

• 专论 •

幼朴与传统厚朴的等效性研究

曾建国^{1,2,3}, 常新亮², 贺晓华², 鄢伟², 蔡光先¹, 梁鑫森⁴

(1 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410007; 2 湖南省中药提取工程研究中心, 湖南 长沙 410331; 3 湖南农业大学, 湖南 长沙 410128; 4 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023)

摘要:目的 针对目前传统厚朴资源短缺的现状, 研究以 2~5 年生厚朴的根皮(以下简称幼朴)快速高效产业化获取厚朴总酚的方法, 并比较幼朴与传统厚朴的化学与生物等效性。方法 研究不同生长年限(1~20 年)凹叶厚朴中厚朴总酚在不同生长部位中的代谢积累变化规律, 并采用密集种植提高 2~5 年生幼朴产量的方式, 与按传统种植方式采用 10、15、20 年生的厚朴植物获取厚朴总酚进行分析对比, 以证实幼朴能快速高效产业化获取厚朴总酚; 利用 HPLC、GC-MS 色谱法对幼朴与市售根朴、筒朴进行化学表征分析, 同时进行急性毒性、药效试验和临床观察, 以确定其等效性。结果 2~5 年生幼朴可以替代传统厚朴作为获取厚朴总酚的原料; 幼朴与传统厚朴具有化学等效性; 急性毒性实验结果表明, 幼朴与传统厚朴均没有显示毒性, 在使用上是安全的; 药效试验结果表明幼朴入药的厚朴三物汤与传统厚朴入药的厚朴三物汤对正常小鼠和便秘小鼠的肠道功能作用没有显著差异; 临床观察结果显示幼朴入药的厚朴三物汤与传统厚朴入药的厚朴三物汤在治疗老年功能性便秘的疗效上作用一致。结论 幼朴与厚朴在厚朴总酚方面具有化学、生物等效性, 幼朴可以代替传统厚朴使用。

关键词: 幼朴; 厚朴; 代谢框架; 等效性

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)05-0673-08

厚朴是我国传统药材, 为木兰科植物厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. 或凹叶厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. var. *biloba* Rehd. et Wils. 的干燥干皮、根皮和枝皮^[1]。自古以来其被用于治疗消化系统疾患及用作镇静和缓解骨骼肌紧张药^[2], 主要生物活性成分是厚朴酚、和厚朴酚^[3], 《中国药典》中明确规定厚朴中厚朴总酚的量不得低于 2.0%, 方可入药。目前厚朴的传统栽培与传统用药途径通常是厚朴或凹叶厚朴种植 15 年以上, 砍伐后, 剥取茎皮、枝皮入药, 茎皮称为干朴或筒朴, 枝皮称枝朴, 也有少部分以后不再种植厚朴的, 直接挖去厚朴根皮入药为根朴^[4]。这种传统的采收与用药途径存在着种植周期长、平均收益低、资源破坏大的弊端。因此, 找到一种种植周期短、平均收益高、实现厚朴资源高效利用的方法尤显重要。

植物中具有生物活性的次生代谢产物的积累是决定中药品质和高效利用的关键因素。植物代谢组学是系统、全面地研究植物中所有小分子代谢产物的一门前沿技术, 很多学者对天然产物进行代谢轮廓分析, 即对少数所预设的一些代谢产物的定量分析, 如某一类结构、性质相关的化合物、某一代谢途径的所有中间产物或多条途径的标志性组分^[5]。但由于药

用植物功能成分的复杂性和目前技术水平的限制, 在制定植物原料质量标准时只能对某一种或某一类成分进行定量分析。基于植物代谢组学技术的基础上, 笔者尝试性地提出“代谢框架”研究的概念, 即以药用植物中某一种或某一类功能有效成分作为指标, 研究不同生长年限、不同生长期、不同生长环境下目标成分(组)在药用植物不同生长部位(根、茎、叶、花、果实等)的代谢积累变化规律, 描绘出目标成分(组)在特征条件下药用植物不同生长部位代谢积累的量化表征, 以指导资源利用与资源改良。

本研究在“代谢框架”思路指导下, 以厚朴酚、和厚朴酚为指标成分, 研究产地为湖南桂东的不同生长年限(1~20 年)的凹叶厚朴中厚朴总酚在不同生长部位中的代谢积累变化规律, 证实 2~5 年生厚朴的根皮(以下简称幼朴)能替代传统厚朴作为获取厚朴总酚的原料。同时通过密集种植提高 2~5 年生幼朴产量的方式, 与按传统种植方式采用 10、15、20 年生的厚朴植物获取厚朴总酚进行对比, 考察年单产厚朴总酚的收益, 以期实现幼朴能快速高效产业化获取厚朴总酚, 达到厚朴资源高效利用的目的。

为验证幼朴是否能替代传统厚朴入药, 本研究利用 GC-MS 法对 3 年生幼朴与市售筒朴、根朴的

①收稿日期: 2009-12-23

作者简介: 曾建国(1965—), 男, 湖南常德人, 教授, 湖南中医药大学博士, 湖南农业大学教授, 研究方向为中药资源及其成分(包括植物提取物)应用开发。Tel: (0731) 84686489 E-mail: ginkgo@worldway.net

挥发性组分进行化学表征,并通过 HPLC 法对主要生物活性成分厚朴酚、和厚朴酚定量分析,阐述 3 年生幼朴与传统厚朴具有化学等效性;通过急性经口毒性实验,验证幼朴与传统厚朴在使用上的安全性;分析比较幼朴入药的厚朴三物汤(下文简称为幼朴三物汤)与传统厚朴入药的厚朴三物汤(下文简称为厚朴三物汤)对正常小鼠和便秘型小鼠肠道功能的影响,验证幼朴与传统厚朴的药效等效性;观察幼朴三物汤与厚朴三物汤对老年功能性热结型便秘的治疗作用,验证二者的临床疗效的等效性。

1 材料

1.1 药物:幼朴(3 年生)采自湖南桂东,由湖南中医药大学药学院药用植物学周日宝教授鉴定为木兰科植物凹叶厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. var. *biloba* Rehd. et Wils. 的根皮;市售简朴、根朴购买自湖南省长沙市高桥药材批发市场,产地为湖南安化,由周日宝教授鉴定为《中国药典》所收载的厚朴品种。厚朴三物汤颗粒、幼朴三物汤颗粒委托湖南中医药研究院中药研究所生产,批号:20090905。和厚朴酚(批号:110729-200310)、厚朴酚(批号:110730-200307),购自中国药品生物制品检定所。

营养性半固体药糊的配制:取羧甲基纤维素钠 10 g 溶于 250 mL 蒸馏水中,分别加入奶粉 16 g、糖 8 g、淀粉 8 g、活性炭末 2 g,搅拌均匀,配制成 300 mL 的黑色营养性半固体糊状物。取传统厚朴入药厚朴三物汤颗粒 5 g 溶于 100 mL 半固体糊,配成质量浓度为 0.05 g/mL 营养性半固体糊;照此方法,分别配制质量浓度为 0.10、0.05、0.025 g/mL 的幼朴入药厚朴三物汤颗粒;将配好的药液冰箱冷藏,用时恢复至室温。

1.2 动物:清洁级昆明种小鼠 170 只,雌雄各半,体质量(20±2)g,由湖南斯莱克景达实验动物公司提供,实验动物生产许可证号为 SCXK(湘)2009-0004,实验动物合格证号为 0047587,全价颗粒饲料由上海西普尔-必凯试验动物有限公司提供。

1.3 仪器及试剂

1.3.1 GC-MS 色谱联用仪:美国 Agilent Technologies 公司 HP6890GC/5973MS 气相色谱-质谱联用仪;HP-5 MS 石英毛细管柱(30 mm×0.25 mm×0.25 μm)。

1.3.2 HPLC 色谱法分析测试仪器:Waters 1525 高效液相色谱仪(美国,包括 Waters 2998 PAD 检测器, Waters 2707 自动进样品);色谱柱为 Waters

XBridge C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。

1.3.3 动物实验仪器及试剂: E60 冰冻切片机(英国 Thermo 公司), BX51 光学显微镜及 Image Pro Express 图像分析系统(日本 Olympus 公司), DY89-1 型电动匀浆机(宁波新芝科器研究所), GIS-1000 数码凝胶图像分析系统(上海天能科技公司), GE-100 凝胶电泳仪, TC-48/T/H(a) 基因扩增仪(杭州大和热磁电子有限公司)。小鼠抗大鼠 5-羟色胺(5-HT)受体 1α、多巴胺(DA)受体 1 单克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司), SABC 免疫组化试剂盒、AEC 显色剂(北京中杉金桥生物技术有限公司), 焦碳酸二乙酯(Solarbio), Trizol (Invitrogen), TaKaRa RNA PCR Kit 试剂盒(宝生物工程有限公司)。色谱用甲醇、乙腈为德国 Merck 公司生产。

2 方法

2.1 厚朴酚、和厚朴酚 HPLC 定量测定方法:参照《中国药典》2005 年版(一部)厚朴的测定方法。

2.1.1 色谱条件:以甲醇-水(75:25)为流动相,体积流量为 0.8 mL/min;检测波长为 294 nm;柱温为 25℃;理论塔板数以厚朴酚峰计算应不低于 3 800。

2.1.2 对照品溶液的制备:精密称取厚朴酚、和厚朴酚对照品适量,加甲醇分别制成含厚朴酚 40 μg/mL 和厚朴酚 24 μg/mL 的溶液,即得。

2.1.3 供试品溶液的制备:取样品粉末(过 3 号筛)1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 100 mL 甲醇,密塞,超声提取 1 h,滤过,精密量取续滤液 5 mL,置 25 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.1.4 检测方法:分别精密吸取上述两种对照品溶液和供试品溶液各 5 μL,注入液相色谱仪,测定。

2.2 GC-MS 测定方法

2.2.1 GC-MS 条件:HP-5MS 石英毛细管柱(30 mm×0.25 mm×0.25 μm);柱温 60~240℃,程序升温 5℃/min;柱流量为 1.0 mL/min;进样口温度 250℃;柱前压 100 kPa;进样量 0.20 μL(其中根朴样品的进样量为 0.1 μL);分流比 10:1;载气为高纯氦气。电离方式 EI;电子能量 70 eV;传输线温度 250℃;离子源温度 230℃;四极杆温度 150℃;质量范围 35~450。采用 Wiley7n.1 标准谱库检索定性。

2.2.2 供试品制备方法:取样品粉末(过 3 号筛)50.0 g,精密称定,置圆底烧瓶中,加入醋酸乙酯,水浴回流提取两次,每次 1 h,醋酸乙酯用量每次为 500 mL,合并两次提取液浓缩至干,加 50 mL 甲醇使溶解,即得。其中根朴供试品精密吸取 10 mL 定

容至 50 mL, 即得。

2.3 急性毒性试验

2.3.1 动物分组与给药: 根据预实验结果, 采用测定最大给药量法观察样品的急性毒性。小鼠(雌雄各半)随机分为 4 组, 每组 20 只, 另设正常对照组 20 只。给药方法: 首日 ig 两次, 两次给药间隔 8 h 以上, 给药体积 40 mL/kg, 正常对照组予生理盐水。

2.3.2 样品制备: 将传统厚朴与幼朴分别粉碎, 精密称取 200 g 药材, 加入 8 倍量蒸馏水或 90% 乙醇提取 2 次, 每次 2 h, 滤过提取液浓缩成浸膏 20 g(提取率均为 10%), 制成传统厚朴水提取物、厚朴醇提取物和幼朴水提取物、幼朴醇提取物。

2.3.3 给药剂量: 传统厚朴水、醇提取物配成质量浓度为 0.5 g/mL 的混悬液(相当于给药量 200 g/kg, 以原药材计), 幼朴水、醇提取物配成质量浓度为 0.5 g/mL 的混悬液(相当于给药量 200 g/kg, 以原药材计)。

2.3.4 观察期限及指标: 观察 14 d, 观察体质量、饮食、外观、行为、分泌物、排泄物、中毒及死亡情况, 动物死亡或观察结束进行解剖, 发现器官病变时进行病理检查。

2.4 对正常小鼠肠道功能的影响

2.4.1 动物分组与给药: 50 只小鼠, 雌雄各半, 将小鼠随机分为 5 组, 对照组, 厚朴三物汤颗粒 1.5 g/kg 组, 幼朴三物汤颗粒高、中、低剂量(3、1.5、0.75 g/kg)组, 每组 10 只。对照组 ig 蒸馏水; 幼朴三物汤颗粒高、中、低剂量组给予相当于成人每天用药等效剂量 2、1、0.5 倍的药糊; 厚朴三物汤颗粒组给予相当于成人每天用药等效剂量 1 倍的药糊; 均按 30 mL/(kg·d) ig 给药。

2.4.2 观察指标: (1) 小鼠小肠推进实验^[7]: ig 给药后 15 min, 每组脱颈椎处死 5 只小鼠, 打开腹腔分离肠系膜, 剪取上端至幽门, 下端至回盲部的肠管, 轻轻将小肠拉成直线测量肠管长度作为小肠总长度。从幽门至炭末前沿的距离作为炭末在肠内推进距离, 计算炭末推进百分率, 并以 *t* 检验统计处理数据。(2) 小鼠排便时间和数量实验(炭末法)^[8]: 小鼠 ig 给药后, 每组取 5 只小鼠分置于铺有滤纸的单笼中观察。记录小鼠开始排黑粪时间, 粪便性状和数目, 观察 5 h。以 *t* 检验统计处理数据。

2.5 对便秘型小鼠肠道功能的影响

2.5.1 动物分组与给药: 40 只小鼠, 雌雄各半, 将小鼠随机分为 4 组, 每组 10 只, 对照组、模型组、幼朴三物汤(1.5 g/kg)组、厚朴三物汤(1.5 g/kg)组。

造模后开始 ig 给药, 对照组和模型组 ig 蒸馏水; 药物组均按 30 mL/(kg·d)(临床等效剂量) ig 给药; 给药 5 d。

2.5.2 模型制备: 采用冰水灌胃法建立小鼠便秘型肠易激综合征(C-IBS)模型。除对照组外, 其余各组小鼠每日均以冰生理盐水(0~4℃) ig 2 次, 均按 30 mL/(kg·d), 连续 14 d, 制备小鼠 C-IBS 模型。

2.5.3 观察指标: 同 2.4.2。

2.5.4 小鼠回肠组织 5-HT 受体 1 α 、DA 受体 1 免疫组化检测: 采用 SABC 法, AEC 显色, 阳性细胞呈紫红色。随机观察 5 个放大 400 倍的视野, 用计算机图像处理软件、Olympus Micro Image 4.0 图像处理系统自动计数免疫阳性细胞数。

2.5.5 小鼠结肠组织 5-HT 受体 1 α 、DA 受体 1 mRNA 表达的检测: 以 Trizol 法提取总 RNA, 组织与 Trizol 分别取 50 mg、1 mL。提取完成后用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳来鉴定 RNA 的完整性, 如果 18S 和 25S 完整性较好, 则可以进入下一步骤。逆转录反应体系 10 μ L, 包括细胞总 RNA 1 μ L, 10 $\times$ RT 缓冲液 1 μ L, RNase free dH₂O 3.75 μ L, dNTP 混合物 1 μ L, RNase 抑制剂 0.25 μ L, AMV 逆转录酶 0.5 μ L, Oligo dT-Adaptor 引物 0.5 μ L。反应条件为: 30℃ 10 min, 45℃ 30 min, 99℃ 5 min, 5℃ 5 min, 1 个循环。PCR 引物根据 www.ncbi.nlm.nih.gov 基因库基因序列, 用软件 Primer 5 自行设计 5-HT、DA 和 β -actin 引物, 由上海捷瑞生物工程公司合成。PCR 反应体系为 50 μ L, 包括逆转录产物 10 μ L, 10 pmol/ μ L 的上、下游引物各 0.5 μ L, 5 $\times$ PCR 缓冲液 10 μ L, ddH₂O 28.75 μ L, Taq HS 0.25 μ L。引物序列和各自反应条件见表 1。取 3 μ L 扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳, 采用凝胶图像分析仪进行吸光度扫描, 应用 GIS-1000 数码凝胶图像分析系统观察条带灰度强弱, 结果以目标条带与 β -actin PCR 产物电泳条带吸光度比值表示。

2.6 治疗老年功能性热结型便秘的临床观察

2.6.1 总体设计: 本研究参阅罗马 II 标准意见和相关文献, 采用分层区组随机、双盲观察、多中心临床试验设计方案, 幼朴三物汤和厚朴三物汤平行对照临床研究实验设计方法, 试验采用优效性设计。

2.6.2 病例来源: 全部病例来源于湖南省耒阳市中医院和张家界市中医院 60~75 岁的患者。幼朴三物汤组 30 例, 厚朴三物汤组 30 例。

2.6.3 病例选择: 诊断依据: 参考“功能性胃肠病的罗马 III 诊断标准”。

表 1 PCR 反应引物序列及反应条件

Table 1 Primer sequence and reaction condition of PCR

基因	引物序列	PCR 反应条件	产物长度/bp
β-actin	正向引物 CTT CCT TCT TGG GTAT GG	94 ℃、45 s, 53 ℃、45 s,	353
	反向引物 TCAGT AAC AGT CCG CCT A	72 ℃、50 s, 35 循环	
DA 受体 1	正向引物 TCCA ACT CACT GACT CCA	94 ℃、45 s, 51 ℃、45 s,	252
	反向引物 ATG CAC CT ACCT TACA ATC	72 ℃、50 s, 35 循环	
5 TH 受体 1α	正向引物 GAG TTG TTGG GT GCCATAA T	94 ℃、45 s, 53 ℃、45 s,	234
	反向引物 TTGAG TGAACAGGAAGGCT C	72 ℃、50 s, 35 循环	

2.6.4 功能性便秘诊断标准: (1) 必须包括以下 2 项或 2 项以上: 25% 的排便费力; 至少 25% 的排便为干球状或硬便; 至少 25% 的排便不尽感; 至少 25% 的排便有肛门直肠梗阻或堵塞感; 至少 25% 的排便需要手法帮助(如用手指帮助排便、盆底支持); 排便每周 < 3 次。(2) 在不使用泻药的情况下很少出现稀便。(3) 没有足够的证据诊断肠易激综合征(IBS)。(4) 诊断前症状出现至少 6 个月, 且近 3 个月症状明显。

2.6.5 热秘证的诊断: (1) 符合功能性便秘标准。(2) 以前使用非药物治疗法至少 2 个月 IBS 症状未得到改善者。(3) 过去 2 年内在便秘症状出现后进行肠道内镜/放射线检查, 排除了癌、炎症性肠病或其他器质性疾病。(4) 对有大便潜血阳性的患者, 应在过去 1 年内肠镜或气钡双重造影检查结果正常者。(5) 年龄在 60~ 75 岁。

2.6.6 观察指标: 包括一般指标和有效性指标, 其中有效性指标是指客观指标、综合评价指标、安全性观察。客观指标主要是排便次数和第一次排便时间, 记录每天服药期间大便次数和服药后第 1 次排便时间。综合评价指标包括: ①消化健康状态量表(DHSI), 评价消化不良症状与整体情况, 对基线时及治疗 4 周后症状进行评估。②中医证候相关指标, 参照《中药新药治疗辨证临床研究指导原则》相关内容制定。安全性观察是①一般体格检查项目(血压、心率、体温、呼吸); ②血、尿、便常规化验; ③心电图检查, 肝功能(ALT)、肾功能(BUN、Cr) 检查。

2.6.7 治疗方案: 采用随机对照研究方法, 厚朴三物汤组予厚朴三物汤颗粒, 幼朴三物汤组予幼朴三物汤颗粒, 冲服, 每次 1 包, 每日两次, 7 d 为一疗程。两组均用药 1 个疗程, 疗后随访 2 周。

3 结果与讨论

3.1 厚朴中厚朴总酚的代谢框架研究: 以厚朴酚、和厚朴酚为指标成分, 研究产地为湖南桂东的不同生长年限(1~ 20 年) 的凹叶厚朴中厚朴总酚在不同生长部位中的代谢积累变化规律, 研究结果表明(表

2): 厚朴在种植 2~ 5 年间厚朴总酚在根部积累很快, 从 0.86% 增加到 7.68%, 随后增加缓慢, 尤其是 10 年后增加更慢(图 1); 2~ 5 年生厚朴的根皮(笔者暂命名为幼朴) 中厚朴总酚量达到 2% 以上, 符合《中国药典》规定的标准, 可以选择 2~ 5 年生幼朴替代传统厚朴作为获取厚朴总酚的原料。

表 2 不同生长年限桂东产厚朴中厚朴总酚的量

Table 2 Magnolol content in root bark of *M. officinalis* var. *biloba* at various ages (1~ 20 year) from Guidong, Hunan Province

生长年限	根皮/(mg · g ⁻¹)			干皮/(mg · g ⁻¹)		
	厚朴酚	和厚朴酚	总酚	厚朴酚	和厚朴酚	总酚
1	2.9	5.7	8.6	2.8	1.5	4.3
2	11.1	16.5	27.6	4.0	3.1	7.1
3	34.9	41.9	76.8	5.8	3.5	9.3
4	34.1	51.2	85.3	8.4	4.8	13.2
5	40.6	53.1	93.7	11.7	5.1	16.8
10	58.9	81.4	140.3	15.3	8.8	24.1
15	53.7	94.9	148.6	25.4	13.5	38.9
20	50.2	117.7	167.9	28.7	28.1	56.8

种植年限/年	厚朴酚	和厚朴酚	总酚
1	2.9	5.7	8.6
2	11.1	16.5	27.6
3	34.9	41.9	76.8
4	34.1	51.2	85.3
5	40.6	53.1	93.7
10	58.9	81.4	140.3
15	53.7	94.9	148.6
20	50.2	117.7	167.9

图 1 桂东产厚朴种植 1~ 20 年根皮中厚朴总酚的量

Fig 1 Magnolol contents in root bark of *M. officinalis* var. *biloba* at various ages (1~ 20 years) from Guidong, Hunan Province

3.2 2~ 5 年生幼朴密植化生产研究: 通过密集种植提高 2~ 5 年生幼朴单位产量的方式, 与按传统种植方式采用 10、15、20 年生的厚朴植物获取厚朴总酚进行对比, 考察年均产厚朴总酚收益(表 3)。研究表明: 对于不同生长年限的厚朴采用不同的种植密度获取厚朴总酚, 厚朴年均每公顷产厚朴总酚量随生长年限的增长而增加, 以 20 年生的厚朴为

最高,达到每年 81.9 kg/hm²,但在 3~10 年间年均每公顷产厚朴总酚量增加缓慢(图 2);2~5 年生幼朴年均每公顷产厚朴总酚量明显高于 10~15 年生厚朴按传统种植方式以干皮获取厚朴总酚的年均每公顷产厚朴总酚量(图 3),在改变种植方式后,前者的年均每公顷产厚朴总酚量是后者的 2 倍多,表明 2~5 年生幼朴可以替代传统厚朴进行规模化种植,具有很好的产业化开发前景。2~5 年生幼朴采用

不同的种植密度,以 5 年生幼朴的年均每公顷产厚朴总酚最高,但 3~5 年间年均每公顷产厚朴总酚量相差不多。从种植周期因素考虑,优选 3 年生幼朴作为获取厚朴总酚的原料^[6]。该方法具有土地利用率高,收效快,单位面积厚朴总酚年产量高,厚朴原料厚朴总酚量高,投资见效快,农民种植积极性高,有利于规模化、标准化生产厚朴药材,实现了厚朴资源的高效利用。

表 3 2~5 年生幼朴采用密集种植方式与 10~20 年生厚朴传统种植方法获取厚朴总酚的产量比较

Table 3 Comparison on magnolol contents between younger (2~5 years by intensive cultivation) and older (10~20 years by traditional cultivation) root bark of *M. officinalis* var. *biloba*

生长年限	种植密度/ (株·hm ⁻²)	单株干皮 产量/kg	干皮产量/ (kg·hm ⁻²)	干皮厚朴 总酚量/%	干皮产厚 朴总酚量/ (kg·hm ⁻²)	单株根皮 产量/g	根皮产量/ (kg·hm ⁻²)	根皮厚朴 总酚量/%	根皮产总 酚量/ (kg·hm ⁻²)	厚朴总 酚量/ (kg·hm ⁻²)	年均产厚 朴总酚/ (kg·hm ⁻²)
1	75 000	/	/	/	/	0 80	60 00	0 86	0 45	0 52	0 52
2	49 500	/	/	/	/	10 70	529 65	2 76	14 62	14 62	7 31
3	33 000	/	/	/	/	42 70	1 409 10	7 68	108 22	108 22	36 07
4	30 000	/	/	/	/	57 90	1 737 00	8 53	148 17	148 17	37 04
5	15 000	/	/	/	/	139 50	2 092 50	9 37	196 07	196 07	39 21
10	3 000	2 31	6 930 00	2 41	167 01	5 12 40	1 537 20	14 03	215 67	382 68	38 27
15	3 000	3 12	9 360 00	3 31	309 82	1 166 10	3 498 30	14 86	519 85	829 66	55 31
20	3 000	4 63	13 890 00	5 68	788 95	1 687 10	5 061 30	16 79	849 79	1 638 74	81 94

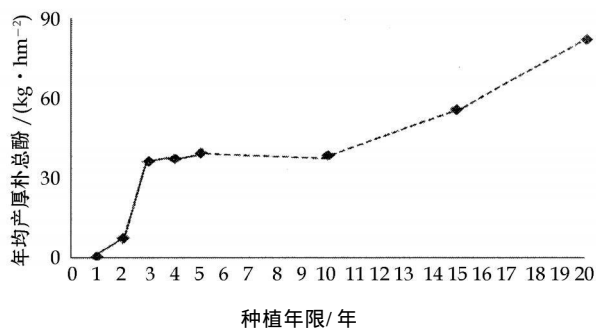


图 2 种植 1~20 年桂东产厚朴年均产厚朴总酚量

Fig 2 Magnolol contents in root bark of *M. officinalis* var. *biloba* in average annual output per hectare at various ages (1~20 years) from Guidong, Hunan Province

3.3 化学等效性研究:用气相色谱法分离并经质谱扫描后,利用 Wiley7n 1 标准谱库的质谱数据进行计算机检索,对 3 个厚朴样品中的挥发性成分进行了分析,结果见表 4。根朴样品共检出 38 个色谱峰及对应的质谱,鉴定出 34 个成分;幼朴样品共检出 36 个色谱峰及对应的质谱,共鉴定出 32 个成分;筒朴样品中共检出 50 个色谱峰,鉴定出 41 个成分。GC-MS 分析结果表明,3 个样品挥发性组分中厚朴酚和厚朴酮为其主要成分,面积归一化法计算根朴、幼朴、筒朴的厚朴总酚质量分数分别为 85.36%、78.73%、69.72%,其他挥发性成分的量相

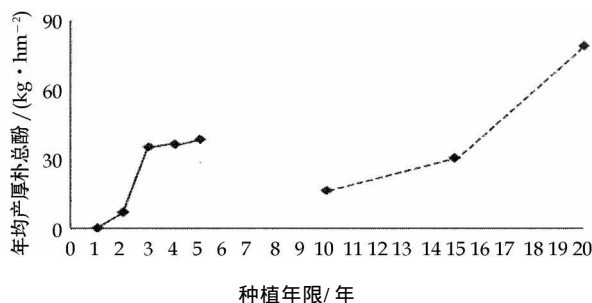


图 3 桂东产 1~5 年生幼朴采用密集种植方式以根皮获取厚朴总酚与 10~20 年生厚朴采用传统种植方法以干皮获取厚朴总酚的年均产量比较

Fig 3 Comparison of magnolol contents in average annual output per hectare between younger (1~5 years by intensive cultivation) and older (10~20 years by traditional cultivation) root bark of *M. officinalis* var. *biloba*

对较低,其中幼朴和根朴的挥发性成分组成十分接近,幼朴与筒朴在挥发性化学成分组成上差别也不大,表明幼朴与传统厚朴具有化学等效性。此外,GC-MS 实验中样品的提取采用醋酸乙酯回流提取,而未采用《中国药典》中规定的甲醇作为溶剂,主要是考虑到甲醇的极性较大,提取不到一些小极性的组分,同时会提取到一些不挥发性的组分,造成仪器的污染。因此以根朴中厚朴总酚为考察对象,分析比

表 4 3 种厚朴药材醋酸乙酯提取物中挥发性成分比较

Table 4 Comparison of volatile components in ethyl acetate extracts from three kinds of <i>Cortex Magnoliae Officinalis</i>									
编号	成 分	质量分数/ %			编号	成 分	质量分数/ %		
		根朴	幼朴	筒朴			根朴	幼朴	筒朴
1	α-蒎烯	0.01	0.04	0.17	24	樟脑	0.02	0.13	
2	莰烯	0.02	0.09	0.05	25	龙脑	0.02	0.05	
3	对聚伞花素+ 柠檬烯+ 1,8-桉叶素	0.09	0.16	0.22	26	乙酸龙脑酯	0.01	0.02	
4	芳樟醇	0.07	0.27	0.15	27	β-古芸烯	0.05	0.05	
5	4-烯丙基苯酚	0.04	0.40	1.29	28	6-O-甲基和厚朴酚	2.12	9.27	
6	α-胡椒烯	0.04	0.01	0.07	29	去氢白菖烯		0.06	0.08
7	β-石竹烯	0.10	0.21	0.24	30	β-蒎烯		0.04	0.02
8	α-石竹烯	0.04	0.07	0.13	31	α-木罗烯	0.08		0.05
9	γ-木罗烯	0.08	0.07	0.16	32	δ-杜松烯	0.12		0.1
10	α-芹子烯	0.12	0.12	0.32	33	萜草烯氧化物	0.03		0.21
11	β-芹子烯	0.14	0.13	0.30	34	3-萜烯	0.02		
12	γ-桉叶油醇	0.11	0.04	1.76	35	己酸			0.33
13	β-桉叶油醇	0.21	0.07	2.22	36	顺-呋喃型芳樟醇氧化物			0.02
14	α-桉叶油醇	0.22	0.12	2.60	37	反-呋喃型芳樟醇氧化物			0.02
15	石竹烯氧化物	0.11	0.05	0.55	38	α-龙脑烯醛			0.02
16	十六烷酸	0.01	0.02	0.09	39	异龙脑			0.02
17	异厚朴酚	0.09	0.17	0.15	40	龙脑			0.08
18	厚朴酚	36.11	33.16	46.08	41	α-松油醇			0.06
19	邻苯二甲酸二异丁酯	0.07	0.25	0.54	42	乙酸龙脑脂			0.10
20	4,4'-二烯丙基-2,3'-二羟基二苯醚	6.91	5.36	7.31	43	2,3,3-三甲基-2-(3-甲基-1,3-丁二烯基)-6-氧杂双环[3.2.0]庚-7-酮+ 1,6-二甲基-4-异丙基萘			0.07
21	和厚朴酚	49.25	45.57	23.64	44	十八碳二烯酸			0.02
22	龙脑基厚朴酚	0.09	0.11	0.84					
23	β-谷甾醇	0.16	0.66	1.01					

根朴的校正因子为 2.5×10^6 ; 幼朴和筒朴校正因子为 2.5×10^5 ; 校正因子= 样品的体积/ 进样体积
root bark of *M. officinalis* var. *biloba*'s correction factor is 2.5×10^6 ; younger and stem branches of *M. officinalis* var. *biloba*'s correction factor is 2.5×10^5 ; correction factors= sample volume/ injection volume

较了甲醇超声提取和醋酸乙酯回流提取方法,结果显示两种提取方法所测得厚朴总酚分别为 172.9、165.8 mg/g, RSD 分别为 1.2%、1.5%,表明两种提取方法对于厚朴总酚的提取率影响不大,本实验采用醋酸乙酯回流提取即能兼顾到厚朴总酚的提取率,又能更充分地提取挥发性成分。

利用 HPLC 色谱法对幼朴、筒朴、根朴进行定量测定,结果见表 5。总酚质量分数分别为 5.25%、2.17%、17.29%,总酚的量高低依次为:根朴>幼朴>筒朴,幼朴中总酚的质量分数高于 2.0%,符合《中国药典》中关于厚朴总酚量的规定。

3.4 幼朴与传统厚朴的急性毒性比较:结果显示,厚朴水、醇提取物和幼朴水、醇提取物按剂量 ig 给药,连续观察 10 d,均安然无恙,未见毒性反应。

表 5 3 个厚朴药材中厚朴酚与和厚朴酚的量
Table 5 Contents of magnolol and honokol in three kinds of *Cortex Magnoliae Officinalis*

样品	厚朴酚/ (mg · g ⁻¹)	和厚朴酚/ (mg · g ⁻¹)	总酚/ (mg · g ⁻¹)
根朴	82.6	90.3	172.9
幼朴	23.7	28.8	52.5
筒朴	13.5	8.2	21.7

3.5 药效等效性研究:

3.5.1 对正常小鼠肠道功能的影响: (1) 对正常小鼠小肠推进的影响: 与对照组比较,厚朴三物汤组和幼朴三物汤各剂量组小肠推进率显著增加,差异显著 ($P < 0.05, 0.01$),表明厚朴三物汤和幼朴三物汤可明显增加小鼠小肠推进速度,其中以幼朴三物汤中剂量组的小肠推进速度最快,但厚朴三物汤和幼朴三物汤各剂量组以及幼朴三物汤各剂量组之间比较,差异不显著 ($P > 0.05$)。结果见表 6。(2) 对正常小鼠排便时间和数量的影响: 与对照组比较,厚朴三物汤组和幼朴三物汤中、低剂量组首次排黑便所需时间、5 h 内排便粒数差异非常显著 ($P < 0.01$)。与厚朴三物汤组相比,幼朴三物汤低、高剂量组小鼠的粪便粒数差异显著 ($P < 0.01$),幼朴三物汤低、高剂量组小鼠的首次排黑便所需时间减少 ($P < 0.05$); 厚朴三物汤组与幼朴三物汤中剂量组之间比较,差异不显著 ($P > 0.05$)。结果见表 6。实验结果表明,厚朴三物汤和幼朴三物汤均能促进正常小鼠的小肠推进率,能减短小鼠排便时间,增加小鼠的排便数量。其中幼朴三物汤在中剂量和厚朴三物汤的作用相当,且量效关系最佳,表明幼朴与传统厚朴的

表 6 厚朴三物汤对正常小鼠肠道功能的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 6 Effects of Houpo Sanwu Decoction on intestinal function of normal mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	推进率/%	首次排便时间/min	5 h 内粪粒数
对照	—	46.51±3.28	102.60±8.62	8.8±0.84
厚朴三物汤	1.5	56.00±6.03**	72.40±5.46**	14.4±1.67**
幼朴三物汤	3.0	52.62±3.62	95.80±11.65△△	10.6±1.14△
	1.5	56.52±7.17**	70.80±8.29**	16.0±1.87**
	0.75	54.33±3.38*	82.40±5.73**△△	11.6±1.67**△△

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与厚朴三物汤组比较: △ $P < 0.05$ △△ $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; △ $P < 0.05$ △△ $P < 0.01$ vs Houpo Sanwu Decoction group

药效作用相当。

3.5.2 对便秘型小鼠肠道功能的影响: (1) 对便秘小鼠小肠推进的影响: 与对照组比较, 小鼠长期 ig 冰水可明显抑制胃肠运动, 其小肠推进率降低 ($P < 0.01$); 给予厚朴三物汤和幼朴三物汤后对胃肠道抑制有促进作用, 可促进其恢复正常 ($P < 0.05$), 与模型组比较差异显著 ($P < 0.01$)。结果见表 7。(2) 对便秘小鼠排便时间和数量的影响: 与对照组比较, 模型组小鼠首次排黑便所需时间、5 h 内排便粒数有显著差异, 表明小鼠便秘模型建立成功 ($P < 0.01$)。模型小鼠给厚朴三物汤、幼朴三物汤之后, 小鼠的首次排便时间和粪便粒数与模型组差异显著 ($P < 0.01$), 和对对照组比较差异不显著

($P > 0.05$), 厚朴三物汤组、幼朴三物汤组之间比较差异不显著 ($P > 0.05$)。结果见表 7。(3) 对便秘小鼠回肠 5-HT 受体 1α、DA 受体 1 表达的影响: G-IBS 小鼠回肠 5-HT 受体 1α、DA 受体 1 表达上升 ($P < 0.05$), 厚朴三物汤、幼朴三物汤均可不同程度调整上述蛋白表达, 与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$), 两药物间比较差异不显著 ($P > 0.05$)。结果见表 7、图 4。(4) 对便秘小鼠结肠 5-HT 受体 1α、DA 受体 1 mRNA 表达的影响: 小鼠结肠 5-HT 受体 1α、DA 受体 1 的 mRNA 表达与阳性细胞表达有类似规律, 厚朴三物汤、幼朴三物汤可不同程度调整上述 mRNA 表达, 两药物比较差异不显著 ($P > 0.05$)。结果见表 7、图 5。

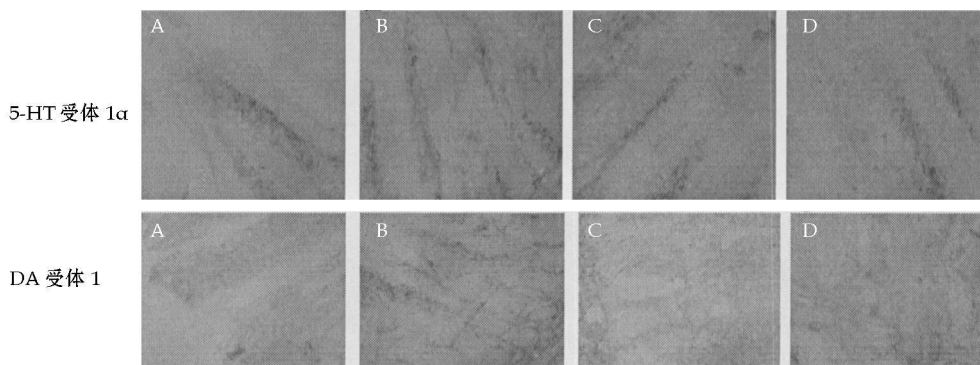
表 7 厚朴三物汤对便秘小鼠肠道功能和 5-HT 受体 1α、DA 受体 1 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 7 Effect of Houpo Sanwu Decoction on intestinal function and expression of 5-HT receptor 1α and DA receptor 1 of constipated mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	推进率/%	首次排便时间/min	5 h 内粪粒数	阳性表达率/%		mRNA 相对表达水平	
					5-HT 受体 1α	DA 受体 1	5-HT 受体 1α	DA 受体 1
对照	—	52.58±3.83	100.6±9.07	9.2±1.10	27.20±5.40	35.20±8.41	0.57±0.05	0.44±0.04
模型	—	29.68±5.97	197.6±21.73**	4.2±0.84*	40.60±6.80**	50.80±9.01**	0.72±0.05**	0.59±0.05**
厚朴三物汤	1.5	47.25±5.03△△	128.8±9.81△△	7.2±0.45△△	29.80±3.42△△	43.00±6.28△△	0.61±0.05△△	0.48±0.05△△
幼朴三物汤	1.5	47.56±5.59△△	125.6±13.07△△	7.8±0.45△△	32.20±6.72△△	42.20±7.19△△	0.59±0.05△△	0.46±0.05△△

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: △△ $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; △△ $P < 0.01$ vs model group



A 对照组 B 模型组 C 厚朴三物汤组 D 幼朴三物汤组

A: control group B: model group C: Houpo Sanwu Decoction group D: Youpo Sanwu Decoction group

图 4 便秘小鼠肠道 5-HT 受体 1α 及 DA 受体 1 阳性表达

Fig 4 Positive expression of 5-HT receptor 1α and DA receptor 1 in intestine of constipated mice

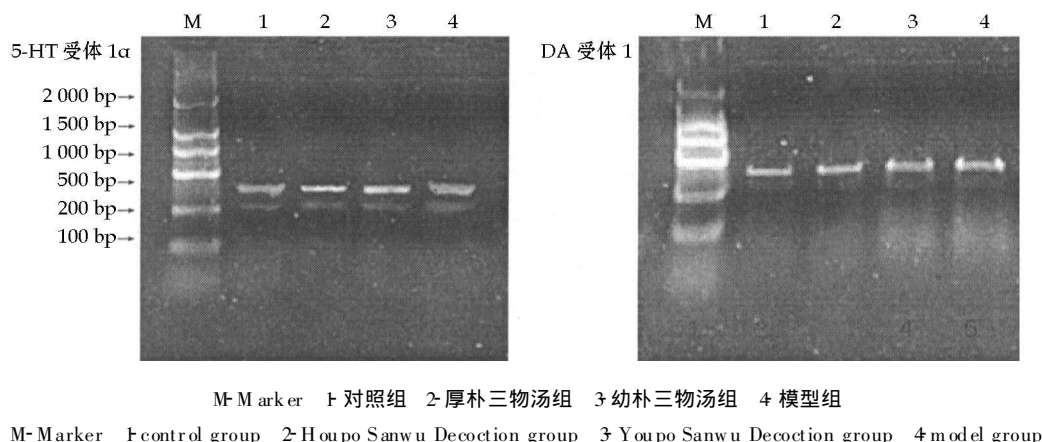


图 5 便秘小鼠肠道 5-HT 受体 1 α 和 DA 受体 1 mRNA 的表达

Fig 5 Expression of 5-HT receptor 1 α and DA receptor 1 mRNA in intestine of constipated mice

经实验证实,厚朴三物汤和幼朴三物汤均能促进便秘小鼠的小肠推进率,能减短小鼠排便时间,增加小鼠的排便数量,降低小鼠回肠组织中 5-HT 受体 1 α 、DA 受体 1 蛋白及 mRNA 的表达,幼朴三物汤和厚朴三物汤的作用没有统计学差异。说明幼朴和厚朴在厚朴三物汤中药理作用相当,其可能作用机制是通过调控 5-HT 受体 1 α 和 DA 受体 1 的表达来实现的。

3.6 对老年功能性热结型便秘的治疗作用:治疗 1 周后,两组临床症状均有显著好转,幼朴三物汤组总有效率 86.7%,厚朴三物汤组总有效率 86.7%。两组总有效率比较差异不显著($P > 0.05$),两组同样有效,作用相当。在观察的临床症状、体征中,两组均有不同程度的改善,且两组间比较,每周排便次数、大便质地、大便带血程度、腹胀、口苦口干、心烦等症状,幼朴三物汤组与厚朴三物汤组显著不差异($P > 0.05$)。

一般检查项目,血常规、尿常规、大便常规、潜血实验、肝肾功能等观察均无异常,60 例患者服药期间均未发生明显不良反应。

4 结论

以上实验的结果表明,3 年生幼朴与传统厚朴相比在厚朴总酚化学成分组成和量上没有明显的差异,且其厚朴总酚的量达到了《中国药典》关于厚朴中总酚量的规定,具有化学等效性;急性毒性实验表

明幼朴与传统厚朴在毒性上没有显著差异,在使用上是安全的;幼朴入药的厚朴三物汤与传统厚朴入药的厚朴三物汤均能促进正常小鼠和便秘小鼠的小肠推进率,缩短小鼠排便时间,增加小鼠的排便数量,降低便秘型小鼠肠道组织中 5-HT 受体 1 α 、DA 受体 1 蛋白及 mRNA 的表达,幼朴三物汤在中剂量和厚朴三物汤的作用相当,且量效关系最佳,幼朴三物汤和厚朴三物汤的药效作用没有统计学差异,表明 3 年生幼朴与传统厚朴具有药效等效性;临床观察结果表明,幼朴与传统厚朴的临床治疗作用相当。因此,幼朴可以代替传统厚朴使用。

致谢:湖南省中医药研究院中药研究所张水寒教授、湖南中医药大学刘柏炎教授、中国科学院昆明植物研究所余珍老师对本研究工作所作的贡献。

参考文献:

- [1] 《中国药典》[S]. I 部. 2005.
- [2] 朱元元,封志平,徐长超,等. 厚朴总生物碱对豚鼠离体气管平滑肌的影响[J]. 中草药, 2009, 40(增刊): 190-193.
- [3] 王立青,江荣高,陈蕙芳. 厚朴酚与和厚朴酚药理作用的研究进展[J]. 中草药, 2005, 36(10): 1591-1594.
- [4] 宋万志,陈建民,季庆义. 木兰科药用植物的研究 II 厚朴的原植物和资源利用[J]. 药学学报, 1984, 19(3): 213-219.
- [5] 许国旺. 代谢组学——方法与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2008.
- [6] 曾建国,黄友生,罗琪. 一种快速获得高总酚厚朴原料的方法[P]. 中国: CN 101496478A, 2009-08-05.
- [7] 陈奇. 中药药理研究方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993.
- [8] 郑学宝,胡玲. 积术汤对脾虚便秘小鼠胃肠运动的影响[J]. 中国临床康复, 2005, 9(3): 240-242.