

## 文冠果种仁油中总甾醇的皂化法提取及组成分析

赵茜茜, 刘俊义, 王珂, 邓红\*, 张志宇

陕西师范大学食品工程与营养科学学院, 西安 710062

**摘要:** 本文研究了皂化法提取文冠果种仁油中甾醇化合物的工艺条件, 并在纯化的基础上利用气相色谱-质谱仪分析了提取物的基本组成。首先通过单因素试验和正交试验探讨了乙酸乙酯用量、皂化温度、料液比、皂化时间对甾醇化合物含量的影响; 结果表明: 乙酸乙酯用量 200 mL, 皂化温度 67 °C, 料液比 1:5 (g/mL), 皂化时间 2 h, 在此条件下文冠果种仁中总甾醇含量达 0.498%。粗甾醇采用溶剂结晶法进行纯化后的气质联用分析结果显示, 文冠果种仁油中总甾醇中主要含有 5 种单体, 分别是豆甾醇、豆甾-7, 22-二烯-3-醇、麦角甾-7, 22-二烯-3-酮、 $\beta$ -谷甾醇、33-降柳珊瑚甾-5, 24(28)-二烯-3-醇。该研究结果为进一步探讨文冠果种仁甾醇的功能奠定了基础。

**关键词:** 文冠果种仁油; 总甾醇; 皂化; 提取; 分析

中图分类号: TQ645

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.10.010

## Extraction and Identification of Total Sterol from Seed Kernel Oil of *Xanthoceras sorbifolia* bunge

ZHAO Xi-xi, LIU Jun-yi, WANG Ke, DENG Hong\*, ZHANG Zhi-yu

College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

**Abstract:** In this study, the extraction process of total sterol from seed kernel oil of *Xanthoceras sorbifolia* bunge were studied using saponification method. The chemical components of extract were analyzed using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) after purification. Through single factor and orthogonal experiments, the effects of saponification time and temperature, liquid/solid ratio, ethyl acetate dosage on the total sterol content were investigated. The results showed the optimal extraction conditions of sterol were as follows: ethyl acetate dosage of 200 mL, solid-liquid ratio of 1:5 (g/mL), saponification temperature of 67 °C for 120 min. Using these conditions, the total content of sterol got the highest ratio of 0.498%. After purification of coarse sterol with solvent crystallization method, the GC-MS analysis showed that five monomers were detected in total sterol, namely stigmast-5, 12-dien-3-ol, stigmasta-7, 22-dien-3-ol, ergosta-7, 22-dien-3-one,  $\beta$ -sitosterol and 33-norgorgosta-5, 24(28)-dien-3-ol. This result will provide the basis for the further studying the function of seed kernel sterol of *X. sorbifolia*.

**Key words:** seed kernel oil of *Xanthoceras sorbifolia* bunge; total sterol; saponification; extraction; analysis

文冠果 (*Xanthoceras sorbifolia* bunge) 又名文灯果, 为无患子科文冠果属木本植物, 在我国北方地区尤其西北地区分布广泛<sup>[1,2]</sup>。文冠果种仁既可食用, 也可榨油, 其种仁含油率高达 55% ~ 65%, 是我国特有的油料树种<sup>[3]</sup>。

近年的研究<sup>[4,5]</sup>表明, 文冠果的果实、根茎等部位均含有大量的生物活性的成分, 主要是甾醇、皂苷、植物碱等, 这些活性成分经提取纯化后, 可应用

于抗炎、改善记忆、防治心血管疾病、抗肿瘤、抗氧化、延缓衰老等多种药物中, 具有非常好的应用前景和实用价值。

甾醇是一类主要存在于动植物及菌类细胞与组织中的结构复杂的生物活性成分, 按其来源则可分为动物甾醇、植物甾醇和菌类甾醇三类<sup>[6]</sup>。植物甾醇广泛存在于植物的细胞组织中, 尤其在各种坚果和植物种子中含量较多, 其中谷甾醇、豆甾醇和菜油甾醇等比较常见。植物甾醇结构与动物胆甾醇的结构十分相似, 具有免疫调节、消炎退热、抗氧化、降血脂、清除自由基及延缓衰老等多种生理功效, 在医药、食品和化妆品及饲料等行业中得到了广泛的应

收稿日期: 2015-05-12 接受日期: 2015-08-26

基金项目: 陕西省自然科学基金(2013JM4036); 农业部产业体系项目(CARS-28)

\* 通讯作者 Tel: 86-29-85310517; E-mail: hongden@snnu.edu.cn

用<sup>[7-9]</sup>。

现有文献<sup>[10,11]</sup>中关于植物甾醇的研究大多数都是针对玉米、菜籽及豆油下脚料等方面,对文冠果种仁甾醇的相关研究非常少见,除了本课题组做的文冠果甾醇提取及抑菌效果的初步试验外<sup>[12]</sup>,对文冠果种仁油中甾醇的种类、单体含量以及功效都不甚清楚。

本课题为提高提取效率,在实验室前期工作的基础上优选了萃取溶剂,以豆甾醇为标准品,通过单因素和正交试验考查了皂化法提取文冠果种仁油中甾醇的主要影响因素,探讨最佳工艺条件;进而用溶剂结晶法对甾醇粗提物进行精制,利用气相色谱仪分析了精制前后甾醇含量的变化;最终通过气相色谱-质谱联用(GC-MS)检测确定了文冠果种仁油中甾醇的种类及结构,为进一步探讨文冠果种仁甾醇的生物活性及抑菌效果量效与构效关系等打下基础。

## 1 材料与仪器

### 1.1 试验材料与试剂

原材料:文冠果种子(即文冠果籽,本校生科院种质资源专家已鉴定),购于陕西省杨凌金山农业科技有限公司,该公司专业进行文冠果育种育苗工作。

试剂:石油醚、乙醇、乙酸乙酯、三氯甲烷、氢氧化钾等均为分析纯,购于西安森博化学仪器供应站。胆固醇为分析纯,购于国药集团化学试剂有限公司。菜籽甾醇、菜油甾醇、豆甾醇、 $\beta$ -谷甾醇(标准品)均为色谱纯,购于Sigma公司。

### 1.2 主要仪器与试验设备

JA2003型电子天平,上海精科天平有限公司;2010 Ultra型气质联用仪——单四极杆,日本岛津;KQ-200KDE型高功率数显超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;722型紫外可见分光光度计,上海市光谱仪器有限公司;RE-52AA型旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;SHB-III型循环水式多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司。

## 2 实验方法

### 2.1 总甾醇的提取及其含量分析

#### 2.1.1 文冠果种仁油中总甾醇的皂化法提取步骤

将文冠果籽人工破壳,取种仁粉碎;用石油醚按1:10(g/mL)的料液比,在60℃下加热回流提取油脂3次,提取液真空抽滤后,得到文冠果种仁油。每

次称取一定量文冠果种仁油于圆底烧瓶中,加入KOH-乙醇溶液,水浴上回流加热120 min;取下圆底烧瓶加蒸馏水稀释,冷却备用。取200 mL皂化液,后移入分液漏斗,加入适量的乙酸乙酯萃取,缓慢振动几分钟静置分层,去掉乙酸乙酯不溶物,连续萃取3~4次,合并乙酸乙酯萃取液,置于旋转蒸发仪上减压蒸馏浓缩提取物,回收所有乙酸乙酯。

#### 2.1.2 总甾醇的测定

以豆甾醇为标准品,采用分光光度法测定提取液中总甾醇的含量。

##### 2.1.2.1 标准曲线的绘制

标准豆甾醇溶液的配制:精密称取豆甾醇标准品20 mg溶于20 mL三氯甲烷中,不溶时超声数秒促其溶解,摇匀,即得1.0 mg/mL豆甾醇标准溶液,于棕色瓶中低温保存备用。

显色剂的配制:将1 mL浓硫酸沿壁缓慢加入到20 mL乙酸酐溶液中,摇匀,冷却备用。

用移液管精密移取0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL豆甾醇标准溶液于6个5 mL具塞比色管中,分别加入酸试剂2.0 mL,以CHCl<sub>3</sub>定容,摇匀,超声分散1 min,静置10 min后,以试剂空白为参比在675 nm处测量吸光度,每个点重复3次。以各试管豆甾醇质量浓度为横坐标,以吸光度为纵坐标,绘制标准曲线该曲线的回归方程为 $y = 5.3396x + 0.0231$ ,相关系数 $R^2 = 0.9948$ ,说明曲线回归性很好,可进行定量分析。

##### 2.1.2.2 样品液中总甾醇的测定

按同样的方法处理不同条件下的皂化提取液1 mL于5 mL具塞试管中,加入酸试剂2 mL,用三氯甲烷定容至刻度,超声分散1 min,静置10 min,于675 nm处测定其吸光度A,在标准曲线中查出相应的总甾醇质量浓度,以考察各因素对甾醇含量的影响。

### 2.2 总甾醇的皂化法提取试验设计

根据相关文献<sup>[13,14]</sup>和预试验结果,根据2.1.1的方法,以文冠果种仁油中总甾醇含量为试验目标,分别在不同的皂化时间(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h)、溶剂用量(100、150、200、250、300 mL)、皂化温度(62、67、72、77、82℃)、料液比[1:2、1:3、1:4、1:5、1:6(mL/g oil)]下进行单因素试验以考察各因素对总甾醇含量的影响;在单因素试验的基础上采用L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交实验确定最佳提取工艺条件,正交实验的因素水平表见表1。

表 1  $L_9(3^4)$  正交试验因素水平表

Table 1 Levels and factors of orthogonal test

水平 Level	因素 Factor			
	A 料液比 Solid to liquid ratio (mL/g oil)	B 时间 Time (h)	C 温度 Temperature (°C)	D 溶剂用量 Solvent quantity (mL)
1	1:3	1.5	62	150
2	1:4	2.0	67	200
3	1:5	2.5	72	250

### 2.3 文冠果种仁油中粗甾醇的纯化

采用重结晶法<sup>[15]</sup>进行纯化:将实验获得的甾醇粗提物溶于 60 °C 的无水乙醇中,充分溶解,自然降温至室温后于 0 °C 降温结晶 12 ~ 18 h;快速过滤得滤渣,并用一定量的乙醇冲洗滤渣表面,将所得滤渣干燥即可得到较纯的甾醇样品。将较纯化的甾醇样品再溶于 60 °C 的正己烷中并充分溶解,自然降温至室温后于 0 °C 降温结晶 12 ~ 18 h。快速过滤得滤渣,并用一定量的正己烷冲洗滤渣表面,将所得滤渣干燥即可得到纯化的甾醇物质。

经多次试验确定了较好的纯化条件:料液比为 1:5 (g/mL),结晶温度 60 °C,结晶时间 12 h。

### 2.4 文冠果种仁总甾醇的纯度及其组成分析

#### 2.4.1 甾醇的定性与定量分析

采用 GC-FID 法对皂化提取物-甾醇进行定性与定量分析,分析仪器为日本岛津气相色谱仪 GC-2010,色谱柱 DB-1TH (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)。检测条件:载气为高纯氮气;总流量为 35 mL/min,分流比 30;柱流量为 0.89 mL/min;进样口和 FID 检测器温度都设定为 300 °C;柱温 270 °C。以胆固醇为内标物计算其甾醇的纯度。

##### 2.4.1.1 甾醇的定性分析<sup>[16]</sup>

利用已知物(胆固醇、菜籽甾醇、菜油甾醇、豆甾醇、β-谷甾醇)直接对照法进行定性,即将未知物和已知标准物在同一根色谱柱上,使用相同的色谱操作条件进行分析,作出色谱图后进行对照比较,根据保留时间进行定性。

##### 2.4.1.2 甾醇的定量分析

采用胆固醇作为内标物,对样品中的植物甾醇组分进行定量分析<sup>[17]</sup>。

(a) 校正系数  $f_1$  的计算

$$f_1 = \frac{A_{内} \times m_{标} \times P_{标} / 10}{A_{标} \times C_{内} \times P_{内}}$$

式中: $f_1$ —校正系数, $A_{内}$ —内标峰峰面积, $A_{标}$ —

标准品峰峰面积, $C_{内}$ —内标溶液内标物浓度,单位为毫克每毫升(mg/mL), $m_{标}$ —配制标准品溶液时豆甾醇标准品的取用量,单位为毫克(mg), $P_{内}$ —内标胆固醇的纯度, $P_{标}$ —标准品豆甾醇的纯度。

(b) 甾醇样品中游离甾醇酯的含量

$$P_{游离甾醇} = f_1 \times \frac{10 \times C_{内} \times P_{内} \times A_{甾醇酯1}}{A_{内} \times m_{甾醇酯1}} \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中: $A_{甾醇酯1}$ —待测甾醇酯样品中植物甾醇峰峰面积之和, $m_{甾醇酯1}$ —配制待测溶液 C 时甾醇酯的取用量,单位为毫克(mg); $P_{游离甾醇}$ —甾醇酯样品中游离甾醇酯的含量(%)。

#### 2.4.2 总甾醇的组成及其结构分析

气相色谱条件:毛细管色谱柱:Rxi-SSLMS-1 (30 m × 250 μm, 0.25 μm);进样口温度 300 °C;载气为高纯度氦气,载气流速 0.86 mL/min;分流比 30,进样量 1.0 μL。

质谱条件:电子轰击离子源(EI);电子能量 70 eV;离子源温度 220 °C;接口温度 300 °C;全扫描方式。

## 3 结果与讨论

### 3.1 文冠果种仁油中总甾醇的皂化法提取的单因素试验结果

皂化时间、萃取溶剂用量、料液比、皂化温度对文冠果种仁中总甾醇提取率的影响分别见图 1(A ~ D)。

由图 1 可以看出,甾醇提取率随着皂化时间、文冠果种仁油和 KOH-乙醇的料液比、温度的增加都呈现先增大后减小的趋势,而乙酸乙酯用量越大提取率越高;但综合考虑提取率、成本、对环境的污染等各种因素,选择皂化时间 1.5、2、2.5 h,萃取溶剂用量 150、200、250 mL,料液比 1:3、1:4、1:5 g/mL、皂化温度 67、72、77 °C 再进行正交实验。

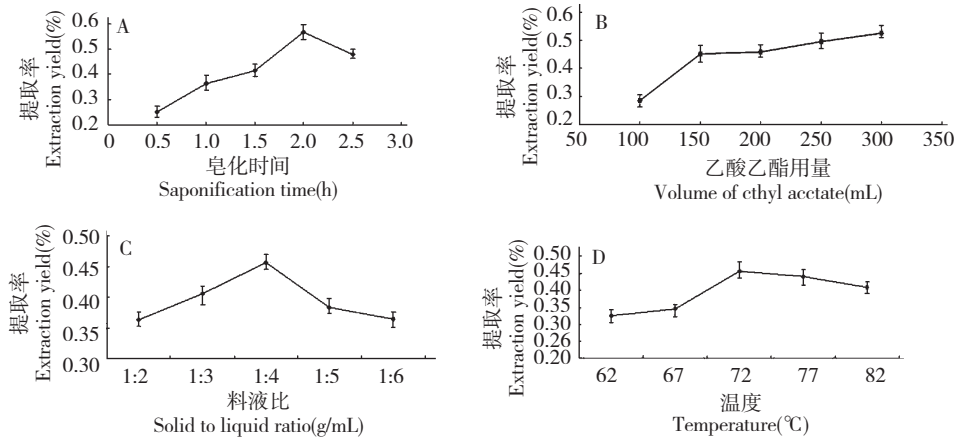


图1 皂化时间(A)、乙酸乙酯用量(B)、料液比(C)及皂化温度(D)对提取液中甾醇含量的影响

Fig. 1 The effect of saponification time (A), volume of ethyl acetate (B), solid to liquid ratio (C) and saponification temperature (D) on the extraction yield of sterol

### 3.2 皂化法提取总甾醇的正交实验结果

在单因素试验的基础上,以皂化时间、溶剂用量、皂化温度、料液比的选择对甾醇提取率的影响,采用  $L_9(3^4)$  正交实验对提取条件进行优化,试验结果与级差分析如下表2所示,方差分析见表3。

由  $L_9(3^4)$  正交试验结果的极差分析可得:影响提取文冠果总皂苷含量的因素依次为乙酸乙酯用量(D) > 皂化时间(B) > 料液比(A) > 提取温度(C)。极差分析确定的最佳皂化提取条件为:  $A_3B_2C_2D_2$ , 即料液比为 1:5 (g/mL)、皂化时间为 2 h、皂化温度

为 72 °C, 乙酸乙酯用量为 200 mL; 此条件不在上述正交表里, 进行验证实验, 可知最佳皂化提取条件下文冠果总皂苷含量为 0.498%。

根据方差分析结果可知, 四个因素的作用均高度显著, 各因素对实验指标影响的主次顺序为乙酸乙酯用量(D) > 皂化时间(B) > 料液比(A) > 提取温度(C), 这与极差分析结果一致。

### 3.3 气相色谱分析结果

#### 3.3.1 甾醇的定性分析

用各甾醇标准品, 在 2.4.1 拟定的色谱条件下

表2 总甾醇提取条件正交试验结果与级差分析

Table 2 The results and range analysis of orthogonal test for the extraction of total sterols

实验序号 No.	因素 Factor				甾醇含量 Sterol content (%)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	0.222
2	1	2	2	2	0.481
3	1	3	3	3	0.335
4	2	1	2	3	0.311
5	2	2	3	1	0.288
6	2	3	1	2	0.303
7	3	1	3	2	0.404
8	3	2	1	3	0.403
9	3	3	2	1	0.318
k1	0.346	0.312	0.309	0.276	
k2	0.301	0.391	0.370	0.396	
k3	0.375	0.319	0.342	0.350	
R	0.070	0.071	0.055	0.108	

表3 总甾醇提取条件正交试验的方差分析结果

Table 3 ANOVA of orthogonal test results for the extraction of sterol

因素 Factor	偏差平方和 Sum of square of deviations	自由度 Freedom	均方 Mean Square	F 值 F value	P 值 P value
A 料液比 Solid to liquid ratio (g/mL)	0.0168	2	0.0084	709.4977	0.0001
B 皂化时间 Saponification time (h)	0.0218	2	0.0109	921.5962	0.0001
C 皂化温度 Saponification temperature (°C)	0.0116	2	0.0058	490.6244	0.0001
D 乙酸乙酯用量 Volume of ethyl acetate (mL)	0.0438	2	0.0219	1851.0610	0.0001
误差 Error	0.0001	9	0.0000		

得到各标准甾醇的色谱图见图 2(A);纯化前后试验所得样品的色谱图见图 2(B)和 2(C)。粗品仅有三个检出峰,纯化之后检测出了粗品未能有效分离

的成分,共有 7 个峰,且响应值大;通过与标准品保留时间值进行对比,确定文冠果种仁油中皂化提取物中含有豆甾醇和  $\beta$ -谷甾醇。

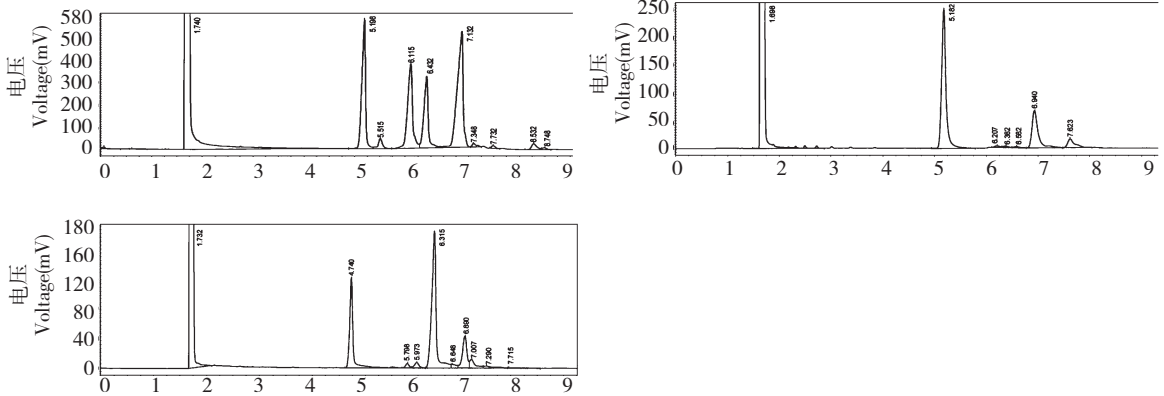


图2 标准品(A)及纯化前(B)、后(C)样品的 GC-FID 色谱图

Fig. 2 GC-FID chromatograms of mixed phytosterol standards (A) and sample before (B), after (C) purification

注:图 2(A)中,从左到右依次为溶剂峰、胆固醇(内标)、菜籽甾醇、菜油甾醇、豆甾醇、 $\beta$ -谷甾醇

Note: as shown in Fig. 2(A), peaks were solvent, cholesterol (internal standard), brassicasterol, campesterol, stigmasterol, stigmasterol-5,12-dien-3-ol and  $\beta$ -sitosterol from left to right

### 3.3.2 甾醇的定量分析

按照 2.4.1 拟定的色谱条件进行检测,并根据公式(1)计算,可得纯化前文冠果种仁油中皂化提取物总甾醇含量为 14%,纯化后总甾醇含量为 55%。甾醇纯度显著提高,说明重结晶技术手段在甾醇的纯化中效果良好。

### 3.4 总甾醇组成的气质联用分析结果

根据 GC-MS 的数据以及文献记载的甾醇的质谱数据,结合 GC-FID 的分析谱,从总离子流中的 7 个峰中最终确认了 5 个峰的分子组成,按照其出峰的顺序分别为:1、豆甾醇(stigmasterol-5,12-dien-3-ol)分子式:  $C_{29}H_{48}O$ ;2、豆甾-7,22-二烯-3-醇(stigmast-7,22-dien-3-ol),分子式:  $C_{29}H_{48}O$ ;3、麦角甾-7,22-二烯-3-酮(ergosta-7,22-dien-3-one),分子式:  $C_{28}H_{44}O$ ;4、 $\beta$ -谷甾醇( $\beta$ -sitosterol),分子式:  $C_{29}H_{50}O$ ;5、33-降

柳珊瑚甾-5,24(28)-二烯-3-醇[33-norgost-5,24(28)-dien-3-ol],分子式:  $C_{29}H_{46}O$ 。

由此可见,文冠果种仁油中的总甾醇主要由以上 5 种单体组成,其功效与结构的关系仍在研究之中;文冠果种仁油中是否存在新的甾醇物质还需要进一步探索。就目前而言,文冠果种仁油中甾醇主要是豆甾醇、麦角甾醇、 $\beta$ -谷甾醇和降柳珊瑚甾醇,其中 C-3 羟基是甾醇的重要活性基团,C-3 位羟基决定了甾醇多方面的生理活性功能。豆甾醇是合成甾体激素重要前体,可以用来生产黄体酮和孕酮; $\beta$ -谷甾醇具有类似雌激素的作用,可以显著影响动物血浆中睾酮的含量。因此,推测文冠果种仁油中甾醇对防治男性前列腺疾病和乳腺疾病或许有较好作用。

此外,根据文献<sup>[18]</sup>推测降柳珊瑚甾醇是一种多

羟基甾醇结构,它具有一定的细胞毒活性,可能具有一定的抗癌活性。麦角甾醇是一种重要的原维生素D,经紫外光照射能转化成为维生素D<sub>2</sub>,维生素D<sub>2</sub>具有防治软骨病的作用。麦角甾醇对确保细胞膜结构的完整性、膜的流动性、膜结合酶的活性、细胞的活力以及细胞运输物质起着重要的作用。文冠果种仁油中的甾醇包含了这几种甾醇,其是否具有协同增效作用还需要进一步研究。

## 4 结论

本试验确定了文冠果种仁油中总甾醇的皂化法提取最佳条件为:乙酸乙酯用量 200 mL,皂化温度 67 °C,料液比 1:5 g/mL,皂化时间 2 h;在此条件下文冠果种仁油中总甾醇含量达 0.498%。由正交试验结果的极差分析可知,影响提取文冠果总甾醇含量的主要因素依次为料液比(C) > 提取剂浓度(A) > 提取温度(B) > 超声功率(D),该结果与方差分析结果一致。试验确定的纯化条件[料液比 1:5 (g/mL),结晶温度 60 °C,结晶时间 12 h]可将粗甾醇的纯度从 14% 提高到 55%,该方法有效。GC-FID 分析,确定了文冠果种仁油中总甾醇的基本组成,主要由有 5 中单体,分别是豆甾醇、豆甾-7,22-二烯-3-醇、麦角甾-7,22-二烯-3-酮、 $\beta$ -谷甾醇、33-降柳珊瑚甾-5,24(28)-二烯-3-醇。

## 参考文献

- Gao QM (高启明), Hou JT (侯江涛), Li Y (李阳). Cultivated application and developmental prospect of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge. *Forest By-Prod Special China* (中国林副特产), 2005, 75(4): 56-57.
- Gao SM (高述民), Ma K (马凯), Du XH (杜希华), et al. Advances in research on *Xanthoceras sorbifolia*. *Chin Bull Botany* (植物学通报), 2002, 19: 296-301.
- Wang ZJ (汪智军), Zhang DY (张东亚), Gu LJ (古丽江). Types of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge and selecting high-yield and high-quality plants in the species. *Nonwood Forest Res* (经济林研究), 2011, 29: 128-131.
- Cao Y (曹莹), Gu KR (谷克仁), Meng D (孟冬), et al. The advance of extraction methods of phytosterol. *Sci Technol Cereals Oils Foods* (粮油食品科技), 2006, 14(5): 25-28.
- Katan MB, Grundy SM, Jones P, et al. Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clin Proc*, 2003, 78: 965-978.
- Gao AX (高爱新), Wang ZL (王舟莲), Wang JW (王敬文), et al. Research on the extraction of phytosterol in pine pollen by supercritical CO<sub>2</sub> extraction technology. *Food Sci Technol* (食品科技), 2010, 35: 208-210.
- Li ZL, Li X, Zhang P. Research progress in the chemical constituents and pharmacological activities of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge. *J Shenyang Pharm Univ*, 2004, 21: 472-475.
- Cheng WM (程文明), Yang BZ (杨柏珍), Li CR (李春如). Two new sterols in the husk of *Xanthoceras sorbifolia*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32: 199-201.
- Wang GS (万国盛), Wang XB (王晓波), Wu LJ (吴立军), et al. Advances in studies on chemical constituents of *Xanthoceras sorbifolia* and their pharmacological activities. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2013, 44: 1842-1852.
- Lv SS (吕双双), Ren TT (任婷婷), Li SG (李书国). Simultaneous extraction of phytosterol and VE from corn germ oil deodorizer distillate. *Food Sci Technol* (食品科技), 2014, 39: 182-186.
- Gao Z (高政). Study on the Extraction, purification and anti-oxidation activity of phytosterol from rapeseed oil. Wuhan: Huazhong Agricultural University (华中农业大学), MSc. 2009.
- Cao LQ (曹立强), Li DD (李丹丹), Deng H (邓红). Study on the extraction and antibacterial properties of phytosterol from the shinyleaf yellowhorn seed oil. *Nat Prod ResDev* (天然产物研究与开发), 2010, 22: 334-338.
- Beerua D, Benjelloun-Mlayah B, Banoub J, et al. AF and unsaponifiable composition of five Amazonina palm kernel oils. *J Am Oil Chem Soc*, 2003, 80: 49-53.
- Jin SM (金世梅), Zhu H (朱惠), Huang J (黄静), et al. Identification of phytoserin and study on its quantification test. *China Food Addit* (中国食品添加剂), 2006, 3: 146-150.
- Liu KY (刘魁英). Food Research and Data Analysis (食品研究与数据分析). Beijing: China Light Industrial Press, 2005. 213-229.
- Liang B (梁博), Guo XH (郭漩华). Spectrophotometry determination of phytosterol content of stems of pitaya. *China J Anal Lab* (分析实验室), 2008, 27: 279-281.
- Miu M (缪妙), Xu JL (徐继林), Yan XJ (严小军), et al. Study of the regular pattern of mass spectrometry of TMS derivatives of sterols. *J Instrum Anal* (分析测试学报), 2008, 27(S1): 59-62.
- Cao X (曹馨). Studies on the chemical constituents and their bioactivities of *Simularia* sp. Qingdao: Ocean University of China (中国海洋大学), MSc. 2012.