

中图分类号: R965; R285 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)24-0051-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.24.011



厚朴酚共晶抑菌活性研究*

曾金石¹, 陈晓锋², 廖龙凤¹, 谢月辉¹, 朱丽康^{1△}

(1. 江西省赣州市赣县区人民医院, 江西 赣州 341100; 2. 国家卫生健康委科学技术研究所, 北京 100018)
摘要:目的 进一步提高厚朴酚(MAG)的抑菌活性。方法 应用研磨法分别制备厚朴酚-L-脯氨酸(MAG-PRO)和厚朴酚-甜菜碱(MAG-BET)共晶, 采用粉末X-射线衍射(PXRD)法、热失重分析(TG)法、差示扫描量热(DSC)法、傅里叶红外光谱(FT-IR)法鉴定共晶; 对共晶粉末样品进行PXRD表征以观察其稳定性; 采用高效液相色谱法测定MAG及其2种共晶在10 mL水、pH 2.0 盐酸缓冲液、pH 4.5和6.8磷酸盐缓冲液4种溶出介质中的平衡溶解度; 采用微量肉汤稀释法检测MAG及其2种共晶不同质量浓度(50, 100, 200 μg/mL)下对大肠埃希菌的抑菌活性。结果 4种鉴定方法确定了共晶形成; PXRD表征结果显示样品未发生晶型改变, 稳定性较好; MAG及其2种共晶在4种溶出介质中的平衡溶解度存在显著差异, 且均在pH 6.8条件下最高, pH 4.5条件下最低。菌悬液在不同MAG质量浓度下, 共晶的抑菌率均高于MAG, 且质量浓度为200 μg/mL时, MAG及其共晶均表现出抑菌作用(抑菌率>50%)。结论 MAG-PRO和MAG-BET的抑菌活性较单体更高。该结论可为MAG进一步的药用研发提供参考。

关键词: 厚朴酚; L-脯氨酸; 甜菜碱; 共晶; 鉴定; 稳定性; 平衡溶解度; 抑菌活性

Study on the Antibacterial Activity of Magnolol Co-crystals

ZENG Jinshi¹, CHEN Xiaofeng², LIAO Longfeng¹, XIE Yuehui¹, ZHU Likang¹

(1. Ganzhou District People's Hospital, Ganzhou, Jiangxi, China 341100; 2. National Research Institute for Family Planning, Beijing, China 100018)

Abstract: Objective To increase the antibacterial activity of magnolol (MAG). **Methods** Magnolol-L-proline (MAG-PRO) co-crystal and magnolol-betaine (MAG-BET) co-crystal were prepared by the grinding method. The co-crystals were

*基金项目: 国家卫生健康委科学技术研究所科技创新基金面上项目[2019GJM02]。

第一作者: 曾金石, 男, 大学本科, 副主任技师, 研究方向为临床医学检验, (电子信箱)13879713635@163.com。

△通信作者: 朱丽康, 女, 大学本科, 副主任技师, 研究方向为临床医学检验, (电子信箱)zlk262744513@163.com。

http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1650.R.20240122.1619.002.html.

[4] 张耀峰, 黄静娥, 符红波. 医师-药师协作的华法林抗凝门诊管理模式的应用及其效果评价[J]. 今日药学, 2021, 31(8): 623-626.

[5] 曹喜红, 罗军, 谢晨. 医药联合门诊促进慢病患者合理用药效果评价[J]. 中国药业, 2021, 30(6): 14-16.

[6] 中国血脂管理指南修订联合专家委员会. 中国血脂管理指南(2023年)[J]. 中国循环杂志, 2023, 38(3): 237-271.

[7] RABAR S, HARKER M, O'FLYNN N, et al. Lipid modification and cardiovascular risk assessment for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease: summary of updated NICE guidance[J]. BMJ, 2014, 349: g4356.

[8] 孙燕, 姚诗慧, 邓文辉, 等. 药师干预口服抗肿瘤药患者用药依从性的成效分析[J]. 中国药业, 2024, 33(3): 57-62.

[9] 余新艳, 苏鹏, 袁晓静, 等. 基层老年慢性病患者心血管疾病综合发生风险的影响因素研究[J]. 中国全科医学, 2024, 27(10): 1186-1193.

[10] 唐静, 王可, 杨昆, 等. 老年住院慢病患者多重用药发生率及其影响因素研究[J]. 中国药业, 2022, 31(16): 119-122.

[11] BANACH M, PENSON PE, VRABLIK M, et al. Optimal use of lipidlowering therapy after acute coronary syndromes: A Position Paper endorsed by the International Lipid Expert Panel (ILEP) [J]. Pharmacological Research, 2021, 166: 105499.

[12] PALATINI P, ROSEI EA, CASIGLIA E, et al. Management of the hypertensive patient with elevated heart rate: Statement of the Second Consensus Conference endorsed by the European Society of Hypertension[J]. J Hypertens, 2016, 34(5): 813-821.

[13] ALADIN AI, AL RIFAI M, RASOOL SH, et al. The Association of Resting Heart Rate and Incident Hypertension: The Henry Ford Hospital Exercise Testing (FIT) Project[J]. Am J Hypertens, 2016, 29(2): 251-257.

[14] 胡孜阳, 李雪山, 黄国强. 中西医结合二级预防模式对急性冠脉综合征PCI术后病人短期预后的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2021, 19(9): 1521-1523.

[15] 陈国华, 曾升. 急性冠脉综合征PCI术后规范化二级预防治疗随访结果浅析[J]. 中国标准化, 2023(12): 293-296.

[16] 梁维娟, 邱伟, 杨春霞. 社区2型糖尿病患者冠心病患病情况及其影响因素[J]. 中国卫生工程学, 2022, 21(4): 614-616.

[17] 江林双, 陈茂伟. 阿托伐他汀药物性肝损伤的临床特征分析[J]. 中国全科医学, 2024, 27(30): 3772-3775.

[18] 高鹏, 程峰, 李浩. 基于FAERS数据库挖掘分析他汀类药物不良反应[J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(22): 2383-2387.

(收稿日期: 2023-12-15; 修回日期: 2024-08-20)

identified by the powder X - ray diffraction (PXRD), thermogravimetric analysis (TG), differential scanning calorimetry (DSC), and Fourier transform infrared spectroscopy (FT - IR) methods. PXRD characterization was performed to observe the stability of co - crystals. The equilibrium solubilities of the MAG and its two co - crystals in four dissolution media [10 mL water, hydrochloric acid buffer (pH 2.0), phosphate buffer (pH 4.5, pH 6.8)] were determined by the high - performance liquid chromatography (HPLC) method. The antibacterial activity of the MAG and its two co - crystals at different mass concentrations (50,100,200 $\mu\text{g} / \text{mL}$) against *Escherichia coli* was detected by the broth microdilution method. **Results** The co - crystals were confirmed by the above four identification methods. The PXRD characterization showed that the samples did not have any crystal form change and showed good stability. The equilibrium solubilities of MAG and its two co - crystals in four dissolution media were significantly different, with the highest in phosphate buffer (pH 6.8) and lowest in phosphate buffer solution (pH 4.5). At different concentrations of MAG, the antibacterial rate of co - crystals was higher than that of MAG; and when the concentration of MAG was 200 $\mu\text{g} / \text{mL}$, all MAG and its co - crystals showed antibacterial activity (antibacterial rate > 50%). **Conclusion** MAG - PRO and MAG - BET have higher antibacterial activity compared to monomer, which can provide a reference for further pharmaceutical research and development of MAG.

Key words: magnolol; *L* - proline; betaine; co - crystal; identification; stability; equilibrium solubility; antibacterial activity

药物共晶可在不改变药物共价结构的前提下改进药物的理化性质,包括提高溶解度和溶出速率,改善化学稳定性、机械性能和生物利用度等,已成为药物研发的新途径^[1-2]。近年来,重磅抗心力衰竭新药LCZ696(沙库巴曲缬沙坦钠)、抗糖尿病新药达格列净和伊格列净等共晶药物相继获得美国食品和药物管理局(FDA)批准上市。药物共晶已成为一种成熟且具有重要应用价值的固体形态,对新药研发具有深远影响^[3-4]。厚朴酚(MAG)为多酚类联苯化合物,是中药厚朴的主要活性成分,具有抑菌、抗炎、抗氧化等多种生物活性^[5-7]。但MAG在水中的溶解度很低(11.6 $\mu\text{g} / \text{mL}$),口服生物利用度仅为5%,限制了其药效的发挥^[8-10]。因此,开展MAG的共晶研究,对于提高其在水中的溶解度及改善其药物代谢动力学性质有重要意义。MAG的结构中含有2个酚羟基官能团。根据共晶合成子设计,酚羟基可与吡啶、酰胺和羧酸类化合物形成氢键。在此,制备得到厚朴酚 - *L* - 脯氨酸(MAG - PRO)和厚朴酚 - 甜菜碱酸(MAG - BET)2种共晶,本研究中采用现代晶型研究技术对其进行了表征,并进一步对MAG共晶的理化性质,以及抑菌活性进行了初步研究。现报道如下。

1 材料

1.1 仪器

D2 Phaser型粉末X - 射线衍射仪(德国Bruker公司);TGA - 1型热重分析仪(瑞士Mettler Toledo公司);STA 409 PC型差示扫描量热仪(德国Netzsch公司);Spectrum Two型红外光谱仪(美国Perkin Elmer仪器有限公司);DAA - 1型稳定性培养箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

1.2 试药

MAG(北京偶合科技有限公司,批号为20220513,含量 > 99%);BET和PRO(阿拉丁化学试剂有限公司,

批号分别为C2023012、Z2023031,含量均大于99%);溴化钾为光谱纯。

1.3 菌种

大肠埃希菌(GXQRMYY2023ATCC25922ECO - 2),来自赣州市赣县区人民医院检验科微生物菌株库,为第2代质控菌株。

2 方法与结果

2.1 共晶制备

将MAG 226 mg(1 mmol),分别与PRO 114 mg(1 mmol)和BET 117 mg(1 mmol)置玛瑙研钵中,各加入甲醇10 μL ,研磨30 min,得到白色粉末状固体,即为MAG - PRO(1:1, *m / m*)和MAG - BET(1:1, *m / m*)2种共晶。

2.2 鉴定

粉末X - 射线衍射(PXRD)法^[11]:检测条件为Cu $K\alpha$ 射线($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$),电流为40 mA;电压为40 kV;扫描速率为每步0.1 s,测试范围为3 ~ 40°。结果,MAG - PRO粉末的特征峰的偏转角为6.75°、14.32°和17.42°,MAG - BET粉末分别为6.82°、14.22°和17.31°(见图1)。

热失重分析(TG)法^[12]:检测条件为,氧化铝坩埚,温度检测范围25 ~ 400 °C,升温速率为10 °C / min,氮气流速为50 mL / min,准确称取3 ~ 8 mg样品并进行检测。结果2种共晶与MAG的特征峰相比均有明显的变化,证明有新相生成,为制备得到的共晶。失重现象并未发生在新的共晶化合物中,说明这2种共晶为非溶剂化合物。且三者分解温度均高于250 °C(见图2)。

差示扫描量热(DSC)法^[13-14]:检测条件为,铝坩埚,升温区间为20 ~ 200 °C,升温速率为10 °C / min。取样品5 ~ 10 mg,精密称定,检测。结果显示,MAG与MAG - PRO和MAG - BET的熔点 T_{onset} 不同,证明有新相生成且纯度较高(见图3)。

傅里叶红外光谱(FT - IR)法^[15-16]:检测条件为,

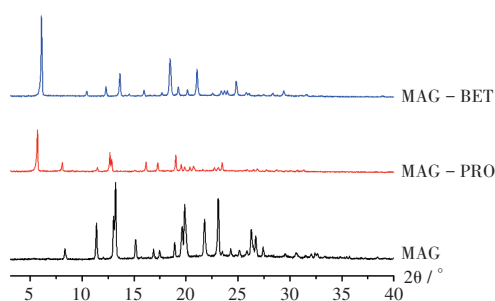


图1 PXRD对比图谱

Fig. 1 PXRD patterns

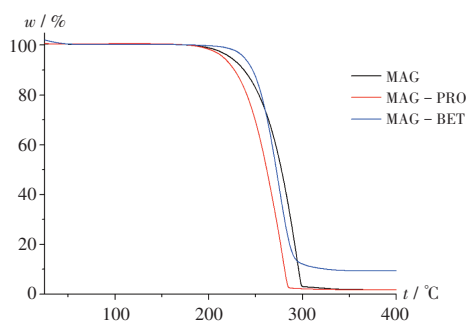


图2 TG对比图谱

Fig. 2 TG patterns

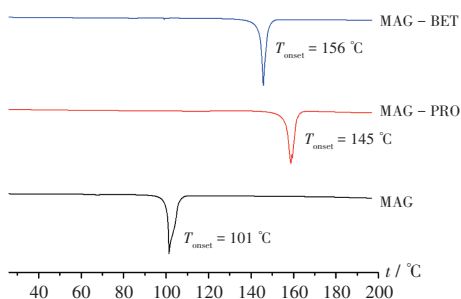


图3 DSC对比图谱

Fig. 3 DSC patterns

光谱波数测量范围 $450 \sim 4\,000\text{ cm}^{-1}$, 分辨率 4 cm^{-1} , 取 $1 \sim 2\text{ mg}$ 样品, 于适量溴化钾压片。结果显示, 波数 $3\,082\text{ cm}^{-1}$ 处的宽峰为厚朴酚羟基 O—H 的伸缩振动峰, 当与 PRO 形成共晶后, 蓝移至波数 $3\,074\text{ cm}^{-1}$ 处, 当与甜菜碱形成共晶后, O—H 伸缩振动峰红移至波数 $3\,128\text{ cm}^{-1}$ 处, 说明存在分子间氢键相互作用, 共晶羟基 O—H 伸缩振动峰的峰形和峰位均发生了明显变化(见图4)。

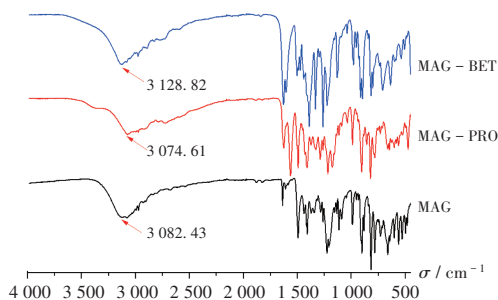


图4 FT-IR对比图谱

Fig. 4 FT-IR spectra

2.3 稳定性考察

取同一批号样品3份, 于 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 、75%相对湿度下在培养箱中放置3个月, 而后对样品进行PXRD表征, 验证样品稳定性。结果显示, 共晶均未发生晶型转变(见图5)。

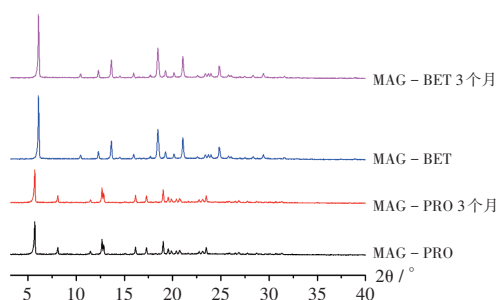


图5 稳定性PXRD对比图谱

Fig. 5 PXRD patterns on stability

2.4 平衡溶解度测定

色谱条件: 色谱柱为 Agilent Eclipse Plus C_{18} 柱 ($250\text{ mm} \times 4.6\text{ mm}$, $3.5\text{ }\mu\text{m}$); 流动相为乙腈-水 ($62:38, V/V$); 流速为 1 mL/min ; 检测波长为 291 nm ; 柱温为 $30\text{ }^\circ\text{C}$; 进样量为 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。

溶液制备: 取 10 mg MAG 及 2 种共晶, 分别加入 10 mL 水、pH 2.0 盐酸缓冲液、pH 4.5 和 6.8 磷酸盐缓冲液中, 搅拌 24 h, 离心, 取上清液, 即得。

方法学考察: 按相关要求进行精密性、稳定性、重复性试验, 结果的 *RSD* 均小于 3.0%, 表明仪器精密性良好, 供试品(单体与共晶)溶液室温放置 24 h 内基本稳定(且共晶更稳定), 方法重复性良好。

平衡溶解度测定结果: 4 种溶出介质中, 单体及共晶的溶解度均存在显著差异, 其中 pH 6.8 条件下 MAG 及其 2 种共晶溶解度均最高, 而 pH 4.5 条件下最低。在共晶中, 由于水溶性配体的引入, 溶解度在 4 种介质中均提高 3~4 倍(见表1)。可知, 共晶的平衡溶解度同时受配体和溶液环境影响, 但相比于单体本身, 共晶的平衡溶解度均有进一步提高。

表1 平衡溶解度测定结果($\mu\text{g/mL}$)

Tab. 1 Results of equilibrium solubility determination ($\mu\text{g/mL}$)

样品	水	pH 2.0	pH 4.5	pH 6.8
MAG	9	8	6	15
MAG-PRO	28	25	17	48
MAG-BET	21	18	15	41

2.5 抑菌性能研究

采用微量肉汤稀释法, 取大肠埃希菌制成含菌数约为 $1 \times 10^6\text{ cfu/mL}$ 的菌悬液, 置液体 LB 培养基中, 于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、振荡器 (160 r/min , 下同) 中培养 24 h, $6\,000\text{ g}$ 离心 5 min, 收集细菌, 用双蒸水洗涤 3 次, 悬浮于蒸馏水中, 得菌悬液。取 MAG 及其 2 种共晶样品各适量, 加入

10 mL菌悬液中,在37℃振荡器黑暗中孵育24 h。采用紫外-可见分光光度计测定600 nm波长处的光密度(OD_{600})值,以检测细菌浊度。取MAG及其2种共晶样品各适量,加入20 mL菌悬液中,得MAG的暴露质量浓度分别为50,100,200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的供试品溶液。阴性对照使用等体积接种肉汤,检测抑菌情况,并计算抑制率(η),公式为 $\eta = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100\%$ 。式中 A_0 为培养控制的 OD_{600} ; A_1 为细菌与MAG和共晶固体孵育的 OD_{600} 。平行测定3次,取平均值。

结果显示,MAG质量浓度为50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 条件下,MAG及其2种共晶对大肠埃希菌均无明显抑制作用,且抑菌率较低;100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 条件下,3者抑菌率均大幅升高,共晶的抑菌率均高于MAG,但均无抑菌作用;200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 条件下,3者抑菌率继续升高,体现出抑菌作用(抑菌率 $>50\%$),且共晶的抑菌率高于单体(见图6)。可见,共晶增加了MAG在介质中的溶解速率,从而有利于MAG在细菌液体环境中的分散。因此,共晶有助于提高MAG的抗菌活性。

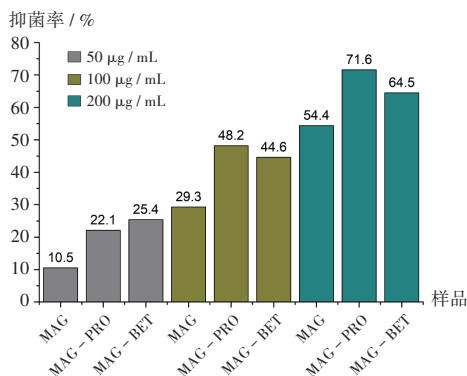


图6 MAG、MAG-PRO和MAG-BET的抑菌率

Fig. 6 Antibacterial rates of MAG, MAG-PRO and MAG-BET

共晶中的活性成分为MAG,配体PRO和BET并无抑菌活性的报道,仅改善了其理化性质。因此,MAG-PRO和MAG-BET不会对其抑菌谱有影响。而由于溶解度及其溶解速率的提高,有助于快速释放MAG并达到更高的浓度,可显著降低最低抑菌浓度。

3 讨论

MAG水溶性差,体内溶出度小,导致其生物利用度低,临床应用受限。本研究中针对该问题,采用晶体工程的设计理念,通过球磨法获得了MAG-PRO和MAG-BET 2种共晶,并应用晶体结构鉴定中的常规检测方法(PXRD法、TG法、DSC法和FT-IR法)对共晶结构进行了表征,并采用模拟人体胃液和肠液环境的缓冲液体体系研究了共晶的物理稳定性和平衡溶解度,结果表明,厚朴酚共晶的稳定性和溶解度均优于单体。且在抑菌试验中发现,2种共晶由于溶解性能提升,抑菌活性也

更强。本研究的不足在于,未进行MAG共晶在动物体内的药物代谢动力学研究,这也是课题组下一步的研究方向。

综上所述,MAG-PRO和MAG-BET 2种共晶相对于单体具有更高的抑菌活性。本研究结论具有一定的社会应用意义,可为MAG进一步的药用研究奠定基础。

参考文献

- [1] SALIMO Z, YAKUBU M, SILVA L, et al. Chemistry and pharmacology of bergenin or its derivatives: A promising molecule[J]. *Biomolecules*, 2023, 13(3): 403-410.
- [2] DAI XL, CHEN JM, LU TB. Pharmaceutical cocrystallization: an effective approach to modulate the physicochemical properties of solid-state drugs [J]. *CrystEngComm*, 2018, 20(36): 5292-5316.
- [3] QU HB, LI ZH, Wu SG, et al. Mechanochemical synthesis of magnolol multicomponent crystalline solids for improved natural antibiotics and customizable release profiles [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2023, 632: 122530-122540.
- [4] 范莹,李敏,杨楠,等. 药物共晶研究进展[J]. *中国药业*, 2022, 31(6): 1-5.
- [5] 莫斯喻,钟洪滨,蔡肇翔. 厚朴酚对LPS致炎小鼠抗炎效应的初步研究[J]. *海南医学院学报*, 2019, 25(5): 335-338.
- [6] 付云贺. 厚朴酚抗炎作用及机制研究[D]. 长春:吉林大学,2013.
- [7] 贾音,任晨曦,夏悠楠,等. 厚朴酚的药理作用研究现状[J]. *生物化工*, 2023, 9(3): 170-174.
- [8] 李春年. 厚朴酚对大鼠实验性牙周炎骨吸收抑制作用的研究[J]. *实用口腔医学杂志*, 2018, 34(3): 341-344.
- [9] 张玲,李敬双,王金莉,等. 厚朴酚调节TLR2和NF- κ B位点对猪链球菌2型诱导巨噬细胞炎症反应的影响[J]. *中国兽医学报*, 2020, 40(5): 947-952.
- [10] 李秦剑. 厚朴醇和氢分子在异常增殖B淋巴细胞系的药理学研究[D]. 北京:北京工业大学,2018.
- [11] 吕扬,吴云山,郑启泰. X射线衍射分析技术在新药及制药研究中的应用进展[J]. *现代仪器*, 2004, 11(3): 347-349.
- [12] 王震红,杨永刚. 热分析技术在药品检验中的应用[J]. *中国药师*, 2012, 15(10): 1498-1500.
- [13] 王洪亮. 药物多晶型的鉴别方法[J]. *河北医科大学学报*, 2002, 23(5): 307-309.
- [14] TAMBE S, JAIN D, MERUVA SK, et al. Recent advances in amorphous solid dispersions: preformulation, formulation strategies, technological advancements and characterization[J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(10): 1-33.
- [15] 杨震红,杨永刚. 热分析技术在药品检测中的应用[J]. *中国药师*, 2012, 15(10): 1498-1500.
- [16] 胡昌勤,冯艳春. 近红外光谱法在药物分析中的应用[J]. *中国药事*, 2003, 17(5): 312-314.

(收稿日期:2024-01-26;修回日期:2024-10-29)