

· 论 著 ·

## 3 种乳化剂对厚朴酚抑制变形链球菌生长及产酸作用影响的体外研究\*

刘 琳,包广洁<sup>△</sup>

(西北民族大学口腔医学院国家民委重点实验室,甘肃兰州 730030)

**摘要:**目的 考察厚朴酚在乳化剂聚乙二醇 400、吐温 20、吐温 80 增溶作用下对变形链球菌生长及产酸的抑制情况,研究乳化剂对厚朴酚抑菌性的影响,并对原因进行分析。**方法** 选用变形链球菌临床分离菌株,用轻唾-琼脂培养基(MS)培养细菌。将厚朴酚分别溶于 40% 的聚乙二醇 400、吐温 20、吐温 80 溶液中,并用相同乳化剂溶液将其等比稀释至预设浓度,采用纸片法将它们同时平行作用于变形链球菌做抑菌试验,比较上述厚朴酚与乳化剂混合物的抑菌效果;将厚朴酚分别溶于 3 种乳化剂中,并用 MS 液体培养基将其等比稀释至预设浓度,将等量的菌液加至培养基中,在特定条件下培养后考察 3 组药物在乳化剂作用下抑制细菌产酸的效果。**结果** 在高浓度时厚朴酚与聚乙二醇 400 作用后抑菌效果好,而在低浓度时药物与吐温 80 作用后抑菌效果好;厚朴酚与聚乙二醇 400 作用后对变形链球菌产酸能力抑制作用最强,与乳化剂吐温 80 作用后对变形链球菌产酸能力抑制作用最弱。**结论** 在不同乳化剂增溶作用下厚朴酚抑制变形链球菌生长及产酸效果有差异,乳化剂中亲油基链的增长增加了对厚朴酚扩散的抑制作用。

**关键词:**厚朴酚;乳化剂;链球菌,变异;抑菌性;产酸

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.14.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)14-1568-03

Study on influence of three kinds of emulsifiers on inhibitory effect of magnolol on growth and acid production of streptococcus mutans in vitro\*

Liu Lin, Bao Guangjie<sup>△</sup>

(Key Lab of State Ethnic Affairs Commission, Stomatology College, Northwest University for Nationalities, Lanzhou, Gansu 730030, China)

**Abstract: Objective** To study the influence of three kinds of emulsifiers on the inhibitory effect of magnolol on the growth and acid production of streptococcus mutans and its mechanism. **Methods** The clinical isolated strains of streptococcus mutans were selected and cultured by the slight saliva-agar culture medium(MS). Magnolol was dissolved in 40% solution of three kinds of emulsifier(polyethylene glycol 400, Tween20, and Tween80), and proportionally diluted to the preset concentration with solution of the same emulsifier. Then the effects of the agent on the growth of the bacteria were assessed by the slip diffusion method. Magnolol was dissolved in 40% solution of three different kinds of emulsifier, and proportionally diluted to the preset concentration with MS liquid media. The same amount of bacteria was added into the MS liquid medium and was cultured to study the inhibition effect of production acid of streptococcus mutans. **Results** At high concentration, magnolol under solubilization of polyethylene glycol 400 had better inhibitory effect on the growth of streptococcus mutans. At low concentration, magnolol under solubilization of Tween80 had better inhibitory effect. Magnolol under solubilization of polyethylene glycol 400 had best inhibitory effect on acid production of streptococcus mutans, and magnolol under solubilization of Tween80 had poor inhibitory effect. **Conclusion** Magnolol under solubilization of different emulsifiers has different inhibitory effect on the growth and acid production of streptococcus mutans. The growth of the lipophilic chain in emulsifiers increases the inhibitory effect on the diffusion of magnolol.

**Key words:** magnolol; emulsifying agents; streptococcus mutans; inhibitory effect; acid production

龋病(dental caries)是人类最常见的牙齿疾病,可引起牙齿颜色、形态、质地的进行性破坏,严重影响牙齿的咀嚼、发音、语言、美容、社交等功能<sup>[1]</sup>。龋病的预防是一个世界性难题,研究有效的防龋药物具有重要的意义。天然中草药作为医疗保健的一种替代选择,因其取材方便,来源丰富,用法简单,疗效显著、毒副作用轻微而引起了人们的广泛兴趣。有研究表明中药厚朴的活性成分厚朴酚能够有效地抑制变形链球菌生长、黏附及产酸<sup>[2-4]</sup>,但由于厚朴酚不溶于水<sup>[5]</sup>,影响了将其制成水剂

药物。使用助溶剂可以提高难溶物在水中的溶解度,聚乙二醇 400、吐温 20、吐温 80 为 3 种常见的非离子表面活性剂,其在 pH 3~10 均可使用,受系统中电解质或离子强度、无机盐、酸及碱的影响较小,本身毒性和刺激性小,应用广泛<sup>[6-8]</sup>。本研究以临床分离的变形链球菌为实验对象,比较厚朴酚在乳化剂聚乙二醇 400、吐温 20、吐温 80 助溶作用下溶于水后抑制变形链球菌生长以及产酸效果,从中发现与厚朴酚作用后能保持较好抑菌效果的乳化剂,为制作含厚朴酚水剂药物选择乳化剂时提

\* 基金项目:甘肃省兰州市科技发展项目(2007-1-86)。 作者简介:刘琳(1981~),实验师,硕士研究生,主要从事牙体牙髓病学方面的研究工作。 △ 通讯作者, Tel:13619321038; E-mail: helenbjg@sina.com。

供实验依据。

1 材料与与方法

1.1 材料 实验菌株采用临床分离菌株;药物来源于西安融升科技有限公司生产的厚朴酚(纯度大于 98%)。

1.2 方法

1.2.1 实验菌液制备 轻唾-琼脂培养基(MS)液体培养基中加入复苏-20℃冻存的菌液,置于 80% N<sub>2</sub>、20% CO<sub>2</sub> 气氛中,37℃厌氧培养 24 h,分光光度计标化菌液,使其光密度 OD<sub>610</sub> 值为 1.0 备用。

1.2.2 实验药液配制 厚朴酚用 40% 聚乙二醇 400、吐温 20、吐温 80 将药物配制成 1 mg/mL 的原液,滤器过滤消毒后置于 4℃冰箱备用。将原液分别用 40% 聚乙二醇 400、吐温 20、吐温 80 二倍稀释到浓度为 0.500 0、0.250 0、0.125 0、0.062 5 mg/mL,加上原液共 5 个浓度梯度。将原液用 MS 液体培养基二倍稀释制得浓度为 0.125 0、0.062 5、0.031 3、0.015 7 mg/mL 共 4 个浓度梯度的药物培养基。

1.2.3 乳化剂增溶作用后药液抑制变形链球菌生长的分组及方法 实验分为 40% 聚乙二醇 400 组(A 组)、40% 吐温 20 组(B 组)、40% 吐温 80 组(C 组),每组包含 5 个厚朴酚药液浓度(1.000 0、0.500 0、0.250 0、0.125 0、0.062 5 mg/mL),采用纸片法进行了抑菌情况测试,每组 4~6 个平行。操作如下:吸取 50 μL 已经标化的实验菌液滴至培养皿上,用三角棒将菌液均匀涂布于 MS 琼脂表面。依次从低浓度到高浓度吸取已配置好的实验药液 10 μL 滴至已高温高压灭菌的 6 mm 滤纸片上,待药液浸满纸片后,将纸片等距离放置于已涂布实验菌液的 MS 琼脂表面。滤纸片贴好后 15 min 内将培养皿倒置放入 80% N<sub>2</sub>、20% CO<sub>2</sub> 气氛中,37℃恒温培养箱内培养 48 h,测量各组抑菌环直径。

1.2.4 乳化剂增溶作用后药液抑制变形链球菌产酸的分组及

方法 实验同上分为 A、B、C 组,菌液组。将每组药物用 MS 液体培养基稀释到 4 个厚朴酚浓度梯度(0.125 0、0.062 5、0.031 3、0.015 7 mg/mL),对照组为不含药物的 MS 液体培养基。每组 4~6 个平行,调定初始 pH 为 7.6,各组按体积比 10:1 接种等量菌悬液,80% N<sub>2</sub>、20% CO<sub>2</sub> 气氛中,37℃厌氧培养 48 h。用实验酸度计测定培养物上清液的 pH 值,用菌液组做对照。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析。乳化剂增溶作用后抑制变形链球菌生长的影响多组均数间比较采用 F 检验,多组间两两比较采用 LSD-t 检验。检验水准为 α=0.05。乳化剂增溶作用后抑制变形链球菌产酸的影响分析多组均数间比较采用 F 检验或者多个样本的 Kruskal-Wallis H 检验,多组间均数两两比较采用 LSD-t 检验。检验水准为 α=0.05,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳化剂增溶作用后药液抑制变形链球菌生长情况 浓度为 1.000 0 mg/mL 时 A 组比 B、C 组抑菌效果强,差异有统计学意义(P<0.05)。浓度为 0.062 5 mg/mL 时 C 组比 A、B 组抑菌效果强,差异有统计学意义(P<0.05),见表 1。不同浓度的厚朴酚在聚乙二醇 400、吐温 20、吐温 80 3 种乳化剂中的抑菌效果,差异有统计学意义(P<0.05)。A 组中药物浓度 1.000 0 mg/mL 与 0.500 0、0.250 0、0.125 0、0.062 5 mg/mL 比较,差异有统计学意义(F=48.28, P=0.00),药物浓度高抑制细菌生长效果好。B 组中药物浓度 1.000 0 mg/mL 与 0.250 0、0.062 5 mg/mL 比较,差异有统计学意义(F=3.14, P=0.046),药物浓度高抑制细菌生长效果好。C 组中药物浓度 0.125 0 mg/mL 与 1.000 0、0.500 0、0.250 0、0.062 5 mg/mL 比较,差异有统计学意义(F=8.69, P=0.00),药物浓度低抑制细菌生长效果好。见表 2。

表 1 相同浓度的厚朴酚在 3 组溶剂中的抑菌效果比较(̄x±s, mm)

| 组别  | n | 1.000 0 mg/mL | 0.500 0 mg/mL | 0.250 0 mg/mL | 0.125 0 mg/mL | 0.062 5 mg/mL |
|-----|---|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| A 组 | 6 | 12.86±0.79    | 9.67±1.15     | 7.88±0.55     | 8.32±0.86     | 7.23±0.32     |
| B 组 | 4 | 9.03±0.64     | 8.55±0.37     | 8.01±0.80     | 8.60±0.54     | 7.68±0.60     |
| C 组 | 6 | 8.13±0.60     | 8.48±0.90     | 8.69±0.38     | 9.50±0.43     | 10.43±1.20    |
| F   |   | 76.965        | 3.007         | 3.402         | 5.126         | 25.533        |
| P   |   | 0.000         | 0.084         | 0.065         | 0.023         | 0.000         |

表 2 不同浓度的厚朴酚在 3 组乳化剂中的抑菌效果比较(̄x±s, mm)

| 组别  | n | 1.000 0 mg/mL | 0.500 0 mg/mL | 0.250 0 mg/mL | 0.125 0 mg/mL | 0.062 5 mg/mL |
|-----|---|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| A 组 | 6 | 12.86±0.79    | 9.67±1.15*    | 7.88±0.55*▲   | 8.33±0.86*▲   | 7.23±0.32*▲■  |
| B 组 | 4 | 9.03±0.64     | 8.55±0.37     | 8.01±0.80*    | 8.68±0.54     | 7.68±0.61*◆   |
| C 组 | 6 | 8.13±0.60■◆   | 8.48±0.90■◆   | 8.69±0.38■    | 9.50±0.43     | 10.43±1.20■   |

\*: P<0.05, 与同组 1.000 0 mg/mL 比较;▲: P<0.05, 与同组 0.500 0 mg/mL 比较;◆: P<0.05, 与同组 0.250 0 mg/mL 比较;■: P<0.05, 与同组 0.125 0 mg/mL 比较。

表 3 相同浓度厚朴酚在 3 组乳化剂中抑制细菌产酸结果的比较[M(P25, P75)]

| 厚朴酚(mg/mL) | A 组(n=6)         | B 组(n=4)         | C 组(n=6)         | χ <sup>2</sup> | P     |
|------------|------------------|------------------|------------------|----------------|-------|
| 0.062 5    | 3.51(3.46, 3.71) | 2.68(2.14, 3.20) | 0.39(0.18, 0.87) | 15.174         | 0.001 |
| 0.031 3    | 3.49(3.43, 3.56) | 1.74(1.64, 1.81) | 0.28(0.18, 0.50) | 15.158         | 0.001 |
| 0.015 7    | 3.43(3.39, 3.51) | 1.19(1.13, 1.24) | 0.29(0.11, 0.53) | 15.174         | 0.001 |

表 4 不同浓度厚朴酚在吐温 80、20 乳化剂作用下抑制细菌产酸结果的比较[M(P25,P75)]

| 乳化剂   | 0.125 0 mg/mL   | 0.062 5 mg/mL   | 0.031 3 mg/mL   | 0.015 7 mg/mL   | $\chi^2$ | <i>P</i> |
|-------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------|----------|
| 吐温 80 | 0.43(0.28,0.54) | 0.39(0.18,0.87) | 0.28(0.11,0.50) | 0.29(0.11,0.53) | 2.611    | 0.456    |
| 吐温 20 | 3.09(2.86,3.19) | 2.68(2.14,3.20) | 1.74(1.64,1.81) | 1.19(1.13,1.24) | 19.680   | 0.000    |

## 2.2 乳化剂增溶作用后药液抑制变形链球菌产酸情况

0.125 0 mg/mL 厚朴酚在 3 种乳化剂中抑制细菌产酸效果差异有统计学意义( $F=303.76, P=0.00$ )。0.062 5、0.031 3、0.015 7 mg/mL 3 个浓度梯度的厚朴酚在 3 种乳化剂中抑制细菌产酸效果差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 3。其中 A 组抑制细菌产酸效果最好,C 组抑制细菌产酸效果最差。厚朴酚 0.125 0、0.062 5、0.031 3、0.015 7 mg/mL 在聚乙二醇 400 乳化剂作用下抑制细菌产酸的 pH 值分别为 $3.57\pm 0.13$ 、 $3.57\pm 0.14$ 、 $3.50\pm 0.09$ 、 $3.44\pm 0.06$ ,差异无统计学意义( $F=1.893, P=0.163$ )。不同浓度厚朴酚在吐温 80、20 乳化剂作用下抑制细菌产酸结果的比较,见表 4。

## 3 讨 论

有研究表明,中药厚朴的有效成分厚朴酚对变形链球菌的生长、黏附及产酸有很好的抑制作用,但是由于不溶于水,影响了将其做成水剂药物。通过乳化剂的增溶作用可以增加有机物在水中的溶解度,本文将厚朴酚在 3 种乳化剂(聚乙二醇 400、吐温 20、吐温 80)的助溶作用下溶解到水中后对变形链球菌生长和产酸的影响,为厚朴酚开发成水剂药物时乳化剂的选择提供实验依据。本实验结果表明,在不同乳化剂助溶作用下,厚朴酚在相同浓度时表现出不同的抑制变形链球菌生长和产酸的能力,高浓度厚朴酚-聚乙二醇 400 抑制变形链球菌生长和产酸的能力比厚朴酚-吐温 20、厚朴酚-吐温 80 强,不同浓度的厚朴酚在聚乙二醇 400 和吐温 20 增溶作用下的药物对变形链球菌产酸有一定的抑制作用,厚朴酚在吐温 80 增溶作用下对变形链球菌产酸基本没有抑制作用。认为这种不同源于 3 种乳化剂结构上的差异引起的乳化剂和厚朴酚之间的作用力不同。

厚朴酚为烯丙基和酚羟基取代的联苯化合物,药物结构和抑菌效果关系研究表明,联苯不显示抑菌活性,厚朴酚强大的抗菌作用是由于联苯环上同时存在亲水的烯丙基和亲脂的酚羟基,因而使其黏附于变异链球菌的细胞所致<sup>[9-10]</sup>。乳化剂对厚朴酚的增溶作用是由乳化剂分子在水中形成胶束后,厚朴酚进入胶束内部而引起<sup>[11-13]</sup>,在胶束中的厚朴酚只有从胶束中扩散出来,通过亲水的烯丙基和酚羟基黏附到变形链球菌表面才能起到抑菌性。聚乙二醇 400、吐温 20、吐温 80 中亲油基和亲水基所占的比例不同,吐温 20、吐温 80、聚乙二醇 400 的亲水亲油平衡值(HLB 值)分别为 16.7、15.0、20.0<sup>[14]</sup>,可知从聚乙二醇 400、吐温 20、吐温 80,亲油基链逐渐增长。任智等<sup>[15]</sup>对表面活性剂结构与乳液稳定性关系的研究表明,随着乳化剂中亲油基长度的增加会增加分子间的侧向作用力,有利用乳液的稳定。随着亲油基链的逐渐增长形成的乳液的稳定性提高,厚朴酚从乳化剂形成的胶束中向外扩散的抑制作用依次增强,因此,聚乙二醇 400、吐温 20、吐温 80 制成的药物抑菌效果依次降低。

综上所述,在不同乳化剂增溶作用下厚朴酚抑制变形链球

菌生长及产酸效果是有差异的,在制作含厚朴酚防龋药物选择乳化剂时要考虑这一影响因素。

## 参考文献:

- [1] 周学东,岳松龄.实用龋病学[M].北京:人民卫生出版社,2008.
- [2] Namba T, Tsunozuka M, Hattori M. Dental caries prevention by traditional Chinese medicines. Part II. Potent antibacterial action of Magnoliae cortex extracts against *Streptococcus mutans*[J]. *Planta Med*, 1982, 44(2): 100-106.
- [3] Huang B, Fan M, Han D. Effect of magnolia officinalis extract on cariogenic activity of mutans streptococci[J]. *J Oral Sci Res*, 2010, 26(3): 362-365.
- [4] 冯瑾,李继遥,周学东.厚朴活性成分对致龋菌生长和产酸影响的体外研究[J].*四川大学学报:医学版*, 2007, 38(3): 456-458.
- [5] Jie X, Li HJ, Zhu XY, et al. Efficient and selective extraction of magnolol from *Magnolia officinalis* by mechanochemical extraction technique[J]. *Chem Eng Process*, 2011, 50(3): 325-330.
- [6] 蒋永红,王佩维,张高勇,等.表面活性剂增溶银杏制剂[J].*日用化学工业*, 2002, 32(2): 8-11.
- [7] 倪楠,高永良.液体制剂中难溶性药物的增溶[J].*中国新药杂志*, 2005, 14(11): 31-34.
- [8] 杨文莲,牛涛,傅春升,等.葛根素自微乳制剂的制备工艺研究[J].*中国药房*, 2012, 23(15): 1375-1377.
- [9] 王立青,江荣高,陈蕙芳.厚朴酚与和厚朴酚药理作用的研究进展[J].*中草药*, 2005, 36(10): 155-158.
- [10] Greenberg M, Dodds M, Tian M. Naturally occurring phenolic antibacterial compounds show effectiveness against oral bacteria by a quantitative structure-activity relationship study[J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(23): 11151-11156.
- [11] 许兴臣.表面活性剂的增溶作用在药物制剂中的应用[J].*天津化工*, 2000(1): 30-31.
- [12] 赵雯,张宏,卢婷利,等.水难溶性药物的载体材料研究进展[J].*材料导报*, 2010, 24(9): 67-70.
- [13] 刘春兰,许月峰.增溶剂的增溶原理及其在制剂生产中的应用[J].*中国药业*, 2008, 17(4): 13-14.
- [14] 陈红艳.药剂学[M].北京:高等教育出版社,2005.
- [15] 任智,陈志荣.表面活性剂结构与乳液稳定性之间关系研究[J].*浙江大学学报:工学版*, 2003, 37(1): 80-83.