

电子舌在羟丙基- β -环糊精抑苦规律研究中的应用

李学林^{1,2}, 陈鹏举^{1,3}, 桂新景^{1,2}, 施钧瀚^{2,3}, 张璐^{2,3}, 康冰亚^{2,3}, 田亮玉¹, 陈玉欢¹, 刘瑞新^{1,2,3*}

1. 河南中医药大学, 河南 郑州 450008

2. 河南中医药大学第一附属医院 药学部, 河南 郑州 450000

3. 国家中医药管理局 中药制剂三级实验室, 河南 郑州 450000

摘要: **目的** 采用电子舌技术研究羟丙基- β -环糊精(HP- β -CD)质量浓度(C)变化对苦味化合物及苦味中药的抑苦规律。**方法** 以盐酸小檗碱、氧化苦参碱、苦参水煎液、穿心莲水煎液为苦味载体,基于口尝评价结果(ΔI)和电子舌信息(ΔI_e),分别建立 ΔI - C 、 ΔI_e - C 2个抑苦规律模型、探索 ΔI - ΔI_e 两者的抑苦效果预测模型,并使用交叉验证和残差分析法对预测模型的拟合精度和优度进行评价。**结果** 对4种苦味载体均建立了良好的 ΔI - C 威布尔抑苦规律模型,决定系数(R^2)依次为0.999 6、0.987 9、0.996 4、0.998 4($P < 0.01$);盐酸小檗碱、苦参水煎液和穿心莲水煎液的6个(每个载体2根传感器) ΔI_e - C 威布尔抑苦规律模型的 R^2 依次为0.996 5、0.991 6、0.997 3、0.989 3、0.999 6、0.999 1($P < 0.01$);相应的6个 ΔI - ΔI_e 线性抑苦效果预测模型的 R^2 依次为0.989 1、0.968 3、0.989 0、0.982 0、0.977 9、0.986 1($P < 0.01$);上述6个预测模型交叉验证的相关系数(R)依次为0.986 0、0.997 3、0.988 4、0.960 8、0.980 2、0.983 9($P < 0.01$)。测试质量浓度范围内的氧化苦参碱对电子舌4根传感器均无随浓度变化的差异性响应,因此未能建立各类模型。**结论** 基于电子舌方法得到了随HP- β -CD质量浓度变化的抑苦规律,建立了以HP- β -CD质量浓度或电子舌数据为基础的预测模型,可用于相关抑苦效果预测。部分苦味化合物对电子舌的响应没有相关规律,有待电子舌技术的进一步研发。

关键词: 电子舌; HP- β -CD; 掩味; 抑苦规律; 抑苦效果预测模型; 盐酸小檗碱; 氧化苦参碱; 苦参; 穿心莲; 交叉验证

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)20-4235-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.20.018

Application of electronic tongue in pattern study about bitterness inhibition by hydroxypropyl- β -cyclodextrin

LI Xue-lin^{1,2}, CHEN Peng-ju^{1,3}, GUI Xin-jing^{1,2}, SHI Jun-han^{2,3}, ZHANG Lu^{2,3}, KANG Bing-ya^{2,3}, TIAN Liang-yu¹, CHEN Yu-huan¹, LIU Rui-xin^{1,2,3}

1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China

2. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China

3. The Level Three Laboratory of Chinese Traditional Medical Preparation of State Administration of TCM, Zhengzhou 450000, China

Abstract: Objective To study the bitterness inhibition law of hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) concentration (C) on the bitter compounds and bitter Chinese herbal medicine, and to explore the application of electronic tongue in this study. **Methods** Berberine, oxymatrine, *Sophora flavescens*, and *Andrographis paniculata* decoction were used as bitterness vectors to establish two models of bitterness inhibition law about ΔI - C and ΔI_e - C , and to explore the prediction model of bitterness inhibition effect about ΔI - ΔI_e , based on the oral taste evaluation results (ΔI) and electronic tongue information (ΔI_e). Then, fitting precision and fitting goodness of the prediction model were evaluated with cross-validation and residual analysis. **Results** In this study, good Weibull model of bitterness inhibition pattern about ΔI - C were established for all the four bitterness vectors, the decision coefficient R^2 are as followed: 0.999 6, 0.987 9, 0.996 4, and 0.998 4 ($P < 0.01$); The decision coefficient R^2 of six (two sensors per vector) models of

收稿日期: 2017-05-25

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(81001646); 国家自然科学基金面上项目(81774452); 河南中医学院省属高校基本科研业务费优青培育项目(2014KYYWF-YQ01); 河南省中医管理局中医药科学研究专项课题(2014ZY02066)

作者简介: 李学林(1960—),男,教授,博士生导师,主任药师,从事中药应用形式研究。Tel: (0371)66245142 E-mail: xuelinli450000@163.com

***通信作者** 刘瑞新(1980—),男,博士,研究生导师,副主任药师,从事中药药剂及其质控分析研究。

Tel: (0371)66233562 E-mail: liuruixin7@163.com

bitterness inhibition law about ΔI_c -C of berberine, *S. flavescens*, and *A. paniculata* decoctions were as followed: 0.996 5, 0.991 6, 0.997 3, 0.989 3, 0.999 6, and 0.999 1 ($P < 0.01$); The decision coefficient R^2 of six corresponding linear prediction models of bitterness inhibition effect about $\Delta I/\Delta I_c$ were as followed: 0.989 1, 0.968 3, 0.989 0, 0.982 0, 0.977 9, and 0.986 1 ($P < 0.01$); The correlation coefficient R calculated by correlation coefficient of six prediction models above were as followed: 0.986 0, 0.997 3, 0.988 4, 0.960 8, 0.980 2, and 0.983 9 ($P < 0.01$); No model was established for oxymatrine within the range of tested concentration in this research, as it didn't respond to the four sensors with varied concentration. **Conclusion** Based on this method, the bitterness inhibition law of HP- β -CD with changed concentration was obtained. Prediction models based on HP- β -CD concentration or electronic tongue data were also established, they can be used to predict the relative bitterness inhibition effect. Part of the bitter compounds didn't response to the electronic tongue regularly, remain further research and development of electronic tongue technology.

Key words: electronic tongue; HP- β -CD; taste masking; bitterness inhibition law; prediction model of bitterness inhibition effect; berberine; oxymatrine; *Sophora flavescens* Ait.; *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees; cross-validation

药物的不良味道尤其是苦味是最让人难以接受的^[1]。然而不幸的是,大多数味觉不佳的药物活性成分都是苦的。对《中国药典》2015 年版一部进行统计发现,药材和饮片部分中共 618 种药材,有苦味口感描述的药材占 49%;而 1 493 种中药成方制剂和单味制剂中,性状被描述为具有不同程度不良苦味口感的比例达 75%^[2]。因此,对药物进行抑苦方面的研究,以降低苦度(intensity of bitterness, I)提高患者服药的依从性,正越来越受到药学工作者的重视^[3-6]。

抑苦研究中, β -环糊精(β -CD)是常用的苦味抑制剂,它能与药物形成包合物以阻断药物分子与味蕾的接触,从而降低苦味药物刺激性^[7],广泛应用于药物的掩味。羟丙基- β -CD(HP- β -CD)通过化学改性方法打开了 β -CD 分子内氢键,较 β -CD 水溶性大为提高^[8],尤其适用于液体制剂的掩味;盐酸小檗碱(berberine hydrochloride, BBR)和氧化苦参碱(oxymatrine, OMT)为传统中药黄连和苦参中的主要生物活性成分,具有广泛的药理学活性^[9-10],其味感较苦,常被作为中药掩味的单体化合物类研究载体^[11];另选用苦参和穿心莲作为中药饮片水煎液类苦味载体,苦参 *Sophorae Flavescentis Radix* 和穿心莲 *Andrographis Herba* 在《中国药典》2015 年版中都被描述为味极苦,可以作为代表性苦味中药载体。

对抑苦效果的评价通常有 2 种方法,一种是基于口尝的方法,简称口尝法,也是目前广泛应用于食品和药学领域口感评价的方法^[12-13];另一种是采用类似味觉细胞工作原理的人工脂膜传感器实现对样品信息收集的电子舌技术,相比口尝法具有灵敏度高、可靠性强、重复性好等优势^[14]。这 2 种评价手段在药物抑苦研究方面的应用目前集中在药物味

道辨别及抑苦后对比分析^[15],未见关于苦味抑制的抑苦规律或建立抑苦效果预测模型相关报道。

本研究拟以上述 4 种代表性苦味化合物或中药为研究载体,基于口尝法和电子舌方法探索 HP- β -CD 的抑苦规律,并探讨电子舌用于预测抑苦效果的可行性,为相关抑苦规律研究及抑苦效果预测模型体系的建立提供借鉴。

1 仪器与材料

日本 Insent 公司研发的 TS-5000Z 型电子舌,本实验使用 AE1、C00、AN0、BT0 传感器;CP225D 型十万分之一电子天平,精密度 0.01 mg,德国 Sartorius 公司;HK250 型科导台式超声清洗器,上海科导超声仪器有限公司;LXJ-IIB 型低速大容量多管离心机,上海安亭科学仪器厂;AM-5250B 型磁力搅拌器,天津奥特赛恩斯仪器有限公司。

HP- β -CD,批号 20150503,购于山东滨州智源生物有限公司;BBR,批号 C025A150705,购于四川协力制药有限公司;OMT,批号 YHKSJ20150717,购于西安昊轩生物科技有限公司;苦参 *Sophorae Flavescentis Radix* (SFR,批号 160608)、穿心莲 *Andrographis Herba* (ADH,批号 141007),河南中一医药有限责任公司,经河南中医药大学第一附属医院陈天朝主任药师鉴定,分别为豆科苦参属植物苦参 *Sophora flavescens* Ait. 的干燥根和爵床科穿心莲属植物穿心莲 *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees 的干燥地上部分。

2 方法与结果

2.1 评价指标的选择

2.1.1 口尝法抑苦评价指标的选择 I 是物质苦味程度的量度,采用口尝法对苦度进行测试。用公式表示为 $I = (I_1 + I_2 + \dots + I_n)/n$, $n \geq 20$,其中 n 为口尝测试的志愿者人数, I_1 、 I_2 、 $\dots$ 、 I_n 为每人测试的

具体 I 值。本研究中,选择苦度降低值 (ΔI) 作为口尝法抑苦评价指标,以判断抑苦效果。

$$\Delta I=I_a-I_b$$

I_a 为掩味前 I , I_b 为掩味后 I

2.1.2 电子舌法抑苦评价指标的选择 本测试选择 TS-5000Z 型电子舌中常用来评价苦味的 4 根传感器 AN0、BT0、C00、AE1 进行测试,各传感器所产生的响应信号及其所代表的味觉信息如表 1 所示,其

中部分传感器有先味 (relaive value, R) 及回味 (change of membrane potential caused by adsorption, CPA) 2 种响应信号,皆为电子舌苦度 (E -tongue bitterness intensity, I_e) [16]。将传感器浸没在参比溶液中 (参比溶液几乎没有味道,在系统中相当于人的唾液),得膜电势 V_r ,后将传感器浸没在样品溶液中得膜电势 V_s ;用参比溶液短暂清洗传感器后,再将传感器浸入到新的参比溶液中,得膜电势 V'_r 。

表 1 4 根味觉传感器代表的味觉信息
Table 1 Taste information represented by four taste sensors

传感器名称	对应的味觉	味觉信息	
		先味	回味
C00	酸性苦味	苦味 (bitterness)	酸性苦味回味 (aftertaste-B)
AN0	碱性苦味	—	碱性苦味回味 (B-bitterness2)
BT0	碱基盐类苦味	—	碱基盐类苦味回味 (H-bitterness)
AE1	涩味	涩味 (astringency)	涩味回味 (aftertaste-A)

— 表示没有先味指标
— there was no relaive value

先味及回味分别表示为

$$R=V_s-V_r$$

$$CPA=V'_r-V_r$$

本研究中,电子舌苦度降低值 (ΔI_e) 又分为先味降低值 (ΔR) 和回味降低值 (ΔCPA),以 ΔI_e 作为电子舌法抑苦评价指标,以判断抑苦效果。

$$\Delta R=R_a-R_b$$

$$\Delta CPA=CPA_a-CPA_b$$

R_a 、 CPA_a 分别表示抑苦前电子舌 R 和 CPA 信息值, R_b 、 CPA_b 分别表示抑苦后电子舌 R 和 CPA 信息值

2.2 待测样品制备

2.2.1 含 HP-β-CD 的化合物类苦味载体样品溶液的制备 将 BBR 和 OMT 分别配制成质量浓度为 0.050 mg/mL 和 0.073 mg/mL 的溶液作为化合物类苦味载体原液。以 BBR 原液为溶剂配制含 HP-β-CD 质量浓度为 0、5.00、8.00、12.81、20.50、32.81、52.41 mg/mL 的 7 份药液,编号依次记为 $B_1\sim B_7$;以 OMT 原液为溶剂配制含 HP-β-CD 的质量浓度同上的 7 份药液,编号依次记为 $O_1\sim O_7$ 。

2.2.2 含 HP-β-CD 的中药饮片水煎液类苦味载体样品溶液的制备

(1) 苦味载体样品溶液制备:按《中国药典》2015 年版规定中药用药量范围的平均值 (如苦参用量为 4.5~9.0 g,则取 6.75 g) 的 10 倍量取苦参和穿心莲饮片,分别置适宜容器中加水 2 000 mL 浸泡

30 min,再置于电磁炉上以 2 100 W 功率加热,沸腾后功率改为 800 W 煎煮 20 min,滤出;二煎加水 2 000 mL 直接加热至沸腾后煎煮 10 min,余同一煎;合并滤液,冷至室温,4 000 r/min 离心 15 min 后取上清液定容至 4 000 mL,灌装,压盖,灭菌,备用;如上方法重复 1 次得实验所需苦参和穿心莲苦味载体样品溶液,以之为原液。

(2) 抑苦后待测样品的制备:以苦参水煎液原液为溶剂,配制含 HP-β-CD 质量浓度为 0、5.00、8.00、12.81、20.50、32.81、52.41 mg/mL 的 7 份药液,编号依次记为 $R_1\sim R_7$;以穿心莲水煎液原液为溶剂,配制含 HP-β-CD 的质量浓度同上的 7 份药液,编号依次记为 $A_1\sim A_7$ 。

2.3 口尝测试

2.3.1 志愿者筛选 经河南中医药大学第一附属医院伦理委员会审查批准后,课题组对招募的志愿者进行了包括苦味敏感度等在内的严格筛选,最终选择 28 名健康志愿者 (男 12 名、女 16 名),在试验前签订知情同意书。

2.3.2 参比样品组的浓度选择及样品制备 参照文献方法 [3],将苦味分为 5 级,每个级别再赋予一定的苦度值范围。配制不同质量浓度的 BBR 溶液作为参比样品组,见表 2。

2.3.3 志愿者口感评价结果同参比样品组既定苦度值之间的“标化” 参照文献方法 [3],分别取 37 ℃

表2 苦度等级与对应的参比样品的浓度

Table 2 Level of bitterness intensity and concentration of corresponding reference sample

编号	苦味程度描述	级别	I	参比样品质量浓度/(mg·mL ⁻¹)
1	不苦	I	[0.5, 1.5)	0
2	微苦	II	[1.5, 2.5)	0.01
3	中等苦度	III	[2.5, 3.5)	0.05
4	很苦(但仍可接受)	IV	[3.5, 4.5)	0.10
5	极苦(几乎不能接受)	V	[4.5, 5.5]	0.50

温育下各质量浓度的参比溶液 20 mL 于口尝杯中, 由志愿者含于口中, 计时 15 s, 此间口腔做漱口动作, 以使舌根及舌测的苦味感受区能够感受药物苦味, 并被告知该参比溶液的苦度分级和具体苦度值, 吐出, 漱口 5 次, 至口腔内无苦味, 15 min 后测定另一质量浓度的参比溶液。

2.3.4 口尝实验程序 同上操作, 受试者根据自己的口尝感受, 结合之前参比液的苦度等级和苦度值, 确定“2.2”项下某样品所在的苦度级别, 并给出具体的苦度值, 记录于预先设计好的“苦味等级评价表”中, 漱口, 至口腔内无苦味, 15 min 后测定另一样品。

2.3.5 离群值的处理 由于本实验对象为生物样本, 且不同受试者之间可能存在个体差异, 实验测试数据中可能有个别异常值, 但不能随意取舍, 因此采用 Grubbs 检验法对数据进行了异常值的循环检验和剔除^[17]。每一组每一轮仅剔除 1 个异常值。口尝试验中过大的异常值和过小的异常值均有存在的可能, 因此采用双侧检验进行剔除。考虑到生物样本的特点, 本实验选择检出水平为 0.1、剔除水平为 0.05。由文献方法^[17], 自动根据内嵌的 Grubbs 临界值 $G_p(n)$ 表查对, 对 4 组实验结果中达到剔除水平的数据进行循环剔除, 剔除后不再进行插值或补充测试。经查对, 本研究 784 个口尝测试数据中共有 23 个异常值被剔除。

2.3.6 样品口尝 ΔI 与 HP- β -CD 质量浓度 C 的关系 根据参考文献报道^[18], 由韦伯-费希纳定律 (Weber-Fechner Law, WFL) 关于中等强度刺激条件下人类的感官强度与刺激物理量呈对数关系的规律 ($S=k\lg R$), 基于 ΔI 和 C , 采用“规划求解”方法得到威布尔关系模型 (f_1) 和对数关系模型 (f_2)。

$$f_1(C)=\beta\{1-\exp[-(C-\alpha)^m/k]\}$$

$$f_2(C)=a\ln C+b$$

a 、 b 、 α 、 β 、 m 、 k 为待定参数

最终选择拟合精度最优的威布尔模型作为 4 种

苦味载体 ΔI 与 C 之间的抑苦规律模型, 用 $\bar{x} \pm s$ ($n=28$) 表示每个质量浓度对应的苦度观测结果, 如图 1 所示。4 种苦味载体威布尔模型相应的拟合方程依次如下。

$$f_3(C)=2.79\{1-\exp[-(C-3.88)^{0.97}/20.72]\} \quad (R^2=0.999\ 6, P<0.01, n=6)$$

$$f_4(C)=1.56\{1-\exp[-(C-0.21)^{1.54}/86.72]\} \quad (R^2=0.987\ 9, P<0.01, n=6)$$

$$f_5(C)=2.43\{1-\exp[-(C-4.63)^{0.61}/9.78]\} \quad (R^2=0.996\ 4, P<0.01, n=6)$$

$$f_6(C)=2.41\{1-\exp[-(C-3.09)^{0.89}/9.11]\} \quad (R^2=0.998\ 4, P<0.01, n=6)$$

2.4 电子舌测试

2.4.1 电子舌测试程序 TS-5000Z 型电子舌测量程序: 首先在清洗液中清洗 90 s, 接着用 2 组相同的参比液依次各清洗 120 s, 传感器于平衡位置归零 30 s 达到平衡条件后开始测试。取“2.2”项中样品溶液, 采集数据 30 s 得传感器先味响应值, 在上述 2 组参比液中分别清洗 3 s 后, 传感器插入新的参比液中采集数据 30 s 得回味响应值; 循环测试 4 次, 去掉第 1 次循环, 取后 3 次平均数据作为传感器先味值及回味值结果。每次清洗、平衡和测试回味的液体均分布在不同样品杯中。

2.4.2 基于响应结果对适用于不同样品的传感器的筛选 图 2 显示了 4 种样品的味觉雷达图, 其中坐标轴单位表示样品 I_e 值, 图例代表不同 HP- β -CD 质量浓度 C 。由图 2 可知, BBR 作苦味载体时, B-bitterness2 和 H-bitterness 均有较显著响应, 随 C 增大 I_e 有降低趋势; OMT 作苦味载体时, 4 个传感器响应微弱; 苦参水煎液和穿心莲水煎液作苦味载体时, 随 C 增大 bitterness 和 aftertaste-B 的 I_e 值均呈降低趋势。因此选择传感器 AN0 和 BT0 评价对 BBR 抑苦后效果; 选择传感器 C00 评价对苦参水煎液和穿心莲水煎液抑苦后效果; 电子舌无法评价此质量浓度下 OMT 抑苦效果。

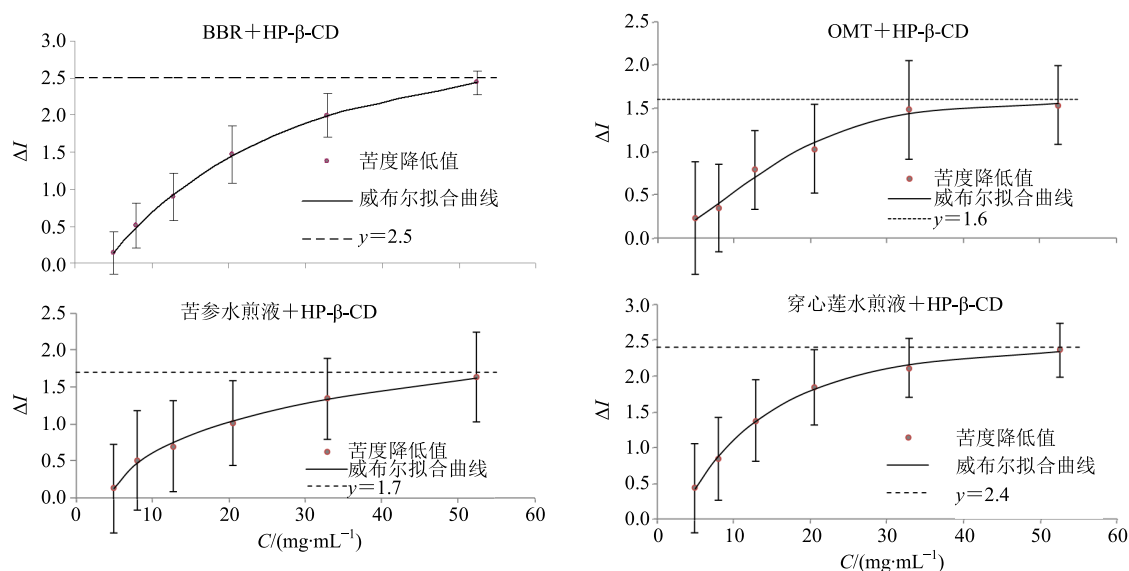


图 1 4 种苦味载体 ΔI 与 C 之间的抑苦规律模型

Fig. 1 Models of bitterness inhibition law between ΔI and C of four bitterness vectors

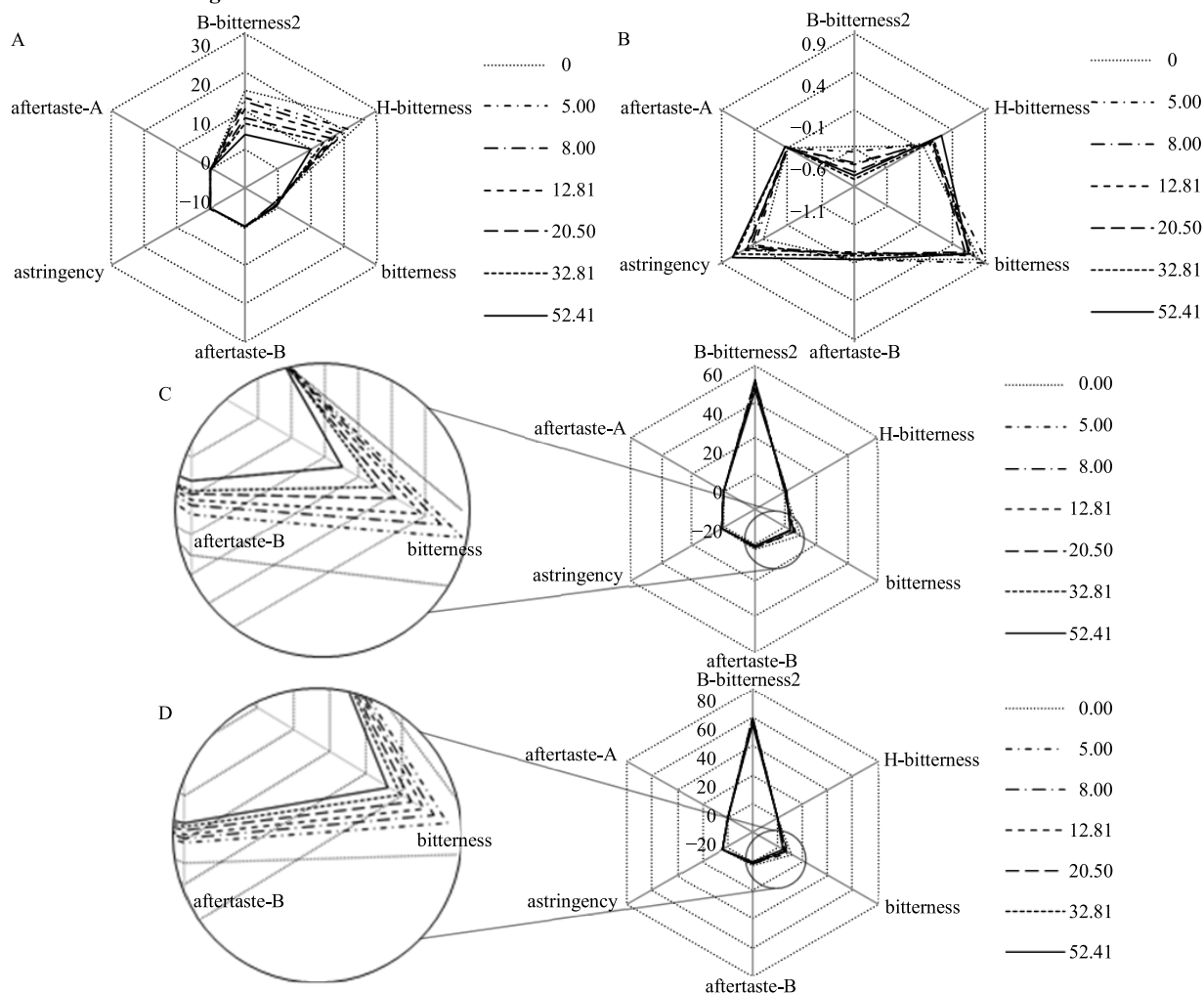


图 2 BBR+HP- β -CD (A)、OMT+HP- β -CD (B)、苦参水煎液+HP- β -CD (C) 和穿心莲水煎液+HP- β -CD (D) 样品的味觉信息雷达图

Fig. 2 Taste information radar chart of BBR + HP- β -CD (A), OMT + HP- β -CD (B), *Sophora flavescens* decoction + HP- β -CD (C), and *Andrographis paniculata* decoction + HP- β -CD (D) samples

2.4.3 样品电子舌 ΔI_e 与 HP- β -CD 质量浓度 C 的关系 参考“2.3.6”项中模型建立方法,根据“2.4.2”下对传感器响筛选结果,最终选择拟合精度最优的威布尔模型作为 BBR、苦参水煎液、穿心莲水煎液 3 种苦味载体 ΔI_e 与 C 之间的抑苦规律模型,用 $\bar{x} \pm s$ ($n=3$) 表示每个质量浓度对应的 ΔI_e 值,如图 3 所示。3 种苦味载体威布尔模型相应的拟合方程依次如下。

BBR+HP- β -CD, B-bitterness2:

$$f_7(C) = 929.51 \{1 - \exp[-(C - 3.37)^{0.50}/553.66]\} \quad (R^2 = 0.9916, P < 0.01, n = 6)$$

BBR+HP- β -CD, H-bitterness:

$$f_8(C) = 961.05 \{1 - \exp[-(C - 1.79)^{0.53}/492.02]\} \quad (R^2 =$$

$$0.9965, P < 0.01, n = 6)$$

苦参水煎液+HP- β -CD, bitterness:

$$f_9(C) = 129.50 \{1 - \exp[-(C - 1.27)^{0.29}/57.42]\} \quad (R^2 = 0.9973, P < 0.01, n = 6)$$

苦参水煎液+HP- β -CD, aftertaste-B:

$$f_{10}(C) = 119.39 \{1 - \exp[-(C - 3.21)^{0.17}/123.24]\} \quad (R^2 = 0.9893, P < 0.01, n = 6)$$

穿心莲水煎液+HP- β -CD, bitterness:

$$f_{11}(C) = 23.60 \{1 - \exp[-(C - 2.88)^{0.28}/10.03]\} \quad (R^2 = 0.9996, P < 0.01, n = 6)$$

穿心莲水煎液+HP- β -CD, aftertaste-B:

$$f_{12}(C) = 21.30 \{1 - \exp[-(C - 3.40)^{0.21}/25.93]\} \quad (R^2 = 0.9991, P < 0.01, n = 6)$$

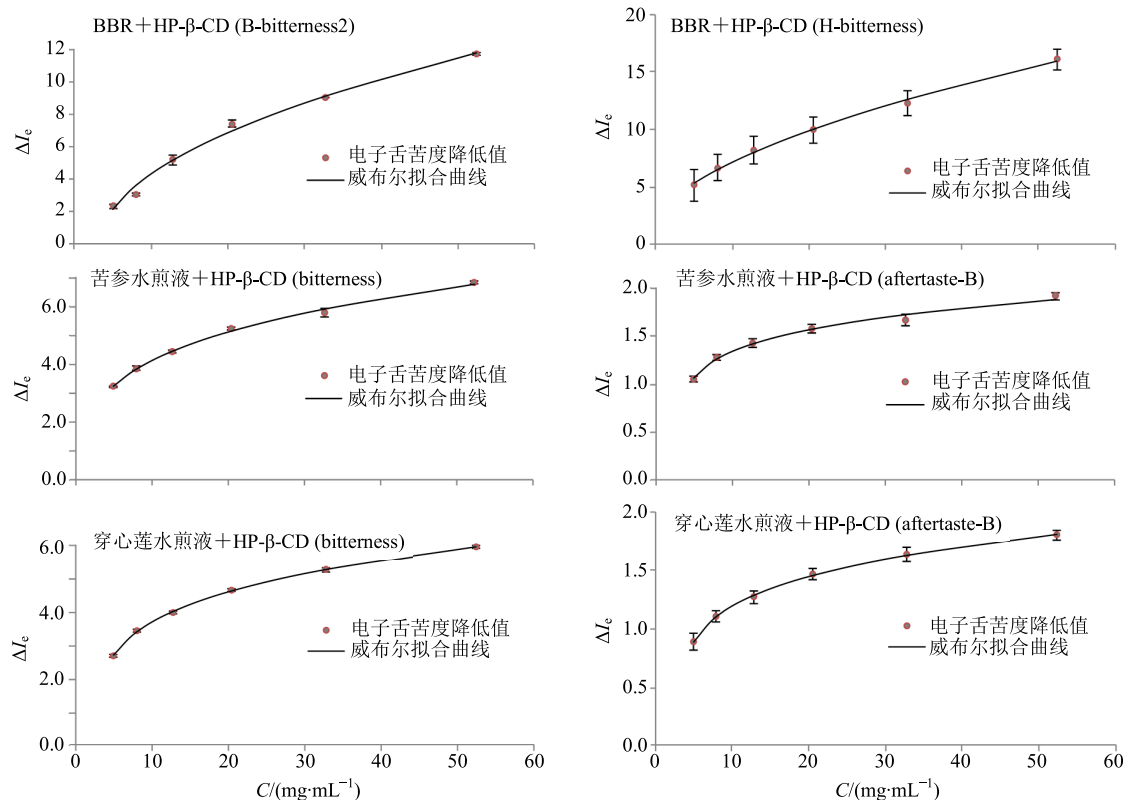


图3 3种苦味载体 ΔI_e 与 C 之间的抑苦规律模型

Fig. 3 Models of bitterness inhibition law between ΔI_e and C of three bitterness vectors

2.5 模型构建及其优化与评估

2.5.1 电子舌味觉信息值对口尝 ΔI 预测模型 由实验结果,对 BBR、苦参水煎液、穿心莲水煎液 3 种苦味载体的 ΔI 和 ΔI_e 进行拟合,结合回归分析,得到最佳拟合方式为线性拟合,得到的拟合方程即为 3 种苦味载体的 ΔI - ΔI_e 抑苦效果预测模型。以 ΔI_e 为横坐标,对应 ΔI 为纵坐标,建立电子舌苦度降低值对口尝苦度降低值的相关性拟合曲线,如图 4 所

示。3 种苦味载体 ΔI - ΔI_e 预测模型相应的拟合方程依次如下。

BBR+HP- β -CD:

$$f_{13} = 0.244 \Delta I_{e(B-bitterness2)} - 0.3389 \quad (R^2 = 0.9891, P < 0.01, n = 6)$$

$$f_{14} = 0.2187 \Delta I_{e(H-bitterness)} - 0.8869 \quad (R^2 = 0.9683, P < 0.01, n = 6)$$

苦参水煎液+HP- β -CD:

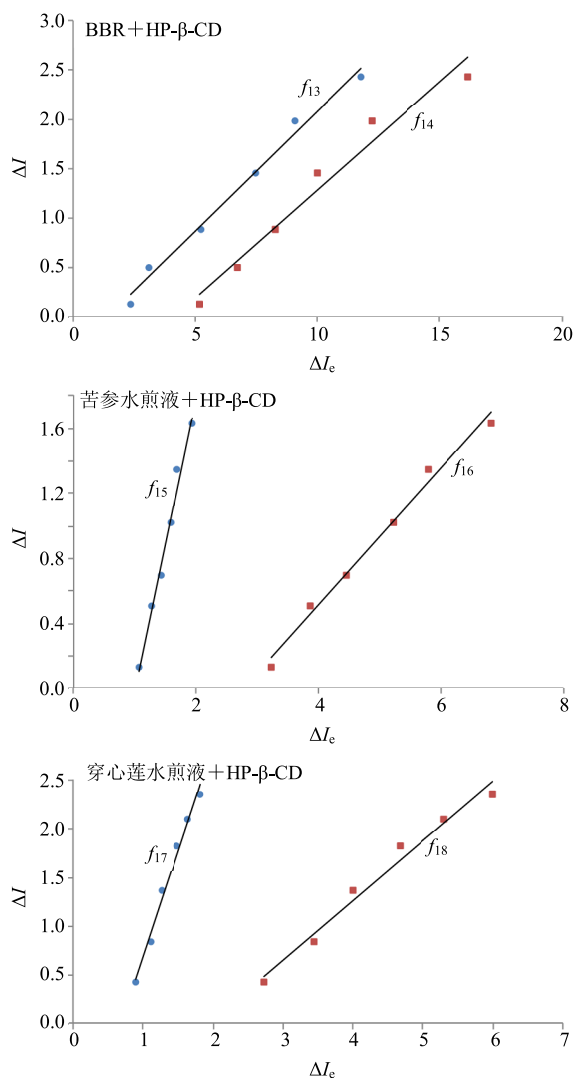


图4 3种苦味载体的 ΔI - ΔI_e 抑苦效果预测模型

Fig. 4 Prediction models of bitterness inhibition effect between ΔI and ΔI_e of three bitterness vectors

$f_{15}=0.418 \Delta I_{e(\text{bitterness})}-1.159$ ($R^2=0.9890$, $P<0.01$, $n=6$)

$f_{16}=1.8144 \Delta I_{e(\text{aftertaste-B})}-1.8141$ ($R^2=0.9820$, $P<0.01$, $n=6$)

穿心莲水煎液+HP- β -CD:

$f_{17}=0.6131 \Delta I_{e(\text{bitterness})}-1.1729$ ($R^2=0.9779$, $P<0.01$, $n=6$)

$f_{18}=2.1966 \Delta I_{e(\text{aftertaste-B})}-1.4958$ ($R^2=0.9861$, $P<0.01$, $n=6$)

结果表明,电子舌测试所得到的 ΔI_e 与口尝测试所得到的 ΔI 存在很好的线性相关性。HP- β -CD对BBR等3种苦味载体的预测模型均有 $P<0.01$,说明这6个预测模型在测试浓度范围内均有意义。

2.5.2 模型的优化与评估

(1) 拟合优度评价:以线性回归方程的决定系数(R^2)、均方根误差(RMSE)为指标对所建模型拟合优度进行评价。 R^2 越接近1,拟合程度越高,趋势线的可靠性就越强。

$$\text{RMSE} = \left(\sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2 / n \right)^{1/2}$$

n 为总测试数, Y_i 为第 i 个测试对应的 Y 值, $\hat{Y}_i$ 为所建模型对 Y_i 的预测值

根据RMSE公式计算,“2.5.1”项下3种苦味载体的 ΔI - ΔI_e 抑苦效果预测模型的RMSE依次为0.0844、0.1440、0.0530、0.0678、0.1013、0.0805,相应的 R^2 依次为0.9891、0.9683、0.9890、0.9820、0.9779、0.9861, P 值均小于0.01。显示预测模型预测结果与实际值相关性较好,预测精度较高。

(2) 交叉验证:采用Jackknifing交叉验证方法对所建 ΔI - ΔI_e 抑苦效果预测模型进行优化和评估。以交叉验证平均绝对误差(mean absolute error of cross validation, MAECV)、交叉验证平均绝对百分比误差(mean absolute percent error of cross validation, MAPECV)^[19]、交叉验证均方根误差(root mean square error of cross validation, RMSECV)和交叉验证预测值与实际值的相关系数(R)为指标对所建模型进行评价。

$$\text{MAECV} = \sum_{i=1}^n |Y_i - \hat{Y}_i| / n$$

$$\text{MAPECV} = \left[\sum_{i=1}^n (|Y_i - \hat{Y}_i| / |Y_i|) \right] / n$$

$$\text{RMSECV} = \left[\sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2 / n \right]^{1/2}$$

n 为总观测数, Y_i 为第 i 个观测对应的 Y 值, $\hat{Y}_i$ 为用 $n-1$ 个观测所建模型对 Y_i 的预测值

在进行交叉验证时,两端数据(最大和最小2组数据)可能会在处理时超出正常值范围,造成较大误差;且模型预测时也不能向两端大幅延伸。因此,以下数据均为去除对两端数据预测结果后的结果。验证结果见表3。

(3) 残差分析及结果:抑苦效果预测模型得到的预测值与口尝苦度降低值之差即残差,残差与残差的标准差之商即标准残差(e_i')。以“2.5.1”项下所建预测模型的预测值,即口尝苦度预测值 $\hat{Y}_i$ 为自变量,标准残差 e_i' 为因变量,查 t 检验临界值表得到相应临界值,作散点图,得标准残差图,见图5。

表 3 交叉验证结果
Table 3 Cross-validation results

组别	数据组	口尝苦度降低值	预测值	MAECV	MAPECV/%	RMSECV	R
BBR	B ₂	0.51	0.37	0.092 9	10.57	0.115 2	0.986 0
	B ₃	0.90	0.94				
B-bitterness2 组	B ₄	1.47	1.48	0.147 8	12.00	0.177 1	0.997 3
	B ₅	2.00	1.82				
BBR	B ₂	0.51	0.60	0.147 8	12.00	0.177 1	0.997 3
	B ₃	0.90	0.92				
H-bitterness 组	B ₄	1.47	1.26	0.047 8	5.81	0.065 7	0.988 4
	B ₅	2.00	1.72				
苦参水煎液	R ₂	0.51	0.44	0.047 8	5.81	0.065 7	0.988 4
	R ₃	0.70	0.70				
bitterness 组	R ₄	1.02	1.02	0.079 0	7.89	0.102 6	0.960 8
	R ₅	1.35	1.24				
苦参水煎液	R ₂	0.51	0.51	0.079 0	7.89	0.102 6	0.960 8
	R ₃	0.70	0.80				
aftertaste-B 组	R ₄	1.02	1.06	0.119 3	8.93	0.126 5	0.980 2
	R ₅	1.35	1.17				
穿心莲水煎液	A ₂	0.85	0.97	0.119 3	8.93	0.126 5	0.980 2
	A ₃	1.38	1.26				
bitterness 组	A ₄	1.84	1.66	0.100 9	8.01	0.108 1	0.983 9
	A ₅	2.11	2.05				
穿心莲水煎液	A ₂	0.85	0.98	0.100 9	8.01	0.108 1	0.983 9
	A ₃	1.38	1.28				
aftertaste-B 组	A ₄	1.84	1.71	0.100 9	8.01	0.108 1	0.983 9
	A ₅	2.11	2.07				

可见描绘的残差点围绕残差等于 0 的直线上下随机散布,无趋势。由上述模型优化和评估结果可知,所建模型对训练集样本拟合优度高,交叉验证结果较好,标准残差图显示预测模型标准化残差在±2.776 范围内随机分布,表示回归曲线对原观测值的拟合情况良好,回归结果较好,说明该建模方法可靠,模型具有良好的预测能力。

3 讨论

3.1 口尝参比样品及苦味载体的选择

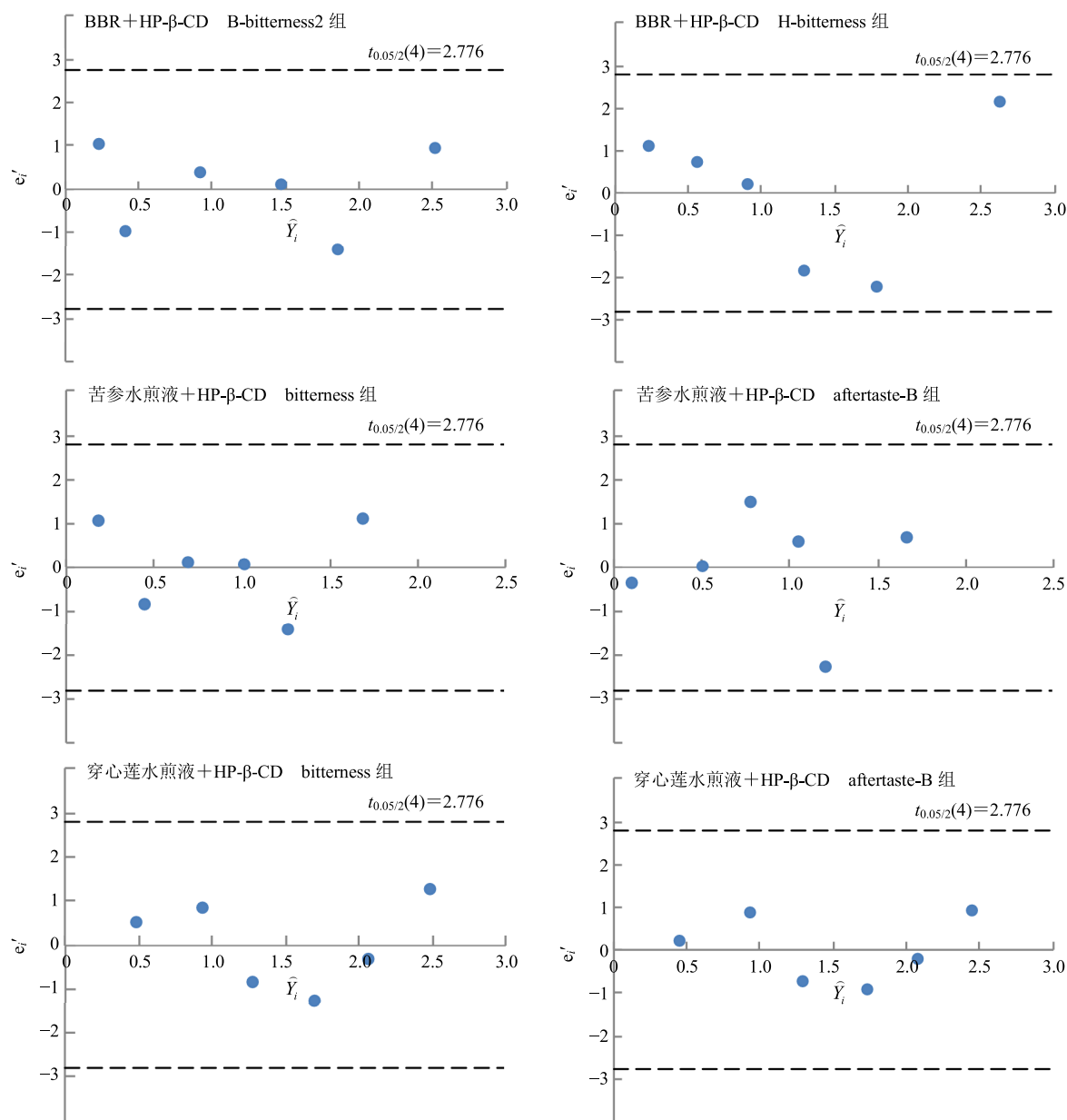
中药中苦味物质的来源主要有生物碱、萜类、糖苷、苦味肽等,生物碱类是中药抑苦研究最常用的载体,本实验选择的口尝参比样品为 BBR,选择的化合物类苦味载体除 BBR 外还有 OMT,二者皆为生物碱类化合物,为中药黄连和苦参中的有效成分,并且生物碱是药用植物中具有多生物活性的一类化学成分,近年来更被发现具有杀菌抑菌、抗高血压等临床实用前景^[20],以之为载体具有一定的代

表意义。

本实验另外选择了主要有效成分为氧化苦参碱等生物碱类的苦参和主要有效成分为穿心莲内酯等萜类的穿心莲作为中药水煎液类苦味载体的 2 个代表,不过中药汤剂成分多、种类复杂,要想探索更广泛的抑苦规律或建立更全面的抑苦效果预测模型,还需要进一步扩大研究对象的范围。本研究在 HP-β-CD 对苦味单体化合物抑苦研究基础上进一步探索其对饮片水煎液的抑苦规律,并形成了行之有效的评价手段和方法,建立了良好的抑苦模型,可为后续相关抑苦研究提供借鉴。

3.2 TS-5000Z 型电子舌用于抑苦评价时的特点

3.2.1 电子舌对同类样品的评价 在使用 TS-5000Z 型电子舌评价药物的苦味时,常用到药物苦味传感器 AN0、BT0,以及食品酸性苦味传感器 C00,也可加入涩味传感器 AE1 作参考。一般来说在评价苦味的时候,推荐使用回味的 CPA 值来进行评价。

图 5 3 种苦味载体的 $e_i' - \hat{Y}_i$ 标准残差图Fig. 5 Standard residual plot between e_i' and $\hat{Y}_i$ of three bitterness vectors

在对苦参水煎液和穿心莲水煎液进行抑苦评价时, 2 种水煎液均可用传感器 C00 来进行评价, 但传感器 AN0 和 BT0 均对 2 种苦味载体响应无规律或无明显响应。一方面说明汤剂中各类成分极其复杂, 致使电子舌有响应但无规律; 另一方面这 2 种苦味载体均可用传感器 C00 评价, 表明中药在煎煮后可能类似于成分复杂的食物, 若有相关研究存在类似处理过程, 或可借鉴使用食品酸性苦味传感器 C00 进行评价; 而从被测体系成分来说, 苦参和穿心莲分别在其主成分喹诺里西啶类苦参总碱、二萜内酯化合物之外, 皆含有多种黄酮类成分, 黄酮类

成分作为苦味物质糖苷类化合物的一种, 因分子中多有酚羟基而呈酸性, 这可能是酸性苦味传感器 C00 可用来评价的另一原因; 同时也表明电子舌传感器在具有选择性的属性之下对同类别样品的评价有很大的借鉴意义。

3.2.2 电子舌评价的不足 在对苦味化合物 BBR 测试时, 传感器 AN0 和 BT0 均可评价抑苦效果, 原因很可能是因为 BBR 为季铵型生物碱盐, 溶液呈碱性, 所以碱性苦味传感器 AN0 和碱基盐类苦味传感器 BT0 响应良好; 但在对 OMT 进行测试时, 4 种传感器均未达到最佳的输出范围, 对 OMT 应答

微弱而无法进行抑苦评价。本研究中 BBR 与 OMT 同为生物碱类苦味化合物,且所用苦味抑制剂 HP- β -CD 的质量浓度相同,所以推测不应答原因可能与 HP- β -CD 对 OMT 进行抑苦时的 OMT 质量浓度或 OMT 分子的某些独特属性有关。配制 BBR 和 OMT 苦味载体原液时,质量浓度分别为 0.050 mg/mL 和 0.073 mg/mL,虽然它们的口尝苦度 I 值都位于 3.0,但电子舌检测的是膜电势,后依据韦伯-费希纳定律将差值转化为味觉数值^[21],会存在与口尝结果不一样的情况,可能是 OMT 质量浓度未达到电子舌的检测限,也暴露出电子舌应用于部分样品时的敏感性问题的,对苦味物质苦度预测需要达到其检测限才能够检测到。

上述结果说明电子舌可以应用在抑苦研究中进行相关评价分析,但是不能毫无质疑地直接把电子舌评价结果等同于口尝评价结果,而应该运用研究者本身药学、化学及相关知识对电子舌输出结果分析辨别后,以之为参考信息,帮助对研究结果进行整体的判断。毕竟电子舌作为近 10 年来新兴发展起来的检测技术,用来评价抑苦研究时尚存在某些不足,有待于研究者使用过程中发现问题提出解决思路,从而进一步研发更为先进、敏感、普适性的传感器。

参考文献

- [1] Mennella J A, Spector A C, Reed D R, *et al.* The bad taste of medicines: Overview of basic research on bitter taste [J]. *Clin Ther*, 2013, 35(8): 1225-1246.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [3] 刘瑞新, 李慧玲, 李学林, 等. 基于电子舌的穿心莲水煎液的掩味效果评价研究 [J]. *中草药*, 2013, 44(16): 2240-2245.
- [4] Dashevskiy A, Mohilyuk V, Ahmed A R, *et al.* Micropellets coated with Kollicoat (R) smart seal 30D for taste masking in liquid oral dosage forms [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2017, 43(9): 1548-1556.
- [5] Liu M, Yin D, Fu H, *et al.* Double-coated enrofloxacin microparticles with chitosan and alginate: Preparation, characterization and taste-masking effect study [J]. *Carbohydr Polym*, 2017, 170: 247-253.
- [6] Tang W L, Tang W H, Chen W C, *et al.* Development of a rapidly dissolvable oral pediatric formulation for mefloquine using liposomes [J]. *Mol Pharm*, 2017, 14(6): 1969-1979.
- [7] Wang L, Duan X G, Wu J. Enhancing the alpha-cyclodextrin specificity of cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans* by mutagenesis masking subsite-7 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2016, 82(8): 2247-2255.
- [8] Wu W, Zu Y, Zhao X, *et al.* Solubility and dissolution rate improvement of the inclusion complex of apigenin with 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin prepared using the liquid antisolvent precipitation and solvent removal combination methods [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2017, 43(8): 1366-1377.
- [9] 何志超, 王冬梅, 李国成, 等. 岩黄连生物碱类成分及其抗氧化活性研究 [J]. *中草药*, 2014, 45(11): 1526-1531.
- [10] 黄玉香, 谭何新, 于剑, 等. 药用植物生物碱次生代谢工程研究进展 [J]. *中草药*, 2016, 47(23): 4271-4281.
- [11] 熊魏, 李青, 吴华强, 等. 黄连提取物掩味技术的初步研究 [J]. *广州化工*, 2015, 43(17): 61-63.
- [12] Nawab A, Alam F, Hasnain A. Mango kernel starch as a novel edible coating for enhancing shelf-life of tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 103: 581-586.
- [13] Tan Q, Zhang L, Liu G, *et al.* Novel taste-masked orally disintegrating tablets for a highly soluble drug with an extremely bitter taste: Design rationale and evaluation [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2013, 39(9): 1364-1371.
- [14] Veloso A C, Dias L G, Rodrigues N, *et al.* Sensory intensity assessment of olive oils using an electronic tongue [J]. *Talanta*, 2016, 146: 585-593.
- [15] 付智慧, 李淑军, 胡慧华, 等. 基于电子舌技术的豨莶草炮制前后滋味比较 [J]. *中草药*, 2017, 48(4): 673-680.
- [16] Guhmann M, Preis M, Gerber F, *et al.* Development of oral taste masked diclofenac formulations using a taste sensing system [J]. *Int J Pharm*, 2012, 438(1/2): 81-90.
- [17] 刘瑞新, 李学林, 陈天朝, 等. 一种基于格拉布斯规则和矩阵实验室语言的药理学测试数据中异常值的剔除方法: 中国, CN 102436542 A [P]. 2012-05-02.
- [18] Ditz H M, Nieder A. Sensory and working memory representations of small and large numerosities in the crow endbrain [J]. *J Neurosci*, 2016, 36(47): 12044-12052.
- [19] 刘瑞新, 史新元, 乔延江. 支持向量回归等 6 种方法用于均匀设计优化的比较研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2009, 15(11): 89-92.
- [20] Bai R R, Wu X M, Xu J Y. Current natural products with antihypertensive activity [J]. *Chin J Nat Med*, 2015, 13(10): 721-729.
- [21] Lee T, Lee H L, Tsai M H, *et al.* A biomimetic tongue by photoluminescent metal-organic frameworks [J]. *Biosens Bioelectron*, 2013, 43: 56-62.