

基于主成分分析结合正交设计的百药煎纯菌种发酵炮制工艺研究

曹文文^{1,2}, 王瑞生^{1,2,3,4*}, 李柯柯⁵, 张振凌^{1,2,3,4,6}

1. 河南中医药大学, 河南 郑州 450008
2. 豫药全产业链研发河南省协同创新中心, 河南 郑州 450008
3. 河南省中药特色炮制技术工程研究中心, 河南 郑州 450008
4. 河南省中药饮片炮制中医药重点实验室, 河南 郑州 450008
5. 永城市中心医院, 河南 商丘 476610
6. 呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心, 河南 郑州 450008

摘要: 目的 优化百药煎的纯菌种发酵工艺, 以实现百药煎质量稳定、可控, 保证临床应用安全、有效, 为国家及地方炮制规范提供技术支持。方法 收集根霉曲、宝山酒曲、中药特曲、红薯酒曲和安琪酿酒曲; 采用酒曲发酵百药煎, 以百药煎中没食子酸含量和外观性状为指标, 筛选最佳发酵酒曲; 从筛选出的酒曲分离发酵优势菌种, 采用显微形态学及分子生物学方法对菌种进行鉴定; 采用 $L_9(3^4)$ 正交设计, 以发酵温度、发酵时间、菌种接种量作为考察因素, 以百药煎中没食子酸、(-)-表没食子儿茶素、没食子酸甲酯、2,4,6-三-*O*-没食子酰- α -*D*-葡萄糖、2,4,6-三-*O*-没食子酰- β -*D*-葡萄糖的含量作为考察指标, 采用主成分分析 (principal component analysis, PCA) 法对 5 种成分进行综合评价, 以计算出的总因子得分 (F) 为综合指标, 对百药煎的纯菌种发酵工艺进行优化。结果 5 种酒曲发酵百药煎中没食子酸质量分数分别为 14.41%、13.73%、9.41%、9.78%、7.16%, 根霉曲发酵百药煎表面长有白色菌丝, 与传统发酵百药煎性状最接近。从根霉曲中分离出 1 个菌种, 菌丝无隔膜, 具分枝和假根, 顶端有孢子囊, 孢子囊近似球状, 孢子呈球形或近似球状; 测序结果通过 BLAST 与 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) GenBank 数据库中的菌株序列进行比对, 结合传统的形态学鉴定和分子生物学鉴定, 最终鉴定结果为米根霉 *Rhizopus oryzae*。正交法优化米根霉发酵百药煎最佳工艺为每五倍子粉末 100 g, 加绿茶 10 g, 茶叶加 15 倍量蒸馏水煎煮 20 min, 煎煮 3 次, 过滤, 合并滤液, 浓缩约 100 mL; 将茶渣、适量茶汁与五倍子粉混合均匀制软材, 使软材含水量约 45%, 并于 115 °C 高压蒸汽灭菌锅中灭菌 30 min, 放凉; 接种 9% 浓度为 1×10^8 个/mL 的米根霉孢子混悬液, 在温度 34 °C、湿度 85% 的条件下发酵时间 52 h, 取出, 烘干。5 种成分没食子酸、(-)-表没食子儿茶素、没食子酸甲酯、2,4,6-三-*O*-没食子酰- α -*D*-葡萄糖、2,4,6-三-*O*-没食子酰- β -*D*-葡萄糖含量高。结论 纯菌种米根霉发酵的百药煎工艺稳定, 可以为纯种发酵百药煎的规范化的生产提供依据和指导。

关键词: 百药煎; 米根霉; 纯菌种发酵; 工艺研究; 没食子酸; (-)-表没食子儿茶素; 没食子酸甲酯; 2,4,6-三-*O*-没食子酰- α -*D*-葡萄糖; 2,4,6-三-*O*-没食子酰- β -*D*-葡萄糖

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)21-7257-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.21.007

Pure strain fermentation process of Baiyaojian based on principal component analysis combined with orthogonal design

CAO Wenwen^{1,2}, WANG Ruisheng^{1,2,3,4}, LI Keke⁵, ZHANG Zhenling^{1,2,3,4,6}

1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China
2. Collaborative Innovation Center of Research and Development on the Whole Industry Chain of Yu Yao, Henan Province, Zhengzhou 450008, China
3. Henan Engineering Research Center of Chinese Traditional Medicine Special Processing Technology, Zhengzhou 450008, China
4. Henan Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Decoction Pieces Processing, Zhengzhou 450008, China
5. Central Hospital of Yongcheng, Shangqiu 476610, China

收稿日期: 2024-05-21

基金项目: 河南省级科技研发计划联合基金项目 (222301420076); 国家重点研发计划 (2018YFC1707200); 国家公益性行业专项 (00104296)

作者简介: 曹文文, 博士研究生, 研究方向为中药炮制药效物质基础研究。Tel: (0371)65676656 E-mail: caowenwen3529@163.com

*通信作者: 王瑞生, 讲师, 从事中药饮片质量及炮制作用机制研究。Tel: (0371)65676656 E-mail: wrsh900226@163.com

6. Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases co-constructed by Henan Province & Education Ministry of P.R. China, Zhengzhou 450008, China

Abstract: Objective Optimizing the pure strain fermentation process of Baiyaojian to achieve stable and controllable quality of Baiyaojian and ensure safe and effective clinical application, and provide technical support for national and local processing standards.

Methods Collecting *Rhizopus koji*, *Baoshan koji*, Traditional Chinese Medicine special *koji*, Sweet Potato *koji*, and Angel *koji*. Using the above five types of *koji* to ferment Baiyaojian, selecting the best fermented *koji* based on the appearance characteristics and gallic acid content of Baiyaojian. Isolating the dominant fermentation strains from the screened *koji*, and identifying the strains by using microscopic morphology and molecular biology methods. Using $L_9(3^4)$ orthogonal design, fermentation temperature, fermentation time, and strain inoculation amount were used as factors, the contents of gallic acid, (-)-epigallocatechin, methyl gallate, 2,4,6-tria-*O*-galloyl- α -*D*-glucose, 2,4,6-tria-*O*-galloyl- β -*D*-glucose in Baiyaojian were used as the evaluation indicator, and principal component analysis (PCA) was used to comprehensively evaluate these five components, the calculated total factor score (*F*) was used as the comprehensive indicator to optimize the pure strain fermentation process of Baiyaojian. **Results** The content of gallic acid in Baiyaojian fermented with five types of *koji* was 14.41%, 13.73%, 9.41%, 9.78%, and 7.16%, respectively. The Baiyaojian fermented by *Rhizopus koji* had white hyphae on its surface, which was closest to the traditional fermentation Baiyaojian in terms of properties. One strain was isolated from *Rhizopus koji*, with no septa in the hyphae but branching and pseudoroots. The top of the hyphae had a sporangium, which was approximately spherical in shape, and the spores were spherical or nearly spherical in shape. The sequencing results were compared with the effectively published strain sequences in the GenBank database through BLAST, combined with traditional morphological and molecular biological identification, and the final identification result was *Rhizopus oryzae*. The optimal process for Baiyaojian of *Rhizopus oryzae* fermentation was as follows: 100 g of gallnut powder, 10 g of green tea leaves added, 15 times the amount of distilled water added to the tea leaves and boiled for 20 min, boiled three times, filtered, combined with the filtrate, and the filtrate concentrated to about 100 mL. Mixing tea residue, an appropriate amount of tea juice, and gallnut powder evenly to make a soft material, with a water content of about 45%. Sterilizing the material in a high-pressure steam sterilization pot at 115 °C for 30 min and letting it cool for later use. Inoculating the sterilized soft material with a mass fraction of 9% concentration of $1 \times 10^8 \cdot \text{mL}^{-1}$ suspension of *Rhizopus oryzae* spores, which was fermented for 52 h at a temperature of 34 °C and humidity of 85%, and then removed and dried. The contents of five components gallic acid, (-)-epigallocatechin, methyl gallate, 2,4,6-tria-*O*-galloyl- α -*D*-glucose, 2,4,6-tria-*O*-galloyl- β -*D*-glucose were high. **Conclusion** The fermentation process of Baiyaojian by *Rhizopus oryzae* is stable, which can provide a basis and guidance for the standardized production of Baiyaojian by pure fermentation.

Key words: Baiyaojian; *Rhizopus oryzae*; pure strain fermentation; process research; gallic acid; (-)-epigallocatechin; methyl gallate; 2,4,6-tria-*O*-galloyl- α -*D*-glucose; 2,4,6-tria-*O*-galloyl- β -*D*-glucose

百药煎是由五倍子 *Galla Chinensis*、绿茶、酒糟或酒曲经发酵而成的块状物，具有润肺化痰、止血止泻、解热生津的功效^[1]。百药煎药用记录首载于《太平惠民和剂局方》，其炮制方法首见于明·陈嘉谟《本草蒙荃》^[2-3]。现代研究多集中于五倍子发酵为百药煎后化学成分和药理作用的变化^[4-12]，其炮制工艺多以酒糟或酒曲发酵，如《河南省中药饮片炮制规范》2022 年版、《四川省中药饮片炮制规范》2015 年版、《江苏省中药饮片炮制规范》2020 年版、《浙江省中药饮片炮制规范》2015 年版记载为“酒糟”^[13-16]；《北京市中药饮片炮制规范》2023 年版、《甘肃省中药炮制规范》1980 年版、《湖北中草药炮制规范》1979 年版记载为“酒曲”^[17-19]。胡梦等^[20-21]和贾丹丹^[22]曾对传统发酵百药煎炮制过程中微生物进行了分离鉴定，并筛选出发酵过程降

解鞣质能力较强的菌种；彭璐等^[12]研究发现百药煎发酵菌种根霉菌相较于安琪曲、黑曲霉，其主要有效成分没食子酸及鞣花酸含量较高、抑菌活性较强，并在此基础上对发酵工艺进行了研究。但对于纯菌种发酵百药煎工艺，目前国内外尚无研究文献报道。本课题研究人员前期对百药煎传统发酵工艺及炮制前后化学成分、药理作用的改变，进行了较为深入的研究^[7-10]，具有较好的研究基础。

本实验通过收集不同厂家酒曲发酵百药煎，筛选发酵百药煎最佳酒曲，对优选的百药煎发酵酒曲进行菌种分离及鉴定，以五倍子发酵后百药煎中含量升高的 5 个成分^[10]：没食子酸、没食子酸甲酯、(-)-表没食子儿茶素、2,4,6-三-*O*-没食子酰- α -*D*-葡萄糖（2,4,6-tria-*O*-galloyl- α -*D*-glucose，TGαG）、2,4,6-三-*O*-没食子酰- β -*D*-葡萄糖（2,4,6-tria-*O*-

galloyl- β -D-glucose, TG β G) 作为考察指标, 结合外观性状, 对所分离的单一菌种进行纯种发酵百药煎工艺优化, 为纯种发酵百药煎质量标准研究提供研究基础, 同时为中药发酵饮片纯菌种发酵工艺研究提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters 717 型高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; ZHPL-200 型立式恒温振荡培养箱、MJL-250 型霉菌培养箱、HWS-250 型恒温恒湿培养箱, 天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司; BT25S 型十万分之一电子分析天平, 赛多利斯科学仪器有限公司; KQ-500DV 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; LDZX-75KBS 型立式压力蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂; SW-CJ-1F 型单人双面净化工作台, 上海苏净实业有限公司。

1.2 药物与试剂

五倍子, 批号 160429, 安徽石田中药饮片有限公司, 经河南中医药大学张振凌教授鉴定, 为漆树科盐肤木属植物盐肤木 *Rhus chinensis* Mill. 叶上的虫瘿, 符合《中国药典》2020 年版五倍子项下的各项规定; 根霉曲, 批号 20160822, 海丰新隆制曲厂; 宝山酒曲、中药特曲、红薯酒曲, 批号分别为 20160901、20160902、20160903, 广西全州县石塘镇宝山酒曲厂; 安琪酿酒曲, 批号 20160822, 湖北宜昌安琪有限公司; 茶叶, 批号 20160810, 信阳绿茶厂; 马铃薯葡萄糖培养基 (批号 20171108)、琼脂粉 (批号 20161102), 北京奥博星生物技术有限责任

公司; 对照品没食子酸、(-)-表没食子儿茶素、没食子酸甲酯, 批号分别为 PS08121401、PS000167、PS161028-01, 质量分数均 $\geq 98\%$, 成都普斯生物科技有限公司; 对照品 TG α G、TG β G, 批号分别为 140801、140802, 质量分数均 $\geq 98\%$, 实验室自制; 甲醇, 批号 20160718, 色谱纯, 美国 Tedia 公司; 甲醇、磷酸、丙三醇, 批号分别为 20160408、20160316、201606513, 分析纯, 天津市富宇精细化工有限公司; 无水葡萄糖, 批号 160008, 分析纯, 天津市风船化学试剂科技有限公司; 乳酸, 批号 201607812, 分析纯, 天津市河东区红岩试剂厂; 苯酚, 批号 201610031, 分析纯, 开封化学试剂总厂。

2 方法与结果

2.1 最佳发酵酒曲筛选

采用收集的不同酒曲发酵百药煎, 以百药煎外观性状结合没食子酸含量, 筛选出最佳发酵酒曲。

2.1.1 酒曲发酵百药煎样品制备^[23] 称取五倍子细粉 200 g, 绿茶叶 20 g 各 5 份, “1.2” 项下 5 种酒曲各 60 g; 茶叶加 20 倍量蒸馏水煎煮 15 min, 滤过, 五倍子粉末与相应的酒曲混匀后, 加茶渣与适量茶汁制 “握之成团, 掷之即散” 的软材, 置于温度 30 $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 85% 恒温恒湿箱中发酵至表面遍布白霉, 取出, 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘干, 编号依次为 Y1~Y5。

2.1.2 没食子酸含量测定 参考文献中没食子酸含量测定方法^[13], 取 Y1~Y5 号百药煎样品, 测定百药煎样品中没食子酸含量。根据不同酒曲发酵百药煎中没食子酸含量并结合外观性状, 筛选出最佳发酵酒曲为根霉曲。结果见表 1。

表 1 不同酒曲发酵百药煎中没食子酸含量及其外观性状

Table 1 Gallic acid content and appearance characteristics in Baiyaojian fermented with different types of koji

样品编号	酒曲种类	样品质量/mg	水分/%	没食子酸/%	外观性状
Y1	根霉曲	200.9	4.8	14.41	表面长有菌丝白色菌落
Y2	宝山酒曲	200.2	6.1	13.73	软材表面长少量白色菌落, 菌落中央浅黄, 具少量黑色孢子
Y3	中药特曲	200.6	4.7	9.41	菌落较小, 布满表面, 白色
Y4	红薯酒曲	200.6	4.5	9.78	土黄色菌丝及孢子布满软材表面
Y5	安琪酿酒曲	200.2	7.2	7.16	表面布满白色菌丝, 稍变黄, 长有少量黑色孢子

2.2 发酵优势菌种筛选

2.2.1 马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA) 配制 称取 37.0 g, 加入 1 000 mL 蒸馏水中, 加热煮沸溶解, 分装至锥形瓶中, 121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min, 备用^[24]。

2.2.2 乳酸-石炭酸棉兰染色液配制 取苯酚 10 g, 乳酸 10 g, 甘油 20 g, 棉兰 0.05 g, 蒸馏水 10 mL, 将苯酚置于水浴中加热至结晶溶解, 然后加入乳酸、

甘油和棉兰混匀, 即可^[25]。

2.2.3 菌种分离 称取 “2.1” 项下筛选出的最佳发酵酒曲 10 g, 加入 90 mL 无菌水中, 置恒温振荡箱中以 180 r/min 振荡 30 min, 混匀。无菌操作下移取 200 μL , 接种到 PDA 培养基上, 置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 霉菌培养箱中培养 2~3 d, 分离纯化菌株。并用 30% 甘油水溶液 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存^[26]。

2.2.4 菌种鉴定

(1) 传统菌落形态观察：将保藏于 30%甘油水溶液中的菌种用接种环接种于 PDA 培养基上，然后置于 30 °C 霉菌培养箱中培养 2~3 d，观察菌落形态^[27]。分离纯化出具有根霉典型特征的菌株 1 株，菌种在 PDA 平板上 30 °C 培养 48 h 后，培养基表面长出白色透明菌丝，60 h 后，白色菌丝长满整个培养基表面，白色，繁密，呈棉絮状，并生长许多黑色孢子。结果见图 1。

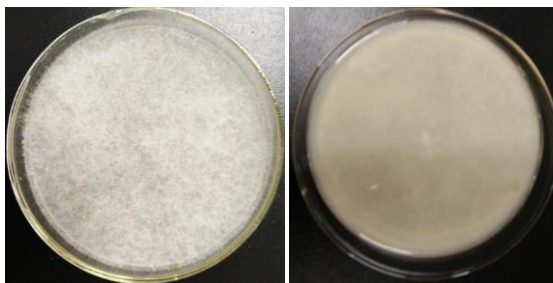


图 1 菌种平板菌落正面及反面观察照片

Fig. 1 Observation photos of front and back of strain plate colonies

(2) 显微结构观察：采用插片培养法，将菌种接种于 PDA 平板培养基上的盖玻片与培养基交界处，置于 30 °C 恒温培养箱中培养，待菌丝生长附着到盖玻片上，用无菌镊子拔取盖玻片，经乳酸-石炭酸棉兰染色液染色后，置于显微镜下观察真菌结构^[28]。显微镜下显示菌丝无隔膜，具分枝和假根，顶端有孢子囊，孢子囊近似球状，孢子呈球形或近似球状。结果见图 2。

(3) 现代分子生物学鉴定：委托中国典型培养物保藏中心对菌种进行分子生物学鉴定。将 18S

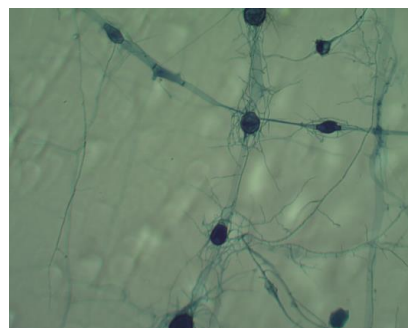


图 2 菌种显微形态照片 (10×10)

Fig. 2 Microscopic morphology photos of strain (10 × 10)

rDNA 测序结果提交到 (美国) 国家生物技术信息中心 NCBI GenBank 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) 中进行 BLAST 搜索，找到典型的菌株系列，用 Clustal X2.0 软件进行同源性比较，将开始和末尾处长短不同的序列剪切整齐，以避免因序列前后参差不齐而增加序列间的差异，生成 aln 文件。利用 Mega 5.03 软件中的种间、种内遗传距离 (kimura 2-parameter distance, K2P) 计算各类群间的核苷酸差异，运行 1 000 次 bootstrap 构建进化树^[29] 并采用 Meta 5.03 软件构建系统发育树，结合传统的形态学鉴定和分子生物学鉴定，最终鉴定结果为米根霉 *Rhizopus oryzae*，命名为 BYJ.G-1。结果见图 3。

2.3 纯菌种发酵百药煎工艺研究

2.3.1 菌种活化及孢子混悬液的制备^[30-31] 将菌种活化于 PDA 平板培养基上，培养 3~4 d 待菌落长满平板时，用 10 μL 接种环刮取 4 环孢子置于含 100 mL 无菌水的锥形瓶 (内含玻璃珠) 中，置于 30 °C、180 r/min 的恒温振荡箱中振荡混匀 2 h，将孢子混

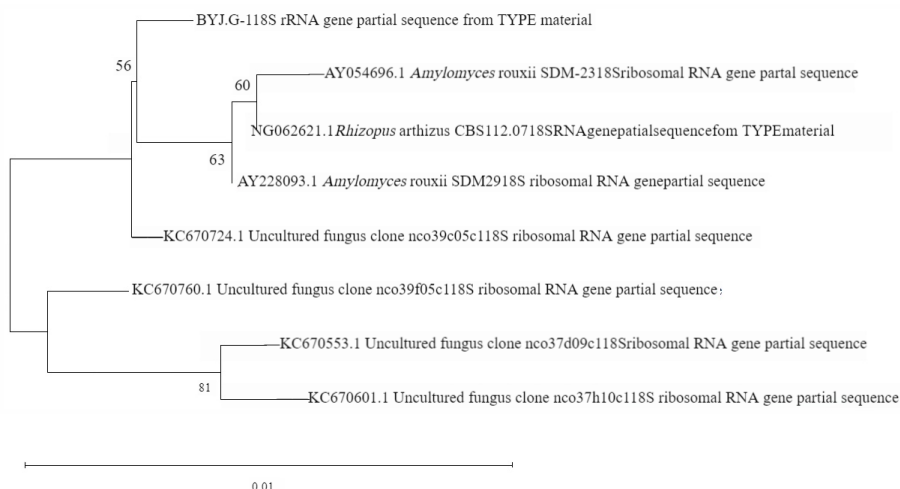


图 3 BYJ.G-1 菌种系统发育树

Fig. 3 BYJ.G-1 strain phylogenetic tree

悬液浓度稀释至 1×10^8 个/mL。

2.3.2 菌丝球质量的测定 吸取上述孢子混悬液 5 mL，置于含 60 mL 马铃薯葡萄糖培养基的锥形瓶中，180 r/min、30 ℃ 振荡培养 10 d，每天取 2 份，迅速恢复到室温，使用抽滤装置，用已恒定质量的滤纸滤过并收集菌丝球，将滤后的菌丝球反复用蒸馏水冲洗数次，将上述洗净后的菌丝球连同滤纸于 60 ℃ 的烘箱中充分烘干至恒定质量，用电子天平称其干质量^[32]。振荡培养 1~2 d，菌种生长速率最快，日生长量最高达到 334.0 mg；培养 2~4 d 菌丝球质量相对稳定，日生长量逐天降低；菌种培养到第 5 天后，培养液开始发黄并渐变红，菌丝球质量出现负增长，应是营养物质的大量消耗，使得营养物质比例失调，不利于菌种生长，开始产生有害物质。因此选择第 4 天作为最佳接种天数，微生物生长速度快，代谢旺盛，细胞代谢产物积累达到最高峰，酶系活跃。结果见图 4。

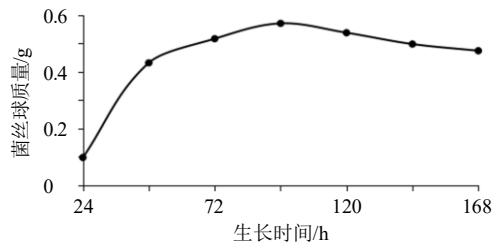


图 4 菌种生长曲线

Fig. 4 Growth curve of strain

2.3.3 单因素试验

(1) 不同发酵时间对百药煎中没食子酸含量的影响：在 30 ℃、相对湿度 85% 的条件下发酵，每隔 12 h 取出，定量，烘干，粉碎，测定没食子酸的含量，结果见表 2。随着发酵时间的延长，没食子酸含量先升高后降低，48 h 时含量最高，为 13.39%；超过 48 h 后，百药煎表面开始出现大量黑色孢子，因此选择 48 h 为最佳发酵时间。

(2) 不同发酵温度对百药煎中没食子酸含量的影响：分别在 28、30、32、34 ℃，相对湿度 85% 的条件下发酵 48 h，结果见表 3。在 30 ℃ 下发酵，百药煎中没食子酸含量最高，达 41.00%。

(3) 不同菌种接种量对百药煎中没食子酸含量的影响：分别添加 5%、7%、9%、11% 菌种，在 30 ℃、相对湿度 85% 的条件下发酵 48 h，结果见表 4，菌种接种量为 9% 时，没食子酸含量最高，达 41.40%。

2.3.4 百药煎中 5 种成分含量测定方法的建立

(1) 色谱条件：色谱柱为 Waters Symmetry

表 2 不同发酵时间对百药煎中没食子酸含量的影响

Table 2 Effect of different fermentation time on content of gallic acid in Baiyaojian

发酵时间/h	样品质量/mg	水分/%	没食子酸/%
0	200.1	7.4	5.24
12	200.6	9.7	6.93
24	200.3	7.9	10.69
36	200.7	8.8	12.86
48	200.9	8.7	13.39
60	200.9	7.1	13.25
72	200.2	7.5	12.16

表 3 不同发酵温度对百药煎中没食子酸含量的影响

Table 3 Effect of different fermentation temperatures on content of gallic acid in Baiyaojian

发酵温度/℃	样品质量/mg	水分/%	没食子酸/%
28	200.6	6.4	38.13
30	200.4	4.9	41.00
32	200.6	4.3	32.62
34	200.6	5.2	35.12

表 4 不同菌种接种量对百药煎中没食子酸含量的影响

Table 4 Effect of different inoculation amounts of strains on content of gallic acid in Baiyaojian

菌种接种量/%	样品质量/mg	水分/%	没食子酸/%
5	200.8	7.2	22.92
7	200.6	6.8	25.87
9	200.7	4.1	41.40
11	200.9	6.8	24.23

Shield™ RP₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相为乙腈-0.1%三氟乙酸水溶液，梯度洗脱：0~40 min, 10%~16%乙腈；40~41 min, 16%~18%乙腈；41~55 min, 18%~19%乙腈；55~75 min, 19%~24%乙腈；75~90 min, 24%~10%乙腈；体积流量 0.8 mL/min；检测波长 280 nm；柱温 30 ℃；进样量 6 μL。

(2) 供试品溶液的制备：精密称取纯菌种发酵百药煎样品（过 4 号筛）0.2 g，置 100 mL 锥形瓶中，精密加入甲醇 50 mL，称定质量，放置 2 h，超声提取 40 min，放凉 30 min，补足减失的质量，滤过，取续滤液，过 0.22 μm 微孔滤膜，即得供试品溶液。

(3) 混合对照品溶液的制备：精密称取没食子酸甲酯对照品 5.13 mg，置于 5 mL 量瓶中，加甲醇定容至刻度，摇匀，制成质量浓度为 1.026 mg/mL 的没食子酸甲酯对照品溶液。另精密称取没食子酸

对照品 7.64 mg, (-)-表没食子儿茶素对照品 5.29 mg, TGαG、TGβG 对照品各 2.15 mg, 并精密移取上述没食子酸甲酯对照品溶液 0.5 mL, 置于同一 5 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 作为混合对照品溶液 1。精密移取 1 mL 混合对照品溶液 1 置于 5、10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 作为混合对照品溶液 2、3; 从混合对照品溶液 2 中精密移取 1 mL 置于 5 mL 量瓶中, 同上操作, 作为混合对照品溶液 4; 从混合对照品溶液 3 中精密移取 1 mL 置于 5 mL 量瓶中, 同上操作, 作为混合对照品溶液 5, 制成系列质量浓度的混合对照品溶液。

(4) 线性关系考察: 分别精密吸取系列质量浓度的混合对照品溶液 6 μL, 注入液相色谱仪, 按“2.3.4 (1)”项下色谱条件测定, 以进样量为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得回归方程: 没食子酸 $Y=3\ 142\ 774 X+133\ 903$, $R^2=0.999\ 9$, 线性范围 98.3~7 962.6 ng; (-)-表没食子儿茶素 $Y=185\ 295 X-7\ 156$, $R^2=0.999\ 9$, 线性范围 242.6~3 882.2 ng; 没食子酸甲酯 $Y=342\ 220 X-16\ 945$, $R^2=0.999\ 8$, 线性范围 12.3~618.0 ng; TGαG $Y=1\ 056\ 954 X-34\ 385$, $R^2=0.999\ 3$, 线性范围 48.9~1 270.5 ng; TGβG $Y=1\ 717\ 844 X-58\ 584$, $R^2=0.999\ 3$, 线性范围 48.9~1 270.5 ng。

(5) 精密度试验: 取纯菌种发酵百药煎样品 1 份, 按“2.3.4 (2)”项下方法制成供试品溶液, 按“2.3.4 (1)”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录各成分峰面积, 计算其 RSD 值, 检验仪器精密度。结果没食子酸、(-)-表没食子儿茶素、没食子酸甲酯、TGαG、TGβG 峰面积的 RSD 分别为 0.16%、0.33%、3.76%、2.92%、1.00%, 结果表明该仪器精密度良好。

(6) 稳定性试验: 取同一纯菌种发酵百药煎样品 1 份, 按“2.3.4 (2)”项下方法制成供试品溶液, 按“2.3.4 (1)”项下色谱条件, 分别于制备后 0、3、6、9、12、24 h 进样分析, 记录各成分峰面积, 计算其 RSD 值, 检验供试品溶液制备方法的稳定性。结果没食子酸、(-)-表没食子儿茶素、没食子酸甲酯、TGαG、TGβG 峰面积的 RSD 分别为 0.20%、0.99%、4.62%、4.35%、3.44%, 结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

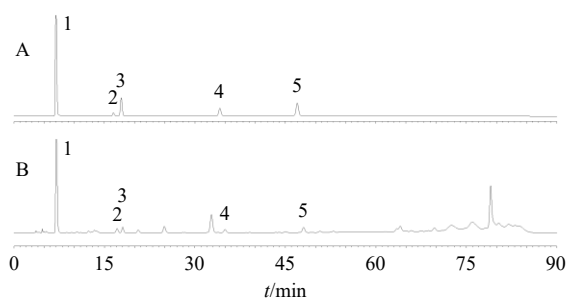
(7) 重复性试验: 精密称取同一纯菌种发酵百药煎样品 6 份, 按“2.3.4 (2)”项下方法制成供试品溶液, 按“2.3.4 (1)”项下色谱条件测定, 记录

各成分峰面积, 计算其质量分数及 RSD 值。结果没食子酸、(-)-表没食子儿茶素、没食子酸甲酯、TGαG、TGβG 质量分数的 RSD 分别为 1.31%、2.98%、4.79%、1.93%、4.01%, 结果表明该方法重复性良好。

(8) 加样回收率试验: 精密称取已测知 5 种成分含量的百药煎样品 0.1 g, 平行称定 6 份, 分别加入质量浓度为 8.23 mg/mL 的没食子酸对照品溶液 1.44 mL, 质量浓度为 1.81 mg/mL 的 (-)-表没食子儿茶素对照品溶液 1.13 mL, 质量浓度为 1.12 mg/mL 的没食子酸甲酯对照品溶液 0.80 mL, 质量浓度为 0.92 mg/mL 的 TGαG 对照品溶液 0.26 mL, 质量浓度为 0.92 mg/mL 的 TGβG 对照品溶液 0.26 mL, 按“2.3.4 (2)”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3.4 (1)”项下色谱条件进样测定, 计算加样回收率。结果没食子酸、(-)-表没食子儿茶素、没食子酸甲酯、TGαG、TGβG 的平均加样回收率分别为 98.93%、98.85%、96.98%、98.16%、97.90%, RSD 分别为 0.12%、0.33%、3.32%、2.13%、3.67%, 结果表明该方法的准确度良好。

(9) 含量测定: 按“2.3.4 (2)”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3.4 (1)”项下色谱条件进行测定, 计算百药煎样品中 5 种成分含量。混合对照品及百药煎样品的 HPLC 图见图 5。

2.3.5 正交设计优化纯菌种发酵百药煎的工艺 以发酵温度 (A)、发酵时间 (B)、菌种接种量 (C) 作为考察因素, 根据单因素实验结果确定各因素取值范围; 以百药煎中没食子酸、(-)-表没食子儿茶素、没食子酸甲酯、TGαG、TGβG 的含量作为考察指标, 采用主成分分析 (principal component analysis, PCA) 法对 5 种成分进行综合评价, 以计算出的总因子得



1-没食子酸; 2-(-)-表没食子儿茶素; 3-没食子酸甲酯; 4-TGαG; 5-TGβG。
1-gallie acid; 2-(-)-epigallocatechin; 3-methyl gallate; 4-TGαG; 5-TGβG.

图 5 混合对照品 (A) 和百药煎样品 (B) 的 HPLC 图
Fig. 5 HPLC of mixed reference substances (A) and Baiyaojian sample (B)

分 (F) 为综合指标, 对百药煎纯菌种发酵工艺进行优化。 F 即为各主成分因子得分与相应方差贡献率乘积之和相加, 计算公式 $F=F_1C_1+F_2C_2$, 式中 F_1 、 F_2 为各主成分因子得分, C_1 、 C_2 为相应方差贡献率。采用 3 因素 3 水平进行 9 次试验, 选用 $L_9(3^4)$ 正交设计表^[24-25], 因素水平、实验设计及结果见表 5、6。

表 5 $L_9(3^4)$ 正交试验设计及结果
Table 5 $L_9(3^4)$ orthogonal experimental design and results

试验号	A/℃	B/h	C/%	D (空白)	质量分数/(mg·g ⁻¹)					F 值
					没食子酸	(-)-表没食子儿茶素	没食子酸甲酯	TGaG	TGβG	
1	30 (1)	44 (1)	7 (1)	(1)	151.06	36.89	5.01	13.64	9.55	0.007 22
2	30 (1)	48 (2)	9 (2)	(2)	126.40	20.71	6.00	6.08	4.54	-0.624 31
3	30 (1)	52 (3)	11 (3)	(3)	133.30	34.69	6.89	8.70	6.48	-0.359 35
4	32 (2)	44 (1)	9 (2)	(3)	138.93	33.35	6.84	10.19	7.75	-0.251 54
5	32 (2)	48 (2)	11 (3)	(1)	109.83	14.31	8.33	25.37	3.29	-0.503 87
6	32 (2)	52 (3)	7 (1)	(2)	117.99	20.45	8.76	5.37	4.31	-0.728 84
7	34 (3)	44 (1)	11 (3)	(2)	189.24	71.04	6.97	19.92	15.68	0.853 94
8	34 (3)	48 (2)	7 (1)	(3)	173.42	64.31	8.12	14.91	11.74	0.437 40
9	34 (3)	52 (3)	9 (2)	(1)	205.39	101.09	7.80	19.83	15.75	1.169 35
K_1	-0.325	0.203	-0.095	0.224						
K_2	-0.495	-0.230	0.098	-0.166						
K_3	0.820	0.027	-0.003	-0.058						
R	1.315	0.433	0.193	0.390						

表 6 方差分析
Table 6 Variance analysis

方差来源	偏差平方和	自由度	F 比	显著性
A	3.070	2	12.582	<0.10
B	0.285	2	1.168	
C	0.056	2	0.230	
D (误差)	0.240	2		

$F_{0.10}(2, 2)=9.00$; $F_{0.05}(2, 2)=19.00$

2.3.6 试验结果及数据处理 将正交设计试验结果输入 SPSS 19.0 软件, 进行 PCA, 解释的总方差见表 7, 成分得分系数矩阵见表 8, 成分得分协方差矩阵见表 9。软件默认特征值大于 1 的成分作为主成分, 由表 7 可知, 前 2 个成分的特征值皆大于 1, 并集中了原始变量 86.599% (>85%) 的信息, 能够较好地解释原始变量, 故选择前 2 个成分作为主成分。由表 8 可知, 主成分是经过标准化且 2 个主成分之

表 7 解释的总方差

Table 7 Total variance of explanation

成分	初始特征值		
	合计	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	3.177	63.540	63.540
2	1.153	23.059	86.599
3	0.635	12.696	99.295
4	0.033	0.653	99.949
5	0.003	0.051	100.000

表 8 成分得分系数矩阵

Table 8 Component score coefficient matrix

指标成分	得分系数				
	1	2	3	4	5
没食子酸	0.382	-0.094	0.028	0.140	-16.005
表没食子儿茶	0.354	-0.087	-0.010	3.755	8.147
没食子酸甲酯	0.038	-0.150	1.030	-0.706	-0.831
TGaG	-0.207	1.111	-0.136	0.241	-0.341
TGβG	0.343	-0.097	0.037	-3.992	8.176

表 9 主成分得分协方差矩阵

Table 9 Principal component score covariance matrix

主成分	1	2
1	1.000	0.000
2	0.000	1.000

间互不相关。总因子得分 $F=0.635 40 F_1+0.230 59 F_2$ 。由直观分析可知, 影响米根霉发酵百药煎的因素主次为 $A>B>C$ 。因素 C 的极差 (绝对值) 小于空白列极差 (绝对值), 说明因素 C 对指标没有显著性的影响。取各因素最高水平组合, 得到最佳工艺条件 $A_3B_1C_2$, 即发酵温度 34 ℃, 发酵时间 44 h, 接种量 9%。

2.3.7 验证试验 平行称定五倍子粉末 100 g 3 份, 按照正交实验优选的百药煎发酵条件进行发酵, 发酵过程中发现, 发酵 44 h 后, 软材表面刚长出一层

浅白霜，故将发酵时间延长至 48、52、56、60 h，并进行含量测定。结果表明，百药煎发酵 52 h，软材表面长满厚白霜，没食子酸等 5 种成分的含量较高，再延长发酵时间，软材表面开始长出黑色孢子，故将发酵时间确定为 52 h，见图 6。进行 3 次验证

试验，取发酵结束后样品，测定没食子酸、(-)-表没食子儿茶素、没食子酸甲酯、TGαG、TGβG 共 5 种成分含量，计算总因子得分 *F*，结果见表 10，平均 *F* 值为 0.750 7，大于正交试验中各组 *F* 值，说明优选的百药煎纯种发酵工艺稳定可行。

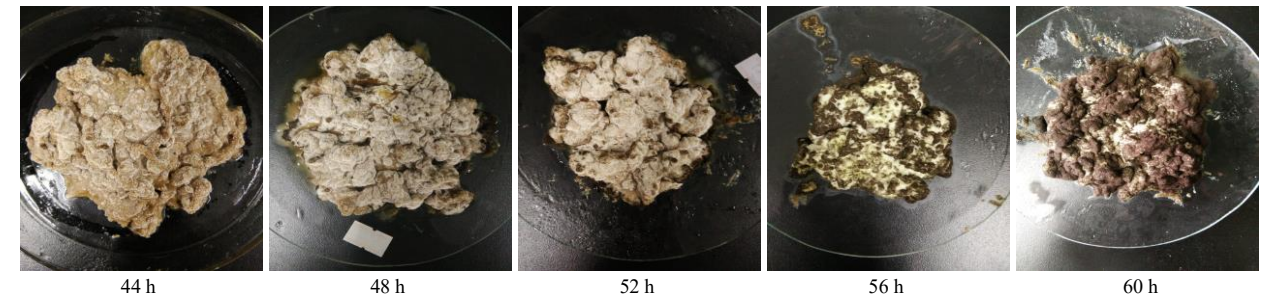


图 6 不同发酵时间百药煎外观性状

Fig. 6 Appearance characteristics of Baiyaojian with different fermentation time

表 10 验证试验结果

Table 10 Validation test results

试验号	质量分数/(mg·g ⁻¹)					<i>F</i> 值	平均 <i>F</i> 值
	没食子酸	(-)-表没食子儿茶素	没食子酸甲酯	TGαG	TGβG		
1	265.82	69.83	14.19	15.75	19.10	0.567 3	0.750 7
2	269.45	127.11	16.23	17.52	19.84	0.881 5	
3	264.94	140.20	12.16	17.16	18.92	0.803 5	

3 讨论

中药发酵技术是利用微生物代谢酶对中药活性成分进行降解、结构修饰和转化的一种技术。现代中药发酵是在传统中药发酵的基础上，结合发酵工程、微生物工程及生物工程等学科而发展起来的中药生物转化技术。中药材经合适的发酵菌种和发酵条件处理后，发酵菌代谢酶可消化中药植物细胞壁以释放中药中的活性成分、生物转化中药毒副成分以降解毒副作用、生成更多生物活性小分子以提高药效^[33]。传统中药发酵为自然开放的发酵体系，依靠空气中的微生物或者以其他方式接种微生物，所以参与发酵的菌种复杂，影响发酵中药的品质与安全性。现代中药发酵融入现代生物工程技术后，中药发酵进入明确菌种、筛选优良发酵菌种阶段^[34]。本实验以传统酒曲发酵百药煎工艺为基础，从优选出的发酵酒曲中分离鉴定出发酵百药煎关键菌种，建立了百药煎纯菌种发酵工艺，提高了百药煎发酵过程中鞣质转化率。发酵前五倍子中鞣质含量高达 70% 以上，易与蛋白质结合形成不溶于水的大分子沉淀物，少数人服用会因大分子沉淀物刺激胃肠黏膜引起食欲不振等不良反应；本研究以纯种米根霉作为发酵菌种，根霉菌能促进 *L*-赖氨酸的生成，进

而促进胃肠道黏膜吸收食物中的蛋白质，避免鞣酸在胃肠道内竞争性消耗，降低了胃肠道刺激性。

百药煎是一种中药发酵炮制品，影响其发酵品质量的因素有发酵基质、发酵条件及发酵菌种。本实验研究中前期单因素考察了发酵温度、发酵时间、菌种接种量、软材灭菌温度、灭菌时间对百药煎发酵的影响。结果表明，软材在 115 ℃ 灭菌 30 min 相比于 121 ℃ 灭菌 20 min，发酵后百药煎中没食子酸等化学成分的含量较高，可能是由于五倍子粉经过高温处理，某些成分裂解或者发生化学反应，导致没食子酸含量升高，百药煎软材 pH 值降低，从而影响了菌种的生长能力，或者相关酶类的活性受到影响。温度低于微生物正常生长范围时，微生物生长缓慢，代谢速率低，发酵周期相对延长，温度高于微生物正常生长范围时，微生物易衰老和死亡，达不到发酵效果；发酵湿度在 80%~90% 时对百药煎发酵影响不大，而且即使在同一恒温恒湿箱的不同隔层，其湿度都是在一个小范围内波动，不能固定在某个数值上，因此本研究并没有考察发酵湿度。百药煎中没食子酸等成分的含量，随着发酵时间的延长呈现先增高后降低的动态变化。目前百药煎的质量评价多是以没食子酸的含量和外观性状为指

标,不能完整地体现百药煎的质量,可以通过调节发酵过程中温度、湿度、pH 值和发酵时间等控制没食子酸、(-)-表没食子儿茶素、TG α G、TG β G 等成分的含量作为评价百药煎质量的一种方法。

本实验建立了稳定的百药煎纯菌种发酵工艺,提高了发酵效率,但与传统自然发酵的百药煎在药理作用、药效物质基础等方面是否存在差异,仍需进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 明·李时珍.本草纲目(校点本)[M].北京:人民卫生出版社,1982:92.
- [2] 宋·太平惠民和剂局所.太平惠民和剂局方[M].上海:上海人民出版社,2005:179.
- [3] 清·陈嘉谟撰.王淑民等点校.本草蒙筌[M].北京:人民卫生出版社,1988:65.
- [4] 李南臻,王刚,万玉军,等.基于没食子酸分析的百药煎发酵炮制工艺研究[J].食品与发酵科技,2023,59(1):98-102.
- [5] 王瑞生,曹文文,张江山,等.百药煎不同菌种发酵品特征性成分差异比较及潜在分子作用机制探讨[J].中草药,2021,52(18):5524-5534.
- [6] 王瑞生,张振凌,曹文文,等.基于肠道菌群及肠黏膜屏障功能探索百药煎治疗溃疡性结肠炎的作用机制[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(20):46-54.
- [7] 陈祎甜,张振凌,王瑞生,等.五倍子发酵炮制百药煎主要药理作用比较研究[J].中华中医药学刊,2021,39(1):187-192.
- [8] 陈晶晶,张振凌,曹淼淼,等.百药煎 HPLC 指纹图谱的建立及其中 5 种成分的含量测定[J].中国药房,2020,31(2):173-178.
- [9] 王瑞生,张振凌,陈祎甜,等.基于寒热证模型大鼠研究五倍子发酵百药煎的药性变化和归属[J].中国中药杂志,2019,44(10):2084-2089.
- [10] 王瑞生,史莲莲,张振凌,等. HPLC 指纹图谱研究五倍子发酵百药煎化学成分变化[J].中草药,2017,48(18):3734-3740.
- [11] 李柯柯,张振凌,于文娜,等.百药煎发酵过程中 pH 值与没食子酸含量动态变化的研究[J].时珍国医国药,2017,28(7):1637-1639.
- [12] 彭璐,张志杰,龚千锋,等.基于成分分析及抗菌活性的百药煎炮制工艺研究[J].中草药,2016,47(21):3805-3809.
- [13] 河南省中药饮片炮制规范[S].2022:380-381.
- [14] 四川省中药饮片炮制规范[S].2015:13.
- [15] 江苏省中药饮片炮制规范(第二册)[S].2020:1-4.
- [16] 浙江省中药饮片炮制规范[S].2015:432.
- [17] 北京市中药饮片炮制规范[S].2023:16.
- [18] 甘肃省中药炮制规范[S].1980:362-363.
- [19] 湖北中草药炮制规范[S].1979:320-321.
- [20] 胡梦.百药煎传统炮制过程中微生物的分离、鉴定及降解鞣质最佳菌种组合的筛选[D].上海:中国医药工业研究总院,2018.
- [21] 胡梦,程玉冰,张培燕,等.百药煎中转化鞣质生成没食子酸的最佳菌种组合筛选[J].中国现代中药,2018,20(4):453-457.
- [22] 贾丹丹.六神曲和百药煎炮制过程中微生物分离、鉴定与特性分析[D].上海:中国医药工业研究总院,2016.
- [23] 杨婷,黄莹莹,方杨冰,等.基于 AHP-熵权法结合正交试验设计优选岭南特色饮片制积壳的发酵工艺及发酵前后成分对比研究[J].中草药,2022,53(20):6443-6450.
- [24] 戴家齐,贺婧,朱晓蓝,等.淡豆豉中产 γ -氨基丁酸微生物对产毒黄曲霉菌的拮抗作用和毒素合成关键基因 mRNA 表达的影响[J].中草药,2024,55(5):1510-1517.
- [25] 潘洁明,玉烨,陈韦唯,等.香蕉炭疽菌拮抗菌 HSL3-29 的分离鉴定及防治效果[J].微生物学通报,2024,51(3):898-909.
- [26] 谢小丽,胡璇,陈振夏,等.高良姜精油提取工艺优化、成分分析及其生物活性研究[J].中草药,2023,54(18):5904-5915.
- [27] 张晓菲,倪晓菁,张子仪,等.响应面法优化黑曲霉固定化条件及其对土壤中溴氰菊酯的降解特性研究[J].微生物学报,2023,63(12):4574-4593.
- [28] 李世新,涂然,张永利,等.嗜热毁丝霉高通量培养技术及其应用[J].微生物学通报,2023,50(9):4180-4189.
- [29] 白雪,张永杰,张姝.洁丽新初伞的子实体培育与生物活性评价[J].微生物学通报,2024,51(3):921-934.
- [30] 许娟,徐彦军,江苏燕,等.基于响应面法对中国皱木耳菌种液体发酵培养基优化[J].菌物学报,2024,43(4):104-117.
- [31] 曹国琼,刘敏,刘耀,等.化风丹药母发酵过程中优势菌种分离鉴定及不同温度和 pH 值下菌株生长情况[J].中成药,2023,45(12):4011-4017.
- [32] 陈飞,韩冰,于广峰,等.红托竹荪菌种快速分离培养基优化[J].微生物学杂志,2023,43(6):54-61.
- [33] 海梅,何正有,肖文艳,等.中药发酵技术研究现状与展望[J].国外医药:抗生素分册,2023,44(6):361-366.
- [34] 熊艳霞,董梦依,刘文君,等.现代中药发酵研究现状及思路[J].中国当代医药,2022,29(28):33-37.

[责任编辑 郑礼胜]