

# 鸡蛋叶酸含量检测方法优化及其富集规律研究

白彦<sup>1</sup> 王瑞<sup>1,2</sup> 杨玉<sup>1\*</sup> 李锐瑞<sup>1</sup> 武笑天<sup>1</sup>

(1.山西农业大学动物科技学院,太谷 030801;2.吕梁学院生命科学系,吕梁 033000)

**摘要:** 本试验旨在建立简单、准确且较快速检测鸡蛋中叶酸含量的方法,并研究饲料中添加叶酸对鸡蛋叶酸含量的影响,以及1个生物学产蛋年叶酸在鸡蛋中的富集规律。试验方法:1) 基于高效液相色谱法,比较荧光检测器和紫外检测器的性能,比较超声、高温、酶解等提取方法及其组合对蛋黄叶酸检测值的影响,确定最佳检测方法。2) 选取30周龄京红蛋鸡648只,随机分为6组,每组6个重复,每个重复18只,分别饲喂在基础饲料中添加0(对照组)、1、3、6、12和24 mg/kg叶酸的试验饲料,试验期35 d,筛选生产富叶酸鸡蛋饲料中叶酸适宜添加量。3) 依据筛选结果,在16 000只蛋鸡舍选10个监测点,于20、21、22、23、24、25、27、29、33、37、41、46、50、55、60周龄检测鸡蛋叶酸含量。结果表明:1) 荧光检测器的检出限和定量限低于紫外检测器,峰面积和峰高极显著高于紫外检测器( $P<0.01$ )。高温和超声5 min+高温提取的蛋黄叶酸含量检测值显著高于超声5 min+酶解和高温+酶解( $P<0.05$ )。检测方法确定为超声5 min后90℃水浴5 min提取、荧光检测器检测,其精密度和稳定性的相对标准偏差(RSD)分别为2.15%和0.57%,回收率平均为98.01%。2) 6和12 mg/kg组鸡蛋叶酸含量极显著高于对照组和1 mg/kg组( $P<0.01$ ),与3和24 mg/kg组无显著差异( $P>0.05$ )。回归分析显示饲料叶酸添加量与全蛋叶酸含量存在极显著三次曲线关系(决定系数=0.679; $P<0.001$ )。3) 20~60周龄饲喂添加7.5 mg/kg叶酸的饲料,蛋黄叶酸含量在23周龄趋于饱和。20~33周龄,全蛋叶酸含量从36.9 μg/枚逐渐增加到87.7 μg/枚,之后基本稳定。综上所述:1) 本试验优化改进的检测鸡蛋中叶酸含量的方法操作简单,准确性高,较快速。2) 从20周龄起在京红蛋鸡饲料中添加7.5 mg/kg叶酸,23周龄后蛋黄叶酸含量保持在5 μg/g以上,33周龄后全蛋叶酸含量保持在85 μg/枚以上。

**关键词:** 蛋黄;5-甲基四氢叶酸;高效液相色谱;叶酸富集

中图分类号:S831;Q563

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2021)10-5838-11

叶酸(folate)是指一类含有蝶酰谷氨酸结构的水溶性维生素,也称为维生素B<sub>9</sub>、维生素H等,主要参与体内一碳单位代谢,与DNA合成、氨基酸转化、甲酸代谢、组氨酸分解、S-腺苷甲硫氨酸(SAM)合成及甲基化反应等有关,是生命体必需物质之一<sup>[1]</sup>。人体内没有叶酸合成相关酶,需要通过食物或添加剂获取叶酸。富含叶酸膳食主要

有绿色蔬菜、豆类食品、酵母、动物肝脏、蛋黄等<sup>[2]</sup>。鸡蛋营养丰富,氨基酸比例适合人体生理需求,是餐桌常见食物。功能性鸡蛋主要通过调节微量元素、维生素、不饱和脂肪酸等在蛋鸡饲料中的科学配比进行饲喂而得到,其营养价值高于普通鸡蛋。其中,富叶酸鸡蛋在我国<sup>[3]</sup>及加拿大<sup>[4]</sup>、美国<sup>[5]</sup>、欧洲<sup>[6-7]</sup>等地得到广泛研究和应用,

收稿日期:2021-03-18

基金项目:山西功能农业共性关键技术研究示范(201703D211001-05);山西省“1331”工程畜牧学重点学科建设(J202011315);山西省现代农业鸡产业技术体系(20211102);山西省高等学校科技创新项目(2019L0959)

作者简介:白彦(1985—),女,山西吕梁人,博士研究生,动物营养与饲料科学专业。E-mail: byshaxind@163.com

\*通信作者:杨玉,教授,博士生导师,E-mail: 345605203@qq.com

但尚未有该产品的国标或行标来规范其生产。

鸡蛋叶酸含量随饲料中叶酸添加量的增加而增加,但并非呈线性增加,而是存在饱和期,达到饱和期的饲料叶酸添加量为 $2\sim 16\text{ mg/kg}$ <sup>[3-6]</sup>。不同研究人员报道的鸡蛋叶酸含量结果差异较大,普通鸡蛋叶酸含量为 $17.5\sim 35.0\text{ }\mu\text{g/枚}$ ,富叶酸鸡蛋为 $41\sim 75\text{ }\mu\text{g/枚}$ ,但总的来讲,富叶酸鸡蛋中叶酸含量为普通鸡蛋的 $2\sim 3$ 倍<sup>[3-4,6,8-10]</sup>。这种差异可能与原料类型及来源、蛋鸡品种及日龄、检测方法等有关。多数研究持续时间为 $3\sim 14$ 周<sup>[3-11]</sup>,而蛋鸡产蛋周期在50周以上;我国居民消费鸡蛋多以“个”为单位,而鸡蛋大小对全蛋叶酸含量有很大影响。因此,需要对全产蛋期鸡蛋叶酸含量进行研究。

鸡蛋中叶酸的主要形式为5-甲基四氢叶酸(5-methyltetrahydrofolate, 5-MTHF),是人和动物体内的活性形式,且主要存在于蛋黄,蛋白中几乎没有<sup>[6,11]</sup>。食品中叶酸测定的国标法<sup>[12]</sup>规定,蛋类样品叶酸提取采用高压水解加酶解方法,检测方法采用微生物法,但整个检测过程至少需要5 d时间。酶解法是利用蛋白酶、淀粉酶等使叶酸从细胞中释放出来,随后利用大鼠血清等将多谷氨酸变成可检测的单谷氨酸或去谷氨酸形式<sup>[13-15]</sup>。酶解处理并不是对所有样品都适用,还可能对测定结果有负面影响<sup>[16]</sup>。蛋黄中蛋白质、脂肪含量较高,超声处理可降低其粒径,增大溶解表面积,促进其溶解性<sup>[17]</sup>,是叶酸提取中常用的辅助方法。然而超声可能对叶酸结构有一定的破坏<sup>[18-19]</sup>,需要严格控制时间。蛋黄叶酸主要与蛋白质结合<sup>[20-22]</sup>,高温可以使蛋白质变性,从而使叶酸释放于提取液中<sup>[18]</sup>,然而高温可降低叶酸稳定性,需添加维生素C等进行保护<sup>[3]</sup>。微生物检测法实验室工作繁杂,标准范围较窄,重复性较差,并不能准确评估食物中叶酸含量<sup>[23]</sup>。而高效液相色谱法检测结果精确,分析速度快,操作步骤简单,分离效果理想,逐渐成为主要的检测手段<sup>[13,24]</sup>。针对叶酸检测,紫外检测器<sup>[24-25]</sup>和荧光检测器<sup>[26-29]</sup>均有使用,但针对两者性能比较的报道较少。

本试验通过比较荧光检测器和紫外检测器的性能,研究超声、高温、酶解等提取方法对蛋黄叶酸含量检测的影响,旨在优化改进基于高效液相

色谱法测定鸡蛋中叶酸含量的方法。通过短期筛选试验,确定生产富叶酸鸡蛋饲料中叶酸的适宜添加量,随后开展大群饲养的长期稳定性试验,确定鸡蛋叶酸含量到达高峰的时间及稳定性,为蛋鸡1个生物学产蛋年生产稳定的富叶酸鸡蛋提供理论和实践依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

5-MTHF(标准品)购自加拿大TRC公司;甲醇(色谱级)购自美国Fisher公司;抗坏血酸(纯度99.0%)、巯基乙醇(纯度99.0%)、蛋白酶(pepsin, 1:3 000)、大鼠血清购自北京索莱宝科技有限公司; $\alpha$ -淀粉酶购自上海易恩化学技术有限公司;其他用于分离的试剂均为国产分析纯;水为4.5 L规格娃哈哈纯净水。

### 1.2 仪器与设备

1260 高效液相色谱仪配置荧光检测器和紫外检测器以及 Poroshell 120 EC-C18 色谱柱(4.6 mm $\times$ 150 mm, 4  $\mu\text{m}$ )(美国安捷伦科技有限公司)、冷冻干燥机(美国 GOLD-SIM 公司)、恒温水浴锅(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司)、超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)、冷冻离心机(盐城市安信实验仪器有限公司)、组织匀浆仪(IKA T10 basic, 德国 IKA 集团)、电子天平(BSA224S-CW, 德国赛多利斯集团)。

### 1.3 高效液相色谱法检测蛋黄中叶酸方法优化

#### 1.3.1 标准溶液配制

准确称取 10 mg 5-MTHF 标准品,用提取液<sup>[14]</sup>(0.1 mol/L 磷酸盐溶液,含 1% 抗坏血酸、0.1% 巯基乙醇,pH 6.1)溶解后定容到 100 mL,配制成质量浓度为 0.1 mg/mL 标准品储备液,-20  $^{\circ}\text{C}$  保存。将标准储备液稀释到 0.10、0.25、0.50、0.75、1.00、5.00、10.00  $\mu\text{g/mL}$  后存于棕色容量瓶中,现配现用,用于绘制标准曲线。

#### 1.3.2 高效液相色谱参考条件

柱温:35  $^{\circ}\text{C}$ ;进样体积:20  $\mu\text{L}$ ;流速:0.4 mL/min;流动相 A:甲醇;流动相 B:pH 4.5、0.03 mol/L 磷酸盐缓冲液;采用梯度洗脱<sup>[27]</sup>,如表 1 所示。荧光检测条件:激发波长 290 nm,发射波长 360 nm<sup>[28]</sup>;紫外检测条件:280、290 nm<sup>[25]</sup>。

表1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

时间 Time/min	流速 Flow rate/(mL/min)	流动相体积分数 Volume fractions of mobile phases/%	
		流动相 A Mobile phase A	流动相 B Mobile phase B
0	0.4	6	94
5	0.4	6	94
20	0.4	25	75
25	0.4	25	75
30	0.4	6	94
35	0.4	6	94

### 1.3.3 样品准备

检测体系构建使用普通京红一号鸡蛋的蛋黄冻干粉。具体为:蛋黄分离后,用滤纸小心擦干表面蛋清,混匀,于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存1 d后,上机冷冻干燥48 h(冷阱温度为 $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,真空度为10 Pa),于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

### 1.3.4 提取方法优化

准确称取0.5 g左右同一蛋黄冻干粉样品于15 mL离心管中,加6 mL提取液,匀浆。之后以超声、高温、酶解等方法及其组合进行叶酸提取,每个处理进行6次重复,以选择适宜提取方法。超声、高温、酶解提取的具体方法如下。

超声提取: $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、80 Hz。

高温提取: $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴5 min后在冰水中冷却。

酶解提取采用“三酶法”,按文献[12,15,30]提供的方法,略有改动,具体如下:加20 mg/mL蛋白酶溶液1 mL, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴3 h(每隔1 h摇匀1次),沸水浴10 min后冰水冷却至室温,加20 mg/mL淀粉酶溶液1 mL、大鼠血清0.3 mL, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴22 h,沸水浴10 min后冰水冷却至室温。

样品经提取处理后,用提取液定容到10 mL, $12\ 000\times g$ 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心25 min后取上清液,过 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜,上机检测。整个过程需要避光操作。

### 1.3.5 方法验证

从太谷区某超市购买白壳、粉壳和褐壳鸡蛋,乌鸡蛋等不同类型的鸡蛋各10枚,将每枚鸡蛋的蛋黄分离后,立即用上述优化方法对新鲜蛋黄中叶酸进行检测。

## 1.4 叶酸富集规律试验设计

试验在太谷区兴民牧业有限公司进行。添加

剂叶酸(纯度99.8%)为河北某生物科技有限公司生产。

试验鸡舍为半封闭式,采用阶梯式笼养模式,每笼3只蛋鸡,试验期间自由采食和饮水,每日光照16 h,强度不少于 $15\ \text{lx}/\text{m}^2$ 。

### 1.4.1 适宜添加量筛选试验

采用单因素试验设计,挑选初始体重一致的健康30周龄京红一号蛋鸡648只,随机分为6组,每组6个重复,每个重复18只。对照组饲喂基础饲料(表2),试验组在基础饲料中分别添加1、3、6、12、24 mg/kg叶酸。第5周最后1天每个重复随机取10枚鸡蛋,将其蛋黄混匀于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,进行叶酸含量检测。

表2 基础饲料组成及营养水平(风干基础)

Table 2 Composition and nutrient levels of the basal diet (air-dry basis) %

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
玉米 Corn	64.50
豆粕 Soybean meal	21.00
棉籽粕 Cottonseed meal	1.00
亚麻仁饼 Linseed meal	2.00
石粉 Limestone	9.66
氯化钠 NaCl	0.30
DL-蛋氨酸 DL-Met	0.14
L-赖氨酸硫酸盐 L-Lys · H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.04
氯化胆碱 Choline chloride	0.10
磷酸氢钙 CaHPO <sub>4</sub>	1.00
植酸酶 Phytase (5 000 U/g)	0.02
多维 Multi-vitamins <sup>1)</sup>	0.04
多矿 Multi-Minerals <sup>2)</sup>	0.20
合计 Total	100.00

续表 2

项目 Items	含量 Content
营养水平 Nutrient levels <sup>3)</sup>	
代谢能 ME/(MJ/kg)	11.08
粗蛋白质 CP	16.46
粗纤维 CF	3.00
粗脂肪 EE	2.89
粗灰分 Ash	12.61
钙 Ca	3.51
总磷 TP	0.50
有效磷 AP	0.22
赖氨酸 Lys	0.78
蛋氨酸 Met	0.39
蛋氨酸+半胱氨酸 Met+Cys	0.66
苏氨酸 Thr	0.58
叶酸 Folate/(mg/kg)	0.35

1) 多维为每千克饲料提供 Multi-vitamins provided the following per kg of the diet: VA 14 400 IU, VD<sub>3</sub> 5 400 IU, VK<sub>3</sub> 3.2 mg, VE 32 mg, VB<sub>1</sub> 2.4 mg, VB<sub>2</sub> 10 mg, VB<sub>6</sub> 4 mg, VB<sub>12</sub> 0.025 mg, 烟酸 nicotinic acid 48 mg, D-泛酸钙 D-calcium pantothenate 14 mg, 生物素 biotin 0.16 mg。

2) 多矿为每千克饲料提供 Multi-minerals provided the following per kg of the diet: Cu (as copper sulfate) 8 mg, Fe (as ferrous sulfate) 50 mg, Mn (as manganese sulfate) 100 mg, Zn (as zinc sulfate) 90 mg, I (as potassium iodide) 0.4 mg, Se (as sodium selenite) 0.36 mg, Co (as cobaltous sulfate) 0.26 mg。

3) 粗蛋白质、粗灰分、粗纤维、粗脂肪、钙、总磷、叶酸为实测值,其余为计算值。CP, Ash, CF, EE, Ca, TP and folate were measured values, while the others were calculated values.

#### 1.4.2 富叶酸鸡蛋叶酸含量的长期稳定性研究

根据 1.4.1 结果,选择 16 000 羽蛋鸡舍,从 20 周龄起,在蛋鸡饲料中添加 7.5 mg/kg 叶酸,至 60 周龄。在鸡舍内选择 10 个监测点,兼顾鸡舍上、下、前、后、南、北等。分别于 20、21、22、23、24、25、27、29、33、37、41、46、50、55、60 周龄 09:00—10:00,每个检测点取 10 枚鸡蛋,称重后,分离蛋黄与蛋清,蛋黄称重混匀后立即进行叶酸含量检测。

### 1.5 数据与分析

数据使用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。采

用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 和 Duncan 氏法进行组间多重比较和差异显著性分析。方法优化数据以平均值和标准差表示,叶酸富集数据以平均值和总体标准误表示。回归分析以叶酸添加量为变量,全蛋叶酸含量为因变量,进行线性、二次、三次等曲线估算。 $P < 0.05$  为差异显著, $P < 0.01$  为差异极显著。用 GraphPad Prism 8 进行绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 检测器性能比较与选择

以标准液叶酸含量为横坐标 ( $X$ ),所对应荧光检测器、紫外检测器峰面积 (重复进样 3 次的平均值) 为纵坐标 ( $Y$ ) 分别进行标准曲线绘制。将浓度为 0.10  $\mu\text{g/mL}$  的标准溶液,按 1.3.2 中的色谱条件测试 3 次,信噪比为 10:1 时的相应浓度为定量限 (LOQ),信噪比为 3:1 时的相应浓度为检出限 (LOD)。按照 1.3.2 中色谱条件,连续 10 d,每天检测 1 次 1  $\mu\text{g/mL}$  标准液,记录峰面积、峰高、半峰宽,比较检测器检测结果的稳定性,如表 3 所示。结果显示,在 0~10  $\mu\text{g/mL}$ ,荧光检测器、紫外检测器 280 nm 和紫外检测器 290 nm 这三者所得标准曲线的相关系数均达到 0.999。荧光检测器峰面积和峰高均极显著高于紫外检测器 ( $P < 0.01$ ),约是紫外检测器的 3.5 倍。紫外检测器在 290 nm 时峰面积显著高于在 280 nm 时 ( $P < 0.01$ ),两者峰高无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。三者半峰宽无显著差异 ( $P > 0.05$ )。荧光检测器的检出限和定量限远低于紫外检测器,表明其灵敏度更高。后续试验选用荧光检测器。

### 2.2 提取方法对检测结果的影响

由表 4 可知,样品匀浆后未进行任何处理和采用 B 提取方法未检出蛋黄叶酸。只对 C~G 提取方法进行分析,结果显示:蛋黄叶酸含量检测值以 D 提取方法最高,C 提取方法次之,再次为 E 提取方法,F 和 G 提取方法最低。C 和 D 提取方法的检测值显著高于 F 和 G 提取方法 ( $P < 0.05$ )。后续试验选用 D 提取方法,即超声 5 min 后 90  $^{\circ}\text{C}$  水浴 5 min 进行蛋黄叶酸提取,随后及时检测。5-MTHF 标准品和蛋黄样品色谱图如图 1 所示。

表3 检测器性能比较

Table 3 Comparison of detector performance

项目 Item	荧光检测器 Fluorescence detector	紫外检测器 280 nm UV detector 280 nm	紫外检测器 290 nm UV detector 290 nm	P 值 P-value
标准曲线 Standard curve	$Y=265.1X+4.744$	$Y=142.3X+7.614$	$Y=146.8X+5.498$	
相关系数 Correlation coefficient	0.999 6	0.999 9	0.999 7	
检出限 LOD/( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	0.001 4	0.07	0.05	
定量限 LOQ/( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	0.004 5	0.23	0.17	
峰面积 Peak area/(LU · s)	$448.61\pm 18.58^{\text{A}}$	$120.01\pm 4.14^{\text{C}}$	$134.92\pm 3.88^{\text{B}}$	<0.001
峰高 Peak height/LU	$14.52\pm 1.91^{\text{Aa}}$	$4.07\pm 0.48^{\text{Bb}}$	$4.54\pm 0.53^{\text{Bb}}$	<0.001
半峰宽 Half-peak breadth/min	$0.223\pm 0.022$	$0.212\pm 0.024$	$0.213\pm 0.023$	0.667

同行数据肩标无字母或相同字母表示无显著差异 ( $P>0.05$ ), 不同小写字母表示有显著性差异 ( $P<0.05$ ), 不同大写字母表示差异极显著 ( $P<0.01$ )。

In the same row, values with no letter or the same letter superscripts mean no significant difference ( $P>0.05$ ), while with different small letter superscripts mean significant difference ( $P<0.05$ ), and with different capital letter superscripts mean extremely significant difference ( $P<0.01$ ).

表4 提取方法对检测结果的影响

Table 4 Effects of extraction method on detection result

样品叶酸提取方法 Extraction methods of folate from samples	叶酸含量 Folate content/( $\mu\text{g}/\text{g}$ )
A: 未处理 Untreated	
B: 超声 10 min Sonicate for 10 min	
C: 高温 (90 °C 水浴 5 min) Water bath at 90 °C for 5 min	$4.304\pm 0.199^{\text{a}}$
D: 超声 5 min+高温 Sonicate for 5 min followed by heat treatment	$4.322\pm 0.133^{\text{a}}$
E: 超声 10 min+高温 Sonicate for 10 min followed by heat treatment	$3.892\pm 0.278^{\text{ab}}$
F: 超声 5 min+酶解 Sonicate for 5 min followed by enzymolysis	$3.694\pm 0.074^{\text{b}}$
G: 高温+酶解 Heat treatment followed by enzymolysis	$3.744\pm 0.333^{\text{b}}$
P 值 P-value	0.043

同列数据不同小写字母表示显著差异 ( $P<0.05$ ), 不同大写字母表示差异极显著 ( $P<0.01$ )。表 8 同。

In the same column, values with different small letter superscripts mean significant difference ( $P<0.05$ ), and with different capital letter superscripts mean extremely significant difference ( $P<0.01$ ). The same as Table 8.

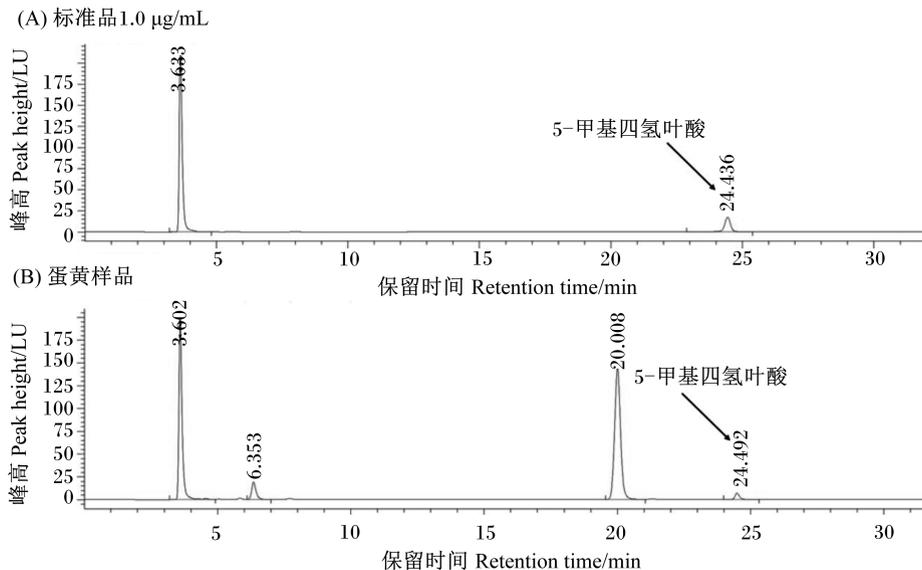


图1 5-MTHF 标准品和蛋黄样品色谱图

Fig.1 Chromatogram of 5-MTHF standard and yolk sample

### 2.3 精密度、回收率和稳定性

用 2.1 和 2.2 中确定的方法,检测同一蛋黄冻干粉样品中叶酸含量,并在样品中加 1  $\mu\text{g}$  5-MTHF 标准品,进行回收率测定,重复测定 8 次,

结果如表 5 所示。样品回收率平均为 98.01%,相对标准偏差(RSD)为 4.42%,同一样品检测结果 RSD 为 2.15%。上述结果表明优化的检测方法精密度和回收率均能满足检测要求。

表 5 精密度与回收率试验  
Table 5 Precision and recovery test

项目 Items	检测值 Detection value	相对标准偏差 RSD/%
样品叶酸含量 Sample folate content/( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	3.979 $\pm$ 0.086	2.15
加标样品叶酸含量 Spiked sample folate content/( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	5.854 $\pm$ 0.069	1.18
回收率 Recovery/%	98.01 $\pm$ 4.33	4.42

由于样品处理与检测不能完全同步,随后进行了稳定性试验。样品提取后立即检测(0 d)以及 1、2 d(4  $^{\circ}\text{C}$  保存)后进行检测,每次 3 个重复。由表 6 可知,连续 3 d 的检测结果差异很小,稳定性较高。

表 6 稳定性试验  
Table 6 Stability test

时间 Time/d	叶酸含量 Folate content/( $\mu\text{g}/\text{g}$ )
0	4.185 $\pm$ 0.006
1	4.186 $\pm$ 0.051
2	4.176 $\pm$ 0.008
相对标准偏差 RSD/%	0.571

### 2.4 方法验证

对市场常见的鸡蛋类型蛋黄叶酸含量进行检测,用于验证方法可行性,结果如表 7 所示。

表 7 常见蛋类叶酸含量  
Table 7 Content of folate in common eggs

项目 Items	蛋黄叶酸含量 Yolk folate content/( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	全蛋叶酸含量 Whole egg folate content/( $\mu\text{g}/\text{个}$ )
乌鸡蛋 Silkie eggs	2.942 $\pm$ 0.235	49.20 $\pm$ 4.47
白壳鸡蛋 White shell eggs	2.427 $\pm$ 0.313	42.39 $\pm$ 7.46
粉壳鸡蛋 Pink shell eggs	2.977 $\pm$ 0.663	49.48 $\pm$ 7.34
褐壳鸡蛋 Brown shell eggs	2.282 $\pm$ 0.436	38.80 $\pm$ 7.40

### 2.6 富叶酸鸡蛋在蛋鸡产蛋期叶酸含量稳定性

从 20 周龄产蛋开始,在基础饲料中添加叶酸 7.5 mg/kg,至 60 周龄,定期检测鸡蛋叶酸含量,测

### 2.5 鸡蛋中叶酸富集规律

由表 8 可知,蛋鸡饲料中添加叶酸 1 ~ 24 mg/kg 可以极显著提高蛋黄和全蛋叶酸含量 ( $P < 0.01$ ),但并非随着饲料叶酸添加量的增加而直线上升,在 6 ~ 12 mg/kg 组达到最高值后,在 24 mg/kg 组呈现下降的趋势。本试验中,叶酸添加量为 3 ~ 24 mg/kg 的 4 个组的蛋黄叶酸及全蛋叶酸含量无显著差异 ( $P > 0.05$ ),但 6 mg/kg 组全蛋叶酸含量比 3 mg/kg 组提高 8.5%,与 12 mg/kg 组差异很小,考虑到生产成本问题,需在理论上估测生产富叶酸鸡蛋的蛋鸡饲料叶酸适宜添加量。

对全蛋叶酸含量进行回归分析,结果如表 9 所示。结果显示,在 0 ~ 24 mg/kg 叶酸添加量范围内,全蛋叶酸含量对饲料叶酸添加量的响应呈二次和三次曲线变化,且三次曲线的决定系数高于二次曲线,因此选择三次曲线的回归模型计算鸡蛋中叶酸富集量最高时对应的蛋鸡饲料叶酸添加量,确定 7.5 mg/kg 为适宜添加量。

定结果如图 2 所示。结果显示,蛋黄叶酸含量在 23 周龄趋于稳定,在 25 周龄达到最高值,在 25 ~ 60 周龄,蛋黄叶酸含量有较小波动,且随着日龄增

加,略有下降,但整体保持在  $5 \mu\text{g/g}$  以上。全蛋叶 蛋重和蛋黄重增加幅度较小,全蛋叶酸含量基本  
酸含量随着日龄的增加而增加,在 33 周龄以后, 稳定,即每个鸡蛋可提供  $85 \mu\text{g}$  以上的叶酸。

表 8 饲料中添加叶酸对鸡蛋叶酸含量的影响

Table 8 Effects of folic acid supplementation on folate content in eggs

叶酸添加量 Folate supplemental levels/(mg/kg)	蛋黄叶酸含量 Yolk folate content/( $\mu\text{g/g}$ )	全蛋叶酸含量 Whole egg folate content/( $\mu\text{g}/\text{个}$ )
0	1.589 <sup>Aa</sup>	27.63 <sup>Aa</sup>
1	2.720 <sup>Bb</sup>	44.44 <sup>Bb</sup>
3	3.666 <sup>BCc</sup>	57.92 <sup>BCc</sup>
6	4.030 <sup>Cc</sup>	62.89 <sup>Cc</sup>
12	3.893 <sup>Cc</sup>	63.55 <sup>Cc</sup>
24	3.296 <sup>BCc</sup>	56.61 <sup>BCc</sup>
SEM	0.154	2.502
<i>P</i> 值 <i>P</i> -value	<0.001	<0.001

表 9 全蛋叶酸含量与饲料叶酸添加量的回归模型

Table 9 Regression models for folate content in whole eggs and dietary folic acid supplemental level

回归模型 Regression models <sup>1)</sup>	决定系数 Determinant coefficient $R^2$	<i>P</i> 值 <i>P</i> -value	叶酸添加量 Folic acid supplemental level/(mg/kg) <sup>2)</sup>
$Y=46.30+0.77X$	0.185	0.009	
$Y=36.88+4.78X-0.17X^2$	0.564	<0.001	13.5~14.5
$Y=31.02+10.83X-0.96X^2+0.023X^3$	0.679	<0.001	7.5~8.5

1)  $Y$  为全蛋叶酸含量 ( $\mu\text{g}/\text{枚}$ ),  $X$  为饲料叶酸添加量 (mg/kg)。 $Y$  indicated whole egg folate content ( $\mu\text{g}/\text{egg}$ );  $X$  indicated dietary folic acid supplemental level.

2) 根据回归方程计算的鸡蛋中叶酸富集量最大时的叶酸添加量范围。The range of folic acid supplemental level in diet was calculated according to the regression equation at the highest concentration of folate in eggs.

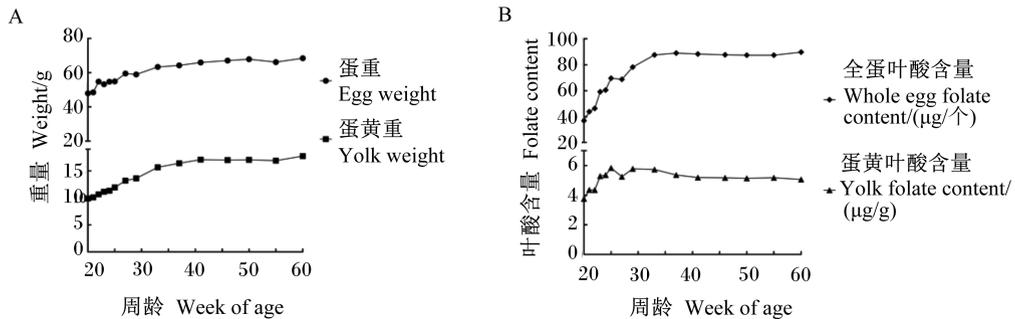


图 2 生产周期内富叶酸鸡蛋蛋重、蛋黄重及叶酸含量

Fig.2 Egg weight, yolk weight and folate content of folate enriched eggs during production cycle

### 3 讨论

#### 3.1 检测条件及提取方法的优化

叶酸本身具有荧光性<sup>[14]</sup>,不需要任何衍生方法即可用荧光检测器进行检测,具备更低的检测

限<sup>[16]</sup>,干扰峰较少<sup>[27]</sup>。叶酸在紫外 210~300 nm 均有吸收,在 280<sup>[24]</sup>和 290 nm<sup>[25]</sup>峰形较好、检测灵敏度高。本试验中,荧光检测器在检出限、定量限、峰型等方面均优于紫外检测器。试验过程中,蛋黄样品检测液中叶酸含量在  $0.125 \mu\text{g}/\text{mL}$  以

上,远高于荧光检测器的定量限,满足检测要求。

对蛋黄样品只进行超声处理时不能达到检出限,表明超声处理虽然能够使提取液与样品更好地接触,但不能释放叶酸。本试验中,超声 10 min 后高温提取的检测结果低于超声 5 min,表明超声可能对叶酸结构有一定的破坏<sup>[18-19]</sup>,因此需要严格控制超声时间。酶解处理也能释放叶酸,而本试验中酶解处理后的检测结果显著低于高温处理,可能与样品中干扰物质有关,使叶酸没有完全释放<sup>[16]</sup>,也可能与处理时间较长使少量叶酸氧化降解有关。

Hoey 等<sup>[6]</sup>利用微生物法测得鸡蛋中叶酸含量为 0.60  $\mu\text{g/g}$ ,折合到 1 个鸡蛋(蛋重 50~70 g)为 30~40  $\mu\text{g}$ ; Jastrebova 等<sup>[31]</sup>利用高效液相色谱法测得蛋黄中叶酸含量为 2.26  $\mu\text{g/g}$ ,折合到 1 个鸡蛋(蛋黄重 15~20 g)为 35~45  $\mu\text{g/枚}$ ;梁敏慧<sup>[15]</sup>利用液质联用(LC-MS)法测得鸡蛋中叶酸含量为 0.823  $\mu\text{g/g}$ ,折合到 1 个鸡蛋为 41~57  $\mu\text{g}$ ;杨艳<sup>[3]</sup>利用 LC-MS 法测得鸡蛋中叶酸含量约为 36  $\mu\text{g/枚}$ 。本试验利用优化的方法测得不同类型鸡蛋中叶酸含量有差异,可能与蛋鸡品种、饲料组成、叶酸添加等有关,但总体在 39~49  $\mu\text{g/枚}$ ,与前人研究结果基本一致,说明方法可行。此方法准确性高,与国标法<sup>[12]</sup>相比,操作简单,检测时间缩短。

### 3.2 生产富叶酸鸡蛋饲料叶酸适宜添加量及生产周期内鸡蛋叶酸含量的稳定性

饲料中添加的叶酸经肠道吸收后,在肠上皮细胞经二氢叶酸还原酶的作用转化为四氢叶酸后经门静脉进入肝脏,转化为各种形式参与机体物质代谢,其中 5-MTHF 从肝细胞进入血液后,随血液循环到机体各个组织器官发挥重要作用。5-MTHF 转运至鸡卵巢后,经胞吞作用进入卵黄而达到富集作用<sup>[2]</sup>。已有研究显示,鸡蛋中叶酸含量随着饲料中叶酸添加量的增加而增加,但到达一定量后不再增加<sup>[3-8,11]</sup>,与本试验结果一致。叶酸在肠道吸收受到限制可能是导致鸡蛋中叶酸含量存在平台期的一个因素<sup>[32]</sup>。不同品种蛋鸡对叶酸的敏感度可能不同。白菜航鸡饲料中添加 2 mg/kg 叶酸时,蛋黄叶酸含量达到饱和<sup>[5]</sup>;海兰 W36、海兰 W98、海兰 CV20 生产富叶酸鸡蛋时,饲料中叶酸适宜添加量均为 4 mg/kg<sup>[3-4,33]</sup>;海兰褐蛋鸡饲料中添加 16 mg/kg 叶酸时鸡蛋叶酸含

量最高,且达到平台期<sup>[6]</sup>。本试验以京红蛋鸡为研究对象,蛋黄叶酸含量在饲料叶酸添加量为 3 mg/kg 时趋于饱和,在叶酸添加量为 6 mg/kg 时达到最高。但为追求最大生产效益,根据统计学分析结果,选择 7.5 mg/kg 作为生产富叶酸鸡蛋的饲料叶酸适宜添加量。蛋黄自形成到从卵巢排出需要 10 d 左右,因而蛋黄中叶酸富集并达到平衡需要一定时间。Hoey 等<sup>[6]</sup>研究显示,饲料添加叶酸第 3 周,鸡蛋叶酸含量达到饱和;Dickson 等<sup>[33]</sup>研究表明,蛋鸡高峰期(25~28 周龄)饲喂添加 4 mg/kg 叶酸饲料 4 周后,全蛋及蛋黄叶酸含量达到最高值,随后每 8 周进行 1 次检测(共 5 次)的结果差异较小,与本试验结果基本一致。33 周龄后每枚鸡蛋可提供叶酸 85  $\mu\text{g}$  以上,根据国家卫生健康委员会推荐的居民膳食营养素参考摄入量<sup>[34]</sup>计算,可满足幼儿至正常成人叶酸推荐量的 50%~20%。

## 4 结 论

① 基于高效液相色谱法对叶酸含量进行检测,荧光检测器性能优于紫外检测器。蛋黄叶酸的提取方法以超声 5 min 后 90  $^{\circ}\text{C}$  水浴 5 min 效果最好。

② 从 20 周龄起在京红蛋鸡饲料中添加 7.5 mg/kg 叶酸,23 周龄后蛋黄叶酸含量保持在 5  $\mu\text{g/g}$  以上,33~60 周龄全蛋叶酸含量保持在 85  $\mu\text{g/枚}$  以上。

## 参考文献:

- [1] ZAITSEV A V, MARTINOV M V, VITVITSKY V M, et al. Rat liver folate metabolism can provide an independent functioning of associated metabolic pathways[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 1-18.
- [2] NADERI N, HOUSE J D. Recent developments in folate nutrition[J]. Advances in Food and Nutrition Research, 2018, 83: 195-213.
- [3] 杨艳. 叶酸在鸡蛋中的转化富集及加工稳定性研究[D]. 硕士学位论文. 无锡: 江南大学, 2020: 34-39. YANG Y. Study on the transformation and enrichment of folate in eggs and its processing stability[D]. Master's Thesis. Wuxi: Jiangnan University, 2020: 34-39. (in Chinese)
- [4] HOUSE J D, BRAUN K, BALLANCE D M, et al. The Enrichment of eggs with folic acid through supplement-

- tation of the laying hen diet [J]. *Poultry Science*, 2002, 81(9):1332-1337.
- [ 5 ] SHERWOOD T A, ALPHIN R L, SAYLOR W W, et al. Folate metabolism and deposition in eggs by laying hens [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1993, 307(1):66-72.
- [ 6 ] HOEY L, MCNULTY H, MCCANN E M, et al. Laying hens can convert high doses of folic acid added to the feed into natural folates in eggs providing a novel source of food folate [J]. *British Journal of Nutrition*, 2009, 101(2):206-212.
- [ 7 ] DORA A R M, BARBARA M B. Fortification of eggs with folic acid as a possible contribution to enhance the folic acid status of populations [J]. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 2007, 77(4):297-301.
- [ 8 ] BAGHERI S, JANMOHAMMADI H, MALEKI R, et al. Laying hens performance, egg quality improved and yolk 5-methyl tetrahydrofolate content increased by dietary supplementation of folic acid [J]. *Animal Nutrition*, 2019(5):130-133.
- [ 9 ] ALTIC L, MCNULTY H, HOEY L, et al. Validation of folate-enriched eggs as a functional food for improving folate intake in consumers [J]. *Nutrients*, 2016, 8(777):1-10.
- [ 10 ] HEBERT K, HOUSE J D, GUENTER W. Effect of dietary folic acid supplementation on egg folate content and the performance and folate status of two strains of laying hens [J]. *Poultry Science*, 2005, 84(10):1533-1538.
- [ 11 ] STRANDLER H S, JASTREBOVA J, MATTISSON I. Folate content in swedish eggs: influence of breed, feed and processing [J]. *European Food Research and Technology*, 2011, 233(6):923-930.
- [ 12 ] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品中叶酸的测定:GB 5009.211—2014 [S]. 北京: 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 2015: 2-7.  
National Health and Family Planning Commission. National food safety standards determination of folate in food; GB 5009.211—2014 [S]. Beijing: National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, 2015:2-7. (in Chinese)
- [ 13 ] SAINI R K, NILE S H, KEUM Y S. Foliates: chemistry, analysis, occurrence, biofortification and bioavailability [J]. *Food Research International*, 2016; 89(1):1-13.
- [ 14 ] DOHERTY R F, BEECHER G R. A method for the analysis of natural and synthetic folate in foods [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(2):354-361.
- [ 15 ] 梁敏慧. 食品中叶酸、烟酸、生物素及泛酸的 UPLC-MS/MS 检测方法研究 [D]. 硕士学位论文. 北京: 北京工业大学, 2015:10-12.  
LIANG M H. Determination of folate, nicotinic acid, biotin and pantothenic acid in food by using UPLC-MS/MS [D]. Master's Thesis. Beijing: Beijing University of Technology, 2015:10-12 (in Chinese)
- [ 16 ] 王博伦, 顾丰颖, 刘子毅, 等. 食品中叶酸测定方法的研究进展 [J]. *食品科学*, 2020, 41(9):303-309.  
WANG B L, GU F Y, LIU Z Y, et al. Advance in determination of folate in food [J]. *Food Science*, 2020, 41(9):303-309. (in Chinese)
- [ 17 ] 唐世涛. 超声联合蛋白酶酶解对蛋黄粉溶解性及乳化稳定性的影响 [D]. 硕士学位论文. 武汉: 华中农业大学, 2019:7.  
TANG S T. Effect of ultrasound combined with protease enzymatic hydrolysis on solubility and emulsifying stability of egg yolk powder [D]. Master's Thesis. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2019:7. (in Chinese)
- [ 18 ] 常韶燕, 李佰一, 姚秀英, 等. 组织叶酸检测方法的建立及应用 [J]. *现代生物医学进展*, 2019, 9(7):56-60.  
CHANG S Y, LI B Y, YAO X Y, et al. Establishment and application of tissue folic acid detection method [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2019, 9(7):56-60. (in Chinese)
- [ 19 ] 邵丽华, 王莉, 白文文, 等. 小米叶酸提取与测定方法的研究 [J]. *食品工业科技*, 2013, 34(18):253-261.  
SHAO L H, WANG L, BAI W E, et al. Study in extraction and detection of folic acid in millet [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 34(18):253-261. (in Chinese)
- [ 20 ] NADERI N, DOYEN A, HOUSE J D, et al. The use of high hydrostatic pressure to generate folate-enriched extracts from the granule fraction of hen's egg yolk [J]. *Food Chemistry*, 2017, 232:253-262.
- [ 21 ] NADERI N, HOUSE J D, POULIOT Y. Scaling-up a process for the preparation of folate-enriched protein extracts from hen egg yolks [J]. *Journal of Food Engineering*, 2014, 141(11):85-92.
- [ 22 ] NADERI N, POULIOT Y, HOUSE J D, et al. High hydrostatic pressure effect in extraction of 5-methyltet-

- rahydrofolate (5-MTHF) from egg yolk and granule fractions [J]. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2017, 43: 191–200.
- [23] UPADHYAYA P, TYAGI K, SARMA S, et al. Natural variation in folate levels among tomato (*Solanum lycopersicum*) accessions [J]. *Food Chemistry*, 2016, 217: 610–619.
- [24] 崔娜. 食物烹调与叶酸损失研究 [D]. 硕士学位论文. 大连: 大连工业大学, 2018: 27–30.
- CUI N. The loss of folic acid caused by storage and cooking [D]. Master's Thesis. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2018: 27–30. (in Chinese)
- [25] 张毅. 叶菜中叶酸含量的 HPLC 测定条件优化及不同处理方式对叶酸保留效果研究 [D]. 硕士学位论文. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016: 12–14.
- ZHANG Y. Determination of folates in leafy vegetables by high-performance liquid chromatography (HPLC) and the effect of different processes on folates retention [D]. Master's Thesis. Yangling: North West Agriculture and Forestry University, 2016: 12–14. (in Chinese)
- [26] 张剑韵, 黄龙全. 四氢叶酸和 5-甲基四氢叶酸高效液相色谱分析方法的建立与应用 [J]. *安徽农业大学学报*, 2004, 03: 8–12.
- ZHANG J Y, HUANG L Q. Establishment and utilization of analytic method of tetrahydrofolate and 5-methyltetrahydrofolate by high performance liquid chromatography [J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2004, 31(3): 258–262. (in Chinese)
- [27] JASTREBOVA J, WITTHOEFT C, GRAHN A, et al. HPLC determination of folates in raw and processed beetroots [J]. *Food Chemistry*, 2003, 80(4): 579–588.
- [28] LENA S, HANNA Å, CORNELIA M, et al. Folate determination in Swedish berries by radioprotein-binding assay (RPBA) and high performance liquid chromatography (HPLC) [J]. *European Food Research and Technology*, 2003, 216(3): 264–269.
- [29] MORALES P, FERNÁNDEZ-RUIZ V, SÁNCHEZ-MATA M C, et al. Optimization and application of FL-HPLC for folates analysis in 20 species of mediterranean wild vegetables [J]. *Food Analytical Methods*, 2015, 8(2): 302–311.
- [30] 孟繁磊, 张玲, 张原宇, 等. 大豆叶酸的三酶法提取及微生物检测技术研究 [J]. *粮食与饲料工业*, 2016(12): 56–59.
- MENG F L, ZHANG L, ZHANG Y Y, et al. Three enzyme-assisted extraction of folate from soybean and microbial detection methods [J]. *Cereal and Feed Industry*, 2016(12): 56–59. (in Chinese)
- [31] JASTREBOVA J, STRANDLER H S, PATRING J, et al. Comparison of UPLC and HPLC for analysis of dietary folates [J]. *Chromatographia*, 2011, 73(6): 219–225.
- [32] TACTACAN G B. Characterization of factors influencing the regulation of dietary folic acid deposition in the eggs [D]. Ph. D. Thesis. Winnipeg: University of Manitoba, 2011: 143–144.
- [33] DICKSON T M, TACTACAN G B, HEBERT K, et al. Optimization of folate deposition in eggs through dietary supplementation of folic acid over the entire production cycle of HY-Line W36, HY-Line W98, and CV20 laying hens [J]. *The Journal of Applied Poultry Research*, 2010, 19(1): 80–91.
- [34] 国家卫生健康委员会. 中华人民共和国卫生行业标准 中国居民膳食营养素参考摄入量 第 5 部分: 水溶性维生素: WS/T 578.5—2018 [S]. 北京: 中华人民共和国国家卫生健康委员会, 2018: 5
- National Health Commission. People's Republic of China health industry standard Reference intake of dietary nutrients for Chinese residents Part 5: water-soluble vitamins: WS/T 578.5—2018 [S]. Beijing: National Health Commission of the People's Republic of China, 2018: 5. (in Chinese)

# Optimization of Method for Folate Content Determination in Eggs and Study on Its Enrichment Rule

BAI Yan<sup>1</sup> WANG Rui<sup>1,2</sup> YANG Yu<sup>1\*</sup> LI Ruirui<sup>1</sup> WU Xiaotian<sup>1</sup>

(1. College of Animal Science, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China; 2. Department of Life Sciences, Lyuliang University, Lyuliang 033000, China)

**Abstract:** This experiment aimed to develop a simple, accurate and relatively fast determination method for folate in eggs, to study the effect of dietary folate supplementation on the folate content in eggs, and to study the enrichment rules of folate in eggs during the period of egg-laying. Experimental methods: 1) The optimal detection method was determined by comparing the performance of fluorescence detector and ultraviolet detector of high-performance liquid chromatography, and comparing the detection value of folate in yolks extracted by sonicate, heat treat (water-bath at 90 °C), enzymatic hydrolysis and their combination. 2) The suitable dietary folic acid supplemental level for folate-enriched eggs production was screened under the feeding experiment lasted for 35 days. Six hundred and forty-eight *Jinghong* laying hens (30 weeks of age) were randomly divided into 6 groups with 6 replicates in each group and 18 hens in each replicate. Laying hens in one group (control group) was fed a basal diet, while those in the other five groups were fed the basal diet supplemented with 1, 3, 6, 12 and 24 mg/kg folic acid, respectively. 3) Given these results of screening test, a long-term experiment was conducted by feeding 16 000 laying hens (20 to 60 weeks of age) with 7.5 mg/kg folic acid supplementation in the diet, and detecting the content of folate in 10 egg monitoring points at 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 29, 33, 37, 41, 46, 50, 55 and 60 weeks of age. The results showed as follows: 1) the limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) of fluorescence detector were lower, and the peak area and peak height of fluorescence detector were extremely significantly higher than those of ultraviolet (UV) detector ( $P<0.01$ ). The detected value of folate content in yolk extracted by heat treatment and sonicate for 5 min+heat treatment was significantly higher than that extracted by sonicate for 5 min+enzymolysis and heat treat treatment+enzymolysis ( $P<0.05$ ). The best condition for extracting folate from yolk was 5 min of sonicate followed by 5 min of 90 °C water bath, and the fluorescence detector had good detection performance. The relative standard deviation (RSD) of precision and stability were 2.15% and 0.57%, respectively; the spiked recoveries averaged 98.01%. 2) The folate content in eggs of 6 and 12 mg/kg groups were extremely significantly higher than those of control group and 1 mg/kg group ( $P<0.01$ ), and there was no significant difference with 3 and 24 mg/kg groups ( $P>0.05$ ). Regression analysis showed that there was an extremely significant cubic linear relationship between dietary folic acid supplemental level and whole egg folate content (determinate coefficient=0.679;  $P<0.001$ ). 3) Adding 7.5 mg/kg folic acid to laying hen diet from 20 to 60 weeks of age, the content of folate in yolk tended to be saturated at 23 weeks of age, and the content of folate in whole egg gradually increased from 36.9 µg/egg at 20 weeks of age to 87.7 µg/egg at 33 weeks of age, then remained stable. In conclusion: 1) the egg folate detection method determined in this experiment is simple to operate, high accuracy accurate and rapid. 2) Due to add 7.5 mg/kg folic acid to diet from 20 weeks of age, the folate content in yolk remains at more than 5 µg/g from 23 weeks of age, and the folate content in whole egg remains at more than 85 µg/egg from 33 weeks of age. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33 (10):5838-5848]

**Key words:** yolk; 5-methyltetrahydrofolate; high performance liquid chromatography; folate enrichment