

# 多重分离-光谱法测定饲料中尿素含量

吴豫鄂

(武汉工程大学分析测试中心,湖北 武汉 430074)

**摘 要:**针对饲料这种复杂的体系中基体物质严重干扰其中尿素含量的测定的问题.本研究用活性碳吸附分离色素,乙酸锌和亚铁氰化钾沉淀分离蛋白质、多肽、氨基酸.在优化的分离条件下:样品/活性碳质量比 1~2,水/固比 10~15,温度 40~50 ℃,pH5,搅拌后静置 2 h,再用水淋洗分离,尿素与干扰物的分离率达 90%以上.用对二甲氨基苯甲醛光度法对分离后样液中的尿素进行定量测定,尿素回收率达 99.9%,RSD 为 3.0%.

**关键词:**饲料中的尿素;干扰物的分离方法和分离条件;定量分析

**中图分类号:**O652.1

**文献标识码:**A

**doi:**10.3969/j.issn.1674-2869.2011.08.005

## 0 引 言

饲料中添加适量的尿素可以补充动物生长所需的氮,降低饲养成本,然而过量会导致动物死亡<sup>[1]</sup>.饲料中过量添加尿素对畜牧业的危害是不容忽视的,对饲料中尿素含量进行监控很有必要,但目前我国尚无相应的检测方法标准.因此,探索饲料中尿素的定量检测方法具有重要的应用价值.

尿素的测定方法有多种,但由于基体物质的干扰都不能直接用于饲料中尿素含量的测定.本研究采用吸附、沉淀与共沉淀的多重分离法对干扰物质与尿素进行分离,通过优化分离条件使分离率达到 90%以上.用对二甲氨基苯甲醛光度法对分离样液中的尿素进行定量测定<sup>[2-3]</sup>,准确地检测出了饲料中尿素的含量.

## 1 实验部分

### 1.1 仪器

德国天平 METTLER TOLEDO AB104-S/FACT;美国惠普紫外可见分光光度计 HP-8452A;德国超纯水系统 Sartorius stedim arium® 611UV;上海电热恒温箱 DHG-9070A.

### 1.2 试剂

尿素标准溶液;对二甲氨基苯甲醛(DMAB)溶液;磷酸盐缓冲溶液(pH7.0);亚铁氰化钾溶液;乙酸锌溶液;活性碳;市售饲料.

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 干扰物质的分离

称取预先粉碎至筛

分 0.85 mm 以下的样品 1~2 g(精确到 0.1 mg)至 100 mL 小烧杯中,加入 1 g 活性碳,加水 25 mL,迅速加入 5 mL 乙酸锌溶液,搅拌 2 min,再加入 5 mL 亚铁氰化钾溶液,搅拌 5 min,用质量分数 3%的乙酸将 pH 值调到 5 左右,40~50 ℃保温放置 2 h.用定量滤纸过滤,水洗,洗滤液承接于 100 mL 容量瓶中,定容.同时做试剂空白试验.

1.3.2 标准曲线的绘制 分别取 1 mg·mL<sup>-1</sup>或 0.2 mg·mL<sup>-1</sup>的尿素标准溶液(视样品中尿素含量而定)0、1、2、3、4、5 mL 于 25 mL 具塞比色管中,加入 5 mL 磷酸盐缓冲液,加水至约 15 mL,加入 5 mL DMAB 显色液,用水稀释至刻度,摇匀,15~35 ℃放置 20 min,在 420 nm 波长下,用 1 cm 或 3 cm 比色池测定,以吸光度为纵坐标,尿素含量为横坐标作曲线图.

1.3.3 尿素含量的测定 取样品滤液 5~15 mL 加入 25 mL 具塞比色管中,其他步骤同 1.3.2,查标准曲线计算尿素含量.

## 2 结果与讨论

### 2.1 乙酸锌、亚铁氰化钾对有机干扰物的分离效果

本研究用乙酸锌作沉淀剂分离样品溶液中的蛋白质、多肽、氨基酸<sup>[4]</sup>;用亚铁氰化钾与过量的乙酸锌反应生成胶性氰亚铁酸锌沉淀<sup>[5]</sup>,此胶性沉淀既可去除过量的乙酸锌,又有共沉淀蛋白质、多肽、氨基酸络合物的作用,还能吸附沉淀微粒使滤液澄清透明.分离效果见图 1.

图 1 是不含尿素的饲料样品经不同处理所得滤液的紫外-可见光谱扫描图. a 是饲料水溶液滤

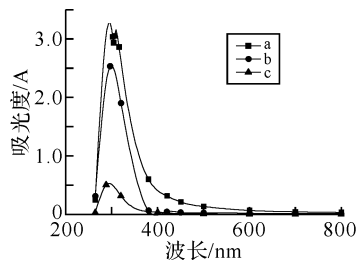


图 1 分离效果比较图

Fig. 1 Comparison of separating results

液的扫描图, b 是饲料经活性炭处理后滤液的扫描图, c 是饲料经活性炭、乙酸锌和亚铁氰化钾处理后滤液的扫描图. a 处理得到的滤液有较深的黄色, 在 210~420 nm 之间有很强的吸收, 说明其中含有丰富的有机物. b 处理得到无色略带混浊的滤液, 在 420 nm 的吸收接近于零, 在 300 nm 附近有很强的吸收, 加入 DMAB 后在 420 nm 处的吸收显著高于试剂空白. 说明此处理对色素的分离效果很好, 分离蛋白质、多肽、氨基酸等物质的效果较差. c 处理得到无色透明的滤液, 在 420 nm 的吸收接近于零, 在 300 nm 附近有微弱的吸收, 加入 DMAB 后在 420 nm 处的吸收与试剂空白无明显差异. 说明该处理对色素、蛋白质、多肽、氨基酸等有机物质有很好的分离效果.

2.2 活性炭的脱色效果及使用粒度、使用量的选择

活性炭是良好的吸附剂, 对非极性和弱极性有机物有较强吸附力, 脱色效果很好<sup>[6]</sup>, 见图 1. 活性炭颗粒的大小, 对测定结果有影响. 粒度大, 与溶液中的色素分子的接触的表面积相对较小, 吸附效果欠佳; 粒度小, 过滤时间较长; 当粒径过小时, 会发生活性炭微粒的穿滤, 穿滤的微粒在 420 nm 有吸收, 对光度分析产生干扰, 所以选用 0.25~0.15 mm 粒径的活性炭.

从理论上讲, 随着活性炭用量增加脱色效果会增强, 但是活性炭的用量过大会造成洗滤困难, 在对洗滤体积有一定要求的情况下, 样品中的尿素不能被完全洗出, 导致测定结果偏低. 经实验, 称取 2 g 样品加入 1 g 活性炭能得到满意的效果.

2.3 温度对吸附分离色素的影响

温度对吸附效果有显著影响<sup>[7]</sup>.

用色值测定计算吸附分离色素的效果(脱色率): 以去离子水为背景, 420 nm 下, 1 cm 的比色杯测定吸光度.

$$\text{脱色率}\% = \left(1 - \frac{\text{处理后的吸光度值}}{\text{饲料水溶液的吸光度值}}\right) \times 100$$

按 1.3.1 方法, 在不同温度下制取样品脱色液, 测定滤液的色值并转换成脱色率. 温度对脱色效果的影响见图 2.

由图 2 可见, 脱色率与温度成正相关, 超过 50 ℃ 变化趋缓. 考虑到 40~50 ℃ 时的脱色率已满足实验要求, 且温度过高会使尿素水解, 选择 40~50 ℃ 为最佳温度.

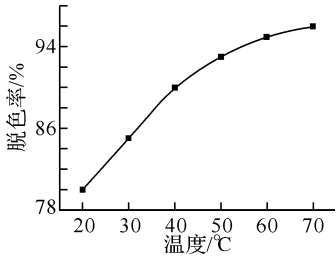


图 2 温度对脱色效果的影响

Fig. 2 The temperature influence on eliminating pigment

2.4 时间对分离效果的影响

吸附反应达到平衡需要时间, 沉淀与共沉淀完成生成、陈化、沉降的过程也需要时间, 时间对分离效果有较大的影响<sup>[7]</sup>. 实验表明, 随着时间的延长脱色效果显著变好, 但 2 h 以后变化趋缓, 选择 2 h 的分离时间既能取得良好的分离效果, 又能相对提高分离效率, 见图 3.

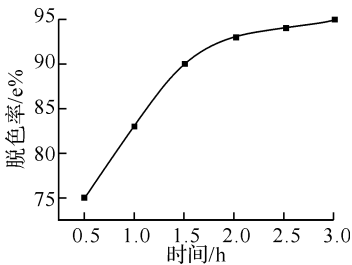


图 3 时间对脱色效果的影响

Fig. 3 The time influence eliminating pigment

2.5 pH 值对吸附分离色素的影响

用 1.3.1 方法制备 6 份实验样品, 将其调节到不同的 pH 值, 测定滤液的色值并转换成脱色率. 实验表明, 脱色率随着 pH 增大而降低, pH4~5 时脱色率达 90% 以上, 能满足实验要求, 见图 4. 选择 pH4~5 为最佳酸度.

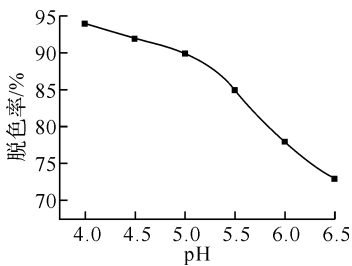


图 4 pH 值对脱色效果的影响

Fig. 4 pH influence on eliminating pigment

2.6 其它非蛋白含氮物质对测定干扰的研究

除尿素以外, 硫酸铵、三聚氰胺、缩二脲也可能被加入到饲料中充作氮源. 实验表明, 这些物质

不与 DMAB 发生显色反应,对测定尿素不产生干扰,见图 5.

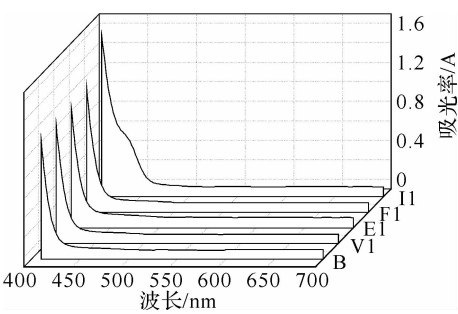


图 5 几种物质与 DMAB 显色后的紫光可见光谱图

Fig. 5 The comparison of uitavlolet-visible spectrum

图 5 是硫酸铵、三聚氰胺、缩二脲等加入 DMAB 显色后的紫外—可见光谱扫描图. 曲线 B 是 5 mL DMAB 显色剂的试剂空白扫描图;曲线 V<sub>1</sub> 是 200 μg · mL<sup>-1</sup> 硫酸铵加入 5 mL DMAB 显色后的扫描图;曲线 E<sub>1</sub> 是 200 μg · mL<sup>-1</sup> 缩二脲加入 5 mL DMAB 显色后的扫描图;曲线 F<sub>1</sub> 是 200 μg · mL<sup>-1</sup> 三聚氰胺加入 5 mL DMAB 显色后的扫描图;曲线 I<sub>1</sub> 是 200 μg · mL<sup>-1</sup> 尿素加入 5 mL DMAB 显色后的扫描图. 由图 5 可见, 420~470 nm 处硫酸铵、缩二脲、三聚氰胺与

DMAB 试剂空白的吸收图形没有区别,而尿素在此处有明显的吸收. 在 420 nm 处,DMAB 试剂空白、硫酸铵、缩二脲、三聚氰胺、尿素加入 DMAB 显色后的吸光度分别是 0. 343,0. 345,0. 350,0. 355,0. 853,扣除试剂空白后硫酸铵、缩二脲、三聚氰胺没有吸收,尿素有 0. 51 吸光度的吸收.

2.7 适合测定的含量范围

对二甲氨基苯甲醛光度法测定尿素线性相关性好,灵敏度不高. 实验的回归曲线为  $y=0.112\ 9x+0.001\ 1$ ,相关系数  $r=0.999\ 8$ ,40 μg · mL<sup>-1</sup> 尿素的吸光度为 0. 113. 考虑到称样量和分取体积等因素,建议本法适用于尿素质量分数在 0. 2% 以上的饲料产品.

2.8 实验中须注意的问题

饲料原材料豆粕中含有尿素酶,遇水会使尿素分解. 因此当样品加入活性碳和水后,要迅速加入乙酸锌,使尿素酶沉淀失活,以免样品中的尿素被分解.

2.9 实验结果的准确性和重复性

取 100 g 不含尿素的饲料,加入质量分数大于 99.0% 的分析纯尿素 2 g,充分混均,用 1. 2 所述方法进行重复测定. 尿素的平均回收率达到 99. 9%,实验的重现性良好,RSD 为 3. 0%,见表 1.

表 1 回收实验结果

Table 1 The results of retrieve test

标号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
测得尿素含量/%	2. 01	1. 95	1. 98	2. 01	1. 90	1. 85	2. 03	1. 95	1. 97	1. 91
平均回收率/%	99. 9									
RSD/%	3. 0									

3 结 语

用活性碳吸附色素,乙酸锌和亚铁氰化钾沉淀共沉淀蛋白质、多肽、氨基酸,此多重分离的方法可以使饲料中的尿素与复杂的基体物质得到良好的分离. 样品中加入分离剂后,在 pH5 左右的酸性条件下,于 40~50 ℃ 静置 2 h,用水淋洗分离,分离效果能达到 90% 以上. 用对二甲氨基苯甲醛光度法对分离后的样液中的尿素进行定量分析,回收率可达到 99. 9%,重复实验的 RSD 为 3. 0%.

参考文献:

[1] 戴洪余. 尿素在反刍动物饲料中的应用[J]. 四川

奶业,2007(1):9-11.

[2] 杭州大学化学系分析化学教研室. 分析化学手册第三分册[M]. 北京:化学工业出版社,1983: 511.

[3] 李川江,李珂,乔澍,等. 对二甲氨基苯甲醛比色法测定微量尿素的改进[J]. 四川师范大学学报:自然科学版,2010,33(3):410-412.

[4] 邢存章,于跃芹. 有机化学[M]. 济南:山东大学出版社,2001: 696.

[5] 陈寿椿. 重要无机化学反应[M]. 上海:上海科学技术出版社,1994: 1501.

[6] 戴卫东,钱礼华,汪守建. 活性炭吸附棉籽糖液中色素的工艺研究[J]. 食品科技,2009,34(9):213-216.

[7] 颜肖慈,罗明道. 界面化学[M]. 北京:化学工业出版社,2005: 143.

# Quantitate urea within feedstuff by multi-separation and colorimetric spectrometry

WU Yu -e

(Center of Analysis and Test, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430074, China)

**Abstract:** Feedstuff was usually complicated mixture. It was difficult to quantitate the urea within it due to severe matrix interference. The present research used activated charcoal to absorb and got rid of pigments, and used zinc acetate and potassium ferrocyanide to precipitate and got rid of proteins, polypeptide and amino acids in feedstuff. The resolution of urea and interference substances were achieved by 90% under optima separation condition as follow: the ratio of sample and activated charcoal was maintained 1 to 2, liquid and solid is maintained 10 to 15, absorb reaction temperature at 40 to 50 °C and pH value is adjusted to 5, after stirred 2 hours, let the system stand and undergo adsorption process, then rinsed by distilled water. By above treatment, 4-Dimethylaminobenzaldehyde colorimetric spectrometry was employed to quantitate the urea in feedstuff sample, the recovery of urea was 99.9% and RSD was 3.0%.

**Key words:** urea within feedstuff; interference substances' separation method and condition; quantitation analysis

本文编辑:张瑞



(上接第 13 页)

# Formation and application of the carboxy-terminated self-assembled monolayers on silicon wafer

MAO Qiang-qiang , XIONG Fang-xin , ZHAO Jing , LIU Shan-tang

(Hubei Novel Reactor & Green Chemical Technology Key Laboratory,

Key Laboratory for Green Chemical Process of Ministry of Education, School of Chemical Engineering and Pharmacy, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430074, China)

**Abstract:** Cyano-terminated self-assembled monolayers (SAMs) were prepared on silicon wafer by the chemisorption of 4-(triethoxysilyl)-butyronitrile, followed by hydrolysis of the terminal groups in hydrochloric acid solution, and then the cyano groups were converted into carboxylic acid groups. Here we investigated the effects of the concentration of  $H^+$ , the reaction temperature and time of solution on the change of the top groups cyano into carboxylic acid. The disappearance of the absorption band of the  $C\equiv N$  at  $2\,250\,cm^{-1}$  and the appearance of the  $C=O$  at  $1\,715\,cm^{-1}$  in FT-IR spectra region provide direct evidence for the conversion of cyano to carboxyl groups. After the cyano were converted into carboxyl, the surface of SAM became hydrophilic and the water contact angle fell from approximately  $60^\circ$  to  $30^\circ$ . Based on the ability of the carboxyl groups of the monolayer to bind  $Ag^+$ , followed by the reduction of  $Ag^+$  to  $Ag^0$  with  $NaBH_4$ , silver nanoparticles were generated on the carboxy-terminated SAMs surface. AFM image show the size of the silver nanoparticles was around 9 nm. These results demonstrated that the carboxy-terminated SAMs were prepared on silicon wafer and could be used as a template for the formation of metal nanoparticles.

**Key words:** silicon wafer; self-assembled monolayers; carboxyl group; metal nanoparticles

本文编辑:张瑞