

白藜芦醇的光稳定性和热稳定性研究

史先敏^{1,2}, 严泽民², 谢静红², 周华锋², 何宏轩³, 段明星¹

(1. 清华大学 生命科学学院 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100084;

2. 江苏隆力奇生物科技股份有限公司 研发中心, 江苏 常熟 215555; 3. 中国科学院 动物研究所, 北京 100101)

摘要: 采用分光光度法和高效液相色谱法(HPLC)对不同环境条件下的白藜芦醇的稳定性进行了研究,并对不同环境条件处理后的样品进行了清除二苯代苦味酰基自由基活性和抑制酪氨酸酶活性的研究。结果表明,反式白藜芦醇具有光不稳定和热不稳定性,在光照和/或加热下有部分转变为顺式白藜芦醇。样品光照0.5 h后,306 nm处吸光度值下降52%;60 °C条件下放置60 h后,306 nm处吸光度值下降32%。未经光照的新配制的白藜芦醇溶液对单酚酶和双酚酶的抑制率为零,而光照36 h的白藜芦醇溶液对单酚酶和双酚酶的抑制率分别达到30.74%和19.42%,并且其自由基清除率比新配制的样品增强了约300%。

关键词: 化妆品添加剂; 白藜芦醇; 光稳定性; 热稳定性; DPPH 自由基; 酪氨酸酶

中图分类号: TQ658.2 文献标识码: A 文章编号: 1001-1803(2011)03-0204-04

Study of photo-stability and thermo-stability of resveratrol

SHI Xian-min^{1,2}, YAN Ze-min², XIE Jing-hong², ZHOU Hua-feng², HE Hong-xuan³, DUAN Ming-xing¹

(1. State Key Laboratory of Biomembrane and Biotechnology, School of Life Sciences, Tsinghua University,

Beijing 100084, China; 2. Jiangsu Longliqi Group Co., Ltd., Changshu, Jiangsu 215555, China;

3. Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: The photo-stability and thermo-stability of resveratrol were investigated using ultraviolet-visible spectrophotometry and high performance liquid chromatography. Meanwhile the activities for scavenging 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical (DPPH·) and inhibiting rate to mushroom tyrosinase of the resveratrol after being treated by sun exposure and heating in water were also studied. The results indicated that trans-resveratrol is unstable under sun exposure and heating. It changes partly to cis-resveratrol under the action of sun light and/or heating. The absorbance of 306 nm decreases 52% after sun exposure for 0.5 h and decreases 32% after heating for 60 h at 60 °C. Under sun exposure for 36 h, the scavenging capacity for DPPH· of resveratrol solution increases 300% as comparing with the original resveratrol solution; and the inhibition rate to phenolase and catecholase of the resveratrol solution after sun exposure achieves 30.74% and 19.42% respectively, while that of the original resveratrol solution before sun exposure is zero.

Key words: additive of cosmetics; resveratrol; photo-stability; thermo-stability; DPPH·; tyrosinase

白藜芦醇(3,5,4'-三羟基二苯乙烯)是一种含有芪类结构的非黄酮类多酚化合物,具有捕获自由基、抗氧化、吸收紫外线的特性,可促进胶原蛋白的分泌,促进超氧化物歧化酶的活性,在化妆品方面具有很好的应用价值^[1]。目前对白藜芦醇的研究主要集中在药品和保健食品领域^[2-4],国内外还没有研究其在化妆品中应用时稳定性的报道。

作者采用分光光度法和高效液相色谱法对不同环境条件下白藜芦醇的稳定性进行了研究,并对不同环

境条件处理后的样品进行了清除二苯代苦味酰基自由基(DPPH·)活性和抑制酪氨酸酶活性的研究,以此来评价白藜芦醇是否适合作为功效添加成分加入到化妆品配方中。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、酪氨酸

收稿日期: 2011-01-21; 修回日期: 2011-04-08

作者简介: 史先敏(1982-),女,博士,电话:(0516)52991250, E-mail: shixianmin80@yahoo.com.cn。

酶(比活力为 5 370 U/mg)和二甲亚砜(DMSO) Sigma 公司; *L*-3,4-二羟基苯氨酸(*L*-DOPA)和 *L*-酪氨酸(Tyr) Aldrich 公司;白藜芦醇原料,市售;甲醇,色谱纯,天津市大茂化学试剂厂;水为蒸馏水;其他试剂为国产分析纯。Shimadzu LC-10AT 高效液相色谱仪和 SPD-10A 紫外检测器,日本岛津公司;UV759 紫外-可见分光光度计,上海精密科学仪器有限公司;数显控温水浴锅,上海浦东新区电理仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 光稳定性实验

精确称量 10 mg 白藜芦醇样品,以无水乙醇溶解并定容于 10 mL 容量瓶中,然后稀释 100 倍,获得质量浓度为 10 μ g/mL 的样品溶液;取新配制的 10 μ g/mL 的白藜芦醇样品,放置到 100 mL 的容量瓶中,太阳光照射,不同时间点取样测定吸光度,检测波长 306 nm,光照 36 h 的样品进行 HPLC 分析,对不同时间点留样进行 DPPH 自由基清除实验和酪氨酸酶抑制实验。

1.2.2 热稳定性实验

取新配制的 10 μ g/mL 的白藜芦醇样品溶液,分装到 5 个 25 mL 棕色容量瓶中,分别放置在 -20 $^{\circ}$ C, 31 $^{\circ}$ C 和 60 $^{\circ}$ C 的条件下进行热稳定性实验。对不同温度下放置的样品每隔一定时间取样,进行吸光度测定,检测波长 306 nm,60 h 后进行 HPLC 分析。对不同温度下的样品进行 DPPH 自由基清除实验和酪氨酸酶抑制实验。

1.2.3 色谱条件

色谱柱为 Shimadzu ODS C_{18} 柱(4.6 mm \times 150 mm 5 μ m),流动相为甲醇-0.05% (体积分数)磷酸水溶液(体积比为 50:50),等度洗脱,检测波长 306 nm,流速 1 mL/min,进样量 10 μ L,柱温为 25 $^{\circ}$ C。

1.2.4 DPPH 自由基清除实验

取 10 μ g/mL 的样品溶液 2 mL 和 100 μ mol/L 的 DPPH 溶液 2 mL,先后加入同一具塞试管中,摇匀,25 $^{\circ}$ C 静置 30 min,于 517 nm 波长下测定样品吸光度,按式(1)计算清除率。

$$\text{清除率} = [1 - (A_i - A_j) / A_c] \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中 A_i 为 2 mL DPPH 溶液 + 2 mL 样品溶液的吸光度; A_j 为 2 mL 样品溶液 + 2 mL 无水乙醇的吸光度; A_c 为 2 mL DPPH 溶液 + 2 mL 无水乙醇的吸光度。

1.2.5 酪氨酸酶抑制实验

取 0.1 mL 的白藜芦醇样品溶液和 2.8 mL 预先在 30 $^{\circ}$ C 恒温水浴中保温的底物(*L*-DOPA 或 *L*-酪氨酸)溶液先后加入试管中,混匀,然后加入 0.1 mL 的 600 U/mL 酪氨酸酶溶液,充分混匀,置 30 $^{\circ}$ C 水浴反应

10 min,即刻使用分光光度计,于 475 nm 处测定多巴色素的吸光度。根据测定的吸光度,按式(2)计算样品对酪氨酸酶活性的抑制率。

$$\text{抑制率} = [1 - (T_1 - T_2) / (C_1 - C_2)] \times 100\% \quad (2)$$

式(2)中 C_1 为未加白藜芦醇溶液加酶的混合物的吸光度; C_2 为未加白藜芦醇溶液也未加酶的混合物的吸光度; T_1 为加入白藜芦醇溶液和酶的混合物的吸光度; T_2 为加入白藜芦醇溶液未加酶的混合物的吸光度。

2 结果与讨论

2.1 白藜芦醇的光稳定性研究

图 1 为白藜芦醇吸光度随太阳光照射时间的变化曲线。从图 1 可知,白藜芦醇对光照非常敏感,光照 0.5 h,吸光度迅速下降 52%,0.5 h 直到 36 h 白藜芦醇的吸光度下降很小,说明光照对白藜芦醇的影响是一个快速的过程,0.5 h 内光照带来的变化基本就达到平衡。

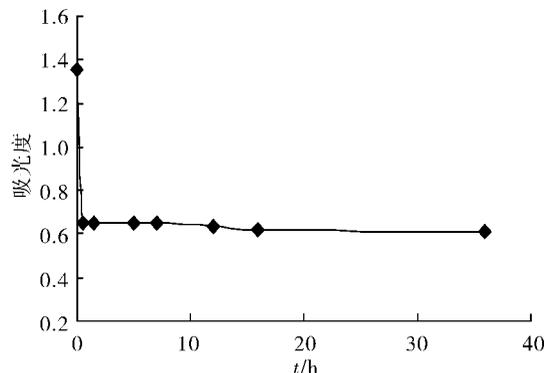


图 1 太阳光照射对白藜芦醇吸光度的影响

Fig. 1 Changes of absorbance of resveratrol under sun exposure

图 2 是新配制样品和光照 36 h 后样品的 HPLC 图谱。

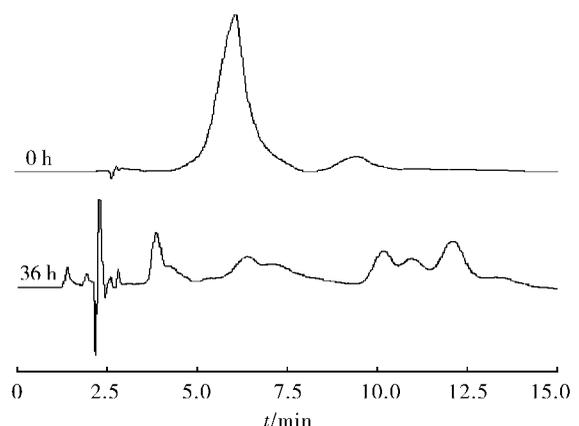


图 2 新配制样品与光照 36 h 样品的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC chromatograms of resveratrol solutions by sun exposure for 0 and 36 h

由图 2 可知,光照引起白藜芦醇的变化是非常显著的。根据文献 [5-6],白藜芦醇在自然条件下是以反式白藜芦醇存在,在一定的外界环境条件下,可以转变为顺式白藜芦醇。在光照的条件下,反式白藜芦醇会转变为顺式白藜芦醇,顺式白藜芦醇和反式白藜芦醇共存;在乙醇溶剂中,白藜芦醇还可能发生与醇加成反应生成其他产物^[6],表现在图谱上就是由一个主峰变成了很多小峰。

2.2 白藜芦醇的热稳定性研究

图 3 为不同温度处理后的白藜芦醇溶液吸光度随时间的变化。

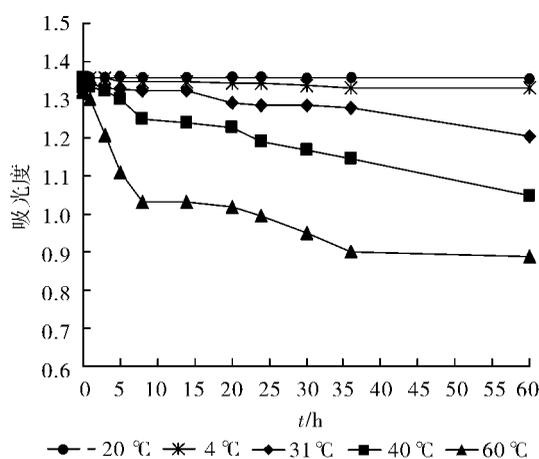


图 3 不同温度条件放置的白藜芦醇溶液吸光度随时间的变化

Fig. 3 Absorbance changes of resveratrol solutions under different temperature conditions

从图 3 可知,在 -20 和 4 °C,白藜芦醇溶液放置 60 h,吸光度变化很小,特别是 -20 °C 保存的样品,吸光度几乎没有变化。随着温度的升高(31 °C 相当于皮肤表面的温度,40 °C 相当于极端保存环境温度,60 °C 相当于护肤品配制时加入白藜芦醇的温度),对白藜芦醇的不稳定性影响逐渐增强。样品在 60 °C 的条件下放置 60 h 后,306 nm 处吸光度下降 32%。

图 4 是不同温度处理 60 h 后的样品的 HPLC 图谱。从图 4 中可以看出,随着温度的升高,其对白藜芦醇图谱的影响逐渐增大。但与图 2 相比,温度对白藜芦醇结构变化的影响要远小于光照对白藜芦醇结构的影响。说明白藜芦醇的热稳定性要高于光稳定性。

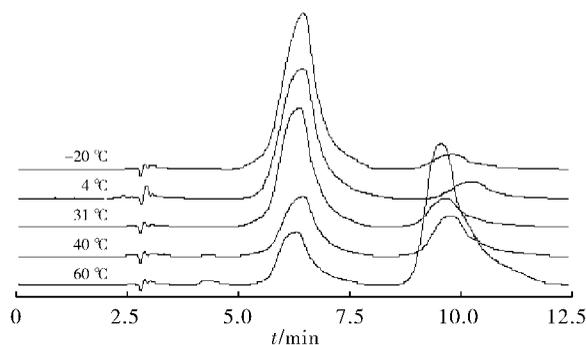


图 4 不同温度处理后样品的 HPLC 图谱

Fig. 4 HPLC chromatograms of resveratrol solutions under different temperature conditions

2.3 DPPH 自由基清除实验

表 1 为不同温度和光照处理的白藜芦醇样品溶液对 DPPH 自由基的清除率结果。

表 1 不同温度和光照处理的样品对 DPPH 自由基清除率

Tab. 1 DPPH • scavenging rate of resveratrol solutions under different conditions

清除率/%	样品						光照 36 h
	新配制	4 °C 保存 60 h	-20 °C 保存 60 h	31 °C 保存 60 h	40 °C 保存 60 h	60 °C 保存 60 h	
	21.73	21.69	21.64	21.59	21.75	22.03	62.41

表 1 表明不同温度处理 60 h 的样品和新配制的样品对 DPPH 自由基的清除率差别不大,说明温度虽然对白藜芦醇的稳定性有一定的影响,但对其清除自由基能力的影响是非常小的,光照 36 h 的样品对 DPPH 自由基的清除率反而是增强的。

从图 5 中也可以得出这一结论,随着样品光照时间的增加,对 DPPH 自由基的清除率逐渐增强,光照 36 h 样品的清除率比新配制的样品增强了约 300%。这可能是因为光照引起了白藜芦醇的结构变化,以反式白藜芦醇为主要成分的样品转变为含有顺反白藜芦醇及其他加成产物的样品^[6],这种变化增强了白藜芦醇清除自由基的能力。

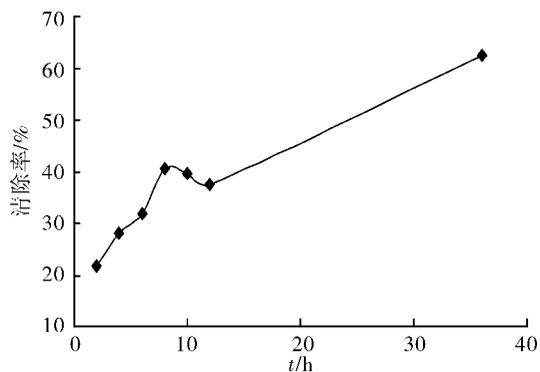


图 5 不同光照时间样品的 DPPH 自由基清除率

Fig. 5 DPPH • scavenging rate of resveratrol solutions under sun exposure for different time

2.4 酪氨酸酶抑制实验

实验测定了在 $10 \mu\text{g/mL}$ 初始质量浓度下 5 份白藜芦醇样品溶液分别在 -20 、 31 、 40 和 60 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 60 h 后对酪氨酸单酚酶和双酚酶的抑制率。实验结果表明,该 5 份样品溶液在热处理后对酪氨酸单酚酶和双酚酶均没有抑制作用。

图 6 为不同光照时间的白藜芦醇样品溶液对酪氨酸酶的抑制率结果。从图 6 中可以看出,新配制的样

品在 $10 \mu\text{g/mL}$ 的质量浓度下对酪氨酸酶没有抑制作用,在光照 2 h 后,对酪氨酸单酚酶和双酚酶的抑制率增强,都达到了 10% 以上,而且随着光照时间的延长,对酶的抑制率也在增强。对单酚酶的抑制率在光照 8 h 达到最强,抑制率为 44.69%;对双酚酶的抑制率在光照 10 h 达到最强,抑制率为 23.84%。继续光照,样品对酪氨酸酶的抑制率缓慢下降,光照 36 h,对单酚酶和双酚酶的抑制率分别为 30.74% 和 19.42%,要远好于没有光照的样品。

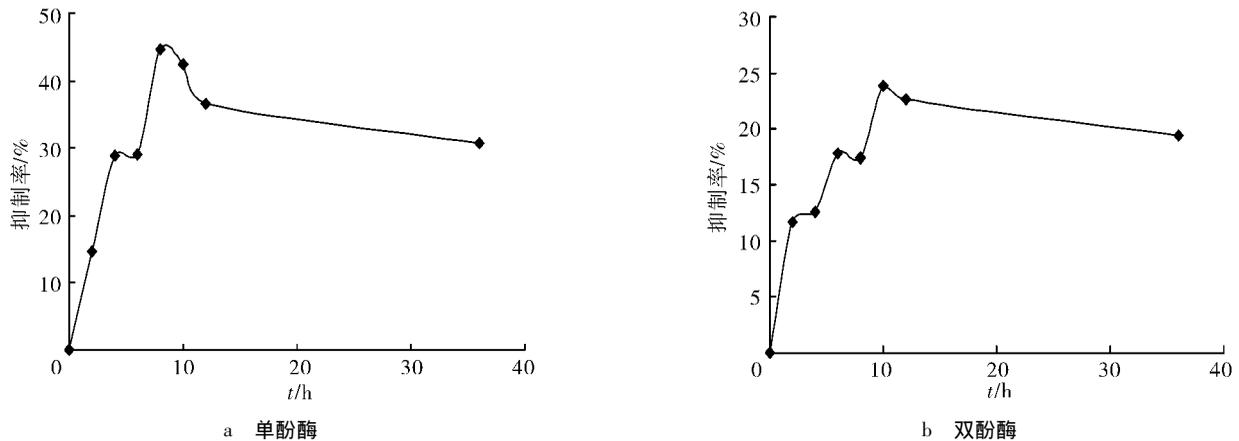


图 6 不同光照时间的白藜芦醇样品对酪氨酸酶的抑制率

Fig. 6 Inhibition to mushroom tyrosinase of resveratrol solutions under sun exposure for different time

3 结论

在光和热的作用下,白藜芦醇溶液均不稳定,特别是在太阳光的照射下白藜芦醇清除 DPPH 自由基的能力以及抑制酪氨酸酶活性的功效增强。添加白藜芦醇的化妆品不用避光使用,也不会高温下失去作用。

参考文献:

- [1] 杜彬,孟宪军.葡萄中功能性物质白藜芦醇的研究进展[J].北方果树,2004(增刊):55-56.
- [2] AZIZ M H, KUMAR R, AHMAD N. Cancer chemoprevention by resveratrol: *In vitro* and *in vivo* studies and the underlying mechanisms[J]. *International Journal of Oncology* 2003 23(1):17-28.

- [3] RATAN H L, STEWARD W P, GESCHER A J, et al. Resveratrol - A prostate cancer chemopreventive agent[J]. *Urologic Oncology* 2002 7(6):223-227.
- [4] WU J M, WANG Z R, HSIEH T C, et al. Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine[J]. *International Journal of Molecular Medicine* 2001 8(1):3-17.
- [5] 戴蕴青,韩雅珊,惠柏棣,等.红葡萄酒中白藜芦醇及其糖苷异构体的反相 HPLC 分析[J].中国农业大学学报,2002,7(1):14-18.
- [6] 刘宇平,文大为,陈政,等.反式白藜芦醇热稳定性与光致异构化的高效液相色谱和液相色谱-电喷雾离子化质谱研究[J].色谱,2004,22(6):583-588.

(上接第 179 页)

参考文献:

- [1] 蒋挺大.壳聚糖[M].北京:化学工业出版社,2007:22.
- [2] 李传秋,贺艳丽.双胍类消毒防腐剂的应用[J].食品与药品,2008,10(7):44-47.
- [3] SASHIWA H, KAWASAKI N, ATSUYOSHI N, et al. Chemical modification of chitosan. 13. 1 Synthesis of organosoluble, palladium adsorbable and biodegradable chitosan derivatives toward the chemical plating on plastics[J]. *Biomacromolecules* 2002 3(5):1120-1125.
- [4] BADAWY M E I, RABEA E I, ROGGE T M, et al. Fungicidal and insecticidal activity of O-acetyl chitosan derivatives[J]. *Polymer Bulletin* 2005 54(4):279-289.

- [5] 陈煜,多英全,罗运军,等.壳聚糖和甲壳素的肉桂酰化改性[J].高分子材料科学与工程,2005,21(3):286-289.
- [6] PAPINEAU A M, HOOVER D G. Antimicrobial effect of water-soluble chitosan with high hydrostatic pressure[J]. *Food Biotechnology*, 1991 5(1):45-47.
- [7] YOUNG D Y, KAUSS H. Release of calcium from suspension-cultured *Glycine max* cells by chitosan, other polycations and polyamines in relation to effects on membrane permeability[J]. *Plant Physiology* 1983 73(2):698-702.