

### 3 种口尝评价方法用于药物苦度评价的比较

刘瑞新<sup>1</sup>, 张杏芬<sup>2</sup>, 李学林<sup>1\*</sup>, 施钧瀚<sup>1</sup>, 李慧玲<sup>2</sup>, 仇继奎<sup>2</sup>

(1. 河南中医学院第一附属医院药学部, 郑州 450000; 2. 河南中医学院, 郑州 450008)

**[摘要]** 目的: 对比 3 种口尝评价方法用于药物苦度评价研究的特点。方法: 以苦参碱为模型药物, 配制不同浓度的水溶液, 由 20 名经筛选、培训合格的评价员口尝测试其苦度等级及具体苦度值, 对样品进行排序法、评分法、排序结合评分法 3 种方法的评价, 经过对所得数据的处理, 用排序正确率、判断灵敏度、赋值精密度、拟合度 4 个指标综合分析。结果: 排序结合评分法的排序正确率为 100%, 判断灵敏度为 96.4%, 拟合方程复相关系数为 0.991 6, 3 个指标均优于其他 2 种方法; 评分法在赋值精密度方面较其他 2 种方法更优。结论: 3 种口尝方法就上述 4 个指标来看排序结合评分法最优, 但各有自己的特点, 具体的口尝方法可根据自己实验目的、样品数目等选择。

**[关键词]** 苦度评价; 口尝法; 排序法; 评分法; 排序结合评分法

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)20-0118-05

**[doi]** 10.11653/syfy2013200118

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130808.1522.004.html>

**[网络出版时间]** 2013-08-08 15:22

### Drug Evaluation of Bitterness Intensity by Three Kinds of THTPM

LIU Rui-xin<sup>1</sup>, ZHANG Xing-fen<sup>2</sup>, LI Xue-lin<sup>1\*</sup>, SHI Jun-han<sup>1</sup>, LI Hui-ling<sup>2</sup>, QIU Ji-xi<sup>2</sup>

(1. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Zhengzhou 450000, China; 2. Henan University of TCM, Zhengzhou 450008, China)

**[Abstract]** **Objective:** Compare characteristics of three kinds of THTPM (traditional human taste panel method) which is suitable for drugs bitter evaluation study. **Method:** As matrine a model drug, made into

**[收稿日期]** 20130307(009)

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金项目(81001646)

**[第一作者]** 刘瑞新, 博士, 副主任药师, 从事中药制剂及分析研究, Tel: 0371-66233639, E-mail: liuruixin7@yahoo.com.cn

**[通讯作者]** \* 李学林, 博士生导师, 主任药师, 从事中药应用形式研究, Tel: 0371-56245142, E-mail: xuelinli450000@163.com

#### [参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 145.

[2] 朱晓红, 王强, 杨丽霞, 等. 尾叶香茶菜的高效液相指纹图谱研究[J]. 解放军药学学报, 2008, 24(4): 326.

[3] 王春胜, 焦文革. 中药配方颗粒的临床应用及存在的问题[J]. 现代药物与临床, 2010, 25(3): 186.

[4] 凌俊红. 麦芽的化学成分及炮制学研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2005.

[5] 国祥, 于秀明, 毕开顺. 刺五加 HPLC 数字化指纹图谱研究[J]. 中成药, 2007, 29(9): 1249.

[6] 凌俊红, 王金辉, 王楠, 等. 大麦芽的化学成分[J]. 沈阳药科大学学报, 2005, 22(4): 267.

[7] 王丹, 杜金华. 比色法快速测定小麦及其麦芽中的阿魏酸[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37, (1): 146.

[8] 刘伟, 范婷. 生长期施肥种类对柴胡 HPLC 指纹图谱影响分析[J]. 中国现代应用药学, 2009, 26(7): 553.

[9] 田润涛, 谢培山. 色谱指纹图谱相似度评价方法的规范化研究(一)[J]. 中药新药与临床药理, 2006, 17(1): 40.

[10] 安金兵, 许玉琼, 贺东奇, 等. 基于拟分布函数的中药色谱指纹图谱的相似性分析[J]. 北京大学学报: 自然科学版, 2008, 44(5): 695.

[责任编辑 邹晓翠]

different concentration of aqueous solution. The training of qualified evaluators screened by 20 taste bitterness level, then make specific bitterness value. Three methods of evaluation of the sample were order evaluation methods, score evaluation method and integrated score evaluation method. After the data processing, comprehensive analysis of the four indicators integrate which was rate of right rank, decision sensitivity, precision of evaluate and fitting of degree. **Result:** Integrated score evaluation method whose rate of right rank was 100%, decision sensitivity was 96.4%, multiple correlation coefficient of Fitting Degree was 0.991 6 which is superior to other two methods through the three indicators. Moreover the score evaluation method was better than the other two methods in precision of evaluate. **Conclusion:** Integrated score evaluation method in the three methods of the tasting evaluation is the best though these four numbers of the indicators. But different experiment methods have its characteristics. Concrete tasting evaluation method is selected on the basic of the purpose of the experiment, the number of the sample and so on.

[**Key words**] intensity of bitterness evaluation; traditional human taste panel method; order evaluation method; score evaluation method; integrated score evaluation method

准确、可靠、简便的药物苦度评价方法是进行苦味药物掩味研究的必要前提。目前,药物味觉信息的评价方法包括体内和体外两类,主要代表方法分别是经典人群口感评价方法(traditional human taste panel method, THTPM, 口尝法)和人工智能味觉系统即电子舌法<sup>[1-2]</sup>。口尝法虽有主观性强、操作繁琐费时、重复性不佳等不足,但只要评价员人数不过少,并有控制误差的措施,则能够得到较为准确的结果<sup>[1]</sup>,且因其是仪器测试中有关数学模型所依赖的参比数据的必要的来源途径,目前仍有一定适用范围。

口尝方法中常用的有差别检验方法、标度和类别检验方法、描述性分析方法、消费者接受性与偏爱测试方法<sup>[1]</sup>等方法。具体到苦度的口尝测评方法,主要涉及到两大类方法,一类是半定量的评价方法,另一类是定量评价方法。前者有等级评价方法(rank evaluation methods, REM 级法)、排序评价方法(order evaluation methods, OEM 排序法);后者有评分法(score evaluation method, SEM)、结合排序方法等半定量方法的评分法(integrated score evaluation method, ISEM)等。在进行口尝苦度评价时,通常首先对各样品按照预定的苦度等级进行等级评价,再进行后续的评价,如排序法(OEM)、评分法(SEM)、“排序+评分法”(ISEM)等。本文试以不同浓度的苦参碱为苦味模型药物,以排序正确率(rate of right rank, RRR)、判断灵敏度(decision sensitivity, DS)、赋值精密性(precision of evaluate, PE)、拟合度(fitting of degree, FD)为指标,对比上述3种方法在药物苦度评价上的特点,为苦味药物掩味研究提供参考。

## 1 材料

盐酸小檗碱单体(四川省玉鑫药业有限公司,批号 101002),苦参碱单体(西安嘉天生物科技有限公司,批号 KS20120318),水为纯化水。

BSA224S-CW 型电子天平(Sartorius), HK250 型科导台式超声波清洗器。

## 2 方法

**2.1 评价员筛选** 经河南中医学院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筛选,最终选择 20 名健康评价员(年龄为 22~28 岁,无严重过敏、遗传病史、无胆囊炎、无不良嗜好及近期无疾病史,其中男 9 名、女 11 名)作为受试者,在试验前签订知情同意书。

### 2.2 样品制备

**2.2.1 参比样品组的浓度选择及评价员培训** 参照文献方法<sup>[1,5-8]</sup>,将苦味分为 5 级,每个级别再赋予一定的苦度值范围。具体方法如下:1 级表示“没有苦味或几乎没有苦味”,苦度 I 的范围为[0.5, 1.5];2 级表示“略有苦味”,苦度 I 的范围为[1.5, 2.5];3 级为“有苦味但可接受”,苦度 I 的范围为[2.5, 3.5];4 级表示“很苦,但是仍然可以忍受”,苦度 I 的范围为[3.5, 4.5];5 级为“不能忍受的苦味”,苦度 I 的范围为[4.5, 5.5]。

选择中药代表性有效成分盐酸小檗碱作为苦味的阳性参比药物<sup>[2]</sup>,1,2,3,4,5 号参比溶液中盐酸小檗碱的质量浓度分别为 0,0.01,0.05,0.1,0.5 g·L<sup>-1</sup>,其对应的苦度 I 的等级分别为 I, II, III, IV, V,对应的 I 的具体取值为 1.0,2.0,3.0,4.0,5.0<sup>[3]</sup>。

**2.2.2 待测样品组制备** 精密称取 500.24 mg 苦

参碱,加水 200 mL 使溶解,然后定容至 2 000 mL 量瓶中,即为  $0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液。以此为母液分别移取 200,320,600 mL 于 1 000 mL 量瓶中,加水至刻度,即得  $0.05, 0.08, 0.15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的样品。同法制得  $0.3, 0.45, 0.6, 0.75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  苦参碱样品,共制得 8 种不同浓度的苦参碱溶液。

### 2.3 口尝评价

**2.3.1 试验安排** 参照最佳口感评价时间,排序法、排序结合评分法在同一天上午,中间间隔 1 h,具体样品品评次序有所不同;评分法安排在第 2 天上午,每个样品间间隔 20 min,其具体样品品评次序与排序结合评分法一致。

**2.3.2 评价员口感评价与参比样品组既定苦度值之间的“标化”** 为确保口尝数据的准确性,评价员要经过培训。20 名评价员分别对上述 5 个参比样品进行口尝,告知其苦度值,然后再口尝待测样品,与参比溶液比较,记录待测样品的苦度值。具体做法为分别取 30 mL 参比溶液于口尝杯中,由评价员含于口中,计时 15 s,此间口腔做漱口动作,以使舌根及舌侧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,至口腔内无苦味。

**2.3.3 OEM 具体口尝方法:**先对评价员进行参比样品的“标化”,然后提供给评价员 8 个样品。他们要按照从不苦到苦的顺序给样品进行排序,并记录于预先设计好的“药物苦味排序表”中。每个样品可重复评价,评价下一个样品时要漱口,并休息 2 ~ 3 min。每轮样品间休息 40 min。考虑到人类味觉的“饱和效应”,即避免在尝试极苦的药物之后无法辨别苦度较低的药物苦度值,对样品的测试顺序,原则上是按照低浓度向高浓度逐步进行,但为了减少评价员“意识惯性”,样品顺序稍有调动。

**2.3.4 SEM 具体口尝方法<sup>[8-9]</sup>:**同上操作,先对评价员进行参比样品的“标化”,受试者根据自己的口尝感受,结合之前的参比液中的等级,确定某样品所在的苦度级别,并给予具体的苦度值,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,20 min 后测定另一样品。

**2.3.5 ISEM 具体口尝方法**同排序法,区别在于要求评价员对每个样品在排序的基础上给出具体的苦度值。数据处理方法同评分法。

### 2.4 数据处理

**2.4.1 Spearman 检验** 为比较评价员对每轮样品苦度的区分与样品理论苦度之间的相关性,对评价

员的排序结果根据国标 GB/T12315-2008<sup>[5]</sup>式(1)计算每个评价员的 Spearman 系数,为消除个别评价员对整轮结果的影响,剔除 Spearman 系数不合格(小于其具体临界值)的评价员数据。评分法中,本次实验组织者按照每个评价员评分高低对各个样品进行排序,然后对排序结果进行 Spearman 系数检验。

**2.4.2 异常值的剔除** 由于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,测试数据中有个别异常值,但不能随意取舍,因此采用 Grubbs 检验法<sup>[4]</sup>对数据进行了异常值的循环检验和剔除。每一组每一轮仅剔除一个异常值。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,本次实验选择剔除水平为 0.05。且剔除后不再进行插值。

**2.5 对比指标** 对以上 3 种方法实验数据从排序正确率、判断灵敏度、赋值精密度、拟合度 4 个方面进行分析比较。为消除不合格评价员对整个方法的影响,统计时均删除不合格评价员数据。

**2.5.1 排序正确率(RRR)** 苦度顺序应与样品浓度成正比,排序正确率(RRR)公式可表示为  $RRR = n/M \times 100\%$ ,其中  $n$  表示样品排对顺序的个数, $M$  表示所有样品的个数,此式中  $M$  应为 8。

**2.5.2 判断灵敏度(DS)** 为区分各方法中样品显著性差异程度,可用判断灵敏度(DS)表示,其公式可表示为  $DS = (1 - n/M) \times 100\%$ ,其中  $n$  表示样品间没有显著性差异的个数, $M$  表示所有样品的成对数,此次试验中每轮均是 8 个样品,故  $M$  应为  $C_8^2$  即 28 次。排序法中显著性差异与否可通过与每轮试验最小显著差  $LSD$  比较得到。由于没有充分利用样本所提供的信息,因此,非参检验的效率低于参数检验<sup>[6]</sup>。故各方法中尽量用参数检验结果。为避免不同评价员间产生的误差相对样品的影响,对评分结果进行了既考虑了样品又考虑了评价员的影响的双向方差分析<sup>[7]</sup>。故评分法,排序结合评分法均用方差分析。

**2.5.3 赋值精密度(PE)** 赋值精密度即数据离散性的比较。因排序法没有具体的评分值,不用做 PE 比较。

**2.5.4 拟合度(FD)** 同一药物的苦度与其浓度间呈良好的威布尔曲线相关性<sup>[1]</sup>,对苦度值进行拟合后与各方法比较可得到各方法的 FD。

## 3 结果

**3.1 Spearman 检验结果** 查询 Spearman 系数临界

值表得当样品数为8、显著水平 $\alpha=0.05$ 下,临界值为0.738,在排序法中有2个评价员得分为0.71,一个评价员得分为0.31,故合格评价员总数为17个;在评分法中评价员得分均 $>0.738$ ,故合格评价员总数为20个;在排序结合评分法中,一个评价员得分为0.48、一个评价员得分为0.6,其余均合格,故合格评价员总数为18个。

**3.2 3种方法的排序秩和结果** 3种方法的排序秩和结果见表1。

表1 不同质量浓度苦参碱3种方法的排序秩和结果

样品	剂量 / $g \cdot L^{-1}$	秩和		
		OEM	SEM	ISEM
苦参碱	0.05	25	22.5	19
	0.08	48	47	38
	0.15	30	53	54
	0.25	79	100	80
	0.3	87	86.5	88
	0.45	96	131.5	109
	0.6	124	125.5	121
	0.75	123	154	139

SEM和ISEM的评分结果见表2。因排序法没有具体苦度值,故并未统计。

**3.3 3种方法的RRR和DS指标的对比结果** 对于RRR和DS,3种方法具体结果见图1。由得分高低可看出,3种方法中,ISEM方法较优,RRR和DS均较高。

表2 不同质量浓度苦参碱两种方法的苦度值( $\bar{x} \pm s, n_1=20, n_2=18$ )

样品	剂量 / $g \cdot L^{-1}$	苦度值	
		SEM( $n_1$ )	ISEM( $n_2$ )
苦参碱	0.05	$0.81 \pm 0.25$	$0.92 \pm 0.37$
	0.08	$1.36 \pm 0.42$	$1.5 \pm 0.53$
	0.15	$1.53 \pm 0.41$	$1.85 \pm 0.54$
	0.25	$2.56 \pm 0.57$	$2.61 \pm 0.81$
	0.3	$2.4 \pm 0.58$	$2.74 \pm 0.85$
	0.45	$3.45 \pm 0.8$	$3.27 \pm 0.79$
	0.6	$3.43 \pm 0.57$	$3.44 \pm 0.72$
	0.75	$4.04 \pm 0.39$	$4.04 \pm 0.79$

**3.4 两种方法的PE和FD指标的对比结果** SEM和ISEM两种方法的RSD分别为 $0.23 \pm 0.07$ ,  $0.29 \pm 0.07$ ( $\pm SE$ ),进行配对双侧 $t$ 检验有显著性差异( $P < 0.01$ ),此结果显示在PE方面SEM较优。

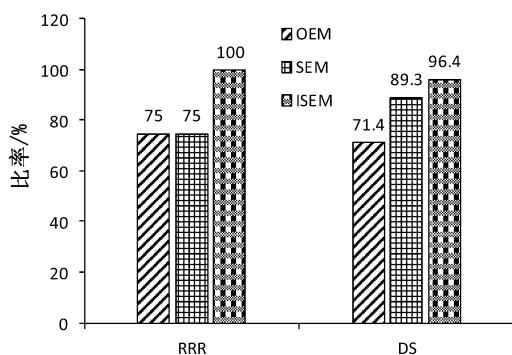


图1 3种口尝评价方法的RRR和DS结果比较

SEM和ISEM两种方法拟合后的复相关系数( $R^2$ )分别为0.9700,0.9916,拟合均方根误差RMSECV分别为0.276,0.059。从对数据的拟合结果看,以ISEM更为理想。见图2。

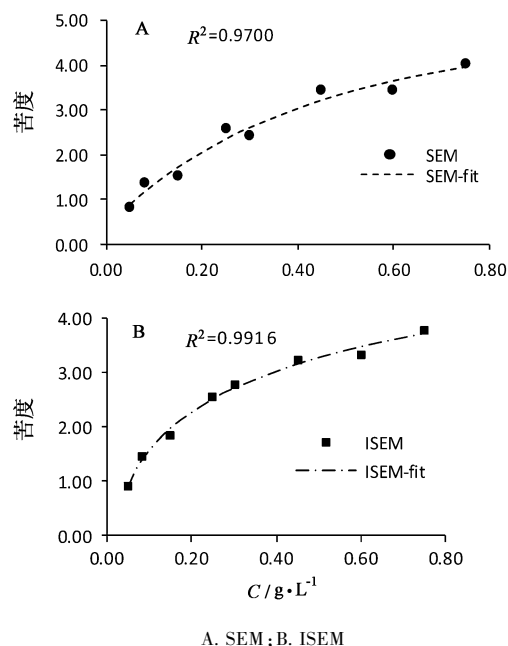


图2 SEM与ISEM的苦度拟合结果对比

由以上结果可看出,OEM所得指标较少,相对比较简单,可用于确定不同原料、处理等条件对样品一个或整体感官指标强度的影响;或进一步进行精细感官分析的预筛。SEM在FD方面较优,可用于样品数目较少、各样品间相对独立(相关性不太高)时的筛选,ISEM在RRR,DS,FD方面均较优,可作为一般口感评价中的方法。

#### 4 讨论

国内法定排序法<sup>[5]</sup>是对样品初筛的简单有效的方法,该法只排出样品的次序,表明样品间相对强度大小,可用于确定不同原料、处理等条件对样品一个或整体感官指标强度的影响;或进一步进行精细

感观分析的预筛。评分法应用广泛<sup>[8-9]</sup>,具体分值可使样品定量化比较区别,可用以评价样品一个或多个特性的强度,实践中常用于产品感观质量评价。但其一般每 2 个样品间有较长间隔时间,而最佳口感评价时间是上午 9 ~ 11 点,下午 3 ~ 5 点<sup>[1]</sup>,这样看来该方法整体品评效率稍低,可用于样品数目较少、各样品间相对独立(相关性不太高)时的筛选。排序结合评分法整合以上两种方法的优势,排序正确率、判断灵敏度、拟合度均较高,可以作为一般口感评价中的方法。

苦味物质的来源主要有生物碱、萜类、糖苷、苦味肽等。以苦味中药中生物碱类成分作为抑苦研究的载体,并以此为突破口进行中药汤剂的掩味研究,具有一定的代表意义<sup>[8]</sup>。苦参碱是中药苦参的有效成分,其苦味纯正,无其他不良味道,且苦参碱类化合物及其总碱是一类极具抑菌活性的前体药物<sup>[9]</sup>,苦参碱在抗肿瘤方面有较广的应用前景<sup>[10]</sup>。以其为载体,有一定的临床意义。

3 种方法中均以多名评价员充当“分析仪器”的角色,评价员是一种主观能动性很强的“仪器”,其稳定性、准确度等受身体状况、情绪及周围环境等多方面影响,但只要评价员人数不过少,并有控制误差的措施,则能够得到较为准确的结果,这在一定程度上体现了群体智慧。此次实验首先人为设定已知浓度的参比样品的苦度值。每个评价员有自己判断苦度的标尺,而且个体间有一定的口感差别,“标化”是为了纠正个体评价员的苦度偏差,尽可能的减小数据离散性。

ISEM 方法在 PE 方面稍差于评分法。苦味一般持续时间较长,ISEM 方法中各样品间间隔 2 ~ 3 min 苦味不能完全消除,可能会影响对下一个样品苦度的判断,这可能是其 RSD 高的原因。而 SEM 方法中,间隔 20 min,人类大脑对之前的苦味记忆会比较模糊,没有与之前样品刻意的比较,这可能是 SEM 方法中 RRR,DS,FD 较低的原因,但具体原因还需要进一步研究。而 RSD 高可通过加强口尝评

价质量监督、增加对评价员的培训等方法加以提高。笔者以苦味中药龙胆草为载体进行的研究表明,其 RSD 达到(0.18 ± 0.08)%,与上述评分法 RSD 进行配对双侧 *t* 检验,有显著性差异( $P < 0.05$ ),这说明通过一些措施后排序结合评分法的 PE 可超过评分法,而具体的口尝方法可根据自己实验目的、样品数目等选择。

#### [参考文献]

- [1] 赵镭,刘文. 感官分析技术应用指南[M]. 北京:中国轻工业出版社,2011:2.
- [2] 王优杰,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.
- [3] 施雯,高东雁,王建新,等. 龙胆苦苷血药浓度测定法在磷脂复合物制备工艺研究中的应用[J]. 复旦学报:医学版,2009,36(3):342.
- [4] 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学测试数据中异常值的剔除方法,中国 201110283466.3[P]. 2012-05-02.
- [5] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. 感官分析方法学排序法[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [6] 祝国强,杭国明,滕海英,等. 谈谈两总体比较的非参数检验方法[J]. 数理医药学杂志,2011,24(5):524.
- [7] 马永强,韩春然,刘静波. 食品感官检验[M]. 北京:化学工业出版社,2010.
- [8] 刘瑞新,李学林,吴子丹,等. 中药汤剂掩味研究的必要性、现状与对策[J]. 中国药房,2012,23(27):2497.
- [9] Lorenz Julie K, Reo Joseph P, Hendl Ondrej, et al. Evaluation of a taste sensor instrument (electronic tongue) for use in formulation development[J]. Int J Pharm,2009,367(1/2):65.
- [10] S Takagi, K Toko, K Wada, et al. Quantification of suppression of bitterness using an electronic tongue[J]. J Pharm Sci,2001,90(12):2042.

[责任编辑 邹晓翠]