

基于“谱-效”关系筛选蓝莓发酵酒中诱导腹泻的关键多酚类化合物

刘宝婷¹, 丁昱文², 刘慧¹, 李霄¹, 程迎新¹, 卢聪然¹, 余强^{1*}

(1. 南昌大学食品科学与资源挖掘全国重点实验室, 江西南昌 330047)

(2. 贵州茅台(集团)生态农业产业发展有限公司, 贵州丹寨 557500)

摘要: 为探究蓝莓发酵酒中诱导腹泻的关键多酚类物质, 该研究比较了不同剂量蓝莓发酵酒诱导的腹泻效应, 选取了八种大孔吸附树脂不同程度降低酒中的多酚类物质, 建立了多酚组分的 DAD 色谱图, 评价了多酚含量降低后小鼠的腹泻效应, 并进一步通过灰度关联分析、正交偏最小二乘法分析和斯皮尔曼相关性分析构建了“谱-效”关系。结果表明, 以 $30 \mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ 灌胃浓缩 3 倍的蓝莓发酵酒会诱发小鼠腹泻。各树脂对蓝莓发酵酒中鉴定出的 50 种多酚类物质 (包括 21 种酚酸、26 种黄酮和 3 种其他多酚) 均有较好的吸附效果, 其中 NKA-II 型效果最明显, 绿原酸相对含量下降了 13.79%。多酚含量降低后, 小鼠腹泻指数可降低 58.38%、肠道蠕动速率可减缓 32.74%、肠道组织损伤明显减轻、血清中二胺氧化酶活性可降低 30.84% 且电解质水平显著上升 ($P<0.05$)。通过“谱-效”关系发现绿原酸 (P8) 与小鼠腹泻效应密切相关, 因此确定绿原酸是蓝莓发酵酒中诱导小鼠腹泻的关键多酚类物质。该研究可为蓝莓发酵酒质量控制提供新的依据。

关键词: 蓝莓发酵酒; 腹泻; 多酚; “谱-效”关系

文章编号: 1673-9078(2026)05-13-28

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.5.0297

Screening of Key Polyphenolic Compounds Responsible for Diarrhea Induction in Fermented Blueberry Wine Based on the Spectrum-effect Relationships

LIU Baoting¹, DING Yuwen², LIU Hui¹, LI Xiao¹, CHENG Yingxin¹, LU Congran¹, YU Qiang^{1*}

(1.State Key Laboratory of Food Science and Resources, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

(2.Guizhou Moutai (Group) Ecological Agriculture Industry Development Co. Ltd., Danzhai 557500, China)

Abstract: The polyphenolic compounds in fermented blueberry wine responsible for diarrhea induction were identified using a spectrum-effect relationship approach. Diarrhea-inducing effects of different doses of fermented blueberry wine were evaluated in mice. Eight types of macroporous adsorption resins were used to selectively remove polyphenols to varying extents, and changes in polyphenolic profiles were characterized using high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection (HPLC-DAD). The effects of polyphenol depletion on diarrhea-related indicators were assessed, and spectrum-effect relationships were analyzed using grey relational analysis, orthogonal partial least squares analysis, and Spearman rank correlation analysis. The results showed that gavage administration of a threefold concentrated fermented blueberry wine at a dose of $30 \mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ induced diarrhea in

引文格式:

刘宝婷, 丁昱文, 刘慧, 等. 基于“谱-效”关系筛选蓝莓发酵酒中诱导腹泻的关键多酚类化合物[J]. 现代食品科技, 2026, 42(5): 13-28.

LIU Baoting, DING Yuwen, LIU Hui, et al. Screening of key polyphenolic compounds responsible for diarrhea induction in fermented blueberry wine based on the spectrum-effect relationships [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(5): 13-28.

收稿日期: 2025-03-04; 修回日期: 2025-05-10; 接受日期: 2025-05-12

基金项目: 江西省重点研发计划项目 (20232BBF60026)

作者简介: 刘宝婷 (2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学, E-mail: 1501466646@qq.com

通讯作者: 余强 (1986-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品功能组分的活性及机制、功能食品研究与开发, E-mail: yuqiang8612@163.com

mice. A total of 50 polyphenolic compounds were identified, including 21 phenolic acids, 26 flavonoids, and 3 other polyphenols. Among the tested resins, NKA-II showed the highest adsorption efficiency, reducing the relative content of chlorogenic acid by 13.79%. After polyphenol removal, the diarrhea index decreased by 58.38%, intestinal propulsion was reduced by 32.74%, intestinal tissue damage was significantly alleviated, serum diamine oxidase activity decreased by 30.84%, and electrolyte imbalance was markedly improved ($P<0.05$). Spectrum–effect relationship analysis revealed a strong correlation between chlorogenic acid (P8) and diarrhea induction. Overall, chlorogenic acid was identified as the key polyphenolic compound responsible for diarrhea induction in fermented blueberry wine. These findings provide a scientific basis for quality control and safety evaluation of fermented blueberry wine.

Key words: fermented blueberry wine; diarrhea; polyphenols; spectrum–effect relationship

蓝莓属于杜鹃花科越橘属浆果，口感酸甜，营养丰富，被誉为“浆果之王”^[1]。由于其鲜果存在贮藏期短等问题，往往通过加工提高其经济附加值。蓝莓发酵酒（Fermented Blueberry Wine, BW）作为蓝莓的生物发酵制品，不仅保留了蓝莓浆果的多种营养成分，还通过发酵产生了一系列生物活性物质，展现出了不菲的经济价值和健康潜力^[2]。然而有部分人群反馈在饮用蓝莓发酵酒后出现了腹泻等不良反应，这一现象与其预期的健康价值形成了矛盾，因此深入探究蓝莓发酵酒中诱导腹泻的关键化合物对于保障产品质量和消费者健康具有重要意义。

蓝莓发酵酒中含有丰富的多酚类化合物，如酚酸、黄酮等^[3]。这些多酚类物质不仅赋予蓝莓发酵酒独特的色泽和风味，还具有抗氧化、抗炎、调节肠道菌群等多种生物活性^[4]。然而，多酚类物质的结构复杂且种类繁多，其在体内的代谢过程和生理作用也存在差异。部分多酚类化合物可能通过影响肠道蠕动、肠道黏膜屏障功能或是肠道菌群平衡，从而引发肠道不适甚至腹泻。何亚伦等^[5]发现高剂量单宁酸的干预会损伤小鼠的肠道功能，破坏肠道屏障，还会影响小鼠结肠肠道菌群的多样性。明确蓝莓发酵酒中诱导腹泻的关键多酚类物质，对于规避产品不良反应风险具有重要的指导意义。

“谱–效”关系研究是一种结合物质分析与生物活性评价的系统方法，通过建立化学成分的图谱与生物效应之间的相关性，能够快速、准确地筛选出对特定生物活性具有重要贡献的关键化合物^[6]。近年来，该方法已在中药、功能性食品等领域广泛应用。Wang等^[7]通过“谱–效”关系筛选出金银花中的异绿原酸A和异绿原酸C具有保肝活性。Huang等^[8]通过“谱–效”关系筛选出木犀草素等可能是食用菊花缓解痛风的关键成分。利用“谱–效”关系筛选蓝莓发酵酒诱导腹泻的关键多酚类物质，不仅可以避免传统植化分离模式逐一筛选效应物质的繁琐过程，还能从整体上把握多酚类化合物与腹泻效应之间的内在联系，为后续的机制研究和产品改良提供科学依据。

本研究采用大孔吸附树脂结合超高效液相色谱四极杆飞行时间串联质谱技术（Ultra High Performance Liquid Chromatography-Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometry/Mass Spectrometry, UPLC-QTOF-MS/MS），构建了蓝莓发酵酒中多酚组分的二极管阵列检测（Diode Array Detector, DAD）色谱图，并评估了不同多酚含量的蓝莓发酵酒对小鼠腹泻效应的影响，通过多元统计分析筛选出了蓝莓发酵酒中潜在的诱导腹泻的关键多酚类成分。旨在为蓝莓发酵酒的肠道健康效应提供更深入的科学理解，并为蓝莓发酵酒产业的工艺优化和质量控制提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

表 1 八种大孔吸附树脂的具体参数
Table 1 Physicochemical properties of eight macroporous resins

树脂类型	粒径范围/mm	比表面积/(m ² ·g ⁻¹)	平均孔径/nm	极性
D101	0.300~1.250	550~600	9~10	非极性
AB-8	0.300~1.250	480~520	13~14	弱极性
ADS-17	0.300~1.250	90~150	25~30	中极性
HPD400	0.300~1.250	550~600	7.5~8	中极性
S-8	0.300~1.250	100~120	28~30	极性
NKA-9	0.300~1.250	500~550	10~12	极性
NKA- II	0.300~1.250	1 000~1 200	14.5~15.5	极性
ADS-7	0.315~1.250	100	25~30	双极性

蓝莓发酵酒样品为实验室自制酒精体积分数 13% 的蓝莓发酵酒。安琪葡萄酒、果酒专用酵母，安琪酵母股份有限公司；盐酸、氢氧化钠、无水乙醇（均为分析纯），西陇科学股份有限公司；甲酸，上海安谱实验科技股份有限公司；乙腈，西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公司；苯酚红、二胺氧化酶活性检测试剂盒，北京索莱宝科技有限公司；羧甲基纤维素钠（USP 级），上海阿拉丁生化科技股份有限公司；D101、AB-8、ADS-17、HPD 400、S-8、NKA-9、

NKA-II、ADS-7 大孔吸附树脂（各树脂具体参数见表 1），上海源叶生物科技有限公司；钠离子比色法测试盒、氯比色法测试盒，武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司。

1.2 实验动物

实验选用 140 只 5 周龄 SPF 级雄性 BALB/c 小鼠，体质量（ 22 ± 2 ）g，购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司，使用许可证号 SYXK（赣）2021-0004。饲养屏障温度维持在（ 25 ± 2 ）℃，屏障内相对湿度为 $50\% \pm 5\%$ ，昼夜周期为 12 h 光照和 12 h 黑暗。所有操作均按照国家卫生研究院实验动物护理和使用指南进行，并经南昌大学实验动物科学中心伦理委员会批准，动物伦理批准号：NCULAE-20221030011。

1.3 仪器与设备

UHPLC30A-Trip TOF 5600+ 型超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用仪，美国 AB SCIEX 公司；TGL 216G 型高速台式离心机，上海安亭科学仪器厂；3K15 型高速冷冻离心机，扬州曦玛离心机有限公司；RV10 digital 型旋转蒸发仪，上海沛升仪器设备有限公司；ZHWY-2102 型恒温培养振荡器，上海智诚分析仪器制造有限公司；JS-THERMO 型多功能酶标仪，美国 Thermo 公司。

1.4 实验方法

1.4.1 蓝莓发酵酒制备

选取无破损、颗粒饱满的蓝莓鲜果，人工破碎制成蓝莓汁。加入蔗糖将初始糖度调整至质量浓度为 $234 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。取 $35 \sim 38 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 的蒸馏水冷却至室温后加入蔗糖，然后加入适量酵母静置 15 min 进行活化。将活化好的酵母种子液（接种量为 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ）加入发酵罐中， $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 进行发酵，当质量稳定不变后，停止发酵。发酵结束后以 $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的转速离心 10 min 即得蓝莓发酵酒样品。

1.4.2 动物实验设计

实验一：为探究蓝莓发酵酒诱导小鼠腹泻的剂量，将小鼠随机分为 4 组（ $n=10$ ），分别为正常组（Normal Control, NC）、 $\varphi=13\%$ 酒基组（13% Alcohol, ALC）、中剂量蓝莓发酵酒组（MBW）以及高剂量蓝莓发酵酒组（HBW）。实验二：为筛选蓝莓发酵酒中致腹泻的关键多酚类化合物，将小鼠随机分为 10 组（ $n=10$ ），分别为正常组（NC）、原蓝莓发酵酒组（BW）和八种大孔吸附树脂处理组（D101 组、AB-8 组、ADS-17 组、HPD 400 组、S-8 组、NKA-9 组、NKA-II 组、ADS-7 组）。

结合《中国居民膳食指南（2022）》中规定的成年人一天饮用的酒精量^[9]，参考基于体表面积折算法的动物与人类等效剂量换算系数^[10]，换算为小鼠的灌胃剂量约为 $30 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

实验小鼠均分笼给予标准饲料适应性喂养一周，期间自由饮水进食。一周后小鼠达到性成熟阶段，每组小鼠以 $30 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ 的剂量灌胃相应物质后，单鼠单笼，观察 2 h 内每只小鼠的稀便率和稀便级，并计算腹泻指数；2 h 后，每只灌胃 $200 \mu\text{L}$ 酚红餐，30 min 后通过摘除眼球取血，采集血液并静置 2 h，以 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ， $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的转速离心 10 min，收集血清并分装。眼球取血后，小鼠采用颈椎脱臼法处死，拿针头固定在解剖台上并迅速解剖取出小肠、结肠和盲肠。

1.4.3 蓝莓发酵酒多酚谱图建立

1.4.3.1 大孔吸附树脂处理蓝莓发酵酒样的制备

将大孔吸附树脂先用无水乙醇浸泡 12 h 除去醇溶性杂质后过滤，用蒸馏水洗至无醇味；然后在 $\varphi=4\%$ 的 HCl 溶液中密闭浸泡 4 h 后过滤，用蒸馏水洗至中性；再加入 4 wt.% 的 NaOH 溶液密闭浸泡 4 h 后过滤，再用蒸馏水洗至中性；最后将活化好的树脂浸泡在无水乙醇溶液中，室温下密闭保存，留用。

取活化后的各大孔吸附树脂，以 1:20（ m/V ）的料液比加入经 $4800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后的蓝莓发酵酒中，再置于 $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床中，以 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的转速吸附 12 h。吸附后的蓝莓发酵酒在 $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $60 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速下通过旋转蒸发浓缩，得到浓缩 3 倍的经各大孔吸附树脂处理后的蓝莓发酵酒样。

1.4.3.2 UPLC-QTOF-MS/MS 条件

取上述酒样稀释 5 倍后，以 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ， $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速离心 10 min，取上清过 $0.22 \mu\text{m}$ 有机系滤膜，待用。参考 Sun 等^[11]的方法，使用 UHPLC30A 系统对蓝莓发酵酒中的多酚类物质进行定性分析。选用依利特 Supersil ODS2 色谱柱（ $2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$ ， $1.8 \mu\text{m}$ ）进行超高效液相色谱分离。柱温 $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ，进样量 $5 \mu\text{L}$ ，流量 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ，检测器为 DAD。流动相为 0.1% 甲酸水（A）和 0.1% 甲酸乙腈（B），梯度洗脱程序为：5%~45% B（0~15 min），45%~95% B（15~17 min），95%~95% B（17~18 min），95%~5% B（18~18.1 min），5%~5% B（18.1~22 min）。DAD 检测波长为 280 nm，在扫描范围为 $100 \sim 1000 \text{ m/z}$ （MS 模式），质量范围为 $50 \sim 1000 \text{ m/z}$ （ MS^2 模式）的负离子模式下获取 ESI-MS 质谱图。操作参数：毛细管电压为 4.5 kV，雾化气体压力为 344.74 kPa，气帘气体压力为 193.05 kPa，离子源温度为 $550 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ，碰撞能量为（ -40 ± 20 ）V，去

簇电压为-60 V。根据已知标准、公开的数据和在线数据库进行定性。

1.4.4 腹泻效应评价

1.4.4.1 灌胃物质的制备

正常组灌胃生理盐水；原蓝莓发酵酒样在 45 ℃、60 r·min⁻¹ 转速下通过旋转蒸发得到 $\varphi=13\%$ 的酒基；中剂量蓝莓发酵酒组灌胃原蓝莓发酵酒样；高剂量蓝莓发酵酒组和原蓝莓发酵酒组灌胃在上述条件下浓缩 3 倍的蓝莓发酵酒；经八种大孔吸附树脂处理后的蓝莓发酵酒样在同样条件下浓缩 3 倍。浓缩的酒样均以 $\varphi=13\%$ 的酒基调配。

酚红餐的制备^[12]：称取 25 mg 的酚红溶于水浴加热至 70 ℃ 的 50 mL 去离子水中，随后将 0.75 g 羧甲基纤维素钠 (Sodium Carboxymethylcellulose, CMC-Na) 均匀分散到 70 ℃ 酚红溶液中，在磁力搅拌器搅拌 30 min。制得的酚红餐溶液冷却至室温，备用。

1.4.4.2 腹泻指数 (Diarrhea Index, DI)

稀便率 (Diarrhea Rate, DR) 为每只小鼠的稀便数占每只小鼠总便数的百分比；稀便级则根据稀便污染滤纸直径分为 4 级^[13]，1 级：<1 cm；2 级：1~1.9 cm；3 级：2~3 cm；4 级：>4 cm；腹泻指数的计算公式如下 (1)：

$$DI = DR \times \bar{r} \quad (1)$$

式中：

DI——腹泻指数；

DR——稀便率，%；

$\bar{r}$ ——平均稀便级。

1.4.4.3 肠道推进水平

小肠拉成直线置于纸质尺上，小肠的总长度为幽门至回盲部的长度，酚红在小肠内的推进距离为酚红到达的最前端至幽门的距离。肠道推进率计算公式如下 (2)：

$$P = \frac{S}{L} \times 100\% \quad (2)$$

式中：

P——小肠推进率，%；

S——酚红在肠内推进距离，cm；

L——小肠总长度，cm。

1.4.4.4 肠道组织形态

取 1 cm 小肠近盲肠端的回肠组织和结肠组织，放入 4 wt.% 的多聚甲醛溶液中固定 48 h，然后按病理检验的标准操作程序进行脱水、修剪、包埋、切片、苏木精-伊红染色 (Hematoxylin and Eosin Staining, HE)、封片等，最后镜检、采图。

1.4.4.5 电解质稳态

血清中的 Na⁺、Cl⁻ 含量均按照电解质检测试剂盒的说明测定。

1.4.4.6 肠道通透性

血清中的二胺氧化酶 (Diamine Oxidase, DAO) 活性按照肠道损伤标志物 (DAO) 检测试剂盒的说明测定。

1.4.5 “谱-效”关系建立

1.4.5.1 灰度关联分析 (Grey Relational Analysis, GRA)

以前期建立的多酚谱图中各物质的峰面积为比较序列，各项腹泻效应评价指标为参考序列，采用均值化法对上述序列数据进行无量纲化处理，通过在 SPSS 分析网站 (<https://www.spsspro.com/>) 进行灰度关联分析， r 值越大，表明该物质对该腹泻效应评价指标的影响越大。

1.4.5.2 正交偏最小二乘法分析 (Orthogonal Partial Least Squares Analysis, OPLS)

以前期建立的多酚谱图中各物质的峰面积为自变量，各项腹泻效应评价指标为因变量，导入 Simca 14.1 软件中，计算标准化回归系数和变量重要性投影 (Variable Importance in Projection, VIP) 值，VIP 值 > 1 表明该物质对该腹泻效应评价指标有重要影响。

1.4.5.3 斯皮尔曼相关性分析 (Spearman Rank Correlation Analysis, SCA)

将前期建立的多酚谱图中各物质的峰面积以及各项腹泻效应评价指标导入 SPSS 26.0 数据分析软件进行双变量-斯皮尔曼相关性分析，斯皮尔曼相关系数越大，表明该物质与该腹泻效应评价指标的相关性越强，相关系数 > 0 表示正相关，相关系数 < 0 表示负相关。

1.5 数据处理

实验重复三次，所得数据以平均值 ± 标准方差表示。使用 Origin 2021 和 GraphPad Prism 8 绘制相关图表。使用 SPSS 26.0 进行单因素 ANOVA 检验和非参数检验 (Kruskal Wallis test)， $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 蓝莓发酵酒诱导小鼠腹泻的剂量

腹泻指数综合稀便率和稀便级，直接反映腹泻程度^[14]。各剂量蓝莓发酵酒对小鼠腹泻指数的影响如表 2 所示。与 NC 组相比，ALC 组的腹泻指数无显著性差异 ($P > 0.05$)，说明蓝莓发酵酒中 $\varphi=13\%$ 的酒

精并不会诱导小鼠出现腹泻症状; MBW 组也无显著性差异 ($P>0.05$), 说明中剂量的蓝莓发酵酒也不会诱导小鼠出现腹泻症状; 而 HBW 组的腹泻指数升至 1.03 ($P<0.01$), 说明以 $30\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ 灌胃浓缩 3 倍的蓝莓发酵酒, 会诱导小鼠出现腹泻症状。其原因可能是多酚类物质 (如酚酸) 的高剂量摄入破坏了小鼠的肠道屏障, 造成肠道功能损伤^[5]。

表 2 不同剂量蓝莓发酵酒对小鼠腹泻指数的影响
Table 2 Effects of dose variations in fermented blueberry wine on the diarrhea index in mice

组别	稀便率/%	平均稀便级	腹泻指数
NC	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ALC	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
MBW	5.03 ± 5.55	0.50 ± 0.55	0.05 ± 0.06
HBW	97.10 ± 4.51**	1.06 ± 0.05**	1.03 ± 0.07**

注: ** 表示与 NC 组相比 $P<0.01$ 。

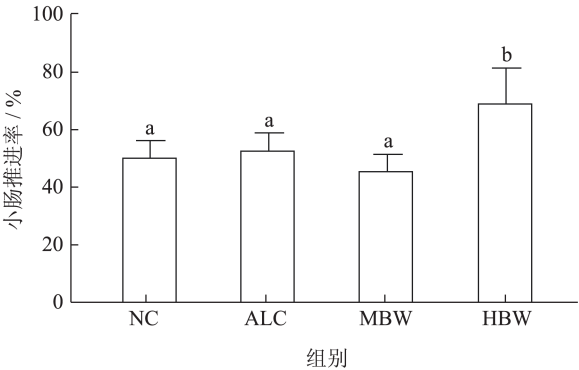


图 1 不同剂量蓝莓发酵酒对小鼠小肠推进率的影响
Fig.1 Effects of dose variations in fermented blueberry wine on the intestinal motion rate in mice

注: 不同字母表示组间具有显著性差异 ($P<0.05$), 下同。

不同剂量蓝莓发酵酒对小鼠小肠推进率的影响如图 1 所示。与 NC 组相比, ALC 组和 MBW 组的小肠推进率均无显著性差异 ($P>0.05$); 而 HBW 组的小肠推进率提高了 37.77%, 小鼠的小肠蠕动显著加速了 ($P<0.05$)。张宁康等^[15]发现腹泻型肠易激综合征 (IBS-D) 患者的空肠和小肠蠕动明显增加、肠道传输时间缩短, 导致肠道内粪便停留时间过短, 引起腹泻症状发生。这进一步说明高剂量蓝莓发酵酒组小鼠出现了腹泻症状。

2.2 蓝莓发酵酒多酚成分的鉴定

蓝莓发酵酒多酚类成分的鉴定结果如表 3 所示。蓝莓发酵酒中鉴定出 50 种多酚类成分, 其中包括 21 种酚酸类成分、26 种黄酮类成分以及 3 种其他多酚类成分。酚酸类主要含有咖啡酰奎宁酸的衍生物 (绿原酸、

咖啡酸、奎宁酸)、羟基苯甲酸的衍生物 (没食子酸、原儿茶酸、香草酸、丁香酸、水杨酸) 和羟基肉桂酸的衍生物 (对香豆酸、阿魏酸、芥子酸)。黄酮类主要以槲皮素、异鼠李素、山奈酚与葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、鼠李糖以糖苷键形式结合为主。这与 Zhang 等^[16]通过 UPLC/ESI-XTQS-MS/MS 技术鉴定酵母和乳酸菌 (LAB) 的顺序发酵和同步发酵蓝莓过程中多酚成分的结果相似。王行等^[17]通过 RP-HPLC 技术也发现蓝莓酒中含有没食子酸、原儿茶酸、绿原酸、香草酸、咖啡酸和丁香酸等酚酸类物质。秦皮乙素、间苯三酚甲醛、开环异落叶松脂素未有相关报道指出, 为首次在蓝莓发酵酒中发现。其可能是蓝莓浆果中的香豆素类和木脂素类物质在发酵过程中经酵母菌的代谢转化生成^[18]。

2.3 蓝莓发酵酒多酚组分DAD色谱图的建立

大孔吸附树脂是一类不含交换基团的非离子型高分子聚合物, 兼具吸附性和筛选性。其具有发达的孔隙结构和较大的比表面积, 可根据极性、孔径和比表面积的不同, 通过氢键相互作用、范德华力以及物理尺寸筛分选择性地吸附不同多酚类成分^[19]。Buran 等^[20]发现 Amberlite FPX66 树脂对蓝莓水提物中的花色苷和类黄酮具有良好的吸附能力。本研究中的蓝莓发酵酒经八种不同大孔吸附树脂处理后的多酚含量情况如图 2 和表 4 所示, 可以看出各多酚的峰面积均有不同程度降低。其中 NKA- II 树脂效果最明显, 绿原酸和田基黄苷的相对含量分别降低了 13.79% 和 10.58%。这可能是由于 NKA- II 树脂比表面积最大, 具有更多的吸附位点。结合 NKA- II 树脂的极性性能, 可以推测蓝莓发酵酒中的多酚类物质以极性组分为主, 其含有大量的羟基而易被吸附^[21]。Cao 等^[22]也发现 NKA-II 树脂是纯化车前草中多酚类物质最有效的树脂, 能使其主要多酚类物质 (绿原酸等) 含量增加 2.5 至 5.0 倍。

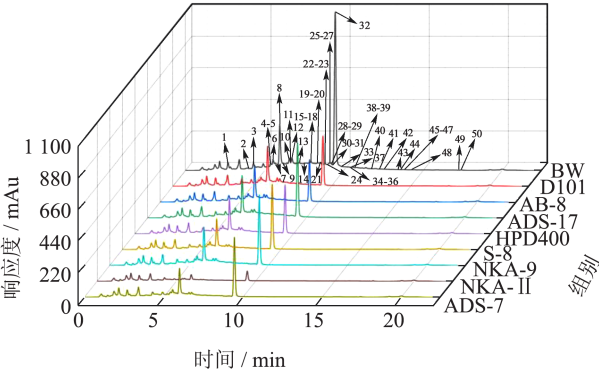


图 2 八种大孔吸附树脂处理后的蓝莓发酵酒多酚谱图 (280 nm)
Fig.2 Polyphenolic profiles of fermented blueberry wine treated with eight macroporous resins (280 nm)

表 3 蓝莓发酵酒多酚类成分鉴定表

Table 3 Polyphenolic compounds identification of fermented blueberry wine

峰号	保留时间 /min	物质名称	分子式	加合方式	母离子 (<i>m/z</i>)		碎片离子 (<i>m/z</i>)
					测量值	理论值	
1	2.854	没食子酸	C ₇ H ₆ O ₅	[M-H] ⁻	169.014 4	169.014 3	125.024 8, 97.029 9, 79.018 9
2	3.942	没食子酸-4-O-β-D-葡萄糖 苷或异构体	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	[M-H] ⁻	331.066 3	331.067 1	169.015 5, 125.024 2
3	4.448	原儿茶酸	C ₇ H ₆ O ₄	[M-H] ⁻	153.018 9	153.019 3	109.029 0
4	5.092	5-羟基异香兰酸	C ₈ H ₈ O ₅	[M-H] ⁻	183.029 6	183.029 9	168.006 5, 124.017 0, 95.013 1
5	5.228	对羟基苯基乳酸	C ₉ H ₁₀ O ₄	[M-H] ⁻	181.050 6	181.050 6	163.038 9, 135.045 8, 119.050 3, 72.992 3
6	5.634	原儿茶醛	C ₇ H ₆ O ₃	[M-H] ⁻	137.024 2	137.024 4	108.021 2
7	5.970	咖啡酸己糖苷	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	[M-H] ⁻	341.087 6	341.087 8	179.035 5, 135.045 4
8	6.144	绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	[2M-H] ⁻	707.186 3	707.183 6	353.087 6, 191.055 9
10	6.597	香草酸	C ₈ H ₈ O ₄	[M-H] ⁻	167.035 3	167.035 0	152.011 8, 108.021 1
12	6.759	咖啡酸	C ₉ H ₈ O ₄	[M-H] ⁻	179.035 2	179.035 0	135.044 3
13	6.845	丁香酸	C ₉ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	197.045 7	197.045 6	182.023 7, 123.008 6, 95.013 1
15	7.700	3-O-阿魏酰奎宁酸 或异构体	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	[M-H] ⁻	367.104 4	367.103 5	191.057 4, 173.046 2, 134.037 0
17	7.922	3-香豆素基奎宁酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	[M-H] ⁻	337.093 4	337.092 9	191.056 0, 173.047 6
19	8.103	没食子酸乙酯	C ₉ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	197.046 0	197.045 6	169.014 1, 124.016 6
20	8.116	4-羟基肉桂酸	C ₉ H ₈ O ₃	[M-H] ⁻	163.039 8	163.040 1	119.051 0, 93.037 4
21	8.306	咖啡酰基乙醇	C ₉ H ₁₀ O ₃	[M-H] ⁻	165.055 9	165.055 7	147.045 4, 103.055 7
23	8.557	对香豆酸	C ₉ H ₈ O ₃	[M-H] ⁻	163.039 9	163.040 1	119.050 0, 93.031 9
24	8.681	阿魏酸	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M-H] ⁻	193.050 5	193.050 6	178.026 5, 149.061 3, 134.037 0
25	8.707	芥子酸	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	[M-H] ⁻	223.060 5	223.061 2	208.051 8, 193.013 9, 164.046 8, 149.026 2, 121.029 1, 93.034 1
38	10.558	水杨酸	C ₇ H ₆ O ₃	[M-H] ⁻	137.024 2	137.024 4	93.034 5, 65.038 7
42	12.527	咖啡酸乙酯	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	[M-H] ⁻	207.066 0	207.066 3	179.034 2, 161.025 3, 135.044 3
9	6.165	(+)-儿茶素	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	[M-H] ⁻	289.072 4	289.071 8	245.084 5, 203.075 9, 179.040 5
14	7.137	表儿茶素	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	[M-H] ⁻	289.070 3	289.071 8	245.078 7, 203.081 0, 179.031 6
16	7.898	槲皮万寿菊素-7-O-β-吡喃 葡萄糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	[M-H] ⁻	479.084 7	479.083 1	316.024 9, 271.019 4
22	8.534	芦丁	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	[M-H] ⁻	609.148 7	609.146 1	300.029 1, 271.026 3, 255.029 9, 178.997 7, 151.003 9
26	8.740	花旗松素	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	[M-H] ⁻	303.052 6	303.051 0	275.057 5, 178.994 5, 151.004 7
27	8.796	槲皮素-3-O-半乳糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	[M-H] ⁻	463.088 3	463.088 2	300.028 6, 271.025 7, 255.031 1, 243.031 8, 227.037 8, 178.998 7, 151.003 4
28	8.983	槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	[M-H] ⁻	477.069 5	477.067 5	301.036 6, 273.040 9, 245.046 9, 229.049 4, 178.999 6, 151.004 0
29	9.183	达提斯根苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	[M-H] ⁻	593.154 3	593.151 2	285.040 2, 255.030 9, 151.004 4
30	9.356	异鼠李素-3-O-芸香糖苷	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	[M-H] ⁻	623.164 5	623.161 8	315.051 2, 300.028 4
31	9.502	槲皮素-3-O-α-L-吡喃 阿拉伯糖苷	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	[M-H] ⁻	433.078 5	433.077 6	300.029 0, 271.026 6, 255.033 0, 243.031 7, 178.996 5, 151.002 5
32	9.538	田基黄苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M-H] ⁻	447.093 7	447.093 3	300.027 4, 271.024 1, 255.030 2, 243.034 2, 227.034 8, 178.996 7, 151.002 6

续表3

峰号	保留时间 /min	物质名称	分子式	加合方式	母离子 (<i>m/z</i>)		碎片离子 (<i>m/z</i>)
					测量值	理论值	
33	9.755	异鼠李素-3-O-葡萄糖苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	[M-H] ⁻	477.105 5	477.103 9	314.043 4, 285.043 3, 271.022 1, 243.029 1
34	10.309	香橙素	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	[M-H] ⁻	287.056 5	287.056 1	259.063 7, 243.067 7, 215.075 0, 201.056 6, 177.057 0, 152.007 8, 125.023 5
35	10.324	杨梅素	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	[M-H] ⁻	317.030 5	317.030 3	271.028 5, 179.001 1, 151.005 8, 137.024 3, 109.031 0, 107.012 5
37	10.403	根皮苷	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀	[M-H] ⁻	435.129 5	435.129 7	273.077 9, 167.028 6
39	10.587	山柰酚-3-O-鼠李糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	[M-H] ⁻	431.098 5	431.098 4	285.042 1, 255.028 9, 227.032 7
40	11.857	圣草酚	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	[M-H] ⁻	287.055 0	287.056 1	151.002 5, 135.047 5
41	12.174	槲皮素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	[M-H] ⁻	301.034 8	301.035 4	273.044 4, 257.049 1, 245.041 9, 229.056 5, 178.998 7, 151.004 4, 121.029 4
43	13.398	柚皮素	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	[M-H] ⁻	271.061 5	271.061 2	151.006 7, 119.050 4, 93.035 1
44	13.523	金雀异黄酮	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	269.045 1	269.045 6	133.029 3
45	13.773	山柰酚	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M-H] ⁻	285.041 3	285.040 5	159.044 8, 117.033 8
46	13.796	3',5,7-三羟基-3,4'-二甲氧基黄酮	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	[M-H] ⁻	329.068 3	329.066 7	314.048 1, 299.015 2, 271.032 8
47	13.857	丁香亭	C ₁₇ H ₁₄ O ₈	[M-H] ⁻	345.061 6	345.061 6	330.037 7, 315.015 4, 287.017 5, 259.022 5
48	14.107	异鼠李素	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	[M-H] ⁻	315.051 7	315.051 0	300.027 7, 283.021 9, 271.028 5, 255.030 8, 151.003 9, 107.013 3
49	17.155	白杨素	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	[M-H] ⁻	253.051 3	253.050 6	209.061 6, 143.053 6
50	17.416	乔松素	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	[M-H] ⁻	255.066 5	255.066 3	213.056 6, 151.004 9
11	6.622	秦皮乙素	C ₉ H ₆ O ₄	[M-H] ⁻	177.019 5	177.019 3	133.032 8, 105.033 5
18	7.984	间苯三酚甲醛	C ₇ H ₆ O ₄	[M-H] ⁻	153.019 3	153.019 3	107.013 8, 65.003 0
36	10.389	开环异落叶松脂素	C ₂₀ H ₂₆ O ₆	[M-H] ⁻	361.166 5	361.165 7	165.060 5

表 4 八种大孔吸附树脂处理后的蓝莓发酵酒多酚的相对含量
Table 4 Relative concentration of polyphenolic compounds in fermented blueberry wine treated with eight macroporous resins

No.	物质名称	相对含量/%								
		D101	AB-8	ADS-17	HPD400	S-8	NKA-9	NKA- II	ADS-7	蓝莓发酵酒
P1	没食子酸	8.00	8.08	7.07	9.03	9.35	8.17	25.75	9.70	4.54
P2	没食子酸-4-O-β-D-葡萄糖苷或异构体	0.08	0.11	0.14	0.18	0.17	0.13	0.25	0.13	0.09
P3	原儿茶酸	7.27	7.24	5.96	7.73	7.31	6.74	15.78	7.53	4.37
P4	5-羟基异香兰酸	2.61	2.57	2.24	2.94	2.68	2.45	4.64	2.73	1.75
P5	对羟基苯基乳酸	1.28	1.27	1.20	1.63	1.63	1.34	3.79	1.69	0.71
P6	原儿茶醛	0.19	0.22	0.16	0.23	0.20	0.19	0.51	0.19	0.15
P7	咖啡酸己糖苷	4.88	4.88	5.12	6.09	6.91	5.86	10.65	7.02	3.09
P8	绿原酸	34.62	36.22	34.22	36.98	36.82	35.63	10.54	37.22	24.33
P9	(+)-儿茶素	1.08	1.05	0.85	1.13	0.82	0.82	0.80	0.84	0.63
P10	香草酸	0.38	0.38	0.33	0.38	0.34	0.34	0.41	0.35	0.33
P11	秦皮乙素	0.21	0.24	0.20	0.22	0.18	0.14	0.21	0.15	0.17
P12	咖啡酸	9.94	10.03	7.10	8.90	7.11	7.10	7.28	6.90	7.90

续表4										
No.	物质名称	相对含量/%								
		D101	AB-8	ADS-17	HPD400	S-8	NKA-9	NKA- II	ADS-7	蓝莓发酵酒
P13	丁香酸	1.12	1.05	1.00	1.19	1.20	0.95	1.19	1.10	1.07
P14	儿茶素	0.67	0.66	0.58	0.68	0.58	0.58	0.26	0.54	0.41
P15	3-O-阿魏酰奎宁酸 或异构体	1.32	1.30	1.69	1.42	1.45	1.50	0.54	1.46	1.31
P16	槲皮万寿菊素-7-O- β -吡喃葡萄糖苷	0.85	0.83	1.00	0.70	0.64	0.86	0.51	0.59	0.89
P17	3-香豆素基奎宁酸	0.19	0.21	0.23	0.22	0.24	0.23	0.12	0.22	0.16
P18	间苯三酚甲醛	1.29	1.30	0.56	0.98	0.56	0.52	ND	0.55	0.81
P19	没食子酸乙酯	2.80	2.85	2.12	2.82	2.34	2.19	2.44	2.38	2.09
P20	4-羟基肉桂酸	0.11	0.10	0.07	0.08	0.07	0.06	0.05	0.06	0.14
P21	咖啡酰基乙醇	2.70	2.66	2.84	3.20	3.68	3.20	4.55	3.86	1.94
P22	芦丁	3.71	3.42	6.24	3.16	4.38	5.48	2.24	4.31	5.15
P23	对香豆酸	0.08	0.08	0.05	0.08	0.06	0.05	0.07	0.04	0.07
P24	阿魏酸	0.22	0.20	0.18	0.23	0.13	0.17	ND	0.14	0.44
P25	芥子酸	0.13	0.12	0.14	0.14	0.11	0.09	0.06	0.09	0.26
P26	花旗松素	0.54	0.50	0.29	0.33	0.21	0.23	0.11	0.19	0.62
P27	槲皮素-3-O-半乳糖苷	5.40	4.92	7.11	3.93	4.23	5.95	2.71	3.86	8.99
P28	槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸	1.71	1.60	2.15	1.26	1.20	1.84	0.80	1.06	2.64
P29	达提斯根苷	0.28	0.27	0.67	0.22	0.43	0.58	0.19	0.39	0.76
P30	异鼠李素-3-O-芸香糖苷	0.60	0.51	1.66	0.45	0.89	1.20	0.39	0.82	1.60
P31	槲皮素-3-O- α -L-吡喃阿拉伯糖苷	0.54	0.48	0.50	0.38	0.26	0.34	0.22	0.20	1.34
P32	田基黄苷	4.04	3.68	5.15	2.44	3.11	4.15	2.09	2.94	12.67
P33	异鼠李素-3-O-葡萄糖苷	0.38	0.36	0.65	0.28	0.33	0.47	0.24	0.34	1.22
P34	香橙素	0.14	0.13	0.03	0.06	0.04	0.04	ND	0.03	0.49
P35	杨梅素	0.03	0.04	0.02	0.00	ND	0.01	ND	ND	0.33
P36	开环异落叶松脂素	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.05
P37	根皮苷	0.05	0.05	0.08	ND	ND	0.04	ND	ND	0.14
P38	水杨酸	0.25	0.21	0.23	0.20	0.23	0.26	0.24	0.23	0.48
P39	山柰酚-3-O-鼠李糖苷	0.03	0.03	0.04	0.02	0.03	0.03	ND	0.02	0.28
P40	圣草酚	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.05
P41	槲皮素	0.14	0.10	0.06	0.04	0.04	0.03	0.22	0.04	2.99
P42	咖啡酸乙酯	0.10	0.05	0.05	0.02	0.02	0.02	0.14	0.06	0.29
P43	柚皮素	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	ND	ND	0.00	0.34
P44	金雀异黄酮	0.00	0.00	ND	ND	ND	0.00	ND	ND	0.06
P45	山柰酚	0.00	ND	0.00	ND	ND	0.00	0.00	0.00	0.15
P46	3',5,7-三羟基-3,4'-二甲氧基黄酮	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.03
P47	丁香亭	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.02	0.01	1.19
P48	异鼠李素	0.00	0.00	0.00	ND	0.00	ND	0.01	ND	0.22
P49	白杨素	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.08
P50	乔松素	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.18

注: ND 表示未检出。各物质相对含量是通过峰面积归一化法计算得出。

2.4 蓝莓发酵酒多酚组分的小鼠腹泻效应评价

2.4.1 对小鼠腹泻指数的影响

经大孔吸附树脂处理后的蓝莓发酵酒对小鼠腹泻指数的影响如表 5 所示。与未经处理的原酒相比，多酚含量降低后，小鼠的腹泻指数均有不同程度的下降，其中 NKA- II 和 ADS-7 树脂处理组的腹泻指数分别下降了 58.38%、57.30% ($P<0.01$)，说明蓝莓发酵酒中的多酚组分可能是诱导小鼠腹泻的原因。Cai 等^[23]观察到摄入没食子酸对断奶仔猪的生长性能、腹泻发生率、肠道形态、血浆抗氧化指标和免疫反应有显著影响，表明多酚类物质的摄入与腹泻发生率之间存在一定关联。Ma 等^[24]通过体内和体外实验发现多酚从膳食中摄入 $6.41\sim396\text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$ 的剂量时可促进乳杆菌属生长，质量浓度超过 $62.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时则会降低乳杆菌属的丰度，而乳杆菌属被认为对肠道功能有益^[25]。说明多酚的过量摄入可能会导致肠道菌群失衡，破坏肠道微生态平衡，进而诱导腹泻产生。

表 5 蓝莓发酵酒多酚组分对小鼠腹泻指数的影响			
Table 5 Effects of polyphenolic components in fermented blueberry wine on the diarrhea index in mice			
组别	稀便率/%	平均稀便级	腹泻指数
NC	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
BW	96.06 ± 6.11***	1.07 ± 0.08***	1.03 ± 0.07***
D101	95.83 ± 6.45***	1.00 ± 0.00**	0.96 ± 0.06***
AB-8	92.76 ± 8.04***	1.05 ± 0.07***	0.97 ± 0.11***
ADS-17	81.94 ± 21.35**	1.00 ± 0.00**	0.82 ± 0.21*
HPD400	71.63 ± 4.08	1.00 ± 0.00**	0.72 ± 0.04
S-8	63.61 ± 6.18	1.00 ± 0.00**	0.64 ± 0.06
NKA-9	58.33 ± 9.13	1.00 ± 0.00**	0.58 ± 0.09
NKA- II	42.78 ± 8.28##	1.00 ± 0.00**	0.43 ± 0.08##
ADS-7	43.89 ± 7.12#	1.00 ± 0.00**	0.44 ± 0.07##

注：*表示与 NC 组相比 $P<0.05$ ，**表示与 NC 组相比 $P<0.01$ ，***表示与 NC 组相比 $P<0.001$ ；#表示与 BW 组相比 $P<0.05$ ，##表示与 BW 组相比 $P<0.01$ 。

2.4.2 对小鼠肠道推进水平的影响

经大孔吸附树脂处理后的蓝莓发酵酒对小鼠小肠推进率的影响如图 3 所示。与 BW 组相比，各树脂处理组的小肠推进率均显著降低 ($P<0.05$)，其中 NKA- II 组的小肠推进水平下降了 32.74%。这可能是由于多酚类物质能够调节肠道神经递质（如 5-HT）的水平^[26]，影响肠道平滑肌的收缩，进而加速小肠的蠕动^[27]。唐超智等^[28]发现连续服用茶多酚 (TP) 对小鼠

的 5-HT 分泌和小肠黏膜组织结构均有影响。

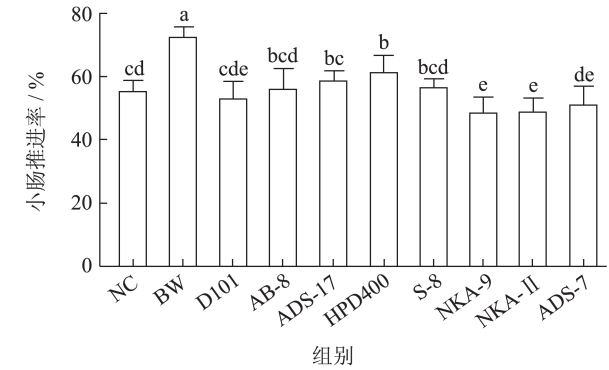


图 3 蓝莓发酵酒多酚组分对小鼠小肠推进率的影响
Fig.3 Effects of polyphenolic components in fermented blueberry wine on the intestinal motion rate in mice

2.4.3 对小鼠肠道组织形态的影响

各蓝莓发酵酒样对小鼠肠道组织结构的影响如图 4 所示。与 NC 组相比，BW 组的回肠组织结构损伤明显，存在部分黏膜上皮与固有层分离（见图中黑箭头处）、肠绒毛萎缩（见图中绿箭头处）、肠绒毛明显变短（见图中蓝箭头处）以及肠绒毛脱落（见图中红箭头处）等现象，其固有肌层内还有极少量中性粒细胞浸润（见图中黄箭头处）。BW 组的结肠组织结构损伤明显，存在腺体丢失（见图中红圈处）和炎性因子浸润（见图中黄箭头处）的现象，表现出广泛的组织病理学改变。相比于 BW 组，在通过大孔吸附树脂降低多酚含量后，NKA- II 组的肠道组织结构损伤程度明显减弱。Polewski 等^[29]通过 Caco-2 细胞模型发现蓝莓多酚成分 AEF 能够对肠屏障功能障碍产生显著影响。Cheng 等^[30]也发现富含多酚的蓝莓果渣通过介导 NF- κ B-MLCK 信号通路显著影响了高脂饮食小鼠的肠道形态和屏障功能。这些结果共同表明蓝莓发酵酒中的多酚组分可能影响小鼠肠道的形态。

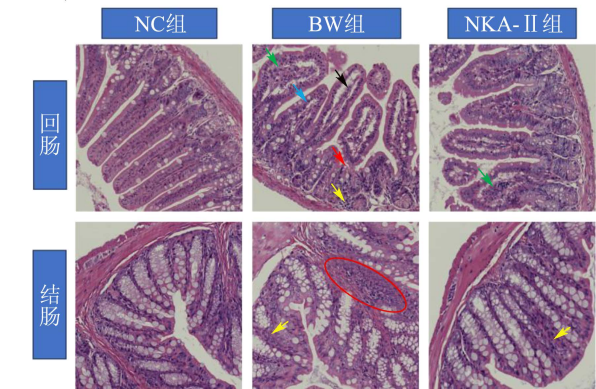


图 4 肠道组织切片 HE 染色结果
Fig.4 Results of H&E staining of intestinal tissue

2.4.4 对小鼠电解质稳态的影响

腹泻的本质是胃肠道电解质吸收和分泌功能的紊乱,其发生与肠道异常的离子转运(K^+ 、 Na^+ 、 Cl^- 等)密切相关。各蓝莓发酵酒样对小鼠血清电解质含量的影响如图5所示。BW组血清中的 Na^+ 和 Cl^- 摩尔浓度分别为 $131.12\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $110.38\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,与NC组相比显著降低($P<0.05$),这一结果与腹泻时体内水和电解质平衡被破坏的情况相符合^[31]。相比于BW组,多酚类物质含量降低后,小鼠的血清电解质水平显著升高($P<0.05$),其中ADS-7树脂处理组的血清 Na^+ (摩尔浓度 $153.01\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)和 Cl^- (摩尔浓度 $114.92\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)与NC组相比无显著性差异($P>0.05$),这表明多酚含量降低后,蓝莓发酵酒诱导的小鼠腹泻效应明显减弱。

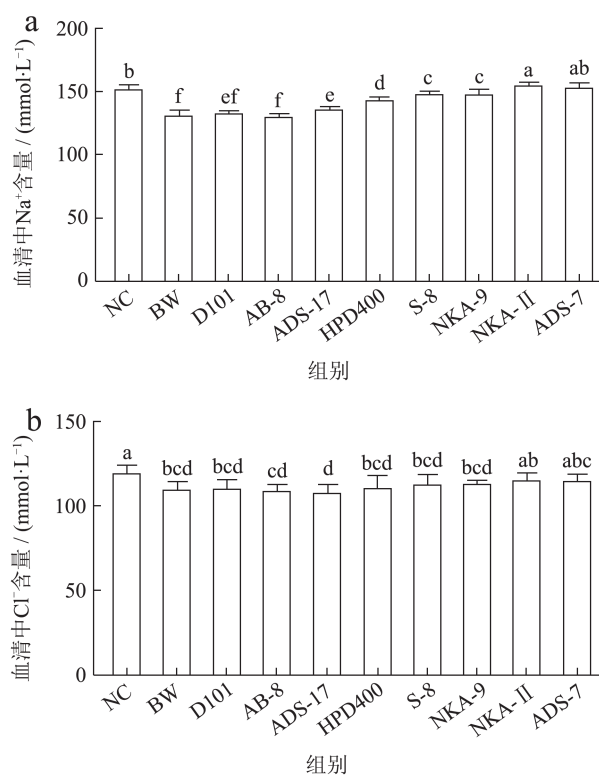


图5 蓝莓发酵酒多酚组分对小鼠血清电解质含量(Na^+ 、 Cl^-)的影响

Fig.5 Effects of polyphenolic components in fermented blueberry wine on the serum electrolyte levels in mice

2.4.5 对小鼠肠道通透性的影响

二胺氧化酶(DAO)由小肠黏膜细胞分泌。当肠黏膜屏障受到破坏时小肠内的DAO会释放到血液中,因此血清中的DAO水平能反映肠道机械屏障的完整性和受损程度^[32]。各组小鼠血清DAO的水平如

图6所示,BW组小鼠血清的DAO活性和NC组相比提升了109.09%,显著升高($P<0.05$),说明该剂量的蓝莓发酵酒破坏了小鼠肠道的机械屏障。肠道通透性的变化与持续性消化道症状相关,且通透性增加与腹泻次数增多相关,这一点在黏膜愈合的炎症性肠病患者中尤为明显^[33]。相比于BW组,多酚含量降低后,DAO活性也分别降低了12.68%、10.08%、13.29%、12.06%、18.49%、24.28%、30.84%和19.34%,均显著降低($P<0.05$),说明蓝莓发酵酒中的多酚组分含量过高可能影响小鼠肠道的通透性。过量摄入多酚可能干扰肠道细胞正常功能,导致肠道通透性增加。Babich等^[34]曾通过体外实验发现高剂量的多酚会抑制细胞抗氧化,导致组织迅速坏死。

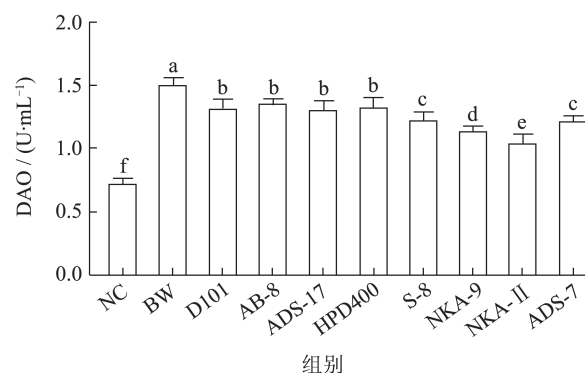


图6 蓝莓发酵酒多酚组分对小鼠肠道损伤标志物(DAO)活性的影响

Fig.6 Effects of polyphenolic components in fermented blueberry wine on the activity of intestinal damage biomarker (DAO) in mice

2.5 “谱-效”关系的建立

2.5.1 灰度关联分析结果

灰度关联分析是通过几何曲线的相似性来判断序列之间的关联程度,曲线越接近关联度越高,通常认为关联度 $r>0.5$ 时子序列与母序列之间存在一定的关联性。蓝莓发酵酒中的多酚类物质与腹泻效应的灰度关联分析结果如表6所示,可以看出 r 值排在前12的物质中P3(原儿茶酸)、P4(5-羟基异香兰酸)、P6(原儿茶醛)、P8(绿原酸)和P13(丁香酸)对小鼠的各项腹泻效应评价指标影响均较大, r 值均 >0.9 。可以推测这5种物质与蓝莓发酵酒诱导的腹泻效应密切相关。Waclawikova等^[35]曾发现与5-羟基异香兰酸结构类似的5-HI可通过激活位于结肠平滑肌细胞上的L型钙通道来加速肠道收缩。

2.5.2 正交偏最小二乘法分析结果

正交偏最小二乘法分析适用于因变量的个数少于自变量的情况。在正交偏最小二乘回归（OPLS）模型中， R^2 和 Q^2 分别表示模型对数据的解释能力和预测能力，其值超过 0.5 通常被认为是一个良好的模型拟合^[36]。本实验中模型优化的结果显示 R^2 和 Q^2 均大于 0.5，表明这 5 个 OPLS 模型是合适的。OPLS 分析的

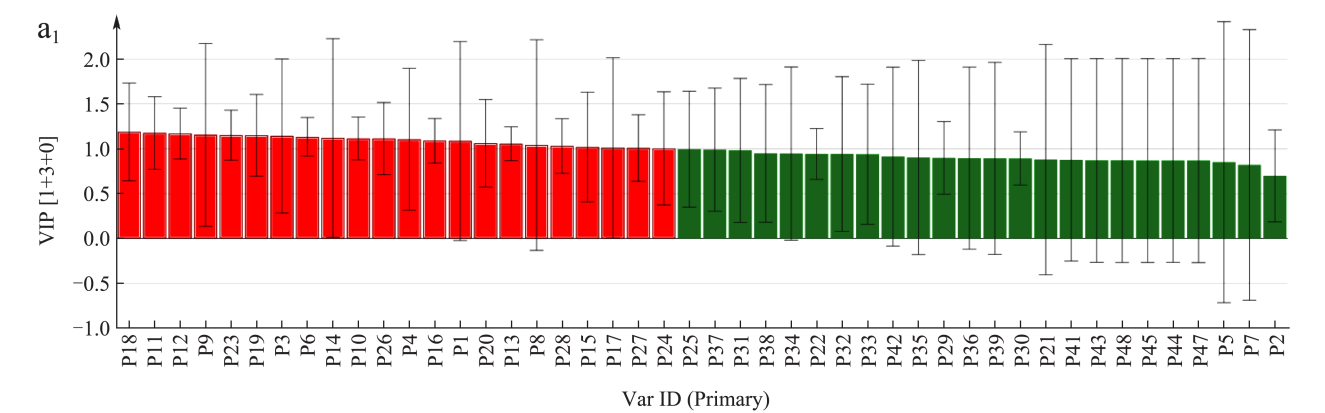
结果如图 7 所示。可看出 P8（绿原酸）、P20（4-羟基肉桂酸）以及 P23（对香豆酸）在以各项腹泻效应指标为因变量的 OPLS 分析中 VIP 值均>1，结合对应的标准化回归系数，可推测这 3 种多酚与小鼠的腹泻效应呈正相关。这可能是由于酚酸类物质会刺激肠道屏障，调节蛋白表达，影响肠道菌群的相对丰度和多样性，进而与腹泻效应具有一定的关联^[37]。

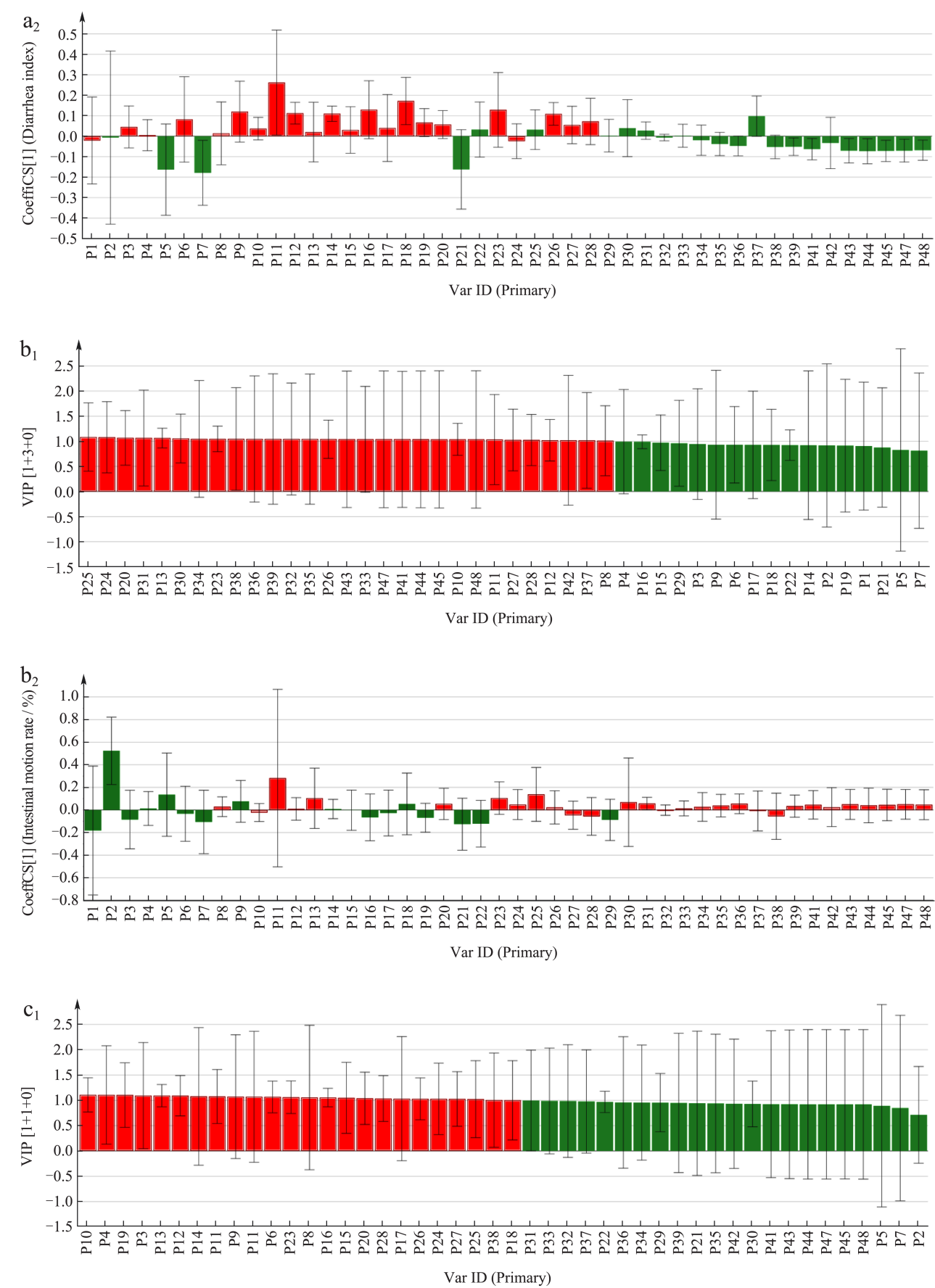
表 6 灰度关联分析结果
Table 6 Results of GRA analysis

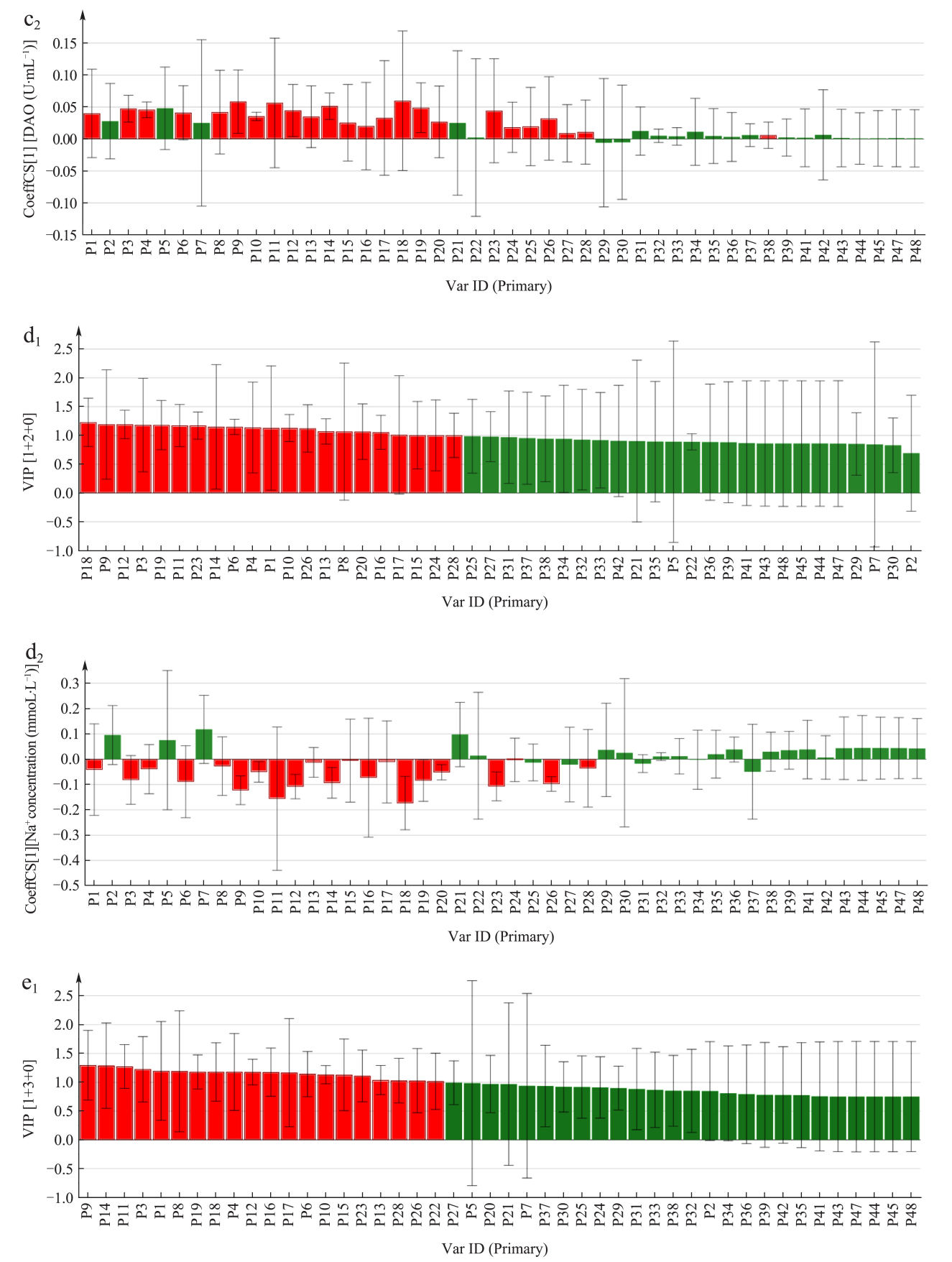
排序	腹泻指数		小肠推进率/%		DAO 活性/(U·mL ⁻¹)		Na ⁺ 浓度/(mmol·L ⁻¹)		Cl ⁻ 浓度/(mmol·L ⁻¹)	
	物质名称	灰色关联度	物质名称	灰色关联度	物质名称	灰色关联度	物质名称	灰色关联度	物质名称	灰色关联度
1	P11	0.97	P1	0.979	P1	0.99	P5	0.974	P5	0.982
2	P9	0.97	P5	0.978	P5	0.982	P1	0.974	P1	0.981
3	P6	0.966	P3	0.974	P3	0.979	P7	0.969	P7	0.971
4	P3	0.966	P4	0.971	P4	0.973	P21	0.964	P21	0.966
5	P14	0.965	P6	0.968	P7	0.971	P3	0.956	P3	0.963
6	P4	0.965	P7	0.968	P6	0.971	P4	0.95	P4	0.958
7	P12	0.963	P21	0.967	P21	0.967	P6	0.949	P6	0.957
8	P19	0.962	P13	0.955	P8	0.957	P2	0.942	P17	0.946
9	P10	0.957	P2	0.955	P17	0.957	P17	0.939	P8	0.943
10	P23	0.954	P17	0.954	P13	0.957	P8	0.937	P13	0.942
11	P8	0.953	P8	0.953	P10	0.952	P13	0.935	P2	0.941
12	P13	0.951	P19	0.948	P19	0.952	P10	0.932	P10	0.94

表 7 正交偏最小二乘回归（OPLS）模型的优化结果
Table 7 Optimized results of the OPLS models

	腹泻指数	小肠推进率/%	DAO 活性/(U·mL ⁻¹)	Na ⁺ 摩尔浓度/(mmol·L ⁻¹)	Cl ⁻ 摩尔浓度/(mmol·L ⁻¹)
R^2X	0.987	0.972	0.925	0.972	0.986
R^2Y	0.965	0.961	0.870	0.911	0.961
Q^2	0.915	0.779	0.827	0.838	0.762







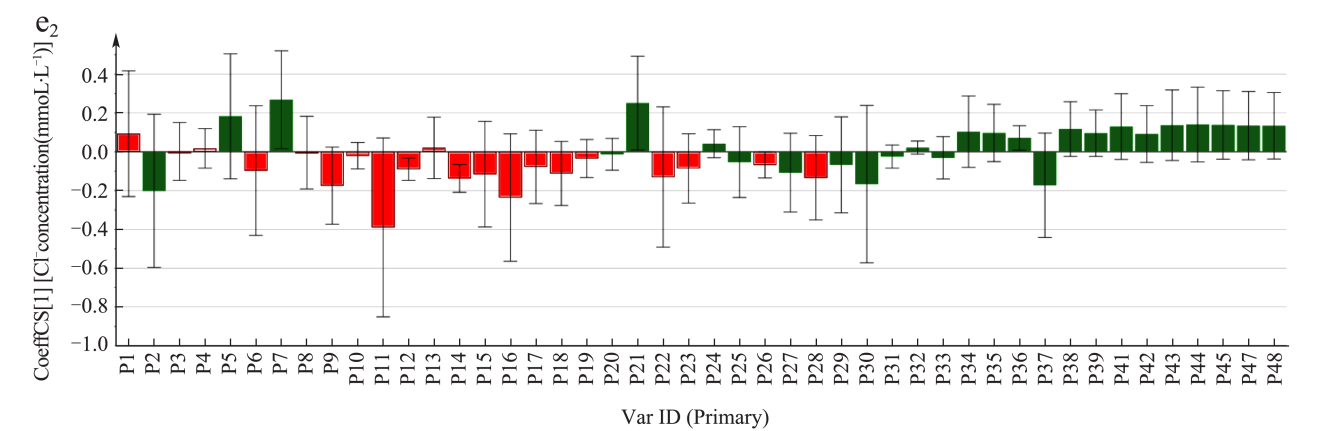


图 7 OPLS 分析结果

Fig.7 Results of OPLS analysis

注: a₁~e₁: 色谱峰面积与腹泻指数、小肠推进率、DAO 活性、Na⁺ 和 Cl⁻ 变化的 VIP 值图; a₂~e₂: 对应的标准化回归系数图。

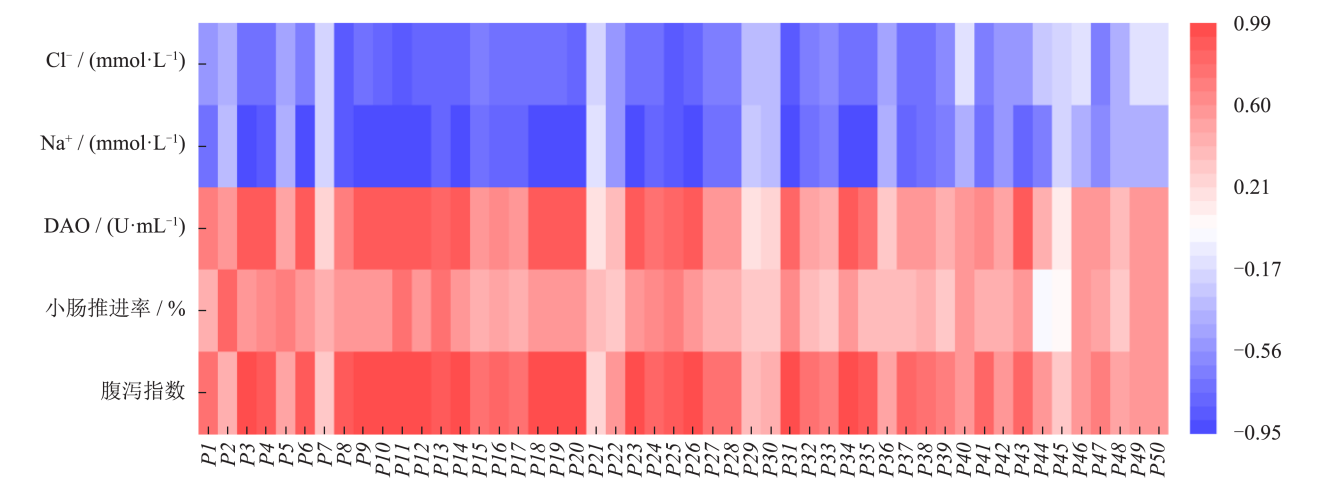


图 8 斯皮尔曼相关性分析结果

Fig.8 Results of SCA analysis

注: * 表示显著相关 ($P < 0.05$), ** 表示极显著相关 ($P < 0.01$)。

2.5.3 斯皮尔曼相关性分析结果

斯皮尔曼相关性分析作为一种非参数统计方法，主要用于评估两个变量之间的相关性。斯皮尔曼相关性分析的结果如图 8 所示。可以看出，除 P7、P21、P29、P30、P36、P40、P44、P45、P46、P48、P49 和 P50 外的其余 38 种多酚均与小鼠的腹泻效应呈正相关，包括前期通过灰度关联分析和正交偏最小二乘法分析得出的 P8（绿原酸），其与小鼠腹泻指数、小肠推进率、血清 DAO 活性、Na⁺ 和 Cl⁻ 含量之间的斯皮尔曼等级相关系数分别为 0.883**、0.55、0.717*、-0.867**、-0.833**。这进一步说明 P8（绿原酸）与小鼠的腹泻效应有密切的正相关性。

2.5.4 联合分析结果

灰度关联分析（GRA）能够评估与药效学指标高度相关的化合物，但无法确定它们之间是正相关还是负相关。因此，正交偏最小二乘法分析（OPLS）和斯

皮尔曼相关性分析（SCA）被用于补充判断。将三种相关性分析结果进行整合，发现绿原酸对反映小鼠腹泻程度的各项腹泻效应评价指标均有重要影响。由此可以得出绿原酸是蓝莓发酵酒中潜在的诱导小鼠腹泻的关键多酚类物质。绿原酸又称咖啡鞣酸，是咖啡酸和奎宁酸通过莽草酸循环途径缩合生成的一种次生代谢产物。目前的研究认为，绿原酸的作用与其应用剂量是密切关联的。Calabrese 等^[38]研究发现绿原酸在多种细胞模型中显示出激素效应，其是一种双相剂量反应关系，即低剂量时产生刺激或保护作用，而高剂量时产生抑制或毒性作用。Gong 等^[39]研究表明绿原酸能够增强金黄色葡萄球菌攻击的细胞的活力，效果在 20 μg·mL⁻¹ 时最佳，在 30 μg·mL⁻¹ 时则减弱。此外，Du 等^[40]曾研究发现高剂量（7 mg·kg⁻¹ body weight）的绿原酸（CA）会诱导大鼠的炎症反应和氧化应激损伤，高剂量 CA 会显著增加回肠组织 MPO 活性和

MDA 含量,同时降低抗氧化酶 SOD 和 CAT 的活性,从而对大鼠回肠组织造成了破坏。这一发现说明绿原酸可能对肠道组织具有消极影响,有力支撑了本研究中“谱-效”关系的结果。

3 结论

本研究基于“谱-效”关系初步筛选出了蓝莓发酵酒中潜在的诱导小鼠腹泻效应的关键多酚类物质。首先通过比较不同剂量蓝莓发酵酒诱导的小鼠腹泻效应,明确了以 $30 \mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ 灌胃浓缩 3 倍的蓝莓发酵酒会诱发小鼠腹泻;随后针对蓝莓发酵酒富含的多酚类成分,本研究利用 UPLC-QTOF-MS/MS 技术共鉴定出 50 种,其中包括 21 种酚酸、26 种黄酮以及 3 种其他多酚;再采用八种不同大孔吸附树脂分别降低了蓝莓发酵酒中的多酚含量,并对处理后的多酚的峰面积进行了测定,结果表明各树脂均能不同程度降低多酚的含量,并且经大孔吸附树脂处理后的蓝莓发酵酒能够显著降低小鼠的腹泻指数、减缓肠道推进率、减轻肠道的组织损伤、稳定血清电解质水平并降低肠道通透性,小鼠腹泻程度显著减弱;最后结合灰度关联分析(GRA)、正交偏最小二乘法分析(OPLS)以及斯皮尔曼相关性分析(SCA)三种统计方法,综合评估了各多酚物质与腹泻效应之间的关系,结果显示绿原酸(P8)与小鼠的腹泻效应密切相关,这表明绿原酸是蓝莓发酵酒中诱导小鼠腹泻的关键效应物质。这些发现不仅揭示了蓝莓发酵酒中多酚类成分对肠道功能的影响,而且也为蓝莓发酵酒的质量控制提供了新的依据。综上所述,本研究为认知蓝莓发酵酒中多酚类成分的健康效应提供了科学依据,也为未来的食品科学和营养学研究贡献了新思路。

参考文献

- [1] CHE X M, LI B, ZENG J L, et al. Effect of co-fermentation of non-*Saccharomyces* yeasts with *Saccharomyces cerevisiae* on the quality and flavor of blueberry wine [J]. Food Research International, 2024, 196: 115051.
- [2] LI Y L, CHEN Y X, CHEN Y Q, et al. *Lactiplantibacillus plantarum* inoculation enhanced the color stabilization and aroma quality of blueberry wine [J]. LWT, 2024, 208: 116750.
- [3] ALEJANDRO RUIZ F E, ORTEGA JÁCOME J F, CELI D, et al. Effect of bottle storage on the color, chemical composition, antioxidant activity, and physicochemical parameters of wild Andean blueberry (mortiño) wine [J]. LWT, 2024, 214: 117105.
- [4] ZHANG T, CHANG M, HOU X H, et al. Apple polyphenols prevent patulin-induced intestinal damage by modulating the gut microbiota and metabolism of the gut-liver axis [J]. Food Chemistry, 2025, 463: 141049.
- [5] 何亚伦,曾丽荣,刘雄,等.高剂量单宁酸对小鼠肠道屏障和肠道菌群的影响[J].生物技术通报,2022,38(4):278-287.
- [6] LIU J F, ZHANG G, WANG Y Q, et al. Screening and verification of hemostatic effective components group of *Panax notoginseng* based on spectrum-effect relationships [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2024, 321: 117539.
- [7] WANG S, YANG L, HOU A J, et al. Screening hepatoprotective effective components of *Lonicerae japonica Flos* based on the spectrum-effect relationship and its mechanism exploring [J]. Food Science and Human Wellness, 2023, 12(1): 283-294.
- [8] HUANG Y T, TAO M F, LI R, et al. Identification of key phenolic compounds for alleviating gouty inflammation in edible chrysanthemums based on spectrum-effect relationship analyses [J]. Food Chemistry: X, 2023, 20: 100897.
- [9] 中国营养学会.中国居民膳食指南(2022)[M].北京:人民卫生出版社,2022.
- [10] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等.药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J].中国临床药理学与治疗学,2004,9:1069-1072.
- [11] SUN N, XIE J Y, ZHENG B, et al. The inhibition mechanism of bound polyphenols extracted from mung bean coat dietary fiber on porcine pancreatic α -amylase: kinetic, spectroscopic, differential scanning calorimetric and molecular docking [J]. Food Chemistry, 2024, 436: 137749.
- [12] 张琪.基于胃肠全段魔芋葡甘露聚糖改善便秘小鼠通便作用机理[D].重庆:西南大学,2021.
- [13] 管志伟,赵琼,赵中和,等.番泻叶致幼龄大鼠腹泻模型量-时-效关系研究[J].时珍国医国药,2021,32(8):1806-1809.
- [14] 周干南,胡芝华,汪亚先,等.小鼠腹泻模型的制备与腹泻指数的应用[J].中草药,1994,4:195-196,199,223-224.
- [15] 张宁康,郑薇薇.腹泻型肠易激综合征的中西医研究进展[J].中国中西医结合消化杂志,2024,32(4):351-356.
- [16] ZHANG J G, FANG L, HUANG X D, et al. Evolution of polyphenolic, anthocyanin, and organic acid components during coinoculation fermentation (simultaneous inoculation of LAB and yeast) and sequential fermentation of blueberry wine [J]. Journal of Food Science, 2022, 87(11): 4878-4891.
- [17] 王行,张海宁,马永昆,等.蓝莓酒发酵过程中酚类物质动态变化及其抗氧化活性研究[J].现代食品科技,2015,31(1):90-95.
- [18] 储正达,蔡彬.秦皮甲素和秦皮乙素的药理研究进展[J].中药新药与临床药理,2024,35(2):291-298.
- [19] 孙楠.绿豆皮膳食纤维中结合多酚的纯化制备、抗氧化活性及 α -淀粉酶抑制机理的研究[D].南昌:南昌大学,2024.
- [20] BURAN T J, SANDHU A K, LI Z, et al. Adsorption/desorption characteristics and separation of anthocyanins and polyphenols from blueberries using macroporous adsorbent resins [J]. Journal of Food Engineering, 2014, 128: 167-173.
- [21] 黎海彬,李小梅.大孔吸附树脂及其在天然产物研究中的应用[J].广东化工,2005,3:22-25.
- [22] CAO D, BU F J, CHENG X X, et al. Purification of phenolics from *Plantago depressa* by macroporous resin: Adsorption/desorption characteristics, chromatographic process development and UPLC-TQ-MS/MS quantitative analysis [J]. LWT, 2024, 203:

- 116405.
- [23] CAI L, LI Y P, WEI Z X, et al. Effects of dietary gallic acid on growth performance, diarrhea incidence, intestinal morphology, plasma antioxidant indices, and immune response in weaned piglets [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2020, 261: 114391.
- [24] MA G L, CHEN Y T. Polyphenol supplementation benefits human health via gut microbiota: A systematic review via meta-analysis [J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 66: 103829.
- [25] 任彩君,吴黎明,王凯.膳食多酚对肠道菌群影响研究进展[J].*食品工业科技*,2022,43(1):400-409.
- [26] LI R, PAN Y K, JING N N, et al. Flavonoids from mulberry leaves exhibit sleep-improving effects via regulating GABA and 5-HT receptors [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2025, 337: 118734.
- [27] 苏海霞,付兆媛,高永泽,等.5-羟色胺与腹泻型肠易激综合征相关性及中医药调控研究进展[J].*中国全科医学*,2023,26(21):2678-2685.
- [28] 唐超智,贡小静,张亚捷,等.茶多酚对小鼠小肠黏膜组织结构及5-羟色胺分泌的影响[J].*河南师范大学学报(自然科学版)*,2010, 38(6):139-141.
- [29] POLEWSKI M A, ESQUIVEL-ALVARADO D, WEDDE N S, et al. Isolation and characterization of blueberry polyphenolic components and their effects on gut barrier dysfunction [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(10): 2940-2947.
- [30] CHENG Y X, WU T, TANG S X, et al. Fermented blueberry pomace ameliorates intestinal barrier function through the NF- κ B-MLCK signaling pathway in high-fat diet mice [J]. *Food & Function*, 2020, 11(4): 3167-3179.
- [31] 傅宝玉.腹泻的病因和发病机制[J].*辽宁医学杂志*,2003,4:169-171.
- [32] 陆一凡,陈宋海,王清清,等.重症急性胰腺炎患者肠黏膜屏障损伤与血清二胺氧化酶和TLR9水平及肠道菌群和其代谢产物的相关性[J].*中国微生态学杂志*,2024,36(3):292-297.
- [33] 郝鹏,郅敏.肠道通透性受损会导致黏膜愈合的IBD患者消化道症状持续存在[J].*中华炎性肠病杂志(中英文)*,2018,2(1):26-26.
- [34] BABICH H, SCHUCK A G, WEISBURG J H, et al. Research strategies in the study of the pro-oxidant nature of polyphenol nutraceuticals [J]. *Journal of Toxicology*, 2011, 2011: 467305.
- [35] WACLAWIKOVÁ B, BULLOCK A, SCHWALBE M, et al. Gut bacteria-derived 5-hydroxyindole is a potent stimulant of intestinal motility via its action on L-type calcium channels [J]. *PLOS Biology*, 2021, 19(1): e3001070.
- [36] ZHANG Y, LI W W, WANG Y, et al. Investigation of the material basis and mechanism of Lizhong decoction in ameliorating ulcerative colitis based on spectrum-effect relationship and network pharmacology [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2024, 323: 117666.
- [37] 侯娅芳,王瑞生,张振凌,等.基于UHPLC-Q-Orbitrap HRMS及16S rDNA测序的肠道菌群研究香梅丸治疗溃疡性结肠炎的作用机制[J].*中国中药杂志*,2025,4:36-49.
- [38] CALABRESE E J, PRESSMAN P, HAYES A W, et al. Do the hormetic effects of chlorogenic acid mediate some of the beneficial effects of coffee? [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2025, 406: 111343.
- [39] GONG X X, SU X S, ZHAN K, et al. The protective effect of chlorogenic acid on bovine mammary epithelial cells and neutrophil function [J]. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101(11): 10089-10097.
- [40] DU W Y, CHANG C, ZHANG Y, et al. High-dose chlorogenic acid induces inflammation reactions and oxidative stress injury in rats without implication of mast cell degranulation [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2013, 147(1): 74-83.