

## 白及中的化学成分鉴定及对金葡菌的抑制机理研究

罗芳,俞映,张琳晗,陆梅芬,陈小明\*

湖南科技学院化学与工程学院,永州 425199

**摘要:**研究白及中的化学成分及对金葡菌的抑制机理。对白及成分进行色谱分离纯化,通过 NMR 对化合物进行结构鉴定,并用微量肉汤稀释法测试化学成分对金黄色葡萄球菌的抗菌作用。通过考察金黄色葡萄球菌的生长曲线、胞外碱性磷酸酶含量、DNA 泄漏程度、细胞壁和细胞膜的完整性的变化探究白及中活性成分的抑菌机制。本研究从该植物中分离鉴定出 10 个化合物,分别为 shancidin(1)、coelonin(2)、lusianthridin(3)、orchinol(4)、isoshancidin(5)、blestriarene A(6)、(E)-3-(4-hydroxyphenyl) acrylic acid(7)、3-phenylpropanoic acid(8)、ethyl 2-(4-hydroxyphenyl) acetate(9)、ethyl 2-(4-ethylphenyl) acetate(10)。其中,化合物 7~10 为首次从该植物种中分离得到。此外,化合物 6 有着显著的抑菌效果,最小抑菌浓度在 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ (阳性药物阿莫西林 0.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),它通过破坏金黄色葡萄球菌膜结构,导致碱性磷酸酶和 DNA 泄漏,从而导致细菌死亡。化合物 6 可通过破坏细胞壁和细胞膜发挥抗菌作用机制。

**关键词:**白及;blestriarene A;抗菌活性;膜损伤

中图分类号:R932

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)11-1894-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.11.007

Study on the chemical constituents from *Bletilla striata* and its antibacterial mechanism against *Staphylococcus aureus*

LUO Fang, YU Yi, ZHANG Lin-han, LU Mei-fen, CHEN Xiao-ming\*

College of Chemical and Biological Engineering, Hunan University of Science and Engineering, Yongzhou 425199, China

**Abstract:** This study aimed to investigate the chemical constituents and antibacterial mechanism of *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. against *Staphylococcus aureus*. A comprehensive chromatographic separation was conducted to isolate and purify active compounds from *B. striata*, then all the isolated compounds were identified by NMR spectra. The inhibitory effect of the isolated compounds on *S. aureus* was evaluated via broth microdilution. The antibacterial mechanism of the active ingredients in *B. striata* was explored from several aspects including the growth curves of *S. aureus*, extracellular alkaline phosphatase content, DNA leakage, cell wall and cell membrane integrity. Ten compounds were isolated and identified as shancidin (1), coelonin (2), lusianthridin (3), orchinol (4), isoshancidin (5), blestriarene A (6), (E)-3-(4-hydroxyphenyl) acrylic acid (7), 3-phenylpropanoic acid (8), ethyl 2-(4-hydroxyphenyl) acetate (9), ethyl 2-(4-ethylphenyl) acetate (10). Besides, compounds 7-10 were isolated from *B. striata* for the first time. Furthermore, compound 6 exerted an excellent bacterial inhibitory effect with a minimum inhibitory concentration of 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (positive control amoxicillin 0.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). The antibacterial mechanism results indicated that compound 6 disrupted the bacterial membrane structure, leading to alkaline phosphatase and DNA leakage, which resulted in bacterial death. Compound 6 may exert antibacterial activity by destroying cell wall and cell membrane.

**Key words:** *B. striata*; blestriarene A; antibacterial activity; membrane damage

抗生素被认为是 20 世纪最“神奇药物”<sup>[1]</sup>。然而,由于人们滥用抗生素,导致了细菌耐药性的产生<sup>[2]</sup>。预计到 2050 年,全球因细菌感染给人类带来

的财产损失将达到 100 万亿美元<sup>[3]</sup>。金黄色葡萄球菌是一种常见的食源性致病细菌,能导致呼吸道、消化道和泌尿道感染<sup>[4]</sup>。目前,临床使用的抗菌药物存在结构类型受限,毒副作用较多和耐药性现象增多等问题<sup>[5-7]</sup>。因此,迫切需要人们开发新型抗菌药物。

天然产物仍然被认为是新药物发现的资源宝库<sup>[8]</sup>。据美国食品和药物管理局(FDA)披露,超过一半的临床药物源自天然产品或其合成衍生物,大约200种微生物来源的天然抗生素被直接用作药物<sup>[9]</sup>。

白及又名风信子兰花,风信子白及,乌兰,其块茎常被作为药用部位。其味甘、苦、涩,性偏寒,具有收敛止血,消肿生肌的功效<sup>[10]</sup>。常用于治疗咳血吐血,外伤出血,疮疡肿毒,皮肤皲裂,溃疡病出血<sup>[11]</sup>。其主要成分包括多糖类、菲类、菲醌类、联苕类、三萜类和木脂素及有机酸<sup>[12]</sup>。药理研究表明,白及具有抗炎<sup>[13]</sup>、抗纤维化<sup>[14]</sup>、抗肿瘤<sup>[15]</sup>、调节免疫<sup>[16]</sup>等多种生物活性,但关于其抑菌机制的研究鲜有报道。因此,本实验以金黄色葡萄球菌为研究对象,考察了提取液与单体化合物的抑菌活性差异,通过测定菌液中碱性磷酸酶(AKP)、DNA泄漏程度以及细菌电镜形貌,考察化合物对金黄色葡萄球菌细胞膜壁的影响,为白及的综合利用以及开发新的抑菌剂提供一定的理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器

Bruker AVANCE III 400 型核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司);PuriSmart-200 型高效液相制备色谱仪(上海科哲生化科技有限公司);SL-3506 型酶标仪(中国 Reotai 公司);SU5000 扫描电镜(日本 Hitachi 公司);GFM-600 倒置荧光显微镜(上海光密仪器公司)。

### 1.2 药品与试剂

白及购买自贵州兴义,经湖南科技学院制药系姜红宇副教授鉴定为兰科植物白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. 的干燥块茎,标本(BS20211009)存贮于湖南科技学院制药系中药标本室。

金黄色葡萄球菌(ATCC29213)(湖南农业大学生物实验中心);蛋白胨(批号:20220301)、酵母提取物(批号:20220603)和琼脂粉(批号:20220313)(生化试剂,上海泰坦科技有限公司);碱性磷酸酶试剂盒(批号:2022421,南京建成生物科技有限公司);碘化丙啶 PI、甲醇、乙醇和丙酮(分析纯,上海阿拉丁生化科技有限公司);硅胶(100~200 和 200~300 目)和薄层色谱(TLC)板(青岛海洋化工厂);SephadexLH-20 凝胶和 5C18-MS-II 制备柱(日本, Cosmosil 有限公司)。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 提取与分离

取干燥的白及药材 0.5 kg 置于圆底烧瓶中,加入 1.0 kg 乙醇(75%)回流提取 2 次,每次 1 h,将提取液合并后减压浓缩得浸膏 250.5 g。将浸膏与硅胶(100~200 目)混匀并装入层析柱,依次用石油醚、乙酸乙酯、丙酮洗脱固定相,收集不同溶剂洗脱液,浓缩后得到石油醚部位(50.1 g)、乙酸乙酯部位(152.4 g)和丙酮部位(18.0 g)浸膏。乙酸乙酯浸膏经二氯甲烷/甲醇体系梯度洗脱(100:1→1:1)得到 5 个洗脱组分(Fr. A~E)。洗脱组分 Fr. B(3.6 g)经石油醚/乙酸乙酯/甲酸(20:1:0.5、10:1:0.5 和 1:1:0.5)柱层析纯化,得到化合物 **1**(6.1 mg)、**2**(4.5 mg)和 **3**(4.8 mg)。洗脱组分 Fr. C(10.2 g)经石油醚/丙酮体系梯度洗脱(20:1→1:1)得到 4 个子组分(Fr. C1~Fr. C4)。洗脱组分 Fr. C2 经石油醚/乙酸乙酯体系柱层析纯化(10:1→4:1),得到化合物 **4**(2.6 mg)和 **5**(2.7 mg)。洗脱组分 Fr. C4 通过半制备型 HPLC( $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}=55:45$ , 1.5 mL/min)纯化,得到化合物 **6**(1.9 mg,  $t_{\text{R}}=17.5$  min)和 **7**(4.8 mg,  $t_{\text{R}}=30.6$  min)。洗脱组分 Fr. D(8.4 g)通过半制备型 HPLC 纯化( $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}=45:55$ , 1.5 mL/min)获得化合物 **8**(2.8 mg,  $t_{\text{R}}=8.1$  min)和 **9**(2.4 mg,  $t_{\text{R}}=12.5$  min),洗脱组分 Fr. E(2.4 g)经 ODS 柱( $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}=50:50$ )纯化,得到化合物 **10**(5.2 mg)。

### 1.3.2 抗菌活性评价及机理

#### 1.3.2.1 抗菌活性的测定

使用微量肉汤二倍稀释法测定白及中各提取液和单体化合物对金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度。用移液枪向 96 孔板中分别移取 150  $\mu\text{L}$  对数生长期( $\text{OD}_{600}=0.6$ )金黄色葡萄球菌液,和 50  $\mu\text{L}$  不同浓度的单体化合物溶液(0.01~8.0 mg/mL),在 37  $^{\circ}\text{C}$  下孵育 24 h,用酶标仪在 600 nm 波长下测量细菌溶液的吸光度,吸光度小于 0.1 时为最小抑菌浓度。然后,从化合物浓度大于最小抑菌浓度的 96 孔板中各取 100  $\mu\text{L}$  细菌悬浮液,涂布在新鲜 LB 琼脂平板上,于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中孵育 24 h,未出现菌落或每个平板少于 5 个菌落的药物浓度被定义为最低杀菌剂浓度(MBC)。阿莫西林作为阳性对照。

#### 1.3.2.2 细菌生长曲线

构建生长曲线分析化合物对金黄色葡萄球菌的

抑制能力。将培养到对数生长期的金黄色葡萄球菌转移到含有不同浓度药物的 LB 液体培养基中,使最终药物浓度分别为 0.125、0.25、0.5 和 1.0 倍的最小抑菌浓度(MIC)。在 37 °C 下孵育,每 2 h 测量 OD<sub>600</sub> 的光密度值,以时间为横坐标,OD<sub>600</sub> 值为纵坐标绘制生长曲线。

### 1.3.2.3 药物对细菌细胞壁的破坏(AKP 法)

将化合物添加到菌液中,使得最终药物浓度为 MBC 和 MIC,在 37 °C 下孵育。依次在 0、2、4、6 和 8 h 取样 1 mL 菌液,离心 3 min,收集上清液,根据试剂盒说明,计算样品中的 AKP 活性,阴性组不含药物。

### 1.3.2.4 荧光探针(PI)检测细胞膜损伤

取 5 mL 对数生长期细菌溶液与化合物溶液混合,使得最终药物浓度为 MBC,并在 37 °C 下孵育 4 h(无药物处理作为阴性对照),离心后,将细菌与 PI 溶液混合,并在暗室中反应 15 min,然后在倒置荧光显微镜上观察菌液,根据荧光的强弱判断细菌中 DNA 的泄漏量。

### 1.3.2.5 细胞形态观察

将对数生长期的细菌分为两组,一组加入浓度为 MBC 的化合物,一组加入去离子水作为空白对照,在 37 °C 下孵育 2 h,然后在 4 °C 下用 2.5% 戊二醛溶液固定 8 h。离心收集细菌,用 30%、50%、75% 和 100% 乙醇依次洗涤,将细菌脱水。最后,将细菌样品冷冻干燥 12 h,然后加载到导电胶上。用金喷涂样品后,通过扫描电子显微镜观察细胞形态。

## 1.4 统计学分析

统计学数据分析使用 Origin 2019 软件进行,用平均值 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,通过单因素方差分析各组之间的显著差异, $P < 0.05$  被认为差异具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 结构鉴定

**化合物 1** 灰色固体粉末;分子式为 C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ: 8.19 (1H, s, 12-OH), 8.07 (1H, s, 4-OH), 7.95 (1H, s, 4'-OH), 7.83 (1H, s, H-14), 6.80 ~ 6.81 (2H, d,  $J = 5.0$  Hz, H-2', H-6'), 6.56 (1H, s, H-11), 6.55 (1H, s, H-13), 6.53 ~ 6.54 (2H, d,  $J = 5.0$  Hz, H-3', H-5'), 6.44 (1H, s, H-3), 3.81 (2H, s, H-7'), 3.63 (3H, s, 2-OMe), 2.47 ~ 2.50 (2H, m, H-8), 2.40 ~ 2.43 (2H,

m, H-7); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ: 112.5 (C-1), 153.2 (C-2), 98.2 (C-3), 156.5 (C-4), 117.8 (C-5), 139.3 (C-6), 29.6 (C-7), 26.2 (C-8), 138.8 (C-9), 125.3 (C-10), 113.7 (C-11), 155.1 (C-12), 114.9 (C-13), 128.8 (C-14), 54.9 (2-OMe), 132.3 (C-1'), 129.3 (C-2', C-6'), 115.0 (C-3', C-5'), 155.2 (C-4'), 29.6 (C-7')。以上数据与文献<sup>[17]</sup>报道基本一致,故鉴定化合物 **1** 为 shancidin。

**化合物 2** 白色粉末;分子式为 C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ: 8.25 (1H, s, 4-OH), δ: 8.11 (1H, s, 12-OH), 8.05 (1H, s, H-14), 6.70 (1H, s, H-11), 6.68 (1H, s, H-13), 6.47 (1H, s, H-5), 6.39 (1H, s, H-3), 3.83 (3H, s, 2-OMe), 2.64 ~ 2.66 (4H, s, H-7, H-8); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ: 116.3 (C-1), 158.7 (C-2), 99.1 (C-3), 157.3 (C-4), 108.2 (C-5), 140.0 (C-6), 31.4 (C-7), 30.8 (C-8), 141.3 (C-9), 125.7 (C-10), 114.9 (C-11), 156.0 (C-12), 113.5 (C-13), 129.9 (C-14), 55.7 (2-OMe)。以上数据与文献<sup>[17]</sup>报道基本一致,故鉴定化合物 **2** 为 coelonin。

**化合物 3** 白色粉末;分子式为 C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ: 8.55 (1H, s, 12-OH), 8.21 (1H, s, 2-OH), 8.12 (1H, s, H-14), 6.70 (1H, s, H-11), 6.68 (1H, s, H-13), 6.43 (1H, s, H-5), 6.38 (1H, s, H-3), 3.74 (3H, s, 4-OMe), 2.66 ~ 2.70 (4H, m, H-7, H-8); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ: 114.1 (C-1), 155.2 (C-2), 100.7 (C-3), 158.4 (C-4), 105.1 (C-5), 138.9 (C-6), 29.8 (C-7), 30.6 (C-8), 140.5 (C-9), 125.0 (C-10), 114.9 (C-11), 155.0 (C-12), 112.6 (C-13), 129.0 (C-14), 54.4 (4-OMe)。以上数据与文献<sup>[18]</sup>报道基本一致,故鉴定化合物 **3** 为 lusianthridin。

**化合物 4** 白色粉末;分子式为 C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>Cl) δ: 8.11 ~ 8.13 (1H, d,  $J = 10.0$  Hz, H-14), 6.70 ~ 6.72 (2H, d,  $J = 10.0$  Hz, H-11, H-13), 6.45 (1H, d,  $J = 10.0$  Hz, H-5), 6.42 (1H, s, H-3), 3.87 (3H, s, 4-OMe), 3.84 (3H, s, 2-OMe), 2.73 ~ 2.74 (4H, m, H-7, H-8); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>Cl) δ: 116.2 (C-1), 158.9 (C-2), 97.5 (C-3), 157.7 (C-4), 104.6 (C-5), 140.1 (C-6), 30.7 (C-7), 29.7 (C-8), 140.7 (C-9), 126.1 (C-10), 114.9 (C-11), 151.5 (C-12), 113.1 (C-13), 129.7 (C-

14), 55.5 (2-OMe), 55.3 (4-OMe)。以上数据与文献<sup>[17]</sup>报道基本一致,故鉴定化合物 **4** 为 orchinol。

**化合物 5** 白色粉末;分子式为  $C_{22}H_{20}O_4$ ;  $^1H$  NMR (500 MHz,  $(CD_3)_2CO$ )  $\delta$ : 8.24 (1H, s, 2-OH), 8.09 (1H, s, 12-OH), 8.00 ~ 8.02 (1H, d,  $J = 10.0$  Hz, 4'-OH), 7.97 (1H, s, H-14), 7.00 ~ 7.01 (2H, d,  $J = 5.0$  Hz, H-2', H-6'), 6.70 ~ 6.72 (2H, d,  $J = 10.0$  Hz, H-11, H-13), 6.66 ~ 6.68 (2H, m, H-3', H-5'), 6.61 (1H, s, H-3), 3.99 (2H, s, H-7'), 3.81 (3H, s, 4-OMe), 2.59 ~ 2.62 (2H, m, H-8), 2.51 ~ 2.53 (2H, m, H-7);  $^{13}C$  NMR (125 MHz,  $(CD_3)_2CO$ )  $\delta$ : 116.2 (C-1), 154.3 (C-2), 98.2 (C-3), 155.9 (C-4), 117.2 (C-5), 139.5 (C-6), 29.6 (C-7), 26.2 (C-8), 138.9 (C-9), 125.1 (C-10), 112.5 (C-11), 155.1 (C-12), 113.6 (C-13), 129.3 (C-14), 54.8 (4-OMe), 132.2 (C-1'), 128.9 (C-2', C-6'), 114.9 (C-3', C-5'), 155.2 (C-4'), 29.8 (C-7')。以上数据与文献<sup>[19]</sup>报道基本一致,故鉴定化合物 **5** 为 isoshancidin。

**化合物 6** 灰白色粉末;分子式为  $C_{30}H_{26}O_6$ ;  $^1H$  NMR (500 MHz,  $(CD_3)_2CO$ )  $\delta$ : 8.22 (2H, s, 12-OH, 12'-OH), 8.08 ~ 8.10 (2H, d,  $J = 10.0$  Hz, 3-OH, 3'-OH), 7.48 (2H, s, H-1, H-1'), 6.68 ~ 6.70 (4H, d,  $J = 10.0$  Hz, H-2, H-2', H-4, H-4'), 6.60 (2H, s, H-13, H-13'), 3.87 (6H, s, 14-OMe, 14'-OMe), 2.56 ~ 2.59 (4H, m, H-8, H-8'), 2.31 ~ 2.34 (4H, m, H-7, H-7');  $^{13}C$  NMR (125 MHz,  $(CD_3)_2CO$ )  $\delta$ : 129.2 (C-1, C-1'), 112.5 (C-2, C-2'), 155.2 (C-3, C-3'), 113.6 (C-4, C-4'), 140.3 (C-5, C-5'), 128.2 (C-6, C-6'), 26.9 (C-7, C-7'), 29.6 (C-8, C-8'), 139.3 (C-9, C-9'), 113.8 (C-10, C-10'), 116.1 (C-11, C-11'), 154.7 (C-12, C-12'), 98.1 (C-13, C-13'), 157.3 (C-14, C-14'), 54.7 (14-OMe, 14'-OMe)。以上数据与文献<sup>[20]</sup>报道基本一致,故鉴定化合物 **6** 为 blestriareneA。

**化合物 7** 淡黄色粉末;分子式为  $C_9H_8O_3$ ;  $^1H$  NMR (500 MHz,  $(CD_3)_2CO$ )  $\delta$ : 7.60 ~ 7.63 (1H, d,  $J = 15.0$  Hz, H-7), 7.54 ~ 7.56 (2H, d,  $J = 5.0, 10.0$  Hz, H-2, H-4), 6.89 ~ 6.91 (2H, d,  $J = 5.0, 10.0$  Hz, H-1, H-5), 6.32 ~ 6.35 (1H, t,  $J = 10.0$  Hz, H-8);  $^{13}C$  NMR (125 MHz,  $(CD_3)_2CO$ )  $\delta$ : 115.8 (C-1, C-5), 130.3 (C-2, C-4), 126.2 (C-3), 159.6 (C-6),

144.6 (C-7), 114.9 (C-8), 167.3 (C-9)。以上数据与文献<sup>[21]</sup>报道基本一致,故鉴定化合物 **7** 为 (E)-3-(4-hydroxyphenyl) acrylic acid。

**化合物 8** 白色粉末;分子式为  $C_9H_{10}O_2$ ;  $^1H$  NMR (500 MHz,  $(CD_3)_2CO$ )  $\delta$ : 7.24 ~ 7.29 (4H, H-1, H-2, H-4, H-5), 7.16 ~ 7.20 (1H, d,  $J = 10.0$  Hz, H-6), 2.91 ~ 2.93 (2H, d,  $J = 10.0$  Hz, H-8), 2.61 ~ 2.63 (2H, d,  $J = 10.0$  Hz, H-7);  $^{13}C$  NMR (125 MHz,  $(CD_3)_2CO$ )  $\delta$ : 128.3 (C-1, C-5), 128.4 (C-2, C-4), 141.1 (C-3), 125.9 (C-6), 30.6 (C-7), 35.0 (C-8), 173.1 (C-9)。以上数据与文献<sup>[22]</sup>报道基本一致,故鉴定化合物 **8** 为 3-phenylpropanoic acid。

**化合物 9** 无色油状液体;分子式为  $C_{10}H_{12}O_3$ ;  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 7.14 ~ 7.16 (2H, d,  $J = 10.0$  Hz, H-1, H-5), 6.79 ~ 6.77 (2H, d,  $J = 10.0$  Hz, H-2, H-4), 4.12 ~ 4.16 (2H, t,  $J = 5.0, 10.0$  Hz, H-10), 3.54 (2H, s, H-7), 1.23 ~ 1.26 (3H, t,  $J = 10.0$  Hz, H-11);  $^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 130.5 (C-1, C-5), 115.4 (C-2, C-4), 163.3 (C-3), 126.4 (C-6), 60.8 (C-7), 172.0 (C-8), 40.5 (C-10), 14.2 (C-11)。以上数据与文献<sup>[23]</sup>报道基本一致,故鉴定化合物 **9** 为 ethyl 2-(4-hydroxyphenyl) acetate。

**化合物 10** 白色油状固体;分子式为  $C_{12}H_{16}O_2$ ;  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 7.06 ~ 7.08 (2H, d,  $J = 10.0$  Hz, H-1, H-5), 6.74 ~ 6.76 (2H, d,  $J = 10.0$  Hz, H-2, H-4), 4.1 ~ 4.14 (2H, t,  $J = 10.0$  Hz, H-9), 2.86 ~ 2.89 (2H, t,  $J = 5.0, 10.0$  Hz, H-7), 2.56 ~ 2.59 (2H, t,  $J = 5.0, 10.0$  Hz, H-11), 1.22 ~ 1.25 (6H, t,  $J = 10.0$  Hz, H-10, H-12);  $^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 129.5 (C-1, C-5), 115.2 (C-2, C-4), 158.5 (C-3), 125.1 (C-6), 60.4 (C-7), 199.9 (C-8), 36.3 (C-9), 14.2 (C-10), 30.2 (C-11), 14.2 (C-12)。以上数据与文献<sup>[23]</sup>报道基本一致,故鉴定化合物 **10** 为 ethyl 2-(4-ethylphenyl) acetate。

化合物 **1** ~ **10** 的结构见图 1。

## 2.2 抗菌活性评价及机理

### 2.2.1 抑菌活性和最低抑菌浓度测定

通过测试不同提取物部位抑菌活性,发现乙酸乙酯部位抑菌效果最好 (MIC: 2.0 mg/mL)。所测试单体化合物对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度范围为 10 ~ 250  $\mu\text{g/mL}$ , 其中化合物 **6** 抑菌效果最强 (MIC: 10  $\mu\text{g/mL}$ , MBC: 20  $\mu\text{g/mL}$ )。结果如表 1 所示。

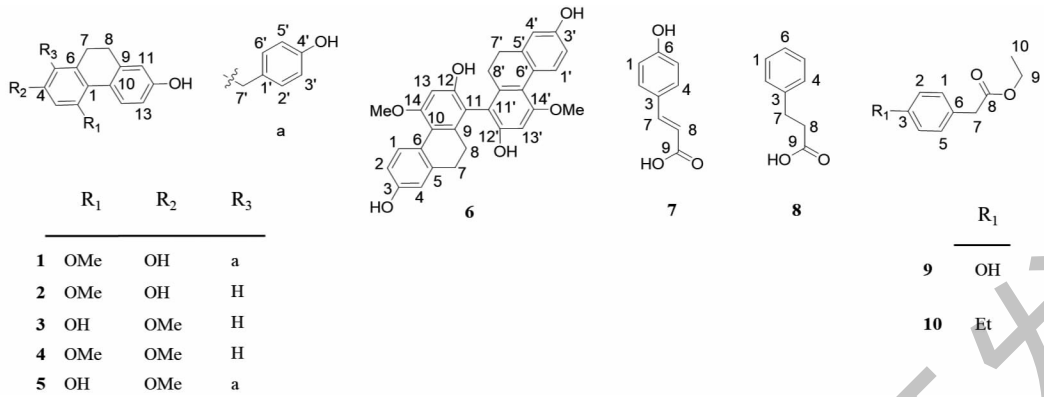


图 1 化合物 1 ~ 10 的化学结构

Fig. 1 The chemical structures of compounds 1-10

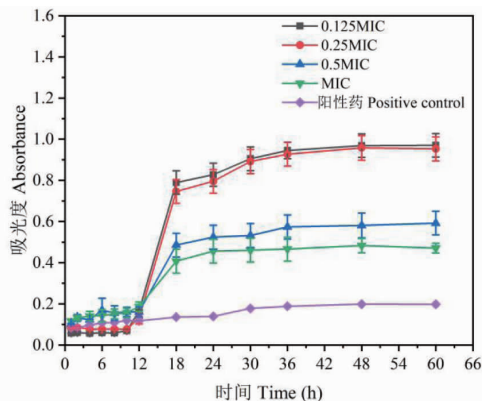
表 1 白及中不同极性部位及单体化合物的抗 *S. aureus* 活性Table 1 Anti-*S. aureus* activity of different polar parts and compounds from *B. striata*

样品 Sample	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
石油醚部位 Petroleum ether part	4.0	8.0
乙酸乙酯部位 Ethyl acetate part	2.0	2.0
丙酮部位 Acetone part	4.0	2.0
1	0.25	0.5
2	0.25	0.5
3	0.25	0.25
4	0.25	0.25
5	0.125	0.25
6	0.01	0.02
7	0.025	0.05
8	0.125	0.25
9	0.125	0.125
10	0.25	0.25

## 2.2.2 生长曲线测定

由图 2 可知, 12 h 后细菌大量繁殖, 不同浓度化合物 6 对金黄色葡萄球菌有较好的抑制作用, 且呈

现出剂量依赖性。给药组化合物 6 对细菌的抑制药效时间与阳性对照组 (阿莫西林 0.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 相当。

图 2 化合物 6 对金黄色葡萄球菌生存能力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )Fig. 2 Effect of compound 6 on the survivability of *S. aureus* ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 2.2.3 对细胞壁完整性的影响

碱性磷酸酶(AKP)存在于细胞壁和细胞膜之间,其含量高低可作为细菌细胞壁破裂程度的指标。由图3可知,化合物6作用于金黄色葡萄球菌后,阴性对照组中检测到微量 AKP,而给药组中 AKP 的含

量显著增加,这表明化合物6对细菌细胞壁造成损伤。在6 h左右,化合物6对金黄色葡萄球菌的破坏达到最大值(AKP的含量几乎不变)。此外,化合物6对金黄色葡萄球菌细胞壁的破坏效果与阳性对照组几乎相当。

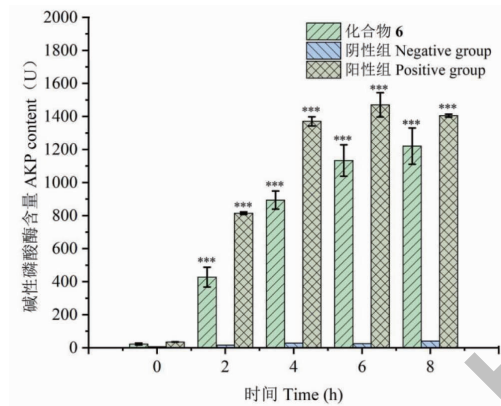


图3 给药后金黄色葡萄球菌中 AKP 的泄漏量( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 3 Leakage of AKP in *S. aureus* after drug administration ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

注:与阴性对照组相比,\*\*\* $P < 0.001$ 。Compared with control of negative group,\*\*\* $P < 0.001$ 。

### 2.2.4 对细胞膜完整性的影响

通过检测 DNA 与 PI 探针结合的荧光强度来反映化合物对细胞膜损伤强弱(见图4)。在荧光显微镜下,与阴性对照组(见图4a)相比,浓度为 MBC 的

化合物6给药组(见图4b)显示出多且强的红色荧光,表明给药组导致了细胞膜的结构损伤,造成细菌中 DNA 的泄漏。

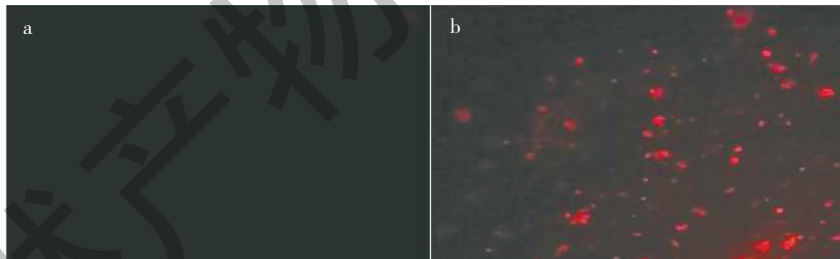


图4 药物作用于金黄色葡萄球菌的荧光图像(1 000 ×)

Fig. 4 Fluorescence image of drug action on *S. aureus*(1 000 ×)

注:a为阴性对照组;b为MBC浓度化合物6。(a) Normal group;(b) Compound 6 (MBC)。

### 2.2.5 对细胞形态的影响

细菌形态如图5所示。与正常金黄色葡萄球菌(见图5a)相比,经浓度为MBC的化合物6给药2 h后,细菌细胞膜轮廓被极大破坏,出现细胞碎片和内容物泄漏物(见图5b),进一步证实了化合物6抑制金黄色葡萄球菌主要是破坏其细胞膜的结构。

## 3 讨论与结论

本实验以抑菌活性为导向,采用色谱分离技术对中药白及的化学成分进行分离纯化,共分离鉴定

了10个化合物(1~10),包括菲类化合物6个(1~6)和香豆酸类似物4个(7~10)。首次在白及属植物中发现了香豆酸类似物的存在,对兰科白及属植物化学成分丰富具有重要的指导意义。

在化合物抑菌机制的探究中,首先筛选了提取物与单体化合物的抑菌活性,测试结果显示所供试化合物中,化合物6对金黄色葡萄球菌抑菌活性最好(MIC 0.01mg/mL),抑菌效果呈剂量依赖性。SEM结果显示该化合物对细菌细胞壁与膜的破坏

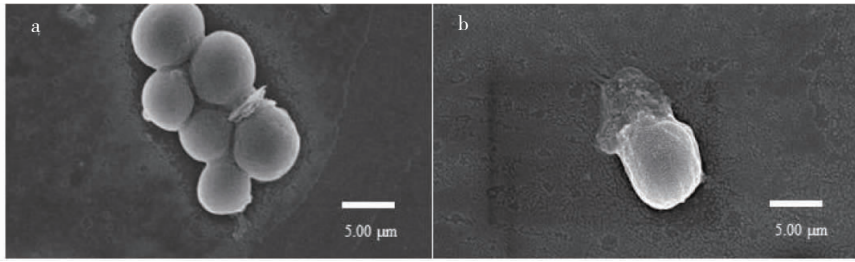


图5 药物作用于金黄色葡萄球菌扫描电镜图片

Fig. 5 SEM image of drug action on *S. aureus*

注: a 为正常组; b 为 MBC 浓度的化合物 6。Note: (a) Normal group; (b) Compound 6 (MBC).

并造成胞内物质的泄漏。此外, AKP 酶的含量变化和 PI 探针的荧光强度进一步证明了化合物 6 对细菌膜的损伤。在临床使用中, 白及提取物能够加快伤口的愈合并防治感染的产生, 这提示白及药材具有抗菌药效物质基础可能与化合物 6 等菲类衍生物相关。

从结构类型来看, 菲类化合物是一种结构完全异于市售抗生素( $\beta$ -内酰胺类、大环内酯类、喹诺酮类)的天然产物, 在此项研究中, 菲类化合物都具有良好的抗菌效果, 这对现行抗菌药物的丰富有着启示作用, 开发出新的菲类抗菌剂有望解决耐药菌的产生。文献报道, 即使是同类型的菲类化合物也会产生不同的抗菌机制, 如 blestriacin 主要是通过破坏细菌膜电位和膜完整性来抑制葡萄球菌的生长<sup>[24]</sup>, aristoloxazine C 通过诱导细胞壁降解和消融来抑制青枯菌的生长<sup>[25]</sup>。从结构上看, 菲类容易在生物体类转化为醌, 导致半醌自由基的产生而形成抑菌活性<sup>[26]</sup>。这提示我们对菲类化合物其抑菌机制进一步深入研究很有必要。总之, 我们的研究初步证实了菲类通过破坏细菌膜的抑菌机制, 为白及抗菌的药效物质基础提供了实验数据。

#### 参考文献

- Ravalli R, Nava Jyothi C. A Review on antimicrobial resistance in developing countries[J]. *Biochem Pharmacol*, 2015, 4:225-231.
- Ferri M, Ranucci E, Romagnoli P, et al. Antimicrobial resistance: a global emerging threat to public health systems[J]. *Crit Rev Food Sci*, 2017, 57:2857-2876.
- Taylor J, Hafner M, Yerushalmi E, et al. Estimating the economic costs of antimicrobial resistance: model and results [M]. Santa Monica: RAND Corporation, 2014.
- Wu S, Liu F, Zhu K, et al. Natural products that target virulence factors in antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67:13195-13211.
- Braun J, Eckes S, Rommens P M, et al. Toxic effect of vancomycin on viability and functionality of different cells involved in tissue regeneration[J]. *J Antibiot*, 2020, 9:238-241.
- Leitner JM, Graninger W, Thalhammer F. Hepatotoxicity of antibacterials: pathomechanisms and clinical data[J]. *Infection*, 2010, 38:3-11.
- Khan IA, Mirza ZM. Piperine, a phytochemical potentiator of ciprofloxacin against *staphylococcus aureus* [J]. *Antimicrob Agents Ch*, 2006, 50:810-812.
- Chopra B, Dhingra AK. Natural products: A lead for drug discovery and development[J]. *Phytother Res*, 2021, 35:4660-4702.
- Cordell GA, Colvard MD. Natural products and traditional medicine: turning on a paradigm[J]. *J Nat Prod*, 2012, 75:514-525.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中华人民共和国药典) [M]. Beijing Chemical Industry Press, 1999:7803.
- Su SL, Duan JA, Li WL, et al. Exploration the toxicity/increase virulence mechanisms of "eighteen incompatible medicaments" based on chemical substances [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2010, 16:123-129.
- He X, Wang X, Fang J, et al. *Bletilla striata*: medicinal uses, phytochemistry and pharmacological activities [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 195:20-38.
- Zhao FF, Li J, Xu GB, et al. Study on the hemostatic active compounds from the non-polysaccharide fraction of *Bletilla striata* [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2021, 33:426-432.
- Leem K, Lee J, Kim M, et al. Effects of *Bletillae Rhizoma* on the elastase, collagenase, and tyrosinase activities and the procollagen synthesis in Hs68 human fibroblasts [J]. *Korea J*

- Herbol, 2013, 28; 9-14.
- 15 Sun A, Liu J, Pang S, et al. Two novel phenanthraquinones with anti-cancer activity isolated from *Bletilla striata* [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2016, 26: 2375-2379.
- 16 Zhang Y, Lv T, Li M, et al. Anti-aging effect of polysaccharide from *Bletilla striata* on nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. Pharmacogn Mag, 2015, 11: 449-454.
- 17 Liu MF, Ding Y, Zhang DM. Phenanthrene constituents from rhizome of *Arundina graminifolia* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2005, 5: 353-356.
- 18 Zhang XY, Chen WC, Du YM, et al. Phytochemistry and pharmacological activities of *Arundina graminifolia* (D. Don) Hochr. and other common Orchidaceae medicinal plants [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 276: 14143-14168.
- 19 Liu M, Han Y, Xing D, et al. A new stilbenoid from *Arundina graminifolia* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2004, 6: 229-232.
- 20 Yamaki M, Bai L, Inoue K, et al. Biphenanthrenes from *Bletilla striata* [J]. Phytochemistry, 1989, 28: 3503-3505.
- 21 Li ZJ, Cai L, Mei RF, et al. A highly efficient transformation of *cis*- to *trans*-cinnamic acid derivatives by iodine [J]. Tetrahedron Lett, 2015, 56: 7197-7200.
- 22 Schmidt AKC, Stark CBW. TPAP-catalyzed direct oxidation of primary alcohols to carboxylic acids through stabilized aldehyde hydrates [J]. Org Lett, 2011, 13: 4164-4167.
- 23 Best D, Jean M, Weghe VD, et al. Modular synthesis of arylacetic acid esters, thioesters, and amides from aryl ethers via Rh(II)-catalyzed diazo arylation [J]. J Org Chem, 2016, 81: 7760-7770.
- 24 Chen B, Lin C, Chen N, et al. Phenanthrene antibiotic targets bacterial membranes and kills *Staphylococcus aureus* with a low propensity for resistance development [J]. Front Microbiol, 2018, 9: 1593-1601.
- 25 Fan X, Kong D, He S, et al. Phenanthrene derivatives from *Asarum heterotropoides* showed excellent antibacterial activity against phytopathogenic bacteria [J]. J Agric Food Chem, 2021, 69: 14520-14529.
- 26 Krayz GT, Bittner S, Dhiman A, et al. Electrochemistry of quinones with respect to their role in biomedical chemistry [J]. Chem Rec, 2021, 21: 2332-2343.