

基于电子舌与人感官的小儿清热宁颗粒滋味关键质量属性 辨识及配方优化

胡小艳¹, 陆影^{2,3}, 王晓萌^{2,3}, 马丽娟^{2,3}, 魏宇楠^{2,3}, 戴平¹,
马朝富^{2,3}, 张瀚^{2,3}, 王静^{2,3}, 李楠^{2,3}, 戴幸星^{2,3}, 姚璐⁴,
徐蓓蕾⁵, 徐伟^{1*}, 吴志生^{1,2,3*}

(1. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 3. 中药制药与新药
开发教育部工程研究中心, 北京 102488; 4. 北京同仁堂科技发展股份有限公司, 北京 100079; 5. 哈尔滨商业大
学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要: 本研究主要针对中药制造口服制剂滋味关键质量属性不明确导致口感不良的科学问题, 以小儿清热宁颗粒为范例, 成功建立了滋味关键质量属性辨识方法、电子舌与人感官结合的口感改进方法, 确定最优口感配方, 以提升患者口服用药依从性, 研究获得了北京中医药大学医学伦理委员会的伦理批准。结果显示, 小儿清热宁颗粒苦味分值占比为61.8%, 其苦味级别为3.70, 确定苦味是导致小儿清热宁颗粒口感不良的滋味关键质量属性; 另外, 以最大允许摄入量、溶解度、甜度等为限定条件确定每毫升小儿清热宁无糖中间体的最优口感配方为羟丙基- β -环糊精 40 mg、海藻糖 180 mg 和安赛蜜 1.5 mg, 该配方的感官评价得分相比于小儿清热宁颗粒提升了 37.5 分。综上所述, 本研究实现了小儿清热宁颗粒的口感改善, 形成了一套包括滋味关键质量属性辨识、矫味剂种类和添加量筛选及配方优化的口感改善策略, 为其他口服制剂不良口感改进研究提供思路参考, 为中药智能制造质量控制提供新视角。

关键词: 口服制剂; 电子舌; 人感官; 苦味; 关键质量属性

中图分类号: R283 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)10-2875-07

Identification of taste critical quality attribute and formulation optimization of Xiaer Qingrening Granules based on electronic tongue and human senses

HU Xiao-yan¹, LU Ying^{2,3}, WANG Xiao-meng^{2,3}, MA Li-juan^{2,3}, WEI Yu-nan^{2,3}, DAI Ping¹,
MA Chao-fu^{2,3}, ZHANG Han^{2,3}, WANG Jing^{2,3}, LI Nan^{2,3}, DAI Xing-xing^{2,3}, YAO Lu⁴, XU Bei-lei⁵,
XU Wei^{1*}, WU Zhi-sheng^{1,2,3*}

(1. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; 2. School of
Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China; 3. Engineering Research
Center of Chinese Medicine Production and New Drug Development, Beijing 102488, China; 4. Beijing Tongrentang
Technology Development Co., Ltd., Beijing 100079, China; 5. School of Pharmacy, Harbin University of Commerce,
Harbin 150076, China)

Abstract: This study primarily concentrated on scientific problems of poor taste caused by unclear critical

收稿日期: 2022-12-05; 修回日期: 2023-02-08.

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFC3501902); 国家自然科学基金优秀青年科学基金项目 (82022073); 国家自然科学基金项目 (82274110);
中央高校基本科研业务费北京中医药大学揭榜挂帅项目 (2022-JYB-JBZR-018, 2022-JYB-JBZR-019).

*通讯作者 Tel: 86-591-22861135, E-mail: xwftcm@sina.com;

Tel: 86-10-53912101, E-mail: wzs@bucm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1329

quality attributes of oral preparations manufactured by Chinese materia medica, successfully established an identification method for taste critical quality attribute and a taste improvement method combining electronic tongue with human senses, and determined the optimal taste formula, to improve patients' oral medication compliance. The study received ethical approval from the Review Committee of the Beijing University of Chinese Medicine. The results showed that the proportion of bitterness of Xiaoer Qingrening Granule was 61.8%, and its bitterness grade was 3.70, it was determined that bitterness is the critical quality attribute that caused the poor taste of Xiaoer Qingrening Granule. Additionally, the optimal taste formula per milliliter of Xiaoer Qingrening sugar-free intermediate was determined with allowable daily intake, solubility, and sweetness as the limiting conditions, which was 40 mg hydroxypropyl β -cyclodextrin, 180 mg trehalose, and 1.5 mg acesulfame potassium. Compared with the Xiaoer Qingrening Granule, the sensory evaluation score of the optimal taste formula was increased by 37.5 points. In conclusion, this study achieved the taste improvement of Xiaoer Qingrening Granule and formed a set of taste improvement strategies including the identification of taste critical quality attribute, the selection of the type and dosage of corrigent, and the optimization of taste formula, which provided a thought reference for the taste improvement of other oral preparations and a new perspective for quality control of intelligent manufacturing of traditional Chinese medicines.

Key words: oral preparation; electronic tongue; human sense; bitterness; critical quality attribute

药物口感是药物本身对人体味觉的直接感官刺激,是影响中药口服制剂开发及制造过程质量控制的关键要素之一^[1]。滋味关键质量属性 (critical quality attribute, CQA) 是中药口服制剂的滋味特征属性,是影响药物口感的关键因素^[2]。苦味是众多不良口感中存在最广泛、最令人难以接受的滋味之一^[3],苦味的感知阈值仅为0.001 6%。中药口服制剂苦味成分复杂且不清晰,其苦度是影响药物口感的核心要素^[4]。以药物苦味为代表的不良口感问题严重限制了中药口服制剂市场占有率及临床效果,甚至导致因吞咽困难、味觉特殊的儿童或老年患者人群用药依从性和安全性不佳的问题^[5]。因此,以客观、准确、简便、高效的滋味CQA辨识与配方优化研究是提升患者服用中药口服制剂依从性和安全性的关键切入点。

目前,电子舌是一种利用化学传感器阵列的特征响应信号模拟人体味觉感知过程的检测技术,因其检测速度快、灵敏度高、不受样品毒性和数量限制等优点^[6],广泛应用于中药味觉特征诊断等领域^[7],该方法适合大量筛选样品。人感官评价法是通过招募人体志愿者对味道进行鼻闻或口尝评价的方法,最能反映口服制剂真实口感^[8],该方法需保证样品的安全性,测试的样品间保证充足的时间间隔。团队前期开发了多种味觉受体功能化生物传感器^[9,10],建立了基于电子舌与人感官联用技术的小儿感冒口服液口感配方优化方法,以此保障本研究的中药口服制剂滋味CQA辨识及配方优化研究的可行性。

本研究以中药口服制剂小儿清热宁颗粒为示范性研究载体,以电子舌与人感官评价为技术支撑,从滋味CQA辨识、矫味剂种类和添加量筛选、配方优选等方

面对小儿清热宁的口感改善研究,建立并完善一套适合小儿清热宁的最优口感配方及口感改善策略,以此实现小儿清热宁颗粒口感提升,为中药制造口服制剂的口感改善及滋味CQA控制研究提供思路参考和方法借鉴。

材料与方法

仪器 ASTREE II电子舌,配有48位自动进样器[7根离子敏感场效应晶体管 (ISFET) 传感器分别是:SCS (苦味敏感传感器)、ANS (甜味敏感传感器)、CTS (咸味敏感传感器)、NMS (鲜味敏感传感器)、AHS (酸味敏感传感器)、PKS (通用传感器) 和 CPS (通用传感器)] (法国 Alpha MOS 公司);磁力搅拌器 (德国 Wiggins 公司);TG16MW 台式高速离心机 (湖南赫西仪器有限公司);601 超级恒温水浴锅 (金坛市文华仪器有限公司);KQ-500DE 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司);SQR 电子分析天平 (北京赛多利斯科学仪器有限公司)。

试剂 盐酸小檗碱 (批号: B802464, CAS 号: 633-65-8, 质量分数 $\geq 99.0\%$)、羟丙基- β -环糊精 (hydroxypropyl beta-cyclodextrin, HP- β -CD; 批号: C11727146, CAS 号: 128446-35-5, 质量分数 $\geq 97.0\%$) 购于上海麦克林生化科技有限公司;赤藓糖醇 (批号: 117825000, CAS 号: 149-32-6, 质量分数 $\geq 99.0\%$)、乳糖醇 (批号: 111109, CAS 号: 585-86-4, 质量分数 $\geq 98.0\%$)、山梨糖醇 (批号: dt472, CAS 号: 50-70-4, 质量分数 $\geq 98.0\%$)、安赛蜜 (批号: 49357c, CAS 号: 33665-90-6, 质量分数 $\geq 98.0\%$)、甜菊糖苷 (批号: 67093e, CAS 号: 57817-89-7, 质量分数 $\geq 97.0\%$)、海藻糖 (批号: 92361d, CAS 号:

99-20-7, 质量分数 $\geq 99.0\%$) 来源于北京伊诺凯科技有限公司; 小儿清热宁无糖中间体溶液及对应批次的小儿清热宁颗粒 (批号: 1911302) 由北京同仁堂股份有限公司提供; 屈臣氏超纯水 (规格: 500 mL/瓶) 购于广州屈臣氏食品饮料有限公司。

待测溶液制备方法

供试品溶液制备 精密量取 100 mL 小儿清热宁无糖中间体溶液于 250 mL 烧杯中, 加入适量矫味剂, 采用磁力搅拌器以 $750 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 搅拌 15 min 使矫味剂完全溶解。将溶液采用高速离心机 $10\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取其上清液; 小儿清热宁无糖中间体溶液和颗粒溶解后的溶液统一按上述离心条件取上清液作为供试品溶液, 室温放置, 备用。

苦味参比溶液制备 盐酸小檗碱是最具代表性的苦味成分, 该物质配制的溶液苦味程度随浓度的增加而增加, 因此本研究采用盐酸小檗碱作为苦味参比物质^[3]。精密称取盐酸小檗碱标准品 50 mg 置于 100 mL 量瓶中, 加 50 mL 水, 超声 5 min 使其完全溶解, 继续加水至刻度, 即得 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的盐酸小檗碱标准品溶液, 标记为 5 号苦味参比溶液; 另分别取 5 号溶液 2、10、20 mL 置于 100 mL 量瓶中, 加水至刻度, 即得 0.01 、 0.05 、 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的盐酸小檗碱标准品溶液, 分别标记为 2、3、4 号苦味参比溶液; 以纯水作为阴性对照, 没有苦味, 标记为 1 号阴性参比溶液。

电子舌检测方法 电子舌以银/氯化银作为参比电极, 采用 $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠和 $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 谷氨酸钠溶液对电子舌的 7 根离子敏感场效应晶体管传感器进行诊断, 利用 $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液对传感器进行预平衡并校准, 预平衡一次大约 1 h, 最多重复 3 次, 校准大约 40 min, 传感器经过平衡和校准后再用于待测样品测试。电子舌检测采用旋转方式检测待测品溶液, 使传感器响应发生显著性变化。每个样品取 25 mL 于专用烧杯中, 并将烧杯置于自动进样器样品盘内, 测定时间规定为 120 s, 取响应时间为 101~120 s 间的传感器响应信号值进行数据处理, 每个样品重复检测 8 次。为避免样品间交叉污染, 两样品间设置一杯超纯水清洗传感器, 清洗时间为 10 s。

取“待测溶液制备方法”项制备的小儿清热宁无糖中间体上清液 25 mL, 连续测定 8 次, 记录各传感器响应值并计算相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD), 以此判断该方法的重现性; 另取 6 份按“待测溶液制备方法”项平行制备的小儿清热宁无糖中间体上清液 25 mL, 分别检测, 记录各传感响应值并计算 RSD, 以此判断该方法的重复性。

中药复方滋味量化方法 根据 2020 版《中华人民

共和国药典》对中药性味的记载, 统计小儿清热宁颗粒中所有中药的滋味特征描述。小儿清热宁颗粒主要由羚羊角粉、牛黄、金银花、黄芩、柴胡、板蓝根、水牛角浓缩粉、冰片 8 种中药组成, 依次按照 1~8 进行编号。首先根据滋味排序对中药的味进行赋值, 如直接描述“苦”味的赋值 1, 描述“微苦”的赋值 0.5, 描述为“极苦”、“苦甚”则赋值为 1.5。药物剂量与小儿清热宁颗粒中所有药物剂量的比值即为该中药在复方中的剂量权重。具体某一味分值计算方式: 苦味的最终得分乘以该药物对应的剂量权重为该药物在复方中苦味的贡献值, 将全方所有苦味得分相加, 即得全方苦味的分值。

“待测溶液制备方法”项中 1~5 号参比溶液的苦度级别依次对应“不苦”、“微苦”、“中等苦度”、“很苦 (但仍可接受)”、“极苦 (几乎不能接受)”共 5 个苦度等级, 依次对应的苦度值的范围为 $0.5\sim 1.5$ 、 $1.5\sim 2.5$ 、 $2.5\sim 3.5$ 、 $3.5\sim 4.5$ 、 $4.5\sim 5.5$ 。将 5 种参比溶液与待测样品同时采用“电子舌检测方法”项的电子舌检测方法进行测定, 采用主成分分析 (principal component analysis, PCA) 方法处理电子舌传感器响应数据, 并建立电子舌响应信号值与苦度等级的标准曲线, 以此计算出待测样品的苦度。

矫味剂种类优化方法 以小儿清热宁无糖中间体溶液为研究载体, 选择溶解度好的糖醇类赤藓糖醇、乳糖醇、山梨糖醇、人工合成安赛蜜、天然非糖类甜菊糖苷、天然海藻糖对小儿清热宁无糖中间体的口感进行改善。以矫味剂甜度适中为依据将上述矫味剂的添加量设置为每毫升无糖中间体溶液添加赤藓糖醇 100 mg、乳糖醇 100 mg、山梨糖醇 100 mg、安赛蜜 3 mg、甜菊糖苷 5 mg、海藻糖 100 mg。进一步采用“电子舌检测方法”项的电子舌检测方法对无糖中间体及 6 种添加不同矫味剂的样品进行检测, 采用 PCA 方法处理电子舌传感器响应数据, 计算添加不同种类矫味剂的样品到无糖中间体之间的标准化欧式距离 (standardized Euclidean distance, SED), 并通过 SED 确定矫味剂添加种类。

矫味剂添加量优化方法 根据美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 对矫味剂每日允许摄入量 (allowable daily intake, ADI) 的规定, 以及 2022 年国家卫健委制订的《中国 7 岁以下儿童生长发育参照标准》, 结合样品日服用量, 计算样品基于 ADI 的最大添加量; 以基于 ADI 的最大添加量为最大值, 根据溶解情况依次降低添加量, 考察其在样品中间体的溶解情况, 以可完全溶解于样品的添加量为该样品基于溶解度的最大添加量; 以基于溶解度的最大添加量为最大值, 根据甜度依次降低添加量, 以样品甜度

适中的添加量为该样品基于甜度的最大添加量;以多种矫味剂基于甜度的最大添加量总量为最大值,根据甜度依次降低添加量(其中矫味剂的比例保持不变),以样品复配甜度适中的添加量确定为该样品的最大添加量。

人感官评价方法 采用问卷调查形式对待测样品进行人感官评价,经北京中医药大学医学伦理委员会审查通过(伦理号2020BZYLL0609)。志愿者招募纳排标准如下:年龄19~55岁,性别比例接近1:1,味觉和嗅觉灵敏,对感觉表述清晰;近期无感冒、发烧、口腔发炎等症状;无严重过敏、味觉衰退、相关遗传病史等情况;自愿退出者、拒不配合采用实验提供的口感评价表进行评价者予以排除。共招募9名志愿者,在实验前签订知情同意书,志愿者进行操作培训,具体操作参考国家标准感官分析的选拔、培训与管理评价员一般导则(GB/T16291.1-2012)。

感官评价方法:取待测样品5 mL于一次性口尝纸杯中,志愿者含于口中计时15 s,此间口腔做漱口动作,吐出,纯水漱口5次,每轮样品间隔1 h。志愿者采用随机、单盲的方法对样品进行感官测试,按相应标准在表格中进行评分,评价内容是通过样品特点及志愿者评价反馈确定的评价因素苦度、异味和综合口感。

模糊数学综合评价方法 采用模糊数学综合评价方法(fuzzy synthetic evaluation method, FSEM)计算样品的感官综合得分,确定评价的因素集 $U = \{\text{苦度}U_1, \text{异味}U_2, \text{综合口感}U_3\}$;确定本研究对各因素按优(100分)、良(75分)、中(50分)、差(25分)等级评价,即评语集 $V = \{\text{优}V_1, \text{良}V_2, \text{中}V_3, \text{差}V_4\}$ 。从 U 到 V 的映射为模糊矩阵 R 。采用强制决定法^[1],确定各因素的权重(W)。进一步将样品的感官评价结果除以评价总人数折算成比率,集中所有因素的评价结果及权重则得到各样品的模糊矩阵,模糊矩阵乘以评语等级对应分值,即为样品的感官综合得分,样品模糊矩阵为 R_1 ,即:

$$R_1 = \begin{bmatrix} 0.2 & 0.5 & 0.3 & 0 \\ 0.5 & 0.1 & 0.2 & 0.2 \\ 0.4 & 0.5 & 0.1 & 0 \end{bmatrix}$$

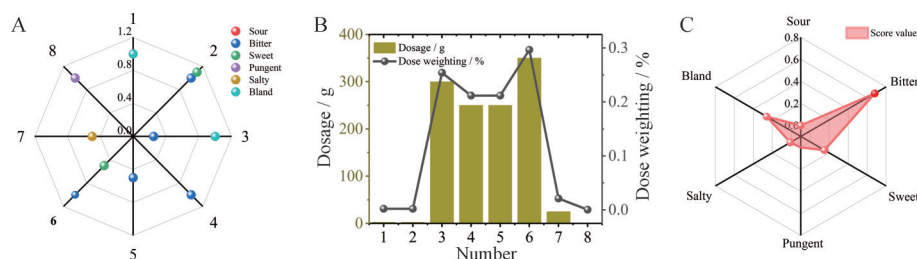


Figure 1 Taste assignment and dose weighting of Xiaoe Qingrening Granule. A: Flavor assignment radar map of Xiaoe Qingrening Granules; B: Drug dose and weight distribution map; C: Taste score radar map

结果

1 电子舌检测方法的重现性和重复性

通过计算电子舌检测方法对小儿清热宁无糖中间体溶液的测量结果,发现同一样品重复检测8次后电子舌的苦味敏感传感器、甜味敏感传感器、咸味敏感传感器、鲜味敏感传感器、酸味敏感传感器、两根通用传感器的信号响应RSD值分别为0.32%、0.26%、0.44%、0.50%、2.21%、0.09%和0.31%,RSD值均小于3%,说明该检测方法的重现性良好。

采用相同的方法检测6份平行样品,结果显示苦味敏感传感器、甜味敏感传感器、咸味敏感传感器、鲜味敏感传感器、酸味敏感传感器、两根通用传感器的信号响应RSD值分别为3.07%、2.43%、2.79%、4.64%、5.64%、0.36%和2.67%,RSD均小于6%,甜味敏感传感器、咸味敏感传感器、两根通用传感器的RSD小于3%,说明该检测方法的整体重复性良好,方法稳定可靠,为后续研究提供科学的方法保障。

2 小儿清热宁的滋味关键质量属性辨识

2.1 基于滋味赋值的滋味关键质量属性辨识 以2020版《中华人民共和国药典》对各中药的滋味描述为依据,描述为羚羊角粉滋味淡;牛黄味苦、甘;金银花味淡,微苦;黄芩味苦;柴胡味微苦;板蓝根味微甜而后苦涩;水牛角浓缩粉味微咸;冰片味辛。

通过“中药复方滋味量化方法”项的方法得到小儿清热宁中8味中药的滋味赋值,如雷达图1A所示,药物剂量及权重分布见图1B。最终通过滋味赋值和药物剂量权重计算得小儿清热宁淡味得分为0.26,甘味得分为0.15,苦味得分为0.68,辛味得分为0.000 40,咸味得分为0.010。其中,苦味分值占比为61.8%,且远远高于其他滋味(图1C),因此基于文献研究提出的滋味赋值法对小儿清热宁的苦味进行了初步定量,发现苦味是影响小儿清热宁口感不良的核心因素。

2.2 基于参比物质的滋味关键质量属性辨识 采用PCA方法对5种参比溶液及小儿清热宁颗粒配制的溶液的电子舌传感器响应数据进行处理后发现第一主成分(PC1)和第二主成分(PC2)的累计贡献率为97.7%

(图2A), 说明PC1和PC2能代表该数据的整体信息, 图2A中“1~5”代表5种参比溶液, “XEQRN”代表小儿清热宁颗粒配制的溶液。结果显示, 从低浓度到高浓度的盐酸小檗碱溶液在PC1方向上依次从右到左进行分布, 说明PC1能代表样品苦味的特征信息。因此, 以5种参比溶液电子舌传感器响应信号的PC1贡献率与其对应苦味等级进行曲线拟合, 结果如图2B所示, 发现PC1贡献率和苦味等级呈线性相关关系, 线性拟合方程为 $y = 2.90 - 0.66x$, 相关系数(R^2)为0.9976, 表明其相关性良好。计算出小儿清热宁颗粒的苦度为3.70, 进一步基于参比物质标准曲线法验证了苦味是影响小儿清热宁口感不良的滋味CQA, 儿童对苦度大于3的样品极其敏感, 表明小儿清热宁颗粒的口感亟待改善。

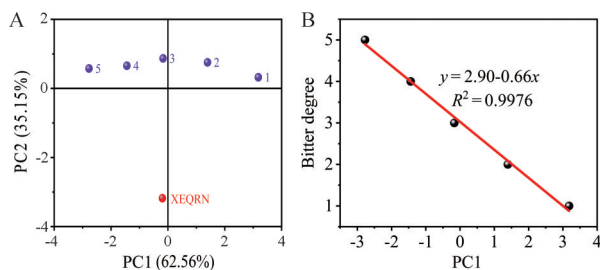


Figure 2 Principal component analysis of the response value of electronic tongue sensor. A: Principal component analysis diagram of electron tongue sensor response value; B: Standard curve fitting diagram of berberine hydrochloride. PC: Principal constituent; XEQRN: Xiaoer Qingning

3 基于电子舌与人感官的小儿清热宁颗粒配方优化

3.1 矫味剂种类优化 小儿清热宁无糖中间体及添加赤藓糖醇(erythritol)、乳糖醇(lactitol)、山梨糖醇(sorbitol)、安赛蜜(acesulfame potassium)、甜菊糖苷(stevioside)、海藻糖(trehalose)矫味剂样品的电子舌传感器响应值的PCA分析结果表明(图3), PC1和PC2的累计贡献率为97%, 添加上述6种矫味剂样品到无糖中间体之间的SED值依次为3.50、3.60、4.07、4.48、4.80、4.38。由于甜菊糖苷的ADI较小, 计算其添加量小易引起称量误差, 因此选择SED相近的海藻糖。最终选择SED值偏大的天然甜味剂海藻糖、人工合成甜味剂安赛蜜为小儿清热宁无糖中间体的适宜矫味剂。

结合“基于参比物质的滋味关键质量属性辨识”项的苦味定量评价结果, 小儿清热宁颗粒的苦味级别大于3, 适宜阻止接触型口感改善, 选择水溶性最好的HP- β -CD对中间体进行包合处理。因此, 确定最终添加矫味剂种类为安赛蜜、海藻糖、HP- β -CD。矫味剂添加方式为先加入包合剂HP- β -CD, 再加入甜味剂安赛蜜和海藻糖。综上所述, 此部分研究实现了矫味剂的

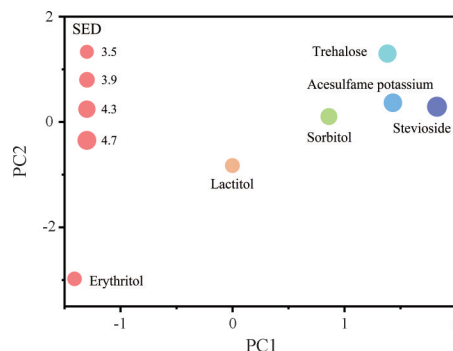


Figure 3 Standardized Euclidean distance between samples and intermediates of different types of corrigent

个性化筛选, 优选出了溶解度好、甜度适中且无异味的安赛蜜、海藻糖、HP- β -CD矫味剂, 为后续小儿清热宁口感改善研究奠定基础。

3.2 矫味剂添加量优化 小儿清热宁无糖中间体每11.5 L对应不低于2.2325 kg颗粒成品(即每克中间体约对应5 mL)。1岁儿童每日服用小儿清热宁颗粒的剂量为8 g, 即对应中间体约40 mL。根据美国FDA规定: 安赛蜜的ADI为 $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。结合小儿清热宁颗粒日服用量及国家卫健委制订的《中国7岁以下儿童生长发育参照标准》-1岁儿童体质量约为10.0 kg, 确定了每毫升小儿清热宁无糖中间体中安赛蜜最大允许添加量为3.8 mg; 海藻糖因其安全性较高, 其添加量可参考美国FDA批准列入一般公认安全清单的赤藓糖醇, 确定了海藻糖的最大允许添加量为300 mg; HP- β -CD没有ADI相关规定, 参考文献^[12]确定其最大添加量为50 mg。

HP- β -CD、海藻糖和安赛蜜3种矫味剂最大添加量80%、60%、40%的样品溶解性考察结果显示, 每毫升小儿清热宁无糖中间体溶液中添加HP- β -CD 50 mg、海藻糖 300 mg、安赛蜜 3.8 mg可完全溶解。加入HP- β -CD后再加入海藻糖和安赛蜜同样可完全溶解, 因此, 基于溶解度的HP- β -CD、赤藓糖醇和安赛蜜最大添加量分别为50、300和3.8 mg。

为避免添加矫味剂后样品出现过甜现象, 海藻糖、安赛蜜两种矫味剂最大添加量分别为100%、80%、60%样品的人感官评价结果如表1所示。结果表明, 每毫升小儿清热宁无糖中间体溶液中海藻糖添加量为300 mg、安赛蜜添加量为3.8 mg时甜度适中。因此, 基于甜度的海藻糖、安赛蜜最大添加量分别为300、3.8 mg。

另外, 避免甜度叠加导致样品过甜现象, HP- β -CD、海藻糖、安赛蜜3种矫味剂最大添加量总量为100%、80%、60%、40%样品的人感官评价的结果如表1所示。

Table 1 Overall taste of single and compound corrigent with different dosage. HP-β-CD: Hydroxypropyl beta-cyclodextrin

Type of corrigent	Dosage/mg	Overall taste
Trehalose	300	Haut
Trehalose	240	Bitter
Trehalose	180	Bitter
Acesulfame potassium	3.8	Haut
Acesulfame potassium	3	Bitter
Acesulfame potassium	2.3	Bitter
HP-β-CD; trehalose; acesulfame potassium	353	Extremely sweet
HP-β-CD; trehalose; acesulfame potassium	283	Haut
HP-β-CD; trehalose; acesulfame potassium	212.3	Bitter
HP-β-CD; trehalose; acesulfame potassium	141.5	Bitter

结果显示 HP-β-CD、赤藓糖醇和安赛蜜的总添加量为 283 mg 时甜度适中。因此, 基于复配甜度的矫味剂最大总添加量为 283 mg, 其中, HP-β-CD、海藻糖、安赛蜜添加量比例为 40:240:3。

综上所述, 本研究通过 ADI、溶解度、甜度及复配甜度 4 个方面对矫味剂的添加量进行限定, 确定了矫味剂在每毫升小儿清热宁无糖中间体中的最大添加量, 即 HP-β-CD 添加量为 40 mg, 海藻糖添加量为 240 mg, 安赛蜜添加量为 3 mg。

4 基于电子舌与人感官的小儿清热宁口感改善

4.1 基于电子舌的小儿清热宁口感改善 为考察前期筛选出 HP-β-CD、海藻糖和安赛蜜 3 种矫味剂的交互作用, 基于 Box-Behnken 实验设计, 采用 Design-Expert 8.0 软件设计 3 因素 3 水平共 17 次试验, 其中因素与水平分别为每毫升小儿清热宁无糖中间体的 HP-β-CD 添加量 (20、30、40 mg)、海藻糖添加量 (120、180、240 mg)、安赛蜜添加量 (1.5、2.25、3 mg)。

小儿清热宁无糖中间体及 Box-Behnken 实验设计得到的 17 个样品电子舌传感器响应值见图 4A, 其 PCA 分析结果如图 4B 所示。结果显示 PC1 和 PC2 的累计贡献率为 98.6%, 因此说明 PC1 和 PC2 两个主成分可代表 18 个样品的整体滋味特征。进一步计算 17 个口感改善样品到小儿清热宁无糖中间体 (blank) 的 SED, 如图 4C 所示。结果显示 13、14、15 号样品与无糖中间体差异最大。因此, 最终选择 13、14、15 号样品进行人感官评价。

4.2 基于人感官的小儿清热宁口感改善 通过“基于电子舌的小儿清热宁口感改善”项筛选出的 13、14、15 号样品及小儿清热宁颗粒 (product) 感官评价结果显示 (图 4D), 其中, 评价因素分别为苦度 (A)、异味 (B)、综合口感 (C), 等级以“1~4”表示优良中差。根据 FSEM 的计算方法, 计算得 13、14、15 号样品综合得分

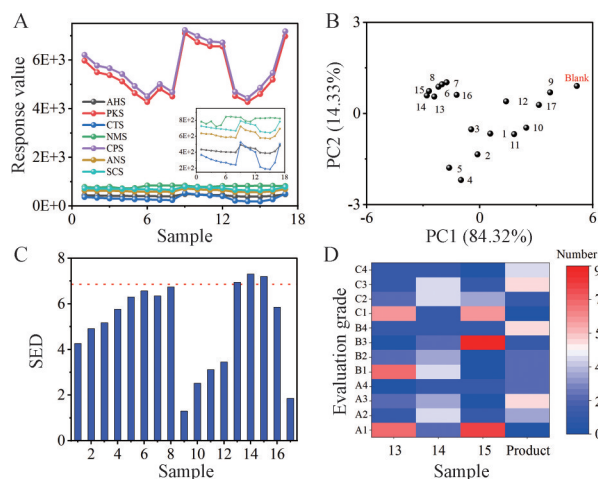


Figure 4 Optimal selection of flavor correction formula for Xiaoer Qingrenging Granule. A: Characterization diagram of electron tongue sensor response value; B: Principal component score graph; C: Standardized Euclidean distance (SED) from the sample to the Sugar-free intermediate; D: Correlation analysis of sensory evaluation. AHS: Sour; CTS: Salty; SCS: Bitter; NMS: Umami; ANS: Sweet; PKS and CPS: Compound flavor

结果见表 2, 发现 3 个优选样品评分均高于小儿清热宁颗粒, 且 13 号样品评分最高, 高达 85 分。因此, 确定了每毫升小儿清热宁无糖中间体溶液的最优口感配方, 即 HP-β-CD 为 40 mg、海藻糖为 180 mg、安赛蜜为 1.5 mg。相比于小儿清热宁颗粒, 最优口感配方感官评价得分提升了 37.5 分。

Table 2 Human real sensory evaluation score results

Sample	HP-β-CD/ mg	Trehalose/mg	Acesulfame potassium/ mg	Score
13	40	180	1.5	85
14	20	180	1.5	66.5
15	40	120	2.25	80.25
Product	0	0	0	47.5

讨论

本研究重点关注了不良口感中的以苦味为代表的滋味 CQA, 通过滋味赋值法计算的中药复方的苦味分值占比仅考虑中药口服制剂所有中药组成单一味分值的总和, 因此又提出了基于参比物质的苦味定量评价方法, 以弥补因复方中药物间相互作用导致苦度计算时出现误差的不足。由于儿童志愿者招募的困难性, 采用电子舌技术和成人志愿者对儿童口服制剂进行口感评价。电子舌感官评价方法不能完全代表真实滋味, 但适合大量筛选样品; 人感官评价方法易疲劳、主观性强, 但最能代表样品真实滋味, 因此两种方法联合应用可弥补单一方法的不足。另外, 口尝感官培训及矫味添加量的筛选等过程均考虑到儿童用药特点进行

适量扩大范围, 以尽力弥补成人志愿者评价儿童药物口感的不足。

本研究针对中药口服制剂滋味 CQA 不明确导致口感不良的问题, 以小儿清热宁颗粒为范例, 建立了基于滋味赋值和参比物质的滋味 CQA 辨识方法, 发现小儿清热宁颗粒的苦味分值占比为 61.8%, 苦味等级为 3.70, 表明苦味是导致小儿清热宁颗粒口感不良的滋味 CQA; 其次, 以 ADI、溶解度、甜度及复配甜度为限定条件确定矫味剂种类为 HP- β -CD、海藻糖、安赛蜜, 每毫升小儿清热宁无糖中间体溶液中的最大添加量分别为 40、240、3 mg; 基于电子舌和人感官评价技术确定了每毫升小儿清热宁无糖中间体溶液的矫味剂最优添加量, 即 HP- β -CD 为 40 mg、海藻糖为 180 mg、安赛蜜为 1.5 mg, 且该配方感官评价得分相比于小儿清热宁颗粒提升了 37.5 分; 最终形成了一套包括滋味 CQA 辨识、矫味剂种类和添加量筛选及配方优化的小儿清热宁口感改善策略, 为其他中药口服制剂不良口感改善提供思路参考, 为中药智能制造质量控制提供新视角。

作者贡献: 胡小艳、陆影负责实验研究、分析数据和文章撰写; 王晓萌、魏宇楠、戴平、马朝富、张瀚、王静负责实验研究; 马丽娟、戴幸星、姚璐和徐蓓蕾博士负责思路指导; 吴志生研究员、徐伟教授、李楠副研究员负责思路指导和对文章的知识性内容进行审阅并提供研究经费。

利益冲突: 所有作者均声明没有利益冲突。

References

- [1] Wu ZS, Qiao YJ. Manufacturing Surveying of Chinese Materia Medica (中药制造测量学) [M]. Beijing: Science Press, 2021: 1-10.
- [2] Lu Y, Zeng JQ, Ma JC, et al. Critical quality attribute characterization of big brand TCM: taste formulation strategy and application of Xiaoe Ganmao Oral Liquid based on taste quality attribute [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2022, 46: 1606-1615.
- [3] Wang QX, Gao XJ, Gui XJ, et al. Study on quantitative method of equivalent molecular bitterness of traditional Chinese medicines based on bitterness threshold concentration [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2022, 53: 6698-6705.
- [4] Gao XJ, Bai MX, Gui XJ, et al. Study on quantitative method of drug's molecular bitterness based on bitterness threshold concentration [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2022, 53: 696-703.
- [5] Chen X, Lu A, Wang XY, et al. Analysis of technical difficulties and new strategies of oral liquid pharmaceutical preparation for children [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2021, 56: 130-137.
- [6] Miao XS, Cui QY, Wu HH, et al. New sensor technologies in quality evaluation of Chinese materia medica: 2010-2015 [J]. Acta Pharm Sin B, 2017, 7: 137-145.
- [7] Ni ST, Yang TG, Gao XH, et al. Research on classification of different head numbers of *Panax notoginseng* based on ASTREE II electronic tongue [J]. Beijing J Tradit Chin Med (北京中医药), 2022, 41: 1164-1167.
- [8] He CX, Du YK, Yang X, et al. Taste-masking effect of montelukast sodium orally disintegrating tablets using electronic tongue analysis and human sensory evaluation method [J]. Chin Pharm J (中国药理学杂志), 2020, 55: 1354-1357.
- [9] Ma LJ, Zheng YF, Wang J, et al. Development of MIF/IL-1 β biosensors for discovery of critical quality attributes and potential allergic rhinitis targets from clinical real-world data by intelligent algorithm coupled with *in vitro* and *vivo* mechanism validation [J]. Biosens Bioelectron, 2021, 194: 113608.
- [10] Hu XY, Zeng JQ, Ma LJ, et al. End-to-end dataflow engineering framework of honey manufacturing from intermediates to process by TAS1R2@AuNPs/SPCE biosensor coupled with quality transfer principle [J]. Fundament Res, 2022. DOI: doi.org/10.1016/j.fmre.2022.09.029.
- [11] Zhao JX, Zhang HM, Jiang LJ, et al. Comprehensive evaluation based on the fuzzy mathematics comprehensive evaluation method combined with electronic nose and electronic tongue to optimize the new process of radish pickles [J]. Genom Appl Biol (基因组学与应用生物学), 2019, 38: 4142-4153.
- [12] Li XL, Kang H, Tian LY, et al. Evaluation of different types of bitterness masking on inhibition of bitterness efficiency and law of four Chinese materia medicine decoctions of *Gentianae Radix et Rhizoma*, *Sophorae Flavescentis Radix*, *Andrographis Herba*, and *Nelumbinis Plumula* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2018, 49: 5280-5291.