E<sup>-</sup>), extended-spectrum  $\beta$ -lactamase *Escherichia coli* (E<sup>+</sup>), *Klebsiella pneumoniae* (E<sup>-</sup>/E<sup>+</sup>), *Acinetobacter baumannii*, and *Pseudomonas aeruginosa* to compare with the minimal inhibitory concentrations value of chlorogenic acid. **Results** For the most tested strains, the antibacterial activities of some major metabolites were enhanced, ranging from four to 66 times higher than chlorogenic acid. Benzoic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, *p*-coumaric acid, dihydrocaffeic acid, and gallic acid were stronger than the other metabolites. Moreover, the antibacterial actions of dihydrocaffeic acid and gallic acid against MSSA and MRSA was increased 33—66 times respectively. **Conclusion** Some main metabolites presented more potent antibacterial activities than chlorogenic acid, and chlorogenic acid may exert antibacterial effects through some of its metabolites.

**Key words:** chlorogenic acid; metabolites; minimal inhibitory concentration; antibacterial activity; dihydrocaffeic acid; gallic acid

绿原酸又名咖啡鞣酸, 为咖啡酸 1 位羧基与奎尼酸 3 位羟基缩合而成的羧酚酸, 是植物中广泛存在的多酚类物质之一, 可作为评价金银花等清热解毒类中药的指标成分, 具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤等多种生物活性<sup>[1-8]</sup>。绿原酸原型进入体内后很快被代谢为咖啡酸与奎尼酸, 其中约 1/3 在胃和小肠中以原型形式吸收入血, 经过肝脏代谢; 约 2/3 进入

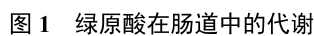
盲肠, 在肠黏膜酯酶和肠道菌群的共同作用下代谢, 以肠道代谢为主。如图 1、2 所示, 2 条代谢途径所产生的代谢物各不相同<sup>[9-11]</sup>。由于绿原酸在体内几乎仅以代谢物形式存在, 其体内发挥药效的物质基础尚不明确。本研究针对绿原酸的抗菌作用, 根据其体内代谢特点, 选择临床分离常见致病菌 (金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动

收稿日期: 2020-07-06

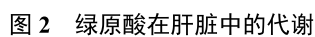
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81803812); 四川省科技计划项目 (2016JY0077)

作者简介: 樊 荣 (1981—), 男, 在读硕士, 研究方向为中药药理。Tel: 13882208086 E-mail: fanrong@cdu.edu.cn

\*通信作者 程 强 (1963—), 男, 硕士生导师, 研究员, 研究方向为抗生素药理。Tel: 15308005386 E-mail: chengqiang@cdu.edu.cn



**Fig. 1** Metabolism of chlorogenic acid in intestinal tract



**Fig. 2 Metabolism of chlorogenic acid in liver**

杆菌、铜绿假单胞菌、粪肠球菌和屎肠球菌), 对 13 种体内主要代谢物进行最低抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 测定, 评价其抗菌活性, 并与绿原酸进行比较, 为绿原酸抗菌作用的物质基础研究提供参考。

## 1 材料

### 1.1 菌株

临床分离致病菌: 甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌 (MSSA) 5 株; 耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌 (MRSA) 5 株;  $\beta$ -内酰胺酶阴性大肠杆菌 (E-) 5 株; 产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶大肠杆菌 (E+) 5 株; 肺炎克雷伯菌 (E-/E+) 各 5 株; 鲍曼不动杆菌 5 株; 铜绿假单胞菌 5 株; 粪肠球菌和屎肠球菌各 5 株, 均购自四川抗菌素工业研究所。质控菌株: 金黄色葡萄球菌 ATCC29213、大肠杆菌 ATCC25922、铜绿假单胞菌 ATCC27853、屎肠球菌 ATCC29212, 均购自北纳创联生物科技有限公司。

### 1.2 药品与试剂

绿原酸 (批号 L-007-181216, 质量分数  $>98\%$ ) 购自成都芬瑞思生物科技有限公司; 咖啡酸 (批号 L390S52, 质量分数  $\geq 99\%$ )、奎尼酸 (批号 LJC0R89, 质量分数  $\geq 98\%$ )、购自北京百灵威科技有限公司; 对香豆酸 (批号 Y24A10C86607, 质量分数  $\geq 98\%$ )、二氢咖啡酸 (批号 L16J9Z50254, 质量分数  $\geq 98\%$ )、莽草酸 (批号 X25J9C64226, 质量分数  $\geq 98\%$ )、马尿酸 (批号 H02N8P47277, 质量分数  $\geq 99\%$ )、异阿魏酸 (批号 Z03J10H92129, 质量分数  $\geq 98\%$ )、阿魏酸 (批号 L03A9D57744, 质量分数  $\geq 99\%$ )、没食子酸 (批号 C1309C72105, 质量分数  $\geq 98.5\%$ )、对羟基苯甲酸 (批号 D1308S45560, 质量分数  $\geq 99\%$ )、丁香酸 (批号 S18J10K93270, 质量分数  $\geq 98\%$ )、香草酸 (批号 H11J9Z65318, 质量分数  $\geq 98\%$ )、购自上海源叶生物科技有限公司; 苯甲酸 (批号 2015030601, 质量分数  $\geq 99.5\%$ )、二甲基亚砷 (批号 20130701), 购自成都市科龙化工试剂厂; MHA 培养基 (批号 20180210) 购自北京奥博星生物技术有限责任公司; NB 营养肉汤 (批号 20190531) 购自海博生物技术有限公司; 盐酸左氧氟沙星氯化钠注射液 (批号 C18030809-02, 规格 0.2 g/100 mL) 购自四川科伦药业股份有限公司。

### 1.3 仪器

Sartorius BS124S 电子天平 (德国赛多利斯公司); LDZX-75KBS 立式高压灭菌锅 (上海申安医

疗器械厂); GNP-9080 隔水式恒温培养箱 (上海精宏实验设备有限公司); ZHWY-100B 恒温培养振荡器 (上海智城分析仪器制造有限公司); HFsafe-1200 生物安全柜 (上海力申科学仪器有限公司); DensiCHEK Plus 电子比浊仪 (梅里埃诊断产品上海有限公司); DW-86L490 超低温冰箱 (青岛海尔集团有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 主要代谢物的 MIC 检测

**2.1.1 菌液的准备** 取上述菌株划线接种于 MHA 平板, 于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养  $18\sim 24\text{ h}$ , 挑取单菌落于 2 mL 无菌生理盐水中, 调节至麦氏浊度  $0.8\sim 1.2$ , 用 NB 营养肉汤稀释 1 000 倍 (约  $1\times 10^5\text{ CFU/mL}$ )。

**2.1.2 左氧氟沙星配制** 取盐酸左氧氟沙星氯化钠注射液适量, 加入一定体积的 NB 营养肉汤, 配制成质量浓度为  $256\text{ }\mu\text{g/mL}$  的溶液。

**2.1.3 实验分组与给药** 采用美国临床实验室标准协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 推荐的抗菌药物敏感性实验 M07 标准中微量肉汤稀释法, 样品按二倍稀释使其质量浓度为  $8.000\sim 0.015\text{ mg/mL}$ , 左氧氟沙星按二倍稀释使其质量浓度为  $128.000\sim 0.008\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。设置本底对照组、阳性对照组、实验组。

**本底对照组:** 于 96 孔板中, 首孔加入  $200\text{ }\mu\text{L}$  用 NB 营养肉汤稀释的质量浓度为  $16\text{ mg/mL}$  的待测样品, 其余各孔按顺序分别取上孔  $100\text{ }\mu\text{L}$  加  $100\text{ }\mu\text{L}$  NB 营养肉汤对倍稀释, 使其最终质量浓度范围为  $8.000\sim 0.015\text{ mg/mL}$ 。

**阳性对照组:** 左氧氟沙星质量浓度设置为  $128.000\sim 0.008\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。于 96 孔板首孔中加入  $200\text{ }\mu\text{L}$  用 NB 营养肉汤稀释的质量浓度为  $256\text{ }\mu\text{g/mL}$  的左氧氟沙星, 其余孔按顺序均用  $100\text{ }\mu\text{L}$  NB 营养肉汤依次对倍稀释至  $0.016\text{ }\mu\text{g/mL}$ , 最后分别再加入  $100\text{ }\mu\text{L}$  各菌液, 使其终质量浓度为  $128.000\sim 0.008\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。

**实验组:** 于 96 孔板中, 首孔加入  $200\text{ }\mu\text{L}$  用 NB 营养肉汤稀释的质量浓度为  $16\text{ mg/mL}$  的待测样品, 其余每孔中按顺序均用  $100\text{ }\mu\text{L}$  NB 营养肉汤依次对倍稀释至  $0.03\text{ mg/mL}$ , 最后分别再加入  $100\text{ }\mu\text{L}$  各菌液, 使其最终质量浓度为  $8.000\sim 0.015\text{ mg/mL}$ 。

各组每个浓度均设 1 个复孔, 每株菌均设菌对照。封口膜密封防止蒸发, 于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养  $18\sim 24\text{ h}$  后肉眼观察结果, 微孔中细菌生长完全被抑制时所

对应的最低药物质量浓度为 MIC。

## 2.2 主要代谢物与绿原酸的抗菌活性比

以各代谢物和绿原酸对不同菌株抑制 50% 细菌生长的最低药物浓度 ( $MIC_{50}$ ) 值表示其抗菌活性大小, 用抗菌活性比进行各代谢物与绿原酸抗菌作用的相对比较。抗菌活性比  $< 2$  倍, 表示代谢物相较于绿原酸抗菌作用减弱; 抗菌活性比  $= 2$  倍, 表示代谢物与绿原酸抗菌作用相当; 抗菌活性比  $\geq 4$  倍, 表示代谢物相较于绿原酸抗菌作用明显增强。

抗菌活性比  $= MIC_{50} \text{ 绿原酸} / MIC_{50} \text{ 代谢物}$

## 3 结果

### 3.1 主要代谢物的 MIC

实验中本底对照组均呈阴性, 阳性对照组对质控菌株大肠杆菌 ATCC25922 的 MIC 为  $0.125 \mu\text{g/mL}$ , 铜绿假单胞菌 ATCC27853 的 MIC 为  $1.000 \mu\text{g/mL}$ , 金黄色葡萄球菌 ATCC29213 的 MIC 为  $0.015 \mu\text{g/mL}$ , 粪肠球菌 ATCC29212 的 MIC 为  $1.000 \mu\text{g/mL}$ , 分别符合 CLSI M100 S27 中  $0.008 \sim 0.060 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.5 \sim 4.0$

$\mu\text{g/mL}$ 、 $0.06 \sim 0.50 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.25 \sim 2.00 \mu\text{g/mL}$  的标准。实验中菌对照生长正常, 本底对照组未见细菌生长, 显示该实验系统稳定可靠。绿原酸和 13 种体内主要代谢物的最低抑菌浓度范围 ( $MIC_R$ ) 见表 1~5。

由于绿原酸进入体内后首先代谢为咖啡酸和奎尼酸, 从表 1~5 中可见, 与绿原酸 MIC 比较, 咖啡酸对 MSSA、MRSA 和粪肠球菌的抗菌作用较佳, MIC 分别为  $0.25 \sim 1.00$ 、 $0.5 \sim 4.0$ 、 $2 \text{ mg/mL}$ 。咖啡酸进一步代谢, 代谢物二氢咖啡酸、对香豆酸和苯甲酸的抗菌作用进一步增强, 其中二氢咖啡酸对 MSSA 和 MRSA 具有较强的抗菌作用, MIC 分别为  $0.015 \sim 0.030 \text{ mg/mL}$  和  $0.03 \sim 0.06 \text{ mg/mL}$ , 对香豆酸和苯甲酸对肺炎克雷伯菌 (E-/E+) 的 MIC 均为  $1 \sim 2 \text{ mg/mL}$ 。与绿原酸 MIC 比较, 奎尼酸的抗菌活性变化不大。奎尼酸进一步代谢, 代谢物没食子酸和对羟基苯甲酸的抗菌作用进一步增强, 其中没食子酸对 MSSA 和 MRSA 具有较强的抗菌作用, MIC 均为  $0.06 \text{ mg/mL}$ 。

表 1 绿原酸经肠道或肝脏代谢后共同代谢物咖啡酸和奎尼酸的  $MIC_R$  ( $n = 5$ )

Table 1  $MIC_R$  of chlorogenic acid and its co-metabolites caffeic acid and quinic acid metabolized through intestine or liver ( $n = 5$ )

| 菌种        | $MIC_R/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$ |                      |                |
|-----------|------------------------------------------|----------------------|----------------|
|           | 绿原酸                                      | 咖啡酸                  | 奎尼酸            |
| 肺炎克雷伯菌 E- | 8 (8)                                    | 2~4 (4)              | 4 (4)          |
| 肺炎克雷伯菌 E+ | 8 (8)                                    | 4~8 (4)              | 4 (4)          |
| 大肠埃希菌 E-  | 8 (8)                                    | 2~4 (4)              | 4 (4)          |
| 大肠埃希菌 E+  | 8 (8)                                    | 4 (4)                | 4~8 (4)        |
| 鲍曼不动杆菌    | 4~8 (8)                                  | $> 8^*$ (8*)         | 2~4 (4)        |
| 铜绿假单胞菌    | 4 (4)                                    | 2~8 (4)              | 2 (2)          |
| MSSA      | 2 (2)                                    | $0.25 \sim 1.00$ (1) | $1 \sim 2$ (2) |
| MRSA      | 2~4 (2)                                  | $0.5 \sim 4.0$ (1)   | $1 \sim 2$ (2) |
| 粪肠球菌      | 8 (8)                                    | 2 (2)                | 4 (4)          |
| 屎肠球菌      | 4 (4)                                    | 4 (4)                | 2 (2)          |

\*最大溶解质量浓度; 括号中数值为  $MIC_{50}$ , 下表同

\*Maximum dissolved concentration; Value in brackets is  $MIC_{50}$ , same as below tables

表 2 咖啡酸经肠道代谢后主要代谢物的  $MIC_R$  ( $n = 5$ )

Table 2  $MIC_R$  of major metabolites of caffeic acid metabolized though intestine ( $n = 5$ )

| 菌种        | $MIC_R/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$ |                |                |
|-----------|------------------------------------------|----------------|----------------|
|           | 二氢咖啡酸                                    | 对香豆酸           | 苯甲酸            |
| 肺炎克雷伯菌 E- | 4 (4)                                    | $1 \sim 2$ (1) | $1 \sim 2$ (1) |
| 肺炎克雷伯菌 E+ | 4 (4)                                    | $1 \sim 2$ (2) | $1 \sim 2$ (1) |
| 大肠埃希菌 E-  | 2~4 (2)                                  | $1 \sim 2$ (2) | $1 \sim 2$ (2) |
| 大肠埃希菌 E+  | $1 \sim 2$ (2)                           | 2 (2)          | 2~4 (2)        |
| 鲍曼不动杆菌    | 2~4 (2)                                  | 2 (2)          | 4 (4)          |
| 铜绿假单胞菌    | 2 (2)                                    | 2~4 (4)        | 2 (2)          |
| MSSA      | $0.015 \sim 0.030$ (0.030)               | 1 (1)          | $1 \sim 2$ (1) |
| MRSA      | $0.03 \sim 0.06$ (0.06)                  | 1 (1)          | $1 \sim 2$ (2) |
| 粪肠球菌      | 2 (2)                                    | 2 (2)          | 1 (1)          |
| 屎肠球菌      | 2 (2)                                    | 2 (2)          | 1 (1)          |

表 3 奎尼酸经肠道代谢后主要代谢物的 MIC<sub>R</sub> (n = 5)Table 3 MIC<sub>R</sub> of main metabolites of quinic acid metabolized though intestine (n = 5)

| 菌种        | MIC <sub>R</sub> /(mg·mL <sup>-1</sup> ) |         |         |
|-----------|------------------------------------------|---------|---------|
|           | 莽草酸                                      | 苯甲酸     | 马尿酸     |
| 肺炎克雷伯菌 E- | 8 (8)                                    | 1~2 (1) | 4~8 (4) |
| 肺炎克雷伯菌 E+ | 8 (8)                                    | 1~2 (1) | 4~8 (4) |
| 大肠埃希菌 E-  | 4~8 (4)                                  | 1~2 (2) | 2~4 (4) |
| 大肠埃希菌 E+  | 4~8 (4)                                  | 2~4 (2) | 2~4 (4) |
| 鲍曼不动杆菌    | 4 (4)                                    | 4 (4)   | 4 (4)   |
| 铜绿假单胞菌    | 2 (2)                                    | 2 (2)   | 2 (2)   |
| MSSA      | 1~2 (2)                                  | 1~2 (1) | 2 (2)   |
| MRSA      | 2 (2)                                    | 1~2 (2) | 2~4 (2) |
| 粪肠球菌      | 4 (4)                                    | 1 (1)   | 2 (2)   |
| 屎肠球菌      | 2 (2)                                    | 1 (1)   | 2 (2)   |

表 4 咖啡酸经肝脏代谢后主要代谢物的 MIC<sub>R</sub> (n = 5)Table 4 MIC<sub>R</sub> of major metabolites of caffeic acid metabolized though liver (n = 5)

| 菌种        | MIC <sub>R</sub> /(mg·mL <sup>-1</sup> ) |         |            |
|-----------|------------------------------------------|---------|------------|
|           | 二氢咖啡酸                                    | 阿魏酸     | 异阿魏酸       |
| 肺炎克雷伯菌 E- | 4 (4)                                    | 4~8 (4) | >8* (>8*)  |
| 肺炎克雷伯菌 E+ | 4 (4)                                    | 4~8 (8) | >8* (>8*)  |
| 大肠埃希菌 E-  | 2~4 (2)                                  | 4~8 (8) | >8* (>8*)  |
| 大肠埃希菌 E+  | 1~2 (2)                                  | 4~8 (8) | >8* (>8*)  |
| 鲍曼不动杆菌    | 2~4 (2)                                  | 4~8 (8) | 2~8* (>8*) |
| 铜绿假单胞菌    | 2 (2)                                    | 8 (8)   | >8* (>8*)  |
| MSSA      | 0.015~0.030 (0.030)                      | 2~4 (2) | 1 (1)      |
| MRSA      | 0.03~0.06 (0.06)                         | 2~4 (2) | 1~2 (2)    |
| 粪肠球菌      | 2 (2)                                    | 4 (4)   | 1 (1)      |
| 屎肠球菌      | 2 (2)                                    | 4 (4)   | 4 (4)      |

表 5 奎尼酸经肝脏代谢后主要代谢物的 MIC<sub>R</sub> (n = 5)Table 5 MIC<sub>R</sub> of major metabolites of quinic acid metabolized though liver (n = 5)

| 菌种        | MIC <sub>R</sub> /(mg·mL <sup>-1</sup> ) |         |         |         |
|-----------|------------------------------------------|---------|---------|---------|
|           | 没食子酸                                     | 对羟基苯甲酸  | 丁香酸     | 香草酸     |
| 肺炎克雷伯菌 E- | 8 (8)                                    | 2 (2)   | 4~8 (4) | 4 (4)   |
| 肺炎克雷伯菌 E+ | 4~8 (8)                                  | 2~4 (2) | 4~8 (4) | 4 (4)   |
| 大肠埃希菌 E-  | 4 (4)                                    | 2 (2)   | 4 (4)   | 2~4 (4) |
| 大肠埃希菌 E+  | 4 (4)                                    | 2 (2)   | 2~4 (4) | 4 (4)   |
| 鲍曼不动杆菌    | 2~4 (2)                                  | 2 (2)   | 2~4 (2) | 2~4 (2) |
| 铜绿假单胞菌    | 2 (2)                                    | 2 (2)   | 2~4 (4) | 4 (4)   |
| MSSA      | 0.06 (0.06)                              | 1 (1)   | 1~2 (1) | 2 (2)   |
| MRSA      | 0.06 (0.06)                              | 1 (1)   | 1~2 (2) | 2 (2)   |
| 粪肠球菌      | 2 (2)                                    | 2 (2)   | 2 (2)   | 4 (4)   |
| 屎肠球菌      | 4 (4)                                    | 1 (1)   | 1 (1)   | 1 (1)   |

### 3.2 主要代谢物与绿原酸的抗菌活性比

各主要代谢物与绿原酸的抗菌活性比见表 6。以抗菌活性比 $\geq 4$  倍为抗菌作用明显增强的判断标准, 对大多数受试菌株, 抗菌作用明显增强的代谢物依次为苯甲酸>对羟基苯甲酸>对香豆酸>二氢咖啡酸>没食子酸; 对 MSSA 和 MRSA 抗菌作用明显增强的代谢物依次为二氢咖啡酸>没食子酸, 其中二氢咖啡酸和没食子酸抗菌作用是绿原酸的 33~66 倍; 对肺炎克雷伯菌抗菌作用明显增强的代谢物依次为对香豆酸>苯甲酸>对羟基苯甲酸; 对粪肠和屎肠球菌抗菌作用明显增强的代谢物为丁香

酸、苯甲酸和对羟基苯甲酸。

### 4 讨论

本研究选择临床常见致病菌, 包括革兰阴性、革兰阳性的敏感菌和耐药菌进行 MIC 测定, 具有临床针对性; 设置本底对照组防止本底干扰, 部分代谢物高浓度时 pH 值为 6, 不影响细菌生长和测定, 实验系统可靠; 对抗菌活性明显增强的代谢物 (二氢咖啡酸、没食子酸、对香豆酸、苯甲酸和对羟基苯甲酸) 各再选择 20 株相应菌株进行了抗菌活性再验证, 结果一致。MIC<sub>50</sub> 值越小表示抗菌活性越强, 绿原酸、咖啡酸、奎尼酸的相对分子质量分别为

表 6 奎尼酸、咖啡酸及其主要代谢物与绿原酸的抗菌活性比

Table 6 Ratio of antibacterial activity between quinic acid, caffeic acid and major metabolites to chlorogenic acid

| 菌种        | 抗菌活性比/倍 |     |       |      |     |       |     |      |     |     |        |     |     |
|-----------|---------|-----|-------|------|-----|-------|-----|------|-----|-----|--------|-----|-----|
|           | 奎尼酸     | 咖啡酸 | 二氢咖啡酸 | 对香豆酸 | 阿魏酸 | 异阿魏酸  | 莽草酸 | 没食子酸 | 丁香酸 | 香草酸 | 对羟基苯甲酸 | 苯甲酸 | 马尿酸 |
| 肺炎克雷伯菌 E- | 2       | 2   | 2     | 8    | 2   | >1*   | 1   | 1    | 2   | 2   | 4      | 8   | 2   |
| 肺炎克雷伯菌 E+ | 2       | 2   | 2     | 4    | 1   | >1*   | 1   | 1    | 2   | 2   | 4      | 8   | 2   |
| 大肠埃希菌 E-  | 2       | 2   | 4     | 4    | 1   | >1*   | 2   | 2    | 2   | 2   | 4      | 4   | 2   |
| 大肠埃希菌 E+  | 2       | 2   | 4     | 4    | 1   | >1*   | 2   | 2    | 2   | 2   | 4      | 4   | 2   |
| 鲍曼不动杆菌    | 2       | 1   | 4     | 4    | 1   | >1*   | 2   | 4    | 4   | 4   | 4      | 2   | 2   |
| 铜绿假单胞菌    | 2       | 1   | 2     | 1    | 2   | >0.5* | 2   | 2    | 1   | 1   | 2      | 2   | 2   |
| MSSA      | 1       | 2   | 66    | 2    | 1   | 2     | 1   | 33   | 2   | 1   | 2      | 2   | 1   |
| MRSA      | 1       | 2   | 33    | 2    | 1   | 1     | 1   | 33   | 1   | 1   | 2      | 1   | 1   |
| 粪肠球菌      | 2       | 4   | 4     | 4    | 2   | 8     | 2   | 4    | 4   | 2   | 4      | 4   | 4   |
| 屎肠球菌      | 2       | 1   | 2     | 2    | 2   | 2     | 2   | 2    | 4   | 4   | 4      | 4   | 2   |

354、180、192, 即绿原酸相对分子质量分别约为咖啡酸和奎尼酸的 2 倍, 如 MIC<sub>50</sub> 按浓度计算, 不考虑相对分子质量因素, 应以抗菌活性比=1 倍表示抗菌作用相当, 但本研究中 MIC<sub>50</sub> 以质量浓度 (mg/mL) 表示, 为避免代谢物相对分子质量的变化对抗菌活性比产生干扰, 以抗菌活性比=2 倍 (摩尔浓度相同) 表示抗菌作用相当, ≥4 倍表示抗菌作用增强。结果显示, 与绿原酸比较, 抗菌作用明显增强的代谢物为二氢咖啡酸、没食子酸、对香豆酸、苯甲酸和对羟基苯甲酸, 抗菌作用增强了 4~66 倍, 其中二氢咖啡酸、没食子酸对 MSSA 和 MRSA 的抗菌作用增强 33~66 倍。

结合文献报道<sup>[10,12]</sup>, 绿原酸在体内的代谢途径分为肠道代谢和肝脏代谢, 其中以肠道代谢为主, 生成的代谢物相对简单。口服后大部分绿原酸首先在肠道被肠黏膜酯酶和肠道菌群水解, 生成咖啡酸和奎尼酸, 绿原酸原型进入体内的量很少, 使得绿原酸生物利用度很低, 血浆中几乎不能被检测。咖啡酸在肠道被链球菌还原成具有抗菌活性的二氢咖啡酸, 能部分吸收入血, 成为血液中主要循环产物, 二氢咖啡酸最后与葡萄糖醛酸结合后排出体外。同时, 奎尼酸在肠道菌群作用下使母环逐渐芳香化后被吸收, 经无抗菌活性的莽草酸过渡后脱羟基转化为具有抗菌活性的苯甲酸, 苯甲酸再与甘氨酸结合后生成马尿酸排出体外。少部分绿原酸及水解产物咖啡酸和奎尼酸被直接吸收入血, 经肝脏继续代谢, 其中咖啡酸经还原反应生成二氢咖啡酸, 经甲基化反应生成无抗菌活性的阿魏酸和异阿魏酸, 经氧化反应生成无抗菌活性的香草酸; 奎尼酸在肝脏中将母环芳香化, 生成具有抗菌活性的没食子酸, 没食子酸经脱羟基生成同样具有抗菌活性的对羟基苯甲

酸, 再经脱羟基后生成苯甲酸。绿原酸本身抗菌活性较弱, 从上述绿原酸代谢途径中具有抗菌活性代谢物的生成规律可见, 抗菌活性的增强主要由肝脏和肠道代谢中咖啡酸还原生成的二氢咖啡酸和奎尼酸母环芳香化后生成的没食子酸、对羟基苯甲酸和苯甲酸通路产生; 由于尿中的代谢物马尿酸所占比例最高, 约占绿原酸及其代谢产物总量的 50%<sup>[13]</sup>, 推测由肠道代谢产生的苯甲酸量可能最多。除二氢咖啡酸抗菌活性未见文献报道外, 其余部分代谢物常被用作食品、药品中的防腐剂, 由于这些代谢物在体内同时存在, 而各代谢物的抗菌谱又有所不同, 因此, 当协同作用时抗菌谱可能相对变宽。结果显示, 虽然绿原酸及部分代谢物具有一定的抗菌作用, 但体内能达到的有效浓度仍低于其 MIC, 尚不足以对细菌产生直接清除作用。课题组目前研究发现, 在低于 MIC 的亚抑菌浓度下, 绿原酸及部分代谢物虽然抑制细菌的作用不强, 但能显著减少细菌的毒力因子释放, 降低细菌的致病性, 有利于机体发挥自身的免疫功能对细菌进行清除, 如绿原酸、奎尼酸和二氢咖啡酸 (1/2 MIC~1/64 MIC) 对铜绿假单胞菌产生的生物被膜具有消除作用, 绿原酸 (1/4 MIC) 对铜绿假单胞菌弹性蛋白酶分泌具有抑制作用, 绿原酸和奎尼酸 (1/4 MIC~1/16 MIC) 能显著下调铜绿假单胞菌群体感应系统中与细菌毒力因子释放密切相关的 lasR 和 rhlR 基因。表明绿原酸在体内可能具有协同抑菌和降低细菌致病性的双重作用, 体现出中药成分及代谢物独特的抗菌作用机制。

#### 参考文献

- [1] 王玲娜, 姚佳欢, 马超美. 绿原酸的研究进展 [J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(11): 1121-1130.
- [2] 张浩超, 郝宝燕, 孙皓熠, 等. 绿原酸研究进展 [J]. 食

- 品与药品, 2017, 19(3): 222-227.
- [3] Wu J M, Chen H X, Li H, *et al.* Antidepressant potential of chlorogenic acid-enriched extract from *Eucommia ulmoides* Oliver bark with neuron protection and promotion of serotonin release through enhancing synapsin I expression [J]. *Molecules*, 2016, 21(3): 260.
- [4] 胡居吾, 韩晓丹, 付建平, 等. 三种绿原酸提取物的抑菌和抗氧化效果比较 [J]. *天然产物研究与开发*, 2017, 29(11): 1928-1933.
- [5] Sun Z L, Zhang X X, Wu H H, *et al.* Antibacterial activity and action mode of chlorogenic acid against *Salmonella enteritidis*, a foodborne pathogen in chilled fresh chicken [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2020, 36(2): 24.
- [6] Rajasekharan S K, Ramesh S, Satish A S, *et al.* Antibiofilm and anti- $\beta$ -lactamase activities of burdock root extract and chlorogenic acid against *Klebsiella pneumoniae* [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2017, 27(3): 542-551.
- [7] Zheng Y, Liu J, Cao M L, *et al.* Extrication process of chlorogenic acid in Crofton weed and antibacterial mechanism of chlorogenic acid on *Escherichia coli* [J]. *J Environ Biol*, 2016, 37(5): 1049-1055.
- [8] Su M M, Liu F, Luo Z, *et al.* The antibacterial activity and mechanism of chlorogenic acid against foodborne pathogen *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2019, 16(12): 823-830.
- [9] 李 云, 周明眉, 邢丽娜, 等. 绿原酸的肠道菌群代谢研究进展 [J]. *中草药*, 2015, 46(4): 610-614.
- [10] 高 茹, 林以宁, 梁 鸽, 等. 绿原酸的吸收与代谢研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(10): 316-319.
- [11] Gonthier M P, Verny M A, Besson C, *et al.* Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats [J]. *J Nutr*, 2003, 133(6): 1853-1859.
- [12] Baeza G, Sarriá B, Mateos R, *et al.* Dihydrocaffeic acid, a major microbial metabolite of chlorogenic acids, shows similar protective effect than a yerba mate phenolic extract against oxidative stress in HepG2 cells [J]. *Food Res Int*, 2016, 87: 25-33.
- [13] 陈少萍. 绿原酸药代动力学研究进展 [J]. *中成药*, 2010, 32(4): 645-648.