

药食同源五汁饮抗褐变工艺关键成分解析及其胃保护作用

游 宇, 李 娟, 吴佳颖, 周玮玲, 樊馨璐, 袁兴钟滢, 周彦汐, 邓鸿丹, 胡慧玲*, 傅超美*

成都中医药大学, 中药种质资源创新与高效利用四川省重点实验室, 四川 成都 611137

摘要: 目的 针对药食同源复方五汁饮液体剂储存期易发生的非酶褐变难题, 系统解析其褐变机制, 并评价抗褐变工艺制备的五汁饮对酒精性胃损伤的保护作用。方法 采用非靶向代谢组学超高效液相色谱-质谱联用 (ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry, UPLC-MS) 结合 Spe-Pak 微柱分离技术, 分析五汁饮褐变前后差异代谢物及褐变中间体; 以颜色、褐变度及营养成分变化表征褐变程度; 建立无水乙醇诱导小鼠急性胃损伤模型, 评价抗褐变工艺制备的五汁饮胃保护作用。结果 褐变导致总糖、总多酚及总氨基酸含量显著下降 ($P < 0.05$)。筛选出 19 种关键差异化合物, 其中果糖、蔗糖、缬氨酸、异亮氨酸、酪氨酸及对香豆酸为主要驱动因子; 鉴定出核心褐变中间体为 2-羟基-3-甲基-2-环戊烯-1-酮, 证实褐变由美拉德反应、酸催化糖降解及酚类氧化交联共同驱动; 抗褐变工艺制备的五汁饮高剂量 (43.72 g/kg) 可显著降低小鼠胃溃疡指数 (抑制率 72.42%), 减轻胃黏膜病理损伤, 其机制与抑制核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 通路, 降低炎症因子 [白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-6], 调节氧化应激 [升高超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)/丙二醛比值] 及保护黏膜屏障 [调节 NO、前列腺素 E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂)、三叶因子 2 (trefoil factor 2, TFF2)] 相关。结论 果糖、蔗糖、缬氨酸、异亮氨酸、酪氨酸及对香豆酸是五汁饮褐变的关键驱动因子; 美拉德反应、酸催化糖降解及酚类氧化交联是其主要褐变途径; 抗褐变工艺制备的五汁饮对酒精性胃损伤具有显著保护功能。

关键词: 五汁饮; 非酶褐变; 褐变机制; 酒精性胃损伤; 代谢组学; 果糖; 蔗糖; 缬氨酸; 异亮氨酸; 酪氨酸; 对香豆酸; 2-羟基-3-甲基-2-环戊烯-1-酮; 美拉德反应

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2026)18-7295-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.18.018

Analysis of key components in anti-browning process of medicine-food homology formula Wuzhiyin and its gastroprotective function

YOU Yu, LI Juan, WU Jiaying, ZHOU Weiling, FAN Xinlu, YUAN Xingzhongyan, ZHOU Yanxi, DENG Hongdan, HU Huiling, FU Chaomei

Sichuan Provincial Key Laboratory of Genetic Resources Innovation and Efficient Utilization of Chinese Medicinal Materials, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective Given that the liquid formulation of the medicine-food homology formula Wuzhiyin is susceptible to non-enzymatic browning during storage, this study systematically investigates the underlying browning mechanism and evaluates the gastroprotective effect of Wuzhiyin prepared using an anti-browning processing technology against alcoholic gastric injury. **Methods** The differential metabolites and browning intermediates before and after browning of Wuzhiyin were analyzed by non-targeted ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS) and Spe-Pak microcolumn separation technology. The degree of browning was characterized by color changes, browning degree, and alterations in nutritional components. An anhydrous ethanol-induced acute gastric injury mouse model was established to evaluate the gastroprotective function of anti-browning prepared

收稿日期: 2026-06-12

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (81904088); 国家中医药管理局创新团队和人才培养计划 (ZYXCXTD-D-202209); 中国博士后科学基金第 76 批面上资助项目 (2024MD763926); 四川省科技厅青年基金项目 (2025ZNSFSC1804); 博士后科研项目特别资助 (TB2025092); 成都中医药大学 2024-2025 年度大学生科研实践创新项目 (ky-2025069)

作者简介: 游 宇 (1986—), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中药炮制与中药制剂研究。E-mail: yvonne@cdutcm.edu.cn

***通信作者:** 胡慧玲, 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事中药炮制与中药制剂研究。E-mail: huhuiling@cdutcm.edu.cn

傅超美, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事中药炮制与中药制剂研究。E-mail: chaomeifu@126.com

Wuzhiyin. **Results** Total sugars, total polyphenols, and total amino acids were significantly decreased by browning ($P < 0.05$). Nineteen key differential compounds were screened, among which fructose, sucrose, valine, isoleucine, tyrosine, and *p*-coumaric acid were identified as major driving factors. 2-Hydroxy-3-methyl-2-cyclopenten-1-one was identified as the core browning intermediate, and the browning mechanism was elucidated as a synergistic process involving the Maillard reaction, acid-promoted sugar degradation, and oxidative cross-linking of phenolic compounds. High-dose anti-browning prepared Wuzhiyin (43.72 g/kg) significantly reduced the gastric ulcer index (inhibition rate 72.42%) and alleviated pathological damage to the gastric mucosa. The underlying mechanisms include inhibiting nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathway, reducing inflammatory cytokines [interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-6], regulating oxidative stress [elevation of superoxide dismutase (SOD)/malondialdehyde ratio], and protecting mucosal barrier [modulation of NO, prostaglandin E₂ (PGE₂), trefoil factor 2 (TFF2)]. **Conclusion** Fructose, sucrose, valine, isoleucine, tyrosine, and *p*-coumaric acid are the key drivers of browning in Wuzhiyin; the Maillard reaction, acid-catalyzed sugar degradation, and phenolic oxidative cross-linking constitute the major browning pathways; and Wuzhiyin prepared via the anti-browning processing technology exhibits a significant gastroprotective effect against alcoholic gastric injury.

Key words: Wuzhiyin; non-enzymatic browning; browning mechanism; alcoholic gastric injury; metabonomics; fructose; sucrose; valine; isoleucine; tyrosine; *p*-coumaric acid; 2-hydroxy-3-methyl-2-cyclopenten-1-one; Maillard reaction

药食同源是中医药学的重要组成部分,承载着中华民族“寓医于食”的千年智慧,体现了中国传统文化中“食养”“治未病”的独特思想。在“健康中国”战略和大健康产业蓬勃发展的时代背景下,药食同源产品开发已成为中医药传承创新的重要方向,也是满足人民群众日益增长的健康需求的有效路径。

五汁饮是药食同源的经典代表,源于清代温病大家吴鞠通所著《温病条辨》,由梨汁、荸荠汁、藕汁、麦冬汁、芦根汁“五汁”组成,乃甘寒救津之代表经方,功擅生津润燥、清热和胃。因其气味甘淡、组方平和,后世常作为日常调养之品,用于饮酒过度、胃脘灼热等不适。现代研究表明,五汁饮富含多糖、多酚及氨基酸等活性成分,具有抗炎、抗氧化及黏膜保护等生物活性^[1-7]。然而五汁饮含还原糖(果糖、半乳糖)和氨基酸(缬氨酸、异亮氨酸、酪氨酸)及酚酸(对香豆酸),是一种化学组成较复杂的液体制剂,在储存过程中极易发生非酶褐变,表现为产品颜色由亮黄色迅速加深为棕褐色,感官品质严重下降。更关键的是,褐变伴随多酚、多糖、氨基酸等活性成分显著损耗,以及 5-羟甲基糠醛(5-hydroxymethylfurfural, 5-HMF)等潜在风险物质生成^[8-10],这一问题也是药食同源液体产品储存过程中的共性技术难题。目前,由于五汁饮成分高度复杂,其褐变的关键驱动因子及反应机制尚不明确,此外,五汁饮的传统应用涉及胃的功能调节,包括酒精性胃损伤^[11-18],因此胃保护功能可作为评价抗褐变工艺后制备的制剂,是否保留生物活性的适宜评价模型。

针对上述问题,本课题组前期已完成五汁饮抗

褐变制备工艺^[19],并制备了合格产品。本实验聚焦五汁饮褐变机制的深度解析及其胃保护功能研究,系统表征五汁饮褐变过程中的颜色参数及营养成分变化;联合非靶向代谢组学与 Spe-Pak 色素分离技术,识别褐变前后关键差异代谢物及核心褐变中间体,阐明褐变化学途径;建立小鼠急性胃损伤模型,初步考察抗褐变工艺制备的五汁饮胃保护功能。本实验旨在揭示五汁饮褐变的化学本质,为抗褐变制剂提供机制层面的科学解释,为同类“药食同源”液体产品的高品质开发提供实验依据,助力中医药在大健康产业中的创新发展。

1 仪器与材料

1.1 仪器

UV-3300 型紫外-可见分光光度计,上海美谱达仪器有限公司; Synapt XS LC-MS 系统,美国沃特世公司; 1260 Infinity II 型高效液相色谱系统,安捷伦科技(中国)有限公司; Ci7XX0 型色差仪,爱色丽(上海)色彩科技有限公司; Ultimate 3000 型超高效液相色谱系统,美国赛默飞世尔科技有限公司。

1.2 药品与试剂

梨、莲藕和荸荠购自中国成都农产品中心批发市场,鲜麦冬来自四川绵阳,鲜芦根来自中国河南南阳,所有药材均经成都中医药大学龙飞副教授鉴定,梨为蔷薇科梨属植物白梨 *Pyrus bretschneideri* Rehd. 的新鲜果实,莲藕为睡莲科莲属植物莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn. 的新鲜根茎,荸荠为莎草科荸荠属植物荸荠 *Eleocharis dulcis* (Burm. f.) Trin. ex Hensch. 的新鲜球茎,鲜麦冬为百合科沿阶草属植物麦冬 *Ophiopogon japonicus* (L. f.) Ker-Gawl. 的新鲜块根,鲜芦根为禾本科芦苇属植物芦苇 *Phragmites*

communis Trin.的新鲜根茎;以上样品均经鉴定为正品,且符合《中国药典》2025 年版相应品种项下的规定。

对照品葡萄糖(批号 23040411)、果糖(批号 22052304)、蔗糖(批号 20122806)、缬氨酸(批号 22021710)、异亮氨酸(批号 20071003)、酪氨酸(批号 190216)、对香豆酸(批号 21052604)、精氨酸(批号 20071003)、没食子酸(20122806),质量分数均 $\geq 98.0\%$,均购自成都普菲德生物技术有限公司。核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B) p65 抗体、半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶 3(cysteine-aspartic acid protease 3, Caspase-3)抗体及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 、丙二醛、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、NO、前列腺素 E₂(prostaglandin E₂, PGE₂)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)、三叶因子 2(trefoil factor 2, TFF2) ELISA 检测试剂盒,批号分别为 2023114232、GB11009-1、2023110501、2023110521、2023114553、MPC2303081、20230905、20231027、2023114454、MPC2309056、MPC2304029、2023114654,均购自武汉赛维尔生物科技有限公司。无水乙醇为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。

1.3 动物

SPF 级雄性昆明小鼠 48 只,体质量(20 $\pm$ 2) g,购自成都达硕实验动物有限公司,许可证号 SCXK(川)2020-030。动物实验经成都中医药大学动物伦理委员会批准,批准号 2024517。

2 方法与结果

2.1 五汁饮样品制备

取梨 700 g、荸荠 300 g、莲藕 200 g,榨汁、滤过、离心,取上清液,备用。另取芦根 80 g、麦冬 50 g,加 8 倍量水浸泡 0.5 h,煎煮 90 min,滤过 3 次,合并滤液并浓缩备用。将上清液与浓缩液合并,加入 0.05%山梨酸钾,用 20%氢氧化钠调 pH 值至 5.5~6.0,加水至 1 000 mL,搅匀、静置、滤过,即得未褐变样品(T₁),将部分 T₁样品于 4℃储存 31 d,作为自然褐变样品(T₂,褐变)。

2.2 褐变对五汁饮外观色泽及营养成分影响研究

2.2.1 褐变相关参数的测定 将样品用超纯水按体积比 1:25 稀释后,以超纯水为空白参比,于波长 420 nm 处测定 T₁、T₂样品的吸光度(*A*)值,按通

用公式(1)计算褐变度。

$$\text{褐变度} = 10 \times A_{420} \quad (1)$$

采用 Ci7XX0 色差仪测定 T₁、T₂样品的亮度(*L*^{*})、红绿色度(*a*^{*})、黄蓝色度(*b*^{*})值,按通用公式(2)~(5)计算 T₁、T₂的褐变指数(browning index, BI)、黄度指数(yellowness index, YI)、总色差(ΔE)值。

$$X = (a^* + 1.75 L^*) / (5.645 L^* + a^* - 3.012 b^*) \quad (2)$$

$$BI = (X - 0.31) \times 100 / 0.172 \quad (3)$$

X 为计算 BI 时引入的中间转换参数

$$\Delta E = [(L_1^* - L_0^*)^2 + (b_1^* - b_0^*)^2 + (a_1^* - a_0^*)^2]^{1/2} \quad (4)$$

$$YI = 142.86 b^* / L^* \quad (5)$$

2.2.2 能量及核心营养素的测定 参照中华人民共和国食品药品监督管理局颁布的 GB 28050-2011、GB 5009.5-2016 及 GB 5009.91-2017 标准,对 T₁、T₂样品的能量、蛋白质含量、脂肪含量、碳水化合物含量及钠含量进行测定。

2.2.3 褐变对五汁饮颜色的影响 五汁饮样品在 CIE 颜色系统中检测结果见图 1,样品整体颜色变暗并朝红黄方向演变,表明五汁饮样品发生严重褐变反应;表 1 结果表明,褐变后亮度值 *L*^{*}由 83.05 降至 67.65,红绿色度值 *a*^{*}由 0.18 升至 5.49,黄蓝色度值 *b*^{*}由 18.76 升至 36.34,BI、YI、*A* 值在 420 nm 均显著上升,表明五汁饮样品发生严重褐变。

2.2.4 褐变对五汁饮营养成分的影响 表 1 结果表明,褐变后总能量由 1.75 kJ/g 降至 1.48 kJ/g,碳水化合物由 96.0 g/kg 降至 80.0 g/kg,钠由 0.48 mg/g 升至 0.61 mg/g,而蛋白质(7.0 g/kg)和脂肪(0 g/kg)在褐变前后均无变化。

2.3 UPLC-MS 非靶向代谢组学研究五汁饮褐变前后关键差异化合物

2.3.1 UPLC-MS 分析条件

(1)色谱条件:色谱柱为 Acquity UPLC[®] CSHTM C₁₈ 柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m);流动相为 0.1%甲酸水溶液(A)-0.1%甲酸乙腈溶液(B),洗脱程序:0~3 min, 99%~97%A; 3~5 min, 97%~95%A; 5~7 min, 95%~90%A; 7~9 min, 90%~80%A; 9~12 min, 80%~60%A; 12~15 min, 60%~40%A; 15~20 min, 40%~20%A; 20~22 min, 20%~95%A; 22~24 min, 95%A; 24~25 min, 95%~99%A; 25~29 min, 99%A; 体积流量 0.3 mL/min;柱温 30℃,进样量 0.3 μ L。

(2)质谱条件:电喷雾离子源(ESI),正、负

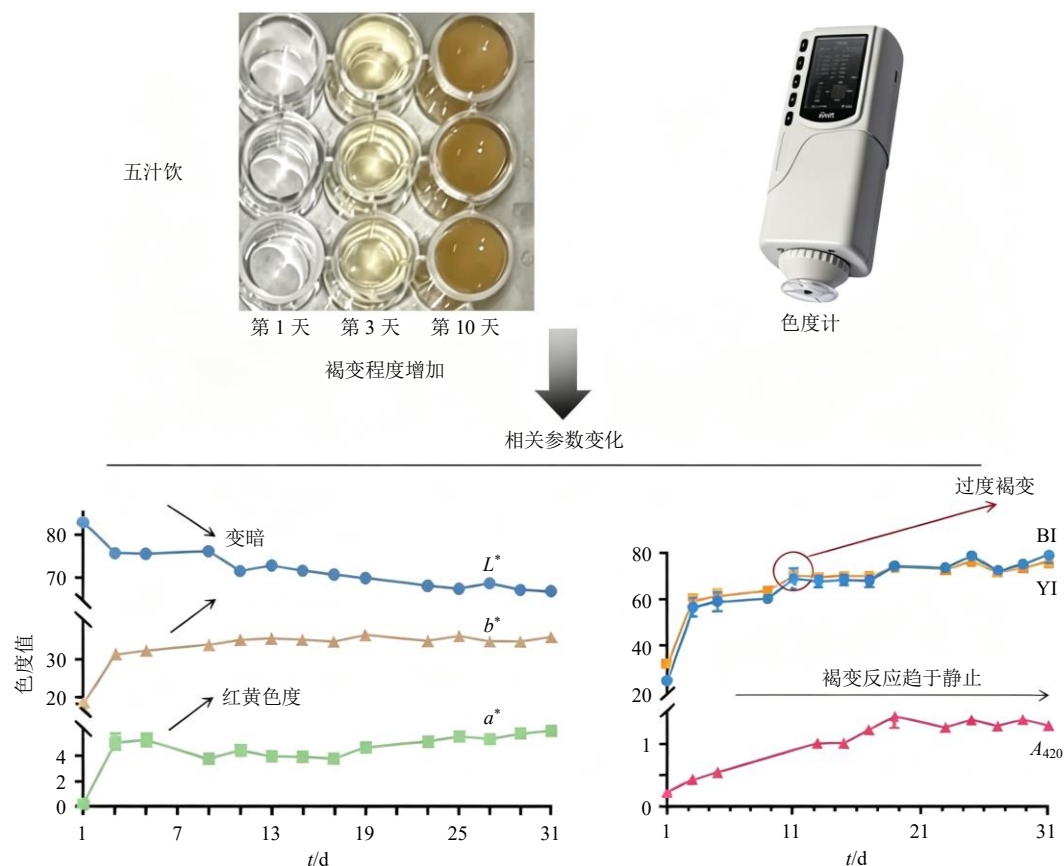


图 1 五汁饮褐变外观色泽变化

Fig. 1 Browning appearance and color changes of Wuzhiyin

表 1 褐变前后颜色参数与营养成分变化

Table 1 Changes in color parameters and nutritional components before and after browning

样品	L^*	a^*	b^*	BI	YI	A_{420nm}	能量/(kJ·g ⁻¹)	蛋白质/(g·kg ⁻¹)	脂肪/(g·kg ⁻¹)	碳水化合物/(g·kg ⁻¹)	钠/(mg·g ⁻¹)
T ₁	83.05	0.18	18.76	24.87	32.27	0.40	1.75	7.0	0	96.0	0.48
T ₂	67.65	5.49	36.34	78.92	76.75	1.39	1.48	7.0	0	80.0	0.61

离子喷雾电压分别为+3.5、-2.5 kV，离子源温度 150 °C，干燥气体温度 450 °C，质量扫描范围 m/z 50~1 700。

2.3.2 数据的采集与统计学分析 采用 Progenesis QI 与 EZinfo 3.0 软件进行峰识别、对齐及归一化处理。将处理后数据导入 SIMCA 14.0 进行主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)。以 $P < 0.05$, |差异倍数 (fold change, FC)| > 2 , 变量重要性投影 (variable importance projection, VIP) > 1.5 为条件筛选差异代谢物, 并进行层次聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA) 及绘制火山图。将筛选出来的差异化合物导入 UNIFI 数据系统与五汁饮褐变相关化合物成分自建库进行匹配, 并结合相应文献分

析, 鉴定关键差异化合物结构。

2.3.3 质控样本稳定性分析 质量控制 (quality control, QC) 样品基峰色谱图 (base peak chromatogram, BPC) 结果见图 2, QC 样品间的相关性趋近于 1, 表明该仪器状态良好, 数据可靠。

2.3.4 差异代谢物多元变量分析 PCA 结果 (图 3-A、B) 表明, 正离子模式下检测到的 21 995 个代谢物中, 第 1、2 主成分 (PC1、PC2) 分别占总方差的 52.4% 和 19.6% (累积方差贡献率 72.0%); 负离子模式下检测到的 4 391 个代谢物中, PC1、PC2 分别占总方差的 67.6%、14.0% (累积方差贡献率 81.6%), T₁ 和 T₂ 组间有明显的分离, 表明褐变对五汁饮整体化合物轮廓影响显著。OPLS-DA 模型结果 (图 3-C、D), 正离子模式下 $R^2 = 0.748$, $R^2 = 0.990$, $Q^2 = 0.949$; 负离子模式下 $R^2 = 0.906$, $R^2 =$

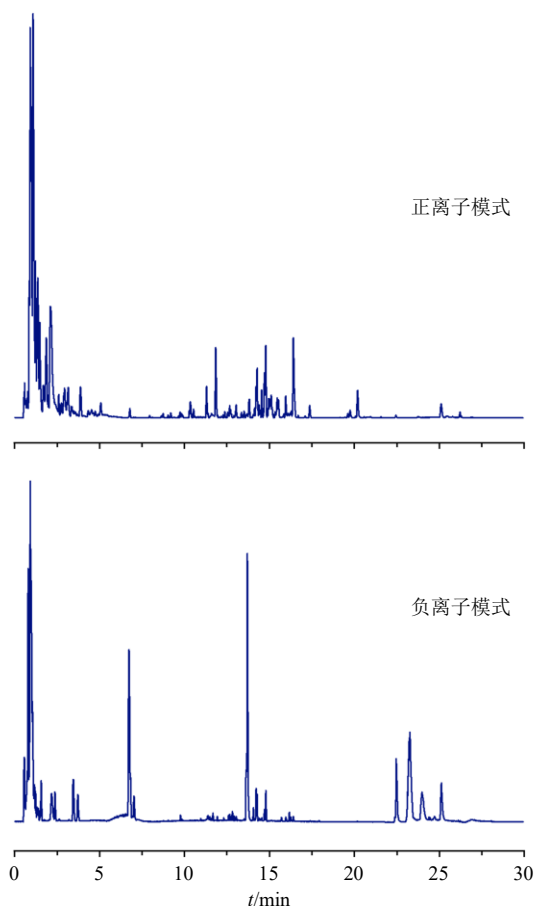


图 2 QC 样品的 BPC
Fig. 2 BPC of QC sample

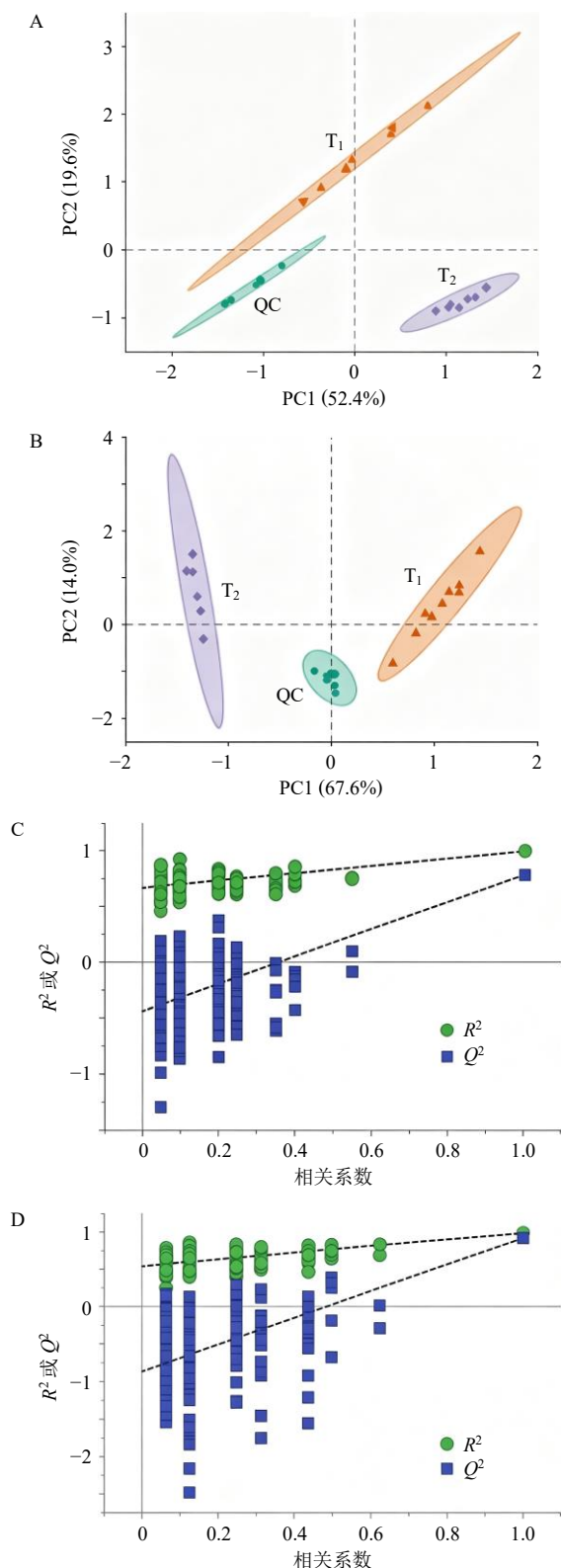
0.995, $Q^2=0.956$ 。结果表明, 经 200 次置换检验, 模型均无过拟合, 该模型可用于后续分析。

2.3.5 差异代谢物火山图分析 以 $|FC|>2.0$, $P<0.05$ 为筛选条件绘制火山图, 结果 (图 4) 显示, 正离子模式下上调代谢物 645 个, 下调代谢物 14316 个; 负离子模式下, 上调代谢物 460 个, 下调代谢物 796 个。

2.3.6 差异代谢物的 HCA 以 $|FC|>2.0$, $P<0.05$, $VIP>1.5$ 为条件进行 HCA, 结果表明 T2 中整体代谢物丰度降低 (图 5); 共筛选出 19 个关键化合物, 包括 9 种糖及糖苷衍生物, 6 种氨基酸及其衍生物, 4 种酚类化合物 (表 2)。

2.4 UPLC-MS 非靶向代谢组学测定五汁饮褐变前后关键差异化合物含量

本实验针对五汁饮中关键差异化合物的理化性质差异, 分别建立了 2 大类含量测定方法: (1) 大类成分总量测定。采用紫外-可见分光光度法 (UV-Vis) 测定总糖、总氨基酸及总多酚含量; 其中, 总糖含量测定参照现行版《中国药典》通则方法并加

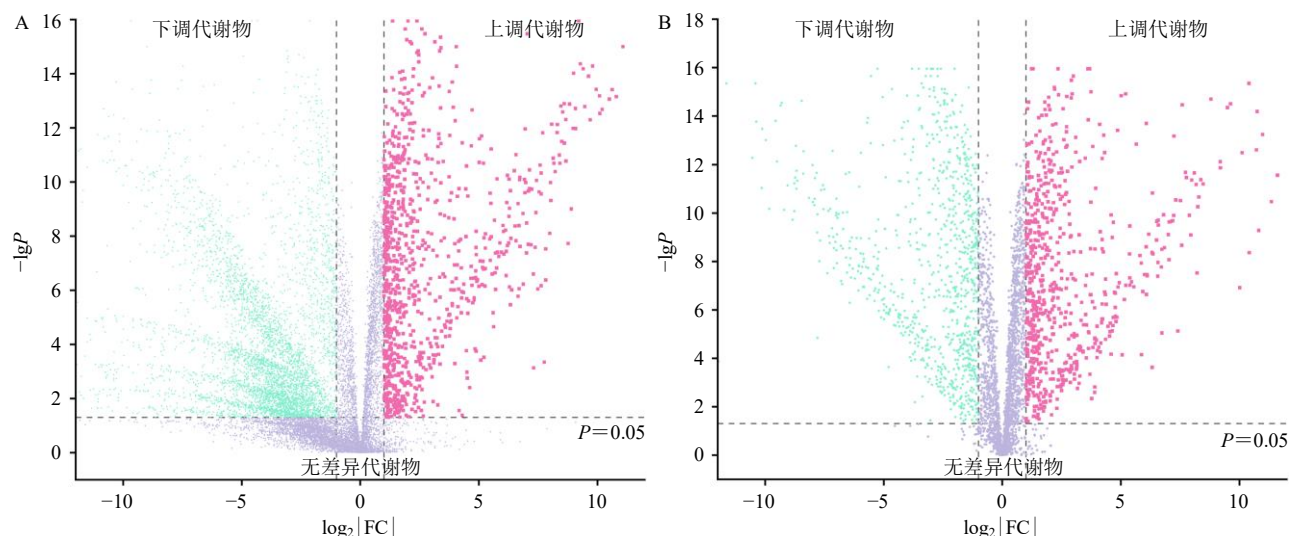
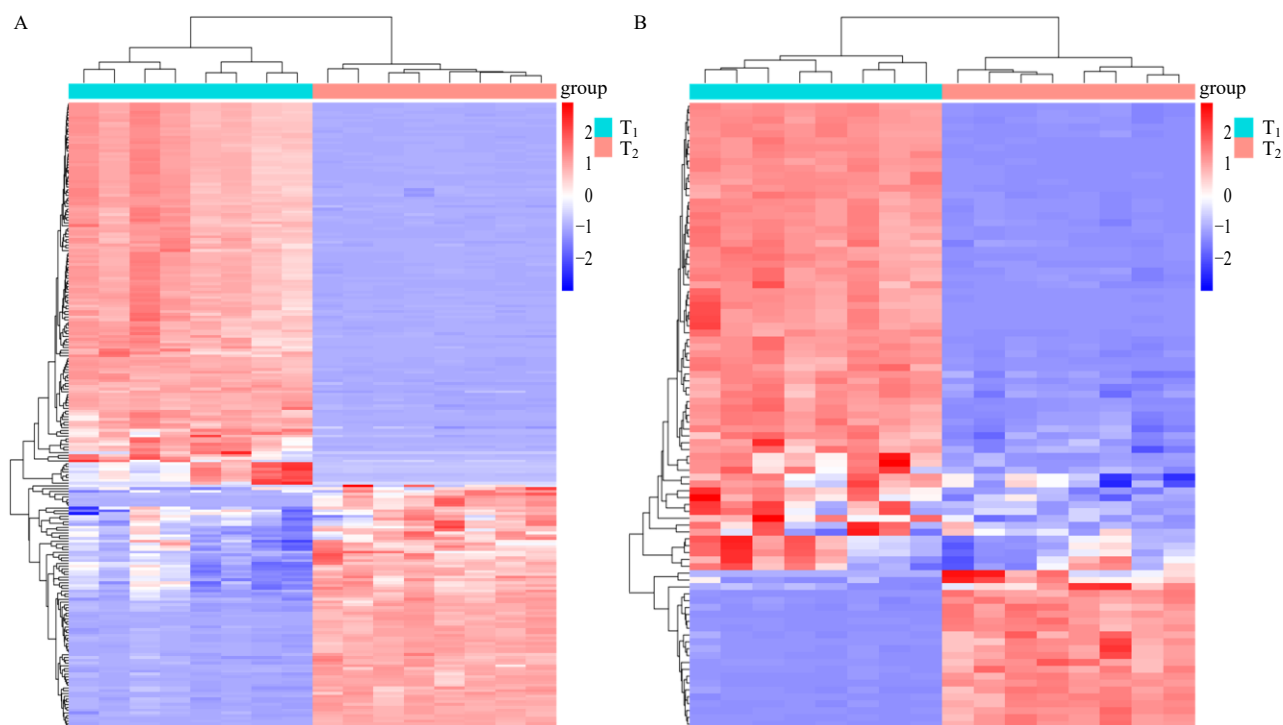


A、B-正、负离子模式 PCA 得分图; C、D-正、负离子模式 OPLS-DA 置换检验图。

A, B-PCA score plots in positive, negative ion modes; C, D-OPLS-DA permutation test plots in positive, negative ion modes.

图 3 多元变量分析

Fig. 3 Multivariate analysis

图4 正离子 (A) 和负离子 (B) 模式下的火山图分析 ($n=8$)Fig. 4 Volcano diagram analysis in positive ion (A) and negative ion (B) modes ($n=8$)图5 正离子 (A) 和负离子 (B) 模式下的热图分析 ($n=8$)Fig. 5 Thermographic analysis in positive ion (A) and negative ion (B) modes ($n=8$)

以调整；总氨基酸及总多酚含量测定参照文献方法。(2) 单体化合物含量测定。采用 HPLC 法分别测定果糖、蔗糖、缬氨酸、异亮氨酸、酪氨酸及对香豆酸6种关键单体的含量。各单体化合物的HPLC测定方法均为本课题组在参考文献方法基础上自主建立。

2.4.1 总糖、总氨基酸及总多酚的含量测定

(1) 总糖含量测定：采用苯酚-硫酸显色法测定

总糖含量^[20]。取适量样品溶液，加纯化水稀释至适当浓度。精密吸取稀释后的样品溶液 1.0 mL，置于 10 mL 具塞试管中，加入 5% 苯酚溶液 1.0 mL，摇匀，迅速加入浓硫酸 5.0 mL，摇匀，室温放置 10 min 后，于 40 °C 水浴加热 15 min，取出，冰浴冷却至室温，以相应空白溶液为参比，采用紫外可见分光光度计于 490 nm 处测定 A 值。计算样品中总糖含量，以 D-无水葡萄糖为对照品，以 A 值为纵坐标

表 2 差异代谢化合物
Table 2 Differential metabolic compounds

类别	t_R/min	模式	分子式	确定代谢物	FC	VIP	趋势
糖及其衍生物	0.95	负离子	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	蔗糖	13.59	16.82	↓
	0.91	负离子	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	半乳糖	2.21	1.59	↓
	0.96	负离子	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	D-(+)-果糖	2.21	1.59	↓
	1.35	负离子	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	甘露糖	4.40	1.62	↓
	2.01	负离子	$\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}_{26}$	β -D-呋喃结构-(2→1)- β -D-吡喃结构-(2→6)- α -D-吡喃结构基-(1→2)- γ -D-吡嗪酮结构基	5.63	2.35	↓
	4.97	正离子	$\text{C}_{60}\text{H}_{102}\text{O}_{51}$	1,4- β -D-甘露糖	3.04	1.58	↓
	13.51	正离子	$\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{O}_{13}$	(+)-lyoniresinol 9-葡萄糖	2.18	1.82	↓
	13.61	正离子	$\text{C}_{52}\text{H}_{54}\text{O}_{27}$	山柰酚-3-O-阿魏酰基-咖啡酰基-葡萄糖苷7-O-葡萄糖苷	145.07	1.57	↓
	14.22	正离子	$\text{C}_{33}\text{H}_{52}\text{O}_9$	1,25-二羟基维生素D3单葡萄糖醇苷	2.64	1.90	↓
	0.95	正离子	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2$	D-(-)-缬氨酸	13.83	10.14	↓
氨基酸及其衍生物	1.51	正离子	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$	异亮氨酸	4.98	4.21	↓
	0.96	正离子	$\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{NO}_4$	L-多巴正丁酯	2.29	2.23	↑
	1.25	正离子	$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4$	苏氨酸-色氨酸	3.09	2.73	↑
	12.38	负离子	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_3$	α -甲基间-酪氨酸	2 019.80	2.38	↑
	1.56	正离子	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3$	酪氨酸	6.59	7.95	↓
酚类化合物	1.56	正离子	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$	对香豆酸	3.12	5.92	↓
	1.47	正离子	$\text{C}_{13}\text{H}_8\text{O}_6$	诺阿梯醇	2.22	3.16	↑
	15.07	正离子	$\text{C}_{37}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_{11}$	sativan	4.08	1.91	↑
	12.96	负离子	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$	间香豆酸	441.69	1.94	↓

↓ 下调代谢物; ↑ 上调代谢物。

↓ down-regulated metabolites; ↑ up-regulated metabolites.

(Y), 质量浓度为横坐标(X), 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得线性回归方程为 $Y=10.694X-0.1105$, $R^2=0.9980$ 。

(2) 总氨基酸含量测定^[21]: 采用茚三酮显色法。取 0.5 mL 样品溶液置于 10 mL 量瓶中, 定容, 从中取 1 mL 稀释样品溶液, 置于 10 mL 具塞试管中, 加入 1 mL 2%茚三酮乙醇溶液, 加入 1.0 mL pH 值为 7.14 Na_2HPO_4 缓冲溶液, 加纯化水稀释至 5 mL, 混匀, 90 °C 水浴 15 min, 取出冷却至室温, 于波长 570 nm 处测定 A 值, 以 A 值为纵坐标(Y), 精氨酸质量浓度为横坐标(X), 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得线性回归方程为 $Y=33.346X-1.3880$, $R^2=0.9915$ 。

(3) 总多酚含量测定^[22]: 采用福林显色法, 取 0.1 mL 样品, 置于 10 mL 具塞试管中, 加入 0.5 mL 福林酚试剂及 1.5 mL 15% Na_2CO_3 溶液, 充分混匀, 用纯化水稀释至 10 mL, 75 °C 水浴 15 min, 于 760 nm 测定 A 值, 以 A 值为纵坐标(Y), 没食子酸质量浓度为横坐标(X), 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得线性回归方程 $Y=8.2607X-0.0074$, $R^2=$

0.9994。

2.4.2 果糖、蔗糖的含量测定

(1) 色谱条件: 色谱柱为 Sugar-D 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为水-乙腈, 洗脱程序: 0~10 min, 72%~60%乙腈; 柱温 35 °C; 体积流量 1 mL/min; 漂移管温度 90 °C; 载气体积流量 2.0 L/min; 进样量 10 μL 。

(2) 对照品溶液: 取果糖、蔗糖对照品适量, 精密称定, 分别加纯化水制成质量浓度为 0.604、0.388 mg/mL 的对照品溶液。

(3) 供试品溶液的制备: 取五汁饮样品 0.125 mL, 加水定容至 25 mL, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得供试品溶液。

2.4.3 缬氨酸、酪氨酸、异亮氨酸的含量测定 采用柱前衍生化 HPLC 法。五汁饮样品经 6 mol/L 盐酸 110 °C 水解 22 h, 1-氟-2,4-二硝基苯 (1-fluoro-2,4-dinitrobenzene, FDNB) 衍生化后测定。

1% FDNB 衍生化试剂的配制: 精密称取 FDNB 0.25 g 至 25 mL 棕色量瓶中, 加入乙腈定容至刻度, 得到 1% 的 FDNB 衍生化试剂。

色谱条件: 色谱柱为 Uranus C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以 0.1% 乙酸水溶液为流动相 A、以乙腈-水 1:1 为流动相 B, 洗脱程序: 0~5 min, 35% B; 5~15 min, 35%~5% B; 15~25 min, 5% B; 柱温 35 ℃; 体积流量 1 mL/min; 检测波长 355 nm; 进样体积 10 μL。

2.4.4 对香豆酸的含量测定

(1) 色谱条件: 色谱柱为 Uranus C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A)-0.1% 甲酸乙腈溶液 (B), 洗脱程序: 0~3 min, 1% B; 3~6 min, 1%~5% B; 6~10 min, 5%~10% B; 10~27 min, 10%~20% B; 柱温 35 ℃; 体积流量 1 mL/min; 检测波长 310 nm; 进样体积 10 μL。

(2) 对照品溶液的制备: 取对香豆酸对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成含对香豆酸 0.176 mg/mL 的对照品溶液。

(3) 供试品溶液的制备: 取五汁饮样品溶液 1 mL, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

2.4.5 线性关系考察 果糖、蔗糖、缬氨酸、异亮氨酸、酪氨酸、对香豆酸以对照品溶液质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 得到回归方程为果糖 $Y=233.820 X-9.302 9$, $R^2=0.990 1$; 蔗糖 $Y=146.100 X-2.442 8$, $R^2=0.995 8$; 缬氨酸 $Y=90 402.000 X-5.348 7$, $R^2=0.997 7$; 异亮氨酸 $Y=70 050.000 X+7.166 6$, $R^2=0.999 4$; 酪氨酸 $Y=20 343.000 X-1.658 6$, $R^2=0.999 5$; 对香豆酸 $Y=9 717.100 X-2.879 4$, $R^2=0.999 0$; 结果表明, 精氨酸在 0.040~0.100 mg/mL、没食子酸在 0.002~0.014 mg/mL、果糖在 18.9~604.0 μg/mL、蔗糖在 12.1~388.0 μg/mL、缬氨酸在 0.040~12.750 μg/mL、异亮氨酸在 0.048~7.625 μg/mL、酪氨酸在 0.039~6.25 μg/mL、对香豆酸在 0.551~17.625 μg/mL 与峰面积线性关系良好。

2.4.6 精密度试验 取五汁饮供试品溶液, 分别连续测定 6 次, 计算得精氨酸、没食子酸 A 值的 RSD

分别为 0.45%、0.76%, 果糖、蔗糖、缬氨酸、异亮氨酸、酪氨酸、对香豆酸峰面积的 RSD 分别为 2.29%、2.17%、0.06%、0.08%、0.46%、2.21%, 结果表明该仪器精密度良好。

2.4.7 稳定性试验 取五汁饮供试品溶液, 分别于制备后 0、2、4、6、8 h 进行测定, 计算得精氨酸、没食子酸 A 值的 RSD 分别为 2.00%、2.46%, 果糖、蔗糖、缬氨酸、异亮氨酸、酪氨酸、对香豆酸峰面积的 RSD 分别为 4.63%、1.81%、0.34%、2.30%、0.73%、2.95%, 结果表明供试品溶液在 8 h 内稳定性良好。

2.4.8 重复性试验 取同一批次五汁饮样品, 平行制备供试品溶液 6 份, 分别进行测定, 计算得精氨酸、没食子酸 A 值的 RSD 分别为 2.95%、1.77%, 果糖、蔗糖、缬氨酸、异亮氨酸、酪氨酸、对香豆酸峰面积的 RSD 分别为 0.59%、2.26%、0.11%、4.30%、0.38%、2.49%, 结果表明该方法重复性良好。

2.4.9 加样回收率试验 取重复性试验同一批次样品 6 份, 分别加入与样品中各指标含量接近 1:1 的各对照品溶液, 分别制备供试品溶液并进行测定, 计算各对照品的加样回收率, 结果供试品溶液中精氨酸、没食子酸、果糖、蔗糖、缬氨酸、异亮氨酸、酪氨酸、对香豆酸的平均加样回收率分别为 94.08%、93.51%、86.55%、75.05%、76.87%、117.93%、90.49%、95.76%, RSD 分别为 2.71%、2.79%、5.39%、4.55%、2.94%、1.44%、5.89%、2.92%, 基本符合试验要求。

2.4.10 含量测定结果与分析 褐变前后关键差异化合物含量测定结果 (表 3) 表明, T1 样品中果糖、蔗糖及缬氨酸、异亮氨酸、酪氨酸、对香豆酸的质量浓度分别为 67.27、28.85 mg/mL 及 350.85、28.56、12.90、1.59 μg/mL; T2 样品中蔗糖未检出, 其余 5 种成分的质量浓度分别降至 23.98 mg/mL 及 99.72、12.13、5.82、1.23 μg/mL, 表明褐变后五汁饮药效组分含量显著降低。

表 3 褐变前后关键差异化合物含量 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Contents of key differential compounds before and after browning ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	$D-(+)$ -果糖/ (mg·mL ⁻¹)	蔗糖/ (mg·mL ⁻¹)	$D-(-)$ -缬氨酸/ (μg·mL ⁻¹)	异亮氨酸/ (μg·mL ⁻¹)	酪氨酸/ (μg·mL ⁻¹)	对香豆酸/ (μg·mL ⁻¹)
T ₁	67.27±8.21	28.85±2.70	350.85±30.76	28.56±0.87	12.90±1.09	1.59±0.09
T ₂	23.98±1.49*	未检出	99.72±1.78**	12.13±1.01**	5.82±0.40*	1.23±0.08**

与 T₁ 组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ 。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs T₁ group.

对非靶向代谢组学筛选的 6 种关键差异化合物进行定量检测, 结果(表 3)显示, 褐变后果糖含量下降 64.35%, 蔗糖降低至未检出水平(低于定量限), 缬氨酸、异亮氨酸、酪氨酸及对香豆酸含量均显著下降($P < 0.05$ 、 0.01), 绝对定量结果与 UPLC-MS 非靶向代谢组学的定性趋势基本一致。

2.5 五汁饮褐变色素的分离与鉴定研究

2.5.1 色素样品的制备 取规格为 150 mg/6cc 的 Spe-Pak 柱, 依次加入 6 mL 甲醇、纯化水活化并润湿。取 20 mL T₂ 样品涡旋混匀, 以 1.0 mL/min 体积流量缓慢上样后, 加入 6 mL 2% 甲酸水溶液淋洗, 最后加入 6 mL 甲醇溶液以 1 mL/min 流速洗脱并收集, 经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 即得。

2.5.2 UPLC-MS 分析条件

(1) 色谱条件: 色谱柱为 Acquity UPLC[®] CSH[™] C₁₈ 柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m); 流动相为 0.02 mol/L 乙酸铵水溶液-甲醇, 洗脱程序: 0~0.2 min, 3%~15% 甲醇; 0.2~8.0 min, 15%~25% 甲醇; 8.0~15.0 min, 25%~45% 甲醇; 15.0~20.0 min, 45%~60% 甲醇; 20.0~25.0 min, 60%~85% 甲醇; 25.0~35.0 min, 85%~95% 甲醇; 35.0~45.0 min, 95%~3% 甲醇; 45.0~47.5 min, 3% 甲醇; 体积流量 0.2 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 进样量 0.3 μ L。

(2) 质谱条件: 同“2.3.1”项。

2.5.3 数据的采集与统计学分析 将质谱原始数据导入 UNIFI 数据系统与五汁饮褐变相关化合物成分自建库进行匹配, 并结合相应文献分析, 鉴定色素化合物。

2.5.4 褐变色素中关键中间体的鉴定结果 洗脱色素定性鉴定结果见图 6。Spe-Pak 分离结合 UPLC-MS 鉴定出保留时间为 5.97 min 的核心褐变中间体 2-羟基-3-甲基-2-环戊烯-1-酮, 该化合物为缬氨酸与果

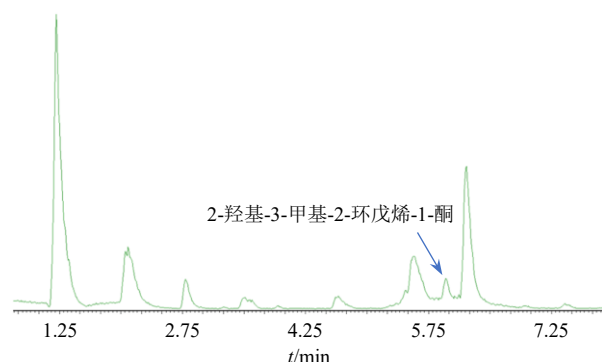


图 6 褐变色素样品 BPC 图

Fig. 6 BPC diagram of browning pigment sample

糖发生 Strecker 降解的典型产物, 是美拉德反应的特征性标记物; 同时检测到 2-乙酰基呋喃、葡萄糖酮、5-甲基糠醛等糖酸水解降解产物, 表明蔗糖/果糖在弱酸性条件下发生了酸催化降解; 此外还检测到对香豆酸的氧化产物 6-甲氧基-7-羟基香豆素, 证实酚类氧化交联途径的存在^[23-25]。

2.6 抗褐变五汁饮的制备

根据本课题组前期已完成五汁饮抗褐变制备工艺, 并制备合格产品, 其具体制备方法: 取梨 700 g、荸荠 300 g、莲藕 200 g, 榨汁、滤过、离心, 上清液备用, 另取芦根 80 g、麦冬 50 g, 加 8 倍量水浸泡 0.5 h, 煎煮 90 min, 滤过 3 次, 合并滤液并浓缩, 备用。将果蔬汁上清液与浓缩液合并, 加入 0.75% 柠檬酸、0.34% D-异抗坏血酸钠及 0.015% 植酸, 搅匀, 静置, 加入 0.23% 果胶酶, 55 $^{\circ}$ C 酶解 2.25 h, 滤过。加入 0.15% 甜菊糖苷及 0.05% 山梨酸钾, 用 20% 氢氧化钠调 pH 值至 5.5~6.0, 加水至 1 000 mL, 搅匀、静置、滤过, 灭菌, 即得。

2.7 五汁饮胃保护作用

2.7.1 动物分组、给药及造模 48 只小鼠随机分为 6 组: 正常组、模型组、奥美拉唑组 (8 mg/kg) 及五汁饮低、中、高剂量组。参照《中国药典》2025 年版第一部成方制剂“用法与用量”项下及由魏伟主编的《药理试验方法学》第四版中有关规定进行换算, 得五汁饮低、中、高剂量分别为 10.93、21.86、43.72 g/kg。连续 ig 给药 13 d, 末次给药后禁食 24 h、禁水 2 h, 除正常组外, 各组 ig 无水乙醇 (0.01 mL/g) 诱导急性胃损伤。造模后处死小鼠, 收集血液样本和胃组织, 于 -80 $^{\circ}$ C 备用。

2.7.2 脏器指数、溃疡指数 (ulcer index, UI) 及溃疡抑制率的计算 滤纸吸干胃组织表面的水分, 精密称取胃质量, 计算胃组织系数, 参照 Guth 标准对 UI 进行计分 (完整黏膜, 计 0 分; 黏膜水肿及小圆点型出血糜烂 < 1 mm, 计 1 分; 黏膜充血水肿及条状出血糜烂, 计 2 分; 1 mm $\leq$ 损伤长度 < 2 mm, 计 3 分; 2 mm $\leq$ 损伤长度 ≤ 3 mm, 计 4 分; > 3 mm, 计 5 分)。按照双盲法计算每组小鼠的平均 UI, 并根据公式 (7) 计算溃疡抑制率。其中, UI_{模型} 为模型组的平均 UI, UI_{治疗} 为治疗组的平均 UI。

$$\text{组织系数} = \text{脏器质量} / \text{体质量} \quad (6)$$

$$\text{溃疡抑制率} = (\text{UI}_{\text{模型}} - \text{UI}_{\text{治疗}}) / \text{UI}_{\text{模型}} \quad (7)$$

各组小鼠胃组织解剖病理结果 (图 7 和表 4) 表明, 与模型组相比, 五汁饮各剂量组及奥美拉唑

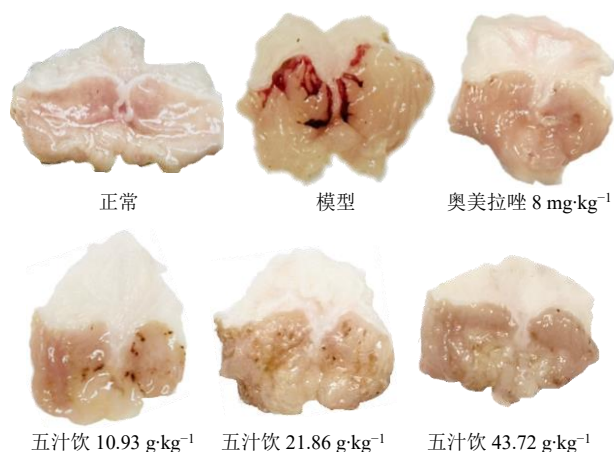


图 7 急性胃黏膜损伤的宏观评估

Fig. 7 Macroscopic evaluation of acute gastric mucosal injury

表 4 各组小鼠溃疡抑制率 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)Table 4 Ulcer inhibition rate of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	UI	溃疡抑制率/%
正常	—	0	—
模型	—	37.88 ± 2.80*	—
奥美拉唑	0.008	15.00 ± 2.50 [#]	60.40
五汁饮	10.93	16.38 ± 8.44 [#]	56.77
	21.86	11.13 ± 1.36 [#]	70.63
	43.72	10.44 ± 3.77 [#]	72.42

与正常组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$; 下表同。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs normal group; [#] $P < 0.05$

^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs model group; same as below tables.

组 UI 均显著降低 ($P < 0.05$), 其中五汁饮中、高剂量组抑制率分别为 70.63% 和 72.42%。

2.7.3 胃组织切片染色分析 将小鼠胃组织固定于 4% 多聚甲醛溶液中, 经脱水、石蜡包埋、切片后进行苏木精-伊红 (HE) 及高碘酸希夫染色 (PAS) 染色。于光学显微镜下观察胃黏膜病理改变及黏液分泌情况。HE 染色结果 (图 8) 显示, 模型组胃黏膜层大面积充血、上皮细胞脱落坏死、炎症浸润; 五汁饮给药组胃组织水肿及充血显著减轻, 黏膜结构趋于完整。PAS 染色结果 (图 9) 显示, 五汁饮可增加胃黏膜糖蛋白分泌, 增厚黏液层。

2.7.4 小鼠胃组织生化指标检测 取小鼠血清及胃组织样本, 采用 ELISA 法检测血清 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 及胃组织匀浆中丙二醛、SOD、NO、PGE₂、NF- κ B、CAT、GSH、TFF2 水平, 严格按试剂盒说明书操作。对各组小鼠胃组织中的 SOD、GSH、丙

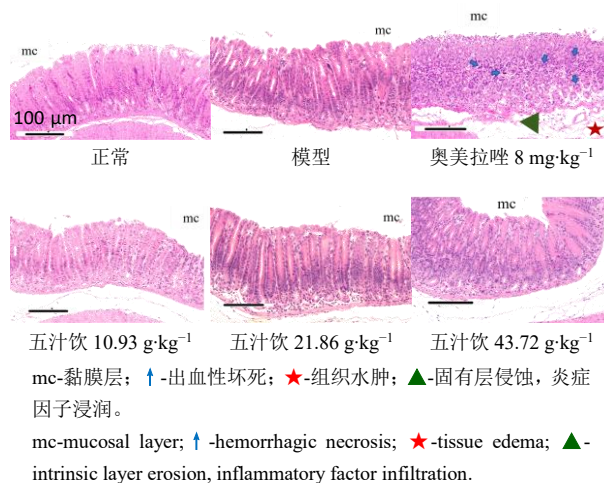


图 8 急性酒精胃黏膜损伤病理切片图 (HE 染色, ×15)

Fig. 8 Pathological section of acute alcohol induced gastric mucosal injury (HE staining, ×15)

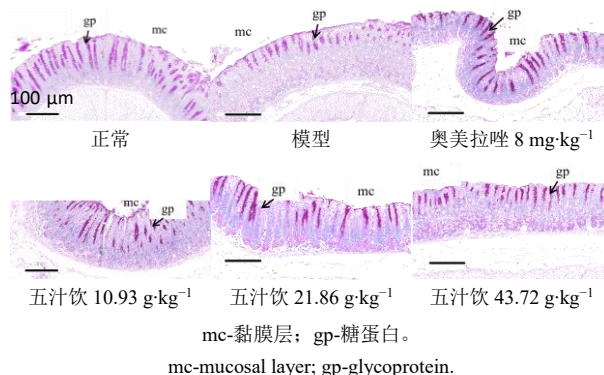


图 9 急性酒精胃黏膜损伤的染色微观图 (PAS 染色, ×15)

Fig. 9 Pathological section of acute alcohol induced gastric mucosal injury (PAS staining, ×15)

二醛、CAT 水平进行检测, 结果见表 5。与模型组相比, 五汁饮高剂量组 SOD 和丙二醛显著降低, CAT、GSH 水平升高, 机体抗氧化综合能力 (SOD/丙二醛) 提升。表明五汁饮可显著调节体内氧化应激因子水平, 促使机体回复正常水平, 其高剂量组与阳性药 OME 效果相当。

ELISA 实验结果见表 6, 与模型组相比, 五汁饮各剂量组及奥美拉唑组血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 及胃组织中 NF- κ B 水平均显著下降 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 表明五汁饮口服液可明显降低小鼠血清中炎症因子水平, 对无水乙醇所致炎症损伤具有良好预防作用。对各组小鼠胃组织中的 NO、PGE₂、TFF2 水平进行检测, 结果见表 7。与模型组相比, 五汁饮高剂量组胃组织中 NO、PGE₂、TFF2 水平明显降低 ($P < 0.001$), 表明五汁饮口服液对 NO 途径失常调节最优, 其可有效保护胃黏膜组织。

表 5 五汁饮对急性酒精胃黏膜损伤小鼠胃组织氧化应激水平影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 5 Effects of Wuzhiyin on oxidative stress levels in gastric tissue of mice with acute alcohol induced gastric mucosal injury ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)	丙二醛/(nmol·mg ⁻¹)	CAT/(U·mg ⁻¹)	GSH/(μmol·g ⁻¹)	SOD/丙二醛
正常	—	231.01 ± 17.31	0.83 ± 0.14	28.65 ± 5.60	1.30 ± 0.23	286.46 ± 39.55
模型	—	284.65 ± 16.58***	1.29 ± 0.22**	26.01 ± 5.85	0.97 ± 0.23*	220.85 ± 33.61*
奥美拉唑	0.008	252.30 ± 31.55##	1.12 ± 0.29	26.79 ± 5.13	1.25 ± 0.27#	255.92 ± 71.91
五汁饮	10.93	276.69 ± 16.45	1.19 ± 0.23	27.27 ± 4.75	1.10 ± 0.22	224.38 ± 31.37
	21.86	264.40 ± 24.26	1.26 ± 0.27	28.07 ± 2.97	1.23 ± 0.18	240.44 ± 53.25
	43.72	247.05 ± 8.30###	0.99 ± 0.20#	27.68 ± 3.30	1.28 ± 0.27#	266.51 ± 71.95

表 6 五汁饮对急性酒精胃黏膜损伤小鼠血清炎症因子水平影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 6 Effects of Wuzhiyin on serum inflammatory factor levels in mice with acute alcohol induced gastric mucosal injury ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	IL-1β/(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	TNF-α/(pg·mL ⁻¹)	NF-κB/(pg·mL ⁻¹)
正常	—	61.61 ± 5.81	94.82 ± 6.06	505.68 ± 24.60	882.52 ± 75.41
模型	—	114.79 ± 5.51	184.94 ± 12.19	1 015.71 ± 27.98	1 759.07 ± 67.59
奥美拉唑	0.008	74.11 ± 4.44###	107.27 ± 6.32###	598.81 ± 39.55###	1 073.99 ± 84.94###
五汁饮	10.93	108.06 ± 4.44#	153.62 ± 7.19###	906.29 ± 43.23###	1 595.96 ± 79.59##
	21.86	92.30 ± 6.65###	139.59 ± 6.72###	798.17 ± 36.00###	1 405.95 ± 56.97###
	43.72	83.22 ± 4.87###	128.38 ± 5.29###	706.23 ± 49.49###	1 216.92 ± 43.10###

表 7 五汁饮对急性酒精胃黏膜损伤小鼠胃组织炎症介质 NO、PGE₂ 及黏膜保护因子水平 TFF2 以及 NF-κB p65、Caspase-3 平均 A 值的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 7 Effects of Wuzhiyin on inflammatory mediators NO, PGE₂ and mucosal protective factor TFF2, and average optical density (A) of NF-κB p65, Caspase-3 in gastric tissue of mice with acute alcohol-induced gastric mucosal injury ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	NO/(μmol·g ⁻¹)	PGE ₂ /(pg·mL ⁻¹)	TFF2/(ng·mL ⁻¹)	平均A值	
					NF-κB p65	Caspase-3
正常	—	0.10 ± 0.03	630.11 ± 20.43	5.99 ± 0.34	0.269 ± 0.053	0.218 ± 0.039
模型	—	0.21 ± 0.04	1 227.64 ± 46.65	11.11 ± 0.35	0.338 ± 0.020*	0.316 ± 0.017**
奥美拉唑	0.008	0.15 ± 0.05#	731.60 ± 38.09###	7.25 ± 0.36###	0.288 ± 0.011	0.227 ± 0.012##
五汁饮	10.93	0.17 ± 0.06	1 104.45 ± 41.28###	10.63 ± 0.50	0.315 ± 0.020	0.253 ± 0.041#
	21.86	0.15 ± 0.05#	917.59 ± 45.87###	8.84 ± 0.39###	0.318 ± 0.014	0.240 ± 0.023#
	43.72	0.11 ± 0.04###	845.98 ± 61.51###	8.28 ± 0.35###	0.293 ± 0.018	0.225 ± 0.010##

2.7.5 胃组织免疫组织化学分析 取 4%多聚甲醛固定胃组织,经脱水、透明、包埋、切片、抗原修复、一抗二抗反应、血清封闭、DAB 染色、光学树脂封片后,经光学显微镜观察并拍照,采用 Image J 软件对 NF-κB p65、Caspase-3 阳性表达细胞进行定量分析。免疫组化分析结果(表 7 和图 10)表明,模型组中 Caspase-3、NF-κB p65 阳性表达显著增加($P < 0.05, 0.01$),分别约为正常组的 1.45、1.25 倍,五汁饮高剂量组可抑制 Caspase-3、NF-κB p65 表达。

2.8 统计分析

药理实验数据采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析,Origin 2019 进行可视化处理。计量资料采用

ANOVA 单因素方差分析,比较组间差异。若基本符合正态性分布的数据,则按照方差齐否,分别采用 LSD、Dunnett T3 分析;若数据不符合正态分布,则进行非参数 Kruskal-Wallis 检验。

3 讨论

本实验系统解析了五汁饮的非酶褐变机制,确证果糖、蔗糖、缬氨酸、异亮氨酸、酪氨酸及对香豆酸为关键驱动因子,2-羟基-3-甲基-2-环戊烯-1-酮为核心褐变中间体,褐变由美拉德反应、酸催化糖降解及酚类氧化交联 3 条途径协同驱动。研究表明,经抗褐变工艺制备的五汁饮在乙醇致急性胃黏膜损伤小鼠模型中,能显著降低 UI、减轻黏膜出血,表

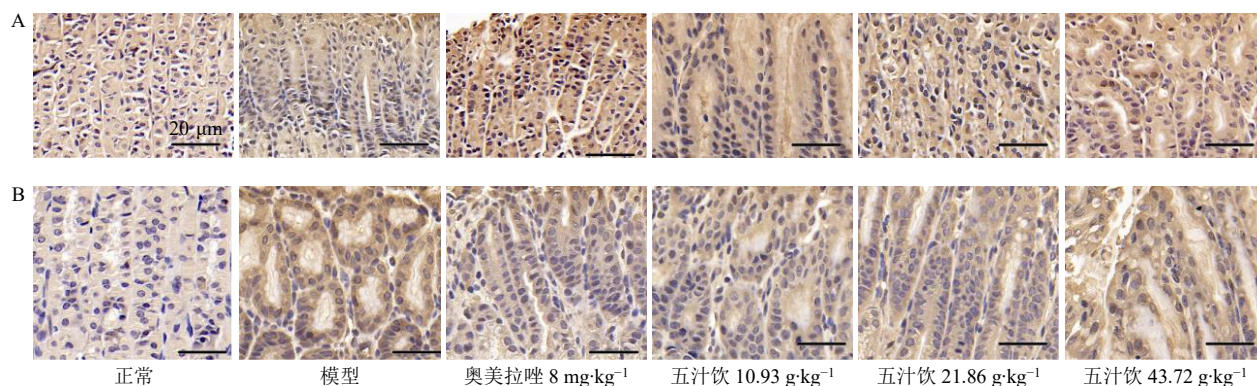


图 10 小鼠胃组织中 NF- κ B p65 (A) 和 Caspase-3 (B) 阳性细胞表达水平

Fig. 10 Expression levels of NF- κ B p65 (A) and Caspase-3 (B) positive cells in mouse gastric tissue

现出明确的胃保护作用，其药效与阳性对照药奥美拉唑具有可比性。然而，抗褐变工艺是否通过抑制褐变反应从而有效“保留”了五汁饮的胃保护生物活性，尚需通过抗褐变样品与原工艺样品的直接药效对比实验进一步验证。

综上，本实验不仅为提升五汁饮的品质提供了科学依据，为同类药食同源液体产品的褐变控制与功能评价提供了方法学参考。

3.1 五汁饮褐变的化学本质与关键驱动因子

本实验首先对褐变前后的五汁饮进行了系统的差异分析。发现褐变导致总多酚、总多糖及总氨基酸含量显著下降。通过非靶向代谢组学筛选鉴定出 19 种关键差异化合物，其中果糖、蔗糖、缬氨酸、异亮氨酸、酪氨酸及对香豆酸为主要损耗物质。进一步结合 Spe-Pak 分离鉴定出的特征中间体（2-羟基-3-甲基-2-环戊烯-1-酮、2-乙酰基呋喃、5-甲基糠醛），归纳出 3 条主要褐变途径：（1）美拉德反应：果糖与缬氨酸/异亮氨酸发生 Strecker 降解，生成羟基酮类中间体，进而聚合为类黑精色素^[26-27]，本实验在褐变色素中鉴定出的 2-羟基-3-甲基-2-环戊烯-1-酮正是该途径的特征性中间体，其生成直接证实了美拉德反应在五汁饮褐变中的主导地位。（2）酸催化糖降解：蔗糖在弱酸性条件下水解为果糖和葡萄糖，果糖更易脱水生成 5-HMF 及呋喃类化合物^[28-31]，色素样品中检测到的 2-乙酰基呋喃、glucosone 及 5-甲基糠醛等小分子降解产物证实该途径的存在。值得注意的是，蔗糖在褐变样品中完全损耗（含量低于定量限），果糖含量下降 64.35%，提示糖类的酸催化降解是五汁饮褐变中物质损耗最为显著的途径。（3）酚类氧化交联：酪氨酸及对香豆酸被氧化为醌类，进而交联聚合生成棕色色素^[32]，

色素样品中检测到的 6-甲氧基-7-羟基香豆素等对香豆酸氧化产物为该途径提供了直接证据。3 条途径并非独立进行——美拉德反应生成的 α -二羰基化合物可促进酚类氧化，而酚类氧化产物亦可与氨基酸侧链发生共价交联，形成协同放大的复杂褐变网络。此外，上述 6 种关键差异化合物（果糖、蔗糖、缬氨酸、异亮氨酸、酪氨酸及对香豆酸）不仅为褐变机制解析提供了物质基础，亦具备成为五汁饮潜在质量标志物的条件，其与药效活性直接相关，且定量方法可靠，后续可进一步建立以这 6 种成分为核心的多指标质控标准，为五汁饮及其同类产品的质量标准的制定提供依据。

3.2 机制解析对药食同源产品品质提升的启示

褐变不仅影响产品外观，导致多酚、多糖、氨基酸等活性成分的显著损耗。本实验发现，褐变后果糖含量下降 64.35%，蔗糖完全损耗，缬氨酸、酪氨酸等氨基酸含量下降 70% 以上，这些成分正是五汁饮发挥抗炎、抗氧化及黏膜保护作用的物质基础。由此可见，褐变并非单纯的“变色”问题，而是关乎产品功效的“质变”问题，药食同源产品的稳定性研究应关注活性成分的保留与功效的维持，而非仅关注感官指标。

3.3 抗褐变工艺制备的五汁饮胃保护功能及其意义

课题组前期研究的抗褐变工艺制备的五汁饮在酒精性胃损伤模型中显示出显著的胃保护作用，高剂量组溃疡抑制率超过 70%，效果与阳性对照奥美拉唑相当。进一步的机制检测发现，五汁饮可抑制 NF- κ B p65 活化及 Caspase-3 表达，降低血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平，调节胃组织 SOD/丙二醛值及 NO、PGE₂、TFF2 等黏膜保护因子^[33-38]。上述结果表明，抗褐变工艺制备的五汁饮在本实验条件下

对酒精性胃损伤具有显著的保护作用,但本实验尚存在一定局限性,褐变是否直接导致胃保护功能减退有待 T₁ 与 T₂ 直接药效对比实验验证;五汁饮中发挥核心作用的活性物质群(多酚类、多糖类或皂苷类)及肠道菌群等间接机制亦需进一步研究;对各关键化合物在褐变过程中的多时间点动态消耗规律及完整演化路径亟待明确,上述局限将为后续的系统性研究指明方向。从大健康产业的角度看,开发安全、稳定、有效的药食同源产品具有重要的社会意义和产业价值。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Yang M, Lee U, Cho H R, *et al.* Effects of pear extracts on microbiome and immunocytokines to alleviate air pollution-related respiratory hypersensitivity [J]. *J Med Food*, 2023, 26(3): 211-214.
- [2] Khan A, Kashtoh H, Rauf A, *et al.* Muscle relaxant and antipyretic effects of pentacyclic triterpenes isolated from the roots of *Diospyros lotus* L. [J]. *Heliyon*, 2024, 10(9): e30547.
- [3] Abdelazeez W M A, Maaty D A M, El-Swaify Z A, *et al.* *In vitro* true root cultures of *Lotus hebranicus* Hochst. ex Brand: Profiling of secondary metabolites and plausible *in vivo* gastroprotective effect [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult PCTOC*, 2024, 156(3): 93.
- [4] Zhi Y, Xie S S, Shao C M, *et al.* A web-based pharmacological approach to the mechanism of action of *Rhizoma Phragmitis* and *Rhizoma Curcumae* in the treatment of chronic atrophic gastritis [J]. *Contrast Media Mol Imaging*, 2022, 2022: 3483774.
- [5] 周昀璐, 李荣群. 五汁饮临床应用及现代研究进展 [J]. *新中医*, 2023, 55(23): 30-34.
- [6] 周玮玲, 李林致, 吴佳颖, 等. 基于网络药理学探究五汁饮对 2 型糖尿病的治疗作用 [J]. *中药与临床*, 2024, 15(2): 50-55.
- [7] 叶倩倩, 朱万鸿, 王宇晴, 等. 古方五汁饮的组方应用研究 [J]. *中国民族民间医药*, 2022, 31(5): 68-70.
- [8] Silva F V M, Sulaiman A. Control of enzymatic browning in strawberry, apple, and pear by physical food preservation methods: Comparing ultrasound and high-pressure inactivation of polyphenoloxidase [J]. *Foods*, 2022, 11(13): 1942.
- [9] Long P P, Su S X, Wen M C, *et al.* Novel pink pigments produced by thermal interaction of theaflavins, theanine, and glucose: Color formation, isolation, and structural characterization [J]. *J Agric Food Chem*, 2024, 72(40): 22303-22315.
- [10] Pihen C, López-Malo A, Ramírez-Corona N. Effect of UV LED and pulsed light treatments on polyphenol oxidase activity and *Escherichia coli* inactivation in apple juice [J]. *J Agric Food Chem*, 2024, 72(25): 14294-14301.
- [11] 王雪雪, 尹爱武, 陶柱萍, 等. 中草药抗酒精性胃损伤活性成分及其作用机制研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(20): 4836-4845.
- [12] Li C P, Duan S S, Li Y P, *et al.* Polysaccharides in natural products that repair the damage to intestinal mucosa caused by cyclophosphamide and their mechanisms: A review [J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 261: 117876.
- [13] 饶智. 药膳五汁饮对化学性肝损伤具有辅助保护作用的活性部位及成分研究 [D]. 湖南: 湖南中医药大学, 2022.
- [14] Aziz R S, Siddiqua A, Shahzad M, *et al.* Oxyresveratrol ameliorates ethanol-induced gastric ulcer via downregulation of IL-6, TNF- α , NF- κ B, and COX-2 levels, and upregulation of TFF-2 levels [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 110: 554-560.
- [15] 张林丽, 田书婷, 刘芮希, 等. 乙醇诱导胃黏膜损伤模型小鼠胃干细胞的分化作用研究 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2025, 39(6): 444-452.
- [16] Li Y F, Chen T, Chen L H, *et al.* Construction of diallyltrisulfide nanoparticles for alleviation of ethanol-induced acute gastric injury [J]. *Int J Pharm*, 2024, 657: 124143.
- [17] Li Y F, Zhu B W, Chen T, *et al.* Construction of magnolol nanoparticles for alleviation of ethanol-induced acute gastric injury [J]. *J Agric Food Chem*, 2024, 72(14): 7933-7942.
- [18] 范玥宁, 丁艺娴, 王振猛. 喝酒伤胃吗?浅谈酒精和胃癌的关系 [J]. *科学生活*, 2025(6): 104-105.
- [19] 周玮玲, 李燕燕, 邱菁, 等. 五汁饮褐变抑制工艺优化 [J]. *中成药*, 2024, 46(2): 410-417.
- [20] 中国药典 [S]. 四部. 2025: 163.
- [21] 杨立国, 萨如拉, 包文龙. 青黛化学成分、药理作用、临床应用及不良反应研究进展 [J]. *中草药*, 2026, 57(16): 6601-6615.
- [22] 张娜, 伍振峰, 曹萱, 等. 结合灰色关联度优化鲜竹沥总酚酸的纯化工艺及其体外活性分析 [J/OL]. *世界中医药*, (2026-09-01) [2026-09-02]. <https://link.cnki.net/urlid/11.5529.R.20260901.0847.004>.
- [23] Wang H P, Iqbal A, Murtaza A, *et al.* A review of discoloration in fruits and vegetables: Formation mechanisms and inhibition [J]. *Food Rev Int*, 2023, 39(9): 6478-6499.
- [24] Jiang S, Penner M H. The effect of *p*-coumaric acid on

- browning inhibition in potato polyphenol oxidase-catalyzed reaction mixtures [J]. *Foods*, 2022, 11(4): 577.
- [25] Pham H T T, Bazmawe M, Kebede B, *et al.* Changes in the soluble and insoluble compounds of shelf-stable orange juice in relation to non-enzymatic browning during storage [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(46): 12854-12862.
- [26] 高昀, 王淑敏, 李洪亮, 等. 常规乳美拉德褐变抑制研究进展及在乳糖水解乳中应用可行性探讨 [J]. 食品科学, 2026, 47(7): 394-405.
- [27] Şen D, Gökmen V. Kinetic modeling of Maillard and caramelization reactions in sucrose-rich and low moisture foods applied for roasted nuts and seeds [J]. *Food Chem*, 2022, 395: 133583.
- [28] Pham H T T, Kityo P, Buvé C, *et al.* Influence of pH and composition on nonenzymatic browning of shelf-stable orange juice during storage [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(19): 5402-5411.
- [29] Lwin H P, Leisso R S, Lee J. Pre-storage temperature conditioning reduces cortex browning and cavity and alters organic, amino, and fatty acid metabolism in cold-stored 'Chuhwangbae' pears [J]. *Sci Hortic*, 2023, 315: 111989.
- [30] Liu P, Xu N, Liu R F, *et al.* Exogenous proline treatment inhibiting enzymatic browning of fresh-cut potatoes during cold storage [J]. *Postharvest Biol Technol*, 2022, 184: 111754.
- [31] Meng Z, Wang T, Malik A U, *et al.* Exogenous isoleucine can confer browning resistance on fresh-cut potato by suppressing polyphenol oxidase activity and improving the antioxidant capacity [J]. *Postharvest Biol Technol*, 2022, 184: 111772.
- [32] 苏艳丽, 高晓铭, 杨健, 等. 梨果实发育过程中褐变度、酚类物质及相关酶的变化研究 [J]. 园艺学报, 2022, 49(11): 2304-2312.
- [33] 陈皖倩, 康朝霞, 崔冬梅. 促肾上腺皮质激素释放因子及其相关肽在胃肠道疾病中的研究进展 [J]. 中国现代医生, 2025, 63(11): 101-105.
- [34] 张帅, 高媛, 杨杨, 等. 多糖的生物活性及其对胃肠道功能的影响 [J]. 中国食品学报, 2024, 24(10): 438-448.
- [35] Jia J H, Zhao H J, Li F F, *et al.* Research on drug treatment and the novel signaling pathway of chronic atrophic gastritis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 176: 116912.
- [36] Wang R X, Zhao Y D, Zhou L, *et al.* Costunolide ameliorates MNNG-induced chronic atrophic gastritis through inhibiting oxidative stress and DNA damage via activation of Nrf2 [J]. *Phytomedicine*, 2024, 130: 155581.
- [37] Lin K W, Wang Z T, Wang E H, *et al.* Targeting TRPV1 signaling: Galangin improves ethanol-induced gastric mucosal injury [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 335: 118605.
- [38] Ahmed B, Jiang C C, Huang K X, *et al.* Explore dual anti-inflammatory and cell protective mechanisms the mechanism of Jianwei Yuyang Tablet in the treatment of alcohol-induced gastric ulcers via bioinformatics and experimental validation [J]. *Phytomedicine*, 2025, 144: 156936.

[责任编辑 郑礼胜]