



戴安 (DIONEX) 园地

尿素溶液及尿素蛋白缓冲液中氰酸根的直接测定

尿素在水溶液中降解为氰酸盐和铵盐。在接近中性 pH 值, 即典型的生物缓冲 pH 范围时, 氰酸盐产量最大。对于氰酸盐的测定, 离子色谱法 (IC) 是一种理想的方法。

本文采用免化学试剂离子色谱系统 (RFIC), 在 $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素, $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素及 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化物, $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素及 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化物与 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲剂样品系列中测定氰酸盐。这种方法可提供更好的灵敏度、允许小体积进样量和较低的稀释倍数, 具有更高的 Cl^{-} 和 CN^{-} 分离度。

1 IC-3000 免化学试剂离子色谱

戴安公司 IC-3000 免化学试剂离子色谱淋洗液再生系统: SP 单流向梯度泵; DC 检测器及色谱模块, 单/双温度配置区; CD 传导率检测器; EG 淋洗液发生器; AS 带样品瓶的自动进样器; 可控温的 1.5 mL 样品瓶托盘; 淋洗液发生系统 EGC II KOH; 连续再生阴离子捕获柱 (CR-ATC); Chromeleon 6.8 色谱工作站; 虚拟柱分离模拟器 (非强制); 0.3 mL 带盖及隔片的聚丙烯样品瓶。

分析柱: InPac AS15 $5 \mu\text{m}$ ($3 \times 150 \text{ mm}$), 保护柱: InPac-AG15 $5 \mu\text{m}$ ($3 \times 30 \text{ mm}$); 淋洗液: $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KOH; 带有 CR-ATC 捕获柱的淋洗液在线发生器; 流速: $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温: 30°C ; 样品盘温度: 4°C ; 进样体积: $5 \mu\text{L}$; 检测器: 抑制型电导检测器 ASRS-300 (2 mm), 自循环模式; 背景电率: $< 1 \mu\text{S}$; 系统反压: $\sim 2200 \text{ psi}$; 运行时间: 22 min ; 淋洗液条件为: $0-12 \text{ min}$ 为 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KOH; $12-20 \text{ min}$ 为 $65 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KOH, 自循环模式, 抑制电流 81 mA ; 用控温自动进样器维持温度在 4°C 以使氰酸盐浓缩过程中的变化最小化。

2 溶液的配制

用去离子水溶解 6.50 g 氰酸钠 (NaOCN , $\text{FW } 65.01 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) 置于 100 mL 容量瓶中, 定容, 摇匀配制 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氰酸盐标准储备液。

移取 $100 \mu\text{L } 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氰酸钠标准储备液至 100 mL 容量瓶中, 用去离子水定容至刻度, 摇匀配制 $1.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氰酸盐工作标准溶液。

从 $1.00 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氰酸盐标准储备液中分别移取 $50, 100, 200, 500, 1000, 2500$ 和 $5000 \mu\text{L}$ 至 50 mL 容量瓶中, 用去离子水定容、摇匀。配制 $1, 2, 4, 10, 20, 50$ 和 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氰酸钠单标。

用连续稀释法稀释 $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氰酸盐工作标准溶液, 以配制 $0.13, 0.25$ 和 $0.50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氰酸盐检测限标准。例如, 将 $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氰酸盐标准溶液稀释至 50% 得 $0.50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氰酸盐。 0.13 及 $0.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氰酸盐标准溶液则以相同的方法分别稀释 0.25 及 $0.50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氰酸盐标准溶液得到。所有标准均在 4°C 的条件下保存。

用去离子水溶解 48.05 g 尿素于 100 mL 容量瓶中, 定容至体积, 摇匀。配制 $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素 (H_2NCONH_2 , $\text{FW } 60.06 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) 基体样品溶液。

用去离子水溶解 48.05 g 尿素及 5.84 g 氯化钠于 100 mL 容量瓶中, 以相同方法配制 $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素与 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠 (NaCl , $\text{FW } 58.44 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) 的混合样品溶液。

用去离子水溶解 48.05 g 尿素、 5.84 g 氯化钠、 0.683 g 磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{FW } 58.44 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)、 0.007 g 磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4 , $\text{FW } 141.96 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) 于 100 mL 容量瓶中, 定容至刻度, 摇匀 ($\text{pH} = 8.4$)。配制 $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素、 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠及 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)、 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸氢二钠的混合溶液。

从混合样品溶液中分别移取 $200, 400$ 和 $2000 \mu\text{L}$ 至 20 mL 聚丙烯闪烁管中, 加去离子水至总重量为 20.00 g 分别制备稀释 $100, 50$ 和 10 倍的混合样品溶液。

3 方法优化

为提取虚拟柱模拟器所获得结果, 用 InPac-AS15 $5 \mu\text{m}$, $3 \times 150 \text{ mm}$ 分析柱测定 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氰酸盐、氯化物、碳酸盐的保留时间, 进样量为 $5 \mu\text{L}$, 淋洗液为 $20, 25$ 和 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钾, 流速为 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 温度为 30°C 。实验表明, 用 20 或 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钾为淋洗液, 截至 3.2 min 氰酸盐可以很好的与氯化物和碳酸盐分离, 此外, 与预期一样, 保留时间随淋洗液强度的增加而降低。本实验中选用 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钾淋洗液。对于使用流速为 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 电解发生氢氧化钾淋洗液, 通过 InPac AS15 $5 \mu\text{m}$ 分析柱分离 $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氰酸盐, 图 1 显

示了良好的峰响应值和峰不对称性。

为了测定样品中极小浓度的氯化物是否会造成柱超载, 我们所进样品为稀释 20, 50 和 100 倍的含有 $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 氯化物的 $8\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 尿素溶液. 稀释 20 倍的样品 ($50\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 氯离子) 色谱图显示氯离子峰的扭曲为柱超载的特征. 因此, 至少需要稀释 50 倍的 $8\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 尿素与 $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 氯化物的混合溶液, 以避免这种现象并获得适当的氰酸根与氯离子的分离度.

4 方法限定

为了限定氰酸根检测方法, 我们评价了线性、系统噪音、量化限和检出限. 测定的氰酸根响应峰面积为 $1\text{—}100\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 使用校准标准的三联进样. 氰酸根响应峰面积的线性则通过变色龙软件以最小二乘法测定. 线性相关系数为 0.9993. 峰与峰间的基线噪声的测定是在 20—60min 内选择 1min 无峰的时间段进行. 噪声低至可以接受的范围 ($0.95\pm0.13\text{ nS}$ ($n=3$)).

为了测定检测限, 注入七组 0.13 , 0.25 和 $0.50\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 的氰酸盐. 氰酸根的峰响应值则用三倍的信噪比与基线噪声对比. 检出限为 $0.25\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 氰酸根 (信噪比为 3.01). 这些检出限显著低于使用 bnPac AS14 柱及重碳酸盐/碳酸盐淋洗液所报导的 $2\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. 这可能是由于电解发生氢氧化物淋洗液以及抑制型电导检测的使用. 每根 bnPac AS15 柱具有类似的柱容量, 但比 AS14 柱低 30%. 这些不同提高了峰响应值及灵敏度. 这样允许较小的进样量、降低柱超载、延长柱子寿命. 使用 10 倍信噪比测出量化限为 $0.8\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($1.0\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $S/N\ 11.6$).

5 尿素及含有尿素的溶液中氰酸根的测定

在稀释 50 倍的 $8\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 尿素溶液 (A)、 $8\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 尿素与 $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 氯化物 (B)、 $8\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 尿素与 $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 氯化物及 $50\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液 (pH 8.4) (C). 具有近似的氰酸根浓度 ($1.1\pm0.1\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 见表 1). 氰酸根峰可与氯离子及碳酸根峰很好的分离, 并且具有良好的峰型 (图 2A). 可以观察到尿素溶液中一个可接受的小基线漂移 ($<0.15\mu\text{S}$) 在 2.4min 开始, 大约在 15min 结束. 在含有摩尔浓度氯离子的尿素溶液中, 氰酸根在较大氯离子峰的背景下游洗, 没有与氯离子完全分离 (图 3A). 其色谱图与含有氯离子及磷酸根的尿素溶液色谱图相似 (图 4A).

表 1 尿素及含有尿素的溶液中氰酸根的回收率

尿素溶液	初浓度 ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	RSD	加入量 ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	测定值 ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	RSD	回收率 /%	加入量 ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	测定值 ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	RSD	回收率 /%	加入量 ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	测定值 ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	RSD	回收率 /%
A	1.13	0.50	1.20	2.26	0.64	96.7	2.20	3.32	1.32	99.7	3.62	4.92	0.87	103.6
B	1.11	1.07	0.91	1.88	1.03	93.1	1.31	2.43	1.44	100.4	2.22	3.48	0.55	104.4
C	1.00	1.41	0.81	1.60	1.10	89.5	1.24	2.27	0.69	101.1	1.70	2.66	1.16	98.0

为了验证方法的准确性, 在稀释 50 倍的 $8\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 尿素样品中加入梯度浓度氰酸根 (1.2 , 2.2 和 $3.6\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). 此外, 在稀释 50 倍的 $8\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 尿素与 $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 氯离子、 $8\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 尿素与 $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 氯离子及 $50\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 磷酸根的缓冲溶液中也同样分别加入 $0.9\text{—}2.2\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 及 $0.8\text{—}1.7\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 氰酸盐. 对于所有溶液计算所得回收率均大于 89% (表 1). 稀释 50 倍的 $8\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 尿素溶液及加入 $3.6\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 氰酸盐的同种溶液的色谱图如图 2 所示.

峰 6—8 为 20min 内从色谱柱上淋洗下来的尿素原液中未知离子峰, 延长运行时间至 22min 以保证下一针进样前这些离子能被完全淋洗出来. 稀释 50 倍的 $8\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 尿素及 $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 氯离子混合液在加入与不加入 $2.2\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 氰酸盐两种情况下的色谱图如图 3 所示.

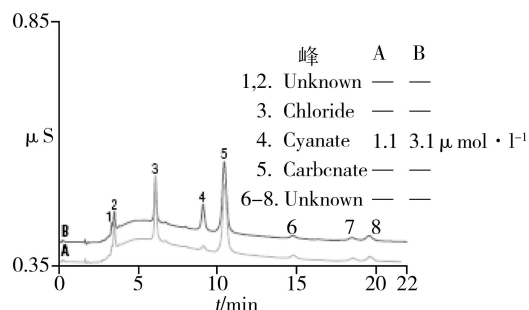


图 2 $8\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 尿素 (A) 与 $8\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 尿素中加入 $2.2\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 氰酸盐的比较

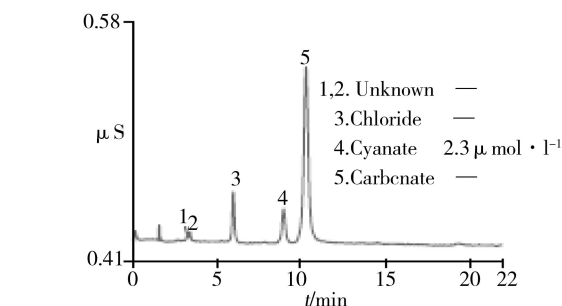


图 1 $2\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 氰酸盐的离子色谱测定

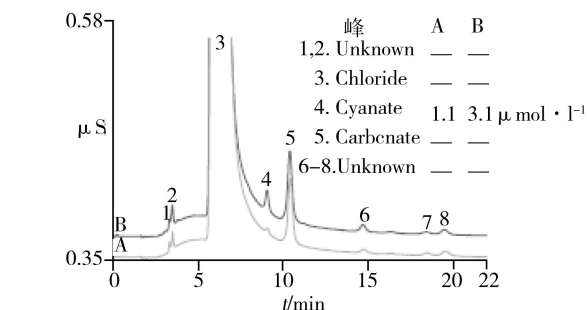


图 3 $8\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 尿素中加入 $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 氯化物 (A) 与 $8\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 尿素, $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 氯化物和 $2.2\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 氰酸盐 (B) 的比较

加入与不加入 $1.7\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 氰酸根及稀释 50 倍的 $8\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 尿素与 $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 氯离子及 $50\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 磷酸根离子缓冲溶液的色谱图如图 4 所示。

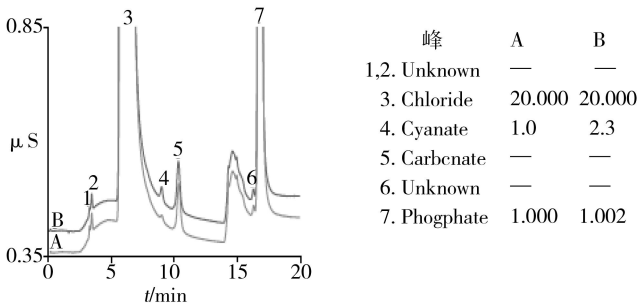


图 4 $8\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 尿素， $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 氯化物和 $50\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 磷酸氢二钠缓冲液（ $\text{pH}=8.4$ ）的混合溶液（A）与样品 A 中加入 $2\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 氰酸盐的比较

为了测定保留时间和峰面积精度，分别向去离子水、稀释 50 倍的 $8\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 尿素、 $8\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 尿素与 $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 氯离子混合液、 $8\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 尿素与 $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 氯离子及 $50\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 磷酸根缓冲溶液（ $\text{pH} 8.4$ ）中平行加入 7 针 $2\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 氰酸盐。对于所有样品，在 $8.99\text{--}9.07\text{min}$ 时具有相近的保留时间和峰面积精度（表 2）。对于三个样品，保留时间及峰面积精度均分别 <0.1 和 $<2\%$ 。

表 2 尿素溶液（稀释 50 倍）中加入 $2\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 氰酸盐的保留时间及峰面积精度（ $n=7$ ）

尿素溶液	保留时间 /min	RSD	峰面积 RSD /%	尿素溶液	保留时间 /min	RSD	峰面积 RSD /%
去离子水	9.07	0.02	1.06	B	9.03	0.04	0.65
A	9.07	0.02	1.65	C	8.99	0.06	1.69

6 样品稳定性

为了测定放置 4d 的尿素中氰酸根的稳定性，对稀释 50 倍的 $8\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 尿素、 $8\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 尿素与 $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 氯离子混合液、 $8\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 尿素与 $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 氯离子及 $50\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 磷酸根缓冲溶液（ $\text{pH}=8.4$ ）中测定氰酸根浓度。在 4d 实验中，溶液分别在 -40°C 、 4°C （AS 自动进样器）及 25°C 下保存。为了洗提磷酸盐缓冲尿素溶液中的磷酸根，在 12min 出现碳酸根峰之后将 KOH 浓度改为 $65\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 以改进方法。

实验表明，在 -40°C 的贮存条件下， $8\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 尿素中氰酸根总浓度是稳定的。然而，在 4°C 的储存条件下，4d 后氰酸根浓度增长了 10 倍以上（从 6 到 $75\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ），在 25°C 下储存增长的更多（从 24 到 $886\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ）（图 5）。在 $8\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 尿素与 $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 氯离子混合液、 $8\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 尿素与 $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 氯离子及 $50\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 磷酸根缓冲溶液中，其氰酸根与在 $8\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 尿素溶液中具有相似的稳定性。磷酸盐缓冲溶液不会一直尿素中氰酸根的聚集。

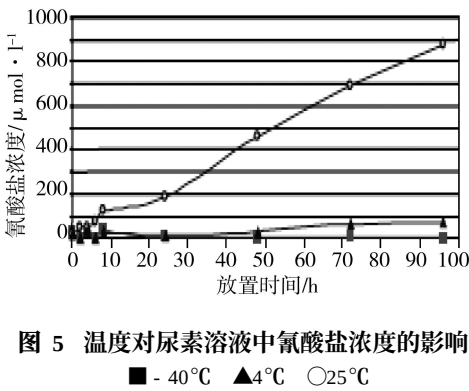


图 5 温度对尿素溶液中氰酸盐浓度的影响
■ -40°C ▲ 4°C ○ 25°C

7 结论

用大容量离子交换色谱柱及抑制型电导检测器，准确测定了稀释 50 倍后的 $8\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 尿素及含有摩尔浓度的氯离子和毫摩尔浓度的磷酸根的尿素溶液中低浓度（ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ）的氰酸根。这种方法可以快速、准确的测定含有尿素的溶液中氰酸根的含量。免化学试剂离子色谱系统保证了极高的精密度，免除了制备淋洗液的必要性及制备过程中可能产生的误差。