

基于发酵过程中“微生物-成分”关联分析胆南星炮制机制

武旭^{1,3}, 王晶¹, 付毛毛¹, 任润馨¹, 邹婷¹, 张萌萌¹, 张桥^{1,2}, 杜升旗⁴, 王昌利^{1,2}, 孙静^{1,2}, 赵重博^{1,2*}

1. 陕西中医药大学学院/陕西省中药饮片工程技术研究中心, 陕西 咸阳 712046

2. 国家中医药管理局中药炮制技术传承基地(陕西), 陕西 咸阳 712046

3. 天津中医药大学中药学院/国家中医药管理局中药炮制技术传承基地(天津), 天津 301617

4. 陕西兴盛德药业有限责任公司, 陕西 铜川 727031

摘要: 目的 研究牛胆汁发酵天南星 *Arisaematis Rhizoma* 制备胆南星 *Arisaema cum Bile* 过程中微生物群落及化学成分的变化规律, 为其炮制机制提供研究思路。方法 采用新鲜牛胆汁发酵炮制天南星[药物-辅料 1:3, 发酵温度(30±5)℃, 发酵湿度(70±5)%], 制备不同发酵时间的胆南星样品。利用 HPLC 法对各样品中夏佛塔苷、异夏佛塔苷、黄嘌呤、尿嘧啶等 12 个成分进行含量测定, 同时采用 16S rRNA 高通量测序技术对其中微生物组成进行鉴定和考察。对“微生物-成分”进行相关性分析, 探讨两者在发酵炮制过程中的变化规律。结果 随着发酵时间的增加, 腺嘌呤、鸟苷、夏佛塔苷、腺苷、肌苷、胸腺嘧啶核苷、甘氨酸含量降低; 胆酸含量增加; 次黄嘌呤、黄嘌呤含量先增加后减少。菌群分析发现, 在门水平上主要以变形菌门、厚壁菌门和蓝藻菌门为主; 在属水平上主要以乳酸杆菌和假单胞菌为主。关联分析表明, 胆南星中化学成分与菌群(门、属)间存在显著相关, 其中腺嘌呤、胸腺嘧啶核苷与蓝藻菌门、放线菌门呈显著正相关($P<0.01$), 与变形菌门呈显著负相关($P<0.05$); 胆酸与厚壁菌门呈显著正相关($P<0.01$), 与变形菌门呈显著负相关($P<0.05$)。结论 牛胆汁发酵炮制天南星的过程中化学成分与微生物群落之间存在显著的变化规律, 为其炮制机制研究提供理论基础。

关键词: 胆南星; 发酵; 微生物群落; 化学成分; 相关性分析; 腺嘌呤; 黄嘌呤; 尿嘧啶; 次黄嘌呤; 腺苷; 鸟苷; 肌苷; 胸腺嘧啶核苷; 异夏佛塔苷; 夏佛塔苷; 胆酸; 甘氨酸

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)03-0795-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.03.007

Study on processing mechanism of *Arisaema cum Bile* based on “microorganism-component” correlation analysis of fermentation method

WU Xu^{1,3}, WANG Jing¹, FU Maomao¹, REN Runxin¹, ZOU Ting¹, ZHANG Mengmeng¹, ZHANG Qiao^{1,2}, DU Shengqi⁴, WANG Changli^{1,2}, SUN Jing^{1,2}, ZHAO Chongbo^{1,2}

1. College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine/Shaanxi Provincial Engineering Technology Research Center for Traditional Chinese Medicine Decoction Pieces, Xianyang 712046, China

2. Traditional Chinese Medicine Processing Techniques Heritage Base (Shaanxi), National Administration of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

3. School of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine/Traditional Chinese Medicine Processing Techniques Heritage Base (Tianjin), National Administration of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

4. Shaanxi Xingshengde Pharmaceutical Co., Ltd., Tongchuan 727031, China

Abstract: Objective To study the changes of microbial community and chemical composition in the preparation of *Arisaema cum Bile* by fermentation of *Arisaematis Rhizoma* from bovine bile, and to provide research ideas for its processing mechanism. **Methods**

收稿日期: 2024-09-09

基金项目: 陕西省高水平中医药重点学科中药炮制学(陕中医药函(2023)83号); 陕西省重点研发计划(2024SF-ZDCYL-03-11); 秦创原铜川“科学家+工程师”队伍建设项目(2024KJ-KXJGCS-01); 王昌利全国老药工传承工作室(国中医药人教函(2024)255号); 秦创原中医药产业创新聚集区项目(L2024-QCY-ZYYJJQ-X34)

作者简介: 武旭, 博士研究生, 从事中药炮制与饮片质量标准研究。E-mail: wuxu_145185@126.com

***通信作者:** 赵重博, 副教授, 研究生导师, 从事中药炮制与饮片质量标准研究。E-mail: zhao_chongbo@126.com

Firstly, the fresh bovine bile was used to ferment and process *Arisaema Rhizoma* [drug-excipient ratio = 1: 3, fermentation temperature $(30 \pm 5) ^\circ\text{C}$, fermentation humidity $(70 \pm 5) \%$] to prepare *Arisaema cum Bile* samples with different fermentation time. Then, HPLC was used to determine the content of 12 components including schaftoside, isoschaftoside, xanthine and uracil in the samples. As well, the 16S rRNA high-throughput sequencing technology was employed to identify and to investigate the species and the abundance of microbial communities in each *Arisaema cum Bile* sample. Finally, the correlation analysis of “microorganism-component” was carried out via mathematical algorithm, and the changed rules of them in the processing was discussed. **Results** With the increase of fermentation time, the contents of adenine, guanosine, schaftoside, adenosine, inosine, thymidine and glycocholic acid decreased, the content of cholic acid increased, the content of hypoxanthine and xanthine increased first and then decreased. The results of flora analysis showed that there were mainly Proteobacteria, Firmicutes and Cyanobacteria at the phylum level. At the genus level, there were mainly *Lactobacillus* and *Pseudomonas*. Correlation analysis showed that there was a significant correlation between the chemical component of *Arisaema cum Bile* and the fermentation flora (phylum and genus). Adenine and thymidine were significantly positively correlated with Cyanophyta and Actinobacteria ($P < 0.01$), while negatively correlated with Proteobacteria ($P < 0.05$). Cholic acid was positively correlated with Firmicutes ($P < 0.01$), and negatively correlated with Proteobacteria ($P < 0.05$). **Conclusion** There were significant changes between chemical components-microbial communities during the fermentation of *Arisaematis Rhizoma* with bovine bile processing. The results can provide a theoretical basis for the study of the processing mechanism of *Arisaema cum Bile*.

Key words: *Arisaema cum Bile*; fermentation; microbial community; chemical composition; correlation analysis; ; adenine; xanthine; uracil; hypoxanthine; adenosine; guanosine; inosine; thymidine; isoschaftoside; schaftoside; cholic acid; glycolaminocholic acid

胆南星 (*Arisaema cum Bile*, ACB) 为天南星科天南星属植物天南星 *Arisaema erubescens* (Wall.) Schott、异叶天南星 *A. heterophyllum* Bl. 或东北天南星 *A. amurense* Maxim. 的干燥块茎与胆汁共同制成, 归肺、肝、脾经, 具有清热化痰、息风定惊的功效, 用于热痰咳嗽、咯黏稠黄痰、中风痰迷等。《中国药典》2020 年版记载, 胆南星的炮制方法为制天南星的细粉与牛、羊或猪胆汁经过加工制成; 或生天南星细粉与牛、羊或猪胆汁经发酵加工后制成^[1]。可见辅料胆汁的使用混乱可能是导致其炮制机制不明的原因之一。

经文献考证和实地调研, 首载胆南星的炮制方法为“腊月酿牛胆内阴干百日”(宋·钱乙《小儿药证直诀》)^[2]。猪胆炮制胆南星的方法为“以大南星湿纸裹煨, 为末, 猪胆汁调下”(元·危亦林《世医得效方》)^[3], 该方法非发酵法炮制。工业生产中因羊胆体积小、胆汁产量少不易采集, 以猪、牛胆汁为主。团队前期研究发现, 胆南星“……阴干百日”具有一定科学性^[4], 本实验继续采用牛胆汁进行相关研究。天南星经发酵后制成胆南星, 药性由温转凉, 药味由辛变苦, 功效由温化寒痰转为清化热痰, 增强抗高热惊厥作用, 产生显著的解热作用, 且毒性降低^[5], 在其炮制原理方面, 多聚焦于炮制过程中化学成分变化的研究^[6-7]。施宇等^[8]也通过对胆南星发酵过程中的微生物进行了分离与鉴定(肠杆菌属、铅黄肠球菌、高地芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、微杆菌属、百岁兰曲霉、黄曲霉菌、肠球菌属), 在

胆南星的生产工艺及其质控等方面的研究进行了完善。在物质基础方面, 天南星含有黄酮类、生物碱类、苷类、凝集素类、甾醇及脂肪酸类等多种化学成分, 具有镇痛、镇静、抗炎、祛痰、抗肿瘤等药理作用^[9]。文献报道, 腺苷是一种内源性嘌呤核苷酸, 具有减少心肌漏出酶, 维持细胞完整性, 促进造血功能等生理活性; 腺嘌呤可防治白细胞减少症; 次黄嘌呤参与细胞内糖代谢和蛋白质合成等, 这些成分的含量可由发酵调控^[10-11]。文献研究表明, 茯苓经双向发酵、香菇经液体发酵等过程其中涉及黄酮苷类成分转化为黄酮, 总黄酮含量增加^[12-13]。本团队前期对天南星经生姜、白矾炮制前后成分变化研究发现^[14], 腺苷、次黄嘌呤和夏佛塔苷等成分发生显著变化。但在牛胆汁发酵天南星的过程中, 其活性成分如何变化, 是否与发酵过程中微生物的种类和代谢活动有关尚不清楚。基于此, 本实验以胆南星炮制过程中, 物质基础与微生物动态关联变化为切入点, 研究两者之间的潜在规律, 以期胆南星炮制机制研究提供理论基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters-2695 型高效液相色谱仪, 配备 2996 型紫外检测器, 美国 Waters 公司; LC-2030 型高效液相色谱仪, 配备 ELSD-LTII 型蒸发光散射检测器, 日本岛津公司; New Classic MS-S 型十万分之一电子天平, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; L5-型紫外-分光光度计, 上海仪电分析仪器有限公司;

LM17R 型冷冻高速离心机, 美国赛默飞世尔公司; DYCP-32C 型琼脂糖水平电泳仪, 北京市六一仪器; T100 型梯度 PCR 聚合酶链式反应仪, 美国 Bio-Rad 公司; Novaseq 6000 型测序仪, 美国 Illumina 公司; BPS-250CA 型恒温培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; WK-200B 高速药物粉碎机, 青州精诚机械有限公司; 101 型电热鼓风干燥机, 上海科恒实业发展有限公司。

1.2 试药及试剂

新鲜牛胆, 购自咸阳市秦都市场, 经陕西中医药大学赵重博副教授鉴定为牛科牛属脊索动物黄牛 *Bos taurus domesticus* Gmelin 的新鲜胆囊; 天南星药材, 购自安徽国宏药业股份有限公司, 批号 2101401, 经陕西中医药大学王昌利教授鉴定为天南星科天南星属植物天南星 *A. erubescens* (Wall.) Schott 的干燥块茎。

无水乙醇, 分析纯, 天津天力化学试剂有限公司; 对照品尿嘧啶 (批号 PS020117)、腺苷 (批号 PS001227)、胸腺嘧啶核苷 (批号 PS020196)、鸟苷 (批号 PS010291)、次黄嘌呤 (批号 PS020061)、肌苷 (批号 PS010437)、夏佛塔苷 (批号 PS010457)、异夏佛塔苷 (批号 Z16A10B93543)、腺嘌呤 (批号 PS020156)、胆酸 (批号 PS020335), 质量分数均 $\geq 98.0\%$, 均购自成都普思生物科技股份有限公司; 对照品黄嘌呤 (批号 B20561)、甘氨酸 (批号 B27078), 质量分数均 $\geq 98.0\%$, 均购自上海源叶生物科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 样品制备

取生天南星, 粉碎, 过筛 (4 号)。另取新鲜牛胆汁, 4 层纱布滤过后混合均匀 (以保持胆汁样本均一性), 按照生天南星-牛胆汁 1:3 于烧杯内搅拌均匀, 保鲜膜覆盖 (未发酵的样品记为 D0), 然后置于温度为 $(30 \pm 5)^\circ\text{C}$ 、相对湿度为 $(70 \pm 5)\%$ 的恒温恒湿箱内进行发酵, 每次共计使用生天南星粉末 500 g, 牛胆汁 1.5 L, 将同一发酵天数的样品, 均匀分成 3 份, 每天 10:00 时搅拌排气后挖取新鲜样品 5 g (-80°C 保存), 用于微生物组成和丰度分析。其余隔水蒸制 (2 h), 每 30 min 搅拌 1 次, 除去腥臭气, 口尝无麻味为度, 趁热制成小块, 鼓风干燥 (50°C), 即得^[15-17], 用于定量测定。分别制备发酵 1(24 h)~9 d 的胆南星样品, 分别记作 D1~D9, 结果详见图 1。

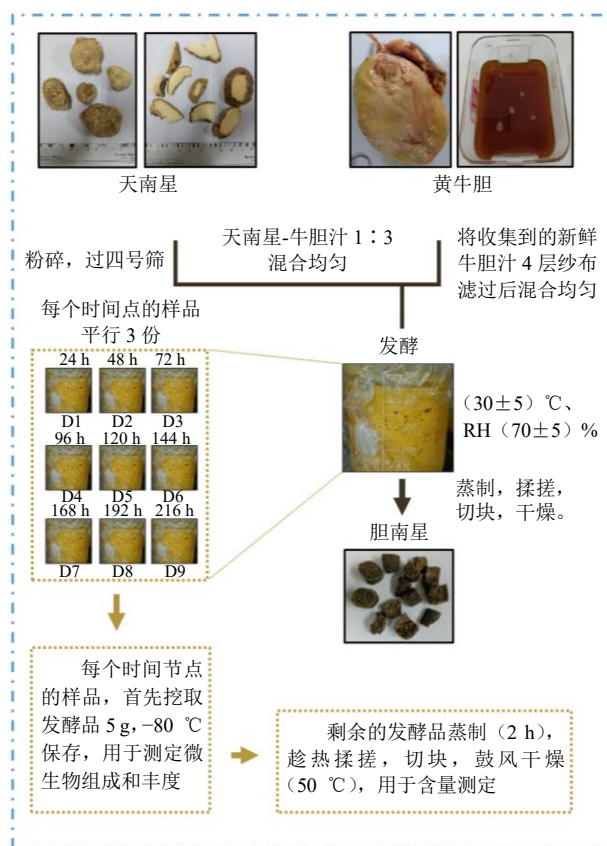


图 1 胆南星的制备工艺流程

Fig. 1 Preparation processing flow chart of ACB

2.2 胆南星中 2 种胆酸类成分的定量测定

2.2.1 对照品储备液的制备 精密称取胆酸、甘氨酸胆酸适量, 加甲醇制成质量浓度分别为 354.0、128.0 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品储备液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取各胆南星样品粉末 (过 4 号筛) 2.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 20 mL, 称定质量, 超声处理 (功率 500 W、频率 40 kHz) 35 min, 冷却至室温, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀后滤过, 即得供试品溶液。

2.2.3 色谱条件 色谱柱为 Agilent 5 TC- C_{18} 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~2 min, 25%~27%乙腈; 2~5 min, 27%~33%乙腈; 5~10 min, 33%~35%乙腈; 10~20 min, 35%~40%乙腈; 20~25 min, 40%乙腈; 25~28 min, 40%~55%乙腈; 28~30 min, 55%~60%乙腈; 30~33 min, 60%~30%乙腈; 33~40 min, 30%乙腈; 40~45 min, 30%~25%乙腈; 45~50 min, 25%乙腈; 体积流量 1 mL/min; ELSD 增益为 7; 进样量为 5 μL 。色谱图见图 2。

2.2.4 线性关系考察 分别将“2.2.1”项下对照品

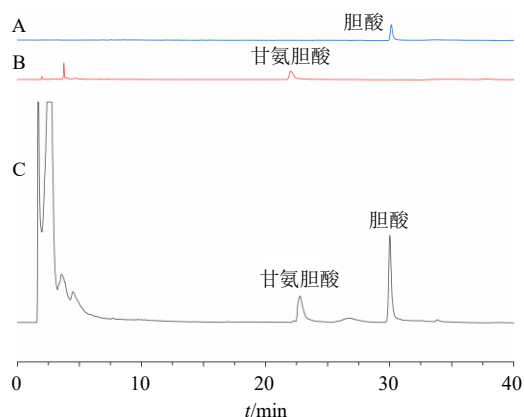


图 2 胆酸对照品 (A) 和甘氨胆酸对照品 (B) 及胆南星样品 (C) 的 HPLC-ELSD 图

Fig. 2 HPLC-ELSD of cholic acid reference substance (A) and glycolaminocholic acid reference substance (B) and ACB sample (C)

储备液逐级稀释,按“2.2.3”项下色谱条件进样测定,以对照品质量浓度的对数为横坐标(X),峰面积的对数为纵坐标(Y),绘制标准曲线并计算回归方程,可得胆酸的回归方程为 $Y=1.1134X+4.0803$, $R^2=0.9999$,结果表明胆酸在 $70.8\sim 531.0\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好;甘氨胆酸的回归方程为 $Y=1.6589X-2.0775$, $R^2=0.9987$,结果表明甘氨胆酸在 $51.2\sim 256.0\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.2.5 精密度考察 分别取 2 种胆酸对照品溶液,按“2.2.3”项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录胆酸、甘氨胆酸峰面积,计算其 RSD 分别为 0.82%、

1.49%,结果表明该仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性考察 取 D1 试品溶液,分别在放置 0、2、4、6、8、12 h,按“2.2.3”项下色谱条件进样测定,记录胆酸、甘氨胆酸峰面积,计算其 RSD 分别为 1.50%、1.65%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.2.7 重复性考察 精密称取 D1 粉末 2.0 g(6 份),按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.3”项下色谱条件进样测定,记录胆酸、甘氨胆酸峰面积,计算其质量分数的 RSD 分别为 1.13%、1.42%,表明该方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率考察 精密称取已测知成分含量的胆南星样品粉末(D1)6 份,每份 1.0 g,精密称定,分别精密加入等量各对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.3”项下色谱条件进样测定,记录胆酸、甘氨胆酸峰面积,代入“2.2.4”项下回归方程计算其含量,计算加样回收率及 RSD 值,结果胆酸、甘氨胆酸的平均加样回收率分别为 97.41%、99.80%,RSD 分别为 1.32%、1.85%,表明该方法准确度良好。

2.2.9 胆南星中 2 种胆酸类成分含量测定 取不同发酵节点的胆南星样品(D0~D9)各 2.0 g,精密称定,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.3”项下色谱条件进样测定,计算样品中各成分的含量,并参考《中国药典》2020 年版四部“9101”考察检出限和定量限,结果见表 1。

表 1 胆南星样品 (D0~D9) 中各成分定量测定结果 ($n=3$)

Table 1 Determination results of components in ACB samples (D0—D9) ($n=3$)

样品	质量分数/(μg·g ⁻¹)												OD
	腺嘌呤	黄嘌呤	尿嘧啶	次黄嘌呤	腺苷	鸟苷	肌苷	胸腺嘧啶核苷	异夏佛塔苷	夏佛塔苷	胆酸	甘氨胆酸	
D0	80.1	1 283.8	64.2	101.0	100.1	10.7	64.4	0.3	177.9	79.2	3 056.1	2 987.6	0.552
D1	119.0	2 986.1	75.7	137.0	138.7	9.2	59.9	8.0	147.5	74.4	7 549.9	1 430.8	0.670
D2	113.4	3 062.3	81.1	142.2	121.3	5.2	57.7	9.0	144.8	45.6	10 493.1	1 281.8	0.650
D3	40.5	2 684.2	74.0	112.8	99.8	6.7	34.9	—	124.0	36.2	10 207.0	1 694.9	0.404
D4	66.9	2 728.8	96.9	134.2	120.3	9.8	74.1	—	151.1	31.2	8 681.8	1 524.3	0.589
D5	16.3	1 887.5	65.3	103.0	99.1	8.9	29.9	0.3	134.3	28.8	6 051.8	1 504.6	0.296
D6	2.6	1 091.3	55.9	66.0	—	8.1	15.8	—	133.0	21.3	3 280.7	1 521.1	0.072
D7	13.5	2 033.5	81.0	144.4	95.4	3.8	46.2	—	143.8	24.7	6 619.6	1 771.8	0.358
D8	46.3	2 169.9	83.5	162.3	91.8	12.0	64.8	1.6	149.7	25.2	4 126.8	1 941.0	0.516
D9	21.2	1 278.7	99.3	91.9	87.7	11.2	83.8	1.5	141.6	39.4	5 636.2	2 395.7	0.489
定量限	1.5	215.2	41.1	52.5	49.8	2.5	21.5	0.3	52.3	18.5	2.2	2.5	/
检出限	0.5	75.0	13.5	16.5	16.0	0.8	7.2	0.1	17.5	6.2	0.7	0.8	/

“—”表示未检出,“/”表示未涉及。

“—” means not checked out, “/” means not involved.

2.3 胆南星中 10 种非胆酸类成分的定量测定

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取腺嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶、次黄嘌呤、腺苷、鸟苷、肌苷、胸腺嘧啶核苷、异夏佛塔苷、夏佛塔苷适量，加甲醇制成质量浓度依次为 310.0、22.0、178.0、220.0、380.0、280.0、300.0、460.0、120.0、308.0 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品储备液。

2.3.2 供试品溶液的制备 按照“2.2.2”项下同法制得。

2.3.3 色谱条件 色谱柱为 Agilent 5 TC- C_{18} 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)；流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液，梯度洗脱：0~10 min, 5%乙腈；10~20 min, 5%~15%乙腈；20~30 min, 15%乙腈；30~40 min, 15%~20%乙腈；40~50 min, 20%乙腈；体积流量 1.0 mL/min；检测波长 270 nm；柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ ；进样量 10 μL 。色谱图见图 3。

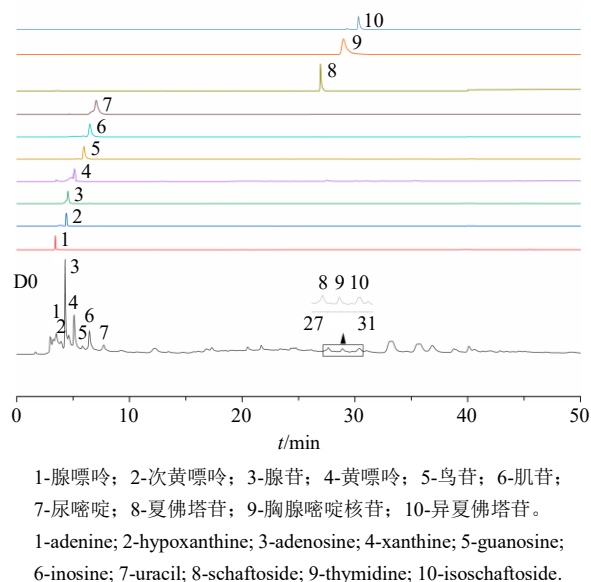


图 3 各对照品和胆南星样品 (D0) 的 HPLC 图

Fig. 3 HPLC of each reference substance and ACB sample (D0)

2.3.4 线性关系考察 将混合对照品储备液稀释至系列质量浓度，按“2.3.3”项下色谱条件进样测定，以对照品溶液质量浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y)，绘制标准曲线并计算回归方程，结果分别为腺嘌呤 $Y=38\,597\,458.79 X+132\,836.40$, $R^2=0.999\,7$ ，线性范围 0.62~310.00 $\mu\text{g/mL}$ ；黄嘌呤 $Y=2\,386\,536.56 X+10\,850.37$, $R^2=0.999\,3$ ，线性范围 2.20~220.00 $\mu\text{g/mL}$ ；尿嘧啶 $Y=41\,229\,279.96 X-138\,332.19$, $R^2=0.999\,0$ ，线性范围 1.78~178.00 $\mu\text{g/mL}$ ；次黄嘌呤 $Y=22\,311\,999.27 X+8\,686.62$, $R^2=$

0.999 7，线性范围 0.44~220.00 $\mu\text{g/mL}$ ；腺苷 $Y=24\,442\,169.68 X-135\,095.35$, $R^2=0.999\,0$ ，线性范围 3.80~380.00 $\mu\text{g/mL}$ ；鸟苷 $Y=33\,394\,087.46 X-2\,267.40$, $R^2=0.999\,5$ ，线性范围 0.28~280.00 $\mu\text{g/mL}$ ；肌苷 $Y=30\,909\,591.40 X+76\,890.60$, $R^2=0.999\,8$ ，线性范围 0.60~300.00 $\mu\text{g/mL}$ ；胸腺嘧啶核苷 $Y=44\,675\,831.47 X+25\,511.85$, $R^2=0.999\,2$ ，线性范围 0.046~4.600 $\mu\text{g/mL}$ ；异夏佛塔苷 $Y=17\,335\,844.44 X-196\,131.13$, $R^2=0.999\,4$ ，线性范围 12.00~96.00 $\mu\text{g/mL}$ ；夏佛塔苷 $Y=8\,330\,509.59 X+74\,421.14$, $R^2=0.999\,0$ ，线性范围 6.16~308.00 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3.5 精密度考察 分别取 10 种非胆酸类成分对照品溶液，按“2.3.3”项下色谱条件连续进样测定 6 次，记录腺嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶、次黄嘌呤、腺苷、鸟苷、肌苷、胸腺嘧啶核苷、异夏佛塔苷、夏佛塔苷峰面积，计算其 RSD 分别为 0.69%、1.18%、1.49%、1.03%、0.43%、0.55%、1.55%、1.40%、0.74%、1.09%，表明该仪器精密度良好。

2.3.6 稳定性考察 取 D0 供试品溶液，分别在放置 0、2、4、6、8、12 h，按“2.3.3”项下色谱条件进样测定，记录腺嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶、次黄嘌呤、腺苷、鸟苷、肌苷、胸腺嘧啶核苷、异夏佛塔苷、夏佛塔苷峰面积，计算其 RSD 分别为 0.76%、1.37%、1.27%、0.94%、1.52%、1.49%、1.26%、1.58%、1.60%、1.10%，结果表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.3.7 重复性考察 精密称取 D0 粉末适量，共 6 份，按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.3.3”项下色谱条件进样测定，记录腺嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶、次黄嘌呤、腺苷、鸟苷、肌苷、胸腺嘧啶核苷、异夏佛塔苷、夏佛塔苷峰面积，计算其质量分数的 RSD 分别为 0.44%、0.36%、0.23%、1.29%、0.79%、0.55%、1.20%、1.01%、1.33%、0.92%，表明该方法重复性良好。

2.3.8 加样回收率考察 精密称取已测知成分含量的样品粉末 (D0) 6 份，每份 1.0 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，分别精密加入等量各对照品，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.3.3”项下色谱条件进样测定，记录各成分峰面积，并代入“2.3.4”项下回归方程计算其含量，计算加样回收率及 RSD 值，结果腺嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶、次黄嘌呤、腺苷、鸟苷、肌苷、胸腺嘧啶核苷、异夏佛塔苷、夏佛塔苷的平均加样回收率分别为 100.77%、

96.73%、99.83%、97.81%、98.08%、99.24%、100.91%、97.24%、97.89%、98.18%，RSD 值分别为 0.99%、1.10%、1.68%、1.03%、1.42%、1.61%、1.39%、1.59%、1.85%、1.61%，说明该方法准确度良好。

2.3.9 胆南星中 10 种非胆酸类成分含量测定 取不同发酵节点的胆南星样品各 2.0 g，精密称定，同“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.3.3”项下色谱条件进样测定，计算 10 种成分含量，并考察检出限和定量限。为考察各样品中各成分总体变化情况，参考文献方法^[18]，将 12 种成分进行总评归一分析，计算总评归一（overall desirability, OD）值 $[d_i = (y_i - y_{\min}) / (y_{\max} - y_{\min})]$ ； $OD = (d_1 + d_2 + d_3 + \dots + d_k) / k$ ，其中 $y_{\min}$ 为指标中最小值， $y_{\max}$ 为指标中最大值， k 为指标数），结果见表 1。结果发现发酵 7 d 后 OD 值呈先增加后减小。

2.4 胆南星发酵过程中优势菌群的测定

2.4.1 胆南星样品前处理及高通量测序 用十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）法对每个样品进行基因组 DNA 提取，1% 琼脂糖凝胶电泳测定 DNA 纯度和浓度。PCR 扩增采用引物序列 338 F: 5'-ACTC-CTACGGGAGGCAGCA-3' 和 806 R: 5'-GGACTA-CHVGGGTWTCTAAT-3' 对样本的 V3~V4 可变区进行扩增。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳胶浓度 1%、电压 170 V、电泳时间 30 min。利用 Illumina Novaseq 平台，对样品进行双端测序，并进行操作分类单元（operational taxonomic unit, OTU）聚类去噪、物种分类（门、纲、目、科、属、种）、 α 多样性和 β 多样性等分析^[19-20]。

2.4.2 稀疏曲线和 OUT 分布 Venn 图 对 D1~D9 组共 27 个样品进行测序分析，所得测序数据经过 Barcode 拆分，获得有效序列信息，共得到 1 898 034 条序列，样本中所含最大序列数为 2 700 208，最小序列数为 34 999，平均测得 105 446 条序列。随着测序深度的增加，稀疏曲线（图 4-A）达到饱和状态，即使增大样本容量，曲线变化也非常微小，说明测序数据量合理且足够大，能够满足后续分析要求^[21]。Venn 图可观察出样品中交集与差异序列（图 4-B）。对 OTU 丰度矩阵中每个样品序列总数在不同深度下随机抽样，以每个深度下抽到的序列数及其对应的 OTU 数量构建 α 多样性。

2.4.3 各胆南星样品中微生物 α 多样性分析 为考察胆南星样品中微生物群落的丰富度和多样性，对

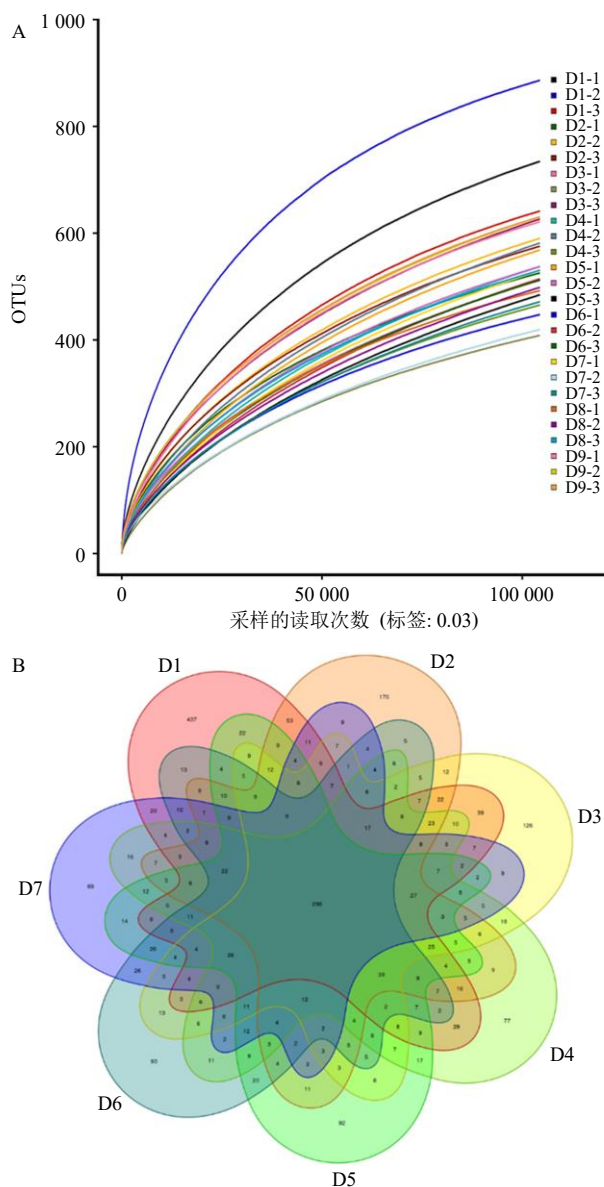


图 4 样品稀疏曲线 (A) 及 OUT 分布 Venn 图 (B)

Fig. 4 Sparse curve (A) and OUT distribution Venn diagram (B)

微生物数据进行 α 多样性分析。评价参数有 Chao1 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数^[22]；其中，Chao1 指数用来描述样本中微生物群落的丰富度，用以评估群落中 OUT 数目，Shannon 指数和 Simpson 指数往往描述微生物的均匀度。首先，对样本中物种组成和丰富度进行预测分析^[23]，通过物种累积曲线（图 5）进行评估，随着样本量的不断增多，物种累积曲线增加趋于平缓，表明检测环境中物种的数量不会随着样本的增加而增加，即样本量充足。

研究结果表明，随着胆南星发酵天数的增加，D1 样品中菌群丰度最高，从发酵 2 d 起呈现出先增加后降低的趋势（Chao1 指数），结果见表 2 中 Chao1

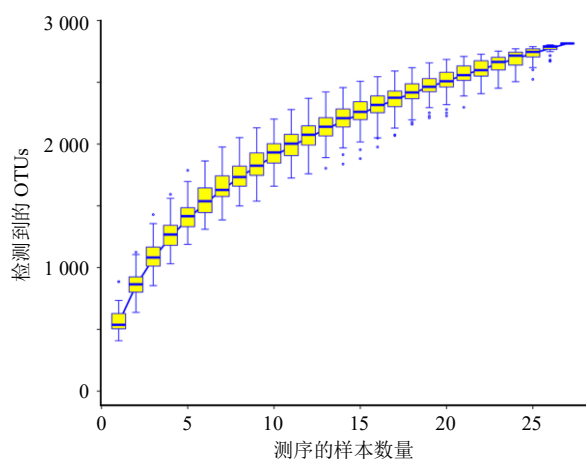


图 5 物种累积曲线 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Species accumulation curve ($\bar{x} \pm s, n=3$)

指数。样品中微生物群落的均匀度呈先减少后增加的趋势 (Shannon 指数和 Simpson 指数)。

谱系多样性是基于系统发育树计算, 兼顾物种丰度和进化距离的多样性指数, 结果显示, D1~D3 降低, D4 开始增加至 D8 变化趋于平缓 (PD_whole_tree 图)。随着检测序列深度的增加, 实际检测到的 OTU 的个数, 从 D1 起减少后 D2~D8 变化趋于平

表 2 α 多样性指数 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Alpha diversity index ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品	Chao1 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	observed_species 指数
D1	755.57 $\pm$ 94.83	2.85 $\pm$ 0.08	0.65 $\pm$ 0.07	515.67 $\pm$ 103.19
D2	610.09 $\pm$ 38.95	2.41 $\pm$ 0.25	0.63 $\pm$ 0.07	371.35 $\pm$ 19.99*
D3	574.83 $\pm$ 119.68	1.91 $\pm$ 0.95	0.50 $\pm$ 0.21	334.38 $\pm$ 75.57**
D4	607.86 $\pm$ 68.54	1.37 $\pm$ 0.58*	0.40 $\pm$ 0.22	337.18 $\pm$ 39.20**
D5	605.14 $\pm$ 27.21	1.24 $\pm$ 0.47*	0.35 $\pm$ 0.19	338.64 $\pm$ 31.49**
D6	567.92 $\pm$ 70.90	1.24 $\pm$ 0.29*	0.31 $\pm$ 0.09	313.18 $\pm$ 20.77**
D7	549.34 $\pm$ 66.27*	1.51 $\pm$ 0.36*	0.40 $\pm$ 0.09	299.48 $\pm$ 34.12**
D8	570.93 $\pm$ 42.59	1.85 $\pm$ 0.16	0.53 $\pm$ 0.08	327.35 $\pm$ 15.82**
D9	654.62 $\pm$ 19.79	2.80 $\pm$ 0.07 [#]	0.72 $\pm$ 0.01 [#]	415.27 $\pm$ 3.89

与 D1 比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与 D6 相比, [#] $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs D1; [#] $P<0.05$ vs D6.

缓, D9 增加 (observed_species 指数), 见表 2 中 observed_species 指数。

2.4.4 β 多样性分析 为了观察不同样品中微生物群落的相似性, 对各样品中菌群进行 β 多样性分析, 结果见图 6。通过组间距离发现, 随着发酵地进行, 胆南星发酵前 3 d 差异较大, 从第 4 天开始各组之

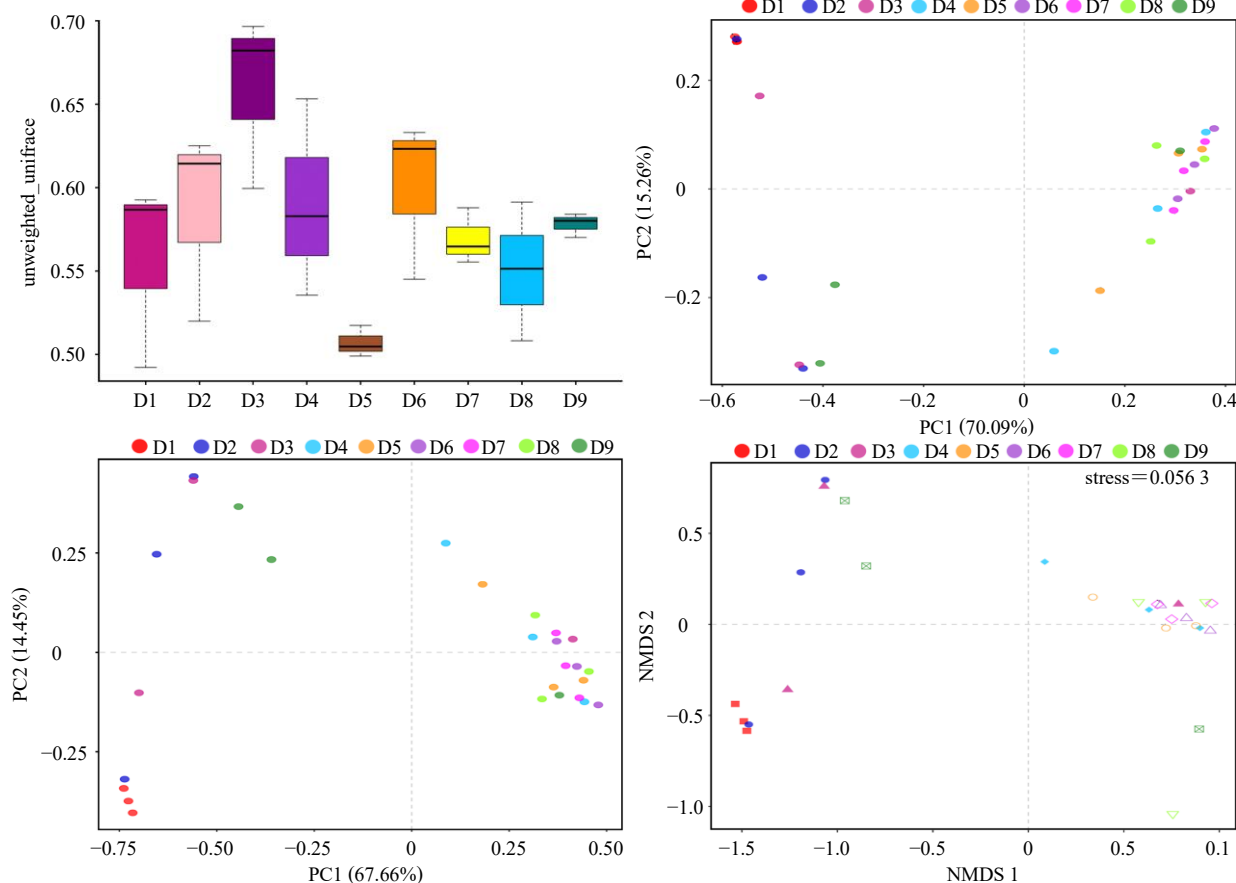


图 6 发酵过程中微生物的 β 多样性 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Beta diversity of microorganisms during fermentation ($\bar{x} \pm s, n=3$)

间距离越来越近,表明群落组成差异逐渐减少,相似度逐渐变高。PCA 结果表明,PC1 和 PC2 的累积方差贡献度为 85.35%,反映出大部分样本信息。胆南星随发酵时间的增加,微生物群落差异呈先增大后减小最终趋于稳定的趋势。

2.4.5 门水平菌群组成及相对丰度分析 如图 7 所示,样品中主要变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、蓝藻菌门(Cyanobacteria)、放线菌门(Actinobacteriota)和拟杆菌门(Bacteroidota)。研究结果发现,变形菌门丰度随发酵时间延长持续增加,发酵至 6 d 后基本不变,至第 9 天减少。厚壁菌门、蓝藻菌门、放线菌门和拟杆菌门丰度随发酵时间延长整体呈下降的趋势,发酵至 6 d 后基本

不变,至第 9 天增加。

胆南星发酵过程中优势菌门分别为变形菌门、厚壁菌门和蓝藻菌门,发酵第 3 天变形菌门开始增加,发酵至第 4 天成为绝对优势菌门(78.52%),持续至第 8 天丰度基本不变(83.94%)。

发酵至第 9 天随着营养物质和氧气不断被消耗,伴随厚壁菌门的微生物不断地产生有机酸,变形菌门生物不适应缺氧和高酸的环境,其相对丰度明显下降;对于厚壁菌门而言,自身为厌氧菌能够存在于缺氧和高酸的生长环境,相对丰度增加^[24];随着炮制时间的延长拟杆菌门微生物在缺氧环境下再发酵,与厚壁菌门微生物发生竞争发育,适应生长后丰度增加(图 7)^[25]。

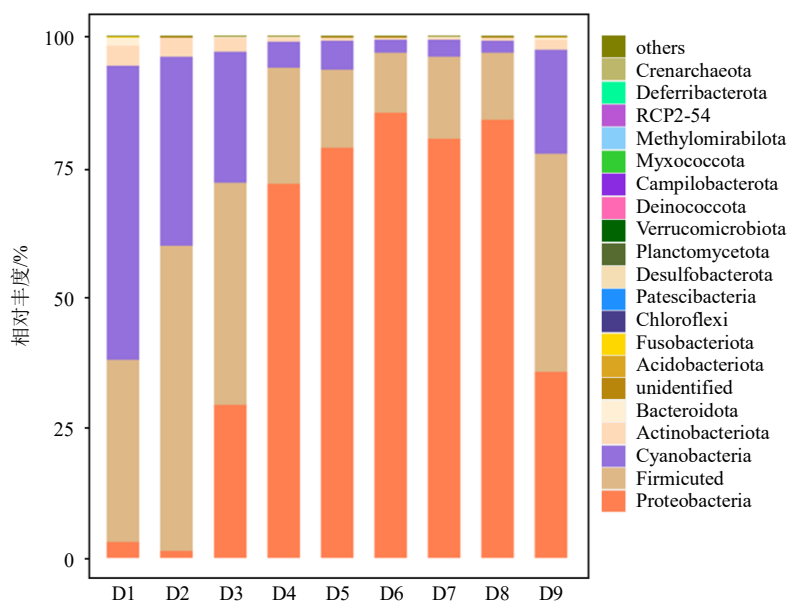


图 7 发酵过程中微生物的门水平各菌的相对丰度

Fig. 7 Relative abundance of bacteria at level of phylum during fermentation

2.4.6 属水平菌群组成及相对丰度分析 如图 8 所示,随着胆南星炮制时间的延长,大肠埃希菌-志贺菌 *Escherichia-Shigella* 丰度在第 6 天达到最大,在第 7 天下降,第 9 天最小;小球菌(*Pediococcus*)先增加后减小,第 6~8 天变化平稳;漫游球菌(*Vagococcusg*)和乳酸杆菌(*Lactobacillus*)逐渐减少。假单胞菌(*Pseudomonas*)为腐生菌逐渐减少,但在第 8 天增加;乳酸菌随发酵时间的延长在第 1 至 6 天减少,在第 7 天增加后减少。

胆南星发酵前期腐败微生物(假单胞菌)活动强烈,使得营养物质消耗速度加快^[25];漫游球菌利用一些碳水化合物进行发酵代谢,产生乳酸合成蛋白酶和碳水化合物活性酶,促进蛋白质和碳水化合

物的分解^[26];乳酸菌的增长可以有效的抑制腐败菌的生长;随着微生物环境逐渐稳定,乳酸杆菌代谢有机酸(乳酸)的产量增加,使其自身表现出活动受限,行动缓慢,趋于稳定(图 8)。

2.4.7 微生物群落与化学成分之间的相关性分析 利用 SPSS 26.0 软件以微生物群落为自变量,12 个化合物的含量为因变量进行相关性分析,结果见图 9 及表 3、4。

在门水平上:胸腺嘧啶核苷和蓝藻菌门、放线菌门、变形菌门、梭杆菌门、Patescibacteria 成显著性正相关($P<0.01$);夏佛塔昔与酸杆菌门、绿弯菌门、浮霉菌门成显著性正相关($P<0.05$ 、 0.01);胆酸与厚壁菌门、变形菌门成显著相关性($P<$

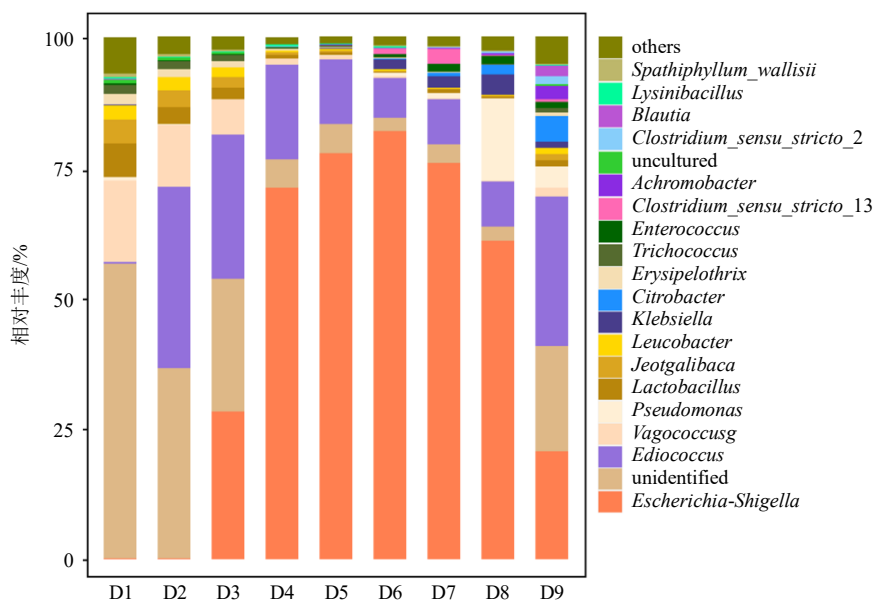


Fig. 8 Relative abundance of bacteria the level of genus during fermentation

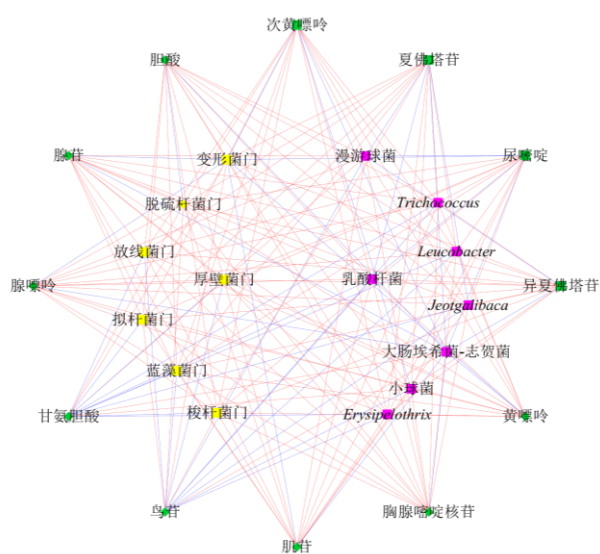


图9 “微生物-成分”关联网络图 (红线代表正相关, 蓝线代表负相关)

Fig. 9 “Microorganism-component” correlation network diagram (red line represents positive correlation, blue line represents negative correlation)

0.05); 甘氨酸与酸杆菌门、浮霉菌门成显著性正相关 ($P<0.05$)。

在属水平上：腺嘌呤和漫游球菌、乳酸杆菌、*Jeotgalibaca* 等成显著性正相关 ($P<0.05$ 、 0.01)，与大肠埃希菌-志贺菌成显著负相关 ($P<0.05$)；黄嘌呤和漫游球菌、*Spathiphyllum_wallisii* 成显著性正相关 ($P<0.05$)；胸腺嘧啶核苷与漫游球菌、乳酸

杆菌、*Jeotgalibaca*、*Leucobacter* 等成显著性正相关 ($P<0.05$ 、 0.01), 与大肠埃希菌-志贺菌成显著负相关 ($P<0.01$)。

3 讨论

胆南星作为传统的曲剂中药，由天南星经胆汁炮制，临床广泛用于治疗痰热咳喘、癫痫及急惊风等疾病^[27]。其药性变化可能与化学成分变化有一定关系^[28]。本研究采用 HPLC 检测不同发酵天数胆南星的化学成分，结合发酵过程中生物群落的动态变化，探索其潜在联系。

发酵是通过微生物干预,产生特殊风味和营养物质并伴随明显的化学成分转化的复杂过程,这些成分变化在发酵品品质研究中具有重要意义^[29]。发酵技术广泛应用于食品工业^[30-33]、中药制药^[34-36]、兽药研发^[37-39]等领域。现代药理学研究发现,发酵果汁中酚酸类和黄酮类化合物发生显著变化,提高了抗氧化能力^[40];经过红曲发酵后的金银花具有较强清除自由基的能力^[41];经过灵芝发酵的刺五加提取物显著增强了抗氧化活性^[42]。经过朱红栓菌 *Trametes cinnabarina* (Jacq.) Fr. 发酵马钱子可得到 4 个新成分^[43];发酵可以使得黄酮、生物碱和甾体等化合物发生糖基化、羟基化或者水解并产生丰富的次生代谢产物^[44],由此可见,发酵可显著影响中药成分的变化及其生物活性。

实验室在传统发酵胆南星实验中研究发现^[45],不同胆汁经过发酵后产生了不同的“气味”,可通过

表 3 在门水平上菌和成分的皮尔逊相关性分析
Table 3 Pearson correlation analysis of bacteria and components at door level

门	腺嘌呤		黄嘌呤		尿嘧啶		次黄嘌呤		腺苷		鸟苷	
	皮尔逊	显著性水平	皮尔逊	显著性水平	皮尔逊	显著性水平	皮尔逊	显著性水平	皮尔逊	显著性水平	皮尔逊	显著性水平
	相关性	(双尾)	相关性	(双尾)	相关性	(双尾)	相关性	(双尾)	相关性	(双尾)	相关性	(双尾)
蓝藻菌门	0.801**	0.010	0.598	0.089	0.058	0.882	0.175	0.652	0.555	0.121	-0.107	0.785
厚壁菌门	0.611	0.081	0.500	0.170	0.332	0.383	0.093	0.812	0.474	0.198	-0.235	0.543
放线菌门	0.811**	0.008	0.649	0.059	0.093	0.811	0.188	0.629	0.558	0.118	-0.177	0.648
变形菌门	-0.767*	0.016	-0.594	0.092	-0.195	0.616	-0.148	0.703	-0.556	0.120	0.174	0.655
拟杆菌门	0.609	0.082	0.359	0.342	0.006	0.988	0.144	0.712	0.428	0.250	0.187	0.631
梭杆菌门	0.709*	0.032	0.426	0.253	0.124	0.751	0.087	0.823	0.488	0.182	0.133	0.733
Patescibacteria	0.824**	0.006	0.610	0.081	-0.132	0.736	0.240	0.534	0.499	0.172	-0.096	0.807
酸杆菌门	-0.092	0.814	-0.394	0.295	0.493	0.177	-0.088	0.822	-0.085	0.828	0.508	0.162
脱硫杆菌门	0.361	0.339	0.216	0.576	0.344	0.365	0.335	0.378	0.535	0.138	0.319	0.403
绿弯菌门	-0.322	0.398	-0.650	0.058	0.201	0.605	-0.594	0.091	-0.300	0.432	0.292	0.446
弯曲杆菌门	0.280	0.466	0.277	0.470	-0.445	0.231	0.027	0.946	0.047	0.905	-0.224	0.563
Deinococcota	-0.208	0.592	-0.583	0.099	-0.009	0.982	-0.431	0.246	-0.621	0.074	0.263	0.494
浮霉菌门	-0.285	0.457	-0.539	0.135	0.428	0.250	-0.410	0.274	-0.080	0.838	0.612	0.080
疣微菌门	-0.199	0.608	-0.050	0.899	0.610	0.081	-0.105	0.788	0.093	0.811	-0.129	0.742

门	肌苷		胸腺嘧啶核苷		异夏佛塔苷		夏佛塔苷		胆酸		甘氨酸	
	皮尔逊	显著性水平	皮尔逊	显著性水平	皮尔逊	显著性水平	皮尔逊	显著性水平	皮尔逊	显著性水平	皮尔逊	显著性水平
	相关性	(双尾)	相关性	(双尾)	相关性	(双尾)	相关性	(双尾)	相关性	(双尾)	相关性	(双尾)
蓝藻菌门	0.235	0.543	0.840**	0.005	0.089	0.819	0.061	0.876	0.533	0.139	-0.278	0.468
厚壁菌门	0.356	0.347	0.653	0.056	0.121	0.756	0.231	0.550	0.745*	0.021	-0.067	0.865
放线菌门	0.234	0.545	0.839**	0.005	0.035	0.928	0.046	0.907	0.654	0.056	-0.295	0.441
变形菌门	-0.311	0.415	-0.810**	0.008	-0.112	0.774	-0.148	0.704	-0.672*	0.047	0.196	0.614
拟杆菌门	0.238	0.538	0.615	0.078	0.235	0.542	0.065	0.867	0.091	0.815	-0.152	0.696
梭杆菌门	0.337	0.375	0.754*	0.019	0.258	0.503	0.190	0.625	0.311	0.416	-0.104	0.790
Patescibacteria	0.094	0.809	0.857**	0.003	0.029	0.941	-0.111	0.775	0.380	0.312	-0.477	0.194
酸杆菌门	0.571	0.108	0.117	0.764	0.644	0.061	0.909**	0.001	-0.296	0.439	0.749*	0.020
脱硫杆菌门	0.500	0.170	0.285	0.458	0.548	0.126	0.263	0.494	-0.081	0.835	0.126	0.747
绿弯菌门	0.238	0.538	-0.013	0.973	0.419	0.262	0.726*	0.027	-0.343	0.366	0.644	0.061
弯曲杆菌门	-0.356	0.348	0.174	0.654	-0.281	0.463	-0.643	0.062	0.008	0.984	-0.617	0.076
Deinococcota	0.071	0.856	-0.063	0.872	0.398	0.289	0.191	0.623	-0.623	0.073	0.204	0.599
浮霉菌门	0.465	0.207	-0.132	0.734	0.555	0.121	0.758*	0.018	-0.326	0.392	0.739*	0.023
疣微菌门	0.391	0.298	-0.345	0.363	0.190	0.625	0.250	0.516	0.351	0.355	0.546	0.128

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 相关性显著; 表 4 同。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, the correlation is significant; same as table 4.

检测发酵生成的风味物质实现对不同来源的胆汁及其制成的胆南星的鉴别。含量测定发现,胆南星中夏佛塔苷、异夏佛塔苷含量随发酵进行有下降趋势,可能是黄酮苷类化合物发生水解所导致;作为生物代谢过程中必不可少的化学成分,核苷和核苷酸类成分广泛分布于各类动植物中^[46-47],在不同加工过程中,核苷酸类成分会发生降解和转化,从而影响其含量;核苷类具有对机体的免疫系统、代谢

系统、神经系统及心血管系统等方面的生物活性,可发挥抗癫痫、抗心律失常和抗肿瘤等作用^[47]。与文献报道相似^[48]本研究结果表明,胆南星发酵过程中核苷类成分腺苷、鸟苷、肌苷、胸腺嘧啶核苷(胸苷)等含量降低,进而与不同群落变化存在相关性。胸苷作为本实验检测指标之一,是抗艾滋病药物司他夫定和齐多夫定的前体,市场需求日益增长。研究发现,利用微生物发酵生产胸苷^[49]已逐渐

表 4 在属水平上菌和成分的皮尔逊相关性分析
Table 4 Pearson correlation analysis of bacteria and components at genus level

属	腺嘌呤		黄嘌呤		尿嘧啶		次黄嘌呤		腺苷		鸟苷	
	皮尔逊	显著性水平	皮尔逊	显著性水平	皮尔逊	显著性水平	皮尔逊	显著性水平	皮尔逊	显著性水平	皮尔逊	显著性水平
	相关性	(双尾)	相关性	(双尾)	相关性	(双尾)	相关性	(双尾)	相关性	(双尾)	相关性	(双尾)
漫游球菌	0.870**	0.002	0.720*	0.029	-0.045	0.908	0.266	0.489	0.559	0.118	-0.227	0.558
乳酸杆菌	0.827**	0.006	0.636	0.066	-0.021	0.957	0.253	0.511	0.557	0.119	-0.122	0.755
<i>Jeotgalibaca</i>	0.836**	0.005	0.660	0.053	0.007	0.987	0.213	0.583	0.562	0.115	-0.152	0.697
<i>Leucobacter</i>	0.807**	0.009	0.648	0.059	0.093	0.813	0.181	0.642	0.554	0.122	-0.191	0.623
<i>Erysipelothrix</i>	0.808**	0.008	0.651	0.057	0.051	0.897	0.181	0.641	0.552	0.124	-0.165	0.671
<i>Trichococcus</i>	0.773*	0.015	0.599	0.088	0.144	0.712	0.155	0.691	0.553	0.123	-0.137	0.724
<i>Pseudomonas</i>	-0.096	0.806	-0.167	0.668	0.238	0.537	0.414	0.269	-0.063	0.873	0.599	0.088
<i>Spathiphyllum_wallisii</i>	0.844**	0.004	0.689*	0.040	0.001	0.998	0.241	0.532	0.565	0.113	-0.218	0.574
链球菌	0.789*	0.012	0.637	0.065	-0.097	0.804	0.223	0.565	0.526	0.145	-0.117	0.765
<i>Lysinibacillus</i>	0.347	0.360	0.126	0.746	-0.285	0.457	-0.213	0.582	-0.179	0.646	-0.047	0.905
小球菌	0.119	0.760	0.160	0.680	0.412	0.271	-0.083	0.832	0.172	0.658	-0.178	0.647
大肠埃希菌-志贺菌	-0.744*	0.022	-0.529	0.143	-0.284	0.458	-0.208	0.591	-0.542	0.132	0.036	0.928

属	肌苷		胸腺嘧啶核苷		异夏佛塔苷		夏佛塔苷		胆酸		甘氨酸	
	皮尔逊	显著性水平	皮尔逊	显著性水平	皮尔逊	显著性水平	皮尔逊	显著性水平	皮尔逊	显著性水平	皮尔逊	显著性水平
	相关性	(双尾)	相关性	(双尾)	相关性	(双尾)	相关性	(双尾)	相关性	(双尾)	相关性	(双尾)
漫游球菌	0.124	0.751	0.879**	0.002	-0.038	0.922	-0.120	0.759	0.611	0.080	-0.483	0.188
乳酸杆菌	0.177	0.648	0.845**	0.004	0.065	0.868	-0.041	0.916	0.469	0.203	-0.382	0.310
<i>Jeotgalibaca</i>	0.181	0.641	0.853**	0.003	0.024	0.951	-0.035	0.929	0.570	0.109	-0.376	0.319
<i>Leucobacter</i>	0.228	0.556	0.837**	0.005	0.027	0.945	0.043	0.912	0.666	0.050	-0.298	0.435
<i>Erysipelothrix</i>	0.199	0.608	0.824**	0.006	0.003	0.994	0.002	0.996	0.630	0.069	-0.314	0.410
<i>Trichococcus</i>	0.280	0.466	0.809**	0.008	0.082	0.835	0.119	0.761	0.631	0.068	-0.203	0.600
<i>Pseudomonas</i>	0.346	0.362	-0.090	0.818	0.374	0.321	0.498	0.173	-0.506	0.164	0.512	0.159
<i>Spathiphyllum_wallisii</i>	0.162	0.678	0.869**	0.002	-0.010	0.980	-0.045	0.909	0.620	0.075	-0.402	0.283
链球菌	0.093	0.811	0.777*	0.014	-0.036	0.926	-0.138	0.724	0.457	0.216	-0.413	0.269
<i>Lysinibacillus</i>	-0.174	0.654	0.279	0.467	-0.042	0.914	-0.517	0.154	-0.039	0.920	-0.563	0.115
小球菌	0.279	0.468	0.122	0.755	0.053	0.892	0.242	0.531	0.592	0.093	0.157	0.687
大肠埃希菌-志贺菌	-0.427	0.252	-0.810**	0.008	-0.240	0.534	-0.322	0.398	-0.561	0.116	0.030	0.939

取代化学法和酶法等生产方式。但本实验中未能观察到其明显变化规律后期将采用液-质联用技术对其进行进一步研究。

胆酸对肠道微生物有直接或间接的抗菌作用，而胆酸类化合物也是胆南星的药效成分^[50-51]。胆酸作为人类胆汁中含量最多的胆酸，具有良好的血脑屏障透过性及抗氧化性，本研究发现，胆南星中结合型的甘氨酸胆酸含量减低，而游离型的胆酸含量升高，当脑损伤发生时，胆酸能够减轻脑细胞的氧化应激，而起到神经保护作用^[52]，这可能是胆南星临床用于治疗小儿热性惊厥的原因之一。胆南星中其他成分和微生物群落之间是否存在相互影响及联系仍需进一步研究，团队后期将从胆南星分离培养的

关键菌种-化合物-药效作用等方面开展相关研究。

综上所述，胆南星发酵过程中“微生物-成分”间存在潜在关系，其发酵过程中微生物组成和物质基础的动态变化可能是其炮制机理之一。本研究可为胆南星的发酵炮制和临床中的合理用药及其相关资源开发利用提供可靠依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 273.

[2] 宋·钱乙, 邵东梅. 小儿药证直诀 (卷二) [M]. 影印本. 北京: 中国医药科技出版社, 2011: 24.

[3] 凡杭, 申海进. 猪胆药用历史考证 [J]. 亚太传统医药, 2023, 19 (4): 192-196.

- [4] Zhang M M, Wu X, Wang J, *et al.* Revealing the optimal traditional processing methods and its protective effects against febrile seizures of *Arisaema cum Bile* [J]. *Biomed Chromatogr*, 2024, 38(11): e5977.
- [5] 苏发智, 白晨曦, 张文森, 等. 基于正常及寒热证模型大鼠物质能量代谢的天南星与胆南星的药性研究 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(17): 4682-4690.
- [6] 罗雨萌, 孙延平, 黎冠兰, 等. 天南星的化学成分研究 [J]. 中南药学, 2022, 20(12): 2818-2822.
- [7] 杨紫莹, 王芳静, 金传山, 等. 天南星及炮制品天南星和胆南星水提物 HPLC 特征图谱比较研究 [J]. 中草药, 2020, 51(3): 639-646.
- [8] 施宇, 刘晓峰, 单丽倩, 等. 胆南星发酵菌种的分离鉴定与复合菌种发酵初探 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(17): 150-156.
- [9] 王连睿, 苗明三. 天南星的研究进展及其质量标志物的预测分析 [J]. 中药新药与临床药理, 2023, 34(11): 1640-1647.
- [10] 郭憬憬. 蛹虫草腺苷深层发酵优化及其中药活性研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2008.
- [11] 闫更轩, 刘伟, 刘春燕, 等. ARTP 诱变选育高产腺苷菌株及发酵条件优化 [J]. 中国调味品, 2024, 49(8): 63-68.
- [12] 刘金哲, 史小青, 姚艳飞, 等. 香菇发酵葛根生产总黄酮的工艺研究 [J]. 食品科学, 2012, 33(3): 212-214.
- [13] 奚佳玉, 苏圆锦, 董树清, 等. 微生物发酵转化黄酮类化合物研究进展 [J]. 食品科学, 2024, 45(17): 326-334.
- [14] 祁春艳, 王晶, 武旭, 等. 天南星炮制前后主要化学成分含量变化研究 [J]. 中草药, 2022, 53(1): 87-98.
- [15] 唐思园. 胆南星发酵炮制工艺研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2012.
- [16] 陈江宁, 单国顺, 赵启苗, 等. 不同胆汁制胆南星中胆酸类成分及其解热作用比较 [J]. 现代药物与临床, 2017, 32(4): 567-571.
- [17] 陈云, 陈劲松, 郁红礼, 等. 胆南星发酵制品与混合蒸制品的鉴别研究 [J]. 世界中医药, 2019, 14(2): 283-286.
- [18] 张林, 李元波, 张爱军. 总评“归一值”优选银马口服液的澄清工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(2): 24-27.
- [19] Edgar R C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 996-998.
- [20] Rognes T, Flouri T, Nichols B, *et al.* VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics [J]. *Peer J*, 2016, 4: e2584.
- [21] An F Y, Li M, Zhao Y, *et al.* Metatranscriptome-based investigation of flavor-producing core microbiota in different fermentation stages of Dajiang, a traditional fermented soybean paste of Northeast China [J]. *Food Chem*, 2021, 343: 128509.
- [22] Maughan H, Wang P W, Diaz Caballero J, *et al.* Analysis of the cystic fibrosis lung microbiota via serial Illumina sequencing of bacterial 16S rRNA hypervariable regions [J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e45791.
- [23] 侯湖平, 王琛, 李金融, 等. 煤矸石充填不同复垦年限土壤细菌群落结构及其酶活性 [J]. 中国环境科学, 2017, 37(11): 4230-4240.
- [24] 贺亚男, 马乐乐, 吴意, 等. 青黛炮制浸泡发酵环节微生物群落结构与吡啶类成分转化研究 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(13): 3180-3187.
- [25] 胡炜东, 曹晓娟, 武俊英, 等. 发酵时间对燕麦青贮发酵品质和微生物群落的影响 [J]. 饲料研究, 2022, 45(17): 106-110.
- [26] 吴永祥, 王婷婷, 张梦婷, 等. 徽州臭鳃鱼微生物多样性、品质特性及其酶解产物抗氧化能力分析 [J]. 食品科学, 2021, 42(2): 128-134.
- [27] 武旭, 王晶, 邹婷, 等. 天南星胆汁制前后药性变化的研究 [J]. 中药药理与临床, 2023, 39(6): 81-87.
- [28] 张玉凤, 杨美娜, 庞靖祥, 等. 基于栅藻延迟发光的制天南星、胆南星药性研究 [J]. 中草药, 2018, 49(23): 5573-5579.
- [29] Gao Y X, Hou L Z, Gao J, *et al.* Metabolomics approaches for the comprehensive evaluation of fermented foods: A review [J]. *Foods*, 2021, 10(10): 2294.
- [30] 汪冬冬, 唐焱, 伍亚龙, 等. 泡菜细菌多样性和风味成分研究进展 [J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(21): 296-302.
- [31] 丁玉庭, 张静, 周绪霞, 等. 常见食品及调味品中嘌呤类组分含量分析及分布规律 [J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(15): 276-281.
- [32] Xiao M Y, Peng Z, Hardie W J, *et al.* Exploring the typical flavours formation by combined with metatranscriptomics and metabolomics during Chinese Sichuan Paocai fermentation [J]. *LWT*, 2022, 153: 112474.
- [33] 陈冬菊, 刘琨毅, 何二平, 等. 基于非靶向代谢组学分析不同发酵方式马铃薯泡菜代谢物 [J]. 食品研究与开发, 2024, 45(12): 135-143.
- [34] 田依冰, 李中玉, 温艳东, 等. 从胆汁酸-菌群轴探讨慢性萎缩性胃炎脾虚血瘀证的病机内涵 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2023, 29(9): 1496-1499.
- [35] 魏雅芹, 王天云, 李雅婷, 等. UPLC-Q/TOF-MS/MS 法分析鉴定夏佛塔昔在小鼠体内的代谢产物 [J]. 药学学报, 2022, 57(9): 2811-2820.
- [36] 曹文文, 王瑞生, 李柯柯, 等. 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 [J]. 中草药, 2024, 55(21): 7257-7265.

- [37] Niu K M, Wang H Y, Kim S K, *et al.* Stepwise co-fermented traditional Chinese medicine byproducts improve antioxidant and anti-inflammatory effects in a piglet model [J]. *J Sci Food Agric*, 2024, 104(2): 1166-1177.
- [38] Peng Y J, Huang Y H, Li L H, *et al.* Effects of anti-inflammatory and digestive-promoting fermented Chinese herbs on cecum microbiota composition and content metabolome of Chinese chickens (*Gallus domesticus*) [J]. *Ital J Anim Sci*, 2023, 22(1): 1219-1229.
- [39] Liu Q, Luo G L, Guo L, *et al.* Effects of fermented Chinese herb residues on growth performance, nutrient apparent digestibility, serum biochemical indices and faecal microbial flora in beef cattle [J]. *Ital J Anim Sci*, 2023, 22(1): 1305-1320.
- [40] Liu Y X, Cheng H, Liu H Y, *et al.* Fermentation by multiple bacterial strains improves the production of bioactive compounds and antioxidant activity of goji juice [J]. *Molecules*, 2019, 24(19): 3519.
- [41] 王淑红, 郭子瑜, 周碧乾, 等. 发酵类中药红曲的安全性质量控制研究进展 [J]. 中国药理学杂志, 2024, 59(13): 1186-1192.
- [42] 孙琳, 井长欣, 邹睿, 等. 刺五加-灵芝双向固体发酵工艺优化及抗氧化活性评价 [J]. 科学技术与工程, 2023, 23(21): 9004-9014.
- [43] 潘扬, 张弦, 刘亮镜, 等. 马钱子发酵品中生物碱化学成分研究 [J]. 中草药, 2012, 43(3): 452-457.
- [44] 赖晓微, 邓可众, 罗梦甜, 等. 真菌发酵对中药化学成分转化及应用研究进展 [J]. 中国酿造, 2024, 43(6): 21-26.
- [45] 武旭, 钟恋, 王晶, 等. 基于气相色谱-离子迁移色谱法结合分光测色仪技术分析不同胆汁及其所制胆南星的差异性 [J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(12): 5700-5708.
- [46] 王懿文, 谢纯良, 朱作华, 等. 黑曲霉固态发酵对金银花多酚类物质释放及增效作用 [J]. 食品研究与开发, 2023, 44(22): 23-29.
- [47] Rimbert S, Moreira J B, Xapelli S, *et al.* Role of purines in brain development, from neuronal proliferation to synaptic refinement [J]. *Neuropharmacology*, 2023, 237: 109640.
- [48] 洪文龙, 杜若滢, 顾会会, 等. 11 种加工食品中多种核苷/核苷酸同步定量分析的超高效液相色谱-质谱法方法建立 [J]. 食品科技, 2024, 49(5): 299-306.
- [49] 姚卓越, 李然, 蒋帅, 等. 代谢工程改造大肠杆菌生产胸苷 [J]. 生物工程学报, 2024, 40(8): 2432-2443.
- [50] 金贵诗, 许彤. 胆南星炮制方法研究进展 [J]. 中医药临床杂志, 2021, 33(10): 2042-2045.
- [51] 武旭. 牛胆汁发酵天南星的炮制工艺及其“性-毒-效”研究 [D]. 咸阳: 陕西中医药大学, 2023.
- [52] 翁浪仁, 王秋红, 蔡家瀚, 等. 胆酸的药理作用及其临床应用研究进展 [J/OL]. 中国现代应用药学 (2024-05-29) [2024-10-25]. doi: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20232348.

[责任编辑 郑礼胜]