

离子色谱法测定饲料中氯化胆碱和三甲胺的含量

丁永胜^{1, 2}, 牟世芬¹

(1. 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085; 2. 北京大学药学院化学生物系, 北京 100083)

摘要:建立了离子色谱法测定饲料中氯化胆碱含量及鉴别饲料中氯化胆碱及掺假物三甲胺的方法。选用 IonPac CS12 阳离子交换色谱柱(250 mm×4 mm i.d.)和 8.5 mmol/L H₂SO₄ 淋洗液, 抑制型电导检测, 在 16 min 内分离测定了包括胆碱和三甲胺在内的 8 种阳离子。胆碱和三甲胺的最小检出限分别为 0.1 mg/L 和 0.05 mg/L。方法回收率为 99.25%~102.5%。该方法具有灵敏度高、选择性强、操作简单等优点。

关键词:离子色谱; 氯化胆碱; 三甲胺; 饲料

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2004)02-0174-03

Determination of Choline Chloride and Trimethylamine in Feedstuff by Ion Chromatography

DING Yongsheng^{1, 2}, MOU Shifen¹

(1. Research Center for Eco-Environmental Sciences, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China;
2. Department of Chemical Biology, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract: A method was developed for the determination of choline chloride (CC) and trimethylamine (TMA) in feedstuff by ion chromatography. The separation of eight ions including Li⁺, Na⁺, NH₄⁺, K⁺, TMA, choline, Mg²⁺ and Ca²⁺ was achieved by using an IonPac CS12 column (250 mm×4 mm i.d.) and 8.5 mmol/L H₂SO₄ as eluent. Cations were detected by suppressed conductivity detection. The limits of detection of CC and TMA were 0.1 mg/L and 0.05 mg/L, respectively. The method recoveries were between 99.25% and 102.5%. The method was sensitive, selective and simple. The results of sample analysis showed that the method was very useful for the authenticating of choline chloride in feedstuffs.

Key words: ion chromatography; choline chloride; trimethylamine; feedstuffs

氯化胆碱(choline chloride)化学名称为 2-羟基乙基-三甲胺盐酸盐,是动物生长过程中不可缺少的一种水溶性维生素。它在生物体内具有不可替代的基本功能,主要体现在 3 个方面:它是细胞膜的组成成分之一,构成卵磷脂和鞘磷脂(构成体内磷脂的 70%~80%);能促进脂肪的分解(避免脂肪肝);是乙酰胆碱的主要成分,可传递神经信号。当动物体内胆碱不足时,将出现胆碱缺乏症,动物表现为生长受阻、营养不良、繁殖力差和脂肪肝等。因此,满足动物体内胆碱需要量,对于维持动物健康成长和正常生产力具有重要意义。虽然天然饲料原料中都存在胆碱,但其数量不足以满足动物的生长需要,添加氯化胆碱已成为最直接和最经济的补充胆碱方式。氯化胆碱的用量比任何维生素的量都大。在饲料工业中,胆碱通常以氯化胆碱的形式添加。目前我国氯化胆碱添加剂主要是含有 50%氯化胆碱的粉剂。

目前饲料添加剂氯化胆碱的检测方法有非水滴定法、银量法、四苯硼钠法、雷氏盐比色法和雷氏盐重量法等^[1]。现行检测标准(行业标准 HG2941-1999 和国家标准 GB10818-89)均采用化学法间接测定其中的氯化胆碱,方法缺少选择性,干扰因素多,无法鉴别掺入的廉价无机氯化物和胺类等物质^[1]。近几年随着市场的供大于求,一些不法厂商在压低价格的同时,在氯化胆碱中掺入其他低成本物质如三甲胺、铵盐或氯化物原料等,这种掺假的氯化胆碱用行业标准和国家标准检测无法发现问题,但饲料中使用掺假的氯化胆碱会使养殖户蒙受经济上的损失,因此如何有效识别氯化胆碱的掺假,得出氯化胆碱的真实含量对于饲料行业来说具有重要的现实意义。文献中有关胆碱的测定多集中于生物样品(血液或脑组织液),采用的方法有气相色谱-质谱联用(GC-MS)^[2,3]、高效液相色谱-电化学检测(HPLC-

收稿日期: 2003-06-11

作者简介: 丁永胜,男,博士。

通讯联系人: 牟世芬,女,研究员,博士生导师, Tel: (010)62849239, E-mail: shifenm@mail.rcees.ac.cn.

ED)^[4~7]、液相色谱-快原子轰击质谱(HPLC-FABMS)^[8],以及酶法^[9,10]和化学发光法^[11,12]等,采用离子交换分离和电导检测的方法较少。本方法采用抑制型阳离子交换色谱法测定饲料中的氯化胆碱和常见掺假物三甲胺的含量,方法简便,结果准确。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Bio LC 离子色谱仪(Dionex 公司,美国),包括GS50 四元梯度输液泵,ED50 电化学检测器(电导模式),LC25 色谱柱恒温箱,CSAS-II 自动再生电抑制器;采用电导检测。硫酸(98%,优级纯)、氯化胆碱(分析纯)、三甲胺(分析纯)、盐酸(36%,优级纯)均购自北京化学试剂公司;去离子水(电阻率在18 MΩ·cm以上)。超声振荡器(昆山市超声仪器有限公司)。氯化胆碱粉剂和饲料样品由国家饲料检测中心提供。

1.2 色谱分离条件

分离柱:IonPac CS12 阳离子交换色谱柱(250 mm×4 mm i. d.);流动相:8.5 mmol/L H₂SO₄;流速1.0 mL/min;进样体积25 μL;柱压7.5~8.2 MPa(1 100~1 200 psi);CSAS-II 自动再生电抑制器;检测方式:电导检测(背景电导值80~100 nS)。

1.3 标准溶液的制备

分别称取氯化胆碱和三甲胺33 mg和25 mg,溶于去离子水中,定容至25 mL,制成氯化胆碱和三甲胺两者质量浓度均为1 000 mg/L的混合标准储备液。用去离子水稀释成0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 50.0 mg/L的混合标准溶液。

1.4 样品溶液的制备

称取干燥氯化胆碱粉剂0.1 g,置于100 mL的带塞锥形瓶中,精密加入0.1 mol/L HCl 50 mL,然后超声30 min,过滤,弃去初滤液,取滤液0.5 mL于50 mL容量瓶中,加去离子水稀释至刻度,作为待测溶液。称取干燥饲料0.5 g,置于100 mL带塞锥形瓶中,精密加入0.1 mol/L HCl 50 mL,然后超声30 min,过滤,取续滤液作为待测溶液。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

胆碱的化学结构式如图1。胆碱在普通的正、反相HPLC色谱柱上几乎不被保留。在酸性介质中可以阳离子形态存在,因此可用阳离子交换色谱分离。由于氯化胆碱分子中无任何发色团,不能直接用分光光度法检测,但在水溶液中以离子形式存在,

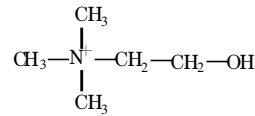


图1 胆碱结构式

Fig. 1 The structure of choline

因此检测方式采用电导检测。

由于样品中包含一些常见阳离子,如K⁺, Na⁺, NH₄⁺, Mg²⁺和Ca²⁺等,在选择分离条件时,必须考虑这些常见离子的干扰问题。本实验选用常规阳离子交换色谱柱IonPac CS12A为分离柱。因为三甲胺和胆碱在IonPac CS12A柱上的保留时间在K⁺和Mg²⁺之间,为了消除K⁺和Mg²⁺对三甲胺和胆碱的干扰,应选用较弱的淋洗液,即较稀的H₂SO₄溶液,但淋洗液浓度小于7.5 mmol/L时,样品中的Mg²⁺和Ca²⁺的保留时间会超过20 min。实验表明淋洗液的浓度为8.5 mmol/L H₂SO₄时,常见阳离子、胆碱和三甲胺在16 min之内得到很好分离。图2是胆碱、三甲胺和6种常见阳离子标准色谱图。

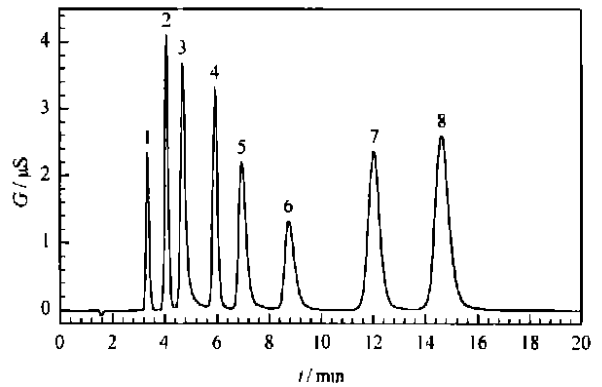


图2 8种标准离子混合溶液的色谱分离图

Fig. 2 Chromatogram of a standard mixture of eight ions

Both of the concentrations of choline and trimethylamine are 5.0 mg/L. Column: IonPac CS12 (250 mm×4 mm i. d.); eluent: 8.5 mmol/L H₂SO₄; flow rate: 1.0 mL/min; injection volume: 25 μL.

1. Li⁺; 2. Na⁺; 3. NH₄⁺; 4. K⁺; 5. trimethylamine; 6. choline; 7. Mg²⁺; 8. Ca²⁺.

2.2 线性范围、相关系数、最小检出量

考察胆碱和三甲胺在0.5~50 mg/L内与峰面积的线性关系,两者的线性方程分别为 $y = -0.02236 + 0.04423x$ 和 $y = -0.03126 + 0.09643x$ (其中, y 为峰面积, x 为组分的质量浓度(mg/L));相关系数为0.9998和0.9996;两者的最小检出限分别为0.1 mg/L和0.05 mg/L。

2.3 方法精密度和回收率

以纯玉米芯为基体,添加不同量的氯化胆碱和三甲胺,经过提取、过滤和稀释后进样分析,结果见表1。从数据中可以看出该方法具有很好的准确度和精密性。

表 1 方法回收率和精密度结果

Table 1 The results of the recovery and precision

Analyte	Added/g	Found/g	Recovery/%	RSD/%
Choline chloride	0.1011	0.1007	99.60	1.23
	0.1004	0.1001	99.70	
	0.0545	0.0542	99.45	
	0.0531	0.0527	99.25	
	0.0137	0.0138	100.7	
Trimethylamine	0.0118	0.0121	102.5	0.74
	0.0955	0.0948	99.26	
	0.0979	0.0975	99.59	
	0.0533	0.0534	100.2	
	0.0520	0.0517	99.42	
	0.0165	0.0164	99.39	
	0.0171	0.0173	101.2	

2.4 样品分析

分析了不同产地的氯化胆碱添加剂和饲料(色谱图见图 3),测定结果见表 2。将离子色谱法测得氯化胆碱含量与雷氏盐沉淀法和高氯酸非水滴定法的测定结果进行比较。3 种方法测定氯化胆碱粉剂 1[#] 中的氯化胆碱含量基本一致,说明这种样品中的氯化胆碱质量较好。相反,在氯化胆碱粉剂 2[#] 样品中,高氯酸非水滴定法测定结果高于其他两种方法,是由于掺入氯化钠等所致。离子色谱法可以同时测定饲料样品中微量的氯化胆碱和三甲胺,而其他两种常规分析方法不易测定饲料中微量的氯化胆碱或三甲胺,雷氏盐沉淀法则对三甲胺的检测无效。

表 2 样品分析结果

Table 2 The results of the sample analysis

Analyte	Method	w (Analyte)/%			
		choline chloride powder 1 [#]	choline chloride powder 2 [#]	feedstuff 1 [#]	feedstuff 2 [#]
Choline chloride	ion chromatography	62.19	17.32	ND ²⁾	0.43
	gravimetric analysis	61.37 ¹⁾	16.59 ¹⁾	—	—
	non-aqueous titration	61.92 ¹⁾	50.42 ¹⁾	—	—
Trimethylamine	ion chromatography	3.41	3.23	0.52	0.06

1) The data were obtained from the China National Feed Quality Control Center. 2) ND; not detected.

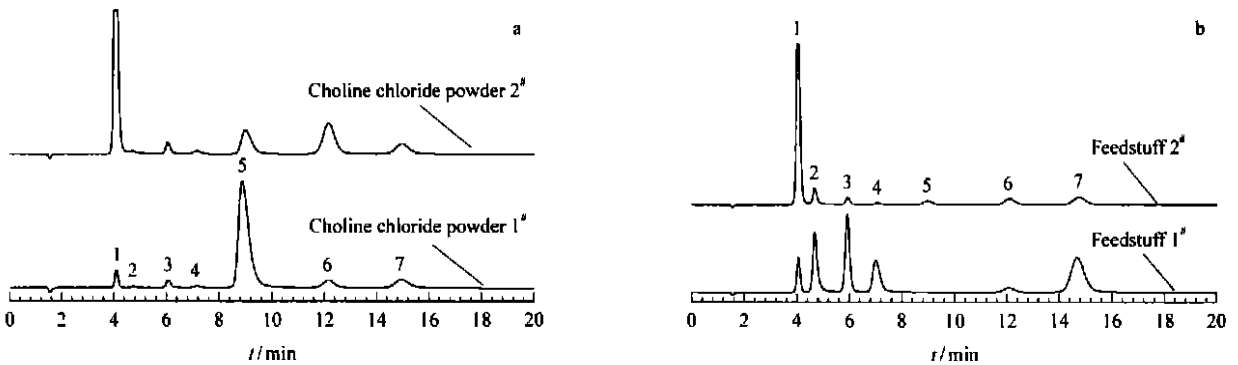


图 3 氯化胆碱粉剂样品(a)及饲料样品(b)的色谱分离图

Fig. 3 Chromatograms of the choline chloride powders (a) and the feedstuffs (b)

1. Na⁺; 2. NH₄⁺; 3. K⁺; 4. trimethylamine; 5. choline; 6. Mg²⁺; 7. Ca²⁺.

致谢 感谢国家饲料检测中心提供的有关数据。

参考文献:

[1] Chang Biying, Song Rong, Ding Yongsheng, Liao Zhiyong. China Feedstuff (常碧影, 宋 荣, 丁永胜, 廖志勇. 中国饲料), 2002, (9): 23
 [2] Marien M R, Richard J W. J Neurochem, 1990, 54(6): 2 016
 [3] Patterson T A, Kosh J W. Bid Mass Spectrom, 1992, 21(6): 299
 [4] Greaney M D, Marshall D L, Bailey B A, Acworth I N. J Chromatogr Biomed Appl, 1993, 622(2): 125
 [5] Osborne P G, Yamamoto K. J Chromatogr B, 1998, 707: 3

[6] Flentge F, Venema K, Koch T, Korf J. Anal Biochem, 1992, 204: 305
 [7] Vreeke M, Maidan R, Heller A. Anal Chem, 1992, 64: 3 084
 [8] Ishimaru H, Ikarashi Y, Maruyama Y. Biol Mass Spectrom, 1993, 22: 681
 [9] Kok F N, Bozoglu F, Hascirci V. Biosensors and Bioelectronics, 2002, 17: 531
 [10] Fan Wenzhe, Zhang Zhujun. Microchemical J, 1996, 53: 290
 [11] Rauch P, Ferri E N, Girotti S, Rauchova H, Carrea G, Bovara R, Fini F, Roda A. Anal Biochem, 1997, 245: 133
 [12] Mitsuhiro W, Kenichiro N, Naotaka K, Shuzo A, Kazuhiro I. J Chromatogr B, 1996, 678: 129