

# 基于多孔石墨碳柱的高效液相色谱法测定电合成尿素产物

沈睿 李泳谊 高晓静 施超欧

(华东理工大学分析测试中心, 上海 200237)

**摘要:** 利用多孔石墨碳柱建立了电合成尿素产物中尿素的高效液相色谱分析方法。选择 Hypercarb™ 多孔石墨碳柱, 采用水-25 mmol/L 甲基磺酸溶液为流动相进行梯度洗脱分离, 柱温为 30 °C, 流速为 1.0 mL/min, 检测波长 190 nm, 可实现不受电解液中其它杂质如 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>、CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>等离子干扰的尿素测定。结果表明, 尿素在 0.1~100 mg/L 质量浓度范围内线性关系良好, 相关系数 ( $r^2$ ) 大于 0.9988; 相对标准偏差 (RSD) 小于 0.79%, 低、中、高三个浓度下的加标回收率在 112.0%~118.4%之间。最后对所接收的实际电解液样品进样分析, 结果显示尿素色谱峰峰形良好, 且未受到其他杂质峰的干扰。该方法前处理简单, 方便快捷, 结果准确可靠, 特异性好, 可用于实际电合成尿素电解液产物中微量尿素及其它相关离子的检测。

**关键词** 多孔石墨碳柱; 高效液相色谱; 尿素; 阴离子

**中图分类号:**

**文献标识码:**

## Determination of electrosynthesized urea products by high performance liquid chromatography based on porous graphite carbon columns

SHEN Rui, LI Yongyi, GAO Xiaojing, SHI Chaoou

(Analysis and Measurement Center, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

**Abstract:** In this paper, a high performance liquid chromatographic method for the analysis of urea in electrosynthesized urea products was established using a porous graphite carbon column. The Hypercarb™ porous graphite carbon column was selected, and water-25 mmol/L methanesulfonic acid solution was used as the mobile phase for the gradient elution and separation, with the column temperature of 30 °C, the flow rate of 1.0 mL/min, and the detection wavelength of 190 nm, which enables the determination of urea without the interference of other impurities in the electrolyte, such as NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, and other ions. The results showed that the linearity of urea was good in the mass concentration range of 0.1~100 mg/L with the correlation coefficient ( $r^2$ ) greater than 0.9988; the relative standard deviation (RSD) was less than 0.79%, and the spiked recoveries were in the range of 112.0%~118.4%. Finally, the actual electrolyte samples received

were sampled and analyzed, and the results showed that the peak shape of the urea chromatogram was good and was not interfered by other impurity peaks. The method is simple, convenient, accurate, reliable and specific. It can be used for the detection of trace urea and other related ions in the actual electrosynthesized urea electrolyte products.

**Keywords:** porous graphite carbon column; high performance liquid chromatography; urea; anions

## 1 前言

尿素 (Urea), 又称脲或碳酰胺, 是最简单的有机化合物之一, 其化学性质并不稳定, 在酸、碱或酶的作用下易水解, 在高温下发生缩合反应。尿素广泛存在于自然界中, 是哺乳动物和两栖动物氮排泄的主要代谢产物, 还可作为农作物肥料、动物饲料、日用品、炸药等产品的原料; 也是许多日常护肤产品的主要成分, 可用于临床中各种皮肤病的治疗<sup>[1]</sup>, 与日常生活息息相关。

电化学合成尿素法可以在一定程度上弥补传统尿素制备所带来的的能源消耗和环境污染问题<sup>[2]</sup>。该方法主要是以  $N_2$  或其它氮源和  $CO_2$  作为原料, 在水中电耦合生成尿素<sup>[3]</sup>。由于亚硝酸盐的解离能更低, 在合成反应中有利于节约成本、降低能耗<sup>[4]</sup>, 可采用碳酸氢根和硝酸盐或亚硝酸盐电解液与  $CO_2$  一同反应进行制备<sup>[5]</sup>。在电化学合成法反应液中, 鉴于方法产率较低, 除含有少量产物尿素外, 还存在大量  $NO_3^-$ 、 $NO_2^-$ 、 $CO_3^{2-}$  等杂质离子, 易对尿素测定产生干扰。

目前国内外关于尿素, 特别是微量及痕量尿素的检测方法, 已有多项报道, 主要有脲酶法<sup>[6-8]</sup>、比色法<sup>[9,10]</sup>、红外光谱法<sup>[11]</sup>及高效液相色谱法<sup>[12,13]</sup>等等。刘灵辉等<sup>[7]</sup>采用脲酶-谷氨酸脱氢酶偶联法, 改进后可实现游泳池水中尿素含量的自动化分析; Chen 等<sup>[9]</sup>和付智慧<sup>[10]</sup>分别选取了二乙酰一肟和对二甲氨基苯甲醛为显色剂, 使其与尿素发生显色反应后, 利用分光光度计进行测定; 谭良锋等<sup>[14]</sup>采用中红外光谱法进行车用尿素的定量分析。其中, 脲酶法和比色法需要对样品进行复杂的预处理操作, 灵敏度和精确度有所损失; 红外光谱法一般可直接进样, 方便快捷, 但灵敏度相对较低; 高效液相色谱具有检测快速、便捷灵敏等优点, 由于尿素属于强极性化合物, 难以在传统液相色谱柱上显著保留, 常常采用亲水作用色谱柱<sup>[15]</sup>、柱前衍生-荧光检测法<sup>[12,16]</sup>、串联质谱法<sup>[17]</sup>等来提高检测灵敏度。其中, Zhang<sup>[12]</sup>等人采用荧光检测器对酒精饮料中尿素的进行测定, 检出限为 0.003 mg/L; Kramer M<sup>[17]</sup>等人对比

了串联质谱和荧光检测两种色谱方法检测饲料中的尿素含量，检出限分别为 3 mg/kg 和 2 mg/kg。

由于尿素的紫外吸收波长在 190 nm 左右，处于远紫外吸收区，因此在使用紫外检测器时，检测易受到干扰。多孔石墨化碳（Porous Graphitic Carbon, PGC）柱作为一种于上世纪八十年代开始商品化的色谱柱，在色谱分析方面有着优于反相键合硅胶柱的一些独特性能。填料 PGC 是一种多孔球形颗粒呈层状交织的特殊导电材料，具有高度稳定性和机械强度，耐强酸强碱、耐高温，非常适用于严苛实验条件下的物质分离<sup>[18]</sup>。同时，其特殊的石墨极性保留效应（PREG）使得在极性物质<sup>[19-21]</sup>的分离上有着极大的优势，将 PGC 柱用于电解液体系下尿素的分离，并在 190nm 低紫外波长下进行检测在理论上是可行的。

国内外已有相关文献报道了关于电合成尿素的反应液中微量尿素的分析方法。刘洋<sup>[22]</sup>等人和 Meng<sup>[4]</sup>等人均采用 NH<sub>2</sub> Phenomenex 色谱柱，分别以乙腈水溶液和甲醇水溶液为流动相，进行电解液中尿素含量的测定，但还未有利用 PGC 柱进行分离检测的相关方法报道。

本研究利用 PGC 柱特殊的保留效应，且在低紫外吸收波长下柱流失远小于传统反相色谱柱的特殊性能，探讨其应用于高效液相色谱并进行电解液体系下尿素检测的可行性。由于电合成尿素产物中存在基体浓度高、离子干扰多等问题，通过对色谱条件的考察以及方法学的验证，实现了实际电合成尿素的电解液中尿素的分离和检测，避免了高浓度杂质离子的干扰。该方法操作简单，无需复杂的样品前处理过程，仅需过滤，为电解液中尿素含量的测定提供一种全新独特且方便准确的检测方法。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器、试剂与材料

U3000 高效液相色谱仪（美国 Thermo 公司）；Hypercarb<sup>TM</sup> 多孔石墨化碳柱，100 mm×4.6 mm，（美国 Thermo 公司）；AL204 电子天平（梅特勒-托利多公司）；Millipore-Q A10 超纯水机（美国 Merck Millipore 公司）；100~1000 μL 移液枪（北京大龙公司）；100mL 容量瓶。

硫酸（96%，国药集团化学试剂有限公司）；磷酸（85%水溶液）、甲基磺酸（MSA, 99.5%）、尿素（99.5%，生物分子级）、无水碳酸钠（优级纯）、无水碳酸氢钠（优级纯）、氢氧化钠（优级纯）均为上海阿拉丁生化科技公司；水中 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>标准溶液，100 mg/L，上海市计量测试技术研究院。

### 2.2 溶液配制

#### 2.2.1 标准溶液的配制

尿素标准溶液：准确称量 100.5 mg 尿素至 100 mL 容量瓶中并用超纯水定容，得到 1000 mg/L 的尿素标准溶液，备用；根据情况分别取适量标准储备液，用超纯水稀释成不同浓度的标准溶液。

模拟电解液溶液：准确称取 1.011 g 硝酸钾和 1.060 g 碳酸钠至 100 mL 容量瓶中用超纯水定容，得到 0.1 mol/L 电解液，备用。

模拟电解液尿素样品溶液：准确称取 1.011 g 硝酸钾、1.060 g 碳酸钠和 100.5 mg 尿素至 100 mL 容量瓶中并用超纯水定容，再利用 0.1 mol/L 电解液逐级稀释得到 0.1 mol/L 电解液背景下的系列浓度尿素样品溶液。

### 2.2.2 样品前处理方法

电合成尿素的实际样品溶液以 0.22  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤，即得待测样品溶液。

## 2.3 色谱条件

色谱柱：Hypercarb™ 多孔石墨碳柱（100 mm  $\times$  4.6 mm，5  $\mu\text{m}$ ）；柱温：30  $^{\circ}\text{C}$ ；流动相：A:  $\text{H}_2\text{O}$ ；B: 25 mmol/L MSA；流速：1 mL/min；进样量：25.0  $\mu\text{L}$ ；检测器：二极管阵列检测器，190 nm；梯度洗脱程序：0-2 min，2% B；2-8 min，40% B；8-15 min，2% B。

## 3 结果与讨论

### 3.1 色谱条件的优化

#### 3.1.1 色谱柱和检测波长的选择

参考文献<sup>[16,22]</sup>色谱条件利用 C18 柱对尿素进行测定，但在实际分析中发现，高浓度的  $\text{NO}_3^-$  与尿素难以分离，干扰现象严重，如图 1 所示。因此我们尝试选择 Hypercarb 柱，发现  $\text{NO}_3^-$  会受到 PGC 较强的保留作用，使得  $\text{NO}_3^-$  出峰延后，远离尿素峰。这可能是由于  $\text{NO}_3^-$  所带孤对电子与 PGC 表面产生电子间相互作用，在酸性条件下，阴离子的保留性增强，而在碱性条件下反之。

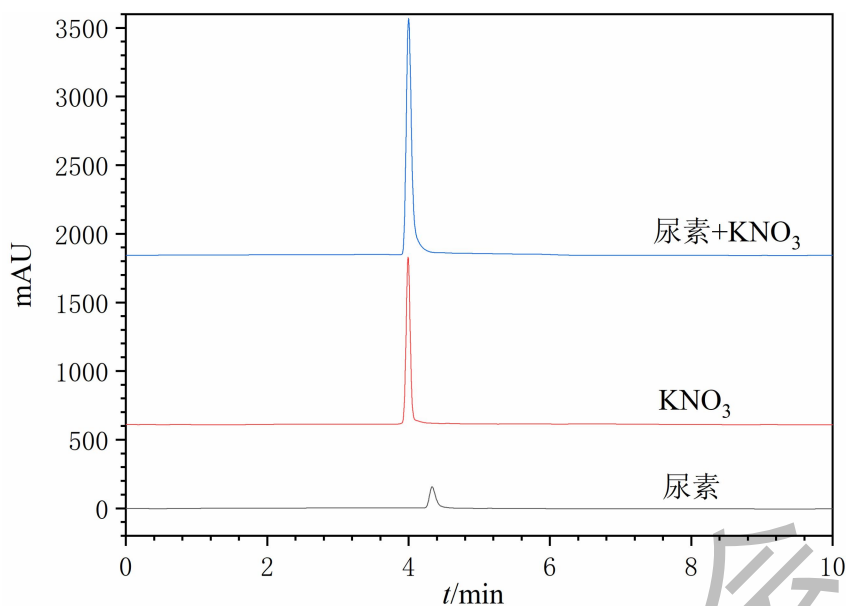


图 1 C18 柱下的尿素、硝酸钾及混合标样的色谱图

在对比了尿素以及其他相关杂质离子的紫外光谱图后发现，尿素紫外吸收小，而待测样品中尿素浓度很低，在 190 nm 这一极端波长下，尿素才有较大的响应，满足灵敏度的要求，而在 195 nm 或更高波长下，难以检测到微量尿素，灵敏度有所欠缺。同时，在 190 nm 低波长的极端检测条件下，PGC 柱的背景噪音相较于 C18 柱等传统色谱柱而言更小，可在尿素检测时减少背景干扰。综合考虑选择 190 nm 作为检测波长，而在通常情况下，小于 195 nm 是无法进行紫外检测的。

### 3.1.2 流动相的选择

鉴于尿素在碱性环境下不稳定且易分解，需在中性或酸性流动相中进行分离。选择磷酸、硫酸以及甲基磺酸三种常见酸性流动相，在相同色谱条件下，分别考察 10 mmol/L 磷酸、硫酸和 5 mmol/L 甲基磺酸下的分离效果，见图 2。结果表明，磷酸洗脱得到的尿素峰值响应较低，且噪音较大，影响检测灵敏度；而以硫酸为流动相时，在尿素保留时间附近出现倒峰，干扰尿素测定。采用甲基磺酸溶液进行淋洗时，可得到基线平稳、峰形优良的尿素液相色谱图。故最终选择甲基磺酸溶液作为流动相。

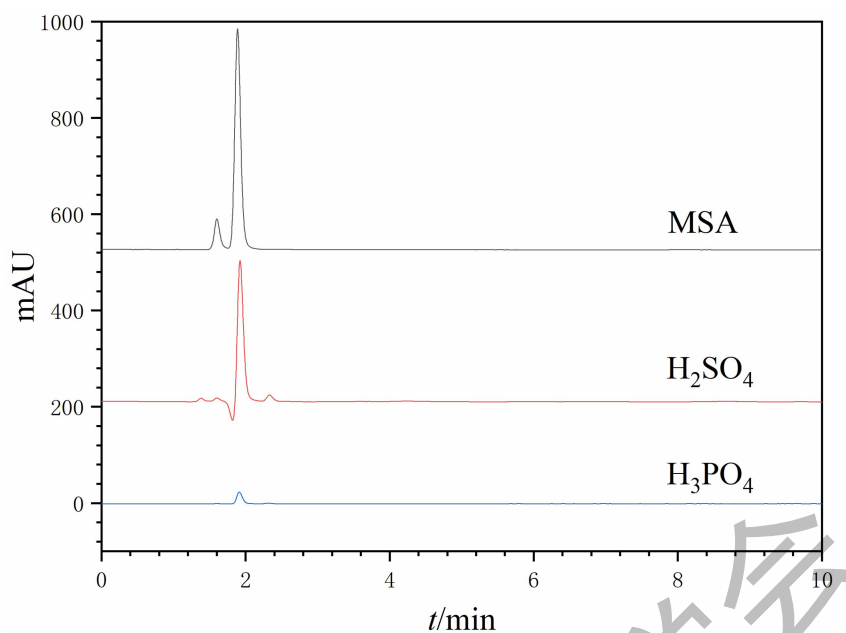


图 2 三种酸性流动相下的尿素标样色谱图

### 3.1.3 流速和柱温的优化

流动相的流速以及色谱柱的柱温均会对待测物的出峰时间以及峰宽造成影响，流速的提高使得柱压增大，从而导致出峰提前；而柱温的改变也会影响待测物与固定相之间的相互作用，发生出峰提前或延后的现象。为确立最佳流速及柱温，在 PGC 柱上，以 5.0 mmol/L 甲基磺酸作为淋洗液，对所配制的 50 mg/L 尿素标样进样，首先考察了 0.3~1.2 mL/min 不同流速对分离效果的影响，结果表明，随着流速增加，尿素保留时间缩短，且峰宽变窄；当流速为 1.0 mL/min 时，有效塔板数较大，分离效果好。其次考察了 20~40 °C 不同柱温对检测结果的影响，数据显示，柱温升高会导致保留时间略有前移，30 °C 下的有效塔板数最高。综合考虑保留时间、塔板数以及分析效率、峰形等因素，最终确定流速为 1.0 mL/min，柱温为 30 °C。

### 3.1.4 浓度优化及干扰离子实验

在流动相淋洗浓度优化实验中，由于样品中除尿素外还含有大量  $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{HCOO}^-$ 、 $\text{HCO}_3^-$  等杂质离子，在选择流动相浓度时需考虑尿素与杂质的分离度。本研究初步尝试等度淋洗的方法。分别选取了 10 mmol/L、5 mmol/L、2.5 mmol/L 三个浓度的甲基磺酸溶液作为淋洗液进行洗脱。检测结果表明，当淋洗液浓度不断降低时，尿素保留时间未有明显变化，而  $\text{NO}_3^-$  等离子的保留时间发生后移。当甲基磺酸浓度为 2.5 mmol/L 时， $\text{NO}_3^-$  的出峰时间延长至 20 min，拉长了检测时间，影响检测效率。而以 5 mmol/L 甲基磺酸溶液洗脱时， $\text{NO}_2^-$  和尿素的色谱峰产生部分重叠（图 2.a），影响尿素分析的准确性。

鉴于此，为实现尿素与其他离子的完全分离，提高分析效率，进一步开发梯度洗脱的方法。最终确定洗脱程序见 1.3。在此梯度淋洗条件下，对尿素混合杂质样品及杂质混合样品分别进样分析。结果表明，尿素的检测未受到  $\text{NO}_2^-$  等其他杂质离子的干扰（图 2.b），峰形窄而尖，有利于定性定量分析，且分析时间仅 15 min，提高了检测效率。

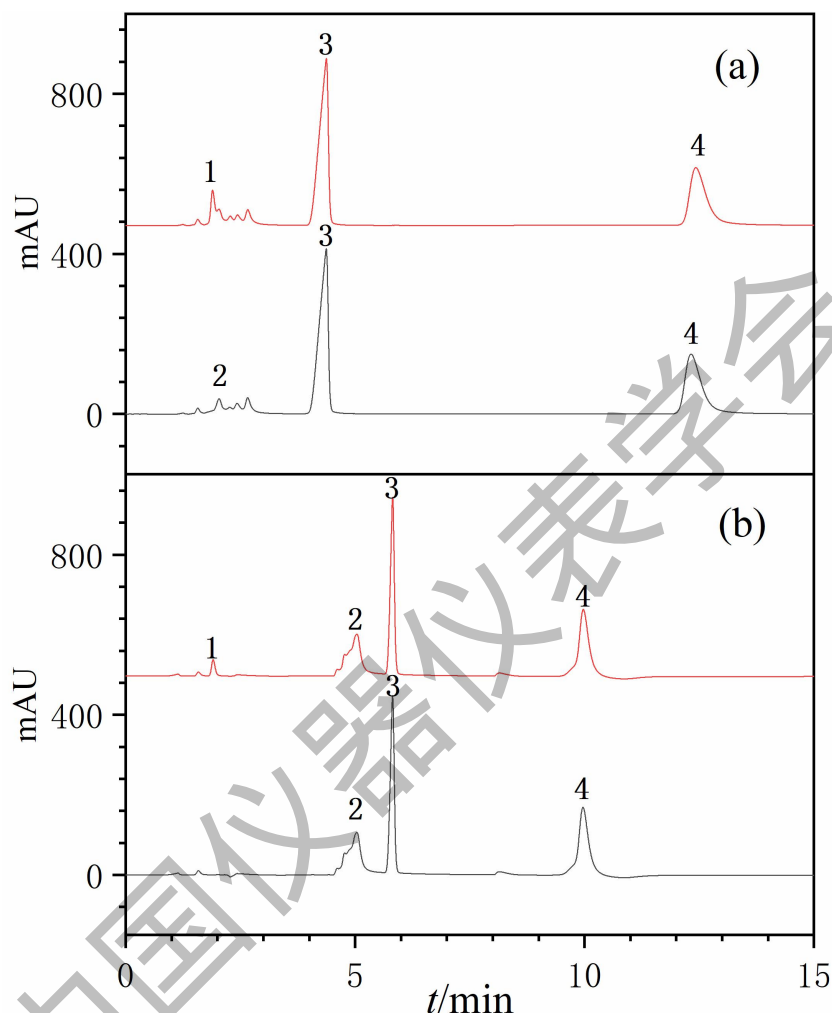


图 3 尿素杂质混合样品（上）及杂质混合样品（下）色谱图 a 等度洗脱 b 梯度洗脱

色谱峰：1. urea； 2.  $\text{NO}_2^-$ ； 3.  $\text{NH}_4^+$ ； 4.  $\text{NO}_3^-$ 。

## 3.2 方法学考察

### 3.2.1 线性关系、检出限与定量限

根据 1.3 所述色谱条件进行测定。待仪器稳定后，对配制好的 0.1、1.0、5.0、10、25、50、100 mg/L 一系列电解质尿素线性标准溶液，浓度从低到高依次进样分析，每个浓度重复测定 3 次。分别以峰面积和峰高的平均值为纵坐标，尿素质量浓度为横坐标绘制标准曲线，可得到对应的线性回归方程。结果表明，峰面积和峰高与浓度均呈现良好的线性关系，相关系数  $r^2$  分别为 0.9997 和 0.9988。同时取噪音 0.098 mAU，以  $S/N=3$  计算方法的检出限为 0.028

mg/L, 以  $S/N=10$  计算方法的定量限为 0.093 mg/L。

### 3.2.2 重复性

为考察方法的重复性, 同样在最佳色谱条件下, 对配制好的 10 mg/L、50 mg/L、100 mg/L 三个浓度的标准溶液样品分别进行连续进样分析, 每个浓度平行测定 8 次, 记录相应的峰面积和峰高。结果见表 3, 保留时间及峰面积、峰高的相对标准偏差 (RSD) 在 0.065%~0.79% 之间, 说明该方法的检测重复性良好。

表 3 三种浓度下尿素标样的精密度 (n=8)

No.	10 mg/L			50 mg/L			100 mg/L		
	t <sub>R</sub> / min	峰面积/ (mAU*min)	峰高/ mAU	t <sub>R</sub> / min	峰面积/ (mAU*min)	峰高/ mAU	t <sub>R</sub> / min	峰面积/ (mAU*min)	峰高/ mAU
RSD (%)	0.17	0.27	0.79	0.081	0.065	0.64	0.072	0.084	0.67

### 3.2.3 加标回收率

通过对实际电解液样品进行加标回收实验, 以考察方法的准确度。选取一个预处理后的 0.1 mol/L 电解液体系下实际电合成尿素的样品溶液为基底, 加入电解液标准样品, 得到位于线性范围内的低、中、高三个浓度待测样品, 平行测定 6 次, 根据结果计算回收率和 RSD 值, 具体见表 4。所得加标回收率在 112.0%~118.4% 之间, RSD 在 3.1%~4.6% 之间, 表明该方法准确度良好, 能满足实际样品基本检测需求。

表 4 电解液中尿素的加标回收率和相对标准偏差 (n=6)

目标物	本底值/(mg/L)	加标量/(mg/L)	测定值/(mg/L)	回收率/%	RSD/%
Urea	0.126	0.080	0.221	118.2	4.6
		0.10	0.238	112.0	3.1
		0.12	0.268	118.4	4.6

### 3.3 实际样品检测

采用该创新性的分析体系, 对所接收的 0.1 mol/L 硝酸钾和碳酸钾电解液体系下进行电合成尿素的多个实际样品进行检测。由色谱图分析, 在 1.5 min 左右出现一较高色谱峰, 在对照了干扰离子实验的结果后难以对其进行归属, 猜测其为在实际电解合成尿素过程中产生的其他杂质。同时  $\text{NO}_2^-$  以及高浓度的  $\text{NO}_3^-$  等杂质离子的保留时间与标样存在差异, 可能是实际样品中的其他未知化合物对其在 PGC 柱上的保留造成影响, 但并未对低浓度的尿素测



定造成干扰, 并利用峰面积进行定量计算得该样品中尿素浓度为 0.126 mg/L, 其余样品中尿素浓度分别为 0.0963 mg/L、0.148 mg/L、0.152 mg/L。说明将该方法应用于实际电合成生产尿素的产物检测是可行的。

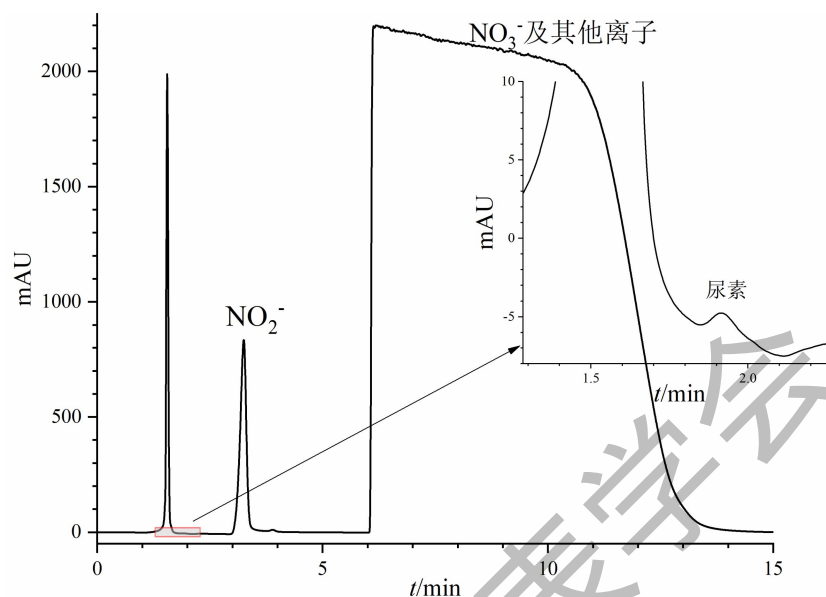


图 4 电合成尿素实际样品色谱图

## 4 结论

本研究建立了将 PGC 柱应用于高效液相色谱来测定电解液体系下微量尿素的分析方法。针对电合成尿素样品的特点, 选择 Hypercarb 柱, 其特殊的保留效应能将尿素与其它高浓度干扰离子轻易分开, 避免了高浓度基体的干扰, 在 190 nm 的超低检测波长下, 既提高尿素的灵敏度, 并保证较低的背景噪音和基线的稳定性。该方法灵敏度高, 准确性好, 且前处理步骤简单, 检测效率高, 为电合成尿素的测定提供了一种新的分析手段。

## 参考文献

- [1] Dirschka T. Mode of action of urea[J]. Int J Clin Pract, 2020, 74:e13569.
- [2] Zhu X, Zhou X, Jing Y, et al. Electrochemical synthesis of urea on MBenes[J]. Nat Commun, 2021, 12(1):4080.
- [3] Chen C, Zhu X, Wen X, et al. Coupling N<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O to synthesize urea under ambient conditions[J]. Nat Chem, 2020, 12(8):717-724.
- [4] Meng N N, Huang Y M, Liu Y, et al. Electrosynthesis of urea from nitrite and CO<sub>2</sub> over oxygen vacancy-rich ZnO porous nanosheets[J]. Cell Reports Physical Science, 2021,

2(12):100378.

- [5] Feng Y G, Yang H, Zhang Y, et al. Te-Doped Pd Nanocrystal for Electrochemical Urea Production by Efficiently Coupling Carbon Dioxide Reduction with Nitrite Reduction[J]. Nano Letters, 2020, 20(11): 8282-8289.
- [6] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 化妆品中尿素含量的测定 酶催化法:GB/T 29661-2013[S]. 北京: 中国质检出版社, 2013.
- [7] 刘灵辉, 谷素英, 骆秋云, 等. 游泳池水中尿素的脲酶-谷氨酸脱氢酶偶联速率测定法[J]. 职业与健康, 2018, 34(18): 2564-2566.
- [8] Ali S M U, Ibupoto Z H, Salman S, et al. Selective determination of urea using urease immobilized on ZnO nanowires[J]. Sens & Actuators B-Chem, 2011, 160(1): 637-643.
- [9] Chen L, Ma J, Huang Y, et al. Optimization of a colorimetric method to determine trace urea in seawater[J]. Limnol & Oceanogr Meth, 2015, 13(6):303-311.
- [10] 付智慧. 对二甲氨基苯甲醛法测定缓释包膜尿素中氮含量的方法[J]. 云南化工, 2021, 48(7):99-103.
- [11] 白静,王会. 红外光谱法测定奶粉中三聚氰胺和尿素[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(8): 267-272.
- [12] Zhang J, Liu G X, Zhang Y, et al. Simultaneous Determination of Ethyl Carbamate and Urea in Alcoholic Beverages by High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Fluorescence Detection[J]. J Agric Food Chem, 2014, 62(13):2797-2802.
- [13] 王瑞菲, 徐婷, 魏凤, 等. 高效液相色谱法测定卡巴匹林钙产品与反应液中尿素的含量[J].中国兽药杂志, 2020, 54(2): 39-45.
- [14] 谭良锋, 邹国雁, 黄俊源. 中红外光谱法测定车用尿素含量[J].当代化工研究,2021 (14): 30-31.
- [15] 柏大为, 程冬, 赵慧. 亲水作用色谱法测定尿素乳膏含量[J].海峡药学, 2020, 32(6): 62-65.
- [16] 曾琪, 张缙, 徐敦明, 等. 柱前衍生-高效液相色谱-荧光检测法测定罐头食品中的尿素[J]. 色谱, 2015, 33(1): 80-83.
- [17] Kramer M, Fry H, Kappenstein O. Development and validation of two analytical methods for urea determination in compound feed, including pet food, and yeast using high-performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection and tandem mass spectrometry[J].

Food Addit Contam Part A-Chem, 2021, 38(6):931-942.

- [18] Pereira L. Porous graphitic carbon as a stationary phase in HPLC: Theory and applications[J]. J Liq Chromatogr & Relat Technol, 2008, 31(11-12):1687-1731.
- [19] Grinevich O, Khesina Z, Buryak A. Abnormal retention of s-triazine herbicides on porous graphitic carbon[J]. Rev Anal Chem, 2021, 41(1):1-9.
- [20] Jin C H, Eom H Y, Bae S J, et al. Enhancement of teprenone isomer separation by subcritical fluid chromatography using porous graphitic carbon column[J]. J Anal Sci & Technol, 2021, 12: 1-10.
- [21] Yokoyama T, Andoh Y, Kunisawa T, et al. Selective determination of formaldehyde by high-performance liquid chromatography with porous graphitic carbon column using N,N'-bis(9-anthrylmethyl)propane-1,3-diamine as derivatizing reagent[J]. Anal Sci, 2023, 39(3):285-295.
- [22] 刘洋, 王意, 黄艳梅, 等. 高效液相色谱法测定电解液中尿素的含量[J]. 分析试验室, 2021, 40(10): 1216-1218.