

## 中药苦味成分的发现策略与方法研究进展

刘惠<sup>1</sup>, 宋娇<sup>1</sup>, 林俊芝<sup>2</sup>, 苏娟<sup>1</sup>, 柯秀梅<sup>3</sup>, 仇敏<sup>1</sup>, 杨明<sup>4\*</sup>, 张定堃<sup>1\*</sup>

1. 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

2. 成都中医药大学附属医院, 代谢性疾病中医药调控四川省重点实验室, 四川 成都 610072

3. 重庆医科大学药学院, 重庆 400016

4. 江西中医药大学, 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

**摘要:** 苦味成分不仅是中药主要的呈味物质, 也是重要的药效物质。但由于中药苦味成分的多样性与结构相似性, 苦味成分的靶向分离与示踪难度大, 单一苦味成分与中药整体呈味特征有偏差, 使很多中药苦味成分仍有待深入解析。通过对传统的逐级分离与分析方法进行总结, 介绍了推测苦味来源、定位苦味部位、鉴定苦味成分、验证苦味成分等研究方法; 梳理了基于本草学知识、基于苦味成分结构相似性、基于苦味受体结合等苦味成分发现策略及数据挖掘、计算机辅助、生物靶向定位等新技术; 提出了谱-味关联分析等苦味成分发现新思路, 为更加快速、精准地发现中药苦味成分, 推动中药苦味成分解析进程。

**关键词:** 中药; 苦味成分; 发现策略; 苦味信息; 苦味受体; 技术方法

**中图分类号:** R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)05-1751-10

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.05.032

## Research progress on discovery strategies and methods of bitter ingredients in traditional Chinese medicine

LIU Hui<sup>1</sup>, SONG Jiao<sup>1</sup>, LIN Junzhi<sup>2</sup>, SU Juan<sup>1</sup>, KE Xiumei<sup>3</sup>, QIU Min<sup>1</sup>, YANG Ming<sup>4</sup>, ZHANG Dingkun<sup>1</sup>

1. State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Traditional Chinese Medicine Regulating Metabolic Diseases Key Laboratory of Sichuan Province, Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, China

3. College of pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

4. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

**Abstract:** Bitter components are not only the main taste substances in traditional Chinese medicine (TCM), but also important pharmacodynamic substances. However, due to the diversity and structural similarity of bitter components in TCM, the targeted separation and tracing of bitter components are difficult, and there is deviation between a single bitter composition and the overall taste characteristics of TCM, bitter components of many TCM still need to be further analyzed. Therefore, this article summarized traditional stepwise separation and analysis methods, introduced research methods such as predicting the source of bitter components, locating bitter parts, identifying bitter components, and verifying bitter components. The discovery strategies of bitter components based on knowledge of herbal medicine, structural similarity of bitter compositions, binding of bitter receptors, as well as new technologies such as data mining, computer-aided, and biological targeted localization were arranged. In order to discover the bitter components of TCM more quickly and accurately and promote the analysis of bitter substances in TCM, a new method for the discovery of bitter components such as spectrum-taste correlation analysis was put forward.

收稿日期: 2023-09-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82173991); 四川省重点研发计划项目 (2022YFS0431, 2022YFS0442)

作者简介: 刘惠, 硕士研究生, 研究方向为中药制剂研发。E-mail: lh3281583808@163.com

\*通信作者: 张定堃, 教授, 硕士生导师, 从事中药炮制与制剂研究。E-mail: zhangdingkun@cdutcm.edu.cn

杨明, 教授, 博士生导师, 从事中药炮制与制剂研究。E-mail: yangming16@126.com

**Key words:** traditional Chinese medicine; bitter component; discovery strategy; bitter information; bitter receptor; technology and method

中药苦味成分来源广泛，结构多样，呈味特征复杂。如何精准发现与辨识中药苦味成分，是推动中药抑苦掩味技术精准化发展的重要前提。经过多年的现代研究，部分临床常用苦味中药的主要呈味物质已相对清晰，基本摆脱了“黑箱”状态。如黄连的主要苦味成分是小檗碱、表小檗碱、药根碱等生物碱类<sup>[1]</sup>；穿心莲的主要苦味成分是穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯等萜类<sup>[2]</sup>；鸡内金的主要苦味成分是L型苦味氨基酸等<sup>[3]</sup>。然而，由于中药苦味成分的靶向分离面临技术瓶颈，导致很多中药的苦味成分仍有待阐明，整体研究尚处于“灰箱”状态。具体表现在以下2个方面。（1）挖掘苦味成分的导向性不够：中药苦味成分种类多，包括生物碱、黄酮、萜类、氨基酸、无机盐及杂醇等大类成分，部分药物可能同时含有多类苦味成分，导致传统苦味成分分离方法缺乏导向性。同时，各类苦味成分的理化性质并不完全相同，分离过程容易出现苦味部位分散的情形，增加苦味成分示踪难度。（2）苦味验证的还原性不足：中药的苦味呈现往往是多种同系物、同分异构体等化合物的苦味叠加，成分浓度、成分种类对口感影响大。此外，药物中的酸味成分会增强苦味的感知、咸味成分会抑制苦味的感知<sup>[4]</sup>，这些影响因素使得苦味成分在单一状态下与在中药复杂体系下的呈味特征存在差异。

基于此，本文通过对中药苦味成分的发现方法进行总结，并进一步提出辨识中药苦味成分的新方法、研究苦味成分的新思路，推动中药苦味成分解析方法的传承创新，为深入理解中药苦味成分的结构特征与呈味规律，科学制订抑苦掩味技术方案提供支撑。

## 1 基于本草学知识发现苦味成分

### 1.1 基于中药性能特征发现苦味成分

中药传统药性理论中的“五味”理论，记载了药物的酸、苦、甘、辛、咸5种药味。其中，苦味的性能特点为能泄、能燥，功效表现为清热泻火、通泄大便、燥湿坚阴等，多集中于清热药、泻下药等。但长久以来，传统本草文献中对于药物性能药味的记载与真实滋味的记载混杂，部分药物作为性能的五味与真实滋味相同，如黄连、苦参等。也有部分药物作为性能的五味与真实滋味并不完全一

致，如鸡内金药性为甘味，突出其健胃消食功效，但其真实滋味又为微苦味。文献记载的药性“五味”与口尝滋味的混杂，为药性理论研究带来了困惑，但也为药物真实滋味的研究提供了线索。对于一些临床使用频率较低、药味研究较薄弱的中药或民族药，可通过文献药性记载或功效特点初步判断其真实滋味，继而寻找苦味成分。胡亚楠<sup>[5]</sup>建立了苦味性、效生物网络，从现代科学的角度阐释真实苦味和性能苦味相关靶点的一致性，探究苦味中药与清热解毒生物靶点间的关联程度，提示可遵循该线索发现中药的苦味成分。

### 1.2 基于苦味植物来源发现苦味成分

药用植物亲缘学在寻找替代药源、开发植物新类群中具有重要的指导作用<sup>[6]</sup>，为挖掘苦味新成分和开发中药苦味新应用拓展了思路。研究苦味中药的植物来源，主要分布于菊科、芸香科、百合科、豆科、唇形科、伞形科、五加科（图1）等，苦味成分广泛分布的类群可能蕴含更多的潜在苦味成分。在植物分类学中，亲缘相同或相近的物种表现出相似的外观性状，可能蕴含相似的生物学信息，遗传规律下可能具有相同或相近的次生代谢产物合成途径，因此含有某些相同成分的几率更大。以人参为例，苦味主要来源于人参皂苷类成分，其同科同属近种的西洋参与三七也具有类似的苦味、含有相同的人参皂苷类成分。此外，三七中人参皂苷含量显著高于人参、西洋参，因此，三七的苦味更为强烈。挖掘苦味成分时，从中药植物亲缘性出发，可为判别苦味来源缩小筛选范围、减少研究的盲目性，即优先选择与已知苦味中药亲缘相近的物种作为苦味研究的对象。

## 2 苦味成分的分离与分析方法

### 2.1 苦味部位的逐步分离与精制

采用分离技术将苦味成分从中药中逐步分离、浓集，是研究苦味成分的关键。系统分离法结合大孔吸附树脂分离是获得苦味成分集中部位的常用方法。根据苦味成分的化学结构特征，大多数苦味成分都有一定疏水性或疏水结构<sup>[7]</sup>，主要存在于中低极性溶剂部位。根据“相似相溶”原理，系统溶剂分离法<sup>[8]</sup>可获得相应溶剂的提取部位。相较于离子交换色谱多应用于分离具有离子官能团的成分，凝

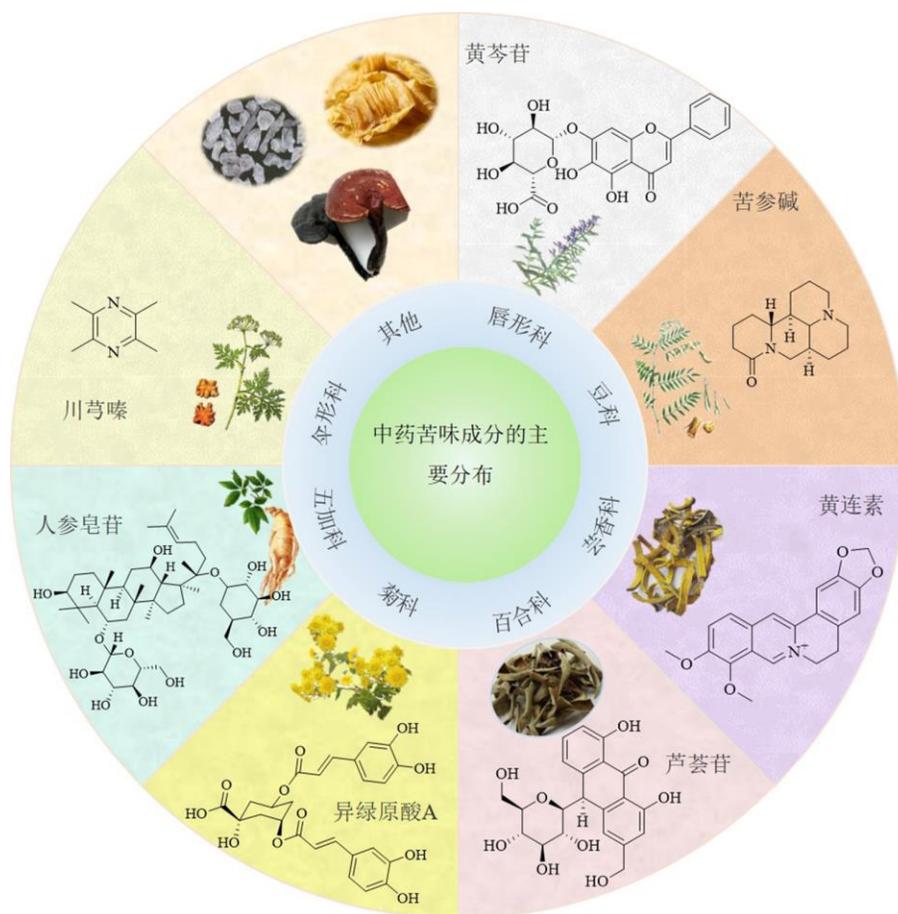


图 1 按主要苦味成分划分的中药分布

Fig. 1 Distribution of traditional Chinese medicine by main bitter components

胶滤过色谱主要用于分离存在相对分子质量差异的成分，大孔树脂吸附分离法应用范围更广泛，更适用于各种天然产物的分离纯化<sup>[9]</sup>，通过对初分离得到的苦味成分群进行吸附和洗脱，可实现苦味成分的进一步精制、富集。由于不同树脂型号对不同化合物吸附能力不同，根据潜在苦味成分的结构特征选择合适的树脂型号，可达到更好的分离效果。

## 2.2 现代分析方法鉴定苦味成分

结合感官导向的现代分析技术是研究中药苦味成分的重要手段，有助于提高发现苦味成分的效率。Pickrahn 等<sup>[10]</sup>通过二维液相色谱结合滋味稀释分析方法，从茴香提取物的 256 种组分中识别到苦味阈值最低的成分 2-甲基丁酸反式假异戊烯醇，现代分析方法与感官导向方法有助于从复杂滋味成分中快速筛选关键苦味成分。超高效液相色谱联合飞行时间串联质谱是现代应用最广的分析技术之一<sup>[11]</sup>，能实现中药组分的识别与鉴定。Yu 等<sup>[12]</sup>在感官引导下借助高效液相色谱串联质谱鉴定出杭白芷中的水合

氧化前胡素、佛手柑内酯、花椒毒酚、欧前胡素、异茴芹内酯和氧化前胡素 6 种苦味成分。Ke 等<sup>[13]</sup>通过溶剂萃取、色谱分离、感官分析、超高效液相色谱飞行时间质谱鉴定等多种分析方法的联用，从花椒中分离出了 7-甲氧基香豆素和 8-异戊烯基山柰酚 2 种苦味成分。

## 2.3 主客观方法联用评价苦味特征

药物口感评价包括感官评价等主观分析方法和动物偏好实验、电子舌评价、电生理实验等客观分析方法<sup>[14]</sup>，其中，感官评价和电子舌应用较多。感官评价是经典的苦味评价方法，运用范围最广、时间最久、最能反映真实味觉，志愿者可准确描述药物的苦味特征及其他感官特征。但由于志愿者个体差异大，评价结果受志愿者生理、心理及环境因素的影响<sup>[15]</sup>，评价结果差异较大；此外，对于部分存在毒性、刺激性样品难以适用。电子舌是味觉评价的重要方法，采用膜电位传感器模拟人体的味觉感受器，将苦味化合物浓度信号转换为电势信号予以

量化表征,具有检测灵敏、样品消耗量少等优点。Zhang等<sup>[16]</sup>采用电子舌评价辅助发现穿心莲的4种关键苦味成分——穿心莲内酯、新穿心莲内酯、14-去氧穿心莲内酯与脱水穿心莲内酯。但电子舌传感电极工作原理始终不同于人体真实的味觉细胞,评价结果与真实的味觉感受存在一定差异<sup>[17]</sup>。感官评价与电子舌评价各有所长,滋味研究中通常将2种方法联用以弥补不足,相互佐证实验结果,增加实验结果的可靠性。张璞等<sup>[18]</sup>以不同苦味中药水煎液为研究对象,将感官评价与电子舌评价相结合,探究了不同种类苦味成分的苦度叠加规律。

#### 2.4 成分敲入法还原验证苦味

对于分离出的单一苦味成分,其苦味特征可能与中药材或水煎液的整体苦味特征有明显差异。因

此,潜在苦味成分既需要单一口感验证,也需要置于整体背景下进行验证。成分敲入法是指将潜在苦味成分按照不同浓度梯度分别加入到药液样品中,通过比较敲入前后不同组别样品的口感差异,评价潜在苦味成分对于整体口感的贡献度,探究其“含量-苦味强度”关系<sup>[19-20]</sup>。成分敲入法<sup>[21]</sup>符合中药复杂体系组成特征,能在整体背景下还原验证潜在成分苦味,是一种较好的验证方法。丁涌波等<sup>[22]</sup>在挖掘花椒精油苦味来源的研究中,通过减压蒸馏份离出各馏份,在感官导向下定位苦味馏份,利用气相色谱-质谱法鉴定出了花椒中芳樟醇、崖伯酮、香芹酮、隐品酮4种主要的苦味成分,最后采用对照品加入法结合苦味阈值相关性分析验证其苦味。苦味成分分离、分析、评价、验证过程见图2。

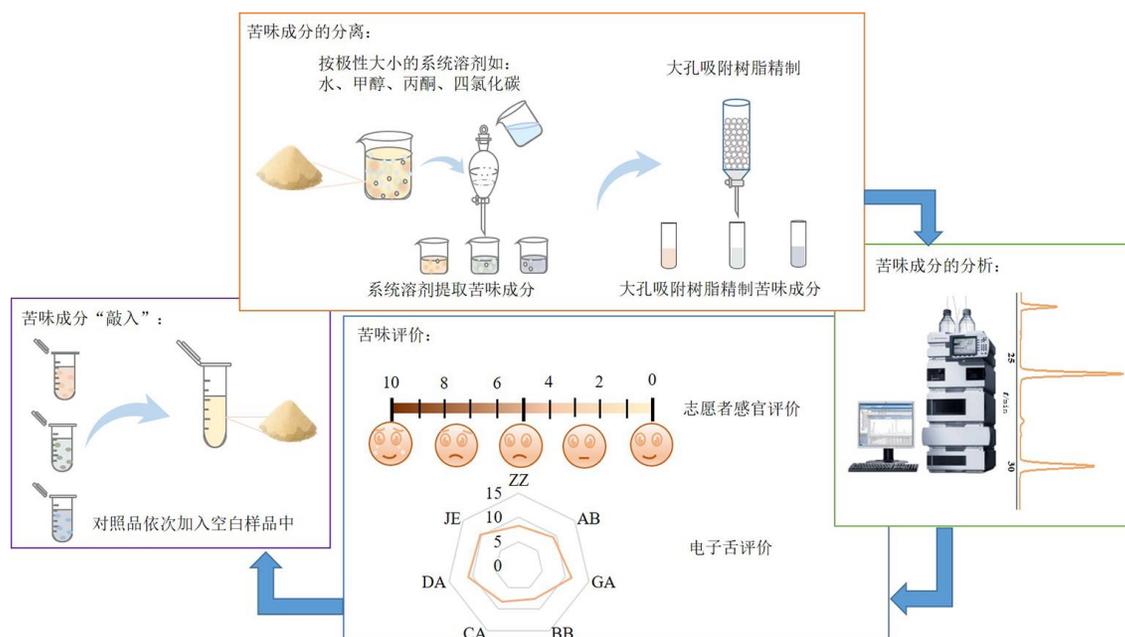


图2 苦味成分分离、分析、评价、验证过程

Fig. 2 Process of separating, analyzing, evaluating, and verifying of bitter components

### 3 基于结构相似性的苦味成分发现策略

结构相似性是发现新成分或现有成分新活性的重要识别手段,通过对“模板”成分进行结构对比,推测具有一定结构相似性的未知成分可能具有“模板”成分的同或相似性质,结构上的差异性又导致该成分表现出不同于“模版”成分的性质。以黄连为例,其化学成分小檗碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀、药根碱的合成前体物都是苯丙氨酸,类别上均属于异喹啉类生物碱,结构中都含有异喹啉环、氮碱基,使其均具有相似的苦味<sup>[23]</sup>。但由于这几种生物碱在供氢体数量、可旋转键数量、相对

分子质量、疏水性等结构参数上存在差异,苦味强度总体呈现出黄连碱>表小檗碱>小檗碱>巴马汀>药根碱<sup>[24]</sup>。

大量研究表明,苦味成分的苦味强度受到相关连接基团的影响。咖啡碱、柚皮苷、胆汁因含重氮基团而呈现苦味,生物碱的苦味强度受氮元素杂化状态影响<sup>[25]</sup>;无机盐因含锂、钙、铷、铯等碱金属离子可与某些成分络合从而产生苦味<sup>[26]</sup>;蛋白质、多肽、氨基酸因暴露的疏水性基团而呈现苦味<sup>[27]</sup>;酚类成分的苦味与相对分子质量有关<sup>[28]</sup>。此外,糖苷类、萜类成分的苦味与化学键有关,含硫苷键、

氮苷键、氰苷键的苷类成分大多具有苦味，萜类成分因其内酯、内缩醛、内氢键、糖苷羟基等可形成螯合物而呈现苦味<sup>[29]</sup>。综上，各类成分的苦味主要与官能团、相对分子质量及化学键有关（表 1）。BitterPredict 是一个基于机器学习算法的苦味分类器，主要以 BitterDB 数据库为苦味分子数据集，以现有文献中检索到的非苦味分子为非苦味分子数据集，在机器算法下通过化合物的化学结构预测其是

否味苦，在一些外部测试集和感官验证中正确分类了 70%~90%的化合物<sup>[32]</sup>。此外，BitterPredict 在苦味分类过程中突出了总电荷、表面相关性质和毒性等分子性质作为区分苦味与非苦味的重要依据，为深入理解苦味分子的结构特征和呈味规律提供参考。基于结构相似性或苦味基团发现苦味成分的重要前提是化学结构已知，故此法多应用于结构已知成分的苦味判断。

表 1 苦味种类及其代表性苦味成分、呈苦原因

Table 1 Bitter types and their representative bitter components, cause of bitter

种类	苦味成分	呈苦原因	文献
生物碱类	小檗碱、苦参碱、奎宁等	含氮碱性基团	30
氨基酸类	L 型氨基酸（酪氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸等）	疏水基团	31
酚类	柚皮苷、芦丁、儿茶素等	相对分子质量	28
萜类	人参皂苷、穿心莲内酯、龙胆苦苷等	内酯、内缩醛、内氢键和糖苷羟基	29
无机盐类	镁盐、铵盐、卤化物等	碱金属离子	26
杂醇类	杂醇油（异丁醇、异戊醇、酪醇等）	不明确	

#### 4 基于苦味受体的苦味成分发现策略

苦味受体对苦味成分的识别作用是判断化合物苦味的重要依据。苦味分子激活苦味受体，引起苦味细胞膜去极化、释放神经递质，信号传导至大脑皮层形成苦味的认知。苦味感知实际是苦味物质与苦味受体在结合位点的结构互补、能量互补。三点接触理论是目前公认度最高的苦味成分结构理论，认为苦味化合物分子与苦味受体均应具有 AH（亲电性基团）、B（亲核性基团）及 X（疏水基团），其中，化合物 AH 与受体 A'结合，化合物 X 与受体 X'结合，而 B'位置悬空，方能形成苦味<sup>[33]</sup>。基于苦味受体的识别作用，梳理出分子对接、药效团模型等虚拟筛选方法，细胞膜色谱法、亲和超滤法等生物垂钓筛选方法<sup>[34]</sup>，及等温滴定量热法、钙离子测定等理化检测筛选方法（表 2）。

分子对接和药效团模型基于苦味受体理论快速筛选潜在苦味成分，为苦味分子与苦味受体的结合作用提供重要信息，辅助苦味成分的结构分析；细胞膜色谱法和亲和超滤法基于苦味受体对苦味成分的识别作用，利用苦味受体筛选中药混合组分中的苦味物质；等温滴定量热法测量反应过程中的热量变化，检测苦味分子的存在，判断成分的苦味强弱；钙离子测定是苦味信号的间接表征，钙离子信号的强弱反映苦味成分的多少。相较于依据成分

的结构相似性判别苦味，基于苦味受体对苦味分子的结合作用，采用计算机虚拟筛选、生物化学检测方法，判别苦味成分与苦味受体的结合能、反应热、反应信号，利用超滤膜、生物柱色谱滤过筛选苦味成分，所得实验结果更具象，也更具有说服力。

#### 4.1 虚拟筛选

4.1.1 分子对接 分子对接是基于受体结构筛选配体分子的虚拟筛选方法，在中药活性成分筛选中发挥着重要作用。分子对接法借助化合物数据库、对接软件对化合物分子和生物受体进行对接模拟，利用机器算法对对接结果进行评价<sup>[35]</sup>，以评价结果判断化合物分子与生物受体亲和力，以此筛选高亲和力的目标成分。对接过程主要包括数据库选择化合物分子、化合物与受体三维结构转化、对接方法选择、对接结果评价等。BitterDB 是应用较多的公共苦味分子数据库，涵盖 700 多种苦味成分的名称、结构、能激活的苦味受体及苦味成分间的相似度<sup>[36]</sup>，为苦味分子对接提供了数据平台。韩彦琪等<sup>[37]</sup>利用同源建模、分子对接，初步推测延胡索中原小檗碱型化合物可能是其主要的苦味成分。李轩豪等<sup>[38]</sup>采用分子对接技术，发现翼首草中的苦味成分主要是 8-表马钱苷酸、马钱苷酸等环烯醚萜苷类成分和新绿原酸、咖啡酸等酚酸类成分。需要注意的是，分子对接结果的准确性主要依赖于对接方法及评价打

表 2 苦味物质研究方法

Table 2 Research methods for bitter components

研究方法	方法简介	优点	不足	联用技术
分子对接	计算机辅助筛选与苦味受体结构匹配的配体分子，从众多化合物中筛选与苦味受体亲和力最强的化合物	高通量筛选，高效、便捷，提高筛选效率	耗费计算资源，筛选结果受对接程序、对接方法、评分方法影响	网络药理学
药效团模型	根据苦味受体活性位点构建药效团模型，从众多化合物中筛选与药效团模型相似度最高的化合物	高通量筛选，快速、方便，有助于预测受体与配体间的作用方式及配体分子结构	耗费资源建模、训练、验证药效团	机器学习
亲和超滤法	基于苦味受体对苦味成分的识别作用，利用载有苦味受体的超滤膜固定与苦味受体有较高亲和作用的化合物	与分析技术联用可实现成分筛选、分析，操作简单、便捷	可能造成假阳性、假阴性结果	高效液相色谱-质谱
细胞膜色谱法	基于苦味受体对苦味成分的识别作用，固定有细胞膜的色谱柱保留与苦味受体亲和力强的化合物	集成分离、筛选于一体，动态反映苦味受体对苦味物质的特异性识别	细胞膜活性周期有限，可能脱落	色谱
等温滴定量热法	监测由滴加的化合物引起反应体系的热量变化，测定苦味受体与苦味成分反应过程中吸收或释放的热量	高灵敏度，连续监测，无需标记，提供生物分子相互作用的热力学信息和动力学信息	特异性不高，难以特异性检测苦味受体与苦味物质反应	光谱
钙离子测定法	通过钙离子量化手段，测定苦味受体识别苦味成分过程中胞内外的钙离子流动变化	有成熟的钙离子量化技术支持	特异性不足，难以特异性表征苦味受体与苦味成分反应	等温滴定量热法

分，对接分数高不代表分子配体与生物受体结合作用一定好，后续还需进行生物实验验证。

**4.1.2 药效团模型** 药效理论认为相同活性的分子有结构相同的药效团。药效团模型在苦味成分筛选中发挥着重要作用，是应用较多的虚拟筛选方法之一。该方法的重点是构建药效团模型和筛选候选物。构建药效团主要内容包括生成数据集、构建药效团、验证药效团。目前已知人类的苦味受体有 25 种，不同苦味受体结构存在差异，任何一种苦味受体都无法识别所有的苦味分子。Meyerhof 等<sup>[39]</sup>验证了人体内 25 个苦味受体与苦味成分间并非“一对一”识别，如典型的苦味成分——咖啡因<sup>[40]</sup>，可以同时被 TAS2R7、10、43、46 多个苦味受体识别，TAS2R39 可以同时识别茶黄素和茶黄素-3,3'-O-双没食子酸酯<sup>[41]</sup>。为提高筛选苦味成分成功率的同时减少工作量，一般选择具有苦味广谱性的 TAS2R10、TAS2R14<sup>[42-43]</sup>、TAS2R46<sup>[39]</sup>受体来构建药效团模型。Zhang 等<sup>[44]</sup>通过构建 TAS2R14 药效团模型，从柴胡主要活性成分柴胡皂苷的 3 种亚型（柴胡皂苷 a~c）中鉴定出柴胡皂苷 b 为 TAS2R14 的直接激动剂。Ke 等<sup>[45]</sup>建立了 TAS2R10、14、46 受体的药效团模型，分别从黄连解毒汤中筛选出二氢木脂素 A、

黄芩黄酮 II、黄柏酮等 15 或 16 种苦味成分。分子对接、药效团模型是应用最广泛的虚拟筛选方法，2 种方法常在数据平台和计算机软件结合使用。此外，药效团模型与化学计量方法联用可用于推测苦味分子构象、计算配体与受体结合能量。

## 4.2 生物垂钓

**4.2.1 亲和超滤法** 亲和超滤法是一种基于生物受体亲和作用筛选配体分子的方法<sup>[46]</sup>，与分析方法联用可实现活性成分的快速筛选与识别。分离苦味受体细胞并培养，将其固定在超滤膜上来过滤筛选潜在的苦味物质（图 3）。筛选苦味成分主要有 2 部分：（1）亲和识别、滤过筛选苦味成分；（2）解析成分、验证活性。在亲和识别成分中，需对亲和条件如苦味受体的用量进行考察。若苦味受体过多，无亲和力或弱亲和力的成分可能会通过物理作用与空白受体结合，造成假阳性结果；倘若苦味受体过少，活性成分可能会因无靶标受体可结合而流失，造成假阴性结果。在成分分析部分，亲和超滤法常联用质谱技术或液质技术用于中药活性成分的筛选<sup>[46-47]</sup>。相较于传统的提取、分离、鉴定再活性验证的分析方法，亲和超滤法在筛选苦味活性成分的同时，剔除了无苦味活性的成分，达到富集苦味成分的效果，有利

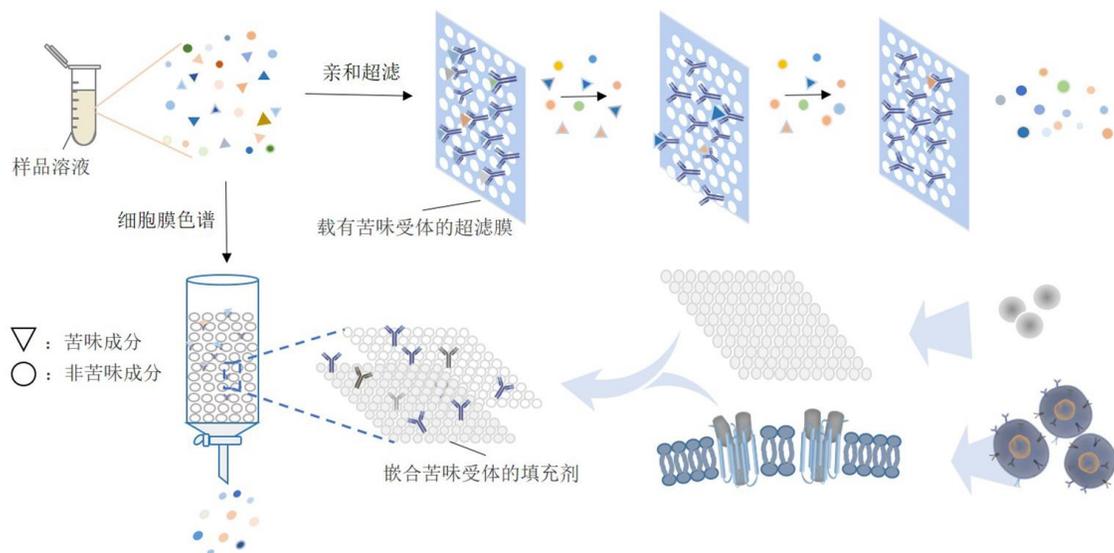


图3 亲和超滤法和细胞膜色谱法筛选苦味成分

Fig. 3 Affinity ultrafiltration method and cell membrane chromatography method screen bitter components

于苦味成分的高效发现。

**4.2.2 细胞膜色谱法** 细胞膜色谱法是一种基于膜受体与配体分子亲和作用识别、分离活性成分的生物色谱方法<sup>[48]</sup>。根据目标成分选用相关活性的细胞，可分离相应活性成分。在以苦味成分作为目标成分的细胞膜色谱法筛选实验中，将苦味细胞膜嵌合到色谱柱中作为固定相，含有潜在苦味成分的中药提取液流经色谱柱模拟服药后中药成分的体内过程，色谱柱可有效保留与苦味受体亲和程度高的药物分子，达到苦味受体亲和识别苦味成分和色谱柱分离苦味成分的双重作用。细胞膜存在活性周期，可能因为嵌合不稳固而脱落，影响筛选成分的效率。为提高细胞膜色谱柱的使用周期，通常会在传统细胞膜色谱法的基础上做出改进，如利用磁性纳米颗粒辅助稳定细胞膜<sup>[49]</sup>。细胞膜色谱法利用苦味细胞膜的特异性识别苦味成分，利用高效率的色谱柱分离苦味成分，有望为分离中药苦味成分提供一种生物垂钓结合化学分离的筛选方法。Tang等<sup>[50]</sup>将小鼠胚胎成纤维3t3-11细胞与黄连粗提物共孵化，再结合高效液相色谱分析技术，应用此法成功筛选出黄连中的小檗碱成分。

### 4.3 理化检测

**4.3.1 等温滴定量热法** 等温滴定量热法是基于化合物分子与生物蛋白相互作用产生的微量热变化来识别成分，是一种通过物理检测识别生物反应来筛选苦味物质的方法<sup>[51]</sup>。分子间发生作用会产生热量信息，测定反应过程的焓、熵、自由能等热力学参

数、结合解离常数、结合常数等可推测反应物的化学计量比。此法还可直接测量反应速率<sup>[52]</sup>，一定程度上反映化合物的浓度和活性。采用此法筛选苦味成分，计算机监测苦味受体结合苦味成分时的热量变化，以此表征是否存在苦味成分及其结合强弱(图4)。Ogi等<sup>[53]</sup>采用等温滴定量热法检测苦味成分与脂肪酸发生作用时的热量变化，发现热量变化强度与脂肪酸的碳链长度有关，为脂肪酸掩蔽苦味机制研究提供重要参考。柚皮素是一种苦味的类黄酮，与蛋白质形成复合物可有效掩盖苦味，Nunes等<sup>[54]</sup>采用等温滴定量热法表征柚皮素与乳铁蛋白1:1复合物的热力学结合，结果表明该复合物的形成主要由焓和熵驱动。相较于其他苦味成分筛选方法，该法无需固定或标记苦味受体，稳定性好、灵敏度高，可用于检测苦味成分的初步筛选。

**4.3.2 钙离子测定法** 钙离子是苦味受体上钙敏感体的内源性配体，可作为反映苦味成分激活苦味受体的重要信号<sup>[55]</sup>。苦味信号传导过程中会引起钙离子内流、内质网释放钙离子，苦味细胞内外钙离子浓度会发生显著变化。钙离子量化手段成熟，钙离子测定、钙离子成像<sup>[56]</sup>可以量化胞内钙离子变化。Abbas等<sup>[57]</sup>通过钙成像反应，辅助啤酒花苦酸(matured hop bitter acids, MHBA)筛选能诱导MHBA刺激肠内分泌细胞产生胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK)的苦味受体，结果表明，人TAS2R1、8、10和小鼠TAS2R119、130、105有助于MHBA诱导肠内分泌细胞产生CCK。钙成像技术可以记录胞内钙

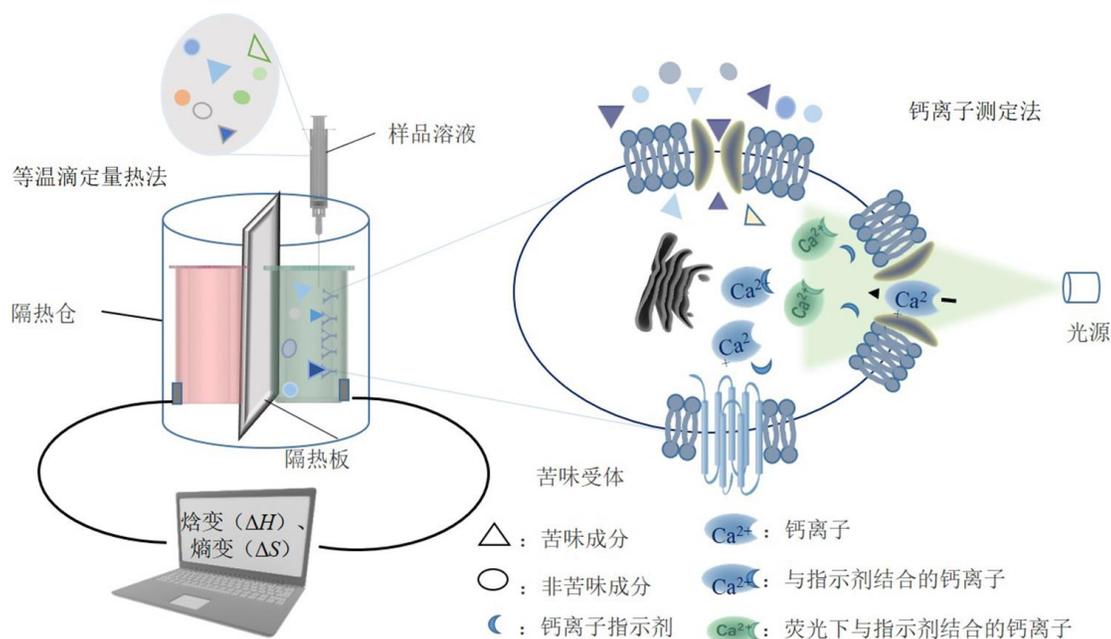


图4 等温滴定量热法和钙离子测定法检测苦味成分

Fig. 4 Isothermal titration calorimetry method and calcium ion measurement method detect bitter components

离子的动态变化, 钙离子荧光探针<sup>[58]</sup>可将受体细胞内的钙离子浓度变化通过信号转化以荧光的形式展现出来(图4)。虽然内质网上钙离子的流动、细胞膜上钙离子的进出并非仅由苦味冲动引发, 但该方法可用于潜在苦味成分的快速筛查。

## 5 结语与展望

谱-效关联法利用数据分析方法将指纹图谱与药效学信息关联, 常应用于中药活性与成分关系研究和中药质量控制<sup>[59]</sup>, 为苦味成分发现提供了新思路——谱-味关联。谱-味关联以中药化学成分指纹图谱和口感评价为研究内容, 以数据分析方法为研究手段, 构建谱-味数学模型, 揭示成分-苦味的相关性。现代技术支撑下的中药化学指纹图谱、中药生物指纹图谱能全面反映苦味中药的整体组分和药效活性, 灰色关联度分析、多元线性回归分析、主成分分析等单一分析方法使用或多种分析方法联用等数据分析方法将为苦味成分的筛选提供有力支撑。课题组以谱-味关联为研究思路, 解析了12批不同来源三七水提液化学指纹图谱与苦味强度的相关性, 发现了人参皂苷Rg<sub>1</sub>等3种主要苦味成分<sup>[60]</sup>, 为其他苦味成分发现提供了方法参考。

本文根据中药苦味特点结合当下研究手段综述了中药苦味成分发现策略, 为从中药复杂体系中分离分析苦味成分提供了方法参考。本草学知识可通过文献性效记载、植物亲缘关系初步判断药物的

整体苦味, 减少苦味成分筛选的盲目性。传统分离手段逐步分离富集苦味成分, 定性定量分析手段可辅助实现苦味成分的精准辨识。利用苦味成分的结构相似性或特征性苦味基团, 是发现苦味成分的重要途径。基于苦味受体的识别作用, 发展出分子对接等虚拟筛选方法、亲和超滤等生物垂钓筛选方法、等温滴定量热等理化检测方法。基于数据挖掘和机器算法的发展, 谱-味分析法可为发现关键苦味成分提供参考方法。上述方法在挖掘苦味成分方面各有优势, 但也存在一定局限性, 多法联用可取长补短, 提高苦味成分发现几率, 将成为未来中药苦味成分发现的重要思路。中药苦味成分的精准发现, 对于深入理解中药的苦味呈味特征与机制具有理论价值, 对开发针对性的掩苦抑味方法具有现实意义。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] 葛改变, 吴心悦, 陈姣, 等. 计算机虚拟筛选技术在中药苦味物质基础中的研究应用 [J]. 中国新药杂志, 2022, 31(13): 1273-1281.
- [2] 李学林, 田亮玉, 张耀, 等. 4种苦味抑制剂对3种苦味成分的掩味效果 [J]. 中成药, 2018, 40(8): 1741-1747.
- [3] Kawai M, Sekine-Hayakawa Y, Okiyama A, et al. Gustatory sensation of (L)- and (D)-amino acids in humans [J]. *Amino acids*, 2012, 43(6): 2349-2358.
- [4] 姜红, 林俊芝, 张定堃, 等. 呈味物质相互作用及口腔释药速率对制剂苦味感知影响的研究进展 [J]. 中药

- 材, 2016, 39(10): 2392-2396.
- [5] 胡亚楠. 中药苦味与清热解毒、活血化瘀功效关系生物网络机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- [6] 肖培根, 李旻辉, 郝大程, 等. 药用植物亲缘学理论创新与应用实践 [J]. 中国现代中药, 2021, 23(9): 1499-1505.
- [7] Jiang D S, Peterson D G. Identification of bitter compounds in whole wheat bread [J]. *Food Chem*, 2013, 141(2): 1345-1353.
- [8] 宋玉鹏, 刘凯洋, 陈海芳, 等. 多溶剂萃取法分离制备陈皮中的川陈皮素和橘皮素 [J]. 中国新药杂志, 2017, 26(8): 952-956.
- [9] 刘丹, 吴叶红, 李玮桓, 等. 大孔吸附树脂在天然产物分离纯化中的应用 [J]. 中草药, 2016, 47(15): 2764-2770.
- [10] Pickrahn S, Sebald K, Hofmann T. Application of 2D-HPLC/taste dilution analysis on taste compounds in aniseed (*Pimpinella anisum* L.) [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(38): 9239-9245.
- [11] 郭伟魁, 严倩茹, 宋伟. 液相色谱检测器联用技术在中药分析中的应用进展 [J]. 中国药事, 2022, 36(5): 569-577.
- [12] Yu M G, Li T, Raza A, et al. Sensory-guided identification of bitter compounds in Hangbaizhi (*Angelica Dahurica*) [J]. *Food Res Int*, 2020, 129: 108880.
- [13] Ke J X, Cheng J X, Luo Q Y, et al. Identification of two bitter components in *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. and exploration of their bitter taste mechanism through receptor hTAS2R14 [J]. *Food Chem*, 2021, 338: 127816.
- [14] Wang P H, Ye X, Liu J, et al. Recent advancements in the taste transduction mechanism, identification, and characterization of taste components [J]. *Food Chem*, 2024, 433: 137282.
- [15] 李潘, 韩雪, 林俊芝, 等. 志愿者感官试验在药物味觉评价的运用及发展研究 [J]. 中国药学杂志, 2017, 52(22): 1971-1975.
- [16] Zhang X, Wu H W, Yu X K, et al. Determination of bitterness of *Andrographis herba* based on electronic tongue technology and discovery of the key compounds of bitter substances [J]. *Molecules*, 2018, 23(12): 3362.
- [17] 王兴亚, 庞广昌, 李阳. 电子舌与真实味觉评价的差异性研究进展 [J]. 食品与机械, 2016, 32(1): 213-216.
- [18] 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.
- [19] 李晨旭, 任延娜, 姚静, 等. 基于经典人群口尝法的苦味药物“比苦度”定量方法研究 [J]. 中草药, 2023, 54(09): 2758-64.
- [20] 王青晓, 高晓洁, 桂新景, 等. 基于苦味阈值浓度的苦味中药分子苦度当量定量方法研究 [J]. 中草药, 2022, 53(21): 6698-6705.
- [21] 蒋运斌, 杨荣平, 祝婧. 基于网络药理学和成分敲除/敲入的中药多维药效物质基础研究方法 [J]. 江西中医药大学学报, 2021, 33(1): 114-118.
- [22] 丁涌波, 罗东升, 陈光静, 等. 花椒精油的苦味成分鉴定 [J]. 食品科学, 2017, 38(24): 74-80.
- [23] 盖晓红, 刘素香, 任涛, 等. 黄连的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(20): 4919-4927.
- [24] 李潘, 仇敏, 田寅, 等. mPEG-PLLA掩蔽黄连生物碱苦味的构-效关系研究 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(13): 3128-3135.
- [25] 代丽凤, 罗理勇, 罗江琼, 等. 植物苦味物质概况及其在食品工业的应用 [J]. 中国食品学报, 2020, 20(11): 305-318.
- [26] 曾广植. 苦味物的结构规律与诱导适应的受体模型 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1981, 8(6): 14-21.
- [27] Liu B Y, Li N N, Chen F S, et al. Review on the release mechanism and debittering technology of bitter peptides from protein hydrolysates [J]. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2022, 21(6): 5153-5170.
- [28] Castro R I, Forero-Doria O, Guzmán L, et al. New polymer for removal of wine phenolics: Poly(*N*-(3-(*N*-isobutyrylisobutyramido)-3-oxopropyl)acrylamide) (P-NIOA) [J]. *Food Chem*, 2016, 213: 554-560.
- [29] 张开诚. 苦味机理与苦味抑制技术研究概况 [J]. 中国调味品, 2004, 29(11): 39-42.
- [30] 金日生. 生物碱类化合物配位色谱分析方法研究 [D]. 合肥: 合肥工业大学, 2009.
- [31] 毕继才, 崔震昆, 张令文, 等. 苦味传递机制与苦味肽研究进展 [J]. 食品工业科技, 2018, 39(11): 333-338.
- [32] Dagan-Wiener A, Nissim I, Ben Abu N, et al. Bitter or not? BitterPredict, a tool for predicting taste from chemical structure [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 12074.
- [33] Li P, Tian Y, Ke X M, et al. Amphiphilic block copolymers: A novel substance for bitter-masking in aqueous solutions [J]. *Mol Pharm*, 2020, 17(5): 1586-1595.
- [34] Hou X F, Sun M, Bao T, et al. Recent advances in screening active components from natural products based on bioaffinity techniques [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10(10): 1800-1813.
- [35] Zhang B H, Li H, Yu K Q, et al. Molecular docking-based computational platform for high-throughput virtual screening [J]. *CCF Trans High Perform Comput*, 2022, 4(1): 63-74.
- [36] Wiener A, Shudler M, Levit A, et al. BitterDB: A database

- of bitter compounds [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(Database issue): D413-D419.
- [37] 韩彦琪, 许浚, 龚苏晓, 等. 基于味觉、嗅觉受体分子对接技术的中药性味物质基础研究的路径和方法 [J]. *中草药*, 2018, 49(1): 14-19.
- [38] 李轩豪, 苏锦松, 刘秀华, 等. 基于分子对接技术的藏族药翼首草“苦味”成分研究 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(15): 3157-3161.
- [39] Meyerhof W, Batram C, Kuhn C, *et al.* The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors [J]. *Chem Senses*, 2010, 35(2): 157-170.
- [40] 陈钰莹, 孙红波, 宋萧萧, 等. 咖啡苦味特性研究进展 [J]. *食品科学*, 2020, 41(9): 285-293.
- [41] Yamazaki T, Sagisaka M, Ikeda R, *et al.* The human bitter taste receptor hTAS2R39 is the primary receptor for the bitterness of theaflavins [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2014, 78(10): 1753-1756.
- [42] Nowak S, Di Pizio A, Levit A, *et al.* Reengineering the ligand sensitivity of the broadly tuned human bitter taste receptor TAS2R14 [J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2018, 1862(10): 2162-2173.
- [43] Di Pizio A, Waterloo L A W, Brox R, *et al.* Rational design of agonists for bitter taste receptor TAS2R14: From modeling to bench and back [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77(3): 531-542.
- [44] Zhang Y X, Wang X, Li X, *et al.* Identification of a specific agonist of human TAS2R14 from *Radix Bupleuri* through virtual screening, functional evaluation and binding studies [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 12174.
- [45] Ke X M, Ma H Y, Yang J X, *et al.* New strategies for identifying and masking the bitter taste in traditional herbal medicines: The example of Huanglian Jiedu Decoction [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 843821.
- [46] 周慧, 王义民, 郑重, 等. 亲和超滤质谱技术在中药活性成分筛选中的研究进展 [J]. *质谱学报*, 2018, 39(6): 641-652.
- [47] 郭思琪, 杨华, 李萍. 亲和超滤结合液质技术在中药有效成分发现中的应用 [J]. *药学学报*, 2016, 51(7): 1060-1067.
- [48] 马文苑, 谢媛媛, 王义明, 等. 细胞膜色谱技术在中药质量评价中的应用与思考 [J]. *药学学报*, 2017, 52(12): 1827-1838.
- [49] Liao F Y, He D M, Vong C T, *et al.* Screening of the active ingredients in Huanglian Jiedu Decoction through amide bond-immobilized magnetic nanoparticle-assisted cell membrane chromatography [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1087404.
- [50] Tang C, Wu X D, Yu Y M, *et al.* Cell extraction combined with off-line HPLC for screening active compounds from *Coptis chinensis* [J]. *Biomed Chromatogr*, 2016, 30(4): 658-662.
- [51] Johnson C M. Isothermal titration calorimetry [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2263: 135-159.
- [52] Di Trani J M, De Cesco S, O'Leary R, *et al.* Rapid measurement of inhibitor binding kinetics by isothermal titration calorimetry [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 893.
- [53] Ogi K, Yamashita H, Terada T, *et al.* Long-chain fatty acids elicit a bitterness-masking effect on quinine and other nitrogenous bitter substances by formation of insoluble binary complexes [J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(38): 8493-8500.
- [54] Nunes N M, Coelho Y L, Castro J S, *et al.* Naringenin-lactoferrin binding: Impact on naringenin bitterness and thermodynamic characterization of the complex [J]. *Food Chem*, 2020, 331: 127337.
- [55] 赵秀英, 杭苏琴, 朱伟云. 钙感受受体介导的信号传导通路及生理功能 [J]. *动物营养学报*, 2015, 27(3): 703-714.
- [56] Vogt N. Calcium imaging in the NIR [J]. *Nat Methods*, 2021, 18(1): 32.
- [57] Abbas S, Koch K W. Quantitative determination of Ca<sup>2+</sup>-binding to Ca<sup>2+</sup>-sensor proteins by isothermal titration calorimetry [J]. *Bio-protocol*, 2020, 10(7): e3580.
- [58] 黄致远, 赵旭鹏, 徐伟刚, 等. 细胞钙离子荧光探针研究进展 [J]. *生命的化学*, 2021, 41(12): 2598-2605.
- [59] 赵娟, 谢世静, 赵兴华, 等. 中药指纹图谱质控方法研究进展 [J]. *云南中医中药杂志*, 2020, 41(1): 82-86.
- [60] Yang J, Qiu M, Lu T, *et al.* Discovery and verification of bitter components in *Panax notoginseng* based on the integrated strategy of pharmacophore model, system separation and bitter tracing technology [J]. *Food Chem*, 2023, 428: 136716.

[责任编辑 赵慧亮]