甜菊甙-白藜芦醇复合体系的制备及抗氧化活性研究

杨晓泉，王丽英，万芝力，王金梅，袁杨

（华南理工大学轻工与食品学院食物蛋白工程研究中心，广东省天然产物绿色加工与产品安全重点实验室，广东 广州 510640）

摘要：白藜芦醇（Resveratrol, RES）是一种天然的食品活性物质，但难溶于水的性质限制了其在食品中的应用，导致其生物利用率下降。本研究通过利用甜菊甙（Stevioside，STE）的增溶特性来提高 RES 在水中的溶解性，并对增溶后的 STE-RES 复合体系的粒度及形态、稳定性和抗氧化活性进行了表征。结果表明，在 60 ℃培养 30 min 处理下，随着 STE 浓度的增加，RES 在水中的溶解性成线性增加，在 STE 浓度为 10%（*m/V*）时，RES 的水溶性可提高到 2.55±0.06 mg/mL。同时，处理温度的增加有利于提高 RES 的水溶性。粒度及形态分析结果显示 RES 和 STE 形成了粒度约为 4.70±0.24 nm 的纳米胶束复合体系。增溶后的 STE-RES 体系经冻干复溶后，在水及模拟胃肠液生理环境下经 12 h 培养后仍可稳定存在。此外，抗氧化试验结果表明 STE 增溶的 RES 仍具有显著的 DPPH 自由基清除能力和还原力，且略有提高。

关键词：白藜芦醇；甜菊甙；增溶；稳定性；抗氧化性

文章篇号：1673-9078(2014)1-115-119

Preparation and Antioxidant Activity of Stevioside-resveratrol Complex

YANG Xiao-quan, WANG Li-ying, WAN Zhi-li, WANG Jin-mei, YUAN Yang

(Research and Development Center of Food Proteins, College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangdong Province Key Laboratory for Green Processing of Natural Products and Products Safety, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Resveratrol (RES) is an active food compound, but the insolubility in water limits its application in food industry and contributes to its low bioavailability. In this study, the solubility of RES was enhanced by utilizing the solubilizing properties of stevioside (STE). The particle size, morphology, stability, and antioxidant activities of STE-solubilized RES were evaluated. The results indicated that the solubility of RES in water increased linearly with increasing STE concentrations, which promoted to 2.55±0.06 mg/mL in the presence of 10% (*m/V*) STE at 60 ℃ for 30 min. Dynamic light scattering and atomic force microscope studies found that RES and STE formed STE-RES nanomicelles (4.70±0.24 nm) complex, suggesting the solubilization of hydrophobic RES in STE self-assembled micelles. After freeze-dried and reconstitution, the STE-solubilized RES was still stable under physiological conditions (water, gastric fluid, and intestinal fluid) over 12 h cultivation. Furthermore, antioxidant activity assays demonstrated that the STE-solubilized RES showed an enhanced DPPH radical scavenging ability and reducing power.

Key words: resveratrol; stevioside; solubility; stability; antioxidant activity

白藜芦醇（RES），化学名为反式-3,4',5-三羟基二苯乙烯（trans-3,4',5-trihydroxystilbene），分子式 $C_{14}H_{12}O_3$，难溶于水，是一种含有芪类结构的非黄酮类多酚化合物，常见于葡萄、花生、虎杖等其他植物中[1]。临床研究结果显示 RES 具有明显的抗氧化、抗自由基、抗癌、降血脂、抗血栓、抗动脉粥样硬化、预防心脑血管疾病等作用，被广泛应用于食品、保健品、医药等领域[2]。甜菊甙（STE）是从天然甜料植物甜叶菊的甜叶中提取的一类高甜度、低热量、对人体无副作用的天然产物[3]，是甜菊糖甙（Steviol glycosides）中最丰富的成分，其甜度是蔗糖的 250~300 倍，故常作为甜味剂应用于食品工业中。此外，STE 对糖尿病、高血压病、龋齿等也显示了一定的辅助治疗作用[4]。STE 分子式为 $C_{38}H_{60}O_{18}$，易溶于水，且其水溶液稳定性好，在 pH 值 3-10 范围加热处理 2 h 后仍可稳定存在。STE 的分子结构是由亲水性的双侧糖基（葡萄糖基和鼠李糖基）和疏水性的甜菊醇基连接构成，该种双亲性的分子结构与三萜皂甙类较为相似。

收稿日期：2013-07-27

基金项目：“十二五”国家科技支撑计划项目（2012BAD33B10；2012BAD34B04-2）；淀粉与植物蛋白深加工教育部工程研究中心开放课题（2012-ERC-04）；国家自然科学基金资助项目（31130124）

作者简介：杨晓泉（1965-），男，博士，教授，研究方向为植物蛋白质的开发与利用

最近，Zhang 等[5]发现一些甜菊糖甙具有增溶特性，并通过研究证实了可利用甜茶甙（Rubusoside）制备水溶性的姜黄色素制剂，且具有良好的稳定性和生物活性。尽管如此，目前仍鲜有利用天然甜味剂 STE 对疏水性多酚进行增溶的报道出现。近年来，市场上对富集白藜芦醇的功能食品的需求越来越多，但是由于它难溶于水的性质使得其应用受到一定的限制，生物活性及利用率难以得到充分的发挥，因此，本文试图通过利用甜菊甙对白藜芦醇进行增溶，以期提供一种制备天然、稳定的水溶性多酚的新型方法，并对增溶后复合体系的粒度及形态、稳定性和抗氧化活性进行了表征。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

白藜芦醇，纯度 98%以上，购于陕西天润植物化学有限公司；甜菊甙，纯度 95%以上，购于济宁奥星甜菊制品有限公司；2,2-二苯基-1-三硝基苯肼（DPPH）购于美国西格玛奥德里奇公司；二甲基亚砜（DMSO）等化学试剂均为分析纯；所有实验用水均为去离子水。

1.2 仪器与设备

电热恒温水浴锅，江苏金坛市宏华仪器有限公司；数显 pH 计，德国 METTLER TOLEDO 公司；Ultra-Turrax T25 均质机，德国 IKA 公司；DELTAT-24/LSC 冷冻干燥机，德国 Christ 公司；CR22G 冷冻离心机，日本 Hitachi 公司；UV2300 紫外分光光度计，日本岛津公司；高效液相色谱 HPLC 系统（配备 Waters 1525 泵及 2487 紫外可见检测器），美国 Waters 公司；Nano-ZS&MPT-2 型纳米粒度仪，英国 Malvern 公司；原子力显微镜，美国 VECEO 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 STE-RES 复合体系的制备[6]

精确称取一系列的 STE 与 RES 溶于 50 mL 水中，其中 RES 添加量恒定为 125 mg，室温搅拌 2 h，以充分溶解，得到的混合液以 9000 r/min 均质 2 min，后置于不同温度（25 ℃~100 ℃）的水浴中加热 30 min，取出，迅速置于冰水中冷却，冷却后的分散液于 8000 *g* 离心 30 min，取上清液，过 0.45 μm 微孔滤膜，测定 RES 的含量，整个操作过程保证避光。

1.3.2 RES 含量的测定

用反相 HPLC 法测定 RES 的含量，其检测色谱条件为：色谱柱：Symmetry C18 柱 (150 mm×3.9 mm, 5 μm)；流动相：乙腈/水等度洗脱（40/60，*V/V*）；流速：0.60 mL/min；检测波长：306 nm；进样体积：10 μL。RES 标准曲线的测定：精确称取 RES 标准品 50 mg 于 50 mL 容量瓶中，加入 40%乙腈溶液定容至 50 mL，即得 RES 储备溶液；取 1 mL RES 储备液用 40%乙腈定容至 10 mL 容量瓶中，再依次等倍稀释，得到系列标准曲线工作溶液（RES 系列浓度为 1~100 μg/mL），过 0.45 μm 膜，进样测定。以 RES 浓度（μg/mL）为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，采用 Origin Pro 8 软件处理后得到相应的标准曲线方程及线性相关系数（$Y=1.0587\times10^5 X$，$R^2=0.9993$）。

1.3.3 STE-RES 复合体系的表征

1.3.3.1 粒度测定

取 10%（*m/V*）STE 增溶的 RES（10% STE-RES）水溶液，过 0.45 μm 膜，用纳米粒度仪测定其粒度分布，扫描角度为 173°，测试温度为 25 ℃，得到平均粒度值（nm）及粒度光强分布图。

1.3.3.2 形态学测定

同上 10% STE-RES 水溶液，过 0.45 μm 膜，取 2 μL 样品液沉积在新劈开的云母表面，在环境温度和常压下晾干，用原子力显微镜（AFM）对其形态进行分析，测试在室温进行，以轻敲模式操作。

1.3.3.3 紫外可见光谱测定

同上 10% STE-RES 水溶液，用水将 RES 浓度稀释到 5 μg/mL，采用紫外分光光度计，对其在 250~400 nm 波长范围内进行波长扫描；对比样为等量的 RES 溶于 DMSO（DMSO-RES）中。

1.3.4 STE-RES 复合体系稳定性[7]

将 10% STE-RES 水溶液冷冻干燥，取一定量 STE-RES 冻干粉分别复溶于水、模拟胃液和模拟肠液中，搅拌 1 h，得到浓度为 10%（*m/V*）的均匀分散液，后置于 37 ℃恒温水浴中避光保存，分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 取样，用 HPLC 测定溶液中 RES 的含量。

1.3.5 STE-RES 复合体系抗氧化活性

1.3.5.1 DPPH 自由基清除活性

参照 Chen 等人的方法[8]对 RES 的 DPPH 自由基清除活性进行测定。配置 0.1 mM 的 DPPH 乙醇溶液，4 ℃避光保存备用。将不同温度下制备的 10% STE-RES 水溶液，用水将 RES 浓度稀释到 20 μg/mL。在反应体系中，2 mL STE-RES 溶液中加入 2 mL 0.1 mM DPPH 乙醇溶液，振荡摇匀，在室温下避光静置 30 min 后，于 517 nm 处测量其吸光度。

DPPH 自由基清除率/%=[1-(样品吸光值/空白吸光值)]×100%

DPPH 自由基清除率（%）越高，说明其抗氧化能力越强。同样的方法，测定 DMSO 溶解的等浓度 RES（20 μg/mL）的抗氧化活性做对比。

1.3.5.2 还原力测定

参照 Yen and Chen 等人的方法[9]对 RES 的还原力进行测定。将不同温度下制备的 10% STE-RES 水溶液，用水将 RES 浓度稀释到 20 μg/mL。在反应体系中，0.75 mL STE-RES 溶液中加入 1.25 mL 的 0.2 M 磷酸缓冲溶液（pH 6.6）和 1.25 mL 1%铁氰化钾溶液，混匀，置于 50 ℃培养 20 min，后取出，加入 1.25 mL 10%的三氯乙酸（TCA）和 0.5 mL 0.1%的三氯化铁（$FeCl_3$）溶液，充分混匀，在 700 nm 处测其吸光值。

测定的吸光值越高，说明其还原能力越强。同样的方法，测定 DMSO 溶解的等浓度 RES（20 μg/mL）的抗氧化活性做对比。

1.4 数据分析

利用 SPSS 11.7 和 Origin Pro 8 软件进行数据统计分析及作图，数据以均值±标准差（Means±SD）表示，显著水平为 $p<0.05$。

2 结果与讨论

2.1 STE 对 RES 水溶性的影响

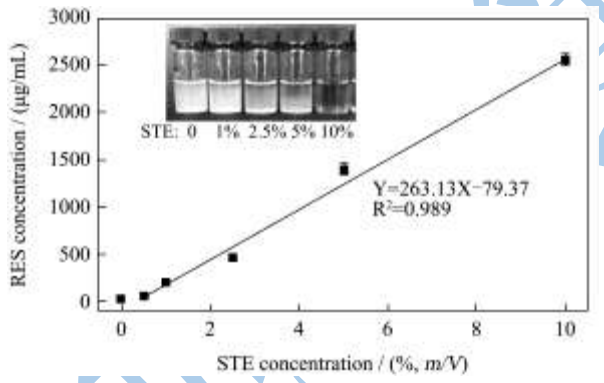


图 1 不同浓度的 STE 对 RES 水溶性的影响

Fig.1 Different STE concentrations on RES water solubility

注：处理温度为 60 ℃，内置图为不同 STE 浓度下的 STE-RES 复合体系外观。

从图 1 可以看出，在 60 ℃处理温度下，随着 STE 浓度的增加，越来越多的 RES 溶解在水中，当 STE 的浓度为 10%（*m/V*）时，RES 完全溶解在水中，浓度达到 2546.10±59.20 μg/mL。内置图中的 STE-RES 体系外观图支持了该变化趋势，单独的 RES 水溶液非常浑浊，随着 STE 浓度的增加，RES 溶液逐渐变的澄清。同时发现，RES 浓度与添加的 STE 浓度有相应的线性关系，即 Y (RES concentration, μg/mL)=26.31×X (STE concentration, mg/mL) - 79.37；R^2=0.989。基于此线性关系，可以预测，在 1 mg/mL 到 100 mg/mL 的实验浓度下，每增加 1 mg/mL 的 STE，可使 RES 的水溶性增加 26.31 μg/mL。

从结构上来看，STE 分子具有亲水性的双侧糖基（葡萄糖基和鼠李糖基）和疏水性的甜菊醇基，该结构使 STE 具有在水溶液中达到一定浓度时自组装形成胶束的能力。Wan 等人[6]首次测定了 STE 的临界胶束浓度（CMC）为 4.94 mg/mL，本研究采用的 STE 最小实验浓度为 5.00 mg/mL，大于 STE 的 CMC 值，STE 会自组装形成胶束，STE 自组装胶束具有疏水性的内腔，可以包裹水不溶性的 RES 分子，从而得以提高 RES 在水中的溶解性[5~6]。STE 自组装形成胶束的性质同其它表面活性剂如 SDS、丙二醇等类似[10]，不仅在难溶小分子增溶方面表现出高效性，而且 STE 是一种天然成分，能够安全地运用在食品中。

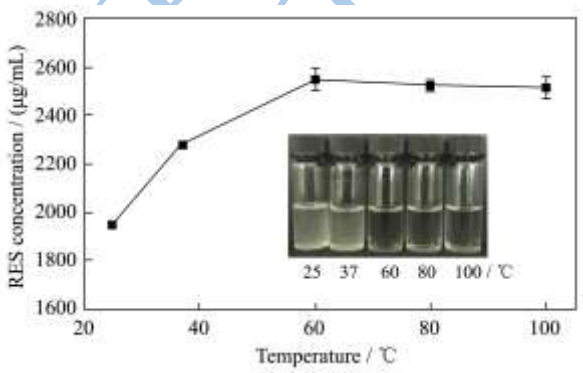


图 2 不同温度对 STE 增溶 RES 效果的影响

Fig.2 Different temperatures on - RES water solubility

注：STE 浓度恒为 10%，内置图为不同温度下的 STE-RES 复合体系外观。

从图 2 可知，在 STE 浓度为 10%时，随着处理温度从 25 ℃增加到 60 ℃，RES 的水溶性相应地从 1947.50±11.20 μg/mL 增加到 2546.10±59.20 μg/mL，这表明温度的增加有利于 RES 溶解于水中。一般来说，温度的增加可使胶束的内腔更加疏水，同时也会增加胶束的数目，这都能使 STE 自组装胶束包裹更多的 RES 分子，使 RES 体现更高的水溶性[11~12]。另外，随着温度的进一步升高，RES 在水中的含量基本未发生明显变化，这表明 60 ℃~100 ℃温度区间的处理不会对 RES 分子的含量造成影响。

2.2 STE-RES 复合体系的表征

2.2.1 粒度分布与形态分析

由图 3 可以看出，10% STE-RES 水溶液体系的粒度分布是单分散的，这说明整个 STE-RES 体系非常均一，同时测定的体系粒径值为 4.70±0.24 nm。从 AFM

图也可以明显地看出，STE 与 RES 形成的复合体系是由很多呈球形的颗粒组成的，颗粒的分布及大小与纳米粒度仪的测定结果基本一致。由前述分析可知，STE 可自组装形成胶束，RES 包裹在 STE 胶束内腔中实现增溶，因此，基本可以认为 AFM 图呈现的颗粒是包裹 RES 的 STE 自组装纳米胶束。

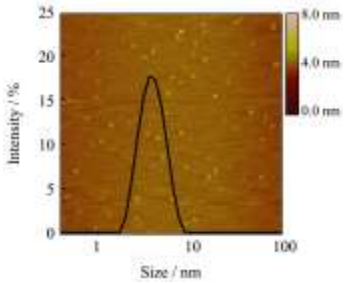


图 3 10% STE-RES 复合体系的粒度光强分布及 AFM 形态分析

Fig.3 Particle size distribution and AFM image of the 10% STE-solubilized RES water solution

2.2.2 紫外可见光谱图

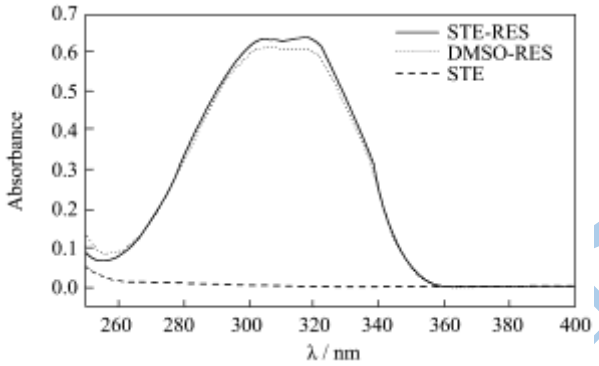


图 4 10% STE-RES 复合体系与 DMSO 溶解的 RES 的紫外可见吸收光谱图比较

Fig.4 UV–vis absorption spectras of the 10% STE-solubilized RES solution and RES solubilized in DMSO

图 4 所示的是 10% STE-RES 与 DMSO-RES 的紫外可见吸收光谱对比图。由图可以看出，STE-RES 复合体系与同浓度的 DMSO-RES 在 250~400 nm 处的吸收光谱图基本一致，都在 306 nm 左右处具有较强的吸收峰，只是吸收度略有增加，这表明 STE-RES 复合体系中的 RES 结构较完整。

2.3 STE-RES 复合体系的生理条件稳定性

如图 5 内置图所示，将冻干的 10% STE-RES 粉末在水、模拟胃液和模拟肠液中复溶后，均可得到透明的 RES 水溶液，不存在可见的 RES 不溶性颗粒，同时，测定的 RES 浓度均在 2.50 mg/mL 左右。另外，STE-RES 的各复溶液在 12 h 的培养过程中 RES 的浓度基本未发生明显变化，均表现了良好的稳定性，这能够为其在胃肠道的吸收和体循环中提供足够的时间[5]。以上结果说明，STE-RES 复合体系在生理溶液环境下具备良好的重分散性和稳定性，有利于扩展其在药学、食品等领域的开发及应用。

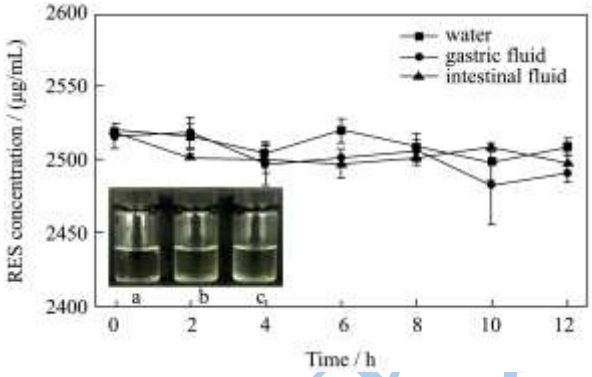


图 5 10% STE-RES 冻干复溶后体系在生理条件下的 12 h 稳定性

Fig.5 Stability of RES in physiological solutions over 12 h following 10% STE-RES powder reconstitution

Note: (Inset) Images of 10% STE-RES reconstituted in physiological solutions; (a) water, (b) gastic fluid, (c) intestinal fluid.

2.4 STE-RES 复合体系的抗氧化活性

2.4.1 DPPH 自由基清除活性

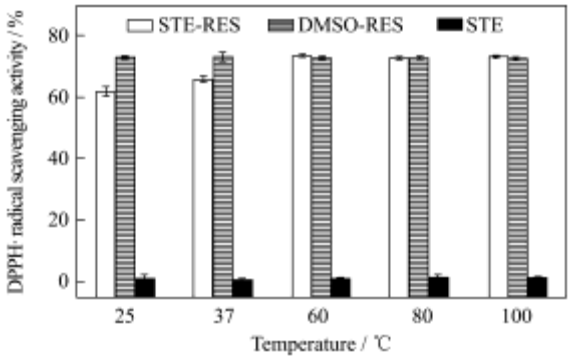


图 6 不同温度下 10% STE-RES 复合体系与 DMSO-RES 的 DPPH 自由基清除活性比较

Fig. 6 DPPH radical scavenging activities of 10% STE-solubilized RES and DMSO-RES under different temperatures

图 6 所示的是 10% STE-RES 与等浓度 DMSO-RES 的 DPPH 自由基清除活性比较情况。在所有温度处理下，DMSO-RES 自由基清除活性未发生改变，这表明 25~100 ℃温度区间的处理不会对 RES 的 DPPH·清除活性造成影响。另外，随着温度的上升，STE-RES 复合体系的 DPPH·清除活性先逐渐增加，后保持不变，最终值与同浓度的 DMSO-RES 的抗氧化性基本相等，该变化趋势与图 2 中温度对 RES 水溶性的影响趋势是一致的，这主要是由于 STE-RES 复合体系的 DPPH·清除能力与体系中 RES 的含量直接相关，

RES 含量越高，DPPH·清除能力越强。STE 基本未表现出 DPPH·清除能力。

2.4.2 还原力

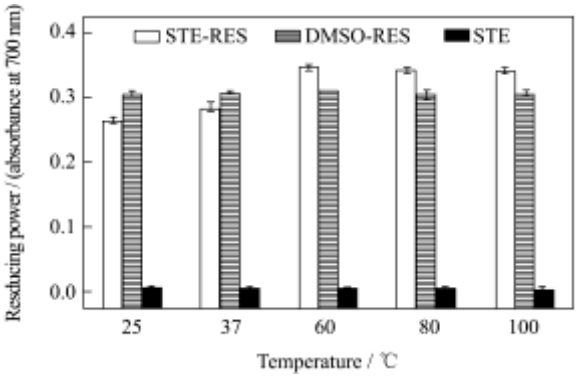


图 7 不同温度下 10% STE-RES 复合体系与 DMSO-RES 的还原力比较

Fig.7 Reducing powers of 10% STE-solubilized RES and DMSO-RES under different temperatures

如图 7 所示，10% STE-RES 与等浓度 DMSO-RES 的还原力比较情况与前述 DPPH 清除能力基本一致。在所有温度处理下，DMSO-RES 还原力均未发生改变。另外，随着温度的上升，STE-RES 复合体系的还原力先逐渐增加，后保持不变，且高于同浓度的 DMSO-RES 的还原力，该变化趋势与图 2 中温度对 RES 水溶性的影响趋势也是一致的，这也是因为温度增加使 STE-RES 体系中溶解的 RES 含量增加，从而使体系的还原力增强。另外，STE 表现出轻微的还原力（0.01），因此使 STE-RES 复合体系的还原力强于同浓度的 DMSO-RES。

3 结论

本研究表明，甜菊甙对白藜芦醇具有增溶作用，在 STE 浓度为 10%（*m*/*V*），60 ℃培养 30 min 后，RES 在水中的溶解性可提高到 2.55±0.06 mg/mL。STE 是通过形成自组装纳米胶束对 RES 进行包裹，从而实现 RES 的增溶。STE-RES 复合体系在水溶液、模拟胃肠液中具备良好的重分散性和稳定性。同时，增溶后的 RES 仍具有显著的抗氧化性，且略有提高。

参考文献

[1] 蒲含林,张振,姜华,等.功能性食品配料白藜芦醇全合成工艺研究[J].食品工业科技,2012,33(2):349-351
PU Han-lin, ZHANG Zhen, JIANG Hua, et al. Study on the synthesis of functional food ingredients resveratrol [J]. Food Industry Science and Technology, 2012, 33(2): 349-351

[2] 丁刘刚,宴日安,黄雪松,等.功能性食品配料白藜芦醇的合成方法 [J].现代食品科技, 2007, 23(3): 83-85
DING Liu-gang, YAN Ri-an, HUANG Xue-Seng, et al. Synthesis of Functional Food Ingredients Resveratrol [J]. Modern Food Science and Technology, 2007, 23(3): 83-85

[3] 王飞生,叶荣飞,闵建.甜菊糖苷的特性及应用[J].中国调味品,2009,34(10):91-99
WAN Fei-sheng, YE Rong-fei, MIN Jian. Characteristics and application prospect of steviol glycosides [J]. China Condiment, 2009, 34(10): 91-99

[4] 孙传范,李进伟.甜菊糖苷研究进展[J].食品科学,2010, 31(9):338-340
SUN Chuan-fan, LI Jin-wei. Research Progress on Steviosides [J]. Food Science, 2010, 31(9): 338-340

[5] Zhang F, Gar Y K, Duane P J, et al. A novel solubility-enhanced curcumin formulation showing stability and maintenance of anticancer activity [J]. J. Pharm. Sci., 2011, 100: 2778-2789

[6] Wan Z L, Wang J M, Wang L Y, et al. Enhanced physical and oxidative stabilities of soy protein-based emulsions by incorporation of a water-soluble stevioside-resveratrol complex [J]. J. Agric. Food Chem., 2013, 61: 4433-4440

[7] Maltais A, Remondetto G E, Subirade M. Soy protein cold-set hydrogels as controlled delivery devices for nutraceutical compounds [J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23, 1647-1653

[8] Chen C H, Wu M C, Hou C Y, et al. Effect of phenolic acid on antioxidant activity of wine and inhibition of pectin methylesterase [J]. J. Inst. Brew., 2009, 115: 328-333

[9] Yen G C, Chen H Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity [J]. J. Agric. Food Chem., 1995, 43: 27-32

[10] Heins A, Garamus V M, Steffen B, et al. Impact of phenolic antioxidants on structural properties of micellar solutions [J]. Food Biophys., 2006, 1: 189-201

[11] Parmar A, Singh K, Bahadur A, et al. Interaction and solubilization of some phenolic antioxidants in Pluronic® micelles [J]. Colloids Surf. B: Biointerf, 2011, 86: 319-326

[12] Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, et al. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion [J]. J. Agric. Food Chem. 1992, 40: 945-948