

# 电化学分析法快速测定粮油食品中的总植物甾醇含量

吕双双, 张媛媛, 李书国

(河北科技大学生物科学与工程学院, 河北石家庄 050018)

**摘要:** 本文研究了植物甾醇在裸玻碳电极上的电化学反应过程, 建立了差分脉冲法快速测定粮油食品中的总植物甾醇含量的新方法。试验表明: 通过快速循环伏安法测定植物甾醇在 1.72 V 处出现氧化峰, 无还原峰, 其电极反应过程是不可逆的; 并且探索了电化学法测定植物甾醇的试验条件, 结果显示: 乙腈-异丙醇(9:1, V/V)为最佳有机溶剂, 支持电解质是 50 mmol/L 高氯酸锂(LiClO<sub>4</sub>), 脉冲幅度 50 mV、电位增量为 3 mV、脉冲宽度为 0.05 s、脉冲间隔为 0.3 s; 在此条件下, 以差分脉冲伏安法测定植物甾醇的线性范围是 160~800 μg/mL, 检测限是 8.8 μg/mL (S/N=3), 线性系数 r=0.998。并用该法测定了玉米胚芽油脱臭馏出物中总植物甾醇含量, 回收率为 97.0~101.3%; 结果表明, 在非水溶剂中, 电化学分析法测定植物甾醇是可行的, 并且操作简便, 样品无需前处理, 测定结果精确。

**关键词:** 植物甾醇; 电化学分析; 快速检测; 粮油食品

文章编号: 1673-9078(2015)5-297-302

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.5.047

## Rapid Detection of Total Phytosterol Content in Cereals, Oils, and Foodstuff by Electrochemical Analysis

LV Shuang-shuang ZHANG Yuan-Yuan, LI Shu-guo

(Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China)

**Abstract:** The electrochemical reaction process of plant sterols in a bare glassy carbon electrode was investigated to develop a new differential-pulse voltammetric method for rapid detection of phytosterols in cereals, oils, and other foodstuff. Cyclic voltammogram of phytosterols showed that the oxidation peak appeared at 1.72 V and no reduction peak was observed, which indicated that the electrode reaction process was irreversible. The electrochemical conditions were optimized for the detection of phytosterols. The results showed that the optimal conditions were: acetonitrile and 2-propanol (9:1, V/V) as organic solvent, 50 mmol/L LiClO<sub>4</sub> as supporting electrolyte, pulse amplitude of 50 mV, potential increment of 3 mV, pulse width of 0.05 s, and pulse interval of 0.3 s. Under these optimized conditions, the calibration curves for determination of phytosterol demonstrated an excellent linear response within the range 160 to 800 μg/mL (r = 0.998), with the detection limit at 8.8 μg/mL (S/N = 3). The proposed method was successfully applied to the determination of phytosterol in corn germ oil deodorizer distillate and the recovery rate was 97.0% to 101.3%. The results indicate that the electrochemical analysis method is feasible for the detection of phytosterols in non-aqueous solvents, easy to perform, and does not require complicated pretreatment of samples.

**Key words:** phytosterol; electrochemical analysis; rapid detection; cereals, oils, and foodstuff.

植物甾醇是一类天然安全的降血脂物质, 广泛存在于植物油、坚果、种子和谷物中, 最常见的包括:  $\beta$ -谷甾醇、谷甾醇、菜油甾醇、豆甾醇、燕麦甾醇、

收稿日期: 2014-09-11

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(20876165); 河北省科技支撑计划项目(14227121D); 河北省教育厅科技项目(2009329)

作者简介: 吕双双(1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 粮油食品加工技术

通讯作者: 李书国(1969-), 博士, 教授, 研究方向: 粮油食品科学与食品安全

芦竹甾醇、甲基甾醇和异岩藻甾醇等。近几十年来研究表明, 植物甾醇具有免疫调节、消炎退热、抗肿瘤、降低血脂和胆固醇、清除自由基及护养皮肤等多种生理功效<sup>[1-5]</sup>, 同时还起到预防和治疗高血压、冠心病等心血管疾病的作用, 已被广泛的应用于制药、食品、化妆品等行业<sup>[6]</sup>。目前分析植物甾醇的方法有很多, 如重量法、比色法、红外光谱鉴定法、分光光度法、气相色谱法(GC)、液相色谱法(HPLC)<sup>[7-8]</sup>(优缺点见表一)。虽然测定植物甾醇方法很多, 检测精度很高, 但是这些方法, 前处理繁琐, 所需药品多, 耗费时间

长。而电化学方法快速、灵敏、简便、测量精度高，前处理程序简单，样品分析时间短，便于在线检测<sup>[9]</sup>。

表 1 几种植物甾醇检测方法的特点比较

Table 1 Comparison of methods to detect phytosterols

方法	优点	缺点
重量法	精确度高，不需要基准物质。	该法操作步骤多、分析时间长、干扰因素较多。
红外光谱法	分析成本低，无需化学试剂，分析速度快。	定量分析误差大，灵敏度低，对样品要求纯度高。
比色法	仪器简单，分析成本低，易于操作。	准确度较低、灵敏度低、选择性差。
分光光度法	简单，成本低，对仪器要求简单、灵敏度高。	一种物质一个检测方法，待测组分损失严重，只能测定总甾醇含量，不能对各甾醇组分分离定量
HPLC	灵敏度高、分离效果显著、重复性好，可同时分离测定各组分甾醇含量。	需要溶样、萃取、分离、洗脱等预处理，步骤繁琐，耗费试剂多，检测成本高。
GC	灵敏度和精确度高，可同时分离测定各组分甾醇含量。	需对样品进行衍生化处理，操作要求高，步骤繁琐、耗费试剂多，检测时间长。

植物甾醇是三萜类化合物，其化学结构和生物功能都与胆固醇相似（如图 1），两者差异仅在于侧链不同。曾经有人报道，胆固醇是一种非电活性的化合物，胆固醇的电化学氧化导致胆甾-4,6-二烯-3-酮形成<sup>[10]</sup>，说明在胆固醇 3β 位置上，羟基是一个电化学氧化的基点。由于植物甾醇的羟基存在于类固醇环 3β 位置上，因此说明植物甾醇在适当的条件下可以发生电化学氧化。Nanako Ito 等<sup>[11]</sup>已经通过高效液相色谱—电化学分析方法，测定了β-谷甾醇、豆甾醇、菜油甾醇含量，表明植物甾醇可以在玻碳电极上发生氧化反应。本试验采用标准加入法，在有机相中以差分脉冲伏安法对植物甾醇在玻碳电极上的反应过程进行研究。

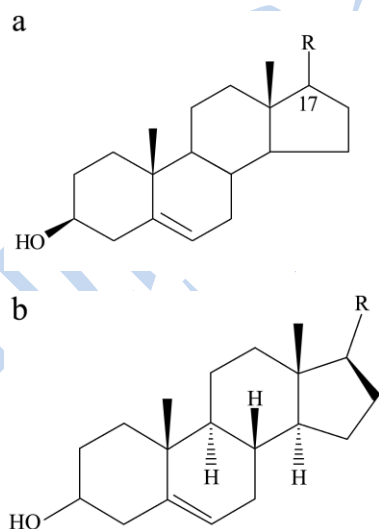


图 1 植物甾醇与胆固醇的化学结构式

Fig1 Chemical structure of phytosterol and cholesterol

注：a为植物甾醇结构式，b为胆固醇结构式。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与材料

植物甾醇混合物（纯度≥95%），陕西森弗生物技术有限公司；玉米胚芽油脱臭馏出物，山东西王集团有限公司提供；LiClO<sub>4</sub>，国药集团化学试剂有限公司；浓硫酸、浓硝酸、无水乙醇、乙腈、异丙醇，天津市博迪化工有限公司；试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

LK98B II型微机电化学分析系统：天津兰力科化学电子高新技术有限公司；3 mm 玻碳圆盘电极、铂丝电极、Ag/AgCl 电极、10 mL 电解杯，上海 CHI 仪器公司；KQ2200 超声波清洗仪，昆山市超声仪器有限公司；TU-1810 紫外可见分光光度计，上海元析仪器有限公司；Dragon MED 微量移液器，大龙医疗设备（上海）有限公司；FA2204N 型电子分析天平，上海青海仪器有限公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 电极的处理

玻碳电极在使用前依次用 1.0、0.3、0.05 μm Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 抛光，然后用大量蒸馏水冲洗，再分别用 V (HNO<sub>3</sub>):V(H<sub>2</sub>O)=1:1、无水乙醇、蒸馏水各超声清洗 30 秒，再用大量蒸馏水清洗，除去表面吸附物。然后在 0.2 mol/L 硫酸溶液中用快速循环伏安法扫描进行活化，活化条件：扫描速率：50 mV/s，电压范围-1~1 V，循环次数 10 次，得到稳定的循环伏安图后，取出，洗净，晾干备用。

#### 1.3.2 标准溶液的配制

用无水乙醇配制 8×10<sup>3</sup> μg/mL 的植物甾醇标准溶液。电解溶液为含有 LiClO<sub>4</sub> 的乙腈-异丙醇溶液，其

中  $\text{LiClO}_4$  作为电解质。在电解杯中加入适量的电解液，再取适量的甾醇标准溶液，注入电解杯中，使其浓度为  $300 \mu\text{g/mL}$ 。将三电极插入，通氮气  $5 \text{ min}$ ，除去氧气，以减少氧波的影响。用电化学分析仪记录其差分脉冲伏安曲线，并优化分析试验条件。

### 1.3.3 甾醇标准曲线测定

在电解液中加入甾醇标准溶液，使其呈梯度浓度，以差分脉冲伏安法测量记录其氧化峰电流值，平行测定 3 次，取平均值，考察峰电流值与植物甾醇浓度之间的关系。

### 1.3.4 实际样品的测定

采用分光光度法和电化学法两种方法测定实际样品中甾醇含量，取  $4 \text{ g}$  玉米胚芽油脱臭馏出物，加  $50 \text{ mL}$  无水乙醇溶解，作为供试样品溶液。取 6 只  $10 \text{ mL}$  小烧杯，分别加入  $100 \mu\text{L}$  供试液，其中三只再各加入  $200 \mu\text{L}$  甾醇标准品（浓度  $5 \times 10^3 \mu\text{g/mL}$ ），另三只分别加入  $300 \mu\text{L}$  甾醇标准品，并计算加标回收率。

## 2 结果与讨论

### 2.1 植物甾醇的电化学行为和电极反应过程

通过循环伏安法分析植物甾醇的电化学行为，在含有  $50 \text{ mmol/L LiClO}_4$  的乙腈-异丙醇（9:1, V/V）电解溶液中，以玻碳电极为工作电极， $\text{Ag/AgCl}$  电极为参比电极，铂丝电极为辅助电极，通过对空白溶液和植物甾醇标准溶液进行循环伏安扫描，得到植物甾醇在玻碳电极上的循环伏安图（如图 2），对其电化学反应行为进行分析研究。电势范围  $1 \sim 2 \text{ V}$ ，扫描速度  $0.1 \text{ V/s}$ 。

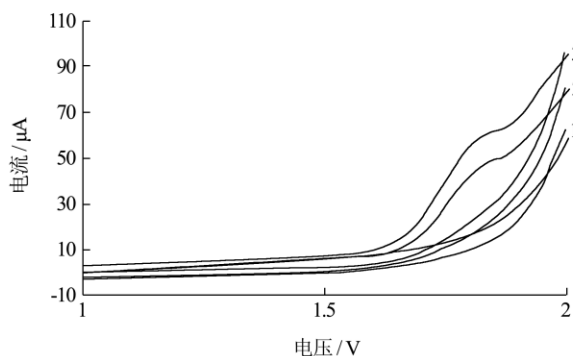


图 2 植物甾醇在玻碳电极上的循环伏安图

Fig2 Cyclic voltammogram of phytosterol using glassy carbon electrode

注：1-白对照；2- $320 \mu\text{g/mL}$ 植物甾醇，峰值 $46.68 \mu\text{A}$ ；3- $480 \mu\text{g/mL}$ 植物甾醇，峰值 $58.84 \mu\text{A}$ ；扫描方向由正到负。

如图 2 中 1 曲线显示空白溶液中无氧化峰，而 2、3 曲线显示在  $1.5 \sim 2 \text{ V}$  之间出现一个阳极峰，在反向扫

描中没有出现阴极峰，这表明植物甾醇能够在玻碳电极上发生氧化反应，且不可逆。而且随着植物甾醇浓度的增加，峰电流值也随之增加，其峰值高度与植物甾醇的浓度成一定比例，表明这种方法可以应用到植物甾醇的定量分析。

### 2.2 有机溶剂和电极的选择

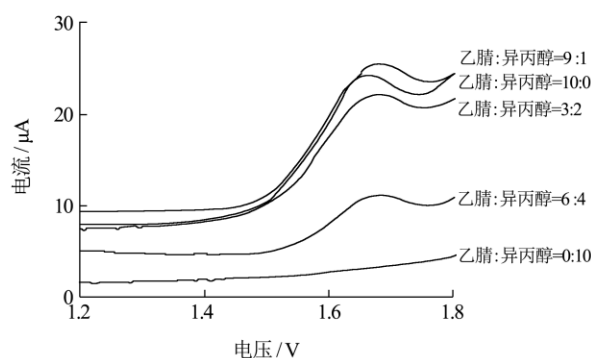


图 3 植物甾醇在乙腈-异丙醇（不同比例，V/V）溶剂中的差分脉冲图

Fig3 Differential pulse graph of phytosterols using acetonitrile-isopropanol solvent in different ratios (V/V)

注：试验条件-脉冲幅度  $50 \text{ mV}$ 、电位增量为  $3 \text{ mV}$ 、脉冲宽度为  $0.05 \text{ s}$ 、脉冲间隔为  $0.3 \text{ s}$ ，在含有  $50 \text{ mmol/L LiClO}_4$  的乙腈-异丙醇溶液中，植物甾醇浓度  $800 \mu\text{g/mL}$ 。

K. Hojo<sup>[10]</sup>等发现在乙腈-异丙醇溶液中，胆固醇在电极上能够发生电化学氧化反应，故乙腈，异丙醇作为首选溶剂。电化学分析法测定植物甾醇，所选溶剂应满足以下要求：能与植物甾醇混合形成均一体系；溶剂应具有良好的介电特性即适宜的介电常数，能溶解支持电解质，使其具有良好的导电性。由于植物甾醇不溶于水、酸和碱，可溶于多种有机溶剂，在含水溶剂中，植物甾醇析出，体系浑浊不均一，所以选择非水溶剂作为电解溶剂。由植物甾醇在乙腈-异丙醇（不同比例，V/V）溶剂中的差分脉冲图（图 3）可知，植物甾醇在单独异丙醇中无氧化峰，在单独乙腈溶剂中有氧化峰但峰形不好，而在乙腈-异丙醇混合溶液中有较好的峰形，且当乙腈-异丙醇体积比为 9:1 时，峰形最好，电流影响大。对于电极材料的选择，在早期试验中使用金电极作为工作电极，然而可能由于植物甾醇的氧化产物吸附到金电极表面，致使金电极重复性工作差，因此最终选择玻碳电极作为工作电极。

综上所述，选取玻碳电极为工作电极，乙腈和异丙醇混合溶液作为电解溶液，且体积比为 9:1，此时能够很好的溶解植物甾醇，在  $\text{LiClO}_4$  做支持电解质时，得到的植物甾醇差分脉冲图峰形最好，电流影响最大。

### 2.3 支持电解质的选择

作为支持电解质，能够提高介质的导电性，而在有机溶剂中溶解性较好的有锂盐，季铵盐等。

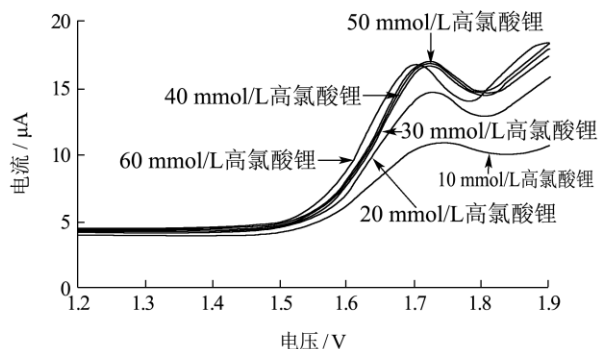


图4 支持电解质浓度对植物甾醇峰电流的影响

Fig.4 Effect of different concentrations of supporting electrolyte on peak current of phytosterols

注：试验条件-脉冲幅度50 mV、电位增量为3 mV、脉冲宽度为0.05 s、脉冲间隔为0.3 s，在含有LiClO<sub>4</sub>的乙腈-异丙醇(9:1, V/V)溶液中，植物甾醇浓度480 μg/mL。

本试验选择的支持电解质是LiClO<sub>4</sub>和LiCl，比较它们对植物甾醇的伏安电流影响，LiCl作为支持电解质时得到的甾醇CV曲线，峰形宽，峰电流小，而且在电势3 V左右出峰。选用LiClO<sub>4</sub>作为支持电解质，在电势1.7 V处出峰，峰形较好，故选用LiClO<sub>4</sub>作为支持电解质。为了更好地研究支持电解质LiClO<sub>4</sub>甾醇的性质影响，在选定范围浓度10~60 mmol/L高氯酸锂有机溶液进行差分脉冲伏安试验研究，结果如图4所示，甾醇氧化峰电流随着支持电解质浓度的增加而增大，但在浓度大于30 mmol/L后增加的趋势明显减小，当支持电解质浓度超过50 mmol/L后，甾醇氧化峰电位随着支持电解质浓度的增加略微负移且峰电流减小。综合考虑，选定50 mmol/L的高氯酸锂作为最佳支持电解质。

### 2.4 电参数的选择

差分脉冲伏安法能有效降低背景电流，具有较高的精确度和灵敏度，因此选择差分脉冲技术对植物甾醇进行检测分析。植物甾醇的差分脉冲伏安图(图5)，电位范围为1.2~2.0 V、脉冲幅度50 mV、电位增量为3 mV、脉冲宽度为0.05 s、脉冲间隔为0.3 s时，氧化峰电流响应最好，峰形尖锐。

综上所述，最终确定最佳电化学条件如下：50 mmol/L高氯酸锂的乙腈—异丙醇(9:1, V/V)为最佳电解溶液，其中高氯酸锂为支持电解质，脉冲幅度50 mV、电位增量为3 mV、脉冲宽度为0.05 s、脉冲间

隔为0.3 s。在此条件下，植物甾醇的峰形较好，峰电流值差大，可获得较高的灵敏度。

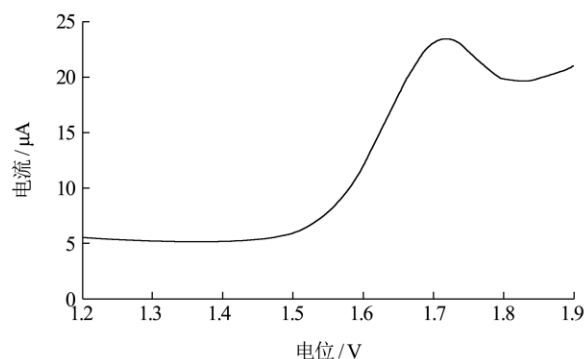


图5 植物甾醇的差分脉冲伏安图

Fig.5 Differential pulse voltammetry of phytosterols

注：试验条件-脉冲幅度50 mV、电位增量为3 mV、脉冲宽度为0.05 s、脉冲间隔为0.3 s，在含有50 mmol/L LiClO<sub>4</sub>的乙腈-异丙醇(9:1, V/V)溶液中，植物甾醇浓度720 μg/mL。

### 2.5 植物甾醇的线性回归方程

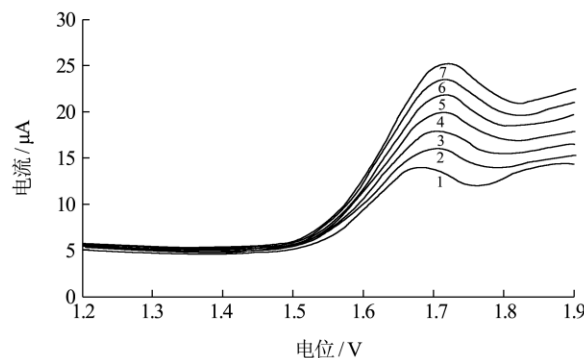


图6 不同浓度植物甾醇在玻碳电极上的差分脉冲伏安图

Fig.6 Differential pulse voltammetry of different concentrations of phytosterols using glassy carbon electrode

注：试验条件-脉冲幅度50 mV、电位增量为3 mV、脉冲宽度为0.05 s、脉冲间隔为0.3 s，在含有50 mmol/L LiClO<sub>4</sub>的乙腈-异丙醇(9:1, V/V)溶液中。1→7依次代表植物甾醇浓度160、240、320、480、640、720、800 μg/mL。

采用标准加入法，制备植物甾醇不同浓度标准样品。在优化试验条件下，记录植物甾醇在裸玻碳电极上的差分脉冲伏安图(如图6)，每一浓度样品试验重复三次，记录其氧化峰电流值的平均值，得到其氧化峰电流值与其对应浓度的线性校正模型(如图7)。所得线性回归方程： $I_p=0.0109x+0.9183$ ， $r=0.998$ 。灵敏度为 $1.09 \times 10^{-2} \mu A \cdot mL/\mu g$ ，最低检测限 $8.8 \mu g/mL$ ( $S/N=3$ )，线性范围160~800 μg/mL。

### 2.6 实际样品测定

在优化条件下，试验测得玉米胚芽油脱臭馏出物

的差分脉冲伏安图(图8),并采用标准加入法测定实际样品回收率,结果见表2,可知样品回收率在97.0~101.3%之间,可以满足分析测定的需要。为了进一步验证此方法的可行性,采用分光光度法分析同一样品,结果见表3。

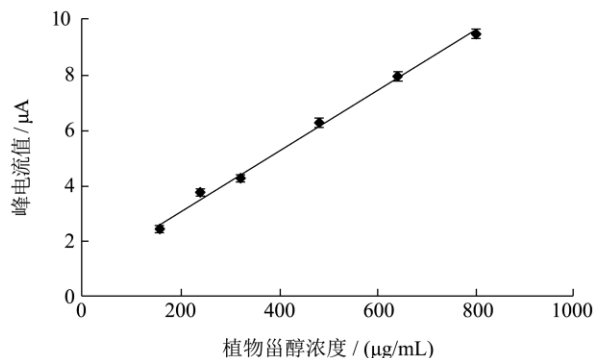


图7 植物甾醇浓度与峰电流值关系图

Fig7 Peak current values with different concentrations of phytosterol

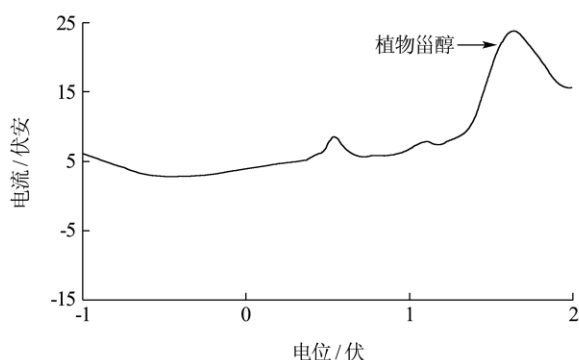


图8 玉米油脱臭馏出物的差分脉冲伏安图

Fig8 Differential pulse voltammetry of com oil deodorizer distillate

注: 试验条件-脉冲幅度50 mV、电位增量为3 mV、脉冲宽度为0.05 s、脉冲间隔为0.3 s, 在含有50 mmol/L LiClO<sub>4</sub>的乙腈-异丙醇(9:1, V/V)溶液中。a曲线为空白样品, b曲线为玉米胚芽油脱臭馏出物。

表2 电化学法对实际样品标准加入回收率的测定

Table 2 Electrochemical method to determine the standard addition recovery rate of sample

项目	样品编号					
	1	2	3	4	5	6
样品中甾醇含量(µg/L)	250	250	250	250	250	250
标样中甾醇含量(µg/L)	200	200	200	300	300	300
实际测定值(µg/L)	449.4	447.0	452.6	542.0	541.0	542.6
回收率/%	99.7	98.5	101.3	97.3	97.0	98.7

由表3可知, 电化学方法和分光光度法测得玉米胚芽油脱臭馏出物中植物甾醇含量基本一致, 分光光度法和电化学法测得甾醇的线性范围分别是 10~60

µg/mL、160~800 µg/mL, 最低检测限分别是 2 µg/mL、8.8 µg/mL, 虽然电化学方法的最低检出限较高, 但是操作程序要比分光光度法简便, 所需要的药品少, 消耗时间短, 结果准确。

表3 电化学法与分光光度法对相同质量脱臭馏出物中甾醇含量测定结果

Table 3 Comparison of electrochemical method and spectrophotometry for deodorizer distillate of the same quality

方法	分光光度法	电化学法
线性方程	$y = 0.0206x - 0.0713$	$y = 0.0109x + 0.9183$
相关系数	0.998	0.998
灵敏度	$2.06 \times 10^{-2} \text{ mL}/\mu\text{g}$	$1.09 \times 10^{-2} \mu\text{A} \cdot \text{mL}/\mu\text{g}$
线性范围	10~60 µg/mL	160~800 µg/mL
最低检出限	2 µg/mL	8.8 µg/mL
平均回收率/%	98.4	98.8
RSD/%	1.62	1.60
样品中甾醇含量/(g/kg)	170.32	166.74

### 3 结论

3.1 一般而言, 植物甾醇并不是一种电化学活性物质, 然而, 植物甾醇可以在含有高氯酸锂的乙腈-异丙醇溶液中, 裸玻碳电极上发生氧化反应, 且不可逆。当电势超过 1.7 V 时, 植物甾醇更活跃, 更容易发生氧化反应。且峰值高度与植物醇的浓度成一定比例, 所以这种方法可以应用到植物甾醇的定量分析。

3.2 本试验确定了电化学法测定植物甾醇最佳试验条件: 50 mmol/L 高氯酸锂的乙腈-异丙醇(9:1, V/V)为最佳电解溶液, 其中高氯酸锂为支持电解质, 脉冲幅度 50 mV、电位增量为 3 mV、脉冲宽度为 0.05 s、脉冲间隔为 0.3 s。利用差分脉冲伏安法, 确定植物甾醇的氧化峰电流与浓度之间的线性回归方程, 线性检测范围及最低检测限等。

3.3 用电化学方法实际测得玉米胚芽油脱臭馏出物中甾醇含量与分光光度法测得结果基本一致, 结果准确, 表明电化学分析法测定植物甾醇是可行的, 而且仪器设备简单, 价格低廉, 操作方便, 样品无需前处理, 测定结果精确度高。但是电化学法与色谱法相比较还存在一些不足, 电化学法只能测定总植物甾醇含量, 不能对制品中各甾醇组分进行分离定量, 所以电化学方法只能用于快速测定食品中总植物甾醇含量, 如果想分离定量各组分甾醇, 还需要与色谱仪联用, 这有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] Burruano B, Bruce RD, Hoy MR, et al. Method for Producing Water Dispersible Sterol Formulations [P]. US patent, 2000, 6: 054, 144
- [2] Holtz RL, Fink CS, Awad AB. Beta-sitosterol activates the sphingomyelin cycle and induces apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells [J]. *Nutr Cancer*, 1998, 32(1): 8-12
- [3] Klippel KF, Hiltl DM, Schipp B. A multicentric, placebocontrolled, double-blind trial of  $\beta$ -sitosterol for the treatment of benign prostatic hyperplasia [J]. *Br J Urol* 1997, 80: 427-432
- [4] Wilt TJ, MacDonald R, Ishani A. Beta-sitosterol for the treatment of benign prostatic hyperplasia: a systematic review [J]. *BJU Int.* 1990, 83: 976-983
- [5] Gupta MB, Nath R, Srivastava N, et al. Anti-inflammatory and antipyretic activities of beta-sitosterol [J]. *Educ*, 1980, 39: 157-163
- [6] Fernandes P, Cabral J M S. Phytosterols: applications and recovery methods [J]. *Bioresour. Technol*, 2007, 98: 2335-2350
- [7] 赵伟,韩敬美,刘春波,等.植物甾醇的分析方法研究进展[J].分析仪器,2012,(4):6-11  
ZHAO Wei, HAN Jing-mei, LIU Chun-bo, et al. The research progress in analysis methods of phytosterol [J]. *Analysis Instrument*, 2012, (4): 6-11
- [8] 陆柏益,杨佳佳,熊丽娜,甾醇阿魏酸酯的功能 制备及检测方法研究进展(J).现代食品科技,2013,29(12):3063-3069  
LU Bai-yi, YANG Jia-jia, XIONG Li-na. Bioactivity, synthesis, extraction and analysis of sterol ferulate: a review [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(12): 3063-3069
- [9] 李书国,袁涛,王丽然.电化学分析法同时测定植物油中的抗氧化剂TBHQ和VE[J].中国粮油学报,2013,28(5):90-94  
LI Shu-guo, YUAN Tao, WANG Li-ran. Simultaneous determination of TBHQ and VE in the vegetable oil with electrochemical method [J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2013, 28(5): 90-94
- [10] Kazuhiro Hojo, Hideki Hakamata, et al. Determination of total cholesterol in serum by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection [J]. *Chromatogr A*. 2007, 135-141
- [11] Nanako Ito, Hideki Hakamata, Fumiyo Kusu. Simultaneous determination of  $\beta$ -sitosterol, campesterol, stigmasterol, and brassicasterol in serum by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection [J]. *Anal. Methods*, 2010, 2: 174-179