

# 直接皂化-比色法测定鸡蛋黄中胆固醇含量

何春玫

(广西农业职业技术学院, 广西南宁 530007)

**摘要:**采用正交实验优化各项技术参数,建立了直接皂化-比色法测定鸡蛋黄中胆固醇含量的分析方法。结果表明,鸡蛋黄中胆固醇提取的最优工艺条件为:料液比为1:10(W:V),提取时间为1 h,提取温度为35℃,挥发温度为65℃,测得每100 g鸡蛋黄的胆固醇含量为1 609 mg;回收率为95.41%,RSD为3.77%。此方法操作简单、快速、准确。

**关键词:**胆固醇;直接皂化法;比色法;蛋黄

**中图分类号:**TS207.3

**文献标识码:**A

**文章编号:**1004-874X(2011)09-0110-04

## Analysis of cholesterol in egg yolk by direct saponification-colorimetric method

HE Chun-mei

(Guangxi Agricultural Vocational and Technical Institute, Nanning 530007, China)

**Abstract:** Orthogonal experiment was used to optimize technical parameters for the establishment of direct saponification-colorimetric method for measuring cholesterol content in egg yolk. The results showed that the optimum technical conditions were as follows: ratio of egg yolk and petroleum ether 1:10 (W:V), extractive time 1 h, extractive temperature 35℃ and volatilized temperature 65℃. The recovery was 95.41%, and RSD was 3.77%. The method for measuring cholesterol content in egg yolk was simple, fast and accurate.

**Key words:** cholesterol; direct saponification method; colorimetric method; egg yolk

鸡蛋是营养最丰富的食品之一,然而蛋黄的高胆固醇含量也引起广泛的关注。据最新报道,每个大鸡蛋含有213 mg胆固醇<sup>[1]</sup>,蛋黄的胆固醇含量大约为9.21~22.8 mg<sup>[2]</sup>。

目前对食品胆固醇含量测定的方法主要有化学比色法、酶测定法和色谱法等。酶测定法的特点是敏感、专一、快速,并能实现自动化分析,但酶法技术要求较高,不适合作为常用的检测方法;色谱法(如薄层层析法、气象色谱法和液相色谱法)对试剂和仪器要求高,且仪器维护费用也相当昂贵,普通实验室难以承受,且操作步骤也较复杂,难以推广应用;而化学比色法简单易行、重现性好,在一般实验室就可以进行。因此,我们借鉴硫磷铁显色剂比色法直接测定血清胆固醇的方法,对鸡蛋蛋黄中胆固醇总含量测定方法进行探讨,采用正交实验优化各项技术参数,建立了直接皂化-比色法测定鸡蛋黄中胆固醇含量的分析方法。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 试验材料

主要仪器:VIS-7220型可见分光光度计,北京瑞利分析仪器公司;AL204电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;恒温水箱,上海安亭科学仪器厂。

主要试剂:胆固醇原液:称取干燥恒重结晶胆固醇100 mg,用甲醇溶解后移入100 mL容量瓶定容,贮存于密闭棕色瓶内,置于4℃冰箱保存;铁贮存液:称取三氯化铁2.5 g,溶于87%浓磷酸钠并定容至100 mL,贮存于密

闭棕色瓶,常温下保存;硫磷铁显色剂:吸取贮存液8 mL,加浓硫酸至刻度100 mL;10%氢氧化钾溶液:称取10 g氢氧化钾先溶解再定容至100 mL;无水乙醇、石油醚、甲醇等;以上试剂均为分析纯。

#### 1.2 试验方法

**1.2.1 鸡蛋黄胆固醇的提取和测定** 参考吴卫平等<sup>[3]</sup>的方法,取1个鸡蛋去蛋清,将蛋黄打碎。准确称取3 g蛋黄匀液,置于25 mL比色管内,加蒸馏水溶解并定容至刻度摇匀,得到蛋黄稀释液。准确吸取1 mL蛋黄稀释液于50 mL烧杯中,加入3 mL 10%氢氧化钾溶液及10 mL无水乙醇溶液搅匀,在60℃水浴直接皂化1 h(每隔15 min搅拌1次)后取出,冷却后置于一定温度下水浴,加入一定量石油醚溶剂,用玻璃棒搅拌均匀,萃取一段时间,吸取上清液于分液漏斗中,用蒸馏水重复冲洗3次,量取上清液总体积后再吸取0.5 mL于小烧杯,置水浴锅60℃下挥干,残渣加入2 mL甲醇溶液和2 mL硫磷铁显色剂。加硫磷显色剂时,要沿壁慢慢加入,等其与甲醇分层后,立即摇匀,以便产生足够热量(>80℃)使显色完全。冷却至室温后,以溶剂代替蛋黄稀释液作空白,用分光光度计在550 nm波长下比色。按照以下公式计算胆固醇含量:

$$\text{蛋黄中胆固醇含量(mg/100g)} = \frac{C \times 4 \times 2 \times V \times 25 \times 100}{W \times 1000}$$

式中,C为提取液中胆固醇的浓度(μg/mL),V为提取液体积(mL),W为蛋黄匀液质量(g)。

**1.2.2 标准曲线绘制** 取浓度为1 mg/mL的胆固醇原液,在临用时用甲醇稀释成0.04 mg/mL胆固醇标准母液。吸取胆固醇标准母液0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mL(相当于胆固醇0、16、32、48、64、80 μg)分别移入25 mL比色管,用甲醇定容至2 mL,再沿管壁缓慢加入2 mL硫磷铁显色

收稿日期:2011-03-16

基金项目:广西教育厅科研项目(201010LX666)

作者简介:何春玫(1975-),女,硕士,讲师,E-mail:hcm2063285@

yahoo.com.cn

剂,迅速摇匀,冷却至室温后,以甲醇作空白用分光光度计在 550 nm 波长处测定吸光度,绘制标准曲线,结果见图 1,标准液胆固醇浓度在 0~20  $\mu\text{g/mL}$  的范围时符合郎伯-比尔定律,线性回归方程为  $y=0.0286x-0.0071$ ,  $R^2=0.9991$ 。

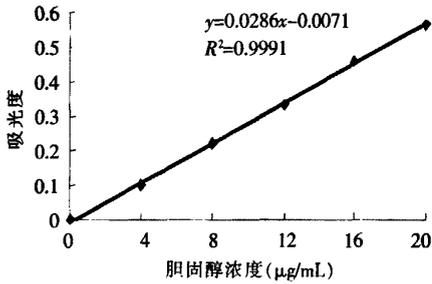


图 1 胆固醇标准曲线

**1.2.3 显色剂用量试验** 准确称取 3 g 蛋黄匀液,按 1.2.1 试验流程在 60℃水浴皂化 1 h 后,按 1:10 料液比加入石油醚提取 1 h,将提取液 0.5 mL 在 60℃下挥干,残渣加入 2 mL 甲醇溶液再分别沿壁慢慢加入 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 mL 硫磷显色剂,等与其甲醇分层后,立即摇匀,以便产生足够热量(>80℃)使显色完全。冷却至室温后,以溶剂作空白用分光光度计于 550 nm 波长下比色,以确定显色剂最佳用量。

**1.2.4 稳定性试验** 准确称取 3 g 蛋黄匀液,按 1.2.1 试验流程在 60℃水浴皂化 1 h 后,按 1:10 料液比加入石油醚提取 1 h,将提取液 0.5 mL 在 60℃下挥干,残渣加入 2 mL 甲醇溶液再加入 2 mL 硫磷显色剂。冷却至室温后,以溶剂作空白用分光光度计于 550 nm 波长下每隔 15 min 测 1 次,分别测定 0.25、0.5、0.75、1、1.25、1.5、1.75、2、2.25 h 的吸光度。

**1.2.5 单因素试验 (1)料液比的影响。**准确称取 3 g 蛋黄匀液,按 1.2.1 试验流程在 60℃水浴皂化 1 h 后,分别按料液比 (W:V)1:6、1:8、1:10、1:12、1:14 加入石油醚,在 30℃下水浴浸提 1 h,将提取液在 60℃下挥干后进行测定,计算胆固醇含量,确定最佳料液比。

(2)提取温度的影响。准确称取 3 g 蛋黄匀液,按 1.2.1 试验流程在 60℃水浴皂化 1 h 后,加入 10 mL 石油醚分别在 25℃、35℃、45℃、55℃下水浴浸提 1 h,将提取液在 60℃下挥干后进行测定,计算胆固醇含量,确定最佳提取时间。

(3)提取时间的影响。准确称取 3 g 蛋黄匀液,按 1.2.1 试验流程在 60℃水浴皂化 1 h 后,加入 10 mL 石油醚分别在 30℃下水浴浸提 0.5、1.0、1.5、2.0 h,将提取液在 60℃下挥干后进行测定,计算胆固醇含量,确定最佳提取时间。

(4)挥干温度的影响。准确称取 3 g 蛋黄匀液,按 1.2.1 试验流程在 60℃水浴皂化 1 h 后,按 1:10 料液比加入石油醚在 30℃下水浴浸提 1 h,将提取液分别在 50℃、55℃、60℃、65℃、70℃下挥干后进行测定,计算胆固醇含量,确定最佳挥干温度。

**1.2.6 正交实验** 根据单因素试验结果,选择对鸡蛋中胆

固醇提取有影响的因素最佳水平附近的 3 个水平,采用正交实验设计,进行工艺优化。

**1.2.7 精密度和重复性试验 (1)精密度试验。**随机取同一品种 1~2 个鸡蛋,除蛋清,取蛋黄液匀浆,按照 1.2.1 试验流程,进行 5 次平行试验,每隔 5 min 在分光光度计下测 1 次,定量测定胆固醇含量,计算相对标准偏差 RSD,考察试验的精密度。

(2)重复性试验。准确称取 6 份鸡蛋黄浆样,按 1.2.1 方法提取胆固醇,分别测定各提取液吸光度  $A_{550}$ ,定量测定胆固醇含量,计算 RSD,考察试验的重复性。

**1.2.8 回收率试验** 准确称取已测定胆固醇含量的蛋黄液 0.15 g,共 5 份,各加入 2.5 mL 胆固醇标准原液,按 1.2.1 方法测定胆固醇含量,计算回收率及 RSD,评价试验方法的准确度。

## 2 结果与分析

### 2.1 波长的选择

吸取胆固醇标准溶液 2 mL,操作同试验方法,然后在不同的波长下(460~640 nm)以甲醇溶液和硫磷铁显色剂作空白进行测定各吸光度,结果见表 1,胆固醇在 550 nm 处有最大吸光度,所以本试验选用 550 nm 的波长。

表 1 胆固醇标准溶液在不同波长下的吸光度

波长(nm)	吸光度	波长(nm)	吸光度
460	0.375	560	0.524
480	0.414	580	0.412
500	0.454	600	0.350
520	0.462	620	0.275
540	0.489	640	0.247
550	0.568		

### 2.2 显色剂用量试验

在同一试验条件下,显色剂用量为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 mL 时,吸光度分别为 0.236、0.360、0.524、0.507、0.516、0.499。可见,显色剂用量在 2~3.5 mL 范围内测定结果变化不大,取 2.0 mL 为最佳,因此本试验选择显色剂用量取 2.0 mL。

### 2.3 稳定性试验

将胆固醇提取液在自然光条件下,每隔 15 min 测定 1 次溶液吸光度,结果见图 2。由图 2 可知,提取液中胆固醇的吸光度在 0.25 h 内随测定时间逐渐变小,2 h 内吸光

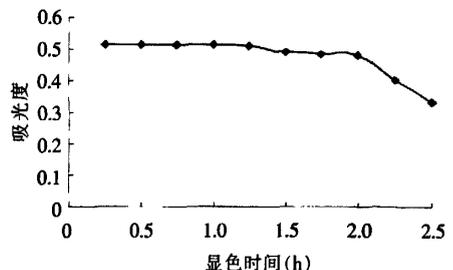


图 2 显色时间对胆固醇测定的影响

度变化较小,但2 h后吸光度开始明显下降。因此,加入显色剂冷却至室温后的2 h内必须比色完毕。

2.4 单因素试验

2.4.1 料液比的影响 以料液比1:6、1:8、1:10、1:12在相同工艺下提取鸡蛋胆固醇并测定含量,结果见图3。可见,胆固醇的提取量随着提取溶剂量的增加而增大,当料液比达到10 mL后再增加溶剂对胆固醇的提取量影响不大,因此可选择料液比为1:10进行提取,以减少溶剂的使用。

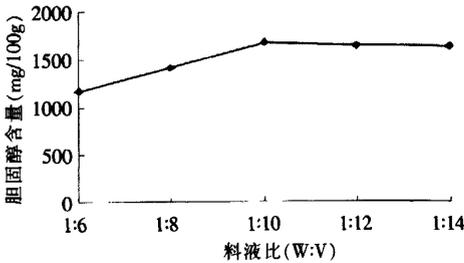


图3 料液比对蛋黄胆固醇提取的影响

2.4.2 提取时间的影响 鸡蛋浆液经0.5、1.0、1.5、2.0 h提取后,测得胆固醇含量结果见图4。由图4可见,在0.5 h内,胆固醇的提取量随提取时间的延长而增大,提取1 h后胆固醇含量是提取2 h的103%,说明胆固醇的提取过程在1 h内已基本完成。为减少提取引起的误差,本试验提取时间采用1 h。

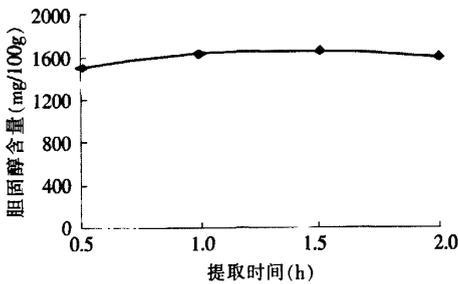


图4 提取时间对蛋黄胆固醇提取的影响

2.4.3 提取温度的影响 鸡蛋浆液经在25℃、35℃、45℃、55℃下水浴浸提1 h后,测得胆固醇含量结果见图5。由图5可知,随提取温度的提高,胆固醇提取量先增大后减小,35℃时达最大,在55℃下提取1 h后已基本挥发干。为减少提取温度引起的误差,本试验提取温度采用35℃。

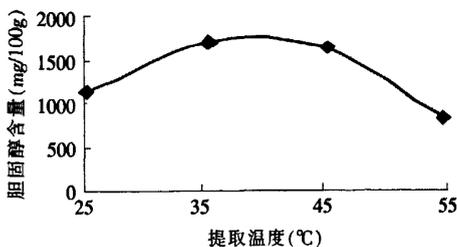


图5 提取温度对蛋黄胆固醇提取的影响

2.4.4 挥干温度的影响 将胆固醇提取液分别在50℃、55℃、60℃、65℃、70℃下挥干后,测得胆固醇含量结果见图6。由图6可知,随着挥干温度升高,胆固醇提取量先增大后减小,60℃时提取量最大,因此本试验挥干温度采用60℃。

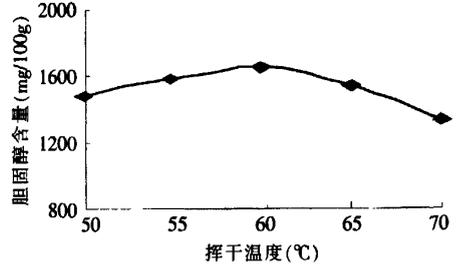


图6 挥干温度对蛋黄胆固醇提取的影响

2.5 正交实验设计

通过单因素试验结果可知,在鸡蛋蛋黄胆固醇提取过程中,料液比、提取时间、提取温度和挥干温度对鸡蛋中胆固醇的提取效果均有较大影响。选择以上4个因素的最佳水平附近的3个水平进行正交实验,以确定鸡蛋蛋黄胆固醇提取最佳工艺条件。正交实验因素水平设计见表2。

表2 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交实验因素水平

水平	因素			
	A (料液比,W:V)	B (提取时间,h)	C (提取温度,°C)	D (挥干温度,°C)
1	1:8	1.0	25	55
2	1:10	1.5	35	60
3	1:12	2.0	45	65

从正交实验结果和极差分析结果(表3)可以看出,本试验研究的4个因素均对鸡蛋胆固醇的提取效果有影响,其影响程度主次顺序是:C(提取温度)> A(料液比)> D(挥干温度)> B(萃取时间)。以提取量高为选择标准,最佳工艺组合是A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>,即料液比为1:10,提取时间为1 h,提取温度为35℃、挥干温度为65℃,测得每100 g鸡蛋

表3 正交实验结果分析

试验号	A	B	C	D	胆固醇含量 (mg/100g)
1	1:8	1	25	55	857
2	1:8	1.5	35	60	1466
3	1:8	2	45	65	1332
4	1:10	1	35	65	1609
5	1:10	1.5	45	55	1548
6	1:10	2	25	60	1226
7	1:12	1	45	60	1462
8	1:12	1.5	25	65	903
9	1:12	2	35	55	1524
k <sub>1</sub>	1218	1309	995	1310	
k <sub>2</sub>	1461	1306	1533	1385	
k <sub>3</sub>	1296	1361	1447	1281	
R	242.67	55.00	537.67	103.33	

胆固醇含量为 1 609 mg。而单因素试验综合结果却显示,  $A_2B_2C_2D_2$  组合的提取效果更好, 但挥干温度和萃取时间的影响较小。

## 2.6 精密度和重复性试验

**2.6.1 精密度试验** 随机取同一品种 1~2 个鸡蛋打碎除蛋清, 匀浆蛋黄液, 按照 1.2.1 试验流程, 进行 5 次平行试验, 每隔 5 min 用分光光度计测 1 次, 结果见表 4。由表 4 可知, 5 次平行试验可测得每 100 g 鸡蛋黄中胆固醇含量平均值为 1 598 mg, 相对标准偏差 *RSD* 为 1.27%, 说明试验精密度较高。

表 4 精密度和重复性分析

序号	胆固醇含量(mg/100g)	
	精密度分析	重复性分析
1	1592	1593
2	1598	1618
3	1607	1625
4	1601	1612
5	1592	1624
6		1603
平均值	1598	1613
<i>RSD</i> (%)	1.27	2.09

**2.6.2 重复性试验** 准确称取 6 份鸡蛋黄浆样, 按 1.2.1 方法提取胆固醇, 分别测定各提取液吸光度  $A_{550}$ , 结果见表 4。由表 4 可知, 6 次重复试验测得每 100 g 鸡蛋黄中胆固醇平均含量为 1 613 mg, 相对标准偏差 *RSD* 为 2.09%, 说明试验重复性较好。

## 2.7 加标回收率测定试验

准确称取已测定胆固醇含量的蛋黄液 5 份(每 100 g

鸡蛋黄胆固醇含量为 1 648 mg)进行回收试验, 测得平均回收率为 95.41%, *RSD* 为 3.77%, 方法准确度较好(表 5)。

表 5 加标回收率测定

称样量 (g)	样品中胆固醇 含量(mg)	标准品加 入量(mg)	测得总 含量(mg)	回收 率(%)	平均回收 率(%)	<i>RSD</i> (%)
0.1530	2.477	2.50	5.02	96.68	95.41	3.77
0.1505	2.480	2.50	4.94	101.22		
0.1502	2.475	2.50	4.82	91.86		
0.1512	2.492	2.50	4.90	92.52		
0.1508	2.485	2.50	4.85	94.75		

## 3 结语

本试验将比色法改进后定量测定鸡蛋黄中胆固醇含量, 样品处理比已有的方法简单、准确。通过采用正交实验优化了料液比、萃取时间、提取温度和挥干温度等条件, 确定鸡蛋黄中胆固醇提取的最优工艺条件为料液比 1:10、提取时间 1 h、提取温度为 35℃、挥干温度为 65℃, 测得每 100 g 鸡蛋黄胆固醇含量为 1 609 mg。此方法的优点是: 取样量少、直接皂化就可测定、操作程序简单、仪器要求不高、精密度高和准确度, 是一种鸡蛋黄胆固醇可行、有效、快速的测定方法。

### 参考文献:

- [1] 谢飞, 张红霞. 降低鸡蛋胆固醇研究回顾与展望[J]. 中国家禽, 2007, 29(19): 30-36.
- [2] 张蓉真, 李珑, 刘树滔, 等. 测定鸡蛋胆固醇的高效液相色谱新方法[J]. 色谱, 1998, 3(2): 91-94.
- [3] 吴卫平, 照那斯图. 选择离子模式气相色谱/质谱法测定鸡蛋中胆固醇含量[J]. 中国饮食卫生与健康, 2005, 3(2): 49-51.

## 中科院植物研究所在高等植物光合作用捕光色素蛋白转运的分子机制研究中取得重要进展

高等植物叶绿体是进行光合作用的细胞器。叶绿体有 2 500~3 000 个蛋白, 95% 以上的蛋白是由核基因编码的。核基因编码的叶绿体蛋白首先在细胞质中合成, 并通过叶绿体内外被膜和类囊体膜转运通道运输到叶绿体内, 从而行使功能。但是一些关键的参与光合作用光能吸收和转化的色素蛋白复合物如何通过特异的转运机制进入叶绿体, 还远没有得到揭示。

捕光色素蛋白复合物是光合膜蛋白中含量最高的色素蛋白复合体, 它在光能吸收、传递、激发能在两个光系统中均衡分配具有重要作用。不仅如此, 它在光能有效耗散光保护中也具有重要功能。但是, 捕光色素蛋白如何转运到叶绿体内并实现其功能的机制还不清楚。

中科院植物研究所张立新研究组及其合作者最近研究发现

了高等植物光合作用捕光色素蛋白被膜转运途径分选进入人类囊体膜转运途径的重要转运蛋白 LTD。LTD 是随着光合生物捕光色素蛋白出现后特异进化而来的, 其功能在于识别捕光色素蛋白特异性的 T14 基序, 从而协助捕光色素蛋白的叶绿体跨内膜转运, 并转运到信号颗粒识别转运途径上, 确保捕光色素蛋白的精确定位和组装成功能复合物。

这一发现不仅对于植物如何实现光能有效吸收和利用具有重要的意义, 而且加深了对叶绿体蛋白转运机制的认识。

该成果于近日在国际著名期刊《自然—通讯》在线发表(Nature Communications. 2:277 doi: 10.1038/ncomms1278 (2011))。该项研究工作得到科技部、国家自然科学基金委和中国科学院太阳能行动计划的资助。