

## 基于 pH 调控多酚-唾液蛋白结合作用的三果汤含片涩味掩蔽方法研究

郑 玉<sup>1</sup>, 谢兴亮<sup>1</sup>, 刘 俊<sup>2</sup>, 韩 丽<sup>2</sup>, 林俊芝<sup>3</sup>, 樊三虎<sup>4,5</sup>, 莫太刚<sup>4,5</sup>, 张定堃<sup>2\*</sup>, 韩 雪<sup>1\*</sup>

1. 成都医学院药学院, 四川 成都 610500
2. 成都中医药大学 药学院西南特色中药资源国家重点实验室, 四川 成都 611137
3. 成都中医药大学附属医院, 四川 成都 610072
4. 成都市三勒浆药业集团, 四川 成都 610000
5. 乳品营养与功能四川省重点实验室, 四川 成都 610000

**摘要:** 目的 通过多酚-唾液蛋白络合作用的涩味形成关键机制, 建立 pH 调控两者结合能力的三果汤含片涩味掩蔽新方法。方法 采用荧光淬灭光谱法测定不同 pH 条件 (2.5、3.5、4.5、5.5、6.5) 下三果汤提取物与  $\beta$ -酪蛋白的相互作用。调节三果汤提取物 pH 至最佳条件, 制备三果汤掩味含片。以电子舌涩味量化方法和志愿者视觉模拟量表法 (visual analogue scale, VAS) 评价掩味效果。采用 DPPH 自由基清除能力、纸片扩散法评价含片的抗氧化活性和抑菌活性。结果 荧光淬灭光谱测得三果汤提取物在 pH 4.5 时与  $\beta$ -酪蛋白的结合能力最弱, 调节提取物 pH 至 4.5 制备三果汤掩味含片。掩味含片的涩度明显弱于原片; 没食子酸的溶出度与原片基本一致; 掩味含片的抗氧化活性和抑菌活性仅受到轻微影响。结论 基于 pH 调控的多酚涩味掩蔽方法可行, 解决了三果汤含片涩味突出的品质缺陷, 对于多酚类中药口含片的涩味掩蔽提供了可行的技术方案。

**关键词:** 三果汤含片; 涩味; 掩味; pH 调控; 多酚-唾液蛋白结合作用; 荧光淬灭光谱法;  $\beta$ -酪蛋白; 电子舌; 视觉模拟量表法; DPPH 自由基; 纸片扩散法; 抗氧化; 抑菌; 没食子酸; 溶出度

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)13-3953-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.13.008

## Taste masking of Triphala Buccal Tablets by pH regulation based on the polyphenol-salivary protein interaction

ZHENG Yu<sup>1</sup>, XIE Xing-liang<sup>1</sup>, LIU Jun<sup>2</sup>, HAN Li<sup>2</sup>, LIN Jun-zhi<sup>3</sup>, FAN San-hu<sup>4,5</sup>, MO Tai-gang<sup>4,5</sup>, ZHANG Ding-kun<sup>2</sup>, HAN Xue<sup>1</sup>

1. School of Pharmacy, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China
2. School of Pharmacy, State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, Pharmacy School, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China
3. The Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, China
4. Sanajon Pharmaceutical Group, Chengdu 610000, China
5. Dairy Nutrition and Function, Key Laboratory of Sichuan Province, Chengdu 610000, China

**Abstract: Objective** To establish a new astringency masking method of Triphala Buccal Tablets (TBT, 三果汤含片) by regulating the polyphenol-salivary protein interaction through pH, which is the key mechanism of astringency. **Methods** Fluorescence quenching spectroscopy was used to determine the binding ability between triphala extract under different pH of 2.5, 3.5, 4.5, 5.5, 6.5 and  $\beta$ -casein. The pH of triphala extract was adjusted to the optimum conditions to prepare taste-masking buccal tablets. The

收稿日期: 2022-02-24

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (81403115); 国家自然科学基金资助项目 (82003955); 成都医学院校基金 (CYZ19-05); 四川省大学生创新创业训练计划 (S202013705018); 成都医学院学科建设创新团队项目 (CMC-XK-2104); 三勒浆药业-成中医联合实验室项目 (2019-YF04-00086-JH)

**作者简介:** 郑 玉 (2001—), 女, 本科生, 研究方向为中药矫味新技术。Tel: (028)62739556 E-mail: 2475657246@qq.com

**\*通信作者:** 张定堃, 男, 副教授, 研究方向为中药制药与品质评价新技术。E-mail: 465790643@qq.com

韩 雪, 女, 讲师, 研究方向为中药制剂新技术。Tel: (028)62739556 E-mail: hanxuetao@126.com

astringent quantification methods based on electronic tongue and human visual analogue scale were used to evaluate the taste masking effect. Antioxidant activity and antibacterial activity were respectively evaluated by DPPH radical scavenging ability and kirby bauer test. **Results** The binding ability with  $\beta$ -casein was the weakest, when the pH of Triphala extract was at 4.5. The pH of Triphala extract was adjusted to 4.5 to prepare taste-masking TBT. And the astringency of the taste-masking tablets was significantly weaker than the original tablets. The dissolution of gallic acid in masked buccal tablets was basically the same as that of the original tablets. The antioxidant activity and antibacterial activity of taste-masking tablets were only slightly affected. **Conclusion** The above results demonstrate that the polyphenol astringency masking method based on pH regulation is feasible, and solves the quality defect of astringency of TBT. And it provides a feasible technology solution for astringency masking of polyphenol traditional Chinese medicine buccal tablets.

**Key words:** Triphala Buccal Tablets; astringency; taste masking; pH regulation; polyphenols; polyphenol-salivary protein interaction; fluorescence quenching spectrometry;  $\beta$ -casein; electronic tongue; visual analogue scale; DPPH radical; kirby bauer test; antioxidation; antibacterial; gallic acid; dissolution

三果汤 (Triphala) 又名哲布松散, 由诃子 *Chebulae Fructus*、毛诃子 *Terminaliae Belliricae Fructus* 和余甘子 *Phyllanthi Fructus* 组成<sup>[1]</sup>。三果汤含片 (Triphala Buccal Tablets, TBT) 是藏药“哲布松汤”的剂型改良新药, 具有清热生津、润燥利咽的功效<sup>[2]</sup>。3 味中药均富含多酚, 具有强烈的涩味刺激; 同时, 由于口含片剂型的特殊性, 涩味刺激在口腔久久难以消散, 严重影响患者的服药顺应性。

多酚与唾液蛋白相互作用是重要的涩味来源, 两者相互作用水平具有很强的涩味预测能力<sup>[3-4]</sup>。前期研究发现多酚浓度、多酚结构、多酚 pH、反应温度、反应时间等均能影响多酚与唾液蛋白的结合作用<sup>[5-7]</sup>。通过对 TBT 处方、口腔反应微环境和实际服药过程分析, 认为药物 pH 是制剂环节可调节的最优因素。因此, 本研究从 pH 调控多酚-唾液蛋白相互作用的角度, 开展 TBT 的涩味掩蔽方法研究。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

Cary Eclipse 型荧光分光光度计, 美国 Varian 公司; UV-1700 型紫外-可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; Turbiscan LAB 型稳定性分析仪, 法国 Formulation 公司; 雷磁 PHS-3C 型 pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司; YD-20 型片剂测试仪, 京塔科技有限公司; ZB-1E 型智能崩解仪, 天津市天大天发科技有限公司;  $\alpha$ -Astree II 型电子舌, 法国 Alpha MOS 公司; Agilent 1260 高效液相色谱仪, 美国 Agilent 科技公司; BSA224S 型电子天平, 赛多利斯科学仪器有限公司。

### 1.2 药物与试剂

诃子、余甘子、毛诃子饮片均购于成都荷花池中药材市场, 经成都中医药大学药学院许润春副教

授鉴定, 分别为使君子科榄仁树属植物诃子 *Terminalia chebula* Retz. 的干燥成熟果实, 大戟科叶下珠属植物余甘子 *Phyllanthus emblica* L. 的干燥成熟果实, 使君子科榄仁树属植物毗黎勒 *T. bellirica* (Gaertn.) Roxb. 的干燥成熟果实。

$\beta$ -酪蛋白, 质量分数  $\geq 98\%$ , 批号 SLBN8470V, 购于 Sigma-Aldrich 公司; 对照品没食子酸, 批号 4051109, 质量分数  $\geq 98\%$ , 购于成都普瑞法科技发展有限公司; L-谷氨酸单钠盐 (批号 H31A6R2860)、硫酸奎宁一水物 (批号 YM0317BA14)、薄荷脑 (批号 JM0524RB13)、阿司帕坦 (批号 WM0327DY13)、三氯蔗糖 (批号 JA0427RA13) 均购于上海源叶生物科技有限公司; 氯化钠、鞣酸购于成都市科龙化工试剂厂, 可溶性淀粉、柠檬酸、蔗糖购于西陇化工股份有限公司, 糊精购于天津市恒兴化学试剂制造有限公司, 以上试剂均为分析纯; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-diphenyl-2-nitro-henylhydrazine, DPPH), 质量分数  $> 98\%$ , 购于美国 Sigma 公司; 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* (ATCC6538)、白色念珠菌 *Candida albicans* (ATCC10231) 由江西中医药大学提供。

## 2 方法与结果

### 2.1 多酚-唾液蛋白结合反应

**2.1.1 空白人工唾液的制备** 为保持反应环境与人体口腔的一致性, 选择人工唾液作为反应介质。人工唾液配方采用 ISO/TR10271 标准<sup>[8]</sup>, 组成为 NaCl 0.400 g, KCl 0.400 g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.780 g,  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.005 g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.795 g, 尿素 1 g, 溶于 1000 mL 去离子水, 调整 pH 至 6.8, 4 °C 保存。

**2.1.2 含  $\beta$ -酪蛋白唾液的制备** 唾液蛋白受时间、食物摄取、昼夜节律、年纪、性别、健康情况、用

药情况等因素影响, 为建立稳定的研究模型, 通常采用单一蛋白进行模拟。选择唾液蛋白中与多酚作用结合力最强的富含脯氨酸蛋白 (PRPs) 代表  $\beta$ -酪蛋白作为模型蛋白<sup>[9]</sup>。唾液中蛋白含量为 0.1%~0.2%, PRPs 约占总蛋白的 70%<sup>[10]</sup>, 因此, 本实验设置  $\beta$ -酪蛋白唾液质量浓度为 1.2 mg/mL。

**2.1.3 三果汤提取物的制备** 按照 1.5:1.2:1 比例称取诃子、余甘子、毛诃子, 加 12 倍量去离子水, 浸泡 40 min, 加热回流 1.5 h, 滤过。滤渣加 12 倍量去离子水回流 1.5 h, 合并滤液, 浓缩, 干燥, 制得浸膏粉末, 收率 48.4%。

## 2.2 pH 值对三果汤-唾液蛋白作用的影响

**2.2.1 不同 pH 值三果汤样品制备** 取适量三果汤提取物, 经人工唾液溶解至 0.4 mg/mL, 测得 pH 为 3.5。用 1 mol/L HCl 溶液和 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 至 2.5、3.5、4.5、5.5、6.5。前期实验表明, 三果汤 pH 在 7.5 和 8.5 时, 虽然涩味明显减弱, 但前期预实验结果显示化学成分发生明显变化, 因此, 不设置碱性样品。

**2.2.2 荧光淬灭光谱测定** 采用荧光淬灭法测定不同 pH 值三果汤与  $\beta$ -酪蛋白的相互作用。分别将 0、10、20、40、80、100、200、400、600、1000  $\mu$ L 三果汤样品与 1 mL 含  $\beta$ -酪蛋白唾液混合, 并用人工唾液定容至 2 mL, 混匀。由于三果汤化学成分复杂, 为方便参数计算, 选择含量较高的没食子酸作为代表。以其摩尔质量 170.12 g/mol 计算, 三果汤含没食子酸浓度分别为 0.024 2、0.048 4、0.096 9、0.193 7、0.242 2、0.484 4、0.968 7、1.453 1、2.421 8 mmol/L。30  $^{\circ}$ C 水浴反应 10 min 后取出, 置于荧光分光光度计检测, 设置激发波长为 280 nm, 扫描 287~450 nm 的发射光谱, 观察荧光强度的变化。340 nm 处的荧光强度用于相互作用过程参数计算。采用相同方法扫描在 20  $^{\circ}$ C 反应时的发射光谱, 观察荧光强度。

### 2.2.3 荧光淬灭光谱

(1) 荧光光谱与淬灭常数:  $\beta$ -酪蛋白在不同 pH 值条件下, 与不同浓度三果汤提取液作用的荧光光谱见图 1。随着三果汤浓度的增加,  $\beta$ -酪蛋白的荧光强度减小。表明三果汤与  $\beta$ -酪蛋白相互作用, 淬灭了蛋白的内部荧光。同时, 高浓度的三果汤 (大于 0.968 7 mmol/L) 几乎完全淬灭  $\beta$ -酪蛋白的内源荧光, 表明三果汤非常接近于  $\beta$ -酪蛋白的荧光发射氨基酸残基。淬灭常数 ( $K$ ) 代表淬灭剂对荧光分

子的接触程度和反应速度。根据以下方程计算。

$$F_0/(F_0-F)=1/(fK[Q])+1/f$$

$F_0$  为  $\beta$ -酪蛋白初始荧光强度,  $F$  为淬灭剂存在时的荧光强度,  $[Q]$  为淬灭剂的摩尔浓度,  $f$  为极性淬灭剂荧光分数<sup>[15]</sup>

$F_0/(F_0-F)$  与  $1/[Q]$  的拟合曲线见图 1, 三果汤对  $\beta$ -酪蛋白的接触速度和反应速度均较高。通过比较  $K$  值, 不同 pH 值三果汤与蛋白的接触程度与反应速度排序为 pH 3.5 $\approx$ pH 2.5>pH 5.5>pH 4.5 $\approx$ pH 6.5。其中, pH 4.5 和 pH 6.5 三果汤与  $\beta$ -酪蛋白的接触反应速度明显弱于原提取液 (pH 3.5)。

(2) 荧光淬灭机制: 荧光分子与淬灭剂之间的淬灭效率都遵循 Stern-Volmer 方程。

$$F_0/F=1+K_qt_0[Q]=1+K_D[Q]$$

$F_0$ 、 $F$  和  $[Q]$  代表含义与前面相同,  $K_D$  为 Stern-Volmer 常数,  $K_q$  为双分子淬灭过程的速率常数,  $t_0$  为在没有淬灭剂存在下荧光分子的平均荧光寿命 ( $\beta$ -酪蛋白为 3.30 ns)<sup>[16]</sup>; 以  $F_0/F$  对  $[Q]$  作图, 得一纵轴截距近似 1 的直线, 其斜率为  $K_D$

三果汤与  $\beta$ -酪蛋白作用的 Stern-Volmer 曲线见图 2。 $K_q$  随着温度的升高而增大, 说明该过程为动态淬灭。然而, 不同 pH 值三果汤与蛋白结合的  $K_q$  值均大于  $2\times 10^{10}$  L/(mol $\cdot$ s) (有生物高聚物的不同淬灭剂的最大散射碰撞淬灭常数), 表明该过程以形成基态复合物为主的静态淬灭<sup>[17]</sup>。同时, 该 Stern-Volmer 曲线仅在低浓度成线性, 高浓度区域非线性。综上, 三果汤与  $\beta$ -酪蛋白的作用是以静态淬灭为主, 高浓度时兼有动态淬灭过程。不同 pH 值三果汤与蛋白结合的  $K_q$  排序为 pH 5.5>pH 2.5>pH 3.5>pH 6.5>pH 4.5。

(3) 表观结合常数与结合位点数: 淬灭剂与蛋白的结合信息可以通过双对数方程反映。

$$\lg[(F_0-F)/F]=\lg K_a+n\lg[Q]$$

$K_a$  为表观结合常数,  $n$  为每个  $\beta$ -酪蛋白分子与三果汤多酚的结合位点数, 以  $\lg[(F_0-F)/F]$  对  $\lg[Q]$  作图计算得出

结合信息结果见图 3。pH 3.5 下 20  $^{\circ}$ C 和 30  $^{\circ}$ C 时, 三果汤与  $\beta$ -酪蛋白之间的  $K_a$  为  $3.08\times 10^4$  L/mol 和  $1.006\times 10^5$  L/mol,  $n$  为 1.19 和 1.32。温度升高,  $K_a$  增大, 表明三果汤与  $\beta$ -酪蛋白的结合过程有以共价形式存在的相互作用, 其中非离子形式起主要作用。表观结合常数排序为 pH 3.5>pH 5.5>pH 6.5>pH 2.5>pH 4.5。

**2.2.4 作用体系的稳定性** 多酚与蛋白的结合是一个可逆过程, 为评价荧光淬灭结果的可靠性, 测定三果汤- $\beta$ -酪蛋白作用体系在不同 pH 值条件下的稳

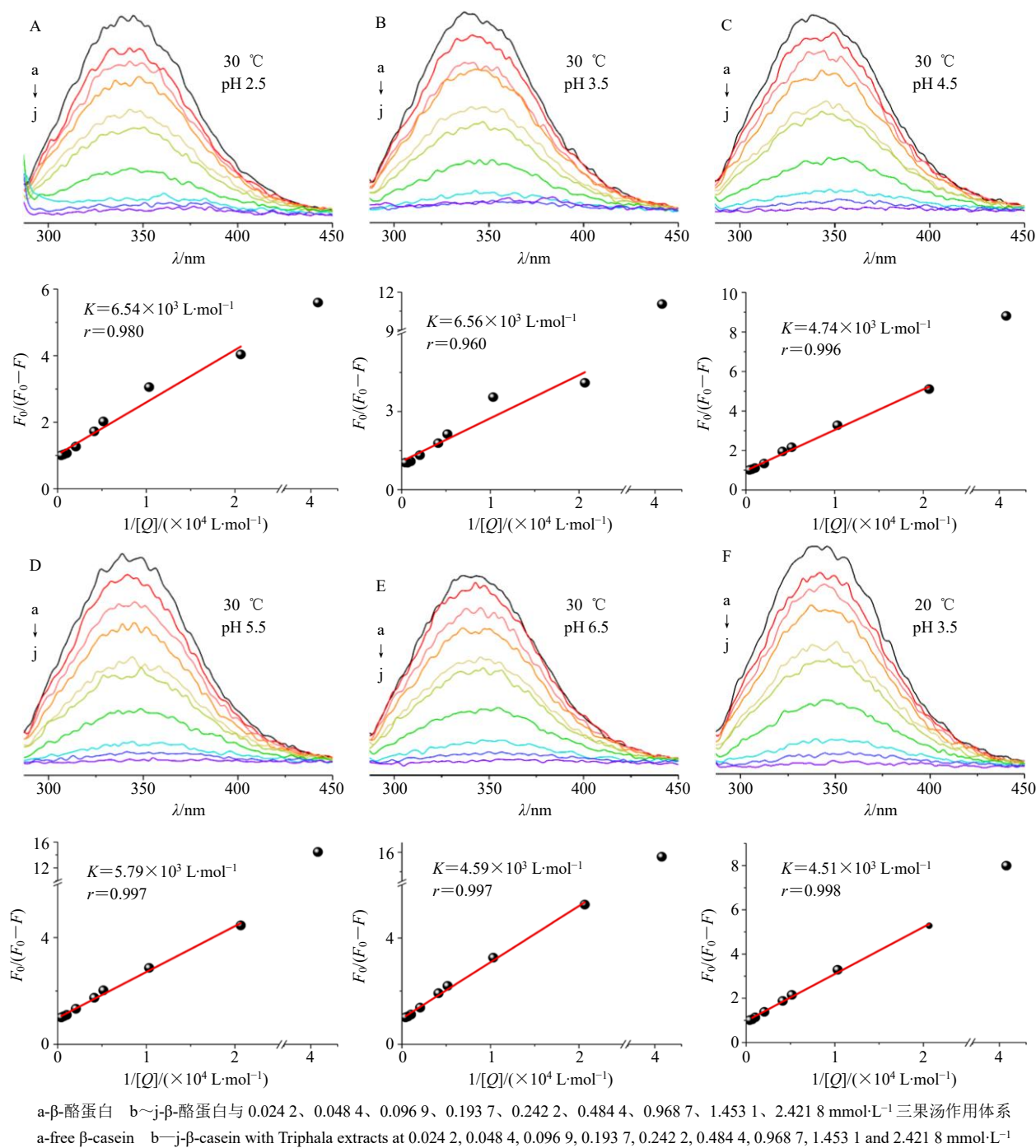


图 1 不同 pH 值三果汤-β-酪蛋白作用体系的荧光光谱与淬灭常数

Fig. 1 Fluorescence emission spectra of Triphala-β-casein interaction systems at different pH value

定性。采用基于多重光散射分析法的 Turbiscan 分析仪测定,评价指标为 Turbiscan 稳定性指数(Turbiscan stability index, TSI) [11]。

$$TSI = \sum_i \left( \sum_h |\text{scan}_i(h) - \text{scan}_{i-1}(h)| H \right)$$

$\text{scan}_i(h)$  为初始扫描时间下样品高度的光强度,  $\text{scan}_{i-1}(h)$  为最后扫描时间样品高度的光强度,  $H$  是样品的总高度

取 10 mL 含 β-酪蛋白唾液与 2 mL 不同 pH 值

三果汤样品于样品管混匀,定容至 20 mL,置于扫描池。设定测试参数:温度 (25.0±0.5) °C,间隔 30 s 扫描 1 次,测定时间 10 min,电发光二极管在近红外区域 (λ=880 nm) 对样品进行扫描。

背散射光谱 (图 4-A) 与稳定性指数 (图 4-B) 结果显示,不同 pH 值三果汤与 β-酪蛋白作用体系 10 min 内具有较高的稳定性,表明结合作用的可逆性未对荧光淬灭结果造成影响。因此,采用多酚-

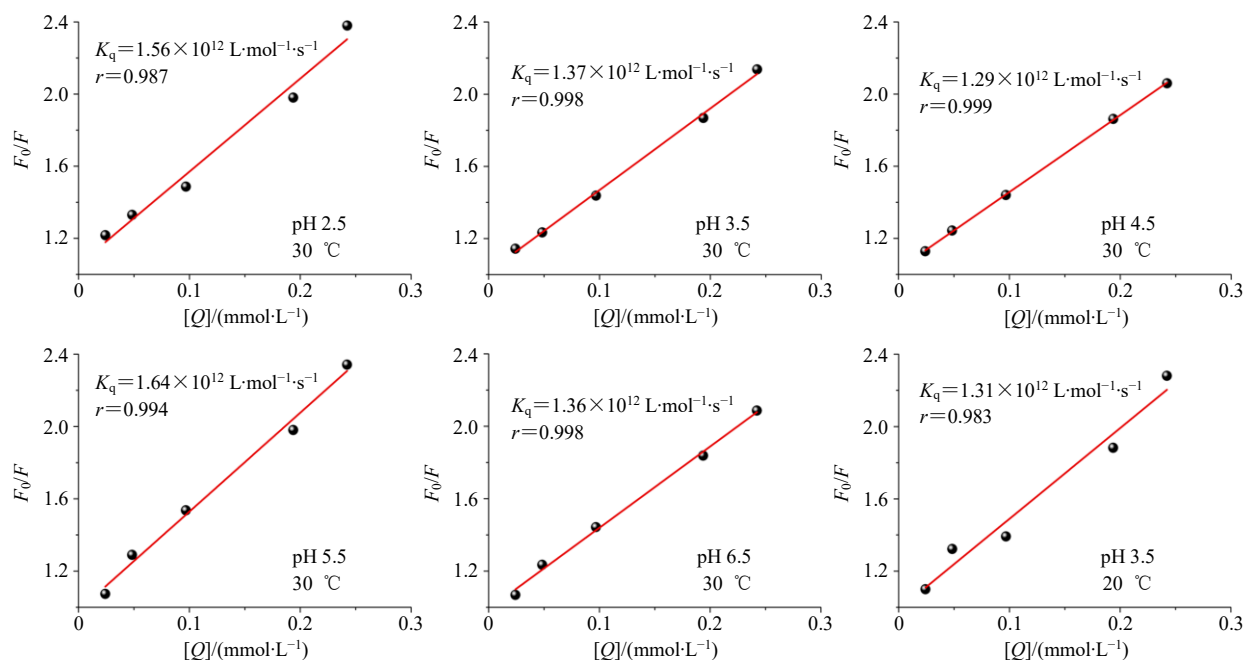


图 2 β-酪蛋白与不同 pH 值三果汤作用的 Stem-Volmer 曲线

Fig. 2 Stem-Volmer plots of fluorescence quenching of Triphala-β-casein interaction systems at different pH of Triphala

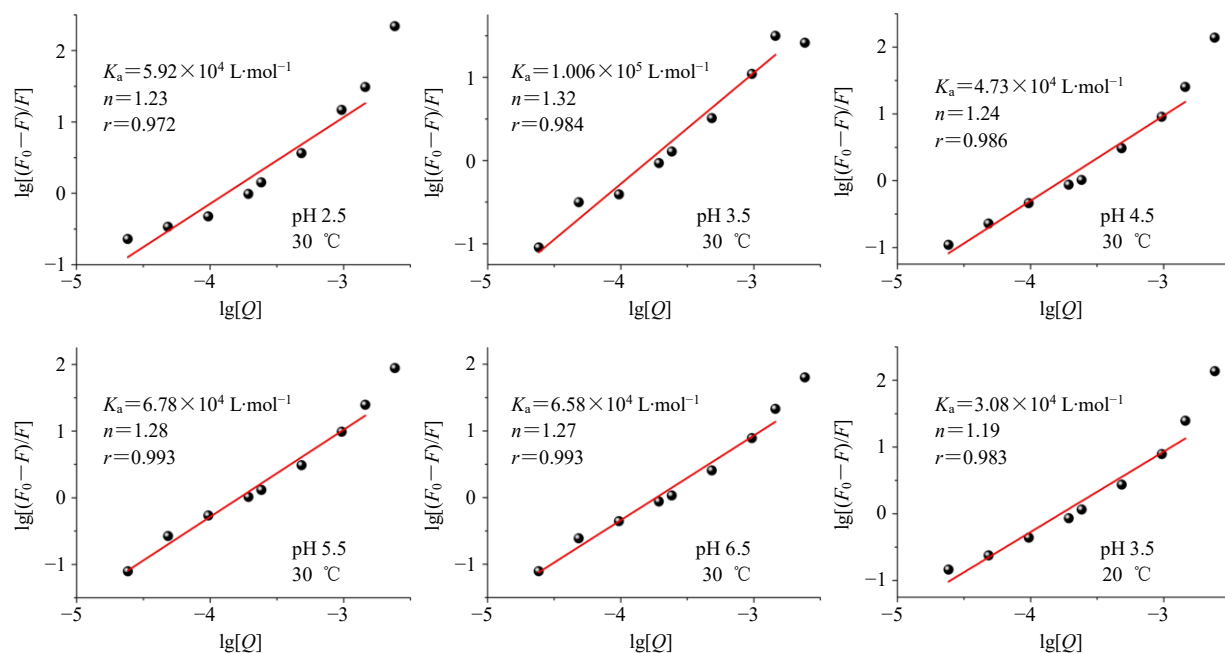


图 3 不同 pH 值三果汤淬灭 β-酪蛋白的双对数曲线

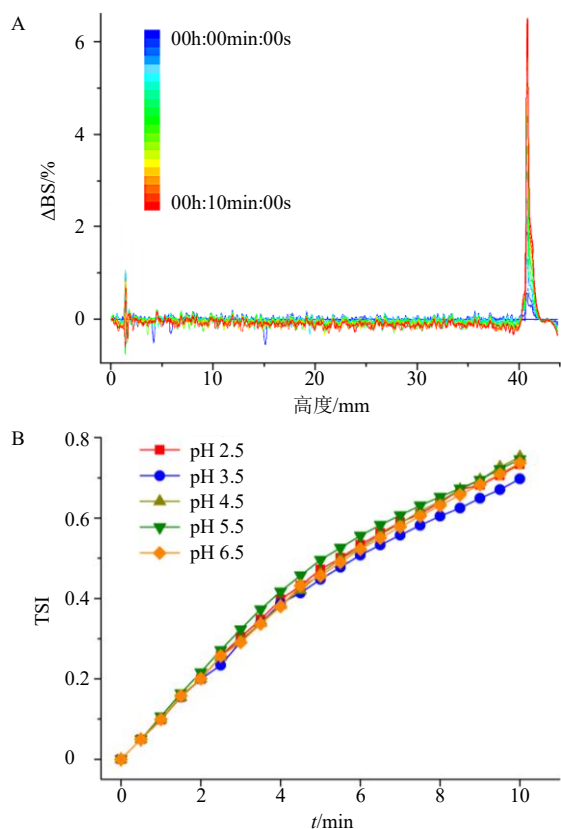
Fig. 3 Plot between  $\lg[(F_0-F)/F]$  and  $\lg[Q]$  in Triphala-β-casein interaction systems at different pH of Triphala

唾液蛋白作用作为涩味模型具有可靠性。结合荧光淬灭结果，pH 4.5 的三果汤与 β-酪蛋白结合能力最弱，涩味强度最低，故后续掩蔽方案将三果汤 pH 调节至 4.5。

### 2.3 TBT 的涩味掩蔽

**2.3.1 TBT 的制备** 按照“2.1.3”项提取工艺制得三果汤提取物，按照制剂生产处方[国家药品标准，

NO.WS3-912(Z-247)-2005(Z)]加入适量淀粉、糊精、矫味剂（蔗糖、阿司帕坦、柠檬酸、三氯蔗糖）混匀，制粒。过 14 目筛网整粒，等量加入硬脂酸镁。将薄荷脑溶于薄荷素油，均匀喷洒到颗粒上。混匀，压制成片，片质量 1 g。制得三果汤原含片（TBT1），由于原制剂处方辅料含有 0.6%柠檬酸，可能会影响口含片的 pH 值，故制备不含柠檬酸的三果汤原含



A-背散射光谱 ( $\Delta BS$ : 不同时间背散射光与初始差值) B-TSI  
A-Turbiscan backscattering profiles ( $\Delta BS$ : the difference between backscattering light at different times and initial) B-TSI

图 4 不同 pH 值三果汤与  $\beta$ -酪蛋白作用体系的稳定性

Fig. 4 Binding stability between Triphala at different pH and  $\beta$ -casein

表 1 TBT 制剂参数和崩解时间

Table 1 Tablet parameters and disintegrating time of TBT

| 处方   | 直径/mm            | 厚度/mm           | 硬度/N           | 体内崩解时间/min      | 体外崩解时间/min       |
|------|------------------|-----------------|----------------|-----------------|------------------|
| TBT1 | 16.21 $\pm$ 0.02 | 4.86 $\pm$ 0.02 | 53.1 $\pm$ 2.8 | 6.98 $\pm$ 2.18 | 12.35 $\pm$ 0.03 |
| TBT2 | 16.31 $\pm$ 0.02 | 4.87 $\pm$ 0.01 | 54.5 $\pm$ 2.5 | 5.87 $\pm$ 1.89 | 11.68 $\pm$ 0.15 |
| TBT3 | 16.38 $\pm$ 0.02 | 4.77 $\pm$ 0.02 | 48.1 $\pm$ 3.0 | 6.28 $\pm$ 1.99 | 10.97 $\pm$ 0.13 |
| TBT4 | 16.32 $\pm$ 0.01 | 4.71 $\pm$ 0.02 | 50.2 $\pm$ 3.5 | 6.77 $\pm$ 1.76 | 10.49 $\pm$ 0.21 |

觉正常,无抽烟、酗酒史)构成,实验经过成都中医药大学附属医院伦理委员会(批准编号:2014KL016)审核批准。首先,采用酸(柠檬酸)、苦(奎宁)、甜(蔗糖)、咸(氯化钠)、鲜(谷氨酸钠)、涩(鞣酸)6种味觉溶液测试志愿者的味觉灵敏度;再用鞣酸溶液(0.062 5、0.125、0.25、0.5、1、2、4、8 mg/mL)训练志愿者对涩味强度的认知,熟悉评价标准。最终,15名志愿者(5名男性和10名女性)参加TBT的涩味评估。志愿者将口含片置于口腔内,含服至无颗粒感,根据量表的标尺评分。

片(TBT2)。根据“2.2”项研究结果,调节三果汤pH值至4.5得到涩味掩蔽提取物,后续步骤与前面相同。最终得到三果汤掩味含片(TBT3)、不含柠檬酸的三果汤掩味含片(TBT4)。

**2.3.2 含片硬度、崩解时间的测定** 采用游标卡尺测定TBT的厚度和直径,片剂测试仪测量片剂的硬度。崩解时间的测定选取12名健康志愿者(20~30岁,来自成都中医药大学)评价。将片剂含于口腔内,直到片剂崩解完全,记录时间,得到其体内崩解时间;将900 mL水加热维持在(37.0 $\pm$ 0.5) $^{\circ}$ C,作为崩解介质,采用崩解仪测定含片的体外崩解时间。TBT的基本制剂质量参数见表1。掩味后2种含片的外观直径略大于原片,厚度变小,可能是由于硬度变小所导致。4种含片的体内崩解时间与体外崩解时间差异较大,可能是由于人体测试过程中会不自主的摩擦搅拌含片,故崩解时间缩短。4种TBT的体外崩解时间均能满足口含片不在10 min内全部崩解或溶化的要求。

### 2.3.3 涩味掩蔽效果评价

(1)电子舌评价:采用前期建立的电子舌涩味评价方法,以鞣酸为涩味标准物质,利用电子舌建立涩味评价模型,用鞣酸浓度表征4种含片的涩度<sup>[12]</sup>。

(2)感官分析验证:采用视觉模拟量表法(visual analogue scale, VAS)进行评估。感官评价小组来自成都中医药大学的健康志愿者(20~26岁,味

样品测试间隔,用纯水冲洗口腔至无涩味感,并给予一定时间休息。

(3)涩味掩蔽效果评价:不同处方TBT的涩味评价结果见图5。电子舌量化结果(图5-A、B)显示,pH调控后的掩味片(TBT3和TBT4)的涩度明显弱于调节前(TBT1和TBT2)。TBT1为原TBT,其涩度相当于5.92 mg/mL鞣酸的涩味;TBT2由原处方去掉柠檬酸制得,其涩度相当于2.89 mg/mL鞣酸;TBT3由掩味提取物制得,其涩味相当于0.54 mg/mL鞣酸;TBT4由掩味提取物以及去除柠檬酸

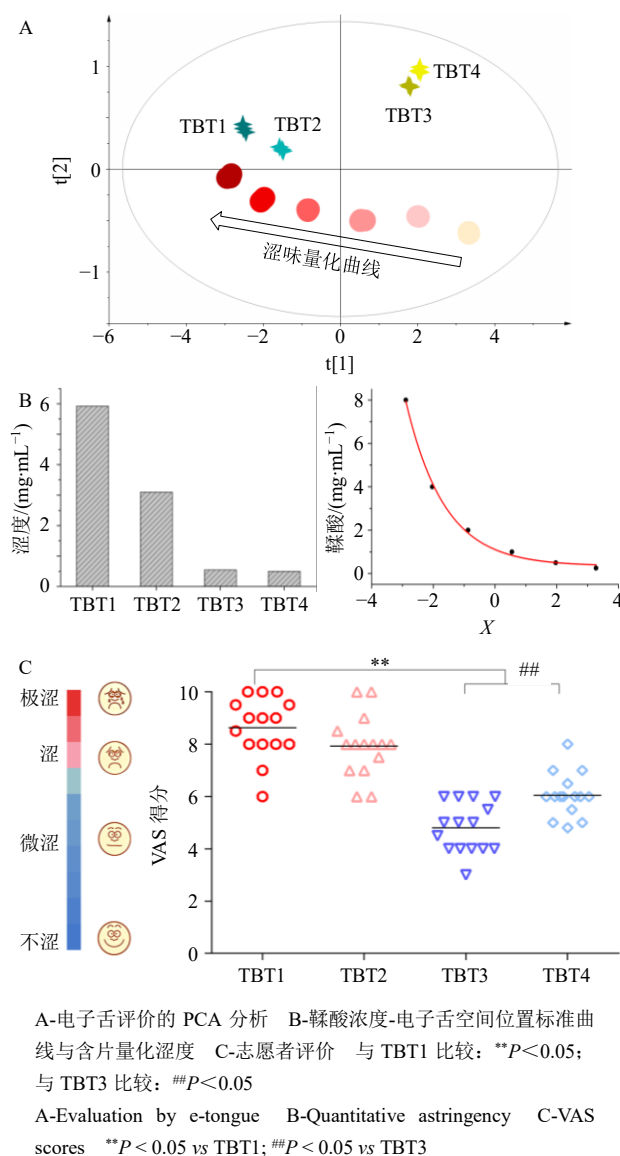


图 5 TBT 的掩味效果

Fig. 5 Astringent masking effect of TBT

处方制得,其涩度相当于 0.50 mg/mL 鞣酸。该结果与志愿者 VAS 评分结果(图 5-C)较为一致。电子舌与感官评价结果均表明,三果汤掩味含片(TBT3、TBT4)的涩味显著弱于 pH 调节前(TBT1、TBT2)。

柠檬酸对 2 种 pH 值三果汤提取物成型后片剂的涩味影响不同,可能是因为加入辅料后片剂的 pH 环境会有小幅升高。TBT2 为原提取物不加柠檬酸制备,故 pH 略高于 3.5,涩味弱于 TBT1(原提取物加柠檬酸)。TBT4 为掩味提取物不加柠檬酸制备,故 pH 略高于 4.5,涩味强于 TBT3(掩味提取物加柠檬酸)。最终以涩度值最低的 TBT3 制备工艺作为 TBT 的涩味掩蔽方法,即仅调节三果汤提取物 pH 值,其他工艺与原处方相同。

### 2.3.4 溶出度测定

(1)供试品溶液的制备:采用浆法测定 4 种 TBT 的溶出度,以没食子酸含量计。取 900 mL 经超声脱气处理的蒸馏水( $37.0 \pm 0.5$ ) $^{\circ}\text{C}$ 于溶出杯,设定转速 50 r/min。分别于 5、10、15、20、40、60 min 取样,0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过。精密称量 4 种 TBT,加入 25 mL 甲醇,超声提取 30 min,0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,用于含量测定。

(2)对照品溶液的制备:精密称取没食子酸对照品,加甲醇溶解,0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过。

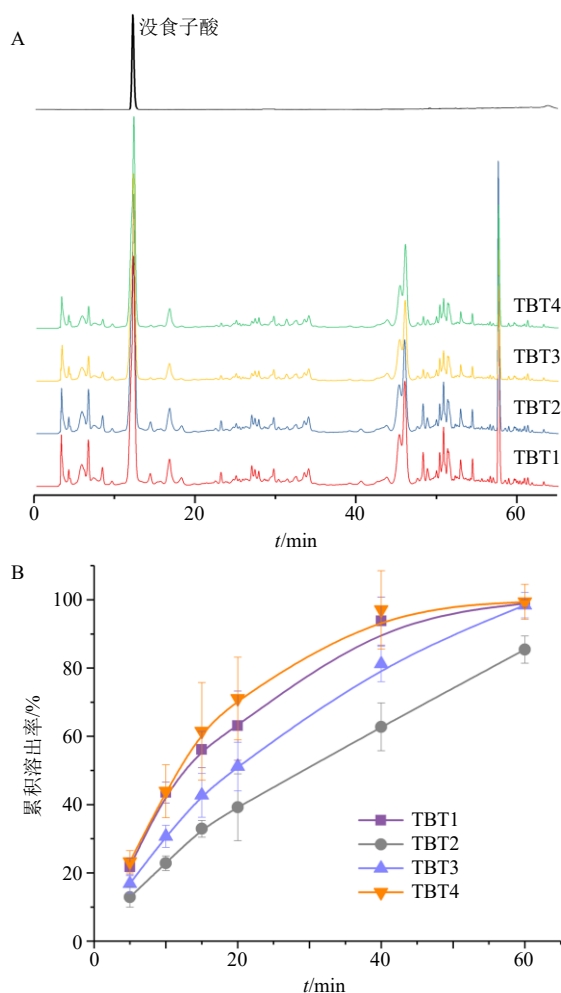
(3)色谱条件:色谱柱为 Welchrom C<sub>18</sub> 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相为 0.1%磷酸水溶液-甲醇;梯度洗脱程序为 0~6 min, 5%甲醇;6~15 min, 5%~7%甲醇;15~20 min, 7%~15%甲醇;20~25 min, 15%~21%甲醇;25~31 min, 21%~22%甲醇;31~41 min, 22%甲醇;41~45 min, 22%~32%甲醇;45~60 min, 32%~65%甲醇;60~65 min, 65%~5%甲醇;检测波长为 270 nm;体积流量 1.0 mL/min;柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ;进样量 20  $\mu\text{L}$ 。

(4)溶出度测定结果:以峰面积计算各时间点的累积溶出率,溶出曲线见图 6。图 6-A 为 4 种含片的含量测定色谱图。以 TBT1 为参照,TBT2、TBT3、TBT4 成分与其相似度分别为 0.997、0.991、0.989。TBT 质量标准以没食子酸计,图 6-B 显示 TBT2 中的没食子酸溶出度显著低于其他 3 种含片,TBT1、TBT3、TBT4 则基本相同。掩味含片 TBT3 的成分与原片仅有略微差异,质控成分没食子酸的溶出度与原片在 60 min 基本相同。

### 2.3.5 体外生物活性评价

(1)抗氧化活性:采用 DPPH 自由基清除能力测定 TBT 的抗氧化活性<sup>[13]</sup>。制备 0.04、0.08、0.12、0.16、0.20、0.24 mg/mL TBT 样品。采用紫外-可见分光光度计在 517 nm 处测定空白溶剂和样品溶液吸光度。将清除率与供试品中提取物浓度作图,建立两者函数方程,得到半抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。

(2)抑菌活性:采用纸片扩散法测定 TBT 对金黄色葡萄球菌、白色念珠菌的抑制活性<sup>[14]</sup>。将菌种接种至固体培养基,置于培养箱 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h。单一菌落接种至 50 mL 液体培养基,置于摇床 37  $^{\circ}\text{C}$  培养。调节菌落数至  $5 \times 10^7$  CFU/mL(金黄色葡萄球菌)、 $1 \times 10^7$  CFU/mL(白色念珠菌)。在固体培养基分别加入上述菌液各 200  $\mu\text{L}$ ,涂抹均匀。各取 1 片 TBT,分别溶解于 20 mL 人工唾液。将纸



A-含量测定的 HPLC 图谱 B-没食子酸的溶出曲线  
A-HPLC chromatogram for content determination  
B-dissolution curve of gallic acid

图 6 TBT 的溶出曲线

Fig. 6 Dissolution curves of TBT

片置于培养基, 加入 5  $\mu\text{L}$  样品溶液, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 24 h。测定抑菌圈的直径, 平行 6 份。

(3) 体外生物活性评价: 4 种 TBT 的抗氧化活性与抑菌活性见图 7。4 个处方的 DPPH 清除自由基活性  $\text{IC}_{50}$  分别为 0.143、0.143、0.147、0.152 mg/mL。掩味含片的抗氧化活性略低于原片。抑菌结果显示, 4 种含片均具有抑菌活性, 其中 TBT3 对金黄色葡萄球菌抑制活性较好, TBT1 对白色念珠菌抑制活性较好。综上, pH 值调节三果汤涩味对含片抗氧化活性与抑菌活性仅有轻微影响。

## 2.4 数据处理

运用 SPSS 22.0 软件对数据统计分析, 以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间采用单因素方差分析, 方差齐者组间进行 LSD 检验, 方差不齐者进行 Tamhane 检验。曲线拟合采用 Origin 9.0 软件, 主成分分析 (principal

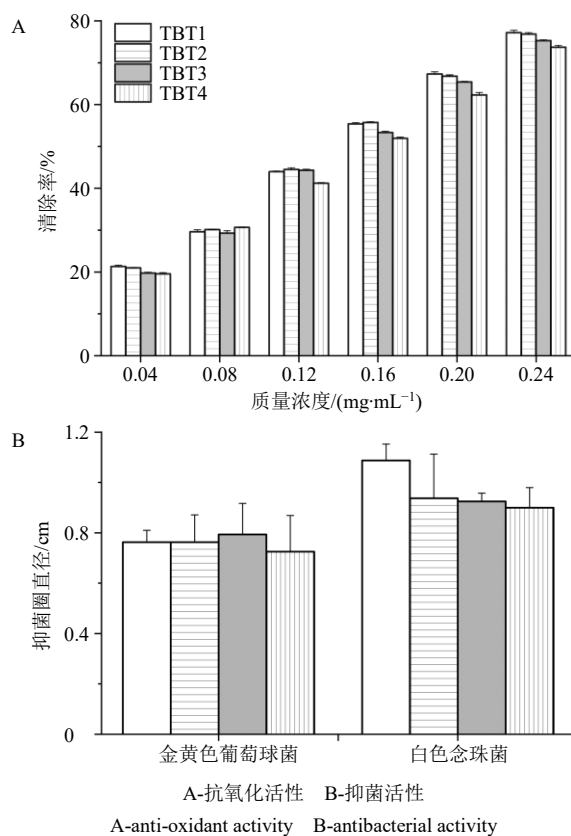


图 7 TBT 的药效作用评价

Fig. 7 Activity of TBT

component analysis, PCA) 采用 SIMCA-P 13.0 软件。

## 3 讨论

目前, 最常用的涩味掩蔽手段有去除多酚<sup>[18]</sup>、物理包覆<sup>[19]</sup>、添加矫味剂等。三果汤富含的没食子酸、鞣花酸等多酚是“清热利咽”的重要物质基础。环糊精包合等物理包覆掩味方法对于口含片这种特殊剂型并不适宜。口含片在口腔停留时间长, 过程中还伴随摩擦、咀嚼, 极有可能破坏包覆的物理结构, 导致多酚释放。药品生产上主要通过增大矫味剂用量改善口感, 效果有限且会对糖尿病等患者用药造成影响。基于 TBT 的特殊剂型与“清热利咽”的药效物质基础, 以上常规方法难以达到理想的掩蔽效果。

本实验从多酚-唾液蛋白相互作用的涩味产生机制出发, 通过 pH 值影响三果汤与唾液蛋白相互作用, 调控 TBT 涩味强度。三果汤在 pH 4.5 与唾液蛋白的结合作用最弱, 涩味掩蔽效果明显, 基本不影响抗氧化活性和抑菌活性。TBT 涩味的成功掩蔽表明, 通过 pH 调控多酚药物涩味的模式科学可行。此外, 与其它掩味手段相比, 该方法实用便捷, 无需复杂仪器, 只需在制剂环节中稍作简单的改变。

同时,涩味不仅广泛存在于药物,还集中在葡萄酒、茶、果汁等食品上。因此,该掩蔽模式不仅能在药物中应用,还可指导食品涩味的掩盖。

本研究发现三果汤多酚与  $\beta$ -酪蛋白结合具有 pH 依赖性,在宏观层面证明了通过 pH 调节多酚-唾液蛋白相互作用来掩蔽三果汤涩味方法的有效性。药物 pH 改变,多酚组成和状态会随之改变。pH 降低使多酚转变为未解离状态,通过氢键增加对唾液蛋白的亲合力<sup>[20]</sup>。同时,多酚还能改变蛋白的构象,不同类型多酚改变情况不同<sup>[15]</sup>。蛋白质作为一种两性电解质,pH 是决定其结构的重要因素。pH 变化会破坏在多肽链中形成盐桥的带电残基之间的静电相互作用,改变蛋白质折叠结构,影响与多酚的结合<sup>[21]</sup>。具体影响取决于蛋白质的等电点、分子电荷和构象等。因此,推测 pH 值主要通过影响多酚成分和唾液蛋白结构来调控涩味,下一步将从以上角度对 pH 掩蔽 TBT 涩味的机制开展研究。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Huang H Z, Zhao S Y, Ke X M, *et al.* Study on the stability control strategy of Triphala solution based on the balance of physical stability and chemical stabilities [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 158: 247-256.
- [2] 钟艳艳, 张琦, 伍红. HPLC 法测定藏成药三果汤含片中没食子酸含量 [J]. 中国民族医药杂志, 2010, 16(12): 46-47.
- [3] Soares S, Brandão E, Guerreiro C, *et al.* Tannins in food: Insights into the molecular perception of astringency and bitter taste [J]. *Molecules*, 2020, 25(11): 2590.
- [4] Gombau J, Nadal P, Canela N, *et al.* Measurement of the interaction between mucin and oenological tannins by Surface Plasmon Resonance (SPR); relationship with astringency [J]. *Food Chem*, 2019, 275: 397-406.
- [5] 范金波, 周素珍, 闫泳, 等. 分子对接结合荧光光谱法探究单宁酸与血清蛋白结合的 pH 依赖性 [J]. 中国食品学报, 2021, 21(10): 23-33.
- [6] Ramos-Pineda A M, Carpenter G H, García-Estévez I, *et al.* Influence of chemical species on polyphenol-protein interactions related to wine astringency [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(10): 2948-2954.
- [7] Engström M T, Sun X W, Suber M P, *et al.* The oxidative activity of ellagitannins dictates their tendency to form highly stabilized complexes with bovine serum albumin at increased pH [J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(47): 8994-9003.
- [8] 罗亚莉, 陈军, 康宏. 镍铬合金烤瓷全冠腐蚀性分析 [J]. 世界科技研究与发展, 2012, 34(3): 450-452.
- [9] Ma W, Baron A, Guyot S, *et al.* Kinetics of the formation of  $\beta$ -casein/tannin mixed micelles [J]. *RSC Adv*, 2012, 2(9): 3934.
- [10] Bennick A. Salivary proline-rich proteins [J]. *Mol Cell Biochem*, 1982, 45(2): 83-99.
- [11] 杨健, 雷帆, 蒋方程, 等. 海藻糖和蔗糖对纳米乳液冻融稳定性的影响 [J]. 食品科技, 2021, 46(1): 232-238.
- [12] Han X, Jiang H, Zhang D K, *et al.* A novel quantitative prediction approach for astringency level of herbs based on an electronic tongue [J]. *Pharmacogn Mag*, 2017, 13(51): 492-497.
- [13] 姜红, 史亚军, 赵生玉, 等. 基于偏最小二乘法对三果汤抗氧化作用谱-效关系的分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(3): 8-12.
- [14] 何彦峰, 王瑞楠, 张璐璐, 等. 胡芦巴叶挥发油的萃取工艺、成分分析及抗氧化和抑菌活性研究 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(13): 3161-3168.
- [15] Hasni I, Bourassa P, Hamdani S, *et al.* Interaction of milk  $\alpha$ - and  $\beta$ -caseins with tea polyphenols [J]. *Food Chem*, 2011, 126(2): 630-639.
- [16] Bourassa P, Bariyanga J, Tajmir-Riahi H A. Binding sites of resveratrol, genistein, and curcumin with milk  $\alpha$ - and  $\beta$ -caseins [J]. *J Phys Chem B*, 2013, 117(5): 1287-1295.
- [17] 薛瑾. 茶多酚-蛋白纳米复合物的研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2014.
- [18] Ran F, Han X, Deng X, *et al.* High or low temperature extraction, which is more conducive to Triphala against chronic pharyngitis? [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 140: 111787.
- [19] 林俊芝, 张定堃, 段渠, 等. 中药涩味的形成原理及掩蔽技术的研究概况 [J]. 中草药, 2014, 45(18): 2716-2721.
- [20] Pires M A, Pastrana L M, Fuciños P, *et al.* Sensorial perception of astringency: Oral mechanisms and current analysis methods [J]. *Foods*, 2020, 9(8): 1124.
- [21] 宗小红. 铜离子和 pH 对再生丝素蛋白二级结构的影响 [D]. 上海: 复旦大学, 2005.

[责任编辑 郑礼胜]