

• 药剂与工艺 •

熊果苷磷脂复合物的制备、表征及理化性质研究

祝上宾, 王英飒, 敬凡尘, 刘润东, 何 静*, 雷建都

北京林业大学材料科学与技术学院, 北京 100083

摘要: 目的 制备熊果苷磷脂复合物 (APC) 以改善熊果苷的皮肤通透性并探讨其形成机制。方法 采用溶剂蒸发法制备 APC, 差示扫描量热法 (DSC)、X 射线衍射 (XRD)、红外光谱 (IR)、¹H 核磁共振 (¹H-NMR) 和扫描电子显微镜和透射电子显微镜用于分析 APC 的形成机制, 并对 APC 的溶解度、皮肤渗透和酪氨酸酶抑制能力进行测定。结果 分析表明磷脂和熊果苷分子之间弱的相互作用力形成了 APC; APC 中的熊果苷在正辛醇中的溶解度从 1.29 μg/mL 增加到 9.54 μg/mL, APC 的形成有效地提高了熊果苷的亲脂性; 体外释放研究中 APC 展现出持续释放行为; 体外渗透研究表明, 熊果苷难以通过皮肤到达皮下组织, 但 APC 显示出强大的渗透能力, 其渗透通量从 0.02 mg/cm² 提高到 0.42 mg/cm²; 酶活性研究中 APC 的酪氨酸酶活性的抑制效果约为熊果苷的 1.85 倍。结论 复合物的形成提高了熊果苷的生物利用度, 并且具有较高的药用和美白应用潜力。

关键词: 熊果苷; 磷脂复合物; 溶解度; 皮肤渗透; 酪氨酸酶; 抑制; 溶剂蒸发法

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)22-5698-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.22.005

Preparation, characterization and physicochemical properties of arbutin phospholipid complex

ZHU Shang-bin, WANG Ying-sa, JING Fan-chen, LIU Run-dong, HE Jing, LEI Jian-du

College of Materials Science and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: Objectives To prepare arbutin phospholipid complex (APC) to improve the skin permeability of arbutin and discuss the formation mechanism of APC. **Methods** Solvent evaporation method was used to prepare APC. The formation of APC was confirmed by differential scanning calorimetry (DSC), X-ray diffraction (XRD), infrared spectroscopy (IR), ¹H nuclear magnetic resonance (¹H-NMR), scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscope (TEM). The solubility, skin permeability and the ability to inhibit tyrosinase of APC were evaluated. **Results** The analysis showed that the weak interaction between phospholipid and arbutin molecules formed APC. The solubility of arbutin in APC in *n*-octanol increased from 1.29 μg/mL to 9.54 μg/mL, and the formation of APC effectively increased the lipophilicity of arbutin. *In vitro* release study demonstrated that APC exhibited sustained release behavior. *Ex vitro* penetration studies showed that arbutin was difficult to reach the subcutaneous tissue through the skin, but APC showed strong penetration ability, of which permeation flux was improved from 0.02 mg/cm² to 0.42 mg/cm². Enzyme inhibitory activity test showed that the inhibition of APC on tyrosinase activity was 1.85 times of arbutin. **Conclusions** The formation of the complex improved the bioavailability of arbutin, and the complex held higher application potential for medicinal and cosmetic.

Key words: arbutin; phospholipid complex; solubility; skin penetration; tyrosinase; inhibition; solvent evaporation method

熊果苷 (arbutin) 又名熊果素, 化学名为 4-羟基苯基-β-D-吡喃葡萄糖苷, 是一种天然酚类成分, 存在于多种植物中, 如岩白菜、熊果、越橘和梨等^[1-3]。熊果苷可以有效抑制酪氨酸酶的活性从而减少黑色

收稿日期: 2020-06-28

项目基金: 国家自然科学基金资助项目 (21576029); 国家重点研发计划项目 (2017YFF0207804)

作者简介: 祝上宾 (1996—), 男, 硕士研究生, 研究方向为天然产物开发与利用。E-mail: 13220813534@163.com

*通信作者 何 静。E-mail: hejing2008@sina.com

素的产生,且几乎没有毒性和副作用^[4]。此外,熊果苷还具有抗氧化^[5]、抗微生物^[6]和抗炎^[7]等药理活性。因此,熊果苷广泛使用于化妆及医疗领域^[8]。然而,熊果苷分子中存在多个可与水分子形成氢键的羟基,使其具有高度亲水性,从而难以穿过皮肤表皮层到达黑素细胞的位置发挥作用^[9-10]。为了克服这些挑战,目前已经开发了多种制剂用来提高熊果苷的生物利用度,如脂质体、聚合物纳米颗粒、水凝胶、酰化、接枝共聚物等^[11-14]。

近年来磷脂复合技术因其能够有效改善药物的生物利用度而广泛关注。磷脂是细胞膜的主要成分,具有毒性低、生物相容性好等特点,可以通过细胞膜和细胞质而不会干扰细胞的正常生理活动^[15-16]。有研究表明,磷脂与药物相结合可以增加药物的稳定性、通透性和药理活性,且磷脂与亲水性和疏水性药物均有良好的相容性^[17-18]。这种两亲性的复合物可以改善药物的生物利用度,并促进药物在体内的传递和细胞对药物的吸收。

本实验通过溶剂蒸发法制备了熊果苷磷脂复合物(arbutin phospholipid complex, APC)以改善熊果苷的脂溶性,探究其形成机制,并对复合物的溶解度、体外释放能力、透皮渗透能力和酪氨酸酶抑制能力进行了测定。

1 材料与试剂

1.1 仪器

SHJ-1A 型水浴恒温磁力搅拌器,金坛市美特仪器制造有限公司; ATX124 型分析天平,日本岛津公司; LC3000 型高效液相色谱仪,北京创新通恒科技有限公司; RE-2000A 型旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂; DSC 204 型差示扫描热量仪,德国 NETZSCH 公司; Nicolet-6700 型傅里叶变换红外光谱仪,美国赛默飞世尔科技公司; Bruker Avance III 型 600MHz 核磁共振波谱仪, D8 Advance X 射线衍射仪,德国 Bruker 公司; JSM-b700F 扫描电子显微镜, JEM-100CXa 透射电子显微镜,日本电子公司。

1.2 材料

熊果苷对照品,批号 JOT-10092,质量分数≥98%,成都普菲德生物技术有限公司;大豆卵磷脂,批号 T09J9F52288,质量分数>98%,上海麦克林生物化学有限公司;蘑菇酪氨酸酶,酶活力 500 U/mg,批号 S05J10G78351,上海源叶生物技术有限公司;色谱级甲醇,上海麦克林生物化学有限公司;所有其他化学品均为分析纯。

1.3 动物

仔猪的腹部皮肤(6~8 周)由北京实创世纪小型猪养殖基地提供,动物许可证号 SCXK(京)2018-0011。

2 方法与结果

2.1 复合物的制备

采用溶剂蒸发法制备 APC。将一定质量比的熊果苷和大豆卵磷脂溶解在无水乙醇中,在恒温磁力搅拌器中搅拌 1 h。然后再旋转蒸发反应溶剂。将产物溶于二氯甲烷中并滤过以分离游离的熊果苷。除去二氯甲烷以获得复合物,并在室温下保存。通过公式复合率=($W_0 - W_1$)/ W_0 (W_0 为熊果苷的初始投入质量、 W_1 为未反应熊果苷的质量)计算复合率。

以复合率为指标,通过对反应溶剂、复合时间、复合温度、质量比、药物浓度进行单因素实验考察以优化 APC 制备工艺。在反应溶剂为乙醇,复合时间 1 h、复合温度 40 °C、熊果苷与磷脂的质量比为 1:3、药物质量浓度 0.5 g/mL 的条件下,熊果苷和磷脂的复合率最高。按照以上优化的条件制备复合物 3 次,测得平均复合率为(94.00±1.72)%。

2.2 熊果苷含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Phenomenex C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-水溶液(10:90);柱温 30 °C;检测波长 283 nm;进样量 10 μL;体积流量 1.0 mL/min。HPLC 图见图 1。

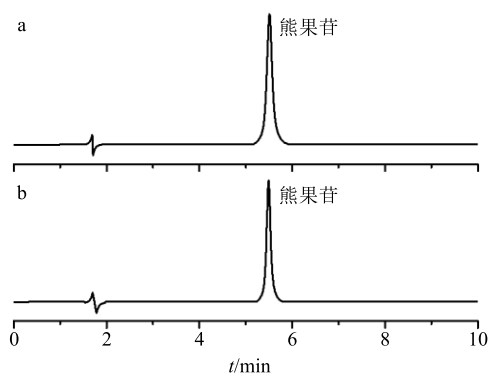


图 1 熊果苷对照品(a)及供试品(b)的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of arbutin reference (a) and sample (b)

2.2.2 对照品溶液的制备 精准称取 1 mg 熊果苷对照品于烧杯中,加入 10 mL 甲醇溶解,作为 100 μg/mL 的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 精准称取 3 mg APC 于烧杯中,加入 10 mL 甲醇溶解,溶液经 0.45 μm 过滤头滤过,作为供试品溶液。

2.2.4 线性关系考察 将对照品溶液用甲醇稀释为

质量浓度分别为 1、2、5、10、20 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液，通过 HPLC 进行测定。以峰面积为纵坐标 (Y)，熊果苷质量浓度为横坐标 (X) 进行线性回归，得回归方程为 $Y=8\,400.9X+22\,172$ ， $r=0.999\,7$ 。

2.2.5 精密度实验 取对照品溶液，在“2.2.1”项色谱条件下进行 HPLC 测定，连续进样 6 次。经计算 RSD 小于 3%。结果表明，仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验 取供试品溶液，在“2.2.1”项色谱条件下进行 HPLC 测定，每隔 2 h 测定 1 次，共测定 6 次。经计算 RSD 小于 3%。结果表明，本分析方法重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 取供试品溶液，分别于 0、2、4、6、8、10 h 进样，经 HPLC 测得峰面积，经计算其 RSD 为 2.13%，表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

2.2.8 加样回收率试验 取供试品溶液 1 mL 9 份，分别加入低、中、高 3 种质量浓度 (50、100、150 $\mu\text{g/mL}$) 的熊果苷对照品溶液，每种质量浓度配制 3 份。通过 HPLC 测定峰面积，通过回归曲线计算熊果苷的含量，计算加样回收率。结果表明熊果苷的平均加样回收率为 97.32%，RSD 值为 1.26%，表明该测定方法准确度较高。

2.3 APC 的特征

2.3.1 差示扫描量热 (DSC) 法分析 使用差示扫描量热仪记录熊果苷、磷脂、APC 及其物理混合物 (PM) 的热分析图。将样品置于铝锅中并密封，在氮气气氛下，以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率在 20~350 $^{\circ}\text{C}$ 下分析样品。图 2 显示了熊果苷、磷脂、PM 和 APC 的 DSC 曲线。熊果苷的 DSC 曲线在 200.13 $^{\circ}\text{C}$ 显示出陡峭的熔融峰，表明熊果苷为结晶状态且熊果苷

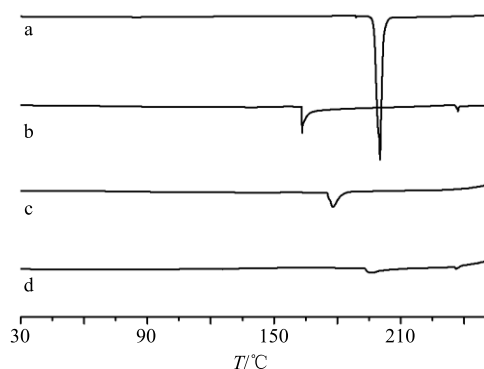


图 2 熊果苷 (a)、磷脂 (b)、PM (c) 和 APC (d) 的 DSC 曲线

Fig. 2 DSC curves of arbutin (a), phospholipid (b), PM (c) and APC (d)

晶体在高温下发生形态转变。磷脂在 163.26 $^{\circ}\text{C}$ 处出现的吸热峰是由于磷脂从胶态转变为液态所致。PM 的 DSC 热谱图在 177.41 $^{\circ}\text{C}$ 处的吸热峰相较于熊果苷向较低温度略有偏移，其原因可能是当温度升高到一定程度时，熊果苷在较高的温度下溶解在熔融的磷脂中并部分形成复合物。APC 中的熊果苷和磷脂的吸热峰均已消失，这表明熊果苷均匀地分散在复合物中，而熊果苷失去了原有的结晶性，这可能是由于复合物中存在弱分子力引起的。

2.3.2 X 射线衍射 (XRD) 分析 使用 X 射线衍射仪检测熊果苷、磷脂、PM 和 APC 的物理状态。单色器为 Cu-K α ，X 射线管的工作条件为电压 30 kV，电流 30 mA。在 5 $^{\circ}$ ~50 $^{\circ}$ 的衍射角范围内以 1.5 $^{\circ}/\text{min}$ 的速率进行数据采集。熊果苷、磷脂、PM 和 APC 的 XRD 图谱如图 3 所示。熊果苷的衍射图在 7.3 $^{\circ}$ 、8.7 $^{\circ}$ 、13.1 $^{\circ}$ 、16.5 $^{\circ}$ 、22.2 $^{\circ}$ 处显示出强烈的衍射峰，这表明了熊果苷的高度结晶结构。相反，在磷脂中没有发现明显的结晶峰，表明磷脂结构为非晶态。PM 的 XRD 图谱中所出现的峰主要为熊果苷的结晶峰，但峰强度明显降低。与 PM 相比，复合物中熊果苷的结晶峰消失，这表明了熊果苷的晶体结构发生了显著变化。XRD 结果证实了复合物的形成及熊果苷以无定形结构分散在复合物中。

2.3.3 红外吸收光谱 (IR) 分析 将每种样品和 KBr 粉末按 1:100 的比例研磨并压成圆盘，使用傅立叶变换红外光谱仪来记录熊果苷、磷脂、PM 和 APC 的 IR。光谱的波数范围为 400~4 000 cm^{-1} 。图 4 显示了熊果苷、磷脂、PM 和 APC 的 IR。熊果苷、磷脂、PM 和 APC 的特征峰主要集中在 700~3 500

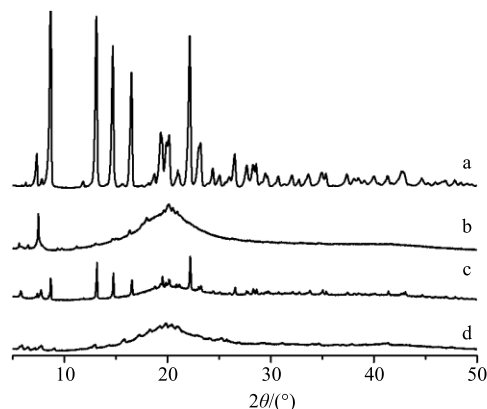


图 3 熊果苷 (a)、磷脂 (b)、PM (c) 和 APC (d) 的 XRD 衍射图

Fig. 3 XRD images of arbutin (a), phospholipid (b), PM (c) and APC (d)

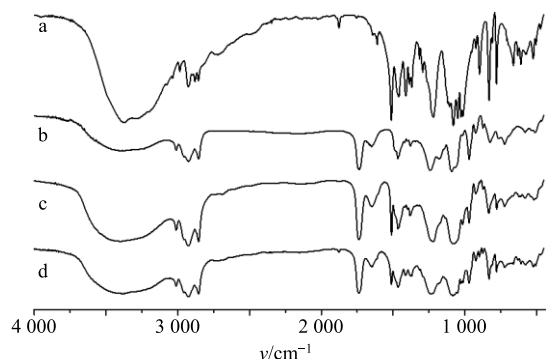


图 4 熊果苷 (a)、磷脂 (b)、PM (c) 和 APC (d) 的 FTIR 光谱

Fig. 4 FTIR spectra of arbutin (a), phospholipid (b), PM (c) and APC (d)

cm^{-1} 区域。熊果苷的主要特征吸收峰为羟基和苯环骨架的拉伸振动。磷脂中含有较强的氢键，从而羟基吸收峰表现出强吸收和低波数的特征。PM 的红外吸收没有明显变化，其红外吸收峰多数为熊果苷和磷脂的特征峰的叠加，其中熊果苷的羟基峰 ($3\,375\text{ cm}^{-1}$) 和磷脂的羟基峰 ($3\,390\text{ cm}^{-1}$) 在 $3\,379\text{ cm}^{-1}$ 处形成了 1 个宽阔的羟基峰。在 APC 的红外光谱中，熊果苷与磷脂之间形成了新的氢键，且氢键缔合度弱于磷脂，因此羟基峰的强度降低，羟基峰向高波数方向移动 (从 $3\,375\text{ cm}^{-1}$ 至 $3\,401\text{ cm}^{-1}$)。此外，磷脂中羰基的特征峰向低波数方向移动 (从 $1\,739\text{ cm}^{-1}$ 至 $1\,738\text{ cm}^{-1}$)，这表明熊果苷分子中的苯环共轭骨架结构与磷脂的极性末端以非共价键相互作用。与熊果苷相比，复合物在指纹区域 ($700\sim 900\text{ cm}^{-1}$) 的弯曲振动也发生了变化。以上结果表明 APC 中没有形成新的化学键。

2.3.4 ^1H 核磁共振 ($^1\text{H-NMR}$) 分析 将熊果苷、磷脂、PM 和 APC 溶解在氘代二甲基亚砜中。使用光谱仪记录熊果苷、磷脂、PM 和 APC 的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱。图 5 显示了熊果苷、磷脂、PM 和 APC 的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱，a 为熊果苷分子中的酚羟基质子；b、c 为熊果苷分子中苯环上的质子 (A_2B_2 系统)；d、e、f 为熊果苷分子中葡萄糖残基 1、2、3 碳位上的羟基质子；g 为磷脂分子中的端甲基质子。在 PM 中，其信号峰为熊果苷和磷脂的信号峰的叠加，每个峰的化学位移没有明显变化。APC 光谱中的多数熊果苷信号峰强度可被检测到，并且可以检测到 APC 中磷脂端甲基质子的信号。磷脂分子中端甲基质子 $\delta\,3.33$ 处信号峰在复合物中移至 $\delta\,3.12$ 处的高电场，但混合物中没有变化。熊果苷分子中苯酚质

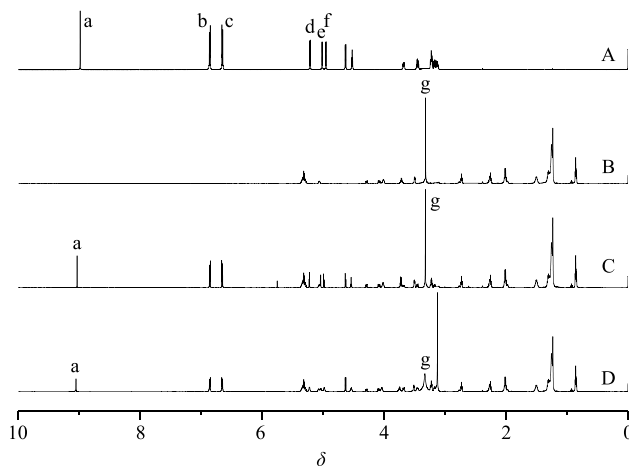


图 5 熊果苷 (A)、磷脂 (B)、PM (C) 和 APC (D) 的 $^1\text{H-NMR}$ 光谱

Fig. 5 $^1\text{H-NMR}$ spectra of arbutin (A), phospholipid (B), PM (C) and APC (D)

子 $\delta\,8.99$ 处的信号峰在复合物中移至 $\delta\,9.05$ 处。以上结果表明，熊果苷和磷脂的极性末端之间存在弱的分子间相互作用。此外， $^1\text{H-NMR}$ 研究的结果与 IR、DSC 和 XRD 分析的结果几乎相同。

2.3.5 扫描电子显微镜 (SEM) 和透射电子显微镜 (TEM) 观察 将 1 滴 APC 悬浮液滴于铝箔表面上，在室温下自然干燥。通过使用离子溅射仪对样品表面进行溅射涂布。使用 SEM 观察熊果苷、磷脂、PM 和 APC 的表面形态。将 1 滴 APC 悬浮液滴在铜网上，用滤纸吸收多余的水分。风干后使用 TEM 观察 APC 颗粒的形态特征。

图 6 展示出了熊果苷、磷脂、PM 和 APC 的表面形态。在 SEM 图中熊果苷呈棒状晶体结构，磷脂呈非晶态。可见熊果苷被磷脂均匀地分散和包裹在 PM 图中，但仍然保留了晶体结构。复合物显示出光滑的表面并且没有晶体结构，这表明熊果苷晶体结构已经改变并高度分散在磷脂中。熊果苷和磷脂可能在电荷转移，氢键和范德华力的作用下形成了复合物。TEM 图像显示分散在水中的 APC 为均匀的球形，平均直径约为 150 nm 。

2.4 溶解度研究

将过量的熊果苷和 APC 分别添加到 10 mL 的蒸馏水和正辛醇中，在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 的摇床上以 100 r/min 的速度恒温振荡 24 h 。24 h 后，将样品以 $15\,000\text{ r/min}$ 的转速离心 15 min 去除未溶解的熊果苷和 APC。使用 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 的膜滤器滤过上清液。用甲醇适当稀释上清液，通过 HPLC 方法测定熊果苷的含量。表 1 显示了熊果苷和 APC 在水和正辛醇中的溶

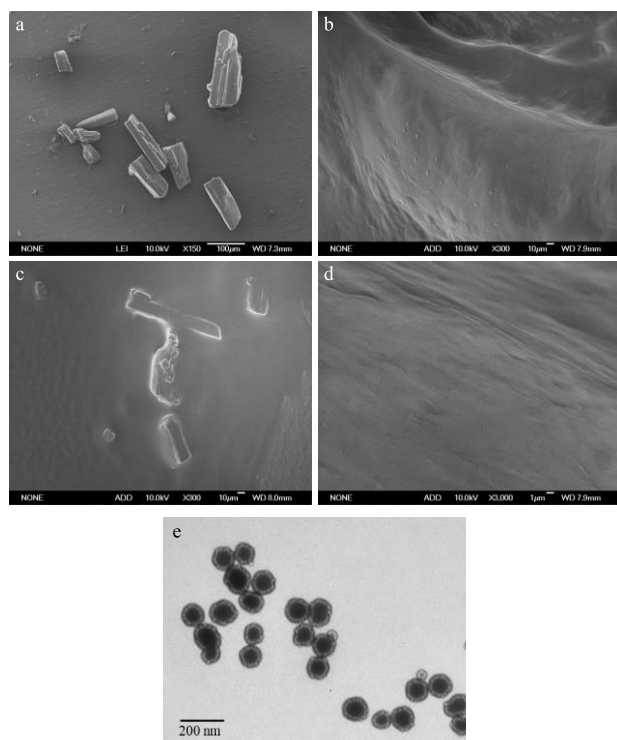


图 6 熊果苷 (a)、磷脂 (b)、PM (c) 和 APC (d) 的 SEM 图像及 APC 的 TEM 图像 (e)

Fig. 6 SEM images of arbutin (a), phospholipid (b), PM (c) and APC (d), and TEM images of APC (e)

表 1 熊果苷和 APC 的溶解度 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Solubility of arbutin and APC ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	溶解度/(mg·mL ⁻¹)	
	水	正辛醇
熊果苷	153.84 ± 4.46	1.29 ± 0.21
APC	27.47 ± 1.03	9.54 ± 0.35

解度。熊果苷在正辛醇中的溶解度为 1.29 mg/mL，而 APC 在正辛醇中的溶解度为 9.54 mg/mL。与熊果苷相比，APC 的溶解度有明显提高，这表明了复合物的形成显著改善了熊果苷的脂溶性。

2.5 体外释放研究

将熊果苷溶液和 APC 悬浮液添加到透析袋中，并用夹子将袋两端的开口密封。透析袋中分别包含 10 mg 的熊果苷和相当于 10 mg 熊果苷的复合物，浸入装有 100 mL pH 7.4 磷酸盐缓冲液的锥形瓶中。将转子添加至到锥形瓶，在室温下以 100 r/min 的速率搅拌。分别在 0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、6、8、12 h 时取出 1 mL 的接收溶液并加入等量的 PBS。使用 HPLC 分析溶解介质中熊果苷的质量浓度。熊果苷的释放率通过公式释放率 = W_1/W_0 (其中 W_0 是熊果苷的初始量，而 W_1 是释放的熊果苷的

量) 计算。

熊果苷和 APC 的体外释放曲线如图 7 所示。整个释放过程可分为 2 个阶段，快速释放阶段和持续释放阶段。在初始阶段，熊果苷和复合物的释放速度较快，最初的 2 h 内大约 100% 的熊果苷及 61.24% 的复合物释放到了溶液中。在第 2 阶段，复合物表现出持续释放行为，在 12 h 内释放了大约 12%。原因可能是熊果苷分子结构上的部分羟基参与了复合物的形成，亲水性羟基数量的减少使得熊果苷的亲水性降低，亲脂性增加。

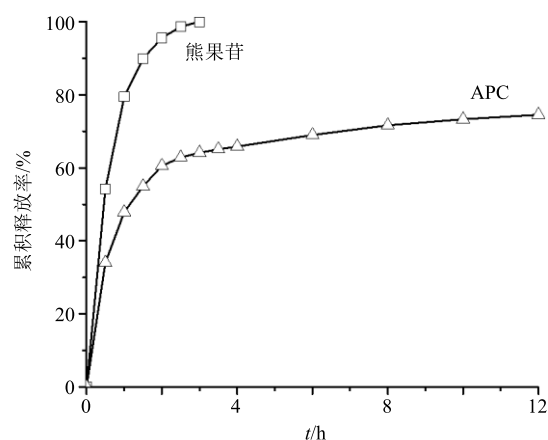


图 7 熊果苷和 APC 的体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 In vitro release profile of arbutin and APC ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.6 离体经皮渗透和保留研究

2.6.1 离体皮肤制备 猪腹部的皮肤用于当前研究。用剃刀小心地去除毛发，避免造成任何皮肤损伤，使用镊子去除皮肤下的结缔组织和脂肪。将处理过的皮肤样本保存在低温环境中，并在一周内使用。

2.6.2 经皮渗透实验 立式 Franz 型扩散池用于皮肤渗透研究。扩散池的受体室可容纳 7 mL 液体，供体室底部的扩散面积为 1.13 cm²，皮肤安装在受体和供体室之间，皮肤的表皮层在供体室一侧。将 3 mg 熊果苷溶液和相当于 3 mg 熊果苷的 APC 复合物的悬浮液加入到供体室中，并且在接收室中填充 pH 7.4 的 PBS 缓冲液并以 300 r/min 的速度搅拌，实验保持在 37 °C。分别在 1、2、3、4、5、6、7、8、12 h 时取出 10 μL 接收溶液，并将等量的 PBS 添加至受体室中，计算接收室中熊果苷的量。

2.6.3 皮肤保留研究 经皮渗透实验结束后，取下皮肤，洗净皮肤表面残留的药物，剪下扩散区域的皮肤并切成小块置于烧杯中，加入适量甲醇，恒温

震荡 12 h, 离心后取上清液经过滤器过滤, 使用 HPLC 分析熊果苷的含量, 并使用公式沉积率 = W_1/W_0 (其中 W_0 是熊果苷的初始量, 而 W_1 是熊果苷在皮肤上沉积的量) 计算熊果苷的皮肤沉积率。

离体经皮渗透和保留研究结果如图 8 所示, 在 12 h 后, 游离熊果苷和复合物中的熊果苷累积渗透量分别为 0.02、0.42 mg/cm²。游离熊果苷和复合物中的熊果苷皮肤保留率分别为 18.16%、31.89%。复合物中熊果苷的累积透皮量和皮肤保留率分别为游离熊果苷的 23.5、1.75 倍。这些结果清楚地表明, 熊果苷与磷脂形成的复合物显著改善了熊果苷的亲脂性, 并有效提升了药物在皮肤中的累积渗透量和保留率。

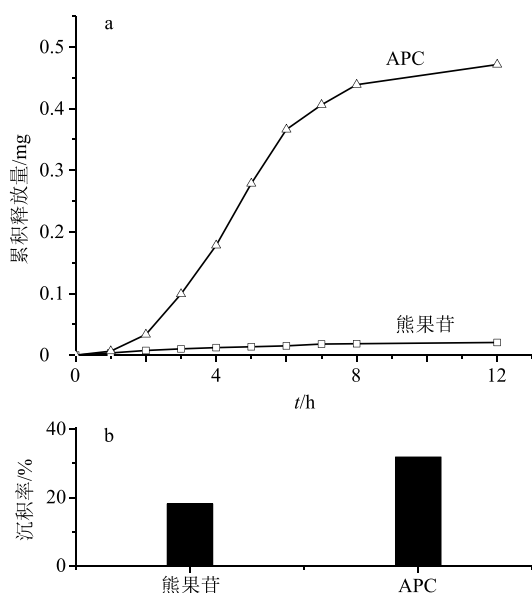


图 8 熊果苷和 APC 的经皮渗透曲线 (a) 以及 12 h 后皮肤中的沉积率 (b) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Percutaneous penetration curve of arbutin and APC (a) and percentage of arbutin deposited in skin after 12 h (b) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.7 测定酪氨酸酶活性的抑制作用

L-酪氨酸 (*L*-Tyr) 作为测试酪氨酸酶活性的底物。反应系统是 3 mL Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液 (50 mmol/L), 其中包含 0.5 mmol/L *L*-Tyr 和 0.1 mL 不同浓度的抑制剂。首先, 将反应系统在 30 °C 下保存 10 min, 然后将 0.1 mL 酪氨酸酶水溶液添加到系统中。系统中酪氨酸酶的浓度为 222.66 U/mL。最后, 在 30 °C 下 475 nm 处观察系统的吸光度 (A) 10 min。按照公式酪氨酸酶活性 = A_1/A_0 (其中 A_1 是 10 min 后有抑制剂的 A , 而 A_0 是 10 min 后没有抑制剂的 A) 计算酶活性。

滞后期是单酚酶的显著特征。在滞后期后, 单酚酶氧化 *L*-Tyr 达到稳定速率, 通过将曲线外推到横坐标来估算。当使用抑制剂时, 稳态速率和滞后期时间会受到影响。图 9-a 显示该复合物有效延长了滞后期时间并降低了稳态速率。

使用熊果苷和复合物作为抑制剂, 研究了它们对酪氨酸酶催化 *L*-Tyr 产生有色物质的抑制作用。结果表明, 熊果苷和复合物均可有效抑制酪氨酸酶的活性。当质量浓度低于 0.2 mg/mL 时, 复合物显示出比熊果苷更高的抑制酪氨酸酶活性的能力。当药物质量浓度超过 0.2 mg/mL 时, 熊果苷和复合物的酪氨酸酶抑制作用几乎相同 (图 9-b)。结果表明, 与熊果苷相比, 熊果苷与磷脂结合形成的复合物具有更好的酪氨酸酶抑制作用。

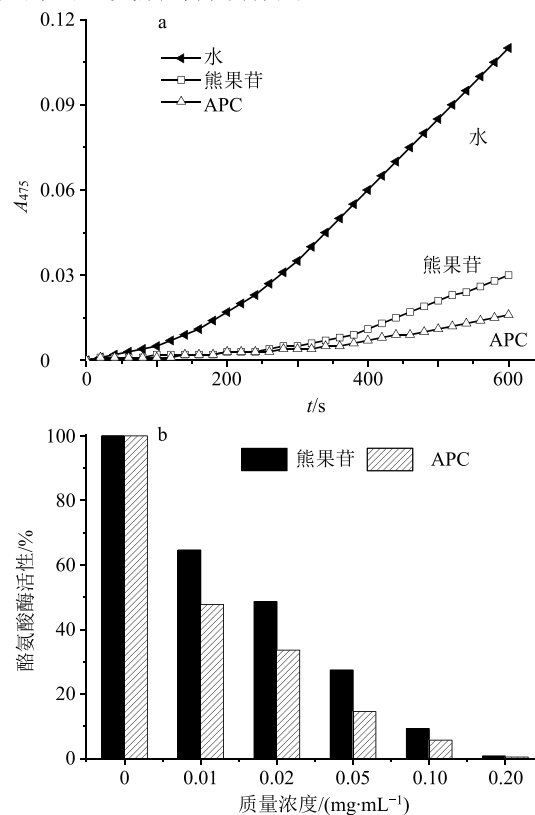


图 9 酪氨酸酶氧化 *L*-Tyr 的过程曲线 (a)、熊果苷和 APC 对酪氨酸酶活性的影响 (b) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Progress curves for oxidation of *L*-Tyr by tyrosinase (a), effect of arbutin and APC on tyrosinase activity (b) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3 讨论

有机溶剂环境中的磷脂, 在电荷迁移、范德华力、氢键等作用力下容易实现与药物成分的复合, 形成两亲性的复合物, 改善其生物利用度。在本研究中, 通过溶剂蒸发法制备磷脂复合物, 操作较为

简便,以复合率为指标,通过单因素试验优化了复合物的制备工艺,在最佳制备工艺条件下,复合率可达 94%。采用 DSC、XRD、IR、¹H-NMR 等对 APC 进行表征并确认了形成机制,其结果表明复合物中并未有新的化学键生成,其形成是由于熊果苷分子与磷脂的极性末端存在弱的分子间作用力所致。此外,磷脂复合物增加了熊果苷的脂溶性,改变了熊果苷体外快速释放的特性。离体渗透试验表明,复合物显著提高了熊果苷的透皮能力且皮肤渗透速率约为游离熊果苷的 23.5 倍。在酶抑制实验中,相较于熊果苷,APC 在低浓度范围内表现出更高的酪氨酸酶抑制活性。

熊果苷广泛存在于梨叶、梨果皮、蓝莓果渣等废弃物中,且含量较高。除良好的美白效果外,还具有抗菌、抗炎、镇咳等特性,药用价值较大。本研究对于农林废弃物有效实现资源再次开发利用更有意义。熊果苷与磷脂所形成的复合物有效改善了熊果苷的透皮吸收能力,生理活性也有一定的增强。后续研究将对药理活性及药物动力学特征等进行评价,为熊果苷的进一步开发利用提供理论基础。

参考文献

- [1] Saleem A, Harris C S, Asim M, *et al.* A RP-HPLC-DAD-APCI/MSD method for the characterisation of medicinal Ericaceae used by the Eeyou Istchee Cree First Nations [J]. *Phytochem Anal*, 2010, 21(4): 328-339.
- [2] Pop C, Vlase L, Tamas M. Natural resources containing arbutin. Determination of arbutin in the leaves of *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch. acclimated in Romania [J]. *Not Bot Horti Agrobot Cluj-Na*, 2009, 37(1): 129-132.
- [3] Cho J Y, Park K Y, Lee K H, *et al.* Recovery of arbutin in high purity from fruit peels of pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2011, 20(3): 801-807.
- [4] Zhu X T, Tian Y Q, Zhang W L, *et al.* Recent progress on biological production of α -arbutin [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(19): 8145-8152.
- [5] Shahaboddin M E, Pouramir M, Moghadamnia A A, *et al.* *Pyrus brossieriana* Buhse leaf extract: An antioxidant, antihyperglycaemic and antihyperlipidemic agent [J]. *Food Chem*, 2011, 126(4): 1730-1733.
- [6] Geetha R V, Anitha R, Lakshmi T. Nature's weapon against urinary tract infections [J]. *Int J Drug Dev Res*, 2011, 3(3): 85-100.
- [7] Lee H J, Kim K W. Anti-inflammatory effects of arbutin in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells [J]. *Inflamm Res*, 2012, 61(8): 817-825.
- [8] Shen X L, Wang J, Wang J, *et al.* High-level *De novo* biosynthesis of arbutin in engineered *Escherichia coli* [J]. *Metab Eng*, 2017, 42: 52-58.
- [9] Yang R L, Li N, Li R F, *et al.* A highly regioselective route to arbutin esters by immobilized lipase from *Penicillium expansum* [J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101(1): 1-5.
- [10] Liao A H, Ma W C, Wang C H, *et al.* Penetration depth, concentration and efficiency of transdermal α -arbutin delivery after ultrasound treatment with albumin-shelled microbubbles in mice [J]. *Drug Deliv*, 2014, 23(7): 2173-2182.
- [11] Wen A H, Choi M K, Kim D D. Formulation of Liposome for topical delivery of arbutin [J]. *Arch Pharmacol Res*, 2006, 29(12): 1187-1192.
- [12] Ayumi N S, Sahudin S, Hussain Z, *et al.* Polymeric nanoparticles for topical delivery of alpha and beta arbutin: Preparation and characterization [J]. *Drug Delivery Transl Res*, 2018, 9(4): 1-15.
- [13] Song J E, Lim S, Kim D H, *et al.* Controlling molecular orientations of hydrogels in oil-drug@hydrogel particle delivery systems for pH-selective/sustained release and stabilization of bioactive drugs [J]. *Colloids Surf A*, 2016, 490: 49-58.
- [14] Zheng L, Xie X, Wang Z, *et al.* Fabrication of a nano-biocatalyst for regioselective acylation of arbutin [J]. *Green Chem Lett Rev*, 2018, 11(2): 55-61.
- [15] Kalita B, Das M K. Rutin-phospholipid complex in polymer matrix for long-term delivery of rutin via skin for the treatment of inflammatory diseases [J]. *Artif Cell Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(sup1): 41-56.
- [16] Guo B, Liu H, Li Y, *et al.* Application of phospholipid complex technique to improve the dissolution and pharmacokinetic of probucol by solvent-evaporation and co-grinding methods [J]. *Int J Pharm*, 2014, 474(1/2): 50-56.
- [17] Ma H, Chen H, Sun L, *et al.* Improving permeability and oral absorption of mangiferin by phospholipid complexation [J]. *Fitoterapia*, 2014, 93(Complete): 54-61.
- [18] Dora C P, Kushwah V, Katiyar S S, *et al.* Improved metabolic stability and therapeutic efficacy of a novel molecular gemcitabine phospholipid complex [J]. *Int J Pharm*, 2017, 530(1): 113-127.