

基于苦味阈值浓度的药物分子苦度定量方法研究

高晓洁¹, 白明学¹, 桂新景^{2,3,4,5,6}, 王艳丽^{2,3,4,5,6}, 王君明³, 姚静^{2,3,4,5,6}, 张璐^{2,3,4,5,6}, 施钧瀚^{2,3,4,5,6}, 李学林^{2,3,4,5,6}, 刘瑞新^{2,3,4,5,6*}

1. 郑州市中医院 制剂室, 河南 郑州 450007
2. 河南中医药大学第一附属医院 药学部, 河南 郑州 450000
3. 河南中医药大学, 河南 郑州 450008
4. 河南省中药饮片临床应用现代化工程研究中心, 河南 郑州 450000
5. 河南中医药大学 呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心, 河南 郑州 450000
6. 河南省中药临床药学中医药重点实验室, 河南 郑州 450000

摘要: 目的 建立仅与药物分子属性有关的药物分子苦度 (molecule bitterness, MB) 的定量方法。方法 采用口尝法, 以盐酸小檗碱为标准苦味物质, 以不同浓度的盐酸小檗碱、奎宁、苦参碱、延胡索乙素、穿心莲内酯、栀子苷、葛根素、柚皮苷、L-精氨酸、熊果苷、益母草碱、柠檬苦素、獐牙菜苦苷、芦荟苷、龙胆苦苷、盐酸青藤碱、氧化苦参碱、京尼平苷、槐定碱的水溶液为载体, 采用“最小极限法”预测苦味阈值浓度 (bitterness threshold concentration, BTC), 并基于此计算其 MB; 以盐酸小檗碱、苦参碱、氧化苦参碱、穿心莲内酯、葛根素的水溶液为载体, 采用电子舌测得不同浓度溶液的响应值, 基于口尝法测得的盐酸小檗碱的 BTC, 预测其他 4 种苦味单体的 BTC, 进而预测其 MB。结果 采用口尝法, 测得感知到苦味的人数比例与苦味单体的浓度之间符合威布尔曲线关系, 然后由拟合的曲线计算出 BTC, 进而测得了 19 种苦味单体的 MB; 在 BTC 试验的测定范围内, 电子舌传感器仅对盐酸小檗碱和苦参碱的测定得到有效数据, 但对其产生响应的传感器不同, 不同传感器之间信息相互独立, 基于电子舌未能得到苦参碱的 BTC。结论 采用口尝法建立了基于 BTC 的 MB 的测定方法, 并测定出 19 种苦味单体的 MB; 虽未能建立基于电子舌的 MB 预测方法, 但是为后续苦度定量方法研究提供借鉴。

关键词: 最小极限法; 苦味阈值浓度; 分子苦度; 口尝法; 电子舌; 盐酸小檗碱; 苦参碱

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)03-0696-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.03.007

Study on quantitative method of drug's molecular bitterness based on bitterness threshold concentration

GAO Xiao-jie¹, BAI Ming-xue¹, GUI Xin-jing^{2,3,4,5,6}, WANG Yan-li^{2,3,4,5,6}, WANG Jun-ming³, YAO Jing^{2,3,4,5,6}, ZHANG Lu^{2,3,4,5,6}, SHI Jun-han^{2,3,4,5,6}, LI Xue-lin^{2,3,4,5,6}, LIU Rui-xin^{2,3,4,5,6*}

1. Department of Pharmaceutical Preparation, Traditional Chinese Medicine Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450007, China
2. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China
3. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China
4. Henan Modernization Engineering Research Center for Clinical Application of Traditional Chinese Medicine Decoction Pieces, Zhengzhou 450000, China
5. Provincial Co-construction Collaborative Innovation Center for Prevention and Treatment of Respiratory Diseases with Traditional Chinese Medicine, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China
6. Henan Key Laboratory for Clinical Pharmacy of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China

收稿日期: 2021-08-27

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81774452); 国家自然科学基金青年基金项目 (81001646); 2017 年国家重点研发计划中医药现代化重点专项 (2017YFC1703402); 河南省中医药拔尖人才培养项目资助 (2019ZYBJ07); 河南省高层次人才特殊支持“中原千人计划”-“中原青年拔尖人才”项目 (ZYQR201912158); 河南省卫生健康中青年学科带头人专项 (HNSWJW-2020014)

作者简介: 高晓洁, 硕士, 主管药师, 从事中药制剂的开发以及质量控制研究。Tel: (0371)86223662 E-mail: 498577500@qq.com

***通信作者:** 刘瑞新, 博士, 主任药师, 从事中药饮片临床应用现代化关键技术研究。Tel: (0371)66233562 E-mail: liuruixin7@163.com

Abstract: Objective To establish a quantitative method of drugs' molecular bitterness (MB) which is only related to the properties of the drug molecule itself. **Methods** In this paper, berberine hydrochloride was used as standard bitter substance and berberine hydrochloride, quinine, matrine, tetrahydropalmatine, andrographolide, gardenoside, puerarin, naringin, *L*-arginine, arbutin, leonurine, limonin, swertiamarin, aloin, gentiopicroside, sinomenine hydrochloride, oxymatrine, geniposide, sophoridine with different concentrations solutions were used as research carriers, based on the minimum limit method, the bitterness threshold concentration (BTC) of bitter monomer was predicted by traditional human taste panel method, and calculated the MB using BTC finally; Using berberine hydrochloride, matrine, oxymatrine, andrographolide, puerarin solutions with different concentrations as the carriers, the response value of different concentration solutions were measured by electronic tongue. Then, the BTC of the bitter molecules were predicted, and finally the MB of the bitter monomers was predicted. **Results** It was measured that the relationship between the proportion of people who felt bitter and the concentration of bitterness monomer conforms to the Weibull curve by using traditional human taste panel method, then the BTC was calculated from the fitted curve, and finally the MB of 19 kinds of bitter monomers were measured; Within the measurement range of the BTC test, the electronic tongue sensors only got valid data for the measurement of berberine hydrochloride and matrine, but the sensor that responded to them were different, and the information between the different sensors were independent, so the BTC of matrine could not be obtained by using electronic tongue. **Conclusion** A method for the determination of MB based on BTC was established by using traditional human taste panel method, and the MB of 19 bitter monomers were determined; Although we failed to establish the MB determination method by using electronic tongue, it can be used as a reference for the further study of quantitative methods of bitterness.

Key words: minimum limit method; bitterness threshold; molecular bitterness; traditional human taste panel method; electronic tongue; berberine hydrochloride; matrine

长久以来,人们对药物苦味的评价多是通过定性的描述来表达,如无法忍受的苦、有点苦、几乎没有苦味等,缺乏对其客观定量的表达。已有的药物苦度定量方法多存在测量标准不统一、适用范围窄等问题,没有一套科学、可行、规范的测试体系,这对开展药物的掩味研究是非常不利的。因此,采用一定的方法对药物苦度进行测量,使其可以用准确的数学指标进行表达,是非常必要的。

在食品领域,人们曾尝试定量测定苦度。如常通过计算所含全部异构化 α -酸(啤酒苦味的主要来源)的量来测定啤酒的苦度,其表示方式有欧洲苦度单位(Europe bitterness units, EBU)^[1-2]、国际苦度单位(international bitter units, IBU)^[3]等。然而,在药学领域,尤其在中药学领域,由于苦味成分复杂,通过计算单位体积内某种特定苦味成分含量的方法,很难应用于药物的苦度测量。

味道的产生,本质上是物质分子溶于唾液,与舌头上的味蕾受体相结合,产生不同的电信号,从而感应出不同的味道。1972 年 Kier 对甜味 AH/B 系统理论进行了扩展,提出著名的 AH,B,X 甜味三角理论。即 A 和 B 是空间相距 0.25~0.40 nm 的带负电荷的 2 个原子,其中 A 与带正电的质子结合成为 AH, AH 在整体上可认为是酸, B 为质子受体,可认为是碱,而 X 为疏水(亲油)结合基团,该基团在与 AH、B 分别相距 0.35 nm 和 0.55 nm 的地方与

二者构成 AH,B,X 甜味三角形(生甜团)^[4]。与甜味受体模型非常相似,苦味物质分子与受体之间的结合也可以用 AH/B 结构来表示,苦味助味基取决于其疏水性结构。许多化学结构迥异的化合物都具有苦味,如生物碱、糖苷、萜类、苦味肽以及金属离子等,苦味的产生除了与苦味分子的形状、大小有关,也与所含官能团的性质及其在分子中的位置相关。因此,研究者们把与药物浓度无关,而仅与药物分子的属性相关的苦度,称之为分子苦度(molecule bitterness, MB)。本研究旨在建立基于苦味阈值浓度(bitterness threshold concentration, BTC)的 MB 的测量方法,为药物的苦度评价提供量化指标,并为药物掩味研究奠定基础,开拓药物的商业价值,提高药物的服用效果。

1 仪器与材料

1.1 仪器

BCA2248-CW 电子天平、CP225D 十万分之一电子天平,德国 Sartorius 公司; HK250 科导台式超声清洗器,上海科导超声仪器有限公司; AM-5250B 磁力搅拌器,天津奥特赛恩斯仪器有限公司; HH-S4A 电热恒温水浴锅,北京科伟永兴仪器有限公司; TS-5000Z 型电子舌,日本 Insent 公司。

1.2 材料

苦味单体:盐酸小檗碱购自于四川省玉鑫药业有限公司,批号为 140406,质量分数为 98.62%;

奎宁购自于北京庄盟国际生物基因科技有限公司, 批号为 C10017584, 质量分数为 >98.5%; 苦参碱、延胡索乙素、穿心莲内酯、栀子苷、葛根素、柚皮苷、L-精氨酸、熊果苷、益母草碱等均购自于西安嘉天生物科技有限公司, 批号分别为 JT20140418、JT20141010、JT20141026、JT20150214、JT20141102、JT20150222、20140412、JT20150401、JT20150326, 质量分数分别为 98.12%、98.12%、98.28%、98.12%、98.54%、98.08%、98.0%、99.59%、98.05%; 柠檬苦素、獐牙菜苦苷、芦荟苷、龙胆苦苷、盐酸青藤碱、氧化苦参碱、京尼平苷、槐定碱均购自于西安昊轩生物科技有限公司, 批号分别为 HXNMKS-150210、HXZYCKG-150326、HXLHG-140815、LDKG20150411、YSQJTJ20150315、YHKSJ20150409、JNPG20150415、HDJ20150415, 质量分数分别为 98.26%、98.12%、98.12%、98.10%、98.20%、98.50%、98.60%、98.20%。

2 方法与结果

2.1 口尝法评价

2.1.1 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 22 名健康志愿者 (男 7 名、女 15 名) 作为受试者, 在试验前签订知情同意书。

2.1.2 评价方法 将样品按照浓度由低到高的顺序进行编号并置于口尝纸杯中, 并在样品序列中随机加入 1 个阴性样品 (纯化水), 然后志愿者按编号顺序将样品含于口中, 计时 15 s, 此间口腔做漱口动作, 使舌根和舌侧的苦味感受区能够充分感受药物是否具有苦味, 将结果填入“药物苦味评价表”中, 然后吐出样品, 漱口 5 次, 至口腔内无苦味, 1~2 min 后测定下 1 个样品。

2.1.3 基于 BTC 的 MB 采用最小极限法测定 37 °C 下标准苦味物质和其他各苦味单体水溶液的 BTC, 即半数志愿者尝到苦味的最低浓度。以盐酸小檗碱为标准苦味物质, 在盐酸小檗碱的 BTC 下, 其 MB 定为 1, 则其他苦味分子的 $MB = C_r/C$ 。其中 C_r 表示标准苦味物质的 BTC; C 表示未知苦味分子的 BTC。通常情况下, 不同苦味分子的 BTC 相差较大, 因此导致不同物质的 MB 数值上差别很大。为此, 引入“分子苦度指数”(MB-index, MBI), 即将 MB 取自然对数, 以减少数量级差别。

2.1.4 样品配制 将盐酸小檗碱配制成浓度分别

为 3.83、7.65、11.50、15.30、23.00、30.60、61.20 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液; 将苦参碱配制成浓度分别为 0.10、0.20、0.31、0.41、0.61、0.81、1.63 mmol/L 的溶液; 将穿心莲内酯配制成浓度分别为 1.15、1.38、1.73、2.07、2.60、3.11、3.89 mmol/L 的溶液; 将延胡索乙素配制成浓度分别为 1.39、1.85、2.78、3.70、5.55、7.40、11.10 mmol/L 的溶液; 将獐牙菜苦苷配制成浓度分别为 0.05、0.08、0.10、0.15、0.20、0.31、0.41 mmol/L 的溶液; 将柠檬苦素配制成浓度分别为 3.60、5.40、7.20、10.80、14.40、21.60、28.80 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液; 将葛根素配制成浓度分别为 0.41、0.62、0.83、1.24、1.65、2.48、3.30 mmol/L 的溶液; 将奎宁配制成浓度分别为 9.23、12.30、18.50、24.60、36.90、49.20、73.80 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液; 将芦荟苷配制成浓度分别为 15.40、23.10、30.80、46.20、61.60、92.30、123.00 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液; 将柚皮苷配制成浓度分别为 0.16、0.23、0.31、0.47、0.63、0.94、1.25 mmol/L 的溶液; 将盐酸青藤碱配制成浓度分别为 20.21、26.93、40.42、53.85、80.84、107.70、161.80 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液; 将栀子苷配制成浓度分别为 0.13、0.19、0.25、0.38、0.51、0.76、1.01 mmol/L 的溶液; 将京尼平苷配制成浓度分别为 0.47、0.71、0.94、1.42、1.89、2.83、3.78 mmol/L 的溶液; 将熊果苷配制成浓度分别为 0.73、1.10、1.47、2.20、2.94、4.41、5.97 mmol/L 的溶液; 将氧化苦参碱配制成浓度分别为 3.64、4.87、7.28、9.74、14.56、19.48、29.13 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液; 将益母草碱配制成浓度分别为 0.12、0.18、0.24、0.36、0.48、0.71、0.95 mmol/L 的溶液; 将 L-精氨酸配制成浓度分别为 19.80、26.48、39.60、52.95、79.20、105.90、158.00 mmol/L 的溶液; 将槐定碱配制成浓度分别为 6.87、9.04、13.73、18.09、27.47、36.18、54.94 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液; 将龙胆苦苷配制成浓度分别为 14.49、20.71、29.58、42.26、60.37、86.24、123.20 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液。

2.1.5 离群值的剔除 由于实验对象为生物样本, 且不同受试者之间存在个体差异, 实验测试数据可能有个别异常值。因此, 根据国家标准 GBT12315-2008 中 8.2.1 个人表现判定 Spearman 相关系数的规定, 对所有评价员的数据进行统计分析, 当对阴性样品的评价仍为“1”, 或者违反韦伯-费希纳定律: 刺激量与刺激强度成正比的规律, 则剔除该评价员对该组样品的评价结果。

2.1.6 口尝测试结果 对上述 19 种苦味单体的口

尝评价结果进行统计分析,结果表明,19 种苦味单体浓度的对数与感知到到苦味的人数比例成正相关关系,与韦伯-费希纳定律一致^[7-8]。因此,分别对 19 种苦味单体感知到苦味的人数比例为 0~100% 的范围内对不同浓度 (C) 下感知苦味的人数比例 (P_0) 分别做威布尔曲线和对数曲线,二者关系式如下。采用“规划求解”建立威布尔曲线和 Excel 建立对数曲线,19 种苦味单体不同的浓度 (C) 与感知到苦味的人数比例 (P_0 , 在 0~100%) 之间的拟合方程见表 1。其中 P_0 代表感知到苦味的人数比例, C 代表浓度, e 是自然数对数的底数, n 是样品浓度个数。

$$P_0=f_i(C)=\beta[1-e^{-(C-a)^m/k}] \quad (1)$$

$$P_0=f_i(C)=a\ln C+b \quad (2)$$

C 表示浓度, a 、 b 、 α 、 β 、 m 、 k 为待定参数

由上述拟合方程的 R^2 可知,19 种苦味物质的威布尔模型均优于对数曲线模型,因此,采用威布尔模型建立 19 种苦味物质不同浓度下感知到苦味的人数比例 P_0 模型。以盐酸小檗碱为标准苦味物质,按照“2.1.3”项所述方法分别计算 19 种苦味单

体的 BTC、MB 以及 MBI,结果见表 2。

2.2 电子舌测定

2.2.1 TS-5000Z 电子舌简介 TS-5000Z 电子舌,是采用了类似于人类舌头味觉细胞工作原理的人工脂膜传感器技术,可以客观数字化的评价食品或药品等样品的酸味、甜味、苦味、咸味、鲜味、涩味的先味,同时还可以分析苦味、涩味、鲜味的回味。这个传感器技术的响应状态同人的舌头对味道的响应极为相似,味觉传感器上的脂膜通过与呈味物质之间的静电作用或者疏水性相互作用产生膜电势的变化,并将该电势作为传感器的输出信号传输到电脑进行分析,以此认知味强度及味特征。

2.2.2 样品制备

(1) 正极清洗液配制:准确称量 7.46 g 氯化钾,用 500 mL 蒸馏水搅拌溶解,然后准确加入 300 mL 无水乙醇溶液,边搅拌边加入准确称量的 0.56 g 氢氧化钾,溶解完毕后,转移到 1000 mL 量瓶中,定容,即得。

(2) 负极清洗液配制:准确量取 300 mL 无水乙醇,与 500 mL 蒸馏水震荡混合,然后加入 8.3 mL

表 1 19 种苦味单体不同的浓度 C 与感知到苦味的人数比例 P_0 的拟合方程

Table 1 Fitting equation between different concentration (C) of 19 bitter monomers and the proportion (P_0) of people who felt bitter

苦味物质	n	威布尔曲线	对数曲线
盐酸小檗碱	5	$P_0=1.03 [1-e^{-(C+5.32)^{3.12}/7\ 723.71}]$, $R^2=0.968\ 3$, $P<0.01$	$P_0=0.52 \ln C-0.63$, $R^2=0.938\ 7$, $P<0.01$
苦参碱	5	$P_0=1.01 [1-e^{-(C-0.10)^{1.33}/0.10}]$, $R^2=0.996\ 0$, $P<0.01$	$P_0=0.58 \ln C+1.34$, $R^2=0.979\ 8$, $P<0.01$
穿心莲内酯	6	$P_0=1.02 [1-e^{-(C-1.38)^{0.87}/0.62}]$, $R^2=0.997\ 0$, $P<0.01$	$P_0=0.91 \ln C-0.10$, $R^2=0.862\ 2$, $P<0.01$
延胡索乙素	6	$P_0=0.95 [1-e^{-(C-1.85)^{2.08}/2.76}]$, $R^2=0.994\ 5$, $P<0.01$	$P_0=0.59 \ln C-0.26$, $R^2=0.879\ 7$, $P<0.01$
獐牙菜苦苷	5	$P_0=1.08 [1-e^{-(C-0.08)^{1.74}/0.03}]$, $R^2=0.999\ 8$, $P<0.01$	$P_0=0.75 \ln C+1.84$, $R^2=0.968\ 5$, $P<0.01$
柠檬苦素	5	$P_0=1.00 [1-e^{-(C-3.08)^{3.99}/7\ 723.71}]$, $R^2=0.999\ 3$, $P<0.01$	$P_0=0.81 \ln C-1.45$, $R^2=0.927\ 7$, $P<0.01$
葛根素	5	$P_0=0.98 [1-e^{-(C-0.41)^{2.19}/0.05}]$, $R^2=0.998\ 5$, $P<0.01$	$P_0=0.73 \ln C+0.78$, $R^2=0.853\ 6$, $P<0.05$
奎宁	6	$P_0=1.02 [1-e^{-(C-9.23)^{0.62}/2.86}]$, $R^2=0.992\ 2$, $P<0.01$	$P_0=0.53 \ln C-0.94$, $R^2=0.812\ 7$, $P<0.05$
芦荟苷	6	$P_0=0.99 [1-e^{-(C+3.17)^{3.20}/131\ 481.94}]$, $R^2=0.992\ 3$, $P<0.01$	$P_0=0.57 \ln C-1.47$, $R^2=0.919\ 1$, $P<0.01$
柚皮苷	4	$P_0=39.50 [1-e^{-(C-0.07)^{0.55}/23.58}]$, $R^2=0.994\ 5$, $P<0.01$	$P_0=0.52 \ln C+1.37$, $R^2=0.989\ 8$, $P<0.01$
盐酸青藤碱	5	$P_0=1.00 [1-e^{-(C-15.22)^{2.33}/7\ 723.72}]$, $R^2=0.997\ 3$, $P<0.01$	$P_0=0.77 \ln C-2.55$, $R^2=0.986\ 2$, $P<0.01$
梔子苷	6	$P_0=0.65 [1-e^{-(C+1.09)^{11.34}/121.86}]$, $R^2=0.989\ 7$, $P<0.01$	$P_0=0.39 \ln C+0.72$, $R^2=0.968\ 5$, $P<0.01$
京尼平苷	4	$P_0=0.93 [1-e^{-(C-0.47)^{4.13}/0.05}]$, $R^2=0.982\ 8$, $P<0.01$	$P_0=0.95 \ln C+0.48$, $R^2=0.934\ 1$, $P<0.05$
熊果苷	5	$P_0=1.02 [1-e^{-(C-0.46)^{1.47}/1.20}]$, $R^2=0.967\ 2$, $P<0.01$	$P_0=0.64 \ln C+0.32$, $R^2=0.960\ 8$, $P<0.01$
氧化苦参碱	7	$P_0=0.96 [1-e^{-(C+8.93)^{4.12}/139\ 736.52}]$, $R^2=0.964\ 0$, $P<0.01$	$P_0=0.44 \ln C-0.37$, $R^2=0.955\ 1$, $P<0.01$
益母草碱	4	$P_0=1.00 [1-e^{-(C-0.05)^{1.63}/0.08}]$, $R^2=1.000\ 0$, $P<0.01$	$P_0=0.43 \ln C+1.13$, $R^2=0.922\ 1$, $P<0.05$
L-精氨酸	6	$P_0=0.91 [1-e^{-(C+68.98)^{9.70}/1.0\times 10^{20}}]$, $R^2=0.990\ 8$, $P<0.01$	$P_0=0.58 \ln C-1.69$, $R^2=0.945\ 5$, $P<0.01$
槐定碱	7	$P_0=0.98 [1-e^{-(C-6.87)^{1.64}/59.73}]$, $R^2=0.999\ 3$, $P<0.01$	$P_0=0.55 \ln C-1.08$, $R^2=0.950\ 1$, $P<0.01$
龙胆苦苷	5	$P_0=1.02 [1-e^{-(C-14.49)^{1.71}/187.41}]$, $R^2=0.999\ 2$, $P<0.01$	$P_0=0.76 \ln C-2.09$, $R^2=0.974\ 5$, $P<0.01$

表 2 19 种苦味单体的 BTC、MB、MBI
Table 2 BTC, MB and MBI of 19 bitter monomers

名称	BTC/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	MB	MBI
氧化苦参碱	7.55	1.347 3	0.298 1
盐酸小檗碱	10.17	1.000 0	0.000 0
柠檬苦素	11.68	0.870 4	-0.138 8
奎宁	12.11	0.839 8	-0.174 6
槐定碱	16.73	0.607 7	-0.498 0
龙胆苦苷	31.37	0.324 1	-1.126 6
芦荟苷	32.55	0.312 4	-1.163 5
盐酸青藤碱	55.17	0.184 3	-1.691 0
獐牙菜苦苷	177.63	0.057 2	-2.860 4
柚皮苷	184.48	0.055 1	-2.898 2
益母草碱	221.68	0.045 9	-3.081 9
苦参碱	236.07	0.043 1	-3.144 8
栀子苷	484.18	0.021 0	-3.863 1
葛根素	641.48	0.015 9	-4.144 5
京尼平苷	929.70	0.010 9	-4.515 6
熊果苷	1 325.89	0.007 7	-4.870 5
穿心莲内酯	1 744.09	0.005 8	-5.144 7
延胡索乙素	3 263.42	0.003 1	-5.771 2
L-精氨酸	43 748.66	0.000 2	-8.366 9

的浓盐酸搅拌混合转移到 1000 mL 量瓶中，定容，即得。

(3) 参比液配制：准确称量 2.24 g 氯化钾和 0.045 g 酒石酸用 500 mL 水溶解，然后转移到 1000 mL 量瓶中，定容，即得。

(4) 待测样品溶液配制：盐酸小檗碱、苦参碱、穿心莲内酯、葛根素、氧化苦参碱溶液配制方法同“2.1.4”项下各样品溶液的配制方法。

2.2.3 电子舌测试方法 TS-5000Z 型电子舌测量程序：首先在清洗液中清洗 90 s，接着用参比液清洗 120 s、继续用新的参比液清洗 120 s，传感器在平衡位置归零 30 s，达到平衡条件后，开始测试，测试时间 30 s；在 2 组参比液中分别短暂清洗 3 s，传感器插入新的参比液中测试回味 30 s。循环测试 4 次，去掉第 1 次循环，取后 3 次平均数据作为测试结果。每次清洗、平衡和测试回味的液体均分布在不同样品杯中。

2.2.4 指标选择 TS-5000Z 味觉分析系统中常用的指标有先味 (relative value, R) 及回味 (change of membrane potential caused by adsorption, CPA) [5-6]，二者分别表示如下。

$$R = V_s - V_r \quad (3)$$

$$\text{CPA} = V_r' - V_r \quad (4)$$

V_s 为传感器在参比液中的电势值， V_r 为传感器在待测样品中的电势值， V_r' 为传感器在参比液中短暂清洗后的电势值

2.2.5 传感器的选择 TS-5000Z 电子舌共有 C00、AN0、BT0、AE1、GL1、CA0、CT0 7 根传感器，其中 C00 和 AE1 传感器有先味和回味 2 种味觉信息，而 AN0 和 BT0 传感器只输出回味值。因此本实验选取跟苦味有关的 4 根传感器，分别为 C00、AN0、BT0、AE1 传感器，共输出 6 种味觉信息值，具体见表 3。

表 3 传感器味觉信息
Table 3 Sensors taste information

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 (aftertaste-B)
AN0	碱性苦味	-	碱性苦味 (B-bitterness2)
BT0	碱基盐类苦味	-	碱基盐类苦味 (H-bitterness)
AE1	涩味	涩味 (astringency)	涩味 (aftertaste-A)

-表示没有先味指标

- indicates that there is no taste indicator

2.2.6 电子舌测试结果

(1) 不同样品的味觉特征雷达图：图 1 显示了不同样品的味觉雷达图，其中横坐标和纵坐标的单位表示味觉的单位，1 个单位代表样品之间浓度相差了 20%，经专业人员鉴定 20% 的浓度差异是正常的人能够感觉到的，如果相差低于 1 个单位，那么正常的人就不能感觉到样品之间的差异^[9]。5 种样品的味觉信息如图 1 所示。结果表明，BT0 传感器和 AN0 传感器对盐酸小檗碱响应显著，且随着样品浓度的增大，苦味回味也呈增大趋势；苦参碱此浓度范围下 C00 传感器和 AE1 传感器对苦参碱响应显著，且随着样品浓度的增大，苦味和涩味均呈增大趋势，苦味和涩味的回味很小；葛根素在测量浓度范围内 AN0 传感器和 C00 传感器响应显著，但是 AN0 传感器的响应值随着浓度的增加先增大后减小，C00 传感器响应无规律；对于氧化苦参碱和穿心莲内酯，所有传感器的响应值均较小，不在最佳输出范围内。

(2) 苦味物质 BTC 的确定：以盐酸小檗碱为标准苦味物质，基于口尝法，测得 BTC，然后测得 BTC 时的电子舌传感器响应值，对于未知物质，仍然采用电子舌测得其不同浓度的传感器响应值，在

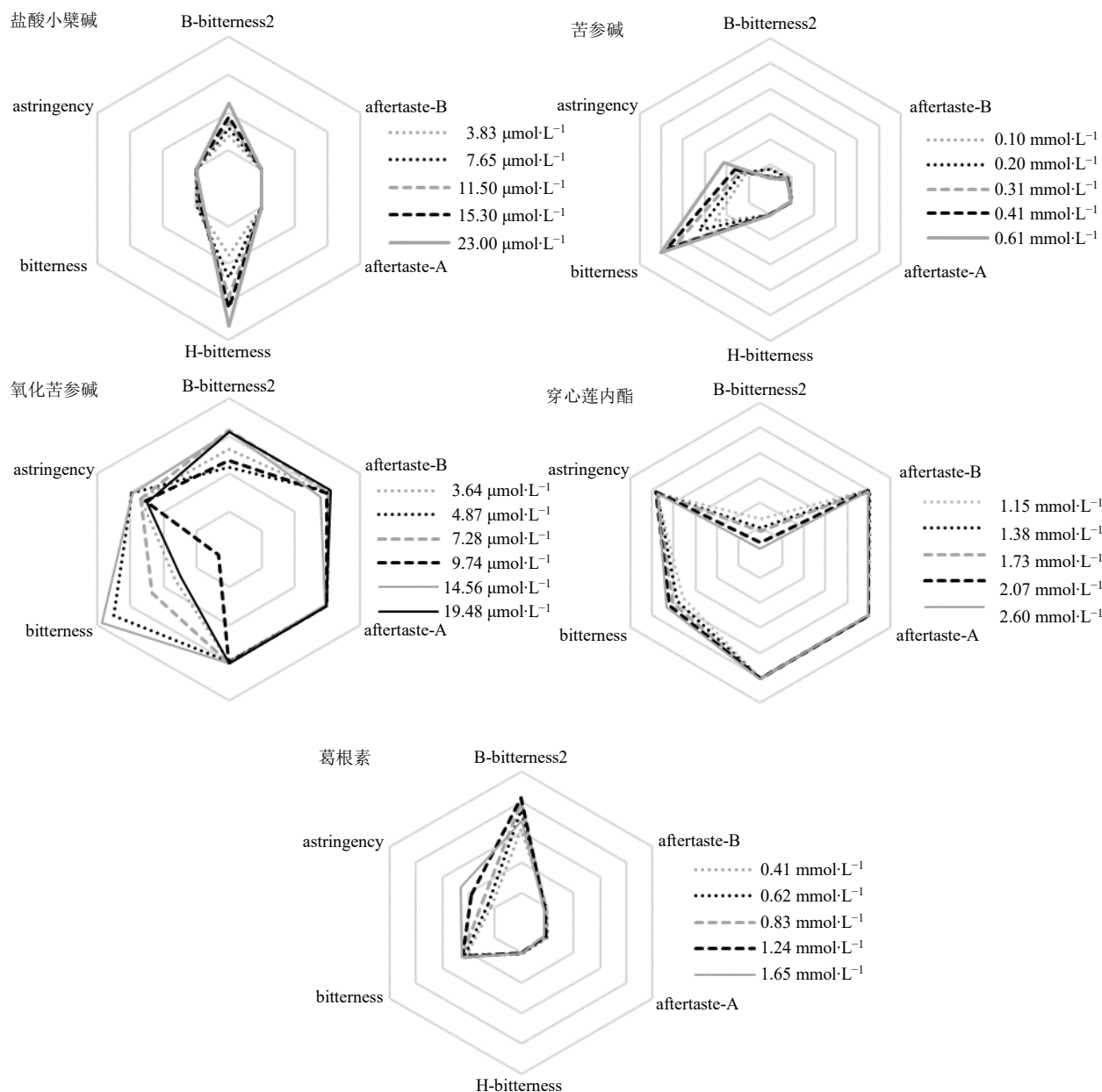


图 1 样品的味觉信息雷达图

Fig. 1 Taste information radar image of samples

与标准苦味物质传感器响应值相同时，未知物质的浓度即为其 BTC。

对不同浓度的盐酸小檗碱的电子舌 AN0 和 BT0 传感器的测定结果进行统计分析，结果表明，盐酸小檗碱浓度的对数与 AN0 传感器和 BT0 传感器的响应值 (I_e) 呈正相关关系，如图 2 所示。由表 2 可知，盐酸小檗碱的 BTC 为 10.17 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ，在该浓度下，BT0 传感器的响应值为 8.68，AN0 传感器的响应值为 3.80。对于苦参碱，其 AN0 传感器和 BT0 传感器均无响应，仅 C00 传感器有响应，但是 TS-5000Z 电子舌各传感器测得的味觉信息之间相

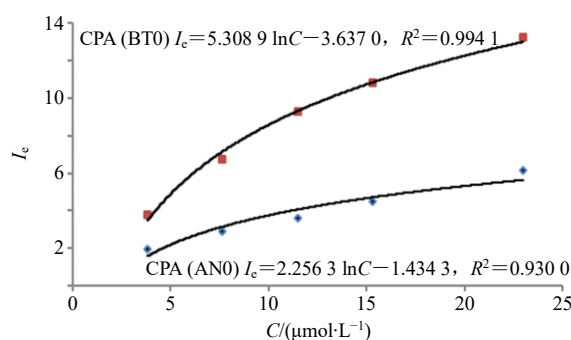


图 2 不同浓度的盐酸小檗碱传感器响应图

Fig. 2 Sensor response diagram of berberine hydrochloride with different concentrations

互独立,不能相互转换,因此,以盐酸小檗碱作为标准苦味物质,未能计算出苦参碱的 BTC。

3 讨论

3.1 标准苦味物质的选择

在进行药物苦味评价时,一般选择奎宁作为标准苦味物质,但因其相对不易得、有一定毒性等原因,在中药苦度评价时,选择盐酸小檗碱比奎宁更具有可比性和代表性^[10]。因此,本实验选择盐酸小檗碱作为标准苦味物质。

3.2 苦味单体的选择

常见的中药中具有苦味的化学成分有生物碱、苷类、萜类、苦味肽等^[11-13],对上述 19 种苦味物质进行分类,其中,盐酸小檗碱、苦参碱、延胡索乙素、奎宁、氧化苦参碱、盐酸青藤碱、益母草碱、槐定碱属于生物碱类化合物;獐牙菜苦苷、葛根素、芦荟苷、柚皮苷、梔子苷、京尼平苷、熊果苷属于苷类化合物;穿心莲内酯、柠檬苦素、龙胆苦苷属于萜类化合物;*L*-精氨酸属于苦味肽类化合物。该部分内容的研究均基于口尝法,选择的苦味单体载体必须对人体无毒害作用,且水溶性要好,由于这些因素的限制,每一类化学成分中选择的载体数量不一。

3.3 BTC 预测的影响因素

BTC 为半数志愿者能够感知到苦味的最低浓度,由于评价员味觉灵敏度、个体差异等因素,测得的 BTC 会存在一定的差异,因此,实验前应对评价员进行规范化培训,此外,先进的味觉传感器的使用可以弥补口尝法主观性强的缺陷。其次,样品来源不同,纯度高低不同也会影响预测结果,因为本研究中涉及的苦味单体均为中药饮片经提取分离得到,中药饮片化学成分繁多,最终得到的样品中仍会残留有部分杂质,由于味觉神经复杂的传递机制,残留的杂质可能会对苦味的呈现起到协同或拮抗作用,本研究中使用的单体质量分数均>98%,使用质量分数更高的单体能够获得更加准确的 BTC。

3.4 文献记载的单体 BTC 与测得 BTC 的差异

文献中记载的部分单体的 BTC 与实验测得的 BTC 如表 4 所示。文献记载的 BTC 和本实验测得的 BTC 进行配对 *t* 检验,结果表明 2 组数据间不存在显著性差异 ($P>0.05$),验证了本研究结果的准确性及实验方法的可行性。

3.5 基于电子舌的药物 BTC

本研究定义的 MB 是基于 BTC 的,进行基于

表 4 文献中记载的单体 BTC 与实验测得的 BTC 的差异
Table 4 BTC difference of monomers between recorded in literature and measured experimentally

单体名称	BTC/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	
	文献记载	实测
奎宁	10.00 ^[14]	12.11
盐酸小檗碱	6.62 ^[10]	10.17
柚皮苷	34.45 ^[15-16]	184.48
柠檬苦素	2.13 ^[15]	11.68

电子舌的 BTC 预测时,样品溶液浓度的设定与口尝法相同,但实验结果表明,对于氧化苦参碱^[17],在较高的浓度时 C00 传感器对其有响应,且随着测试溶液浓度的增高,其响应值也随着增加,但是在对于口尝法测得的 BTC 时,其传感器无响应。实验结果表明,对于某些化合物,在较低浓度时,TS-5000Z 电子舌传感器不能与化合物相互作用,进而不能实现对化合物的味觉辨识。因此,灵敏度更高的传感器膜的开发,对于实现电子舌在药物 BTC 预测方面具有重要意义。

本研究以生物碱类化合物盐酸小檗碱作为标准苦味物质,对于 TS-5000Z 电子舌,其 AN0 和 BT0 两根苦味传感器能对其产生特异性响应,而苦味传感器 C00 则不响应,这 3 根传感器的响应值之间相互独立,彼此之间不能转化,因此,若某种苦味物质采用 TS-5000Z 传感器测定时,对 AN0 和 BT0 传感器能够产生响应,则可以采用本研究的方法预测其 BTC,而本研究选择的载体,没有对 AN0 传感器和 BT0 传感器产生响应的物质,在后续的研究中,应扩大研究载体,筛选能够对 AN0 传感器和 BT0 传感器产生响应的物质,对此方法的可行性进行验证。同时,可尝试选择不同味觉辨识机制的味觉传感器,建立对所有苦味物质均适用的预测 BTC 的方法。

3.6 苦味的呈味机制探讨

苦味分子可略分 2 类^[18-19]:一类含仅具有有限水溶性的疏水亲脂性物质,诸如萜类等;另一类含强极性化合物,这类物质若不仅能有效地干扰苦味受体的静电相互作用,也仍能形成强的疏水相互作用,如奎宁、咖啡因等生物碱^[20]。有研究表明,一些结构类似的化合物具有类似的苦味性质,然而其空间同分异构体构型不同往往又表现出不同的性质。如,*L*-色氨酸是典型的苦味化合物,然而其 D 型的对应异构体却表现出了甜味的性质;槲皮素只有轻微的

涩味, 但是其相同浓度的同分异构体却具有很强的苦味; 橘皮苷没有苦味, 然而其位置异构体却具有很强的苦味^[21]。此外化合物的苦味有时还与其所处的环境存在着密切关系, 如亚麻油酸在溶液中只有很弱的苦味, 而在乳剂中却表现出很强的苦味^[22-23]。

苦味化合物在自然界中分布广泛, 纵观国内外的研究, 苦味与化合物的结构有一定的关系, 但是目前仍不能阐明苦味由何而来。研究者们曾认为化合物中疏水基团决定了分子的苦味, 但是如之前所述, 同分异构体能表现出截然不同的苦味性质, 这表明空间结构也对苦味性质极为重要。近年来, 很多关于预测化合物苦味的模型被建立起来, 如 Rodgers 等^[24]利用已知的近 2 万种苦味化合物和非苦味化合物建立的模型, 在已知的化合物中, 对苦味化合物的辨别能力达到 72%, 但是该模型筛选出来的化合物只有极少数 (33 个) 被验证具有苦味。按照现在的研究成果, 对从未尝过的化合物判断其苦味性质还是非常困难的, 这也和苦味化合物与受体的结合机理有关, 仍需要进一步的探讨。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Polshin E, Rudnitskaya A, Kirsanov D, *et al.* Electronic tongue as a screening tool for rapid analysis of beer [J]. *Talanta*, 2010, 81(1/2): 88-94.
- [2] Rudnitskaya A, Polshin E, Kirsanov D, *et al.* Instrumental measurement of beer taste attributes using an electronic tongue [J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 646(1/2): 111-118.
- [3] Donley J R. Solid-phase extraction of hop acids from beer or wort for subsequent analysis [J]. *ASBC J*, 1992, 50(3): 89-93.
- [4] 郑建仙, 高宪枫, 袁尔东. AH, B, X 的甜味分子识别及其理论扩展 [J]. *中国食品添加剂*, 2001(5): 32-36.
- [5] Nakamura T, Tanigake A, Miyana Y, *et al.* The effect of various substances on the suppression of the bitterness of quinine-human gustatory sensation, binding, and taste sensor studies [J]. *Chem Pharm Bull*, 2002, 50(12): 1589-1593.
- [6] Ishizaka T, Miyana Y, Mukai J, *et al.* Bitterness evaluation of medicines for pediatric use by a taste sensor [J]. *Chem Pharm Bull*, 2004, 52(8): 943-948.
- [7] Omür-Ozbek P, Dietrich A M. Developing hexanal as an odor reference standard for sensory analysis of drinking water [J]. *Water Res*, 2008, 42(10/11): 2598-2604.
- [8] 李学林, 张耀, 陈鹏举, 等. 基于口尝评价和电子舌评价的药物苦味叠加规律研究 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(23): 5134-5142.
- [9] 舒静, 陈轩, 潘从道, 等. 不同品牌食醋味感特征的电子舌分析 [J]. *中国调味品*, 2013, 38(8): 95-98.
- [10] 王俊杰, 徐德生, 冯怡. 中药及其制剂苦味评价方法的建立 [J]. *中国中药杂志*, 2007, 32(15): 1511-1514.
- [11] 张璞, 张耀, 桂新景, 等. 基于经典人群口尝法和电子舌法的中药饮片水煎液苦度叠加规律研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(3): 653-668.
- [12] 李学林, 康欢, 田亮玉, 等. 不同类型掩味剂对龙胆、苦参、穿心莲、莲子心 4 种中药水煎液的抑苦效能及抑苦规律评价 [J]. *中草药*, 2018, 49(22): 5280-5291.
- [13] 李学林, 陈鹏举, 桂新景, 等. 电子舌在羟丙基- β -环糊精抑苦规律研究中的应用 [J]. *中草药*, 2017, 48(20): 4235-4244.
- [14] 蒲云峰. 骏枣苦味物质鉴定及形成机理研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2019.
- [15] 刘伟. 生物酶法脱除柑橘汁苦味的研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2010.
- [16] 江海. 陕西汉中柑桔种质资源调查及品质分析评价研究 [D]. 陕西: 陕西理工学院, 2015.
- [17] 李学林, 桂新景, 刘瑞新, 等. 基于电子舌法对中药苦味化合物苦度的预测 [J]. *中国新药杂志*, 2016, 25(11): 1307-1314.
- [18] Belitz H D, Wieser H. Bitter compounds: Occurrence and structure-activity relationships [J]. *Food Reviews International*, 1985, 1(2): 271-354.
- [19] Meyerhof W. Elucidation of mammalian bitter taste [J]. *Rev PhysiolBiochemPharmacol*, 2005, 154: 37-72.
- [20] 曾广植. 呈味物分子结构变更时的味道变化趋向 [J]. *自然杂志*, 1990, 12(2): 70-75.
- [21] 朱友伟. 苦味评价技术“气管味蕾”的研究及 ITC 筛选掩味物质 [D]. 南京: 南京大学, 2015.
- [22] Ley J P. Masking bitter taste by molecules [J]. *Chemosens Percept*, 2008, 1(1): 58-77.
- [23] Stephan A, Steinhart H. Bitter taste of unsaturated free fatty acids in emulsions: Contribution to the off-flavour of soybean lecithins [J]. *Eur Food Res Technol*, 2000, 212(1): 17-25.
- [24] Rodgers S, Glen R C, Bender A. Characterizing bitterness: Identification of key structural features and development of a classification model [J]. *J Chem Inf Model*, 2006, 46(2): 569-576.

[责任编辑 郑礼胜]