

DOI:10.11937/bfyy.201702035

银翘复方药渣发酵处理试栽毛头鬼伞及主要药物成分分析

韩文清¹, 王建国², 何媛媛², 杨利², 杨娜娜³, 张明斗⁴

(1. 包头轻工职业技术学院 食品药品工程学院, 内蒙古 包头 014035; 2. 包头中药有限责任公司, 内蒙古 包头 014040; 3. 包头市昆区卜尔汉图镇卫生院, 内蒙古 包头 014035; 4. 包头市萨拉齐第二中学, 内蒙古 包头 014100)

摘要:为回收利用生产银翘片废弃药渣,以毛头鬼伞为供试菌株,发酵处理银翘药渣;建堆配料设计原则为控制总料 C/N 接近 40:1,以玉米芯为主料(配合添加奶牛粪、尿素),逐渐增大银翘药渣用量,以替代玉米芯;堆料共采用 4 个配方,配方 A(CK):玉米芯 200 kg,牛粪 100 kg,尿素 3.5 kg,辅料 6%(生石灰 2%、石膏 2%、过磷酸钙 2%);配方 B:玉米芯 100 kg,银翘药渣 50 kg,牛粪 50 kg,尿素 1.0 kg,辅料 6%;配方 C:玉米芯 75 kg,银翘药渣 100 kg,牛粪 50 kg,辅料 6%;配方 D:玉米芯 50 kg,银翘药渣 150 kg,牛粪 50 kg,辅料 6%。4 个配方堆料总干质量均在 200 kg 以上,依墙建堆成半圆锥形($h \geq 1.0$ m, $r \geq 1.4$ m);发酵升温 14 d(4-3-3-2-2)、经 4 次翻堆后,摊料降温装袋接种,待菌丝满袋后脱袋覆土出菇。结果表明:以配方 C 的产出率为最高,其相应生产指标为,初始 C/N 为 41.66、终点 C/N 为 23.71、腐熟度 T 为 0.569、接种满袋率 93.7%、菌袋平均产量 $381.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、生物学效率 41.0%。经 HPLC 检测,配方 C 发酵料中绿原酸、牛蒡苷含量分别为 $5.20 \sim 5.40$ 、 $4.49 \sim 5.30 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,其栽培所得子实体中绿原酸、牛蒡苷含量分别为 $0.40 \sim 0.45$ 、 $3.81 \sim 4.27 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,其中牛蒡苷从栽培料到子实体的迁移率达 84.93%。

关键词:银翘复方药渣;堆料发酵;栽培;毛头鬼伞;绿原酸;牛蒡苷

中图分类号:R 282.71 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)02-0145-05

维 C 银翘片为传统中药制剂,该制剂所采用配方源自祖国传统医学之经典方剂“银翘散”,主治风温初起之发热表证或属卫分风热症候者(流行性感冒、急性扁桃体炎等)^[1]。每年患者发病量大而且集中,所以该药品市场需求量大,国内许多大、中、小药企都相应有所生产;且该药品为片剂型生产,需要将九味中药浸提后取滤液经浓缩等工序再压制成片^[2],生产过程产生废弃物较多,每年都会产生大量复合型中药渣(该试验中简称银翘药渣)。2015《中国药典》成方制剂目录中相近剂型还有银翘伤风胶囊、银翘解毒丸(浓缩蜜丸)、银翘解毒片、银翘解毒颗粒等,这些制剂生产基本采用同一主方,所产生药

渣成分也基本一致,其总量足以成千上万吨计^[3]。在当今环境安全凸显重要的形势下,妥善处理这些数量庞大的中药提取废弃物是药企面临的非常急迫的问题。为达到资源的最大化利用,实现节能减排、发展生态经济,该研究拟对银翘药渣进行发酵处理后试栽毛头鬼伞,对栽培生产的配方设计、生物学效率及药物成分的迁移作初步探讨,以期推广应用于实际生产。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 毛头鬼伞(*C. comatus*)(菌株未命名)母种由大连全禾菌业有限公司菌种室提供。

1.1.2 主要仪器 BSA224S 型电子分析天平, KDN-2C 型凯氏定氮仪(上海), KYP-II 型消化炉(上海), Milli-Q 超纯水发生器(Millipore), KQ-300DB 型数控超声波清洗器, 岛津 LC-2010A HT 高效液相色谱仪。

第一作者简介:韩文清(1971-),男,硕士,副教授,现主要从事微生物应用等研究工作。E-mail:hanwenqing7@126.com。

基金项目:内蒙古自治区高等学校科学技术研究资助项目(NJZC14359)。

收稿日期:2016-09-26

1.1.3 主要试剂 绿原酸对照品(批号 110753-201314,含量 96.6%)、牛蒡苷对照品(批号 110819-201309,含量 95.7%)购自中国食品药品检定研究院;色谱乙腈、色谱甲醇、色谱乙酸均购自 Tedia 公司。

1.1.4 试验原料 药渣取自包头中药有限责任公司,为维 C 银翘片生产中中药浸取废弃物,原料药组成^[2]:山银花 180 g,连翘 180 g,荆芥 72 g,淡豆豉 90 g,淡竹叶 72 g,牛蒡子 108 g,芦根 108 g,桔梗 108 g,甘草 90 g;牛蒡子经 60%乙醇回流提取^[2]后单另收集;其余部分为经水煎煮提取 2 次^[2]后废弃物,与牛蒡子均匀混合后一起摊晾、晒干,防止霉变。牛粪由校园附近奶牛场收集,晒干、拍碎后装袋备用。玉米芯等常规栽培用料均购自当地农贸市场。出菇覆土为黄壤土,采自包头市区南郊黄河岸边冲积滩地。

1.2 试验方法

1.2.1 堆料配制 该试验建堆配料设计原则为控制总料 C/N 接近 40:1^[4-5],以玉米芯为主料(配合添加奶牛粪、尿素)作对照(CK),逐渐增大银翘药渣用量,以替代玉米芯。堆料共采用 4 个配方,配方 A:玉米芯 200 kg,牛粪 100 kg,尿素 3.5 kg,辅料 6%(生石灰 2%、石膏 2%、过磷酸钙 2%);配方 B:玉米芯 100 kg,银翘药渣 50 kg,牛粪 50 kg,尿素 1.0 kg,辅料 6%;配方 C:玉米芯 75 kg,银翘药渣 100 kg,牛粪 50 kg,辅料 6%;配方 D:玉米芯 50 kg,银翘药渣 150 kg,牛粪 50 kg,辅料 6%。

1.2.2 培养料堆积发酵 发酵场地为校园附近奶牛养殖场院内,选在背风向阳、北面靠墙的空闲场地。将 4 种配方中各种原料加水拌匀(料水比 1:1.5),料堆依墙而建呈半圆锥体形($h \geq 1.0$ m, $r \geq 1.4$ m),操作方法参考文献^[6]。从 2015 年 6 月 25 日建堆到 7 月 9 日发酵结束,共发酵 14 d(4-3-3-2-2),翻堆升温 4 次,间隔天数分别为 4、3、3、2 d,期间昼夜气温为 16~33 ℃。每次翻堆前保证料温达 65 ℃以上且至少保持 12~24 h。最后一次翻堆时喷入少量除虫菊酯类农药,2 d 后,摊料降温、装袋接种,为实现绿色生产,不添加多菌灵、克霉灵等抑菌药物。建堆初始及发酵结束时对发酵料多点取样、混匀,经自然干燥后破碎成粉,于凉暗处保存备用。母种、原种、栽培种制备按常规方法进行。

1.2.3 装袋发菌 4 个配方堆料装袋接种前,须分别称出待用菌种质量,接种方法参考文献^[7],采用 3 层接种法,一层料一层菌种,聚乙烯袋规格为

23 cm×45 cm×0.003 cm,播种量控制在 12%~14%。装好的栽培袋分类标记、称重(每个配方堆料装袋后总质量减去相应所接菌种袋质量得出 14 d 后堆料湿质量),并分层放置于培养室内架板上,每层垒放高度不超过 3 袋,每个配方栽培袋随机排放,于 20~25 ℃下遮光、通风培养,定期翻袋并检测菌丝生长情况,统计发菌成功率。

1.2.4 出菇管理 于 2015 年 8—9 月进行,出菇方法参考文献^[8],菌丝发满袋后统一后熟 15 d,菌棒脱袋后从中间截断、一分为二,立于盆(内径 61 cm、高 21 cm,盆底扎密集小孔用于排水)中覆土出菇,每处理重复 3 次。覆土后适时调节覆土含水量,勤浇水以盆底不渗出水滴为宜。于实训室内在 20~25 ℃下出菇,子实体采摘后刮去菌柄基部粘带泥土,称重并作好记录。

1.3 项目测定

1.3.1 出菇量统计 从每个配方发满菌的栽培袋中随机抽取发菌良好的栽培袋,每 10 袋为一个测定样,重复 3 次。采用软件 SPSS 18.0 对不同配方的出菇产量进行方差分析,以 Duncan 法进行多重比较。

1.3.2 有机碳、全氮含量测定 有机碳、全氮含量测定分别参考 NY/T1121.6-2006、GB/T6432-1994 进行,银翘片药渣、玉米芯、奶牛粪、不同配方堆料发酵前后的抽检样品经干燥、粉碎、过 3 号筛(50 目),由内蒙古农业大学检测中心完成。

1.3.3 HPLC 法测定经发酵料及毛头鬼伞子实体中牛蒡苷、绿原酸含量 1)发酵料(含药渣)及菇体样品溶液制备:采收七八分成熟的新鲜毛头鬼伞(*C. comatus*)子实体,切除基部,切成细条,烘箱中 50 ℃烘干,充分研碎成粉,再次 50 ℃烘干至恒重^[9]。将所得粉末与 1.2.2 项下制得发酵料粉末分别过 4 号筛(65 目),精密称取粉末 2 g,置 10 mL 棕色容量瓶中,加甲醇适量,超声处理(功率 300 W,频率 40 kHz)45 min,放冷,加甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得^[2]。2)色谱条件与系统适用性试验:绿原酸、牛蒡苷测定分别按 2015《中国药典》一部“维 C 银翘片”中[含量测定]山银花项、牛蒡子项下进行,上样量 10 μL。3)对照品溶液的制备:精密称取绿原酸、牛蒡苷对照品约 1 mg,分别置 100 mL(棕色)容量瓶中,用甲醇定容,制成绿原酸 10.8 μg·mL⁻¹、牛蒡苷 10.5 μg·mL⁻¹的贮备溶液;精密量取 10.8 μg·mL⁻¹绿原酸 1 mL、10.5 μg·mL⁻¹牛蒡苷 10 mL 置 25 mL(棕色)容量瓶中,甲醇定容。密封存于 4 ℃冰箱中备用,临用时用 0.22 μm 微孔滤膜滤

过,取续滤液,即得。4)线性关系考察:按上述色谱条件,设定绿原酸、牛蒡苷对照品溶液上样体积^[9-10]分别为1、2、4、6、8、10 μL ,对应检测浓度范围为:绿原酸 $0.043\ 2\sim 0.432\ 0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,牛蒡苷 $0.42\sim 4.20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。分别记录不同上样量下峰面积积分值,经回归处理,得绿原酸、牛蒡苷对照品线性方程: $Y=30\ 214X-0.515\ 2$, $R^2=0.999\ 7$; $Y=5\ 362.1X-205.18$, $R^2=1.000\ 0$ 。5)样品测定:分别取药渣及菇体样品溶液,按2)项下色谱条件测定,计算各样品中绿原酸、牛蒡苷含量。

2 结果与分析

2.1 不同栽培料有机碳、全氮含量

玉米芯、牛粪、银翘药渣的有机碳含量分别为48.7%、42.8%、71.1%,有机氮含量分别为0.38%、1.20%、2.18%,3种用料C/N值分别为128.2、35.7、32.6。银翘药渣氮素含量较高,氮素含量及碳氮比均接近棉籽皮,是一种理想的食用菌栽培用料。

表 1

堆料在发酵前后有机碳、全氮含量变化

培养料 Cultivating substrate	初始碳含量 Initial carbon content/%	终点碳含量 Finnal carbon content/%	碳含量降幅 Declining of carbon content/%	初始氮含量 Initial nitrogen content/%	终点氮含量 Finnal nitrogen content/%	氮含量增幅 Increase of nitrogen content/%	初始碳氮比 Initial C ₀ /N ₀	终点碳氮比 Finnal C _t /N _t	腐熟度 T ₀ Maturity T ₀ /%
A	44.2	33.3	-10.9	1.13	1.49	+0.36	39.00	22.35	0.573
B	50.2	36.3	-13.9	1.17	1.58	+0.41	41.04	22.97	0.560
C	54.7	40.3	-14.4	1.31	1.70	+0.39	41.66	23.71	0.569
D	58.1	42.9	-15.9	1.56	1.85	+0.29	37.17	23.16	0.623

2.3 不同堆料发酵处理后出菇产量分析

由表2可以看出,随药渣添加比例的增大,堆料的14 d后残留率呈下降趋势;随堆料秸秆类材质比例的增加,堆料的透气性得到改善,使得耐热好氧微生物代谢活动旺盛,总固形物的损失速率开始加

2.2 堆料发酵前后 C/N 的变化

堆肥过程中总有机碳和全氮的变化是堆肥过程变化的重要特征,在李锐鹏^[11]3个不同处理堆肥试验中,堆肥过程中总有机碳都是不断地消耗减少,全氮含量都呈增加趋势。由表1可知,在栽培料堆制发酵过程中,堆料配方虽不同,但堆料总有机碳及全氮的变化也呈同样趋势。

C/N是堆肥腐熟进程的重要判断指标,MOREL等^[12]建议采用 $T=(\text{初始 } C/N)/(\text{终点 } C/N)$ 评价堆肥腐熟度,并收集分析了许多相关数据,认为当T值小于0.6堆肥达到腐熟。该试验4个配方堆料在发酵之前都接近40:1(配方D略低,由于将氮含量较高的银翘药渣增大到了150 kg,占总料的56.6%,使得总料的C/N值变小),经14 d堆积发酵,终点C/N在22~23,腐熟度T值都接近0.6(表1),说明4个堆料基本达到腐熟。

快^[11]。另外,堆料的接种萌发率、袋料平均产量、生物学效率都有所增高,其中以配方3添加比例为效果最好。该试验所用覆土取自黄河岸边冲积滩地,土壤粒径小,浇水后易板结,透气性差,对出菇产量有一定影响。

表 2

不同配方堆料发酵处理前后质量变化及毛头鬼伞产量分析

配方 Substrate	堆料干质量 Weight of dry material/kg	药渣含量 Residue content/%	14 d后堆料残留率 Residual ratio of the substrate after 14 days/%	接种萌发率 Germination rate/%	袋料总质量(不含菌质量) Total weight of the bag substrate/kg	袋料平均产量 Yield of each bag substrate/(g·kg ⁻¹)	出菇总质量 Total yield /kg	生物学效率 Biological efficiency/%
A	321.7	0.00	81.5	47.9	188.6	282.6±18.0aA	53.30±3.39aA	16.6±1.06aA
B	213.1	23.5	78.2	75.8	189.5	370.4±8.0bB	70.18±1.52bB	32.9±0.71bB
C	238.5	41.9	76.4	93.7	256.1	381.9±6.9bB	97.81±1.76cC	41.0±0.74cC
D	265.0	56.6	75.1	92.3	275.5	380.2±7.8bB	104.76±2.96dD	39.5±1.12cC

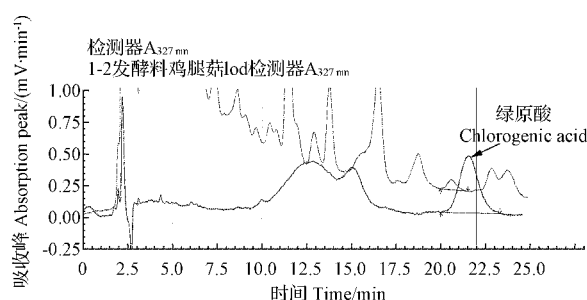
注:同列相同字母表示差异不显著,反之差异显著;小写字母表示 $P<0.05$,大写字母表示 $P<0.01$,下同。

Note: The same letter in the same column indicates that the distinction is not significant and vice versa. Lowercase letters indicate $P<0.05$ and capital letters indicate $P<0.01$.

2.4 银翘药渣及毛头鬼伞子实体中绿原酸、牛蒡苷含量检测结果

绿原酸、牛蒡苷分别为金银花、牛蒡子活性成分之一,在1.3.3方法中描述色谱条件下,药渣及菇体中绿原酸、牛蒡苷与其它组分分离非常好,峰型对

称,无拖尾现象,不受样品中其它组分干扰(图1、2)。由于银翘片生产的原料药中绿原酸、牛蒡苷已被充分提取,所以药渣中2种物质含量相对较少(表3)。发酵料C栽培所得毛头鬼伞子实体中绿原酸含量仅为装料接种时栽培料含量的7.69%(均以表3中最



注:下曲线为银翘药渣,上曲线为毛头鬼伞。图2同。

Note: Upper curve is the residue of Yinqiao, below curve is the chlorogenic acid.

图1 银翘药渣及毛头鬼伞中绿原酸的曲线

Fig. 1 HPLC chromatograms of chlorogenic acid of *Coprinus comatus* and residue of Yinqiao

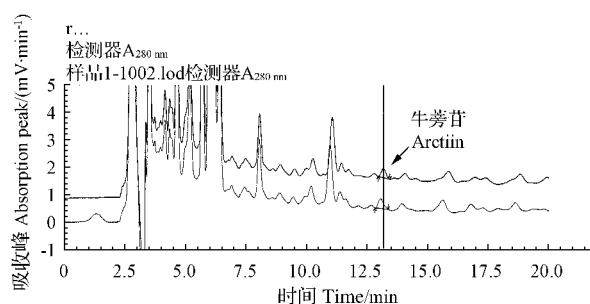


图2 银翘药渣及毛头鬼伞中牛蒡苷的曲线

Fig. 2 HPLC chromatograms of arctiin of *Coprinus comatus* and residue of Yinqiao

表3

发酵料及菇体中绿原酸、牛蒡苷含量

Table 3

Content determination results of chlorogenic acid and arctiin

样品 Substrate	时间 Time/min	峰面积 Absorption peak/(mV·min ⁻¹)	浓度 Concentration/(μg·mL ⁻¹)	含量 Content/(μg·g ⁻¹)
发酵料(绿原酸)Fermented substrate (chlorogenic acid)	20.50~23.50	32 580~33 843	1.08~1.12	5.20~5.40
菇体(绿原酸)Fruit body(chlorogenic acid)	20.50~21.50	2 526~2 829	0.08~0.09	0.40~0.45
发酵料(牛蒡苷)Fermented substrate (arctiin)	12.80~13.45	4 706~5 106	0.90~1.06	4.49~5.30
菇体(牛蒡苷)Fruit body(arctiin)	12.80~13.35	3 850~4 078	0.76~0.85	3.81~4.27

低含量计算),说明经发酵升温、发菌及出菇过程,绿原酸含量急剧减少;这与绿原酸性质较不稳定、受热或见光易分解^[13]密切相关。而同样条件下栽培所得毛头鬼伞子实体中牛蒡苷含量却为装料接种时栽培料含量的84.93%。

3 讨论

3.1 栽培生产方式的探讨

该试验曾尝试采用药渣的熟料栽培生产方式^[3],若应用推广,蒸料过程相对费时费力,且药渣里有桔梗、荆芥等根、茎类较长的药材,装袋灭菌前还须将药材作破碎处理,多道工序,不是十分便捷。其实,秸秆类较长的材质正适合作发酵处理,堆制后堆料相对蓬松、透气,利于升温、腐熟。药渣的发酵料栽培简便易行,生产条件要求简单,便于在农户中推广使用。

3.2 药物成分的抑菌作用

银翘复方药渣含9种中药组分(金银花、连翘、荆芥等),这些中药组分含有多重药物活性成分,其中有些物质均具有抗菌作用^[14],如金银花所含绿原酸、异绿原酸,连翘所含连翘酚,甘草所含甘草甜素等,如果经煎煮浸提后在药渣中仍有残留,将会抑制毛头鬼伞菌丝的萌发及生长。该研究以玉米芯为主料(配合添加奶牛粪、尿素)作对照,逐渐增大银翘药

渣用量,以替代玉米芯进行发酵料栽培试验,装料接种后菌丝均能快速、正常生长,与对照组相比均未有明显受抑制现象,且出菇产量均高于对照组,说明该方法具有可行性。

参考文献

- [1] 段富津. 方剂学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1995.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
- [3] 韩文清,于德才,杨辉,等. 维C银翘片复方药渣栽培毛头鬼伞初探[J]. 内蒙古师大学报(自然汉文版),2015,44(3):415-420.
- [4] 宋锡金. 新编食用菌栽培学[M]. 呼和浩特:内蒙古科学技术出版社,2001.
- [5] 杜敏华. 食用菌栽培学[M]. 北京:化学工业出版社,2007.
- [6] 韩文清,张明斗,张锐,等. 平菇污染料栽培鸡腿菇研究[J]. 食用菌学报,2009,16(3):22-24.
- [7] 王德芳,刘瑞芳,马兰,等. 现代食用菌栽培技术[M]. 武汉:华中科技大学出版社,2012.
- [8] 韩文清,杨辉,于德才,等. 不同覆土基质特性及其对毛头鬼伞出菇产量的影响[J]. 食用菌学报,2014,21(4):22-24.
- [9] 韩永成,刘伟,陈宁,等. UHPLC法同时测定金银花中6种有效成分的含量[J]. 天然产物研究与开发,2015,27(1):89-93.
- [10] 白俞. UV法及HPLC法测定重庆地区金银花中绿原酸和木樨草苷含量比较研究[D]. 重庆:西南大学,2013.
- [11] 李锐鹏. 秸秆与奶牛场废弃物混合堆肥及其应用研究[D]. 南京:南京农业大学,2012.
- [12] MOREL T L, COLIN F, GERMON J C, et al. Methods for the evaluation of the maturity of municipal refuse compost[M]//Gasser J K R.

In composting of agricultural and other wastes, London and New York; Elsevier applied science publisher, 1985.

[13] 蒋玉林. 金银花、茎、叶中绿原酸含量分析对比及综合利用研究

[D]. 长沙:中南大学, 2014.

[14] 国家食品药品监督管理局执业药师资格认证中心组织编写

[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2014.

Cultivation of *Coprinus comatus* Using the Fermented Chinese Medicine Residue From Yingqiao Detoxication Pills Production Waste and Analysis of the Active Pharmaceutical Ingredient

HAN Wenqing¹, WANG Jianguo², HE Yuanyuan², YANG Li², YANG Nana³, ZHANG Mingdou⁴

(1. School of Food and Drug, Baotou Light Industry Vocational Technical College, Baotou, Inner Mongolia 014035; 2. Baotou Chinese Traditional Medicine Co. Ltd., Inner Mongolia, Baotou 014040; 3. Kunqu Buerhan Township Health Centers in Baotou, Baotou, Inner Mongolia 014040; 4. No. 2 Salaqi Senior High School, Baotou, Inner Mongolia 014100)

Abstract: *Coprinus comatus* was cultivated by using the fermented Chinese medicine residue from Yingqiao detoxication pills production waste to recycle it. Corncobs were used as the main materials added with cow dung and urea to design the stack with C/N as 40 : 1. Four designs A, B, C, D were adopted to build the stacks for controlling with Design A: corncobs 200 kg, cow dung 100 kg, urea 3.5 kg, accessories 6% (lime 2%, gypsum 2%, calcium superphosphate 2%). Design B: corncobs 100 kg, Yingqiao residue 50 kg, cow dung 50 kg, urea 1 kg, accessories 6% (lime 2%, gypsum 2%, calcium superphosphate 2%). Design C: corncobs 75 kg, Yingqiao residue 100 kg, cow dung 50 kg, accessories 6% (lime 2%, gypsum 2%, calcium superphosphate 2%) and Design D: corncobs 50 kg, Yingqiao residue 150 kg, cow dung 50 kg, accessories 6% (lime 2%, gypsum 2%, calcium superphosphate 2%). The dry cultivating substrate weighing over 200 kg were stacked against the wall and shaped as a semicone. After 14 days of fermentation and four times of turning-over of the stacks (respectively on the fourth day, the seventh day, the tenth day and the twelfth day), the cultivating substrate were packed in the bags and inoculated. When the hyphae was full of the bag, it was taken out of the bag and cased with soil to make fruit developed. The results showed that the fruit body yield of Design C was the highest of the four designs, with the parametres of it as initial C/N 41.66, final C/N 23.71, T value 0.569, the bag filling ratio of inoculation 93.7%, the even bag yield of mushroom 381.9 g · kg⁻¹, and the biological efficiency 41.0%. As the HPLC showed, the contents of chlorogenic acid and arctiin in the fermented cultivating substrate of Design C were 5.20—5.40 μg · g⁻¹, 4.49—5.30 μg · g⁻¹ respectively and they were 0.40—0.45 μg · g⁻¹, 3.81—4.27 μg · g⁻¹ in the fruit body. The transferring rate of arctiin from the cultivating substrate to the fruit body was high up to more than 84.93%.

Keywords: Yingqiao residue; stack fermentation; cultivation; *Coprinus comatus*; chlorogenic acid; arctiin