

· 药学基础 ·

## 厚朴药渣资源化综合利用的预处理方法考察

肖鹿昆<sup>1,2</sup>, 赵桢熠<sup>2</sup>, 邸继鹏<sup>2</sup>, 刘安<sup>2</sup>, 陈莎<sup>2</sup>, 章军<sup>2</sup>, 张爱平<sup>1\*</sup>, 刘艳<sup>2\*</sup>

(1. 山西医科大学药学院, 太原 030001; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 目的:探究促进厚朴药渣酶解及有效成分提取的预处理方法,为厚朴药渣中资源性成分的利用提供参考依据。方法:采用液质联用技术(LC-MS)分析厚朴药渣中资源性成分的种类,检测条件为Agilent C<sub>18</sub>反相色谱柱(3.0 mm×100 mm, 2.7 μm),流动相水(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~3 min, 25%~48%B; 3~6 min, 48%~59%B; 6~10 min, 59%~80%B; 10~20 min, 80%~90%B; 20~25 min, 90%B),流速0.4 mL·min<sup>-1</sup>,电喷雾离子源(ESI),负离子扫描模式,扫描范围 $m/z$  50~1 200。参考2020年版《中华人民共和国药典》(一部)“厚朴”项下含量测定方法,运用高效液相色谱法(HPLC)定量分析其资源性成分。采用4种预处理剂对厚朴药渣的资源性成分进行分离,并通过场发射扫描电子显微镜(FESEM)、X射线粉末衍射(XRD)及傅里叶变换红外光谱(FT-IR)技术分析不同预处理剂的作用机制。结果:定性和定量分析明确了厚朴药渣的主要资源性成分为厚朴酚、和厚朴酚及木质纤维素组分。在1% NaOH、反应温度80 °C、反应时间60 min条件下,预处理后固体残渣酶解产生还原糖质量浓度32.18 g·L<sup>-1</sup>,较未预处理药渣提高了79.8%,若加入聚山梨酯-80(tween-80),酶解时间缩至原来的1/3(24 h),还原糖质量浓度提高了102.0%;预处理液中厚朴酚和和厚朴酚的总回收率69.23%。结论:厚朴药渣中厚朴酚、和厚朴酚及木质纤维素组分具备开发价值,碱预处理联合tween-80可实现这3种资源性成分的回收利用,可为中药药渣资源性成分的综合利用提供新思路。

**[关键词]** 厚朴药渣; 碱预处理; 双碳; 聚山梨酯-80; 和厚朴酚; 资源化利用; 高效液相色谱法(HPLC)

**[中图分类号]** R22;R28;R931;O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)12-0149-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20230749 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20230320.1523.004.html>

**[网络出版日期]** 2023-03-21 16:21:26

### Investigation of Pretreatment Methods for Comprehensive Resource Utilization of Magnoliae Officinalis Cortex Dregs

XIAO Lukun<sup>1,2</sup>, ZHAO Anyi<sup>2</sup>, DI Jipeng<sup>2</sup>, LIU An<sup>2</sup>, CHEN Sha<sup>2</sup>, ZHANG Jun<sup>2</sup>,  
ZHANG Aiping<sup>1\*</sup>, LIU Yan<sup>2\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the pretreatment methods to promote the enzymatic digestion and extraction of active ingredients from Magnoliae Officinalis Cortex dregs(MOCD), and to provide a reference basis for the utilization of resource components in MOCD. **Method:** Liquid chromatography-mass spectrometry(LC-MS) was used for qualitative analysis of resource components in MOCD with an Agilent C<sub>18</sub> reversed-phase column(3.0 mm×100 mm, 2.7 μm) at the flow rate of 0.4 mL·min<sup>-1</sup>, the mobile phase was water(A)-acetonitrile(B) for gradient elution(0-3 min, 25%-48%B; 3-6 min, 48%-59%B; 6-10 min, 59%-80%B; 10-20 min, 80%-90%B; 20-25 min, 90%B), electrospray ionization(ESI) was employed with negative ion mode scanning and scanning range of  $m/z$  50-1 200. A high performance liquid chromatography(HPLC), which referred to the

**[收稿日期]** 2023-02-08

**[基金项目]** 国家重点研发计划项目(2019YFC1906601)

**[第一作者]** 肖鹿昆, 硕士, 从事药物分析研究, E-mail: xlk18417@163.com

**[通信作者]** \* 张爱平, 博士, 教授, 从事纳米材料的生物学效应研究, E-mail: zhangap1@163.com;

\* 刘艳, 博士, 副研究员, 从事中药质量控制技术和经典名方开发研究, E-mail: yliu1980@icmm.ac.cn

determination in the 2020 edition of *Chinese Pharmacopoeia*, was used for quantitative analysis of resource components in MOCD. Four kinds of pretreatment agents were used to separate the resource components from MOCD, and the mechanism of different pretreatment agents was investigated by field emission scanning electron microscopy (FESEM), X-ray powder diffraction (XRD) and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). **Result:** Magnolol, honokiol and lignocellulose were identified as the main resource components of MOCD by qualitative and quantitative analysis. Under the conditions of 1% NaOH, reaction temperature at 80 °C and reaction time of 60 min, the concentration of reducing sugar produced by the enzymatic hydrolysis was 32.18 g·L<sup>-1</sup>, which was 79.8% higher than that of the untreated MOCD. After adding tween-80, the enzymatic hydrolysis time was reduced to 1/3 of the original time, the concentration of reducing sugar was increased by 102.0%. And the total recovery of magnolol and honokiol in the pretreatment solution was 69.23%. **Conclusion:** Magnolol, honokiol and lignocellulosic components in MOCD are valuable for development and utilization, the combination of alkaline pretreatment and tween-80 can realize the recovery and utilization of these three resource components, which can provide a new idea for comprehensive utilization of resource components in MOCD.

**[Keywords]** Magnoliae Officinalis Cortex dregs; alkaline pretreatment; bicarbon; tween-80; honokiol; resource utilization; high performance liquid chromatography (HPLC)

厚朴为木兰科植物厚朴 *Magnolia officinalis* 或凹叶厚朴 *M. officinalis* var. *biloba* 的干燥干皮、根皮及枝皮,具有燥湿消痰、下气除痹的功效,临床主要用于湿滞伤中、脘痞吐泻、食积气滞、腹胀便秘、痰饮喘咳等证<sup>[1-2]</sup>。厚朴作为中医临床常用药味<sup>[3]</sup>,产生的大量药渣直接堆放和掩埋会造成资源浪费和环境污染。目前,大部分的厚朴饮片及其复方制剂的传统提取溶剂为水<sup>[4-5]</sup>,水提后药渣中仍可能残留大量脂溶性成分,如厚朴酚、和厚朴酚及其相关衍生物等<sup>[6]</sup>,目前有少量研究者对厚朴药渣中残留化学成分进行了提取<sup>[7-8]</sup>。

目前对厚朴药渣资源性成分利用的研究主要是提取其脂溶性成分,对其生物质资源化利用的研究则较少。木质纤维素生物质的资源化利用主要是对其糖化发酵生产高附加值化学品<sup>[9-10]</sup>,该利用途径的关键点在于厚朴药渣酶解糖化的还原糖产量,但植物细胞壁的抗性屏障会阻碍纤维素酶与纤维素的可及性<sup>[11-13]</sup>,从而使厚朴药渣生物质的酶解产糖量大大降低,再利用成本大幅度提高,采用合适的预处理方法或酶解时添加促进酶活的物质(如表面活性剂等)可在一定程度上缓解这一问题<sup>[14-16]</sup>。然而,厚朴药渣与其他农业类生物质资源不同,其是具有较强小分子屏障的特殊生物质,除存在细胞壁的抗性屏障外,还可能含有会抑制纤维素酶活性的酚类化合物<sup>[17]</sup>,说明探究合适的预处理方法及其作用机制是非常必要的。基于此,本研究拟通过液质联用技术(LC-MS)和高效液相色谱法(HPLC)分析厚朴药渣的可利用资源性物质,并设计适合厚朴

药渣资源性成分综合利用的路径,以实现厚朴酚、和厚朴酚及木质纤维素生物质的综合回收利用,为中药药渣的资源化利用提供典型案例参考。

## 1 材料

FW80型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司),HYG-C型多功能组合摇床(苏州培英实验设备有限公司),UltiMate 3000型高效液相色谱仪(配备电喷雾式检测器)、Nicolet iS50型傅里叶变换红外光谱仪(美国赛默飞公司),ME204T/02型万分之一电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司],1290型超高效液相色谱-6540型飞行时间串联四极杆质谱仪[配备电喷雾离子源(ESI)],1260型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),X'Pert3 Powder型X射线粉末衍射仪(荷兰PANalytical公司),Merlin Compact型场发射扫描电子显微镜(FESEM,德国ZEISS公司)。

厚朴酚、和厚朴酚对照品(成都普思生物科技股份有限公司,批号分别为PS010353、PS000412,纯度分别为≥99%、≥98%),D-无水葡萄糖对照品(江西佰草源生物科技有限公司,批号BCY-000577,纯度≥98%),D-木糖、L-阿拉伯糖对照品(上海麦克林生化科技股份有限公司,批号分别为D820550、L800479,纯度均≥99%),Cellic® CTec3型纤维素酶(北京高端森科技有限公司,批号VDQ10004),厚朴(基原为 *M. officinalis*)药渣(华润三九医药股份有限公司,批号20210401,质量约10 kg,是厚朴药材水煎煮生产厚朴配方颗粒后风干获得),聚山梨酯-80(tween-80,北京索莱宝科技有限公司,批号

EZ7890D207),乙腈、三乙胺为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 厚朴药渣的定性分析

**2.1.1 供试品溶液的制备** 称取厚朴药渣(过40目筛)约0.2 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入甲醇25 mL,密塞,浸渍24 h,过0.22 μm微孔滤膜,即得。

**2.1.2 检测条件** 色谱条件为Agilent C<sub>18</sub>反相色谱柱(3.0 mm×100 mm, 2.7 μm),流动相水(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~3 min, 25%~48%B; 3~6 min, 48%~

59%B; 6~10 min, 59%~80%B; 10~20 min, 80%~90%B; 20~25 min, 90%B),柱温25 °C,进样量5 μL,流速0.4 mL·min<sup>-1</sup>。质谱条件为ESI,负离子模式扫描,干燥气温度350 °C,干燥气流量9 L·min<sup>-1</sup>,离子源温度320 °C,雾化器压力40 psi(1 psi≈6.895 kPa),毛细管电压2.5 kV,质量扫描范围 $m/z$  50~1 200。

**2.1.3 定性分析** 供试品溶液经LC-MS检测后,其在负离子模式下的总离子流图见增强出版附加材料。通过数据库和相关文献共鉴别出11个化合物,包括9个木脂素类和2个苯丙素苷类,见表1,化合物结构式见增强出版附加材料。

表1 厚朴药渣中资源性成分的LC-MS分析

Table 1 Analysis of resource components in *Magnoliae Officinalis Cortex* dregs by LC-MS

化合物	名称	分子式	$t_R$ /min	$m/z$ [M-H] <sup>-</sup>	碎片离子
1	厚朴苷B	C <sub>35</sub> H <sub>46</sub> O <sub>20</sub>	1.546	785.268 8	623.237 6, 477.170 1, 461.178 4, 161.028 6
2	厚朴苷A	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>15</sub>	1.780	623.213 1	461.178 5, 161.028 5
3	magndignan C	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	2.488	299.137 0	257.052 1, 239.113 6
4	magndignan E	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	2.910	297.121 4	267.109 2, 249.097 3
5	厚朴三酚	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	3.224	241.093 6	223.083 0
6	randainal	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	4.229	279.110 6	261.099 0
7	和厚朴酚	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	5.799	265.131 2	249.098 8, 224.090 7, 223.077 2, 209.066 6, 197.065 9
8	和厚朴新酚	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>	6.678	281.126 4	240.085 8, 164.052 6
9	厚朴酚	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	6.867	265.131 2	247.119 6, 245.103 0, 223.081 3
10	mag nolignan F	C <sub>36</sub> H <sub>36</sub> O <sub>6</sub>	15.702	563.246 7	265.131 2, 261.121 1
11	辣薄荷基厚朴酚	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	18.045	401.259 5	383.248 5, 247.119 3

化合物2在负离子模式下准分子离子峰为 $m/z$  623.213 1 [M-H]<sup>-</sup>,脱去咖啡醛基形成碎片离子 $m/z$  461.178 5 [M-H-C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>]<sup>-</sup>,咖啡醛基转化为咖啡酸后脱去一分子水形成碎片离子 $m/z$  161.028 5 [C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>-H-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>,结合文献[18]确定该化合物为厚朴苷A。化合物1在负离子模式下的准分子离子峰为 $m/z$  785.268 8 [M-H]<sup>-</sup>,脱去咖啡醛基形成碎片离子 $m/z$  623.237 6 [M-H-C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>]<sup>-</sup>,随后脱去鼠李糖苷或葡萄糖苷形成碎片离子 $m/z$  477.170 1 [M-H-C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>]<sup>-</sup>和 $m/z$  461.178 4 [M-H-C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>]<sup>-</sup>,形成的咖啡酸脱水形成碎片离子 $m/z$  161.028 6 [C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>-H-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>,故鉴定该化合物为厚朴苷B。化合物7在负离子模式下准分子离子峰为 $m/z$  265.131 2 [M-H]<sup>-</sup>,烯丙基自由基断裂形成二级碎片离子 $m/z$  224.090 7 [M-H-C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>]<sup>-</sup>,正烯丙基形成五元环和三元环得碎片离子 $m/z$  249.098 8 [M-H-CH<sub>4</sub>]<sup>-</sup>和 $m/z$  223.077 2 [M-H-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>]<sup>-</sup>,五元

环的形成及烯丙基自由基断裂出现碎片离子 $m/z$  209.066 6 [M-H-CH<sub>4</sub>-C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>]<sup>-</sup>,三元环的形成伴随着乙烯基断裂形成碎片离子 $m/z$  197.065 9 [M-H-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>]<sup>-</sup>,结合文献[19],确定该化合物为和厚朴酚。化合物3结构中的正烯丙基形成三元环产生二级碎片离子 $m/z$  257.052 1 [M-H-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>]<sup>-</sup>,苯环侧链的丙二醇基断裂形成碎片离子 $m/z$  239.113 6 [M-H-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>-</sup>,因此确定该化合物为magndignan C。化合物4的准分子离子峰为 $m/z$  297.121 4 [M-H]<sup>-</sup>,形成的二级碎片离子为 $m/z$  267.109 2 [M-H-CH<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>和 $m/z$  249.097 3 [M-H-CH<sub>2</sub>O-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>,推测该化合物为magndignan E。化合物8的正烯丙基形成三元环形成 $m/z$  240.085 8 [M-H-C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>]<sup>-</sup>,脱去苯丙烯基形成 $m/z$  164.052 6 [M-H-C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>]<sup>-</sup>,推测该化合物为和厚朴新酚。化合物9在负离子模式下准分子离子峰为 $m/z$  265.131 2 [M-H]<sup>-</sup>,2个醇羟基失去一分子水形成二级碎片离子 $m/z$  247.119 6 [M-H-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>,随后电子转移使烯基失去2个H转化为炔基并形成碎片离子 $m/z$  245.103 0 [M-H-H<sub>2</sub>O-2H]<sup>-</sup>;

此外,烯丙基和2个H的脱落形成碎片离子  $m/z$  223.081 3  $[M-H-C_3H_6]^-$ ,结合文献[20]确定该化合物为厚朴酚。化合物5、6、11的准分子离子峰分别为  $m/z$  241.093 6  $[M-H]^-$ 、 $m/z$  279.110 6  $[M-H]^-$ 和  $m/z$  401.259 5  $[M-H]^-$ ,三者均产生了失去1个水分子的二级碎片  $m/z$  223.083 0  $[M-H-H_2O]^-$ 、 $m/z$  261.099 0  $[M-H-H_2O]^-$ 和  $m/z$  383.248 5  $[M-H-H_2O]^-$ ,且化合物11丢失辣薄荷基和1个水分子后形成碎片离子  $m/z$  247.119 3  $[M-H-H_2O-C_{10}H_{18}]^-$ ,据此鉴定三者分别为厚朴三酚、randainal和辣薄荷基厚朴酚。化合物10准分子离子峰  $m/z$  563.246 7  $[M-H]^-$ ,碎片离子有  $m/z$  265.131 2  $[M-H-C_{18}H_{18}O_4]^-$ 和  $m/z$  261.121 1  $[C_{18}H_{18}O_4-H-2H_2O]^-$ ,推测该化合物为厚朴酚二聚体的衍生物 magnolignan F。

## 2.2 厚朴药渣的定量分析

**2.2.1 小分子化合物定量分析** 厚朴药渣中的厚朴酚及和厚朴酚的含量采用2020年版《中华人民共和国药典》(一部)“厚朴”项下含量测定方法进行分析<sup>[1]</sup>。色谱条件为Agilent C<sub>18</sub>反相色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),检测波长294 nm,流动相水-乙腈(22:78),柱温30℃,流速1 mL·min<sup>-1</sup>,进样量5 μL。精密称取厚朴药渣约0.2 g,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇25 mL,摇匀,密塞,浸渍24 h,过0.45 μm微孔滤膜,得供试品溶液,平行3次。结果发现厚朴药渣中厚朴酚及和厚朴酚的残留量较大,二者质量分数分别为1.72%和0.56%,总量2.28%。

**2.2.2 木质纤维素组分定量分析** 采用美国国家可再生能源实验室(NREL)方法制备<sup>[21]</sup>。精密称取厚朴药渣约0.15 g,置60 mL高硼硅玻璃管中,加入72% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.5 mL,置于30℃摇床中反应60 min,待反应结束后取出,冷却至室温,精密加入去离子水42 mL,摇匀,使硫酸质量分数达4%,盖好盖子,置于120℃高压灭菌锅中反应60 min,待反应结束后,冷却至室温。采用烘干至恒重的过滤坩埚进行固液分离,其中液体部分用氢氧化钡中和溶液中的硫酸至pH 7.0后,过0.45 μm微孔滤膜,即得测定还原糖浓度的供试品溶液;固体部分用水洗至中性,将过滤坩埚置于105℃烘箱中烘干至恒重,计算木质素含量,平行3次。采用Waters XBridge Amide色谱柱(4.6 mm×250 mm, 3.5 μm),流动相乙腈-0.2%三乙胺水溶液(80:20),流速0.5 mL·min<sup>-1</sup>,柱温30℃,电喷雾式检测器。纤维素和半纤维素含量分别按公式纤维素含量=葡萄糖浓度×供试品溶液体积/称样量×100%和半纤维素含量=(木糖浓度+阿拉

伯糖浓度)×供试品溶液体积/称样量×100%计算。结果发现厚朴药渣中木质纤维素成分的含量较高,约占70%,其中纤维素、半纤维素及木质素质量分数分别为28.21%、16.96%和24.13%。

**2.3 资源化利用思路** 针对厚朴药渣的两类资源性物质,本研究设计了1条资源化利用路径,见图1。该路径中预处理从破坏木质纤维素的抗性屏障和溶解纤维素酶的酚类抑制剂两方面促进厚朴药渣的酶解产糖,同时采用化学方法对预处理液中的厚朴酚及和厚朴酚进行回收。

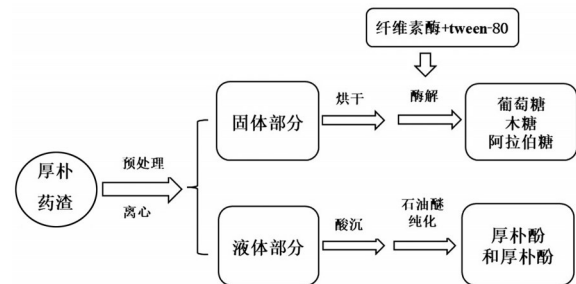


图1 厚朴药渣的资源化利用路径

Fig. 1 Resource utilization path of Magnoliae Officinalis Cortex dregs

## 2.4 预处理剂的选择及机制解析

**2.4.1 厚朴药渣的预处理** 将厚朴药渣置于80℃烘箱中烘干至恒重,粉碎过40目筛。按固液比1:20加入厚朴药渣和预处理剂(水、1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、1% HCl和1% NaOH),摇匀,于120℃高压灭菌锅中反应60 min。反应结束后,固体部分水洗至中性,离心(转速8 000 r·min<sup>-1</sup>,时间10 min,离心半径10 cm,下同),用水洗至中性,固体部分置于80℃烘箱中烘干,用于木质纤维素组分测定和酶解,液体部分混合后用于厚朴酚及和厚朴酚的含量测定。

**2.4.2 药渣木质纤维素组分分析** 预处理后厚朴药渣的木质纤维素组分含量采用2.2.2项下方法测定,计算固体回收率、纤维素回收率、半纤维素回收率及木质素去除率,计算公式分别为固体回收率=预处理后药渣质量/药渣原料质量×100%、纤维素回收率=预处理后药渣纤维素含量×固体回收率/药渣原料纤维素含量×100%、半纤维素回收率=预处理后药渣半纤维素含量×固体回收率/药渣原料半纤维素含量×100%、木质素去除率=(1-预处理后药渣木质素含量×固体回收率/药渣原料木质素含量)×100%,见表2。结果发现4种预处理剂预处理后,药渣的木质纤维素成分均有不同程度的变化,其中1% NaOH预处理后药渣的纤维素和半纤维素含量

最高,并且木质素含量也低于原药渣;碱预处理(1% NaOH)对纤维素的回收率和木质素的去除率

均为最高,酸预处理(1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>和1% HCl)对纤维素的回收能力较差。

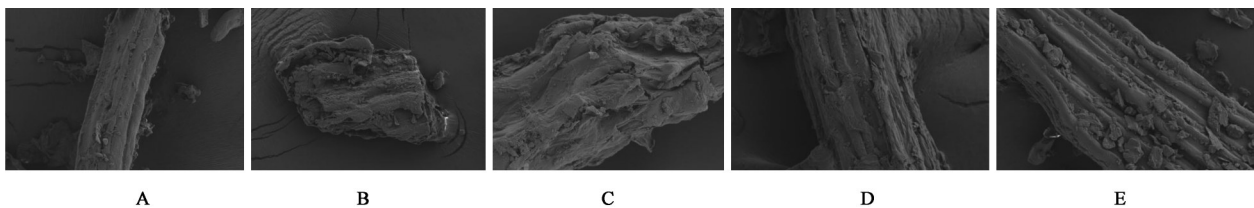
表2 不同预处理方式对厚朴药渣木质纤维素组分的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 2 Effect of different pretreatment methods on lignocellulosic components in *Magnoliae Officinalis* Cortex dregs ( $\bar{x}\pm s, n=3$ ) %

预处理剂	纤维素	半纤维素	木质素	固体回收率	纤维素回收率	半纤维素回收率	木质素去除率
H <sub>2</sub> O	32.61±1.06	5.41±0.87	28.07±0.28	76.20±1.13	87.82±0.68	9.74±0.89	11.40±0.99
1% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	31.18±0.59	2.08±0.26	34.63±0.49	59.48±0.78	65.55±2.26	7.28±2.14	14.58±0.28
1% HCl	39.90±2.06	7.73±1.96	31.69±1.21	57.87±0.38	81.60±1.01	26.40±1.16	24.17±1.13
1% NaOH	44.49±1.16	9.97±0.69	22.51±0.52	56.93±1.05	91.97±0.54	33.56±0.81	47.45±1.38

2.4.3 FESEM分析 将适量干燥后的样品在真空条件下喷金,通过FESEM在10.0 kV电压下获取样品形貌变化,不同样品的FESEM分析见图2。结果显示,原药渣表面光滑,结构致密,生物质内部的纤维束被半纤维素和木质素紧密包裹;水预处理后药渣的生物质表面的致密结构被部分破坏;1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

预处理后药渣的生物质表面被部分破坏且内部的纤维束也出现断裂;1% HCl与1% NaOH预处理后生物质表面的致密结构被完全破坏,其内部结构中的纤维束被暴露出来,且1% NaOH预处理后药渣的纤维束比1% HCl预处理后更松散、暴露的比表面积更大。



注:A.未预处理;B.水;C.1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;D.1% HCl;E.1% NaOH

图2 不同预处理剂对厚朴药渣形貌的影响(FESEM,×900)

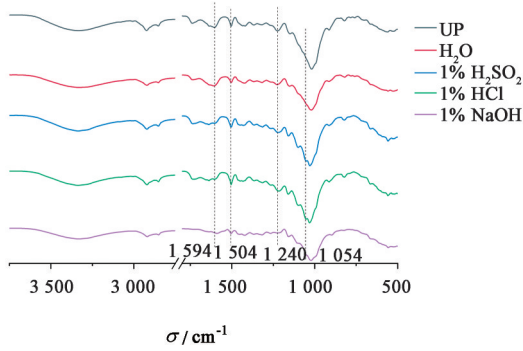
Fig. 2 Effect of different pretreatment methods on morphology of *Magnoliae Officinalis* Cortex dregs (FESEM,×900)

2.4.4 X射线粉末衍射(XRD)分析 通过XRD测定预处理前后厚朴药渣的结晶结构和结晶强度,测试角度2θ为10~40 °C,扫描速度3 °·min<sup>-1</sup>,结晶度(CrI)计算公式为CrI=(I<sub>002</sub>-I<sub>am</sub>)/I<sub>002</sub>×100%,式中I<sub>002</sub>为002衍射面的结晶强度(2θ=22.5 °),I<sub>am</sub>为基线的衍射强度(2θ=18.4 °),见增强出版附加材料。结果显示,预处理前后的样品均保留纤维素的2个特征衍射峰,表明预处理后厚朴药渣中纤维素的结晶结构未发生变化。CrI的变化是反映微晶纤维素相对含量的重要参数,生物质中无定形组分(半纤维素、木质素及非晶态纤维素)的去除使得微晶纤维素的相对含量提高,进而引起CrI增加。由结晶度指数数据(增强出版附加材料)可知,1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、1% HCl和1% NaOH预处理后CrI均有所提高,表明其微晶纤维素的相对含量较原药渣高,该结果与预处理后药渣的木质纤维素组分含量分析结果一致。

2.4.5 傅里叶变换红外光谱(FT-IR)分析 取少量样品与溴化钾混合,充分研磨后用压片机压片,将制好的样品进行检测,检测波长4 000~500 cm<sup>-1</sup>,见图3。结果发现1 594 cm<sup>-1</sup>和1 504 cm<sup>-1</sup>为木质素的

C=C拉伸和苯环上C-H键振动,1 240 cm<sup>-1</sup>为半纤维素和木质素间的连接键(C-O-C键),经预处理后这3个峰的强度有不同程度降低。其中,水主要通过破坏半纤维素与木质素间的醚键而打破其致密结构<sup>[22]</sup>,2种酸预处理后厚朴药渣生物质内部化学键的强度基本一致,表明酸预处理主要使木质素的双键、木质素与半纤维素的醚键断裂而使该结构降解<sup>[23]</sup>。而1% NaOH预处理后药渣1 594、1 504、1 240 cm<sup>-1</sup>的峰强度均最低,表明碱预处理对药渣生物质结构的破坏程度最强,该结果与FESEM分析结果一致。1 054 cm<sup>-1</sup>为纤维素的特征峰,经预处理后该峰强度均增强,表明预处理后纤维素的相对含量均有所增加。

2.4.6 预处理液中酚类抑制剂的分析 将不同预处理剂预处理后的预处理液过0.45 μm微孔滤膜,得样品溶液,按2.2.1项下条件进对样品中厚朴酚、和厚朴酚含量进行测定。结果发现不同预处理剂不仅对木质纤维素结构破坏程度不同,对厚朴酚、和厚朴酚溶解也有很大差异。经H<sub>2</sub>O、1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、1% HCl、1% NaOH预处理后,预处理液中厚朴酚的



注:UP.未预处理

图3 不同预处理剂对厚朴药渣内部化学键的影响

Fig. 3 Effect of different pretreatment methods on internal chemical bond of Magnoliae Officinalis Cortex dregs

质量分数分别为0.65%、0.19%、0.33%和1.58%，和厚朴酚质量分数分别为0.13%、0、0和0.54%，两者总量分别为0.78%、0.19%、0.33%和2.12%。说明厚朴酚的溶解度由大到小依次为碱性溶液>中性溶液>酸性溶液，而和厚朴酚在酸性预处理剂中几乎不溶、在碱性预处理剂中的溶解度则较大。

**2.4.7 药渣的酶解试验** 将预处理前后的厚朴药渣与50 mmol·L<sup>-1</sup>柠檬酸缓冲液(pH 4.8)按1:10混合，加酶量为30 FPU·g<sup>-1</sup>(以厚朴药渣质量计)，于50℃摇床反应72 h，反应结束后离心，取上清液，过0.22 μm微孔滤膜，测定还原糖浓度。原药渣和经水、1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、1% HCl、1% NaOH预处理后药渣酶解产生的还原糖质量浓度分别为17.89、19.96、19.39、21.94、31.82 g·L<sup>-1</sup>。采用SPSS 26进行统计学分析，结果发现1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>预处理与原药渣酶解产糖浓度无明显差异，而1% NaOH预处理后药渣酶解产糖浓度较原药渣提高了77.86%，同时也是4种预处理药渣中酶解产糖浓度最高的。

## 2.5 NaOH预处理条件优化

**2.5.1 NaOH浓度** 按固液比1:20加入厚朴药渣和不同浓度(0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%)的NaOH溶液，摇匀，于120℃反应60 min，固体部分经洗涤烘干后按2.4.7项下方法进行酶解，酶解反应时间24 h。结果发现经上述5个浓度的NaOH预处理后，厚朴药渣产生的还原糖质量浓度分别为22.35、24.50、23.95、23.28、23.45 g·L<sup>-1</sup>，故选择NaOH浓度为1.0%。

**2.5.2 反应温度** 按固液比1:20加入厚朴药渣和1% NaOH溶液，摇匀，于不同温度(25、50、80、100、120℃)下反应60 min，固体部分经洗涤烘干后按2.4.7项下方法进行酶解，酶解反应时间24 h。结果

发现在上述5个反应温度下预处理后，厚朴药渣产生的还原糖质量浓度分别为20.03、20.63、24.60、23.98、24.50 g·L<sup>-1</sup>，故选择反应温度80℃。

**2.5.3 反应时间** 按固液比1:20加入厚朴药渣和1% NaOH溶液，摇匀，分别于80℃反应30、60、90、120、240 min，固体部分经洗涤烘干后按2.4.7项下方法进行酶解，酶解时间24 h。结果发现经上述5个反应时间预处理后，厚朴药渣产生的还原糖质量浓度分别为20.54、24.60、24.44、24.92、24.90 g·L<sup>-1</sup>，从降低能耗和提高厚朴药渣的预处理效率考虑，选择反应时间60 min。

**2.5.4 验证试验** 在NaOH浓度为1.0%、反应温度80℃及反应时间60 min条件下，对厚朴药渣进行预处理，按2.4.7项下方法酶解，结果还原糖质量浓度32.18 g·L<sup>-1</sup>，较未预处理的厚朴药渣提升了79.8%。

**2.6 tween-80对酶解产糖的影响** 将碱处理后厚朴药渣与50 mmol·L<sup>-1</sup>柠檬酸缓冲液(pH 4.8)按比例1:10混合，加酶量分别为20、30 FPU·g<sup>-1</sup>，空白组不添加tween-80，tween-80组按150 mg·g<sup>-1</sup>加入tween-80，于50℃摇床反应72 h，分别在第12、24、72 h时取样，离心后取上清液，过0.45 μm微孔滤膜，测定还原糖浓度，见表3。结果发现酶解12 h时，tween-80组的还原糖浓度较相同加酶量空白组均有提高，但提高幅度较小；酶解24 h时，加酶量20、30 FPU·g<sup>-1</sup>下tween-80组的还原糖产量分别较空白组提高了16.33%和24.96%。酶解72 h时，固定加酶量为30 FPU·g<sup>-1</sup>条件下，tween-80组的还原糖产量较空白组约提高12%，并较未预处理组提高了102.0%；而固定加酶量为20 FPU·g<sup>-1</sup>条件下，tween-80组的还原糖产量较空白组未增加，推测其主要原因是纤维素酶的加入量不足。此外，当加酶量为30 FPU·g<sup>-1</sup>时，tween-80组24 h的酶解产糖质量浓度与空白组72 h的酶解产糖质量浓度相当，说明加入tween-80可明显降低酶解时间，提高酶解效率。

表3 tween-80对厚朴药渣中还原糖质量浓度的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of tween-80 on reducing sugar concentration in enzymatic hydrolysis of Magnoliae Officinalis Cortex dregs ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	加酶量/ FPU·g <sup>-1</sup>	还原糖质量浓度/g·L <sup>-1</sup>		
		12 h	24 h	72 h
空白组	20	19.23±0.70	21.19±0.11	25.56±1.38
	30	21.56±0.39	25.96±0.96	32.31±0.61
tween-80组	20	19.98±0.40	24.65±0.53	25.48±0.33
	30	22.57±0.40	32.44±1.14	36.12±1.10

**2.7 厚朴酚及和厚朴酚的提取** 在1.0% NaOH、温度80℃、反应时间60 min条件下预处理厚朴药渣(5.0 g)后,收集的预处理液用HCl调pH至7.0,放置过夜,减压浓缩至50 mL。将浓缩液-石油醚(1:3)混合,加热至微沸,保温10 min,趁热过滤,滤液用无水硫酸钠干燥。将干燥的石油醚溶液浓缩,冷却,结晶,干燥后得到厚朴酚及和厚朴酚的粗品。将粗品置于25 mL量瓶中,加甲醇溶解至刻度,按2.2.1项下条件测定,结果厚朴酚及和厚朴酚回收量分别为(61.84±0.18)、(17.14±0.08) mg,而药渣中这2个成分的质量分别为(86.02±0.27)、(28.06±0.11) mg,计算二者回收率依次为(71.9±0.41)%、(61.2±0.29)%,总回收率69.23%。

### 3 讨论

基于厚朴药渣中残留的厚朴酚、和厚朴酚及木质纤维素物质这3种资源性成分,设计1种资源化综合提取利用方法,对实现其剩余价值最大化具有重要意义。厚朴药渣细胞壁的抗性屏障及其含有的酚类化合物对生物质酶解产糖过程具有抑制作用,因此,需探究合适的预处理方法,以促进酶解产糖并提取酚类化合物。有研究处理人参药渣时,采用酸预处理方式破坏细胞壁的抗性屏障以促进酶解,并使人参多糖释放到预处理液中予以回收<sup>[24]</sup>。人参多糖可溶于水,因此其预处理目的是破坏生物质的致密结构以促进酶解产糖。而本研究中厚朴药渣残留的酚类化合物属于脂溶性化合物,若酶解的固体中含有酚类化合物,则会抑制纤维素酶的酶解活性,降低产糖,且不同预处理方法对不同生物质的预处理效果有很大差异<sup>[25-26]</sup>,因此,合适的预处理方法在该利用路径中至关重要。本研究选用了酸性(1% HCl和1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、中性(水)及碱性(1% NaOH)4种溶液作为预处理剂,结果发现四者对木质纤维素中3种组分的降解能力各异,这也是造成预处理后药渣酶解产糖浓度差异较大的主要原因,其中以碱预处理后药渣的酶解产糖浓度最高。通过结构分析发现,其预处理机制是通过去除药渣生物质中的木质素,使纤维素酶与纤维素接触的比表面积增大,并降低木质素对纤维素酶的非特异性吸附<sup>[27]</sup>,此外,碱预处理使得约93%的酚类化合物(厚朴酚及和厚朴酚)溶解在预处理液中,解除了其对纤维素酶活性的抑制作用<sup>[17]</sup>。通过优化得到的碱预处理条件较为温和(1.0% NaOH,反应温度80℃,反应时间60 min),符合绿色环保理念。

酶解糖化是生物质糖化发酵过程的关键步骤,

其成本占整个糖化发酵过程的60%以上,其中纤维素酶用量为该阶段的主要成本消耗。本文研究发现,酶解时添加tween-80可促进药渣生物质产糖,且tween-80对生物质酶解产糖的促进作用与加酶量密切相关<sup>[16]</sup>。此外,本文研究结果发现tween-80不仅可以提高酶解产糖量,还可缩短酶解时间,这主要是因为tween-80的疏水相互作用减少了木质素对纤维素酶的吸附,并增强纤维素酶的稳定性,为酶解糖化提供了更多的纤维素酶,进而提高了酶解效率<sup>[28-29]</sup>。综上分析,1% NaOH温和条件预处理联合tween-80酶解,可获得较高的还原糖收率,并且前人研究发现tween-80对后续发酵产化学品过程也无抑制作用<sup>[30]</sup>,提示可将其用于厚朴药渣的资源化利用,以降低用酶成本。

厚朴药渣生物质酶解后含还原糖的酶解液可进一步用于工程菌株发酵生产高附加值化学品,如生物燃料、丁二酸、乳酸、 $\beta$ -香树脂醇等。回收获得的厚朴酚及和厚朴酚可通过进一步纯化用于生产药物,或用作化学对照品等。目前,中药药渣的资源化利用尚处于初级阶段<sup>[31-32]</sup>,为探索成本可控的中药渣循环利用经济模式,实现中药药渣多途径、多层次的综合利用,后续可考察酶解液进一步发酵生产高附加值化学品及酶解残渣在有机肥或其他方面应用的可行性。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

### [参考文献]

- [1] 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,2020:263.
- [2] 谭珍媛,邓家刚,张彤,等. 中药厚朴现代药理研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(22):228-234.
- [3] 郭东晓,于姗姗,郭衍珩,等. 中药配方颗粒标准制定技术问题和对策分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(17):188-194.
- [4] 孙玉雯,刘起华,陈弘东,等. 粒度和加水量对厚朴煮散煎出物的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(7):6-9.
- [5] 荆文光,邓哲,孙晓波,等. 姜厚朴饮片标准汤剂研究[J]. 中草药,2019,50(1):83-89.
- [6] RANAWARE A M, BANIK K, DESHPANDE V, et al. Magnolol: A neolignane from the *Magnolia* family for the prevention and treatment of cancer[J]. Int J Mol Sci,2018,19(8):2362.
- [7] 周永康,史新元,张志强,等. 厚朴配方颗粒药渣中厚朴酚及和厚朴酚的提取纯化研究[J]. 环球中医药,2021,14(8):1395-1400.

- [ 8 ] 王帆,简雅婷,张宇,等. 低共熔溶剂提取厚朴渣中木脂素类化合物[J]. 农业工程学报, 2022, 38(3): 304-310.
- [ 9 ] WANG C, SU X, SUN W, et al. Efficient production of succinic acid from herbal extraction residue hydrolysate [J]. Bioresour Technol, 2018, 265: 443-449.
- [ 10 ] MA H, LI H, ZHANG F, et al. Effects of nitrogen substitute and *Hypericum perforatum* extract on the ethanol fermentation of traditional Chinese medicine dregs[J]. Ind Crop Prod, 2019, 128: 385-390.
- [ 11 ] WANG W, LEE D J. Lignocellulosic biomass pretreatment by deep eutectic solvents on lignin extraction and saccharification enhancement: A review [J]. Bioresour Technol, 2021, 339: 125587.
- [ 12 ] XU H F, PENG J J, KONG Y, et al. Key process parameters for deep eutectic solvents pretreatment of lignocellulosic biomass materials: A review [J]. Bioresour Technol, 2020, 310: 123416.
- [ 13 ] ZHANG Z H, XU J, XIE J X, et al. Physicochemical transformation and enzymatic hydrolysis promotion of reed straw after pretreatment with a new deep eutectic solvent[J]. Carbohydr Polym, 2022, 290: 119472.
- [ 14 ] YU M H, LI J H, CHANG S, et al. Bioethanol production using the sodium hydroxide pretreated sweet sorghum bagasse without washing [J]. Fuel, 2016, 175: 20-25.
- [ 15 ] LIU W, WU R J, WANG B, et al. Comparative study on different pretreatment on enzymatic hydrolysis of corncob residues [J]. Bioresour Technol, 2020, 295: 122244.
- [ 16 ] LING R X, WU W J, YUAN Y F, et al. Investigation of choline chloride-formic acid pretreatment and tween 80 to enhance sugarcane bagasse enzymatic hydrolysis [J]. Bioresour Technol, 2021, 326: 124748.
- [ 17 ] LI S, QI B, LUO J, et al. Ultrafast selective adsorption of pretreatment inhibitors from lignocellulosic hydrolysate with metal-organic frameworks: Performance and adsorption mechanisms[J]. Sep Purif Technol, 2021, 275: 119183.
- [ 18 ] JOO Y H, NAM M H, CHUNG N, et al. UPLC-QTOF-MS/MS screening and identification of bioactive compounds in fresh, aged, and browned *Magnolia denudata* flower extracts[J]. Food Res Int, 2020, 133: 109192.
- [ 19 ] GUO K K, TONG C Y, FU Q C, et al. Identification of minor lignans, alkaloids, and phenylpropanoid glycosides in *Magnolia officinalis* by HPLC-DAD-QTOF-MS/MS [J]. J Pharm Biomed Anal, 2019, 170: 153-160.
- [ 20 ] XUE Z Z, LAI C J S, KANG L P, et al. Profiling and isomer recognition of phenylethanoid glycosides from *Magnolia officinalis* based on diagnostic/holistic fragment ions analysis coupled with chemometrics[J]. J Chromatogr A, 2020, 1611: 460583.
- [ 21 ] HUANG C, CHENG J Y, ZHAN Y N, et al. Utilization of guaiacol-based deep eutectic solvent for achieving a sustainable biorefinery [J]. Bioresour Technol, 2022, 362: 127771.
- [ 22 ] 徐春燕,熊凤,陈德明,等. 低共熔溶剂协同酸性二氧化碳预处理杨木及其酶水解特性的探究[J]. 应用化工, 2022, 51(9): 2558-2564.
- [ 23 ] 解先利,刘云云,余强,等. 低共熔溶剂预处理提高甘草渣酶解效果优化[J]. 化工进展, 2022, 41(3): 1349-1356.
- [ 24 ] SU X Y, XUE Q, SUN M C, et al. Co-production of polysaccharides, ginsenosides and succinic acid from *Panax ginseng* residue: A typical industrial herbal waste[J]. Bioresour Technol, 2021, 331: 125073.
- [ 25 ] PAN M Z, ZHAO G M, DING C X, et al. Physicochemical transformation of rice straw after pretreatment with a deep eutectic solvent of choline chloride/urea[J]. Carbohydr Polym, 2017, 176: 307-314.
- [ 26 ] MODENBACH A A, NOKES S E. The use of high-solid loadings in biomass pretreatment[J]. Biotechnol Bioeng, 2012, 109(6): 1430-1442.
- [ 27 ] WANG J, GAO M, LIU J G, et al. Lactic acid production from *Sophora flavescens* residues pretreated with sodium hydroxide: Reutilization of the pretreated liquor during fermentation [J]. Bioresour Technol, 2017, 241: 915-921.
- [ 28 ] WANG W, ZHUANG X S, TAN X S, et al. Dual effect of nonionic surfactants on improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulose[J]. Energy Fuels, 2018, 32(5): 5951-5959.
- [ 29 ] LI K N, WAN J M, WANG X, et al. Comparison of dilute acid and alkali pretreatments in production of fermentable sugars from bamboo: Effect of tween 80 [J]. Ind Crop Prod, 2016, 83: 414-422.
- [ 30 ] 胡银平,王瑞雪,李冰颖,等. 吐温80对麦秆中提取的纤维素同步糖化发酵制乙醇的影响[J]. 河南科技学院学报:自然科学版, 2020, 48(6): 17-22.
- [ 31 ] 陈彭月,刘艳,陈莎,等. 芍药甘草汤药渣中资源性成分的再利用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(24): 171-177.
- [ 32 ] 张文广,贾春艳,王丹,等. 大黄产业化过程废弃物的资源价值发现与利用探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(21): 214-222.

[责任编辑 刘德文]