

## 火麻仁植物甾醇含量测定及肠道菌培养对甾醇干预的剂量响应

李根林, 吕宁, 吴宿慧, 李寒冰\*, 齐月娟

河南中医药大学, 郑州 450046

**摘要:** 本文主要建立一种火麻仁提取物中植物甾醇含量测定的方法, 并在此基础上研究火麻仁植物甾醇对人源肠道菌的调节作用, 以及甾醇对肠道菌调节作用的量效关系。首先采用气相色谱法检测火麻仁提取物中植物甾醇的含量, 三批不同方法处理的样品中植物甾醇含量分别为 16.16%、45.52% 和 46.76%, 对比得到最佳样品制备方法, 经方法学考察优化了检测条件, 结果表明本法灵敏度高、重复性好, 可用于植物甾醇的含量测定。进而采用人源肠道菌与火麻仁甾醇提取物共温孵培养的方法, 检测肠道菌生长对甾醇干预的剂量响应, 采用 SPSS Statistics 19.0 对火麻仁植物甾醇干预人源肠道菌及双歧杆菌生长情况进行单因素方差分析和相关性分析; 与空白组相比火麻仁植物甾醇在 0.08516 ~ 0.3407 mg/mL 浓度范围时, 人源肠道菌中杆菌生长对甾醇剂量响应明显, 二者呈现正相关 ( $r > 0.99$ ), 同时液体培养的双歧杆菌也有相同的剂量响应。结果说明火麻仁甾醇提取物在体外能够促进人源肠道菌的阳性杆菌及独立分离的双歧杆菌生长, 提示火麻仁中植物甾醇具有促进肠道益生菌生长的作用。

**关键词:** 火麻仁甾醇; 含量测定; 气相色谱法; 人源肠道菌群; 量效关系

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.2.004

## Determination of Fructus Cannabis Phytosterol and Its Dose-response Relationship to Microflora Intestinal

LI Gen-lin<sup>1</sup>, LV Ning, WU Su-hui, LI Han-bing\*, QI Yue-juan

Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

**Abstract:** This paper firstly offered an effective method of determining Fructus Cannabis phytosterol by gas chromatography (GC). The contents of phytosterol of 5 samples were compared. The results showed that the extraction method of sample 2 had high yield, simple and low cost. Through this repeatable method, a more accurate result can be got. Then a study on the dose-response relationship of phytosterol to intestinal microflora was made. The method of Co-incubation with human intestinal microflora and phytosterol extract was used to detect the dose responses of the growth of phytosterol to intestinal microflora. The results were analyzed by SPSS Statistics 19.0. *In vitro* experiment of human intestinal microflora; compared with black control group, as the concentration increased from 0.08516 mg/mL to 0.3407 mg/mL, the number of *E. coli* increased obviously ( $P < 0.01$ ). Fructus Cannabis extract can promote the proportion of human intestinal microflora positive bacilli *in vitro*, and can promote the growth of Bifidobacterium. The results showed that phytosterol in Fructus Cannabis can promote the growth of probiotics.

**Key words:** Cannabis semen phytosterol; content determination; gas chromatography; human intestinal flora; dose-response relationship

火麻仁为桑科植物大麻 *Cannabis sativa* L. 干燥成熟果实。长期以来作为重要的油料作物在我国云南、广西等地广泛种植和使用。同时火麻仁还是重要的药用资源, 具有润肠通便、滋养补虚的功效<sup>[1]</sup>,

为国家批准的药食同源品种<sup>[2]</sup>。据研究报道, 世界五大长寿地区之一, 我国广西巴马瑶族自治县的百岁老人均常年食用火麻仁类食物, 心血管疾病及老年性便秘的发病率极小<sup>[3]</sup>。本课题组前期研究发现火麻仁油及所含植物甾醇具有延长家蚕寿命、抗氧化、调节血脂等药理作用<sup>[4]</sup>。进一步研究发现, 火麻仁药理作用的发挥与其对肠道菌群的调节有着密切关系<sup>[5]</sup>。植物甾醇广泛存在于植物尤其是植

收稿日期: 2017-07-10 接受日期: 2017-09-12

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81473435); 河南中医学院科技创新人才支持计划(2015XCXRC02)

\* 通信作者 E-mail: lhb8899@163.com

物种子中,对人体及动物具有十分重要的作用,在医疗、制药、食品、化工、化妆品和饲料等领域都有广泛的应用,是当前生命科学相关领域研究的热点天然活性成分之一。

近年来发现植物甾醇对人体内肠道菌群也有一定的调节作用<sup>[6]</sup>。据此,笔者所在科研团队认为火麻仁中植物甾醇是火麻仁药理作用发挥的重要物质基础,且与肠道菌群的调节有关。为深入研究火麻仁的药理、药效物质基础,本文在前期研究基础上,进一步优化火麻仁中植物甾醇的提取及纯化工艺,建立了基于气相色谱法的植物甾醇含量测定方法,同时以体外人源肠道菌培养为基础开展了肠道菌培养对火麻仁中甾醇干预的剂量响应实验研究,以探讨火麻仁甾醇的药理活性及可能的作用途径与方式。为深入开发火麻仁的食用及药用价值及新产品开发奠定科学基础。

## 1 材料与仪器

### 1.1 试剂

豆甾醇标准品(批号:150812,四川省维克奇生物科技有限公司)、 $\beta$ -谷甾醇(批号:151107,四川省维克奇生物科技有限公司)、菜油甾醇(批号:150925,四川省维克奇生物科技有限公司);氢氧化钾(天津市风船化学试剂科技有限公司)、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (天津市致远化学试剂有限公司)、正己烷(色谱纯,禹王集团)浓硫酸、浓硝酸(洛阳昊华化学试剂有限公司)、无水乙醇(天津市登科化学试剂有限公司)、乙酸乙酯(天津市大茂化学试剂厂)以上试剂均为分析纯,肉汤培养基(产品编号 HB0384-1)、双歧杆菌琼脂培养基(产品编号 HB0396-1)、琼脂粉(产品编号 01-023)均购于青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。

### 1.2 仪器

7890A 气相色谱仪(Agilent Technologies), HP-5 (30 m  $\times$  0.320 mm, 0.25  $\mu\text{m}$ , Agilent); 厌氧工作站(YQX-II); 全自动显微图像分析系统(NikoN 90i); KJ.45-WZT-3 光电浊度计(北京卓川电子科技有限公司); SW-CJ 超净工作台; HH-4 八孔电热恒温水浴锅(巩义市予华仪器有限责任公司); BS 1500 型电子天平(上海友声衡器有限公司); Easy Well 自动双重纯水器(上海茸研生化仪器厂); GHG-9071A 型电热鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); 多功能粉碎机 150T(铂欧五金厂)等。

### 1.3 药材

火麻仁(产地:甘肃,批号:20151201)样品经河南中医药大学中药鉴定教研室陈随清教授鉴定为桑科植物大麻(*Cannabis sativa* L.)的成熟果实。

## 2 实验方法

### 2.1 气相色谱法测定火麻仁提取物中植物甾醇含量

#### 2.1.1 色谱条件

色谱系统:GC system。检测器:火焰离子化检测器(FID)。色谱柱:HP-5 (30 m  $\times$  0.320 mm, 0.25  $\mu\text{m}$ )。载气:氮气。柱温:250  $^{\circ}\text{C}$ 。FID 和进样口温度:300  $^{\circ}\text{C}$ 。气体流速:氢,空气和氮气分别以 30、350 和 25 mL/min 流动比率混合。进样:自动进样,进样量为 1  $\mu\text{L}$ ,分流比为 5:1。运行时间:30 min

#### 2.1.2 混合标准品的制备及标准曲线的绘制

准确称取豆甾醇标准品 7.68 mg、 $\beta$ -谷甾醇 7.84 mg、菜油甾醇 7.84 mg,用 4 mL 正己烷定容,分别得 1.92、1.96、1.96 mg/mL 的混合标准品溶液,采用 2 倍稀释,得到 5 个浓度的标准品溶液,气相测定。以浓度(mg/mL)为横坐标,峰面积( $\text{pA} \times \text{s}$ )为纵坐标,分别得到三种甾醇的线性方程。

#### 2.1.3 样品的制备

火麻仁样品 1:取火麻仁 50 g,加入氢氧化钾-乙醇溶液 250 mL,打浆后 85  $^{\circ}\text{C}$  回流 2 h,然后加生理盐水,石油醚萃取,蒸干得到提取物 14.7 mg,加入少量正己烷溶解,定容至 1.5 mL,用 0.22  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜过滤至样品瓶中,得到 9.8 mg/mL 的样品液。

火麻仁样品 2:取火麻仁 20 g,加 200 mL 纯水,浸泡 30 min,加热至沸腾煮 30 min,过滤,浓缩至 10 mL,相同的皂化方法进行提取,然后加生理盐水,石油醚萃取,蒸干得到提取物 30 mg,加入少量正己烷溶解,定容至 3 mL,用 0.22  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜过滤至样品瓶中,得 10 mg/mL 的样品液。

火麻仁样品 3:准确称取 3.0 g 自榨火麻仁油,加入氢氧化钾-乙醇溶液 120 mL,85  $^{\circ}\text{C}$  回流 2 h,相同的皂化方法提取,然后加生理盐水,石油醚萃取,蒸干得到提取物 28 mg,加少量正己烷溶解,定容至 3 mL,得 9.33 mg/mL 的样品液。

火麻仁样品 4:取巴马火麻仁 50 g,加入氢氧化钾-乙醇溶液 250 mL,粉碎 80  $^{\circ}\text{C}$  回流 2 h,然后加生理盐水,石油醚萃取,蒸干得到提取物 14 mg,加入

少量正己烷溶解,定容至 1.5 mL,用 0.22  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜过滤至样品瓶中,得到 9.33 mg/mL 的样品液。

火麻仁样品 5:取市场选购的火麻仁油 3 g,加入氢氧化钾-乙醇溶液 120 mL,粉碎 85  $^{\circ}\text{C}$  回流 2 h,然后加生理盐水,石油醚萃取,蒸干得到提取物 14 mg,加入少量正己烷溶解,定容至 1.5 mL,用 0.22  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜过滤至样品瓶中,得到 9.33 mg/mL 的样品液。

#### 2.1.4 方法学考察

精密度实验:准确配制 0.125 mg/mL 的混合标准品 6 份,相同条件下测定其峰面积,计算其植物甾醇的含量并计算 RSD 值。

重复性实验:用同种方法制备 9.8 mg/mL 的火麻仁植物甾醇提取物 6 份,相同条件下测定其峰面积,计算其植物甾醇的含量并计算 RSD 值。

稳定性实验:取 9.8 mg/mL 的火麻仁植物甾醇提取物分别在 0、2、4、6、8、10、12 h 下测定不同时间的峰面积,计算其植物甾醇的含量并计算 RSD 值。

加样回收率实验:取 9.8 mg/mL 的火麻仁植物甾醇提取物分别按照 80%、100%、120% 做加样回收率实验,并计算 RSD 值。

## 2.2 火麻仁植物甾醇的药理活性

### 2.2.1 液体培养

取健康男子清晨第一次排出的新鲜粪便,无菌、厌氧环境下称量 1 g,加入到 100 mL 0.1 M PBS 缓冲液中,混匀得粪便菌悬液(0.1 M PBS 缓冲液:8.00 g NaCl、0.20 g KCl、1.44 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、0.24 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,加入 800 mL 的纯水,用盐酸调 pH = 7.4,加水定容至 1 L,灭菌,保存于室温或 4  $^{\circ}\text{C}$ )。取 30 mg 火麻仁植物甾醇,加热至 68  $^{\circ}\text{C}$ ,放置 30 min 后迅速冷却至 4  $^{\circ}\text{C}$ ,待用。

液体培养基的制备:称取 1.8 g 肉汤培养基,加 100 mL 纯水,灭菌,待用。空白液体培养基:取 1 mL 的无水乙醇,加入 9 mL 的肉汤培养基,混匀。3 mg/mL 含药液体培养基:取灭过菌的植物甾醇,用 1 mL 的无水乙醇溶解(超声),并加入 9 mL 的肉汤培养基,混匀。2 倍稀释依次得到 1.5、0.75、0.375、0.1875、0.09375 mg/mL 的含药肉汤培养基。

设空白组、给药组(3、1.5、0.75、0.375、0.1875、0.09375 mg/mL),每组三个平行,各培养管中加入 200  $\mu\text{L}$  菌悬液,在无氧厌氧培养箱中培养 48 h。

### 2.2.2 固体培养

取 10.8 g 的肉汤培养基,10 g 的琼脂粉,加入 600 mL 纯水,灭菌。在超净台中将培养基倒入培养皿中,凝固。将液体培养好的菌液加入固体培养基,涂板。分别为空白组、含药组(3、1.5、0.75、0.375、0.1875、0.09375 mg/mL),每组三个平行。在厌氧培养箱中培养 24 h,待用。

### 2.2.3 革兰氏染色

在固体培养基上滴加 2 滴无菌水,用灭过菌的接种环将表面的菌混匀。菌液涂片时不可过厚,干燥、固定。最后进行染色,包括初染、媒染、脱色、复染四个步骤:(1)结晶紫,1 min,冲洗干净。(2)加碘液,1 min,冲洗干净。(3)95% 酒精,根据涂片的厚度,脱色 20 ~ 40 s,冲洗干净,吸取多余水分。(4)加番红,1 min,冲洗干净。封片,并用油镜观察。

### 2.2.4 火麻仁植物甾醇对双歧杆菌的影响

取 15 mg 火麻仁植物甾醇,溶于 1 mL 无水乙醇中,加入 9 mL 生理盐水,得到 1.5 mg/mL 药液,2 倍稀释,依次得到 0.75、0.375、0.1875、0.09375 mg/mL 的药液。分别加入菌液浓度为  $6 \times 10^8$  /mL 的双歧杆菌,采用固体培养的方法,无菌厌氧环境下培养 48 h 后取出观察,用固定体积的无菌生理盐水冲洗表面菌落,并用光电浊度仪测定并绘图。

## 3 实验结果

### 3.1 标准曲线

三种甾醇的标准曲线如下:菜油甾醇标准品  $Y = 2149x - 20.867$ ,  $R^2 = 0.9993$  在 0.12 ~ 1.92 mg/mL 范围内,线性关系良好。豆甾醇标准品  $Y = 2046.3X + 0.55$ ,  $R^2 = 0.9999$  在 0.1225 ~ 1.96 mg/mL 范围内,线性关系良好。 $\beta$ -谷甾醇标准品  $Y = 1707.4X + 18.071$ ,  $R^2 = 0.9991$  在 0.1225 ~ 1.96 mg/mL 范围内,线性关系良好(图 1)。

### 3.2 方法学考察

#### 3.2.1 精密度实验

混合标准品 6 份,相同条件下测定其峰面积,计算其植物甾醇的含量并计算 RSD 值。结果表明仪器精密度良好(表 1)。

#### 3.2.2 重复性

取样品 6 份,相同条件下测定其峰面积,计算其植物甾醇的含量并计算 RSD 值。结果表明样品重复性良好(表 2)。

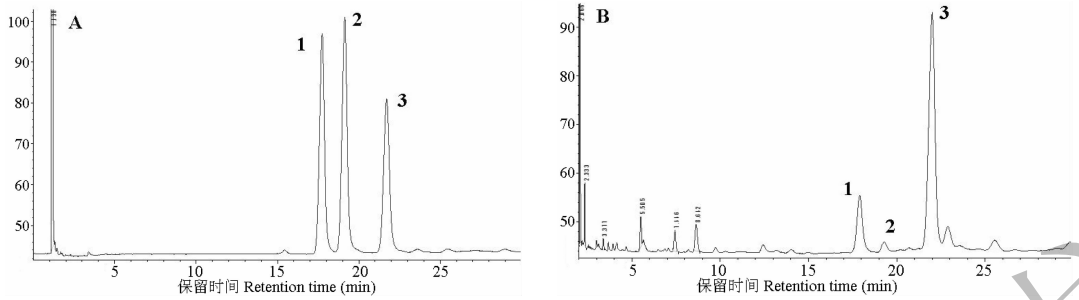


图1 混合标准品图(A)和样品(B)的GC-FID色谱图

Fig. 1 GC-FID chromatogram of mixed standard (A) and sample (B)

注:1. 菜油甾醇 2. 豆甾醇 3.  $\beta$ -谷甾醇Note: 1. campesterol 2. stigmasterol 3.  $\beta$ -sitosterol

表1 三种甾醇的精密度实验

Table 1 Precision experiments of 3 sterols

甾醇 Sterol	峰面积1 Peak area 1	峰面积2 Peak area 2	峰面积3 Peak area 3	峰面积4 Peak area 4	峰面积5 Peak area 5	峰面积6 Peak area 6	RSD (%)
菜油甾醇 Campesterol	442.4	458.1	451.6	446.3	467.5	469.1	2.21
豆甾醇 Stigmasterol	478.9	476.3	468.5	470.1	486.3	460.1	1.76
$\beta$ -谷甾醇 $\beta$ -Sitosterol	424.1	436.9	416.5	427.3	421.9	430.5	1.52

表2 三种甾醇的重复性实验

Table 2 Reproducibility experiments of 3 sterols

甾醇 Sterol	峰面积1 Peak area 1	峰面积2 Peak area 2	峰面积3 Peak area 3	峰面积4 Peak area 4	峰面积5 Peak area 5	峰面积6 Peak area 6	RSD (%)
菜油甾醇 Campesterol	435.20	437.30	423.80	428.60	437.30	437.90	1.34
豆甾醇 Stigmasterol	67.60	66.20	67.90	68.30	69.30	68.00	1.49
$\beta$ -谷甾醇 $\beta$ -Sitosterol	2070.30	2069.80	2035.80	2073.30	2083.90	2095.50	0.97

## 3.2.3 稳定性

三种甾醇在12 h内稳定性良好,峰面积RSD小于2% (表3)。

## 3.2.4 加样回收率

标准品分80%、100%、120%三个浓度,每个浓度3份。结果表明,该方法准确可靠(表4)。

表3 三种甾醇的稳定性试验

Table 3 Stability test of 3 sterols

时间 Time (h)	菜油甾醇峰面积 Campesterol's peak area	豆甾醇峰面积 Stigmasterol's peak area	$\beta$ -甾谷甾醇峰面积 $\beta$ -Sitosterol's peak area
0	436.25	67.05	2085.2
2	440.2	67.6	2070.3
4	437.9	68	2095.5
6	450.1	65.1	2088.2
8	445.1	67.8	2076.9
10	433.88	65.4	2069.4
12	436.3	66.1	2075.2
RSD (%)	1.3	1.78	0.47

表4 三种甾醇的加样回收率

Table 4 Three samples of sterol recovery test

甾醇 Sterol	样品中含量 Content in sample (mg)	加入标准品含量 Added amount (mg)	测得质量 Measured quality (mg)	加样回收率 Average recovery (%)	RSD (%)
菜油甾醇 Campesterol	0.2127	0.1702	0.3816	99.22	3.17
	0.2127	0.2127	0.4304	102.35	
	0.2127	0.2553	0.4825	105.71	
豆甾醇 Stigmasterol	0.0305	0.0244	0.0546	98.50	1.65
	0.0305	0.0305	0.0609	99.28	
	0.0305	0.0367	0.0678	101.67	
$\beta$ -谷甾醇 $\beta$ -Sitosterol	1.3489	1.0791	2.4263	99.84	2.93
	1.3489	1.3489	2.6899	99.41	
	1.3489	1.6187	3.0446	104.75	

### 3.3 样品含量

经测定,样品1植物甾醇含量约为16%,得率为0.294 mg/g。样品2植物甾醇的含量为45.42%,得率为1.5 mg/g。样品3植物甾醇含量为46.76%,得率为1.4 mg/g。样品4植物甾醇含量约为17.98%,得率为0.28 mg/g。样品5植物甾醇含

量19.17%(表5)。可见,样品2、样品3中植物甾醇纯度、得率均较高,二者差异不大,但样品2的制备方法简单、成本低,故本文采用样品2的制备方法(即:火麻仁水煎液样品)提取的甾醇用于体外实验(图1)。

表5 不同样品中三种甾醇所占比例及甾醇总比例

Table 5 The proportion of 3 sterols in different samples and the total proportion of sterols

甾醇 Sterol	样品1 Sample 1 (%)	样品2 Sample 2 (%)	样品3 Sample 3 (%)	样品4 Sample 4 (%)	样品5 Sample 5 (%)
菜油甾醇 Campesterol	2.17	6.78	8.77	2.93	3.4
豆甾醇 Stigmasterol	0.31	0.72	0.66	0	0.38
$\beta$ -谷甾醇 $\beta$ -Sitosterol	13.76	37.92	37.33	15.06	15.39
总含量 Total content	16.25	45.42	46.76	17.98	19.17

### 3.4 体外实验

#### 3.4.1 固体培养结果

从平板固体培养结果可知(图2):与空白组相比,1.3626 mg/mL组可明显看出菌落变少;0.08516 ~ 0.3407 mg/mL内,菌落明显增加,特别是0.1703 mg/mL和0.3407 mg/mL菌落几乎铺盖了整个培养皿。

#### 3.4.2 革兰氏染色结果

镜检结果(图3):采用革兰氏染色方法镜检,观察肠道菌群的变化。与空白组相比,1.3626 mg/mL含药组杆菌数量明显下降,在0.08516 ~ 0.3407 mg/mL时,革兰阳性杆菌的数量随着浓度的增加而增多。对镜检结果进行分析处理,处理结果如表6。

单因素方差分析结果(表6):与空白组相比,1.3626 mg/mL组杆菌/革兰氏阳性菌数量明显下降( $P < 0.01$ ),0.08516 ~ 0.3407 mg/mL组杆菌/革兰氏阳性菌有增多趋势( $P < 0.01$ )。而0.6813 mg/mL和0.04258 mg/mL组并没有明显差异。

对0.08516 ~ 0.3407 mg/mL组进行皮尔逊相关性分析,结果显示:在0.08516 ~ 0.3407 mg/mL范围内,浓度和杆菌、阳性菌、阳性杆菌数量呈高度相关( $P < 0.01, r > 0.99$ )。

#### 3.4.3 火麻仁植物甾醇对双歧杆菌数量的影响结果

与空白组相比,1.3626 mg/mL组的双歧杆菌MCF明显下降,0.08516 ~ 0.3407 mg/mL组的双歧

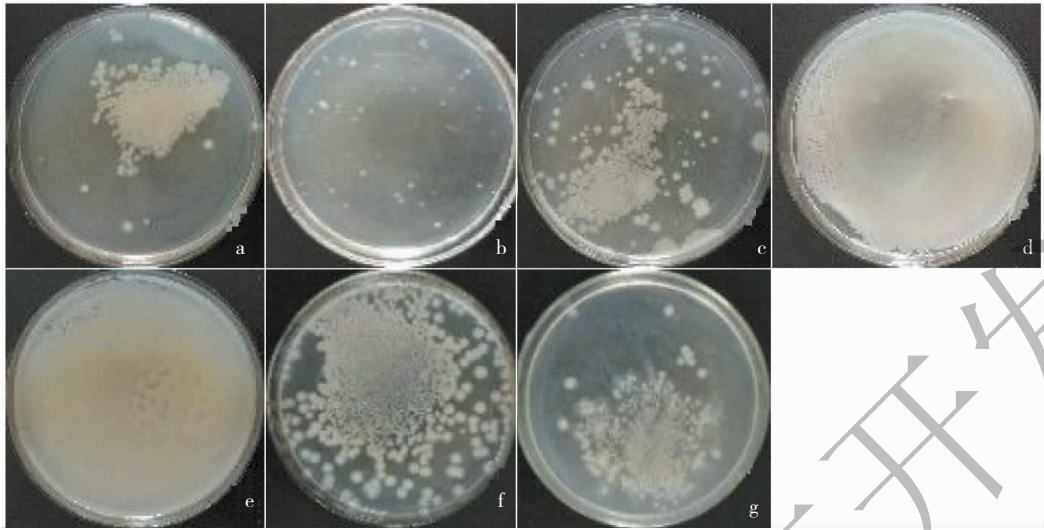


图2 不同浓度火麻仁甾醇对人源肠道菌作用的固体培养结果

Fig. 2 The results of solid culture of different concentrations of Fructus Cannabis sterol extract on human intestinal microflora

注: a 为空白组, b-g 为给药组, 浓度分别为 1.3626, 0.6813, 0.3407, 0.1703, 0.08516, 0.04258 mg/mL

Note: a: blank control group, b-g: administration groups, concentrations were 1.3626, 0.6813, 0.3407, 0.1703, 0.08516 mg/mL and 0.04258 mg/mL, respectively

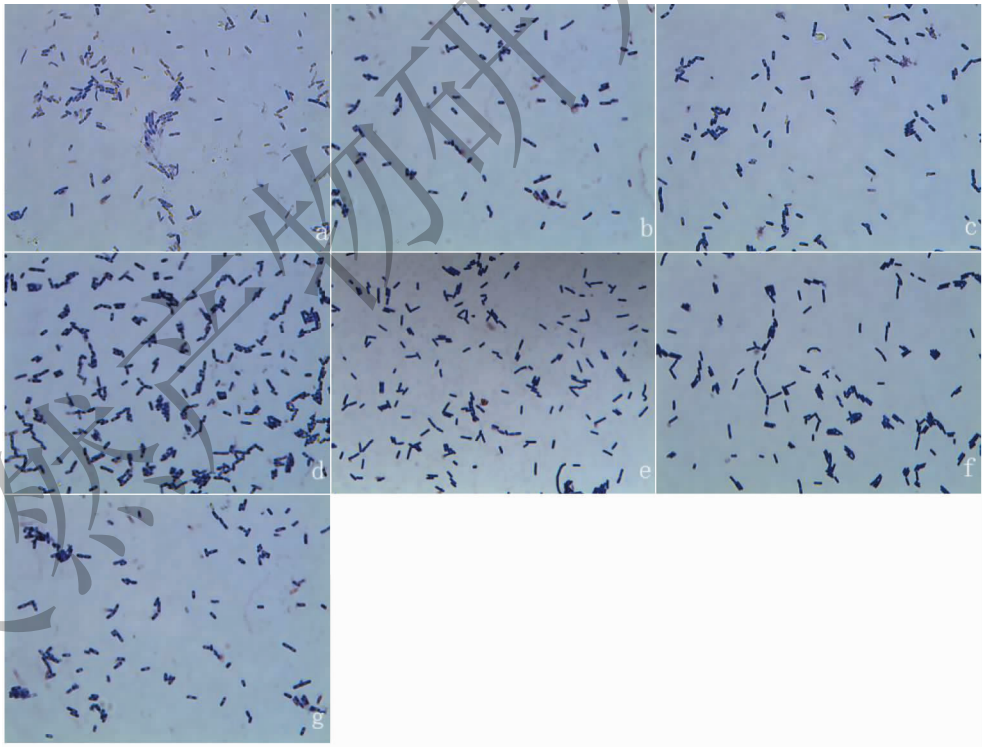


图3 不同浓度火麻仁甾醇对人源肠道菌作用的革兰氏染色结果(1000×)

Fig. 3 The results of Gram stain of different concentrations of Fructus Cannabis sterol extract on human intestinal microflora (1000 ×)

注: a 为空白组, b-g 为给药组, 浓度分别为 1.3626, 0.6813, 0.3407, 0.1703, 0.08516, 0.04258 mg/mL

Note: a: blank control group, b-g: administration groups, concentrations were 1.3626, 0.6813, 0.3407, 0.1703, 0.08516 mg/mL and 0.04258 mg/mL, respectively

表6 SPSS 分析镜检结果

Table 6 Analysis of the Gram staining results using SPSS

组别 Group	杆菌 Bacilli	球菌 Cocci	阳性菌 Positive bacteria	阴性菌 Negative bacteria
空白组 Blank	159.8 ± 6.5	2.5 ± 1.3	156.5 ± 4.9	5.8 ± 4.6
1.3626mg/mL	92.0 ± 11.2 * *	1.8 ± 1.5	93.3 ± 12.1 * *	1.8 ± 2.8
0.6813mg/mL	160.0 ± 12.8	1.0 ± 1.4	156.8 ± 17.1	4.2 ± 4.9
0.3407mg/mL	408.0 ± 7.4 * *	4.5 ± 0.6	404.8 ± 8 * *	7.0 ± 2.1
0.1703mg/mL	257.0 ± 15.2 * *	2.8 ± 1.0	259.2 ± 15.8 * *	0.5 ± 0.5
0.08516mg/mL	197.8 ± 8.8 * *	3.0 ± 2.4	199.8 ± 10.2 * *	1.0 ± 0.8
0.04258mg/mL	135.3 ± 8.0	1.3 ± 0.6	132.0 ± 8.5	4.7 ± 1.2

注:与空白组比较: \*  $P < 0.05$ , \* \*  $P < 0.01$ 。

Note: Compare with blank control, \*  $P < 0.05$ , \* \*  $P < 0.01$ .

杆菌 MCF 值随着浓度升高而增大 ( $r > 0.99$ )。而 0.6813 mg/mL 和 0.04258 mg/mL 组并没有明显差异(图 4)。

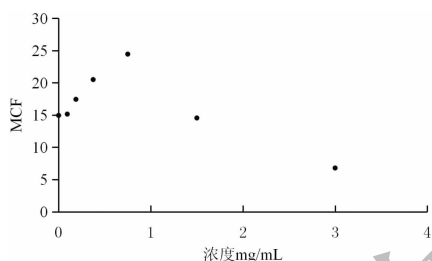


图4 光电浊度法测不同药物浓度下的浊度

Fig. 4 Turbidity under different drug concentrations measured by photoelectric turbidity method

## 4 讨论

植物甾醇是一类广泛存在于植物尤其是植物种子中的天然活性物质,具有抗氧化、清除自由基、延缓衰老、抗炎、降血脂、防治前列腺疾病、调节肠道菌群等生物活性<sup>[6]</sup>。一直以来是医药食品等行业关注的热点。目前,植物甾醇的检测方法主要有紫外分光光度法、液相色谱法、薄层色谱法、气相色谱法、气质联用法<sup>[7-11]</sup>等,植物甾醇化学结构极其相似(见图 7),很多方法无法对多组分的植物甾醇进行准确的分析测定,课题组前期研究表明火麻仁提取物及火麻仁油中含有植物甾醇类成分,并通过紫外分光光度法进行了含量检测,而本实验主要采用气相色谱法对火麻仁提取物中的植物甾醇进行检测,可以使植物甾醇中各组分得以分离,尤其是化学结构和极性都极其相似的菜油甾醇和豆甾醇。本文所建立

的方法方便快捷、安全可靠、重现性好,适合火麻仁提取物中植物甾醇的测定。

虽有报道表明甾醇具有调节肠道菌群的作用<sup>[6]</sup>,但相关研究尚不够深入,大多侧重于植物甾醇在体外对有害菌抑制作用的研究<sup>[12,13]</sup>,关于植物甾醇对肠道菌中的益生菌作用的研究尚不多见。研究表明肠道内各菌群按照一定的比例组合,相互制约、依存,形成一种生态平衡,对于维持机体健康意义重大,肠道菌群结构失调与肥胖、糖尿病等疾病的产生有着重要的关联<sup>[14,15]</sup>。因此清除有害菌或扶植益生菌均是维持肠道菌群平衡的重要手段。肠道菌群培养法是研究药物在体外代谢的主要方法之一<sup>[16]</sup>,该方法用于药物与肠道菌相互作用研究具有重复性好、简单快捷、利于观察等优势,人源肠道菌体外培养实验不仅可以模拟人体内肠道复杂的环境,而且可以最大程度上还原药物与肠道菌在体内的作用结果,应用日益广泛。本文重点研究了火麻仁甾醇对人源肠道菌群的整体调节作用及对益生菌的影响,研究发现肠道菌群对火麻仁甾醇干预的剂量响应明显,量效关系显著,本结果表明火麻仁植物甾醇具有调节肠道菌群的作用,植物甾醇是火麻仁重要的药效物质基础。本研究采用革兰氏染色判断肠道内球杆菌比值,可以简单快捷地确定肠道微生物的情况。临床研究显示正常人肠道球杆菌的比值大约为 1:10,一旦球杆菌比值增大时,肠道会出现一系列不良反应,如腹泻等<sup>[17,18]</sup>,而给予火麻仁甾醇提取物后,可减小球杆菌的比值。实验结果表明,火麻仁所含植物甾醇类成分能够促进肠道内双歧杆菌等益生菌的增值,而双歧杆菌一方面可以有效地抑制腐败菌的生长,另一方面可通过产生有机酸降

低 pH 进而改善肠道微环境,因此推测火麻仁甾醇对肠道菌群的调节作用是火麻仁发挥润下、补益等传统功效的有效途径。

### 参考文献

- 1 Yan XL(闫晓丽). Chemical constituents of hemp seed and their biological activities[D]. Shandong: Shandong University, 2016.
- 2 Wei F(韦凤), Tu DP(涂冬萍), Wang LP(王柳萍). Progress in the development of eating hemp seed and pharmacological effects[J]. *Chin J Gerontol* (中国老年学杂志), 2015, 35:3486-3488.
- 3 Wang F(王芳). Chinese centenarians gut Microbiota and its correlation with high-fiber diet[D]. Guangxi: Guangxi University, 2015.
- 4 Li GL(李根林), Cao YR(曹亚蕊), Wu SH(吴宿慧), et al. Influence of semen cannabis oil on lipid levels, inflammatory cytokines and anti-oxidant of aging model mice[J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2015, 31:109-111.
- 5 Li HB(李寒冰), Sun JY(孙静雅), Ma YJ(马永洁), et al. Observation of influence of Semen Cannabis oil and sterol on Bombyx Mori Linnaeus Life-span[J]. *J Chin Med* (中医学报), 2012, 27:1145-1147.
- 6 Zuo CS(左春山), Liu DY(刘大勇), Xu QJ(徐启杰), et al. Advances in the structure and function of phytosterols[J]. *J Henan Sci Technol* (河南科技), 2013, 17:211-213.
- 7 Zhao W(赵伟), Han JM(韩敬美), Liu CB(刘春波), et al. Research progress in analytical methods of phytosterols[J]. *Instru Anal* (分析仪器), 2012, 4:6-11.
- 8 Yang H(杨虹), Jiang YR(姜元荣), Wei TT(魏婷婷), et al. Optimizing analysis method for determination of phytosterols in edible oils[J]. *J Chin Cereals Oils Assoc* (中国粮油学报), 2011, 26:120-123.
- 9 Fibigr J, Šatínský D, Solich P. A UHPLC method for the rapid separation and quantification of phytosterols using tandem UV/Charged aerosol detection-A comparison of both detection techniques[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, 140:274-280.
- 10 Huang SL(黄舒丽). Determination of phytosterols in wheat germ oil soft capsules by capillary gas chromatography[J]. *Guide China Med* (中国医药指南), 2011, 9(14):206-207.
- 11 Xue F(薛芳), Dai Y(戴亚), Li DL(李东亮), et al. Determination of phytosterols in tobacco by gas chromatography/mass spectroscopy[J]. *Chem Res Appl* (化学研究与应用), 2012, 4:617-620.
- 12 Wu HC(吴海成). Extraction purification and antimicrobial activity of phytosterol from corn silk[D]. Changchun: Jilin University(吉林大学), PhD, 2013.
- 13 Mao CJ(毛春季). Rice bran sterol antibacterial activity *in vitro* and enhancement of immunity research[D]. Changsha: Hunan Agricultural University (湖南农业大学), PhD, 2012.
- 14 Wu YT(吴英韬), Yuan JL(袁杰利). Research advances in assessment system of human intestinal microecological environment[J]. *Parenter Enteral Nutr* (肠外与肠内营养), 2013, 20:169-173.
- 15 Wang YF(王轶菲). Effect of corn oil-derived sterols on regulating cholesterol metabolism and intestinal microbiota in high fat-high cholesterol diet fed hamsters[D]. Tianjin: Tianjin University of Science (天津科技大学), 2016.
- 16 Men W(门薇), Chen Y(陈颖), Yang Q(杨庆), et al. Study on metabolism of *Coptis chinensis* alkaloids from different compatibility of Wuji Wan in human intestinal flora[J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2013, 38:417-421.
- 17 Xu Q(徐前). Relationship between intestinal microflora and pediatric antibiotic-associated diarrhea [J]. *Tianjin Pharm* (天津药学), 2012, 24(4):65-69.
- 18 Pu Y(浦越), Ma S(马爽), Du XC(顾笑春), et al. Clinical significance of fecal smear in the diagnosis of intestinal flora in children with diarrhea[J]. *Chin J Clin Res* (中国临床研究), 2017, 30:102-104.