

苹果籽油中甾醇物质的分离纯化及抑菌活性研究

仇农学¹, 刘海霞¹, 赵雁武^{1,2}, 王 峰¹

(1. 陕西师范大学食品工程与营养科学学院, 陕西 西安 710062; 2. 武警工程学院经济系, 陕西 西安 710086)

摘 要: 本实验采用薄层层析法对苹果籽油中的植物甾醇进行纯化, 采用 K-B 纸片法研究甾醇纯化物的菌制活性及 pH 值、温度等对抑菌性的影响, 并且测定其最低抑菌浓度(MIC)。结果表明, 分离纯化植物甾醇的最佳薄层层析条件为: 展开剂为乙醚-石油醚(3:7, V/V), 显色剂为三氯化铁溶液。抑菌实验结果表明, 甾醇对金黄色葡萄球菌及枯草芽孢杆菌具有很好的抑制作用, 最低抑菌浓度分别为 18 $\mu\text{g/ml}$ 和 30 $\mu\text{g/ml}$, 对大肠杆菌及蜡样芽孢杆菌有抑制作用, 对黑曲霉没有抑制作用。在 pH5~6 条件下其抑菌效果最佳; 一定温度内热处理不影响苹果籽油中甾醇的抑菌活性。苹果籽油中植物甾醇有广谱和常温的抑菌活性。

关键词: 苹果籽油; 甾醇; 抑菌活性

Study on Separation and Antibacterial Activity of Phytosterol from Apple Seed Oil

QIU Nong-xue¹, LIU Hai-xia¹, ZHAO Yan-wu^{1,2}, WANG Feng¹

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

2. Economical Department, Engineering College of People's Armed Police Force, Xi'an 710086, China)

Abstract : Thin layer chromatography (TLC) was used for separating and purifying the phytosterol from apple seed oil. The antimicrobial activities of the phytosterol against different microbes were determined and the effects of pH and temperature on the antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* were investigated. The results showed the optimal developer and color agent for TLC are aether-petroleum aether mixture (3:7, V/V) and ferric chloride. The bacteriostatic experiment showed the phytosterol has strong inhibitory effects against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* with the MICs of 18 $\mu\text{g/ml}$ and 30 $\mu\text{g/ml}$, respectively, and has weak inhibitory effects against *Escherichia coli* and *Bacillus cereus*, but has no inhibitory effect against *Aspergillus niger*. The antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* is strongest when pH value is 5 to 6, and would not be affected in a certain temperature range. In conclusion, the phytosterol from apple seed oil has wide antimicrobial spectrum and the antimicrobial activity is effective at normal temperature.

Key words : apple seed oil ; phytosterol ; antibacterial activity

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)08-0051-05

植物甾醇(phytosterol)是食品中天然存在的微量成分, 对人体非常有益, 是国际生命科学学会推荐的十大功能性食品之一。植物甾醇广泛分布于各种植物油、坚果和植物种子等植物性食品中。目前在植物体中发现了 40 种较为主要的甾醇, 最常见、含量最多的是 β -谷甾醇(β -sitosterol)、菜油甾醇(campesterol)、豆甾醇(stigmasterol)、 β -谷甾烷醇(sitostanol)、菜油甾烷醇(campestanol)等^[1-2]。植物甾醇具有降低血脂和胆固醇、

抑菌、消炎退热、抗氧化、抗肿瘤、免疫调节、清除自由基及护肤等广泛的药理作用和生物活性, 而且还可以用作食品的天然甜味剂和抗氧化剂, 在医药、食品、化妆品及饲料等行业中的应用日益广泛^[3-8]。国内外对苹果籽油中甾醇抑菌作用的研究尚未见报道。本实验采用薄层层析分离纯化苹果籽油植物甾醇, 研究甾醇纯化物对细菌及霉菌的抑制作用以及影响抑菌的主要因素, 旨在为苹果渣中籽油的综合利用及新型安全天

收稿日期: 2008-06-13

基金项目: 农业部 948 项目(2006 - G28)

作者简介: 仇农学(1945-), 男, 教授, 研究方向为水果深加工关键技术与产业化、食品分离技术以及农产品加工理论。

E-mail: nongxueq@snnu.edu.cn

然食品添加剂的研究提供理论依据^[9-10]。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

苹果籽油 陕西恒兴果汁饮料有限公司；甾醇(Stigmasterol) Sigma 公司。

乙醚、石油醚、无水乙醇、氢氧化钾、无水硫酸钠、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、三氯甲烷、罗丹明 6B、85% 浓磷酸、羧甲基纤维素钠(CMC-Na)、硅胶 G 等均为分析纯。

1.2 供试菌种与培养基

大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)和黑霉菌(*Penicillium*)均由陕西师范大学生命科学学院微生物实验室提供。

细菌用培养基：3g 牛肉膏，20g 琼脂，10g 蛋白胨，6g NaCl，蒸馏水溶解至 1000ml。将其 pH 值调至 7.0 左右。

霉菌用培养基：马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)，去皮马铃薯 200g，葡萄糖 20g，琼脂 20g，蒸馏水 1000ml。

1.3 仪器与设备

层析板 100 × 200 × 3mm；展开缸；100μl 移液枪；紫外灯；KQ-250DB 型超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司；WFJ2000 型可见分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司；800B 型台式离心机 上海安亭科学仪器厂；BS224S 电子天平 德国赛多利斯公司；S-SW-CJ-1F 型无菌操作箱 上海跃进医疗器械厂；SHZ-82 型水浴恒温振荡器 江苏金坛丹阳市石英玻璃厂；GZX-9146MBE 型数显鼓风干燥机 上海博迅实业有限公司医疗设备厂；数显恒温水浴锅 上海福玛实验设备有限公司；S.SW-CJ-1F 净化工作台 上海跃进器械医疗厂。

1.4 方法

1.4.1 苹果籽油中粗甾醇的提取工艺研究

称取一定量苹果籽油于圆底烧瓶中，加入 0.5mol/L KOH-乙醇溶液，在 80~85℃ 水浴上回流加热 5h。取下三角瓶加 1000ml 蒸馏水稀释，冷却后移入分液漏斗，加入适量的乙醚萃取，剧烈振动几分钟静置分层，去掉乙醚不溶物，连续萃取 5~6 次，合并乙醚萃取液，置旋转蒸发器上，回收所有乙醚，残余物浓缩、真空冷冻干燥得到黄色膏状物为粗甾醇^[11-14]，备用。

1.4.2 薄层层析分离纯化苹果籽油中甾醇类物质

用 0.5% 羧甲基纤维素钠-硅胶 G 制成 TLC 板置于 105℃ 烘箱中活化 1h，置于干燥器中备用。将适量展开

剂倒入层析缸中，展开剂的加量以没过原点为准。用移液枪将甾醇标准溶液及甾醇样品溶液点样于同一个薄层板上，每个样品点两个，放入层析缸中，密封后进行上样展开，约 2h。取出后吹干，呈雾状显色剂，于 105℃ 烘箱中烘 5~8min，样品展开后会出现紫色斑点^[14-15]。观察、记录其离原点中心的距离，并按照下列公式计算其比移值(rate of flow value, R_f 值)，由此可推断植物甾醇的谱带位置，将此谱带小心刮下，采用乙醚溶液溶解后，将溶液过滤、离心并挥发干溶剂，得到甾醇纯化物。

$R_f = \text{原点中心至斑点中心的距离} / \text{原点中心至溶剂前沿的距离}$

本实验按照上述方法对展开剂及显色剂进行选择，确定最佳的分离纯化条件，最终得到苹果籽油植物甾醇的纯化物，采用此纯化物进行抑菌实验，考察植物甾醇的抑菌效果。

1.4.2.1 展开剂的选择

常用硅胶薄层平板分离甾醇展开剂系统有：石油醚-乙醚、正己烷-乙酸乙酯、正己烷-乙醚、正己烷-丙酮、石油醚-乙醚、氯仿-乙醚等。本实验采用薄层色谱法分离苹果籽油植物甾醇样品，按照 1.4.2 方法操作，考察乙醚-石油醚(3:7, V/V)、正己烷-乙醚(7:3, V/V)、正己烷-乙酸乙酯(6:1, V/V)三种展开剂对样品组分的分离效果。

1.4.2.2 显色剂的选择

由于甾醇本身是无色的，因此要加入显色剂才能分辨出甾醇斑点的位置。常用 TLC 的显色剂有挥发碘显色法、罗丹明 6B 显色-乙醇溶液、10% 硫酸显色、磷钼酸显色法等。本实验按照 1.4.2 的操作要求，考察以挥发碘、10% 硫酸、罗丹明 6B-乙醇溶液以及三氯化铁溶液为显色剂的显色效果，选择最佳的显色剂。

1.4.3 苹果籽油甾醇的抑菌活性研究

1.4.3.1 供试菌株的活化

将金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、黑曲霉等 5 种供试菌种接入相对应的试管斜面培养基上，每种菌接种三支重复，细菌置 37℃ 恒温箱内培养 18~24h，霉菌培养 44~48h，待用。

1.4.3.2 培养基的配制及平板制备

配制的各种菌株的培养基，高压蒸汽消毒灭菌(压力为 0.1MPa，锅内温度达 121℃)20min，冷却至 50~60℃，无菌操作于经干热灭菌的培养皿内，每皿约 15~20ml，即培养皿内培养基的厚度约 2~2.5mm，为实验制备充足数量的培养皿。

1.4.3.3 甾醇样品溶液的制备

准确称取 0.200g 的甾醇样品, 乙醇溶解后, 配成 0.200% 浓度的溶液, 然后稀释成不同浓度溶液。

1.4.3.4 供试菌株悬浮液的制备

在净化工作台上进行无菌操作。用接种环挑取少许菌体于装有 10ml 无菌水的试管中, 用力振荡, 制成均匀的各种菌的菌悬浮液, 浓度为 $10^5 \sim 10^6$ CFU/ml^[16]。

1.4.3.5 苹果籽油中甾醇抑菌活性的测定

采用滤纸片法对各菌株的抑菌活性进行研究^[17-18]。用无菌吸管吸取上述各种供试菌株悬浮液 0.5ml 于平板上, 然后用无菌涂布棒涂布均匀, 待用。将苹果籽油甾醇配成质量浓度为 0.100% 的乙醇溶液, 将直径 6mm 无菌滤纸片浸入甾醇溶液中 2h, 捞出, 45℃ 烘干备用。贴于含菌平板中同时以水做空白实验, 每平板贴 3 片滤纸片, 呈正三角形, 每个圆形滤纸与相邻的滤纸或壁相隔 30mm, 重复 2 个平板, 倒置培养, 细菌于 37℃ 培养 20h, 霉菌于 28℃ 培养 48h。细菌 24h 后观察, 霉菌 48h 后观察, 用游标卡尺测培养基中抑菌圈的直径。另设乙醇为阴性对照、提取溶剂为空白对照。通过比较抑菌圈直径的大小, 判断甾醇对各菌株的抑制效果, 并采用液体培养基法, 测定其对甾醇的最低抑菌浓度。

1.4.3.6 最低抑菌浓度(MIC)测定

采用液体培养基法分别测定不同浓度的样品对 1.4.3.5 确定的具有较强抑菌效果菌株的最低抑制浓度^[19]采用液体培养基作为空白对照组; 向液体培养基中仅加入溶剂乙醇作为乙醇对照组; 按照表 1 量取不同量的甾醇样品溶液加入到液体培养基试管中, 用振荡混匀器充分摇匀, 制成不同浓度的甾醇样品溶液的液体培养基。选用波长为 660nm 测定各个浓度的液体培养基的吸光度。以能抑制细菌生长的甾醇的最高稀释度, 即吸光度最小时对应的甾醇浓度为最低抑菌浓度(吸光度一直在减小, 但是在某一个浓度时, 吸光度下降很急剧, 则说明在这个浓度时有明显的抑菌作用。

表 1 含不同浓度的甾醇溶液试管配制

Table 1 Dosages of phytosterol from apple seed oil for preparing liquid media with of different phytosterol concentrations for different microbes

试管编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
加甾醇的量	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
液体培养基	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.0
最终溶液浓度($\mu\text{g/ml}$)	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60

1.4.3.7 苹果籽油中甾醇的抑菌活性的酸碱稳定性实验

以金黄色葡萄球菌为试验菌, 取适量的样液分别与不同 pH 值(pH2、4、6、8、10、12)的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲溶液混合, 采用甾醇样品溶液制作滤纸圆片, 贴于含菌平板中, 每个 pH 值重复 2 个平板, 并以不同 pH

值的缓冲溶液为对照。经恒温培养 24h 后用滤纸片扩散法测定抑菌活性。

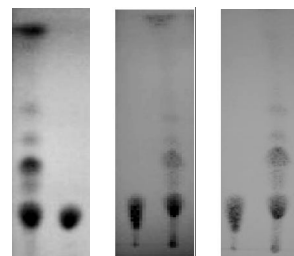
1.4.3.8 苹果籽油中甾醇抑菌活性的热稳定性实验

以金黄色葡萄球菌为供试菌, 采用甾醇样品溶液在不同温度条件下分别处理 30min 后, 制作滤纸圆片; 同时将葡萄球菌菌悬液用涂布器均匀涂布于平板培养基表面。将浸泡好样品溶液的滤纸圆片贴于含菌平板表面上, 分别置 85、100、121℃ 处理, 每一处理温度重复 2 个平板, 同时以试剂乙醇做空白实验。经恒温培养 24h 后滤纸片扩散法测定其抑菌活性。

2 结果与分析

2.1 薄层色谱纯化苹果籽油植物甾醇的最佳条件确定

2.1.1 展开剂的选择



正己烷-石油醚(3:7, V/V); 正己烷-乙酸乙酯(6:1, V/V); 正己烷-乙酸乙酯(6:1, V/V)。

图 1 不同展开剂对样品甾醇的展开效果

Fig.1 Developing effects of different mobile phases

表 2 不同展开条件下样品甾醇的 R_f 值

Table 2 R_f values of phytosterol using different developers

展开剂	R_f 值					
	组分1	组分2	组分3	组分4	组分5	组分6
乙醚-石油醚(3:7, V/V)	0.27	0.29	0.33	0.36	0.38	0.43
正己烷-乙醚(7:3, V/V)	0.32	0.35	0.38	0.42	0.44	0.54
己烷-乙酸乙酯(6:1, V/V)	0.30	0.33	0.37	0.43	0.47	0.58

本实验考察了乙醚-石油醚(3:7, V/V)、正己烷-乙醚(7:3, V/V)、正己烷-乙酸乙酯(6:1, V/V)三种展开剂对于分离样品甾醇的展开效果。三种不同展开剂的展开效果, 如图 1 所示, 采用乙醚-石油醚(3:7, V/V)为展开剂的效果最好, 在该条件下展开、显色后, 甾醇类组分呈现棕红色, 条带无拖尾, 分离效果好; 由表 2 可见不同展开条件下植物甾醇的 R_f 值, 采用乙醚-石油醚(3:7, V/V)为展开剂时, 甾醇组分的比移值在 0.27 ~ 0.45 之间, 这符合薄层比移值的准确范围。因此, 对于薄层层析分离样品甾醇的展开剂, 本实验选择乙醚-石油醚(3:7, V/V)。

2.1.2 显色剂的选择

本实验采用挥发碘、罗丹明 6B-乙醇溶液、10% 硫酸溶液以及三氯化铁溶液这四种显色剂,考察薄层层析分离植物甾醇的不同显色效果。由图 2 的显色效果可见,用薄层层析分离样品甾醇,采用三氯化铁溶液显色最佳。

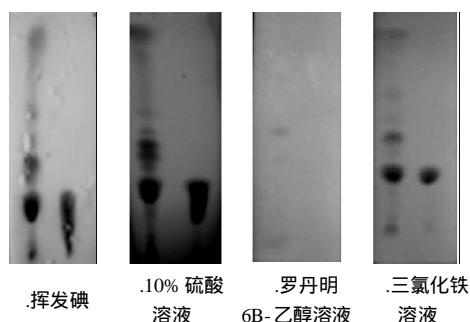


图2 不同显色剂对样品甾醇显色效果比较

Fig.2 Comparison among effects of four color agents

采用挥发碘显色法显色,显色斑点显棕红色,操作比较方便,但是由于样品甾醇难以被氧化,所以显色时间较长,一般需 1~2h,不适用于快速分析;采用罗丹明 6B 显色,此方法显色不是很明显,并且需要在紫外灯下显色,显色呈较弱的橙红色,较难分辨,在紫外灯下则显橙黄色色带;采用 10% 硫酸显色,斑点呈淡红色,底版呈黑色,操作中烘烤的时间需仔细掌握,若时间太长则板将全部变黑;采用三氯化铁溶液显色,在展开后喷在硅胶板上,吹干后放置于 110℃ 烤箱中烘烤 2~3min,斑点清晰易辨认,这种方法方便快捷又安全,适用于样品甾醇薄层层析分析。

2.2 苹果籽油中甾醇的抑菌活性实验结果

2.2.1 苹果籽油中甾醇对不同菌株的抑制作用

表3 供试菌株抑菌活性结果

Table 3 Diameters of inhibition zone of phytosterol from apple seed oil and ethanol again 5 microbes

菌种	抑菌圈直径(mm)		
	甾醇样品组	空白对照组	乙醇对照组
大肠杆菌	9.0	5.0	5.0
金黄色葡萄球菌	12.3	5.0	5.0
蜡样芽孢杆菌	8.3	5.0	5.0
枯草芽孢杆菌	14.5	5.0	5.0
黑霉菌	5.0	5.0	5.0

苹果籽油中甾醇样品对不同菌株的抑菌圈结果如表 3 所示。结果表明,所选用的样品对枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌有较强的抑制作用,对蜡样芽孢杆菌和大肠杆菌有抑制作用,但对实验用黑霉菌无抑制作用。被

抑制的细菌中既有革兰氏阳性菌(金黄色葡萄球菌)又有革兰氏阴性菌(大肠杆菌),既有球菌(金黄色葡萄球菌)又有杆菌(枯草芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌),可见苹果籽油中的甾醇有着广谱的抑菌作用。

2.2.2 苹果籽油中甾醇最低抑菌浓度(MIC)测定结果

以枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌及为蜡样芽孢杆菌为供试菌,根据比较液体培养基的吸光度,确定苹果籽油中甾醇对各菌株的最低抑制浓度,如表 4 所示。结果表明提取物对枯草芽孢杆菌的 MIC 为 18 $\mu\text{g/ml}$;对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 30 $\mu\text{g/ml}$;对大肠杆菌的 MIC 为 42 $\mu\text{g/ml}$;对蜡样芽孢杆菌的 MIC 为 42 $\mu\text{g/ml}$ 。甾醇样品溶液对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌有很强的抑制作用(图 3)。

表4 苹果籽油中甾醇纯化最低抑菌浓度测定

Table 4 Minimum antibacterial concentrations of phytosterol from apple seed oil against 4 microbes

甾醇溶液浓度($\mu\text{g/ml}$)	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60
枯草芽孢杆菌吸光度	0.32	0.315	0.29	0.17	0.12	0.09	0.08	0.075	0.070	0.065
金黄色葡萄球菌吸光度	0.45	0.44	0.43	0.37	0.19	0.14	0.12	0.11	0.10	0.09
大肠杆菌吸光度	0.56	0.55	0.54	0.53	0.51	0.46	0.27	0.22	0.20	0.19
蜡样芽孢杆菌吸光度	0.71	0.70	0.68	0.66	0.62	0.56	0.46	0.34	0.29	0.26

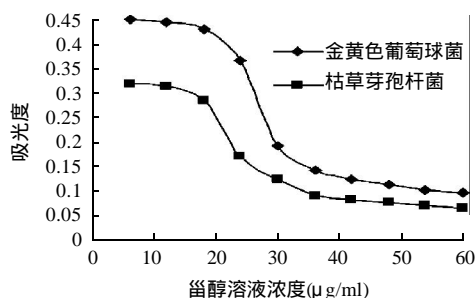


图3 样品甾醇对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌抑制作用

Fig.3 Antibacterial activities of phytosterol from apple seed oil against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*

2.2.3 pH 值对苹果籽油中甾醇抑菌活性的影响

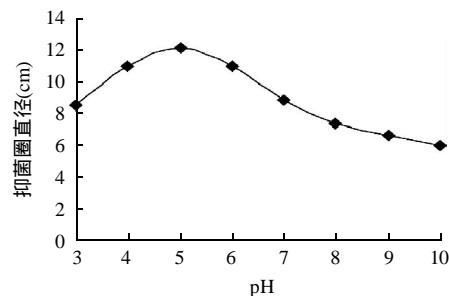


图4 不同 pH 值对苹果籽油中甾醇抑菌活性的影响

Fig.4 Effects of different pH values on antibacterial activity of phytosterol from apple seed oil against *Staphylococcus aureus*

以金黄色葡萄球菌为供试菌,研究不同 pH 值对苹

果籽油中甾醇抑菌活性的影响,结果见图4。由图4可知,pH值对苹果籽油中甾醇抑菌活性的影响较大,当pH值在4~6的弱酸条件下,其抑菌活性较高,而当pH值为7~10时,苹果籽油中甾醇的抑菌活性较低,即随着碱性的增强,苹果籽油中甾醇抑菌活性下降。

2.2.4 苹果籽油中甾醇抑菌活性的热稳定性研究

以金黄色葡萄球菌为供试菌,研究经不同温度处理的甾醇样品的抑菌效果,结果见图5。由图5可见,在低于80℃范围内处理30min后的样品,其抑菌活性差别不大,但当温度高于80℃时,其抑菌活性缓慢下降,可能是高温破坏了甾醇结构,使其抑菌效能降低。由此可知,苹果籽油中甾醇具有较好的常温抑菌活性。

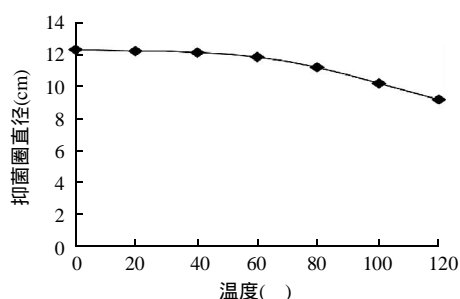


图5 不同温度对苹果籽油甾醇纯化物抑菌活性的影响

Fig.5 Effects of different temperatures on antibacterial activity of phytosterol from apple seed oil against *Staphylococcus aureus*

3 结论

3.1 对苹果籽油中甾醇进行薄层层析分离纯化,确定最佳分离条件为:展开剂为乙醚-石油醚(3:7,V/V),显色剂为三氯化铁溶液。

3.2 采用滤纸片法研究苹果籽油中甾醇纯化物对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌、大肠杆菌及黑曲霉的抑菌活性,结果表明甾醇对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌有较强的抑菌性,对蜡样芽孢杆菌和大肠杆菌有抑菌作用;对黑曲霉没有抑菌性。

3.3 采用液体培养基法测定籽油中甾醇对枯草芽孢杆菌的最小抑菌浓度为18 µg/ml,对金黄色葡萄球菌为30 µg/ml,对大肠杆菌为42 µg/ml,对蜡样芽孢杆菌为42 µg/ml。

3.4 pH值范围在5~6时甾醇有较强的抑菌活性,其余

范围内抑菌活性较弱;而温度对抑菌效果的影响不大,具有常温的抑菌性。

参考文献:

- [1] PARESH C D. Determination of phytosterol oxides in some food products by using an optimized transesterification method[J]. Food Chemistry, 2006, 97: 606-613.
- [2] 韩军花. 植物甾醇的性质、功能及应用[J]. 国外医学: 卫生学分册, 2001, 28(5):285-291.
- [3] BRUFAUA G, CANELAB M A, RAFECASA M. Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties [J]. Nutrition Research, 2008, 28: 217-225.
- [4] 何胜华, 马莺, 周泉城. 菜籽植物甾醇降小鼠血脂功能的实验研究[J]. 中国油脂, 2005, 30(6):60-62.
- [5] 吴时敏, 吴谋成. 植物甾醇的研究进展与趋向()植物甾醇的应用基础和开发研究[J].中国油脂, 2002, 27(3): 73-75.
- [6] 张强, 赵新淮. 植物甾醇及其抗癌作用[J]. 中国油脂, 2006, 31(10): 57-60.
- [7] 钟建华, 徐方正. 植物甾醇的特性、生理功能及其应用[J]. 食品与药品, 2005(2):10-12.
- [8] SIRO I, KAPOLNA E, KAPOLNA B, et al. Functional food product development, marketing and consumer acceptance review[J]. Appetite, 2008, 51(3): 456-467.
- [9] 郝少莉, 陈小蒙, 仇农学. 苹果渣中多酚物质的纯化及其抑菌活性的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(11): 86-90.
- [10] 钟以举, 唐克华, 钟维. 红榉木叶抑菌活性物提取分离研究[J]. 食品科学, 2007, 28(10): 225-228.
- [11] 赵文杰, 刘星, 付苗苗. 苦参子仁油不皂化物的GC-MS分析[J]. 河南工业大学学报, 2008, 29(4): 14-16.
- [12] 刘海霞, 赵雁武, 王峰. 苹果籽油中植物甾醇的提取及分光光度法含量测定研究[J]. 食品科学, 2008, 29(6): 146-150.
- [13] 杨晓静, 王立众, 李和. 紫苏子油不皂化物的分离与分析[J]. 中国油料作物学报, 2006, 28(2): 207-209.
- [14] LIN S H, WANG D M, YANG D P. Characterization of steroidal saponins in crude extract from dioscorea nipponica Makino by liquid chromatography tandem multi-stage mass spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 7(7): 1-9.
- [15] CERCACI L, RODRIGUEZ-ESTRADA M T, LERCKER G, et al. Solid-phase extraction-thin-layer, chromatography-gas chromatography method for the detection of hazelnut oil in olive oils by determination of esterified sterols[J]. Journal of Chromatography A, 2003, 985: 211-220.
- [16] 林君阳, 马良进, 陈安良. 山核桃外果皮化学成分及抑菌活性初步研究[J]. 浙江林学院学报, 2009, 26(1): 100-104.
- [17] 戚欢阳, 张朝凤, 张勉. 毛脉寥化学成分及抑菌活性的研究[J]. 中国药学杂志, 2005, 40(11): 819-822.
- [18] BARILE E, BONANOMI G, ANTIGNANI V. Saponins from *Allium minutiflorum* with antifungal activity[J]. Phytochemistry, 2007, 68: 596-603.
- [19] 周德庆. 微生物学实验教程[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 2006.