植物营养与肥料学报 2006,12(5):754-758
Plant Nutrition and Fertilizer Science

N-溴代丁二酰亚胺-十六烷基三甲基氯化铵-二氯荧光素体系流动注射化学发光法测定尿素中缩二脲含量

方卢秋
(涪陵师范学院化学及环境科学系,重庆涪陵 408003)

Determination of biuret in urea with flow-injection chemiluminescence system of NBS-CTAC-D-flu

FANG Lu-qiu
(*Department of Environment and Chemistry, Fuling Normal University, Fuling, Chongqing 408003, China*)

中图分类号: O657.3　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 1008-505X(2006)05-0754-05

化学反应体系中某种物质(反应物、产物、中间体)的分子吸收了反应所释放的能量而由基态跃迁至激发态,再从激发态返回基态,同时将能量以光辐射的形式释放出来,产生化学发光。基于分子产生的化学发光强度和被测物含量之间的关系建立的分析方法称为化学发光(CL)分析法。该法具有灵敏度高、线性范围宽、仪器设备简单等优点,与流动注射的快速分析和高精度相结合形成的流动注射化学发光(FI-CL)分析法具有分析速度快、精度高、易实现自动化等特点,其研究和应用越来越广泛[1]。目前,在农业科学上的研究与应用主要集中在食品[2]、农药分析[3]等方面,在肥料分析中的研究、应用较少。

缩二脲是尿素在造粒过程中,温度超过135℃时由两分子尿素缩合,生成缩二脲和氨[4]。尿素含有缩二脲,可抑制幼根生长和种子萌发,不宜做种肥[5]。缩二脲是无味、毒性极低的非蛋白氮化合物,是优良的动物饲料添加剂,在国外已得到了广泛的应用。缩二脲及其衍生物可用作安眠药和镇静剂,且具有缓慢利尿和降低血压的功能等[6]。因此,缩二脲具有广泛的工农业用途。

在尿素生产控制分析中,需要即时测定尿素熔融液中缩二脲的含量,便于改变与调节工艺条件,在应用铜复盐分光光度法测定过程中,由于尿素溶液中的氨与铜复盐中的 Cu^{2+} 会形成不同配位数的蓝色配离子,该配离子跟缩二脲与铜形成的蓝紫色配离子同时共存,直接干扰了缩二脲的定量测定[7-8]。此外,测定缩二脲含量的分析方法还有:液相色谱法[9]、离子选择电极法[10]等。但仪器分析法需要使用价值昂贵的精密仪器,操作繁琐费时,不易推广普及。利用流动注射化学发光法测定尿素中缩二尿含量,文献中至今尚未发现报道。

研究发现,在碱性条件下,N-溴代丁二酰亚胺(NBS)直接氧化缩二脲产生强烈的化学发光信号,结合流动注射技术,建立了测定尿素中缩二脲含量的流动注射化学发光分析法。该法用于实际尿素样品的分析,结果令人满意。本研究对该法作进一步验证。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

仪器:IFFM-D型流动注射化学发光分析仪(西安瑞迈电子科技有限公司)。

1×10^{-2} g/mL 缩二脲标准储备液　准确称取

收稿日期: 2005-08-31　　**修改稿收到日期**: 2005-12-16
基金项目: 第二批"重庆市高等学校优秀中青年骨干教师资助计划"[渝教人(2005)2号]资助。
作者简介: 方卢秋(1965—),男,四川遂宁人,副教授,主要从事化学发光分析、农业资源与环境研究。

0.2513 g 缩二脲固体粉末(天津市光复精细化工研究所产品)定容于 25 mL 棕色容量瓶; 1.0 mol/L 氢氧化钠储备液　称取 20.83 g 氢氧化钠(重庆东方试剂厂),加水溶解,定容于 500 mL 容量瓶; 5×10^{-3} mol/L 二氯荧光素(D-flu)储备液　称取 0.5015 g 二氯荧光素(上海试剂三厂)溶解于 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液定容于 250 mL 棕色容量瓶中; 1×10^{-2}mol/L 十六烷基三甲基氯化铵(CTAC)储备液　称取 1.7778 g 十六烷基三甲基氯化铵(南开大学精细化学试验厂)配制 500 mL; 0.10 mol/L N-溴代丁二酰亚胺储备液　称取 N-溴代丁二酰亚胺(中国医药集团上海化学试剂公司)1.8070 g,溶解定容于 100 mL 棕色容量瓶中,现配现用,用时稀释到所需浓度; 无水乙醚为成都科龙化工试剂厂生产。其它试剂均为分析纯,水为二次蒸馏水。

1.2　方法

称取颗粒状固体尿素、尿基复合肥料(肥料商店购买)10 g 研磨成均匀粉末,在 100～105℃温度恒温干燥 2 h。准确称量 1.000 g 于 250 mL 锥形瓶中,加入 50 mL 的蒸馏无水乙醚(99.5%无水乙醚先经蒸馏制备),塞紧胶塞,振荡提取 30 min 后干过滤,并用蒸馏无水乙醚洗涤尿素 3 次,在沸水浴中蒸发除去乙醚,残余物用二次蒸馏水溶解,转入 100 mL 容量瓶中,洗涤 3 次并定容,即得样品处理液,用于测定。

按图 1 的试验装置操作。将各输液管插入相应溶液,启动仪器,待管路中溶液流动平稳,基线稳定后,通过进样阀向载流液中注入缩二脲样品(标准)溶液,记录增强化学发光信号强度值,以相对峰高定量。

1.3　试验条件选择

1.3.1　N-溴代丁二酰亚胺浓度的选择　文献报道,在碱性条件下,NBS 的水解产物 HBrO 具有氧化性,能氧化缩二脲分子中的胺基,激发共存的荧光素,产生强烈的化学发光信号[11],我们的试验研究也证实了这一现象,NBS 氧化缩二脲形成的化学发光信号图,如图 2(注: 样品或标准溶液通过进样阀,进样 15 s,采样 15 s)。NBS 作为氧化剂,其浓度的高低影响化学发光信号强度及本底值。试验考察了 NBS 在 0.01～0.04 mol/L 浓度范围内对体系的影响。结果表明,随着浓度的增加,化学发光信号强度及信噪比(S/N)增大,当 NBS 浓度为 0.015 mol/L 时,S/N 值最大,如图 3,故选择 0.015 mol/L 的 NBS 浓度用于后续试验。

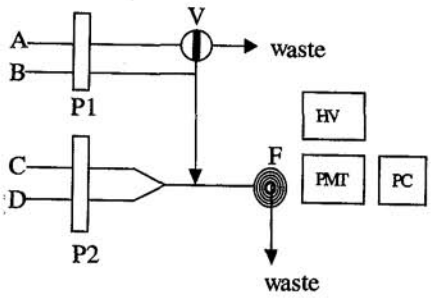

图 1　测定缩二脲的流路图

Fig.1　Schematic diagram of the FIA-CL used for the determination of biuret

(A—样品溶液 Sample stream; B—载流(水) Carry solution (water); C—CTAC + D-flu + NaOH 溶液 CTAC + D-flu + NaOH solution; D—NBS 溶液 NBS solution; P1、P2—蠕动泵 Peristaltic pump; V—进样阀 Injection valve; F—流通池 CL flow cell; PMT—光电倍增高 Photomultiplier tube; HV—负高压 Negative high-voltage supply; PC—计算机控制的化学发光分析仪 Chemiluminescence analyzer controlled by personal computer)

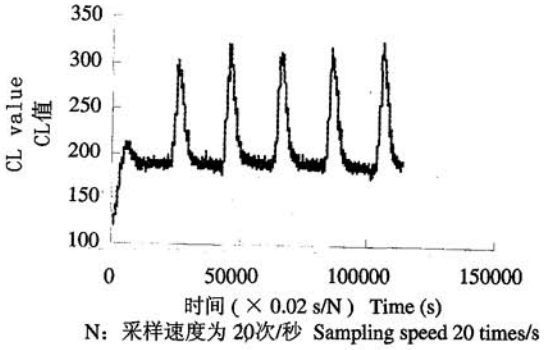

图 2　化学发光信号图[$\rho(NH_2CONHCONH_2)=3.0\times10^{-7}$ g/mL]

Fig.2　Schematic diagram of chemiluminescence(CL) singal

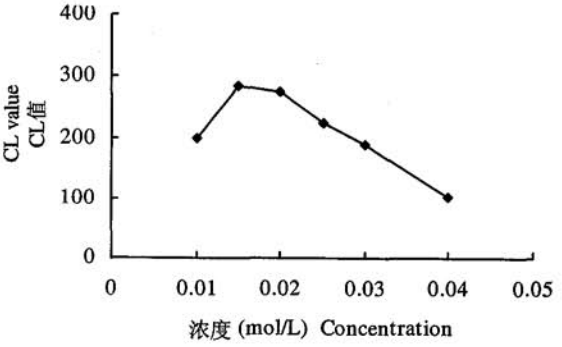

图 3　NBS 浓度对化学发光信号的影响

Fig.3　Effect of NBS concentration on CL intensity

1.3.2 反应介质种类及浓度的选择 NBS在不同的碱性物质作为介质时，产生化学发光的特性不同。试验研究了NBS在氢氧化钠、碳酸氢钠、碳酸钠、氢氧化钾介质中的化学发光情况，以在氢氧化钠中的化学发光信号值最大。试验了氢氧化钠在0.04～0.18 mol/L浓度范围内的化学发光信号情况(图4)，以氢氧化钠浓度为0.14 mol/L时体系的化学发光信号值最大，因此，选择此浓度的氢氧化钠用于后续试验。

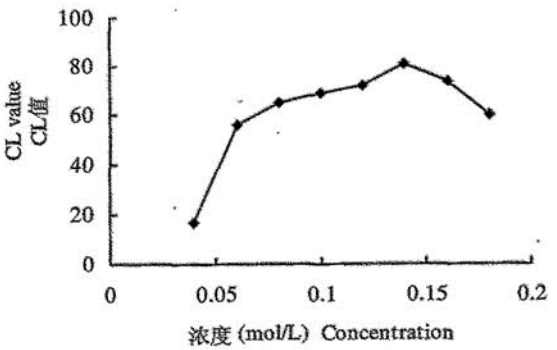

图4 NaOH浓度对化学发光信号的影响

Fig.4 Effect of NaOH concentration on CL intensity

1.3.3 反应介质中荧光素种类及浓度的选择 荧光物质在化学发光反应体系中作为能量转移剂，能显著地影响化学发光信号强度。考察了罗丹明6G、荧光素钠、荧光素、二氯荧光素(D-flu)对化学发光信号的影响。结果显示，相同浓度的荧光物质，以二氯荧光素的化学发光信号最大，因此，本化学发光体系选择二氯荧光素作为能量转移剂。

二氯荧光素浓度影响化学发光信号强度。考察了二氯荧光素在1.0×10^{-4}～8.0×10^{-4} mol/L浓度范围内对化学发光信号值的影响。图5表明，二氯荧光素浓度为2.0×10^{-4} mol/L时，化学发光信号强度最大，此时，基线较低、稳定，故本体系中选择二氯荧光素的浓度为2.0×10^{-4} mol/L。

1.3.4 反应介质中表面活性剂种类及浓度的选择 试验了6种表面活性剂即十二烷基苯磺酸钠、吐温80、聚乙二醇400、十六烷基三甲基溴化铵、十六烷基三甲基氯化铵(CTAC)、曲拉通x-100对该体系产生化学发光信号的影响。结果，以CTAC的增敏作用较强，基线最低。CTAC浓度对化学发光信号强度有显著的影响，试验了CTAC浓度在1.0×10^{-3}～6.0×10^{-3} mol/L范围内对化学发光信号强度的影响(图6)，当CTAC浓度为4.0×10^{-3} mol/L时，化学发光信号强度最强。本试验选择4.0×10^{-3} mol/L的CTAC作为增敏剂。

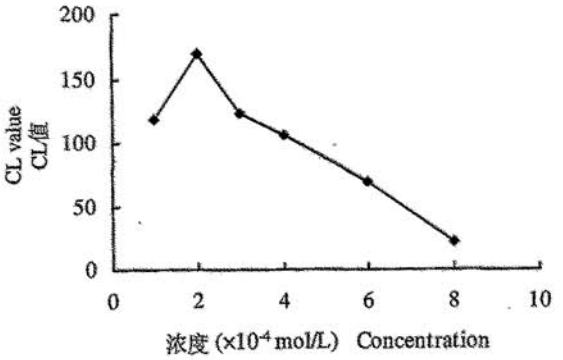

图5 二氯荧光素浓度对化学发光信号的影响

Fig.5 Effect of D-flu concentration on CL intensity

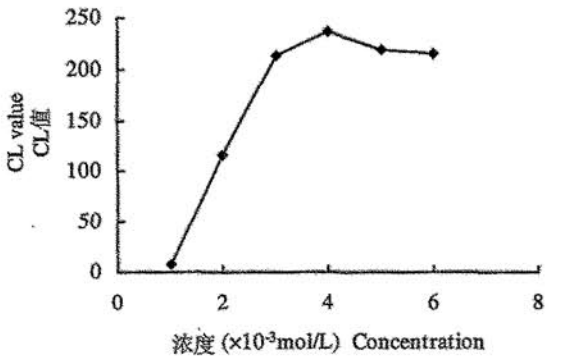

图6 CTAC浓度对化学发光信号的影响

Fig.6 Effect of CTAC concentration on CL intensity

1.3.5 载流酸碱性的选择 考察了载流与样品用相同酸碱性溶液配制对化学发光信号强度的影响。结果显示，载流为水，相应样品用水配制时，相对化学发光信号强度最大，基线值低且较稳定。因此，采用水为载流，样品配制成水溶液。

2 结果分析

2.1 线性范围、标准曲线、精密度及检测限

在选择的最佳试验条件下，相对化学发光信号强度值与缩二脲的质量浓度在5.0×10^{-8}～1.0×10^{-4} g/mL范围内呈线性关系。为了提高测定的精密度，标准曲线分段绘制。回归方程为：$\Delta I = 40.905\rho(\times10^{-7}\ g/mL) + 24.098$，$r=0.9998$ (PMT参数：HIV，550v；Gain，8倍)，浓度为5.0×10^{-8}～9.0×10^{-6} g/mL；$\Delta I = 248.18\rho(\times10^{-5}\ g/mL) + 224.88$，$r=0.9943$ (PMT参数：HIV，400v；Gain，8倍)，浓度为9.0×10^{-6}～1.0×10^{-4} g/mL(图7)。对

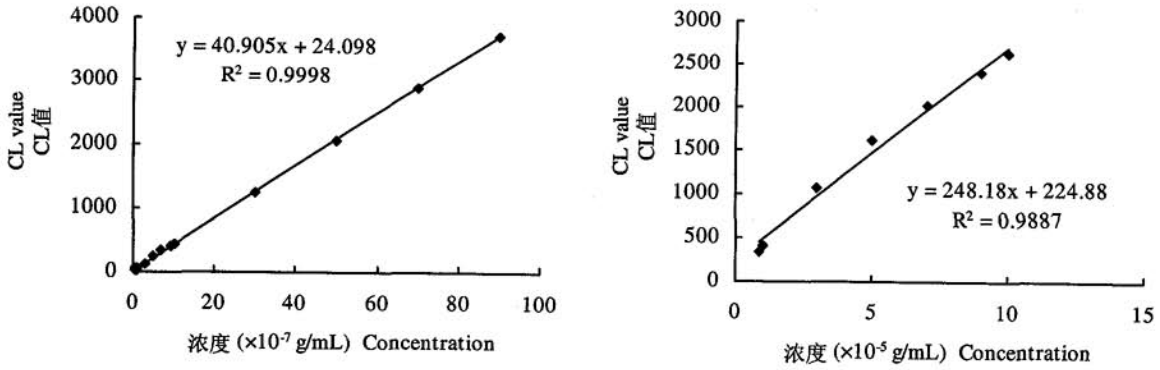

图 7 缩二脲浓度的测定线性范围

Fig.7 Linear range of determination for biuret concentration

5.0×10^{-7} g/L 的缩二脲进行 11 次平行测定,相对标准偏差为 3.5%。根据 IUPAC 规定,算出检出限(3σ)为 1×10^{-8} g/mL。

2.2 干扰试验

在选定的试验条件下,用 5.0×10^{-7} g/mL 的缩二脲进行干扰试验,相对误差在 5% 以内。结果表明,300 倍 Na^+,250 倍 K^+,200 倍 Zn^{2+},150 倍 Ca^{2+},100 倍 Mg^{2+}、Pb^{2+},50 倍 Fe^{3+}、EDTA,25 倍 Hg^+,5 倍 Al^{3+},1 倍 NH_4^+、Hg^{2+} 不干扰测定,等倍尿素、Cu^{2+} 有干扰。因此,在测定实际尿素样品时,利用尿素几乎不溶于乙醚,而缩二脲微溶于乙醚的特性,用蒸馏无水乙醚将尿素和缩二脲分离[12],再进行化学发光法分析。我们进行了尿素及缩二脲在水、蒸馏无水乙醚中的溶解特性试验,结果表明,在 100 g 溶剂中,25 ℃时,缩二脲在水中的溶解度为 2.00 g,在无水乙醚中为 0.02 g;尿素在水中的溶解度为 112 g,在无水乙醚中溶解度小于 0.0001 g。其它杂质在尿素样品中含量很低,可以不经处理进行测定。

2.3 样品测定结果

按照所述方法,对样品处理液中缩二脲的含量进行测定,同时进行了加标回收试验。稀释 1.0×10^{-2} g/mL 的缩二脲标准储备液为 1.0×10^{-4} g/mL 溶液。用 15.0 mL 吸量管准确移取 1.0×10^{-4} g/mL 的标准溶液 2.5、7.5、12.5、17.5、22.5 mL 于 25 mL 棕色容量瓶中分别配制 1.0×10^{-5}、3.0×10^{-5}、5.0×10^{-5}、7.0×10^{-5}、9.0×10^{-5} g/mL 缩二脲溶液标准系列,校准曲线方程为:$\Delta I = 172.45\,\rho(\times10^{-5}$ g/mL$) + 124.15$ ($r = 0.9931$, $n = 7$)。预测样品处理液的相对化学发光信号强度值,将待测样品处理液稀释到标准溶液浓度范围内。测定结果列于表 1、2 中。并与化学分析法(铜复盐分光光度法)相比较。

表 1 样品中缩二脲含量测定及加标回收分析

Table 1 Determination of biuret and recoveries for samples

样品 Samples	初始存在量 Origianl ($\times10^{-5}$ g/mL)	加入量 Aded ($\times10^{-5}$ g/mL)	测得量 Measure ($\times10^{-5}$ g/mL)	回收率 Recovery (%)	相对标准偏差 RSD(%) (n=7)
颗粒状尿素	1.54	—	—	—	2.1
Granular urea		2.0	3.55	100.5	2.9
		4.0	5.51	99.25	4.3
	3.13	—	—	—	4.5
		4.0	7.20	101.75	3.6
尿基复合肥料	0.56	—	—	—	3.2
Compound Fertilizer		0.50	1.03	94.00	4.1
based urea		1.00	1.55	99.00	4.7

表2 样品分析结果

Table 2 Results of the determination of samples

样品 Samples		本法测得量 Proposed method (%)				平均值 Average (%)	化学分析法 Chemical analysis (%)
颗粒状尿素	1	1.696	1.696	1.652	1.640	1.639 ± 0.0498	1.625
Granular urea		1.640	1.585	1.566			
	2	1.553	1.558	1.601	1.600	1.583 ± 0.0194	1.569
		1.589	1.590	1.588			
	3	1.575	1.585	1.569	1.600	1.585 ± 0.0106	1.573
		1.591	1.612	1.583			
	4	1.548	1.590	1.568	1.587	1.583 ± 0.0187	1.580
		1.601	1.592	1.596			
尿基复合肥料	5	0.561	0.600	0.598	0.587	0.582 ± 0.0204	0.568
Compound fertilizer		0.546	0.588	0.593			
based urea	6	0.574	0.581	0.566	0.605	0.582 ± 0.0162	0.572
		0.588	0.598	0.561			

3 结论

结合流动注射技术，利用NBS直接氧化缩二脲产生强烈的化学发光信号，建立了测定尿素中缩二脲含量的流动注射化学发光分析法。克服了铜复盐分光光度法测定缩二脲，操作较繁琐费时，共存物质产生有色配离子干扰比色测定，重现性较差，分析效率较低的弱点，本法具有分析测定操作简单，仪器设备价格低，灵敏快速，重现性良好的优点，可以用于实际尿素样品的分析。

参考文献：

[1] 高嵩，何广平，张以河.流动注射化学发光分析研究与应用进展[J].化学分析计量，2004，13(1)：55-58.
Gao S, He G P, Zhang Y H. Advance in the research and application of the flow injection-chemiluminescence analysis technology[J]. Chemical Analysis and Meterage, 2004, 13(1): 55-58.

[2] 钱建亚.化学发光法在食品分析中的应用[J].食品与发酵工业，1997，23(3)：69-74.
Qian J Y. Aplication of food analysis with Chemiluminescence method [J]. Food and Fermentation Industries, 1997, 23(3): 69-74.

[3] 王建宁.化学发光检测方法在农药分析中的应用[J].青海农林科技，2001(2)：28-29.
Wang J N. Aplication of pesticide analysis with Chemiluminescence method [J]. Science and Technology of Qinghai Agricultrue and Forestry, 2001(2): 28-29

[4] 北京农业大学.农业化学(总论)第二版[M].北京：中国农业出版社，2005.91.
Beijing Agriculture University. Agriculture chemistry (Pandect)(2nd edition)[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2005. 91.

[5] 陆欣.土壤肥料学[M].北京：中国农业大学出版社，2002.203.
Lu X. Soil and fertilizer science[M]. Beijing: China Agriculture University Press, 2002. 203.

[6] 金珍.缩二脲的合成与应用进展[J].齐鲁石油化工，2003，31(1)：41-43.
Jin Z. Advance in the synthesize and application of the biuret[J]. Qilu Petrochemical Technology, 2003, 31(1): 41-43.

[7] 徐斌.氨内参比法测定尿素熔融液中缩二脲含量[J].陕西化工，1997，(1)：30-32.
Xu B. Determ ination of biuret amount in clrea slurry by ammonia in inner reference method[J]. Appied Chemical Industry, 1997, (1): 30-32.

[8] 邹菁，丁庆华，陈万煜.高效缓释肥料中缩二脲的测定[J].武汉化工学院学报，2002，24(4)：20-21.
Zou J, Ding Q H, Chen W Y. Determination of the biuret in high efficiency slow release chemical fertilizer[J]. J. Wuhan Inst. Chem. Tech., 2002, 24(4): 20-21.

[9] 俞鹏程，蔡大雄.尿素和缩二脲的高效液相色谱分析[J].化肥工业，1989(2)：29-31.
Yu P C, Cai D X. The high performance liquid chromatography analysis of urea and biuret[J]. Journal of the Chemical Fertilizer Industry, 1989, (2): 29-31.

[10] Corominas L F. Determination of biuret in urea and mixed fertilizers by cuprie ion selective electrode[J]. J. Assoc. of Anal. Chem., 1986, 69(1): 119-122.

[11] 方卢秋，杨季冬，李晓燕，等.NBS-荧光素-CTAC流动注射化学发光体系测定尿素的含量[J].四川师范大学学报(自然科学版)，2004，27(3)：288-291.
Fang L Q, Yang J D, Li X Y *et al*. Determination of urea with flow-injection chemiluminescence system of NBS-fluorescein-CTAC [J]. Journal of Sichuan Normal University (Natural Science), 2004, 27(3): 288-291.

[12] 中国医药集团上海化学试剂公司.试剂手册(第三版)[M].上海：上海科学技术出版社，2002.181，1342.
China Medicine (Group) Shanghai Chemical Reagent Corporation. Handbook of reagents (3rd edition) [M]. Shanghai scientific and Technical Publishers, 2002. 181, 1342.