

# 厚朴中和厚朴酚标准样品的研制

耿岩玲, 林云良, 崔莉, 朱姮, 付瑞明, 王岱杰

(齐鲁工业大学(山东省科学院), 山东省分析测试中心, 山东省中药质量控制技术重点实验室, 山东济南 250014)

**摘要:** 依据 GB/T 15000.3-2008 标准样品的工作导则, 研制和厚朴酚标准样品。以厚朴药材的提取物为原料, 采用高速逆流色谱法一步分离制备和厚朴酚单体化合物, 通过紫外光谱、红外光谱、质谱、 $^1\text{H}$  和  $^{13}\text{C}$  核磁共振等技术手段进行化合物的结构表征, 同时进行了薄层色谱、液质联用和热重分析纯度和水分含量, 建立了和厚朴的高效液相色谱分析检测技术。和厚朴酚样品进行了均匀性检验、稳定性检验和 8 家实验室联合定值。结果表明, 和厚朴酚样品具有良好的均匀性, 在 0~4 °C 储存条件下 48 个月含量稳定。将定值结果分析统计, 确定其标准值为 99.72%, 置信度 95% 的不确定度为 0.22%。成功研制出了和厚朴酚国家标准样品, 达到了 GB/T 15000.3-2008 规定的技术要求, 样品具有溯源性, 可用于和厚朴酚及相关产品的质量控制和检测方法评定。

**关键词:** 和厚朴酚; 标准样品; 均匀性; 稳定性; 定值; 不确定度

文章编号: 1673-9078(2018)05-215-221

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.05.031

## Preparation of Certified Reference Materials of Honokiol from *M. officinalis*

GENG Yan-ling, LIN Yun-liang, CUI Li, ZHU Heng, FU Rui-ming, WANG Dai-jie

(Key Laboratory of TCM Quality Control, Shandong Analysis and Test Center, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250014, China)

**Abstract:** The certified reference material (CRM) of honokiol was developed according to the technical requirements of *CRM General and Statistical Principle for Certification* (GB/T 15000.3-2008). Honokiol was separated and prepared by high-speed counter-current chromatography with crude extracts of *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. as material, and their structures were confirmed by UV, IR, MS,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR. Simultaneously, the purity and moisture content of Honokiol was analyzed by thin layer chromatography, LC-MS, and thermo-gravimetric to establish HPLC analysis technology. Honokiol was divided into bottles for homogeneity test, stability test, and cooperative certification by 8 laboratories. The results indicated that the homogeneity of honokiol samples were excellent, with good stability within 48 months at 0-4°C. The certified value of the reference material of honokiol was 99.72% with the expanded uncertainty of 0.22% in confidence coefficient of 95%. The reference material of honokiol was successfully developed, which reached the technical requirement of GB/T 15000.3-2008 and could be traceable. The CRM can be used in the content determination and testing method validation of honokiol related products.

**Key words:** honokiol; certified reference material; homogeneity; stability; certification; uncertainty

厚朴为木兰科植物厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. 和凹叶厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. var. *biloba* Rehd. et Wils. 的干燥干皮、根皮及枝皮, 是我国传统大宗中药材<sup>[1]</sup>。厚朴药材同时列入了卫计委

收稿日期: 2017-11-12

基金项目: 山东省重大科技创新工程 (2017CXGC1308); 山东省重点研发计划 (2017GSF216002); 山东省泰山学者岗位专家支持项目; 山东省科学院先导项目

作者简介: 耿岩玲 (1973-), 女, 副研究员, 研究方向: 天然产物化学和标样品研制

通讯作者: 王岱杰 (1981-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 天然产物化学和标样品研制

《可用于保健食品的物品名单》, 保健功效显著。在传统中医学上, 厚朴具有燥湿消痰、下气除满的功效, 主治湿滞伤中, 脘痞吐泻, 食积气滞, 腹胀便秘和痰饮喘咳等症状。现代药理研究表明, 厚朴还具有抗氧化、抗炎、抑菌、抗癫痫、防治老年痴呆、抗抑郁和抗肿瘤等多种功效<sup>[2-22]</sup>。和厚朴酚为药典中规定的厚朴和厚朴花鉴别和质量控制指标之一, 药理研究表明, 和厚朴酚还具有抗病毒、抗肿瘤、中枢抑制、抗血小板、抑菌、抗抑郁、抗血管生成效应和抗增殖等活性<sup>[23-31]</sup>。然而目前市场上和厚朴酚样品主要以对照品为主, 纯度参差不齐, 未按照国家标准进行均匀性、稳定性和定值试验, 最终结果没有不确定度评价, 样品

也不具有溯源性。

标准样品是具有一种或多种足够均匀的和很好确定了特性值的材料或物质,可以用来校准仪器、评价测量方法和给材料赋值<sup>[32]</sup>。随着天然产物包括中药材市场国际化的发展,研制与 ISO 对接的标准样品的需求进一步迫切,也是国内外研究的热点。目前,我国研发的天然产物标准样品种类和数量严重不足,影响相关产品的检测,也制约了相关行业的发展,为改善这一现状,我国天然产物标准样品的研究正在广泛开展<sup>[33]</sup>。因此,为了满足和厚朴酚及相关产品的检测需求,保证检测结果的准确性、可比性和溯源性,本文参照 ISO Guide 35 和 GB/T 15000.3 标准样品的工作导则<sup>[34]</sup>,成功研制了和厚朴酚国家标准样品。

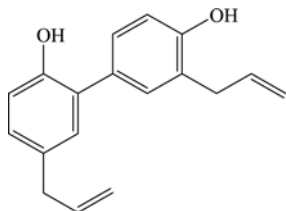


图1 和厚朴酚化学结构式

Fig.1 The chemical structure of honokiol

## 1 材料与方法

### 1.1 原料

厚朴提取物购自青岛红星化工有限公司,厚朴酚与和厚朴酚二者的含量约为 90%。

### 1.2 试剂

柱层析硅胶、GF254 薄层硅胶板,青岛海洋化工厂;甲醇(色谱纯),美国天地公司;水为重蒸水,其它试剂为分析纯。

### 1.3 试验仪器

R-3 型旋转蒸发器,瑞士 BUCHI 公司;SCIENTZ-10N 型冷冻干燥仪,宁波新芝生物科技股份有限公司;E2695 型高效液相色谱仪,美国 Waters 公司;KQ-500VDV 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;TBE-300A 型制备型逆流色谱仪、TBP-5002 型恒流泵和 DC-0506 型恒温冷却循环浴均购自上海同田生物技术有限公司;3057 型记录仪,重庆川仪自动化股份有限公司;8823A 型紫外检测器,北京宾达英创科技有限公司;WRS-1B 型数字熔点仪,上海精密科学仪器有限公司;UV-2550 型紫外可见分光光度计,日本岛津公司;INOVA 600 MHz 核磁共振波谱仪,美国瓦里安公司;6520 Q-ToF 型液质联用仪,美国安捷

伦公司;STA 449FC 型同步热分析仪,德国耐驰公司。

### 1.4 和厚朴酚单体的高速逆流色谱分离

将正己烷、乙酸乙酯、乙醇和水四种溶剂,以体积比 1:0.7:1:0.8 配置于分液漏斗中,剧烈震荡,充分混合,静置分层,待完全分层后分取上下相,上相作为逆流色谱分离的固定相,下相为流动相。厚朴粗提物 200 mg 溶解于体积相等的上下相共 10 mL。首先开启恒流泵以 20 mL/min 流速将固定相注满分离柱,顺时针开启转速 800 r/min,流动相以 2.0 mL/min 流速泵入逆流色谱仪入口,当达到流体动力学平衡后,样品自手动进样圈进样,同时开启紫外检测器 254 nm 和记录仪,根据记录仪的紫外吸收图接管收集组分,HPLC 分析后合并,减压浓缩,冷冻干燥,得到和厚朴酚单体,制备图见图 2。

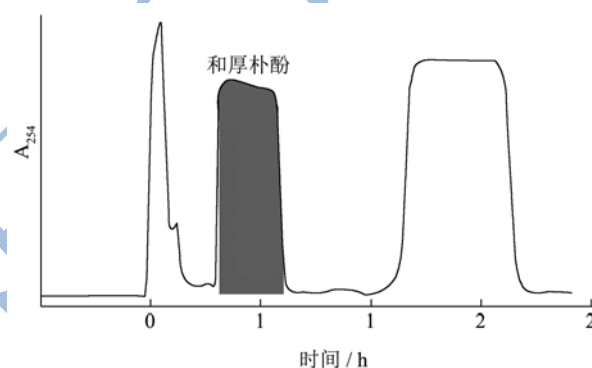


图2 和厚朴酚单体的高速逆流色谱制备图

Fig.2 Chromatogram of honokiol purified by HSCCC

### 1.5 纯度分析方法

#### 1.5.1 高效液相色谱分析

等度条件: shim-pack C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6×250 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水 (78:22, V/V); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C; 运行时间: 30 min; 检测波长: 294 nm; 样品浓度 0.2 mg/mL, 甲醇溶解。梯度条件: YMC C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6×250 mm, 5 μm); 流动相: A 为甲醇, B 为水; 0~20 min, 78%A, 20~40 min, 78%A~100%A, 40~50 min, 100%A。流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C; 运行时间: 50 min; 检测波长: 294 nm, 样品同上。

#### 1.5.2 薄层鉴别

精密称取样品 5 mg, 加甲醇配制成浓度为 0.2 mg/mL 的对照品溶液。展开剂分别为正己烷-乙酸乙酯 (4:1, V/V) 和氯仿-甲醇 (100:1, V/V), 定量毛细管吸取 20、40、60、80、100 μg, 梯度将样品点于 GF254 硅胶板。两种展开剂分别展开, 取出, 晾干, 分别用荧光检测 (254 nm 和 365 nm) 和 10%硫酸乙

醇法显色 (105 °C下加热 3 min, 至斑点显色清晰)。

### 1.5.3 LC-MS 纯度分析

分析条件: shim-pack C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6×250 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水 (78:22, V/V); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C; 运行时间: 30 min。MS 条件: ESI 电喷雾离子源, 毛细管电压为 4.0 kV, 普氮为载气, 载气流速为 10 L/min, 载气温度为 300 °C, 扫描范围 *m/z* 100~1000。

### 1.5.4 热重分析

精密称取样品 5 mg, 置于热重用坩埚中, 热重条件: 初温 30 °C, 最终温度 600 °C, 升温速率 10 °C/min, 气体 N<sub>2</sub>, 流量 100 mL/min。

## 1.6 结构表征

和厚朴酚单体的结构表征采用紫外光谱 (UV)、红外光谱 (IR)、质谱 (MS) 和核磁共振 (NMR) 等技术。UV 法的测试溶剂为甲醇, 扫描范围为 200~400 nm; IR 法采用 KBr 压片, 扫描波数为 400~4000 cm<sup>-1</sup>; MS 为电喷雾离子源, 载气温度为 300 °C, 载气流速为 10 L/min, 普氮为载气, 毛细管电压为 4.0 kV, 扫描范围 *m/z* 为 100~1000; NMR 法的氘代试剂为 CDCl<sub>3</sub>。

## 1.7 均匀性检验

依据标准样品导则 (均匀性研究) 要求<sup>[34]</sup>, 采用顺序重复随机测量, 随机抽取分装好的和厚朴酚样品 10 瓶 (>1.5 √*N*), 3 种抽样程序 (第一种 1-3-5-7-9-2-4-6-8-10; 第二种 10-9-8-7-6-5-4-3-2-1; 第三种 2-4-6-8-10-1-3-5-7-9), 样品按 1.5.1 中规定等度方法进行分装, 样品纯度读取采用峰面积归一化法, 采用方差分析法进行数据分析。

## 1.8 稳定性检验

和厚朴酚样品储存温度为 0~4 °C, 考察样品的 4 年稳定期, 分 5 个时间段考察监测, 按 1.5.1 中规定等度方法进行分装, 样品纯度读取采用峰面积归一化法, 每份样品测定 5 次, 统计分析采用 *t* 检验法<sup>[35]</sup>。

## 1.9 定值

根据工作导则, 标准样品的定值采用 8 家实验室协作进行的方法。随机抽取样品 24 瓶, 每家定值实验室寄出样品 3 瓶, 每瓶测定 2 次, 协作实验室共出 6 个检测结果, 样品纯度以峰面积归一化法读取<sup>[34,35]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 纯度分析

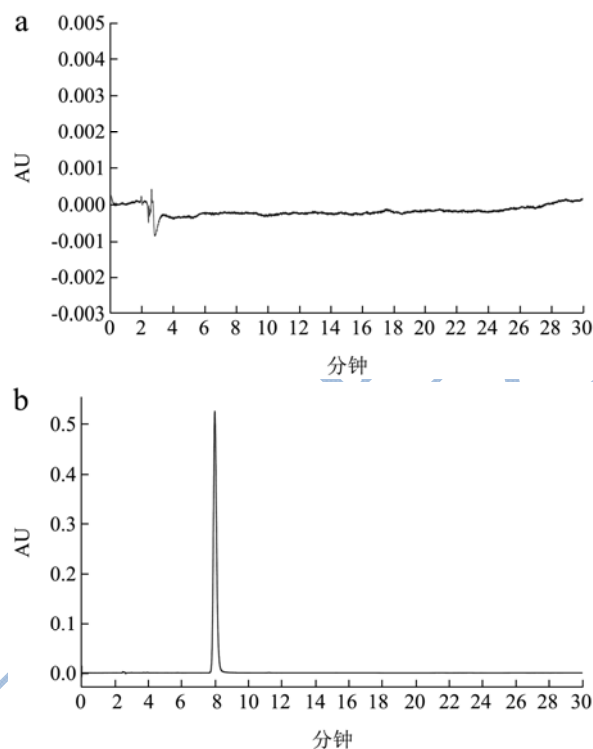


图3 和厚朴酚等度洗脱 HPLC 图谱

Fig.3 HPLC chromatogram of honokiol by isocratic elution

注: a: 空白溶剂; b: 和厚朴酚样品

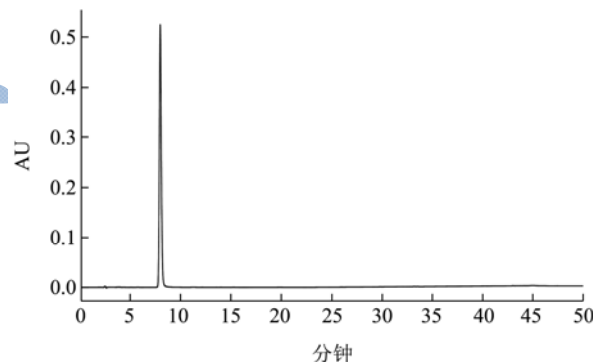


图4 和厚朴酚梯度洗脱 HPLC 图谱

Fig.4 HPLC chromatogram of honokiol by gradient elution

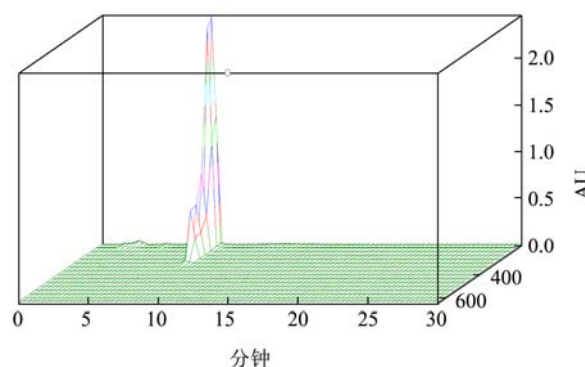


图5 和厚朴酚 HPLC 3D 扫描图

Fig.5 Three dimensional chromatogram of honokiol by HPLC



采用HPLC的DAD检测器对色谱峰进行3D总吸收图扫描,检测结果扣除溶剂峰,HPLC纯度分析结果表明,未见明显杂质峰存在,图3、4、5。以正己烷-乙酸乙酯(4:1, V/V)和氯仿-甲醇(100:1, V/V),荧光和10%硫酸乙醇法显色结果表明,样品呈现灰黑色斑点,  $R_f$ 值分别为0.59和0.57,未见明显杂质斑点存在。LC-MS结果表明,当提取MS的总离子流图,未见明显的杂质峰存在。

热重结果表明,在25.3~187.0℃温度范围内,TG曲线是一条水平线,表明测试样品中吸附水和结晶水含量很低,热稳定性好。当温度增加超过187.0℃时,样品开始分解,DTA曲线显示温度升高到317.5℃,样品迅速分解。

## 2.2 结构表征

熔点: 87~88℃;  $UV\lambda_{max}^{EtOH}$ : 209, 256, 294 nm;

$IR_{\nu_{max}}^{cm^{-1}}$ : 3303 ( $\nu_{OH}$ ), 3000 ( $\nu_{CH}$ ), 1637 ( $\nu_{C=C}$ ), 1586 ( $\nu_{C=C}$ ), 1497 ( $\delta_{CH}$ ), 1431 ( $\delta_{CH}$ ), 1217 ( $\nu_{CO}$ ), 907 ( $\delta_{C=C}$ ), 824 ( $\delta_{C=C}$ ), 776 ( $\delta_{C=C}$ ), 695 ( $\delta_{C=C}$ ); ESI-MS:  $m/z$  267.0  $[M+H]^+$ , 265.0  $[M-H]$ 。在 $^1H-NMR$ 中可以看到 $\delta$ 7.25 (d, 7.8), 6.92 (d, 7.8), 6.89 (d, 7.8), 7.06 (m), 7.22 (d, 1.8), 7.02 (m)六个芳香氢信号,根据其峰形、化学位移和耦合常数推测该化合物存在1,3,4三取代苯环; $\delta$ 5.05~6.11为六个烯氢质子信号;在 $^{13}C-NMR$ 中可以看到18个碳信号,其中8个 $sp^2$ 杂化碳信号,其中 $\delta$ 150.8和153.9为连氧芳香碳信号。 $^1H-NMR$  (600MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 7.25 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, H-2), 7.22 (1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-6), 7.06 (1H, m, H-4'), 7.02 (1H, m, H-6'), 6.92 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, H-3), 6.89 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, H-3'), 6.00 (2H, m, H-8, 8'), 5.11 (4H, m, H-9, 9'), 3.35 (4H, d,  $J=6.6$  Hz, H-7, 7)。  $^{13}C-NMR$  (150 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 153.9 (C-4), 150.7 (C-2'), 137.8 (C-8'), 135.9 (C-8), 132.2 (C-5'), 131.1 (C-6'), 130.2 (C-2), 129.6 (C-3), 128.8 (C-4'), 128.5 (C-6), 127.6 (C-1'), 126.3 (C-1), 117.0 (C-3'), 116.6 (C-5), 115.6 (C-9, 9'), 39.4 (C-7'), 35.2 (C-7)。以上数据与文献<sup>[36]</sup>比较基本一致,确定为和厚朴酚。

## 2.3 均匀性检验

将结果进行F检验,进行数据统计,确定和厚朴酚样品的均匀性,结果见表1和表2。

表1 均匀性检验数据

**Table 1 Results of homogeneity test**

瓶号	样品纯度/%				总平均值
	第1组	第2组	第3组	平均值	
1	99.78	99.75	99.74	99.76	99.79
2	99.80	99.80	99.81	99.80	
3	99.77	99.76	99.78	99.77	
4	99.80	99.78	99.75	99.78	
5	99.77	99.78	99.81	99.79	
6	99.80	99.81	99.78	99.80	
7	99.78	99.81	99.83	99.81	
8	99.79	99.78	99.80	99.79	
9	99.78	99.81	99.80	99.80	
10	99.81	99.77	99.76	99.78	

表2 方差分析数据

**Table 2 Results of variance analysis**

变差源	SS	自由度	MS
组间	0.006630	9	0.000737
组内	0.007067	20	0.000353
总和	0.013697	29	

瓶间方差的计算公式:

$$S^2_A = \frac{MS_{组间} - MS_{组内}}{n_0} = 1.3 \times 10^{-4}$$

则瓶间标准偏差为:

$$S_{bb} = \sqrt{S^2_A} = 0.02$$

$u_{均} = S_{bb} = 0.02$

F值的计算公式:

$$F = MS_{组间} / MS_{组内} = 2.08$$

以组间自由度  $v_1=9$  及组内自由度  $v_2=20$  为变量查询F界值表,可知临界值  $F_{0.05}(9, 20)=2.94$ , 由于  $F < F_{0.05}(9, 20)$ , 因此所研制的和厚朴酚标准样品具有良好的均匀性。

## 2.4 稳定性检验

采用t检验法对稳定性检测结果统计分析,采用直线模型,观察直线斜率值变化趋势,同时进行预测,结果见表3。

斜率计算公式如下:

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} = \frac{-4.92}{1710} = -0.0029$$

式中,  $X_i$  为抽样的月份数,  $Y_i$  为检测的样品纯度,

$$\bar{Y} = 99.75; \bar{X} = 21.$$

截距计算公式如下:

$$b_0 = \bar{y} - b_1 \bar{x} = 99.75 + (0.0029 \times 21) = 99.80$$

直线模型的标准偏差:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - b_0 - b_1 X_i)^2}{n-2} = \frac{0.0095}{4} = 0.0024$$

则  $s=0.10$ 。

斜率相关不确定度计算公式如下:

$$s(b_1) = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}} = \frac{0.05}{\sqrt{1710}} = 0.002$$

查表得自由度为  $n-2$  和 95%置信水平 ( $p=0.95$ ) 分布的  $t$  因子为 3.182。由于斜率变化的绝对值:

$$|b_1| < t_{0.95, n-2} \cdot S(b_1) = 3.182 \times 0.002 = 0.0064,$$

即:  $|b_1| < 0.0064$ , 因此, 斜率变化不显著, 即和

厚朴酚标准样品在 4 年内稳定性良好。稳定性的不确定度为:  $u_{\text{稳}} = S_b \times t = 0.002 \times 48 = 0.10$

表 3 稳定性检验数据

Table 3 Result of stability test

时间/月	样品纯度/%					平均值	标准偏差/%
	1	2	3	4	5		
0	99.79	99.82	99.85	99.83	99.85	99.83	0.03
6	99.78	99.76	99.75	99.76	99.75	99.76	0.02
12	99.79	99.80	99.75	99.79	99.85	99.80	0.04
24	99.77	99.76	99.75	99.74	99.70	99.74	0.03
36	99.73	99.76	99.75	99.73	99.65	99.72	0.05
48	99.70	99.66	99.72	99.63	99.65	99.67	0.04

## 2.5 定值

根据各个协作实验室的反馈结果, 进行数据的统计分析, 并最终确定和厚朴酚标准样品的标准值和不确定度, 统计结果如表 4。

表 4 协作定值数据

Table 4 Results of purity value results

实验室序号	样品纯度/%		总平均值
	测得平均值	标准偏差	
1	99.86	0.02	99.72
2	99.72	0.10	
3	99.81	0.03	
4	99.75	0.03	
5	99.77	0.02	
6	99.69	0.03	
7	99.76	0.04	
8	99.73	0.04	

测定结果总平均值的计算公式如下:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} X_{ij}}{N} = 99.72$$

实验室平均值的标准偏差为:

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} = 0.06$$

总平均值标准偏差为:

$$S_{\bar{x}} = \frac{S_{\bar{x}}}{\sqrt{n}} = 0.03$$

多家定值引入的不确定度:

$$u_{\text{定}} = S_{\bar{x}} = 0.03$$

和厚朴酚标准样品的不确定度由如下三部分组分: (1) 均匀性检验不确定度; (2) 稳定性检验不确定度; (3) 定值不确定度, 这三部分不确定度分量互不相关, 需将三种不确定度合成, 即合成不确定度 ( $U_{\text{合成}}$ ) 为:

$$U_{\text{合成}}^2 = u_{\text{均}}^2 + u_{\text{稳}}^2 + u_{\text{定}}^2$$

代入数据计算得  $U_{\text{合成}} = 0.11$ 。

置信区间 95% 时,  $k=2$ 。

则和厚朴酚标准样品的扩展不确定度:

$$U_{\text{扩展}} = 2U_{\text{合成}} = 0.11 \times 2 = 0.22$$

## 3 结论

本研究针对和厚朴酚及相关产品缺乏国家标准样品的现状, 严格按照国标规定的标样品研制规则, 成功的研制出和厚朴酚标准样品, 并顺利通过了专家验收 (项目编号: S2011018)。研制过程中对标准样品的均匀性进行考察, 并进行方差分析; 稳定性检验采用直线模型, 并进行了  $t$  检验法考察; 定值采用多

家实验室协作,对定值结果进行统计分析。根据三个方面引入的不确定度,进行了不确定度的合成和扩展,获得了标准值为 99.72%,置信度 95%的不确定度为 0.22%的和厚朴酚国家标准样品,具有样品溯源性,可用于相关产品的检测方法评定和含量测定,填补了和厚朴酚标准样品的国内外空白。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.一部[S].北京:中国医药科技出版社,2015  
National Pharmacopoeia Committee. The Pharmacopoeia of the People's Republic of China (Part I) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015
- [2] Wang F, Miao M, Xia H, et al. Antioxidant activities of aqueous extracts from 12 Chinese edible flowers *in vitro* and *in vivo* [J]. Food & Nutrition Research, 2017, 61: 1-9
- [3] Chen Y, Lin K, Shiao M, et al. Magnolol, a potent antioxidant from *Magnolia officinalis*, attenuates intimal thickening and MCP-1 expression after balloon injury of the aorta in cholesterol-fed rabbits [J]. Basic Research in Cardiology, 2001, 96(4): 353-363
- [4] Oh J H, Kang L L, Ban J O, et al. Anti-inflammatory effect of 4-O-methylhonokiol, a novel compound isolated from *Magnolia officinalis* through inhibition of NF- $\kappa$ B [J]. Chemico-Biological Interactions, 2009, 180(3): 506-514
- [5] Kuo W, Chung C, Hwang T, et al. Biphenyl-type neolignans from *Magnolia officinalis* and their anti-inflammatory activities [J]. Phytochemistry, 2013, 85: 153-160
- [6] Walker J M. Identification of *Magnolia officinalis* L. bark extract as the most potent anti-inflammatory of four plant extracts [J]. The American Journal of Chinese Medicine, 2013, 41(3): 531-544
- [7] Raison-Peyron N, Césaire A, Du-Thanh A, et al. Allergic contact dermatitis caused by *Magnolia officinalis* bark extract in a facial anti-ageing cream [J]. Contact dermatitis, 2015, 72(6): 416-417
- [8] Shih H, Kuo P, Wu S, et al. Anti-inflammatory neolignans from the roots of *Magnolia officinalis* [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2016, 24(7): 1439-1445
- [9] Wu X, Yu C, Cai W, et al. Protective effect of a polyphenolic rich extract from *Magnolia officinalis* bark on influenza virus-induced pneumonia in mice [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2011, 134(1): 191-194
- [10] Wang J, Ho T, Chang L, et al. 857-860 Anti-inflammatory effect of magnolol, isolated from *Magnolia officinalis*, on A23187-induced pleurisy in mice [J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 1995, 47(10): 857-860
- [11] Hu Y, Qiao J, Zhang X, et al. Antimicrobial activity of *Magnolia officinalis* extracts *in vitro* and its effects on the preservation of chilled mutton [J]. Journal of Food Biochemistry, 2011, 35(2): 425-441
- [12] Chen C, Tan R, Qu W, et al. Magnolol, a major bioactive constituent of the bark of *Magnolia officinalis*, exerts antiepileptic effects via the GABA/benzodiazepine receptor complex in mice [J]. British Journal of Pharmacology, 2011, 164(5): 1534-1546
- [13] Shin T Y, Kim D K, Chae B S, et al. Antiallergic action of *Magnolia officinalis* on immediate hypersensitivity reaction [J]. Archives of Pharmacal Research, 2001, 24: 249-255
- [14] Lee J W, Lee Y K, Lee B J, et al. Inhibitory effect of ethanol extract of *Magnolia officinalis* and 4-O-methylhonokiol on memory impairment and neuronal toxicity induced by beta-amyloid [J]. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2010, 95(1): 31-40
- [15] Lee Y K, Yuk D Y, Kim T I, et al. Protective effect of the ethanol extract of *Magnolia officinalis* and 4-O-methylhonokiol on scopolamine-induced memory impairment and the inhibition of acetylcholinesterase activity [J]. Journal of Natural Medicines, 2009, 63(3): 274-282
- [16] Xing H, Zhang K, Zhang R, et al. Antidepressant-like effect of the water extract of the fixed combination of *Gardenia jasminoides*, *Citrus aurantium* and *Magnolia officinalis* in a rat model of chronic unpredictable mild stress [J]. Phytomedicine, 2015, 22(13): 1178-1185
- [17] Lee Y, Choi D, Han S B, et al. Inhibitory effect of ethanol extract of *Magnolia officinalis* on memory impairment and amyloidogenesis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease via regulating  $\beta$ -secretase activity [J]. Phytotherapy Research, 2012, 26(12): 1884-1892
- [18] Chen C, Zhou X, Luo Y, et al. Magnolol, a major bioactive constituent of the bark of *Magnolia officinalis*, induces sleep via the benzodiazepine site of GABA<sub>A</sub> receptor in mice [J]. Neuropharmacology, 2012, 63(6): 1191-1199
- [19] Hoi C P, Ho Y P, Baum L, et al. Neuroprotective effect of honokiol and magnolol, compounds from *Magnolia officinalis*, on beta-amyloid-induced toxicity in PC12 cells [J]. Phytotherapy Research, 2010, 24(10): 1538-1542
- [20] Lee S, Kim H, Cho Y, et al. Aqueous extract of *Magnolia officinalis* mediates proliferative capacity, p21WAF1 expression and TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activity in human

- urinary bladder cancer 5637 cells; involvement of p38 MAP kinase [J]. *Oncology Reports*, 2007, 18(3): 729-736
- [21] Lee S, Cho Y, Park K, et al. Inhibitory effects of the aqueous extract of *Magnolia officinalis* on the responses of human urinary bladder cancer 5637 cells in vitro and mouse urinary bladder tumors induced by *N*-Butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine *in vivo* [J]. *Phytotherapy Research*, 2009, 23(1): 20-27
- [22] Liu Y, Tong Y, Yang X, et al. Novel histone deacetylase inhibitors derived from *Magnolia officinalis* significantly enhance TRAIL-induced apoptosis in non-small cell lung cancer [J]. *Pharmacological Research*, 2016, 111: 113-125
- [23] Chen X, Hu Y, Shan L, et al. Magnolol and honokiol from *Magnolia officinalis* enhanced antiviral immune responses against grass carp reovirus in *Ctenopharyngodon idella* kidney cells [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 63: 245-254
- [24] Hahm E, Arlotti J A, Marynowski S W, et al. Honokiol, a constituent of oriental medicinal herb *Magnolia officinalis*, inhibits growth of PC-3 xenografts in vivo in association with apoptosis induction [J]. *Clinical Cancer Research*, 2008, 14(4): 1248-1257
- [25] Xu H, Tang W, Du G, et al. Targeting apoptosis pathways in cancer with magnolol and honokiol, bioactive constituents of the bark of *Magnolia officinalis* [J]. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 2011, 5(5): 202-210
- [26] Teng C, Chen C, Ko F, et al. Two antiplatelet agents from magnolia officinalis [J]. *Thrombosis Research*, 1988, 50(6): 757-765
- [27] Watanabe K, Watanabe H, Goto Y, et al. Pharmacological properties of magnolol and honokiol extracted from *Magnolia officinalis*: central depressant effects [J]. *Planta Medica*, 1983, 49(10): 103-108
- [28] Ho K, Tsai C, Chen C, et al. Antimicrobial activity of honokiol and magnolol isolated from *Magnolia officinalis* [J]. *Phytotherapy Research*, 2001, 15(2): 139-141
- [29] Syu W, Shen C, Lu J, et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of neolignans from *Magnolia officinalis* [J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2004, 1(3): 530-537
- [30] Xu Q, Yi L, Pan Y, et al. Antidepressant-like effects of the mixture of honokiol and magnolol from the barks of *Magnolia officinalis* in stressed rodents [J]. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 2008, 32(3): 715-725
- [31] Ma L, Chen J, Wang X, et al. Structural modification of honokiol, a biphenyl occurring in *Magnolia officinalis*: the evaluation of honokiol analogues as inhibitors of angiogenesis and for their cytotoxicity and structure-activity relationship [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2011, 54(19): 6469-6481
- [32] GB/T 15000.2-94, 标准样品工作导则(2)标准样品常用术语及定义[S]  
GB/T 15000.2-94, Directives for the work of reference materials (2) The common terms and definitions of reference materials [S]
- [33] 杜宁, 周晓晶, 张婉, 等. 我国天然产物标准样品研复制工作组织管理[J]. *现代科学仪器*, 2010, 6(3): 140-142  
DU Ning, ZHOU Xiao-jing, ZHANG Wan, et al. Management of development work for Chinese natural product reference materials [J]. *Modern Scientific Instruments*, 2010, 6(3): 140-142
- [34] GB/T 15000.3-2008, 标准样品工作导则(3)标准样品定值的一般原则和统计方法[S]  
GB/T 15000.3-2008, Directives for the work of reference materials (3) Reference materials-General and statistical principles for certification [S]
- [35] GB/T 8170-2008, 数值修约与极限数值的表示和判定[S]  
GB/T 8170-2008, Rules of rounding off for numerical values & expression and judgment of limiting values [S]
- [36] Kyu Ho Bang, Yoon Kwan Kim, Byung Sun Min, et al. Antifungal activity of magnolol and honokiol [J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2000, 23: 46-49