

β -谷甾醇标准样品的研制

马玉翠¹, 吴晓毅¹, 王尉², 张贵峰¹, 杜宁²,
王淳¹, 吴翠¹, 巢志茂^{1*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;
2. 北京市理化分析测试中心, 北京 100094)

[摘要] 目的:依据 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》,在国家标准化管理委员会批准立项的基础上,研制 β -谷甾醇标准样品。方法:以白芥子为原料,采用硅胶柱色谱和重结晶技术,纯化获得了 β -谷甾醇样品,采用元素分析,UV,红外光谱(IR),质谱(MS),核磁共振(NMR)和X-射线衍射(XRD)进行了结构鉴定。进行了薄层色谱的鉴别。建立了高效液相色谱蒸发光散射检测分析技术。样品分装成300瓶(10 mg/瓶)后,进行了均匀性检验、稳定性检验和联合定值。结果:该样品在95%的置信区间范围内样品均匀性良好,在0~8℃条件下24个月内稳定性良好,定值测定结果确定其纯度为95.41%,扩展不确定度为0.30%,达到了GB/T 15000.3系列国家标准样品的技术要求,通过了国家标准化管理委员会组织的验收。结论:成功地研制了 β -谷甾醇国家标准样品,该标准样品可用于 β -谷甾醇含量测定、检测方法评定、相关产品的检测与质量控制。

[关键词] β -谷甾醇; 标准样品; 均匀性; 稳定性; 定值; 不确定度

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)16-0090-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017160090

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170526.1106.076.html>

[网络出版时间] 2017-05-26 11:06

Development of Certified Reference Material of β -sitosterol

MA Yu-cui¹, WU Xiao-yi¹, WANG Wei², ZHANG Gui-feng¹, DU Ning²,
WANG Chun¹, WU Cui¹, CHAO Zhi-mao^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700,
China; 2. Beijing Center for Physical and Chemical Analysis, Beijing 100094, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a certified reference material (CRM) of β -sitosterol according to the Directives for CRM General and Statistical Principle for Certification (GB/T 15000.3-2008) based on the CRM project approved by Standardization Administration of the People's Republic of China (SAC). **Method:** β -Sitosterol was obtained from the dried seeds of *Sinapisalba* by means of silica gel column chromatography and recrystallization. The structure of β -sitosterol was confirmed by elemental analysis (EA), UV, IR, MS, NMR and XRD. Thin layer chromatography was carried out for the identification, and after sample of β -sitosterol was divided into 300 bottles with 10 mg per bottle, the homogeneity test, stability test, and cooperative certification were carried out by high performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detector (HPLC-ELSD). **Result:** The homogeneity was good within 95% confidence interval. The stability was good within 24 months storage period at 0-8℃. The certified purity value was 95.41% with an expanded uncertainty of 0.30% ($k=2$). The

[收稿日期] 20161219(002)

[基金项目] 国家质量监督检验检疫总局行业科研专项(201210209);国家标准化委员会国家标准样品研制项目(S2012089)

[第一作者] 马玉翠,在读硕士,从事天然产物国家标准样品的研制,Tel:15901296328,E-mail:872018483@qq.com

[通讯作者] *巢志茂,研究员,博士生导师,从事天然产物国家标准样品的研制,Tel:13522705161,E-mail:chaozhimao@163.com

CRM of β -sitosterol complied with the technical requirement of a series of GB/T 15000. 3 guides about CRM, and it was checked and accepted by SAC. **Conclusion:** The national CRM of β -sitosterol was developed for the first time, which can be used in the content determination, method validation, testing and quality control of related products.

[**Key words**] β -sitosterol; CRM; homogeneity; stability; certification; uncertainty

β -谷甾醇属于植物甾醇,在人参、桃仁、白芍、地骨皮、赤芍、白芥子等多种中药中都含有,具有抗炎、抗癌、抗氧化、滋肤养颜、防治高血压和冠心病等生理功能^[1]。因其具有低毒、较强的抗肿瘤活性,已成为治疗肿瘤的主要药物成分^[2],能明显地抑制人肝癌细胞 SMMC-7721 的增殖作用^[3],抑制宫颈癌细胞的增殖^[4],促进共刺激细胞的增殖,增强对胃癌 SGC-7901 细胞的杀伤活性^[2],抑制人肝癌 HepG2 细胞的生长^[5]。并有抗雄激素和抗炎活性,能抑制前列腺增生^[6],是一种良好的抗氧化剂,有较好的清除自由基的能力^[7],能降低儿童高胆固醇血症患者低密度脂蛋白的含量^[8],较好地保护 LPS 所致的小鼠急性肺损伤^[9],使干燥和硬化的角质皮肤恢复柔软,防治皮肤晒伤^[10]。

β -谷甾醇,国内外各种各样的对照品较多,但是纯度参差不齐,均没有进行过定值试验,也没有不确定度的数据评价,准确性、可比性、可溯源性均不能保证。为此,国家标准化委员会批准了 β -谷甾醇国家标准样品的研制。同时,作为没有紫外吸收的标准样品示范性研制,得到了质检总局的行业专项资助。笔者参照 ISO Guide 35:2006,按照 GB/T 15000. 3 标准样品系列工作导则^[11],研制了 β -谷甾醇的国家标准样品。

1 材料

X-6 型显微熔点测定仪(温度计未校正,世纪科信),FTIR-8400S 型傅立叶红外光谱仪(日本岛津公司),Vario EL cube 元素分析仪(德国 Elementar 公司),6320 Ion Trap ESI-MS 型质谱仪(美国 Agilent 公司),Avance II 400M 型核磁共振仪(德国 Bruker 公司,以 TMS 为内标),Xevo G2 Qtof 型高分辨质谱仪(美国 Waters 公司),Gemini E 型 X-单晶衍射仪(美国 Agilent 公司),100 型制备液相色谱仪(美国 Varian 公司),RE-201D 型旋转蒸发器(巩义市予华仪器有限责任公司),薄层色谱、柱色谱用硅胶(青岛海洋化工厂),LD5-10 型离心机(北京金立离心机有限公司),CP225D 型电子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司),STA449F3-QMS403C 型热重/差热同步热分析仪(德国 Netzsch 公司)。

乙腈、甲醇为色谱纯(德国 Merck 公司),水为

重蒸水,其他试剂为分析纯。

白芥子购自北京卫仁中药饮片厂,产自四川,由中国中医科学院中药研究所何希荣主管药师鉴定为十字花科植物白芥 *Sinapis alba* 的干燥成熟种子,样品保存于本实验室。

2 方法与结果

2.1 样品的制备 取白芥子 9.56 kg,粉碎,过 80 目筛,6 倍量石油醚加热回流提取脂肪油(4 h/次,3 次),KOH-CH₃OH 溶液皂化。取不皂化部分,反复重结晶,得到大量无色针状结晶,为 β -谷甾醇粗品;剩余母液进行硅胶柱色谱,石油醚-乙酸乙酯(3:1~1:1)梯度洗脱,乙酸乙酯反复重结晶,得另一批 β -谷甾醇粗品。将两份 β -谷甾醇粗品(8 g)合并,纯度为 75%,采用甲醇重结晶,可形成粗大的晶体,再经过 2 次甲醇重结晶,得到柱状透明晶体 3.6 g,即为 β -谷甾醇样品。

2.2 结构鉴定

2.2.1 元素分析 分子式 C₂₉H₅₀O,理论值为 C, 83.98%; H, 12.16%; 实际测定值为 C, 83.57%; H, 10.604%。

2.2.2 UV 溶剂 CH₃OH 中紫外可见光区(200~800 nm)全波长扫描,未见吸收峰。

2.2.3 红外光谱(IR) 溴化钾压片,测定红外光谱,解析结果见表 1。

表 1 β -谷甾醇的红外光谱归属

Table 1 IR attribution table of β -sitosterol

吸收峰/cm ⁻¹	振动类型	强度	基团
3 393	OH 伸缩振动	m	OH
2 959	CH 伸缩振动	s	CH ₃
2 868	CH 伸缩振动	s	CH ₂
1 708, 1 667	CC 骨架振动	w	C = C
1 465	CH 面外弯曲振动	m	CH ₂
1 378	CH 面外弯曲振动	m	CH ₃
1 055	CO 伸缩振动	m	C-O

2.2.4 MS EI-MS *m/z* 414 (M⁺, 56%), 399 (M - CH₃, 22%), 396 (M - H₂O, 33%), 381 (M - CH₃ - H₂O, 22%), 273 (M - 侧链, 20%), 255 (M - 侧链 - H₂O, 35%), 231 (M - 侧链 - 42, 20%), 213

(M-侧链-42-H₂O, 35%), 43 [(CH₃)₂CH₂, 100]。与文献[12]报道数据一致。

2.2.5 核磁共振 (NMR) 以 CDCl₃ 为溶剂, 测

定¹H, ¹³C, DEPT, COSY, H MQC 及 H MBC 的核磁共振数据。并对其进行了归属, 见表 2。化学位移与文献[13-15]一致。

表 2 β-谷甾醇的核磁共振数据

Table 2 NMR data of β-sitosterol

No.	δ _C	δ _H	No.	δ _C	δ _H
1	37.26	1.08, dd, J = 10.4, 5.2 Hz 1.86, dd, J = 10.4, 5.2 Hz	16	28.24	1.29, td, J = 10.4, 4.0 Hz 1.86, td, J = 10.4, 4.0 Hz
2	31.65	(2H) 1.85, td, J = 12.0, 4.4 Hz	17	56.08	1.13, t, J = 4.0 Hz
3	71.78	3.50, tt, J = 8.0, 4.4 Hz	18	11.85	(3H) 0.68, s
4	42.29	(2H) 2.28, d, J = 8.0 Hz	19	19.39	(3H) 1.01, s
5	140.76	-	20	36.14	1.35, m
6	121.69	5.35, br s	21	18.78	(3H) 0.93, d, J = 4.8 Hz
7	31.91	(2H) 1.54, dd, J = 12.0, 4.0 Hz	22	33.96	1.04, m, 1.32, m
8	31.91	2.00, td, J = 12.0, 4.0 Hz	23	26.12	(2H) 1.19, m
9	50.15	0.96, d, J = 12.0 Hz	24	45.85	0.95, m
10	36.51	-	25	29.18	1.71, m
11	21.09	(2H) 1.54, dd, J = 7.2, 3.6 Hz	26	19.81	(3H) 0.82, d, J = 6.8 Hz
12	39.79	1.16, t, J = 7.2 Hz, 2.00, t, J = 3.6 Hz	27	19.05	(3H) 0.83, d, J = 6.4 Hz
13	42.32	-	28	23.08	(2H) 1.27, m
14	56.77	1.04, td, J = 12.0, 5.2 Hz	29	11.98	(3H) 0.85, t, J = 7.2 Hz
15	24.30	1.07, td, J = 10.4, 5.2 Hz 1.61, td, J = 10.4, 5.2 Hz			

2.2.6 X-射线衍射 (XRD) 色谱甲醇室温中获得 0.80 mm × 0.80 mm × 0.10 mm 白色柱状结晶, 经 XRD 测定认为, 该晶体属于单斜晶系, 空间群为 P2₁, 晶胞参数为 a = 9.422 6(7), b = 7.482 4(9), c = 36.889(3) Å, V = 2 597(4) Å³, Z = 4, D_c = 1.084 g · cm⁻³, Mr = 423.70, F(000) = 600, μ(MoKα) = 0.064 mm⁻¹, 最终的偏离因子为 R₁ = 0.088 6, wR₂ = 0.223 4。结构鉴定见图 1。

流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 30 °C。ELSD 条件漂移管温度 80 °C, 载气流速 1.6 L · min⁻¹, 进样量 10 μL。

2.4 样品溶液的制备 精密称取样品 1 mg, 加甲醇定容至 5 mL 量瓶中, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 得 0.2 g · L⁻¹ 的样品溶液。

2.5 薄层鉴别 精密称取样品 2 mg, 加乙酸乙酯 0.1 mL 溶解, 配制成 20 g · L⁻¹ 溶液。吸取 20, 40, 60, 80, 100 μg 点于同一硅胶 G 薄层板上, 以石油醚-乙酸乙酯(3:1), 石油醚-正己烷-乙酸乙酯-甲酸(4:6:3:0.2), 石油醚-乙酸乙酯(2:1) 为展开剂, 分别展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 磷钼酸乙醇溶液, 于 105 °C 加热至斑点显色清晰。样品溶液在薄层色谱板上, 仅显示唯一的蓝色斑点, R_f 值分别为 0.41, 0.54, 0.73, 未见其他杂质的斑点, 说明该样品的纯度较高。

2.6 热重分析 热重分析是在程序控制温度下, 测量物质质量与温度关系的一种技术, 可以判断研究物质的热稳定性、脱水、氧化、水分挥发等化学现象。该样品在 40 °C 时真空干燥 24 h 后进行热重分析。随着温度的升高, 该样品主要产生一次性失重, 失重

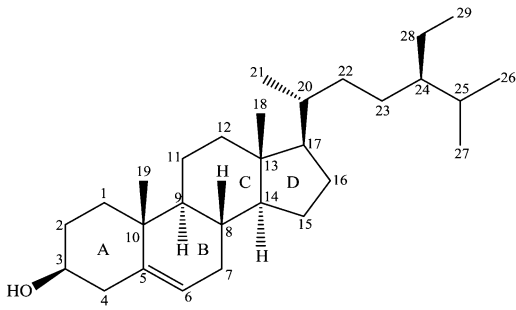


图 1 β-谷甾醇结构式

Fig. 1 Structure of β-sitosterol

2.3 色谱条件 Kromasil 100-5C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-水(99:1),

质量占样品质量的 99.78%，见图 2。说明该样品不含溶剂和水分子。

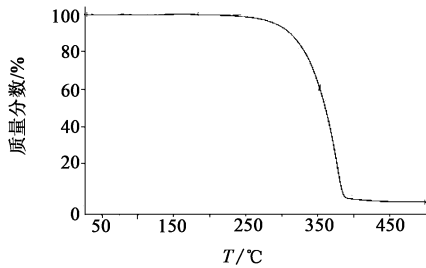


图 2 β -谷甾醇样品热重分析

Fig. 2 Mogravimetric analysis diagram of β -sitosterol

2.7 均匀性检验 按照标准样品工作导则^[11]第 7 章均匀性研究的要求进行。确定抽样数目为 12 个，按 3 种程序分别从每瓶中称取 1.0 mg 样品 3 份，每份样品加甲醇溶解，并定容至 5 mL 量瓶中，进行 HPLC 分析。3 次的抽样顺序为 1, 3, 5, 7, 9, 11, 2, 4, 6, 8, 10, 12 号瓶；12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 号瓶；2, 4, 6, 8, 10, 12, 1, 3, 5, 7, 9, 11 号瓶。按照 2.3 项下色谱条件对每个样品重复测定 3 次，用峰面积归一化法计算纯度，然后用方差分析法进行均匀性检验。结果见表 3, 4。

表 3 β -谷甾醇标准样品的纯度均匀性检验

Table 3 Homogeneity test of CRM of β -sitosterol %

瓶号	第 1 份	第 2 份	第 3 份	平均值	总平均值
1	95.61	95.59	95.55	95.58	
2	95.63	95.35	95.33	95.44	
3	95.60	95.42	95.41	95.48	
4	95.46	95.51	95.49	95.49	
5	95.36	95.35	95.59	95.43	
6	95.61	95.60	95.57	95.59	
7	95.40	95.58	95.42	95.47	95.49
8	95.61	95.58	95.61	95.60	
9	95.54	95.50	95.46	95.50	
10	95.61	95.59	95.62	95.61	
11	95.53	95.55	95.55	95.54	
12	95.40	95.40	95.57	95.46	

从表 4 可见，以 v_1 (组间) = 11 及 v_2 (组内) = 24 查 F 界值表， $F_{0.05}(11, 24) = 2.22$ ，由于 $F = MS_{\text{间}}/MS_{\text{内}} = 1.94 < F_{0.05}(11, 24)$ ，说明在 95% 置信区间该样品的均匀性良好。

表 4 β -谷甾醇均匀性试验的方差分析

Table 4 Variance analysis of homogeneity test of CRM of β -sitosterol

变差源	SS	f	MS
瓶间	0.144 8	11	0.013 2
瓶内	0.163 3	24	0.006 8
总和	0.308 1	35	

$$\text{瓶间方差计算式为 } s_A^2 = \frac{MS_{\text{间}} - MS_{\text{内}}}{n_0} -$$

$$\frac{0.013 2 - 0.006 8}{3} = 0.002 133 3。 \text{瓶间标准偏差}$$

$$u_{bb} = s_{bb} = \sqrt{0.002 133 3} = 0.05。$$

2.8 稳定性检验 标准样品的稳定性是用来描述标准样品的特性值随时间的变化。为了考察 β -谷甾醇标准品的稳定性，模拟市售包装，进行 0 ~ 8 °C 条件下放置 24 个月的稳定性检验，分别于 0, 1, 2, 3, 6, 9, 12, 18, 24 个月时取 3 个样品，按照 2.3 项下色谱条件，每份样品连续进样 2 次，用峰面积归一化法求出纯度。结果见表 5。

表 5 β -谷甾醇标准样品纯度稳定性检验

Table 5 Stability test of CRM of β -sitosterol %

时间/月	样品 1	样品 2	样品 3	平均值	标准偏差
0	95.51	95.69	95.40	95.53	0.15
1	95.62	95.51	95.76	95.63	0.12
2	95.63	95.65	95.66	95.65	0.02
3	95.42	95.45	95.37	95.41	0.04
6	95.88	95.52	95.56	95.65	0.20
9	95.47	95.52	95.30	95.43	0.12
12	95.47	95.50	95.38	95.45	0.06
18	95.32	95.63	95.76	95.57	0.23
24	95.56	95.40	95.70	95.56	0.15

注：性状均为白色柔软柱状晶体。

从表 5 的数据看，每次测得的平均值在测定时间内没有随时间的变化而明显的升高或降低。根据标准样品工作导则^[11]的要求，以直线模型作为经验模型，采用 t 检验和 F 检验对稳定性检验获得的数据进行分析。

$$t \text{ 检验: } b_1 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} = -0.001 4$$

X_i 为每次检测时间/月， Y_i 为次检测纯度/%，为每次检测时间总和/间隔检测次数，为检测纯度结

果的平均值。

式中 $\bar{Y} = 95.54\%$, $\bar{X} = 8.33$, 截距 $b_0 = \bar{Y} - b_1\bar{X} = 95.55\%$ 。

直线上的点的标准偏差计算公式为 $s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - b_0 - b_1X_i)^2}{n - 2} = 0.009 92$ 。

取其平方根 $s = 0.099 599\%$, 与斜率相关的不确定度计算式为

$$s(b_1) = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}} = 0.004 247$$

自由度为 $n - 2$ 和 $P = 0.95$ (95% 置信水平) 的 t 因子等于 2.37。由于 $|b_1| = 0.001 4\% < t_{0.95n-2} \times s(b_1) = 0.10\%$ 。故斜率是不显著的, 未观测到不稳定性。

F 检验: β -谷甾醇标准样品稳定性检验数据 (0~24 个月) 经线性拟合, 得到表 6 的结论。

从表 6 数据看, 在测定时间内 (24 个月) 直线回归方程的拟合度较好。经直线回归的方差分析得到

表 6 β 谷甾醇标准样品稳定性数据线性回归的方差分析

Table 6 Variance analysis of linear regression

差异来源	SS	f	MS	F	P
回归分析	0.001 144	1	0.001 144	0.115 514	0.743 9
残差	0.069 345	7	0.009 906		
总计	0.070 489	8			

$F = 0.115 5$, 小于方差分析临界值 $F_{0.05}(1, 7) = 5.59$ 。可以确定该标准样品在 0~8 °C 的条件下, 在 24 个月内是稳定的。

稳定性检验的稳定性不确定度: $u_{\text{its}} = s_{b_1} \times t = 0.10\%$, 稳定性检验表明, β -谷甾醇在 0~8 °C 的条件下保存 2 年仍稳定。

2.9 定值分析 按照标准样品工作导则^[11], 采用多个实验室协作定值, 选择获得国家或者部门认可、具备资质的 8 家实验室进行定值。随机抽取 16 瓶样品, 每个实验室送 2 瓶, 按照 2.3 项色谱条件, 每瓶重复测定 3 次, 应用峰面积归一化法进行定量。见表 7。

表 7 8 家实验室 β -谷甾醇纯度定值数据

Table 7 Eight laboratories certification data

实验室	1 次	2 次	3 次	4 次	5 次	6 次	平均值	标准偏差	RSD
1	95.70	95.51	95.39	95.54	95.12	95.62	95.48	0.21	0.21
2	96.12	96.65	95.12	95.12	96.44	96.08	95.76	0.55	0.58
3	95.08	95.02	95.07	95.08	95.04	95.03	95.05	0.03	0.03
4	95.36	95.92	95.68	95.52	95.82	96.47	95.80	0.39	0.40
5	95.51	95.69	95.40	95.62	95.51	95.76	95.58	0.13	0.14
6	95.04	95.07	95.21	95.02	95.11	95.10	95.09	0.07	0.07
7	95.31	95.10	95.11	95.18	95.23	95.06	95.17	0.09	0.10
8	95.33	95.29	95.02	95.42	95.73	95.16	95.33	0.24	0.25

汇集各家实验室的数据, 对每家检测单位的数据按大小顺序排列, 采用格拉布斯 (Grubb's) 检验法进行检验, 未发现异常值, 测定结果呈正态分布。通过以上对检验数据的考察, 所得数据符合标准样品工作导则^[11]的要求。采用峰度法检验各实验室数据的正态性, 没有检出异常值。然后再用 Grubb's 法对各实验室的平均值进行检验, 将其看成一组测定值进行异常值检验, 结果无异常值, 因此将各实验室的数据作为无偏估计值, 计算 8 家实验室测定结果的平均值及标准偏差。对表 7 的数据进行方差分析, 结果见表 8。计算加权平均值作为定值结果, 总平均值为 $\bar{x} = 95.41\%$ 。

2.10 定值分析的不确定度评定 按照标准样品

表 8 8 家实验室定值数据方差分析

Table 8 Analysis of variance of 8 laboratories certification data

变差源	SS	f	MS
组间	3.583 7	7	0.512 0
组内	2.938 5	40	0.073 46
总和	6.522 2	47	

工作导则^[11]的要求, 定值结果由标准值和不确定度组成。对表 8 的数据进行计算, $s(\bar{x})$ (总平均值的标准偏差) 为 0.29%, s_r (实验室内重复性标准偏差) 为 0.27%, s_L (实验室间再现性标准偏差) 为 0.27%, $u(\bar{x})$ (总平均值的 不确定度值) 为 0.10%。

3 结论

标准样品特性标准值的测量不确定度 u_{CRM} 由测定得到的标准值的不确定度 $u(\bar{x})$, 均匀性检验的不确定度 u_{bb} 和稳定性检验的不确定度 u_{ls} 组成。标准值定值试验引入的不确定度 $u(\bar{x})$ 按照加权法计算得到标准样品定值的不确定度 $u(\bar{x}) = 0.10\%$ 。均匀性检验引入的不确定度 u_{bb} , 该项用瓶间方差表示, 计算得到 $u_{bb} = 0.05\%$ 。稳定性检验引入的不确定度 u_{ls} , 24 个月的不确定度贡献 $u_{ls} = 0.10\%$ 。

取包含因子 $k = 2$, 则标准样品特性值的扩展不确定度 $u_{CRM} = k \sqrt{u(\bar{x})^2 + u_{bb}^2 + u_{ls}^2}$ 。这样, β -谷甾醇标准样品的纯度为 95.41%, 置信度为 95% 的扩展不确定度值为 0.30%。

4 结语

按照标准样品工作导则^[11]的要求, 研制的 β -谷甾醇标准样品经试验考察其均匀性、稳定性均符合要求, 定值结果为 $(95.41 \pm 0.30)\%$, 达到了天然产物国家标准样品的研制要求。该标准样品可用于 β -谷甾醇含量测定、检测方法评定、相关产品的检测与质量控制, 对白芥子等含有 β -谷甾醇的相关产品的检测和科学研究提供了技术支撑和量值溯源保证, 为目前药品检测中使用的对照品提供了样品。

[参考文献]

[1] 吴国欣, 吴红京. 白芥子 β -谷甾醇的分离与测定[J]. 海峡药学, 2002, 14(3):40-41.
[2] 王娟, 刘军权, 陈复兴, 等. β -谷甾醇对人共刺激细胞杀伤胃癌 SGC-7901 细胞的影响及其机制的探讨[J]. 免疫学杂志, 2014(7):578-584.
[3] 李庆勇, 姜春菲, 张黎, 等. β -谷甾醇、豆甾醇诱导人肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(5):1173-1175.
[4] 王莉, 杨永杰, 陈松华, 等. β -谷甾醇对子宫颈癌细胞微管系统的影响[J]. 中华医学杂志, 2006, 86(39):2771-2776.
[5] 张忠泉, 邢煜君, 胡国强, 等. β -谷甾醇诱导人肝癌

HepG2 细胞凋亡机制研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(15):2145-2148.
[6] 吴国欣, 林跃鑫, 欧敏锐, 等. 白芥子提取物抑制前列腺增生的实验研究[II][J]. 中国中药杂志, 2003, 28(7):643-647.
[7] 刘慧琼, 郭书好, 沈英森, 等. 半夏中 β -谷甾醇的抗氧化作用研究[J]. 广东药学院学报, 2004, 20(3):281-283.
[8] Becker M, Statab D, Bergmann K V. Treatment of severe familial hypercholesterolemia in childhood with sitosterol and sitostanol[J]. World J Pediatrics, 1993, 122(2):292-296.
[9] 姚凤, 周清燕, 熊瑛, 等. β -谷甾醇对脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤的保护作用研究[J]. 中国农学通报, 2015, 31(2):55-61.
[10] 吴晓毅, 巢志茂, 刘海萍, 等. 葫芦科药用植物甾醇类成分研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(A1):169-175.
[11] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 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]. 北京:中国标准出版社, 2008.
[12] 郝砚彬, 巢志茂, 王金. 湖北栝楼种子中不皂化物质的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(21):2262-2265.
[13] ZHANG X, Geoffroy P, Miesch M, et al. Gram-scale chromatographic purification of β -sitosterol synthesis and characterization of β -sitosterol oxides[J]. Steroids, 2005, 70(13):886-895.
[14] Chaturvedula V S P, Prakash I. Isolation of stigmasterol and β -sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavisissimus*[J]. Int Curr Pharm J, 2012, 1(9):239-242.
[15] WU X Y, CHAO Z M, WANG C, et al. Extraction and crystal structure of β -sitosterol[J]. Chin J Stru Chem, 2014, 33(5):801-806.

[责任编辑 顾雪竹]