

超声萃取-高效液相色谱测定土壤中的氯硝柳胺

周颖¹, 周艺彪², 何明祯², 王海银², 屈卫东³, 姜庆五^{2*}

[摘要] 目的 建立土壤中氯硝柳胺的超声萃取-高效液相色谱检测方法。方法 土壤样品经风干研磨过筛后, 称取 10 g 加入 90 ml 甲醇超声萃取 3 次, 应用高效液相色谱分离, 紫外检测器检测氯硝柳胺含量。结果 方法线性范围为 1~100 $\mu\text{g/ml}$ 检出限为 50 $\mu\text{g/kg}$ 相对标准偏差为 4.6% ($n=7$), 样品加标回收率为 73.0%~77.4%, 平均回收率为 75.1%。结论 应用超声萃取-高效液相色谱检测土壤中氯硝柳胺含量, 操作简便, 定量准确, 仪器要求低, 易于普及。

[关键词] 氯硝柳胺; 超声萃取; 高效液相色谱; 响应曲面法; 土壤

[中图分类号] R115 [文献标识码] A

Determination of niclosamide in soil by high-performance liquid chromatography with ultrasonic extraction

Zhou Ying¹, Zhou Yibiao², He Mingzhen², Wang Haiyin², Qu Weidong³, Jiang Qingwu²

1 Department of Sanitary Chemistry, School of Public Health, Fudan University, Key Laboratory of Public Health Safety, Ministry of Education, Shanghai 200032, China; 2 Department of Epidemiology, School of Public Health, Fudan University, China; 3 Department of Environmental Health, School of Public Health, Fudan University, China

* Corresponding author

[Abstract] **Objective** To establish a method for determination of niclosamide in soil by high-performance liquid chromatography (HPLC) with ultrasonic extraction. **Methods** The soil was firstly dried at room temperature and then grounded down to a fine granular material and further sieved by using a copper mesh of 90 μm . The sieved soil sample (10 g) was extracted ultrasonically with 90 ml methanol thrice for 17 min each time. Finally the extract was concentrated and analyzed by HPLC with an ultraviolet detector. **Results** The analytical method was shown to be linear in the range of 1–100 $\mu\text{g/ml}$ and reached the limit of detection of 50 $\mu\text{g/kg}$. The relative standard deviation (RSD) was 4.6% ($n=7$). The method accuracy was also assessed and good recovery rates (73.0%–77.4%) were obtained. **Conclusion** The proposed method based on ultrasonic extraction with HPLC is a simple and accurate method for analysis of niclosamide in soil.

[Key words] Niclosamide; Ultrasonic extraction; High-performance liquid chromatography; Response surface methodology; Soil

氯硝柳胺 (Niclosamide), 化学名 4-硝基-2,5-二氯水杨酰苯胺, 为无臭无味的黄色粉末。氯硝柳胺对螺类的毒性很大, 约为五氯酚钠的 5~8 倍^[1]。它是世界卫生组织 (WHO) 唯一推荐使用的化学灭螺药^[2], 目前在我国血吸虫病流行区被广泛使用^[3]。虽然施药后氯硝柳胺在土壤中持续时间及其持效时间已有报道^[4,5], 但都是定性结果, 氯硝柳胺的有效灭螺浓度、降解情况和环境残留量等尚不清楚。因此, 建立土壤中氯硝柳胺的检测方法十分必要。目前, 国内外分析氯

硝柳胺的方法主要有分光光度法^[6]、气相色谱法^[7]和高效液相色谱法^[8-10]等。其中高效液相色谱法因操作简单、分离效果好而使用最广。但是基于土壤样品的氯硝柳胺分析尚未见报道。土壤中有有机物的提取常采用索氏萃取技术^[11]。虽然索氏萃取法的提取效率较高, 但提取时间长 (约 12 h)。与常规的索氏萃取技术相比, 超声萃取技术具有快速和高效的特点^[11]。本研究采用超声萃取技术提取土壤中的氯硝柳胺, 然后用高效液相色谱法进行分析, 以建立土壤中氯硝柳胺的检测方法。

材料与方法

1 主要仪器和试剂

HP 1100 型高效液相色谱仪包括 DAD 紫外检测器 (美国 Agilent 公司); CSF-1A 超声波发生器 (上海超

[基金项目] 国家高技术研究发展技术 (863 计划) (2006AA02Z402)
[作者单位] 1 复旦大学公共卫生学院卫生化学教研室、公共卫生安全教育部重点实验室 (上海 200032); 2 复旦大学公共卫生学院流行病学教研室; 3 复旦大学公共卫生学院环境卫生学教研室
[作者简介] 周颖, 男, 博士, 讲师。研究方向: 卫生检验
* 通讯作者 电话: 021-54237435 E-mail: jiangqw@fudan.edu.cn

声波仪器厂); RE 52-99 旋转蒸发仪带恒温水浴 (上海亚荣生化仪器厂), SHZ-3 循环水多用真空泵 (上海沪西分析仪器有限公司); PTFE 微孔滤膜 (0.45 μm, 美国 Agilent 公司); 氯硝柳胺标准品 (纯度 > 98%, 美国 Sigma 公司); 甲醇 (HPLC 级, 美国 Merck 公司); Millipore 超纯水 (美国 Millipore 公司)。氯硝柳胺标准储备液 (1 mg/ml): 精确称取 10 mg 氯硝柳胺标准品, 加入适量甲醇作溶剂, 超声浴中溶解 10 min, 然后用甲醇定容至 10 ml。

2 样品制备

将风干土壤研磨后过 180 孔 /25 4 mm 铜丝筛于铝箔纸上。称取 10 g 于 250 ml 锥形烧瓶中, 用 90 ml 甲醇分次进行超声萃取。萃取次数和萃取时间用 Doehlert^[12] 实验设计进行优化 (表 1)。萃取物以 3 000 r/min 离心 10 min, 合并上清液; 将上清液转移至鸡心瓶中 (在转移过程中过 0.45 μm 滤膜), 在旋转蒸发仪上浓缩至 2 ml 左右, 转移至 10 ml 离心管中, 同时用 4 ml 甲醇分两次清洗鸡心瓶, 清洗液一同加入离心管中, 然后继续在旋转蒸发仪上浓缩至 1 ml, 4 °C 保存待分析。

表 1 Doehlert 设计矩阵和实验条件

Table 1 Doehlert's experimental matrix and corresponding experimental conditions

| 实验 Experiment | 编码矩阵 Coded matrix | | 实验条件 Experimental condition | |
|------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| | 萃取时间 Extraction time (min) | 萃取次数 Extraction times | 萃取时间 Extraction time (min) | 萃取次数 Extraction times |
| | 1 | - 0.50 | 0.87 | 10 |
| 2 | - 0.50 | - 0.87 | 10 | 1 |
| 3 | 0 | 0 | 15 | 2 |
| 4 | 0.50 | - 0.87 | 20 | 1 |
| 5 | 1.00 | 0 | 25 | 2 |
| 6 | - 1.00 | 0 | 5 | 2 |
| 7 | 0.50 | 0.87 | 20 | 3 |
| 8 | 0 | 0 | 15 | 2 |
| 9 | 0 | 0 | 15 | 2 |
| 10 | 0 | 0 | 15 | 2 |

3 色谱条件

ZORBAX Eclipse Plus C18 型色谱柱, 大小为 150 mm × 4.6 mm × 5 μm; 选用乙腈和乙酸缓冲溶液^[8]、乙腈和磷酸缓冲溶液^[9]、甲醇和水^[10]等 3 种流动相进行实验, 流速 1.0 ml/min, 检测波长为 330 nm; 柱温为 40 °C; 进样体积 20 μl。外标法峰面积定量^[13]。

4 样品分析

采集 6 份施用氯硝柳胺后不同时间间隔的土壤样品, - 20 °C 保存待分析。

结 果

1 色谱流动相的选择

用甲醇和水 (3: 1) 作流动相时, 氯硝柳胺的峰形对称, 且保留时间较短。如图 1 所示, 氯硝柳胺的保留时间为 10.194 min。

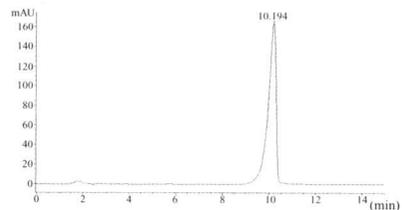


图 1 氯硝柳胺标准品的色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of niclosamide

2 超声萃取条件的优化

利用响应曲面法^[14]对超声萃取次数和萃取时间进行实验。两因素的 Doehlert 设计矩阵被用于实验设计。所有实验均随机进行以减少系统误差。加标回收率作为响应值来评价萃取效率。通过最小二乘回归, 可得到一个二阶回归模型:

$$\text{加标回收率} = -94\ 740\ 63 + 6\ 538\ 08X_1 + 101\ 632\ 50X_2 - 0\ 199\ 23X_1^2 - 21\ 681\ 87X_2^2$$

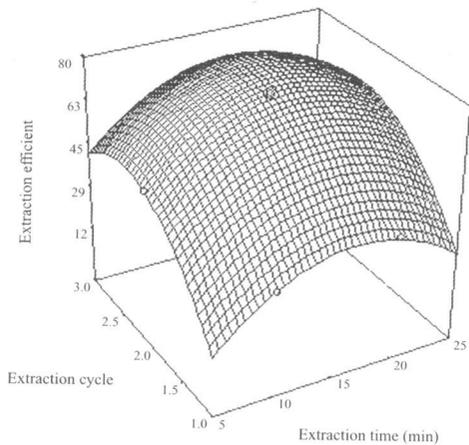


图 2 萃取时间和萃取次数的响应曲面图
Fig 2 Response surface plot of extraction time and extraction cycle

X_1, X_2 分别代表萃取时间和萃取次数。方差分析显示该模型具有统计学意义 ($P < 0.01$)。基于模型方程得到响应曲面图如图 2 所示, 图中 X、Y、Z 轴分别代表萃取时间、萃取次数和萃取效率。由图 2 可见, 在实验范围内萃取效率存在最大值。运用 Design-Expert 7.0 软件得到最大萃取效率对应的最佳萃取时间为 16.4 min, 萃取次数为 2.3 次, 此时萃取效率为 78%。

3 线性范围和检测限

配制 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0, 100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 不同浓度的氯硝柳胺标准溶液, 在优化后的色谱条件下测其峰面积, 对所测数据进行回归分析, 氯硝柳胺线性范围为 1 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 其线性回归方程为: $Y = 77.187X + 85.065$, 相关系数 $r^2 = 0.9998$, 以 3 倍的信噪比 (S/N) 计算, 方法的检测限为 0.05 mg/kg 。

4 精密度和回收率

取同一个样品, 按上述提取方法进行 7 次平行实验, 求得相对标准偏差为 4.6%。向同一个样品加入不同浓度标准溶液进行回收率实验, 结果见表 2, 平均回收率为 75.1%。

表 2 加标回收率实验

Table 2 Results of recovery test

| 样品 Samples | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--|------|------|-------|-------|-------|-------|
| 本底值 Background amounts (μg) | 5.60 | 5.60 | 5.60 | 5.60 | 5.60 | 5.60 |
| 加标量 Added amounts (μg) | 2.00 | 2.00 | 10.00 | 10.00 | 50.00 | 50.00 |
| 检测量 Detected amounts (μg) | 7.10 | 7.06 | 13.34 | 13.17 | 42.79 | 43.05 |
| 回收率 Recovery rate (%) | 75.0 | 73.0 | 77.4 | 75.7 | 74.4 | 74.9 |

5 样品分析

用本研究建立的方法分析了 6 份在撒药后不同时间段采集的土壤样本, 测定结果在 0.42 ~ 33.90 mg/kg 之间。

讨 论

氯硝柳胺常用高效液相色谱法进行分析。使用的流动相主要有乙腈和乙酸缓冲溶液^[8]、乙腈和磷酸缓冲溶液^[9]以及甲醇和水^[10]。由于样品性质不同, 使用的流动相种类或配比就会有差异。因此, 本研究参照文献分别使用上述流动相进行分析。结果显示, 在乙腈和乙酸缓冲溶液以及乙腈和磷酸缓冲溶液组成的流动相中氯硝柳胺峰型漂移严重, 而且出峰时间较长; 甲醇和水流动相能很好地分离氯硝柳胺, 且出峰时间短, 因此, 本研究使用甲醇和水作为流动相。接着使用了不同比例的甲醇和水进行实验, 结果发现,

当比例为 3:1 的甲醇和水作流动相时, 氯硝柳胺的峰形对称, 且保留时间较适宜。

与常规萃取技术相比, 超声波辅助萃取具有快速、价廉、高效等特点^[11]。就超声萃取技术而言, 萃取时间和萃取次数是影响目标成分提取效率的重要因素^[15]。常用的优化实验采用的是单因素分析, 费时且不能研究因素间的交互作用。响应曲面法不仅能够反映出各个研究因素对响应值的影响, 亦能反映出因素间交互作用, 并以三维立体图像揭示出这种内在联系。Doehlert 设计是一种响应面设计, 对于两因素而言, 它是效率最高的实验设计方法。本研究利用响应曲面法对萃取时间和萃取次数这两个因素进行研究, 分别得到二阶回归模型和响应曲面图, 清楚显示萃取时间和萃取次数对萃取效率有显著影响, 且两因素间无交互作用。

在优化的萃取条件和色谱分析条件下, 方法在 1 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围具有良好的线性关系, 且方法

的精密度和加标回收率均满足痕量分析要求。

本研究首次建立了土壤中氯硝柳胺的超声萃取-高效液相色谱检测方法。样品前处理方法简单、操作快速、定量准确, 是检测土壤中氯硝柳胺残留量的可行方法, 而且仪器要求低, 具有一定的应用推广价值。

[参考文献]

[1]张涛, 姜庆五. 氯硝柳胺的毒理学研究 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2002 14 (3): 234-236
 [2]王锐. 灭螺药研究的历史及现状 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2003, 15 (6): 478
 [3]徐世芳, 王晗, 姜丽霞. 氯硝柳胺不同剂型及其灭螺的研究进展 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2005 17 (6): 478-480
 [4]蔡祖华, 洪林娣, 邵丰尧, 等. 氯硝柳胺在水体及土壤中持效期的现场试验研究 [J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2006 17 (1): 47-48
 [5]朱明东, 洪林娣, 蔡祖华, 等. 氯硝柳胺在水体及土壤中持效时间及其影响因素的实验研究 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2005 17 (5): 373-376
 [6]嵇正平, 姜友富, 汪世新, 等. 萃取光度法测定水中氯硝柳胺含量的研究 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2005 17 (6): 430-432

[7]余智平, 李延东. 氯硝柳胺的检验 [J]. 刑事技术, 2001 (3): 52
 [8]Schreier TM, Dawson VK, Choi Y, et al Determination of niclosamide residues in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fillet tissue by High-performance liquid chromatography [J]. J Agric Food Chem, 2000 48 (6): 2212-2215
 [9]Graebing PW, Chib JS Metabolism of niclosamide in sediment and water systems [J]. J Agric Food Chem, 2004, 52 (19): 5924-5932
 [10]王娇娜, 龙海, 肖同, 等. HPLC测定氯硝柳胺的含量 [J]. 华西药理学杂志, 2006 21 (4): 401-402
 [11]杨铁金. 分析样品预处理及分离技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007 19-21
 [12]Ferreira SLC, dosSantosWNL, Quintella CM, et al Doehlert matrix a chemometric tool for analytical chemistry [J]. Talanta 2004, 63 (4): 1061-1067.
 [13]傅若农. 色谱分析概论 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004 287-288.
 [14]Lundstedt T, Seifert E, Abramo L, et al Experimental design and optimization [J]. Chemom Intell Lab Syst 1998, 42 (1): 3-40.
 [15]Tor A, Aydin ME, Ozcan S. Ultrasonic solvent extraction of organochlorine pesticides from soil [J]. Anal Chim Acta 2006, 559 (2): 173-180

[收稿日期] 2008-09-01 [编辑] 汪伟

(上接第 34 页)

为了系统、准确掌握山区血吸虫病流行动态和趋势, 为制定山区血吸虫病防治策略提供科学依据, 2005~ 2007年选择西昌市川兴镇新农村为血吸虫病疫情监测点进行血吸虫病监测。

1 内容与方法

1.1 螺情调查 每年春季对监测点内各类环境采用系统抽样结合环境抽查法普查, 框距 5~ 10m, 捕获框内全部钉螺用压碎法检查有无血吸虫感染。

1.2 人群病情调查 每年对监测点 6 岁以上全部常住居民采

用间接血凝试验 (HA) 进行筛查, 阳性者 (HA 滴度 $\geq 1: 10$) 采用 Kato-Katz 法 (1 粪 3 检) 进行病原学检查。

1.3 家畜病情调查 以在有螺地带散放的家畜为监测对象, 采用塑料杯顶管孵化法进行检查。

2 结果

2.1 人畜病情 2005~ 2007 年人群血吸虫感染率分别为 2.57%、1.67%、0.27% (表 1)。年龄分布以 60 岁以上年龄组为最高, 职业分布以农民为最高。2005~ 2007 年共检查水牛、马、骡、驴等家畜 16 头 (匹), 均未发现阳性。

表 1 2005~ 2007 年西昌市血吸虫病监测点人群血吸虫感染率和感染度

| 年份 | 检查人数 | 血检阳性人数 | 血检阳性率 (%) | 粪检人数 | 粪检阳性人数 | 感染率 (%) | 病人 EPG | 人群 EPG |
|------|------|--------|-----------|------|--------|---------|--------|--------|
| 2005 | 778 | 205 | 26.35 | 198 | 20 | 2.57 | 20.43 | 0.13 |
| 2006 | 779 | 128 | 16.43 | 128 | 13 | 1.67 | 10.66 | 0.04 |
| 2007 | 739 | 97 | 13.13 | 97 | 2 | 0.27 | 17.89 | 0.01 |

表 2 2005~ 2007 年西昌市血吸虫病监测点螺情

| 年份 | 调查面积 (m ²) | 有螺面积 (m ²) | 活螺数 | 阳性螺数 | 活螺密度 (只 / 0.1m ²) | 感染螺密度 (只 / 0.1m ²) | 钉螺感染率 (%) | 灭螺面积 (m ²) |
|------|------------------------|------------------------|-------|------|-------------------------------|--------------------------------|-----------|------------------------|
| 2005 | 37 620 | 16 240 | 4 247 | 0 | 1.13 | 0.00 | 0.00 | 10 780 |
| 2006 | 37 770 | 15 060 | 4 238 | 0 | 1.12 | 0.00 | 0.00 | 17 430 |
| 2007 | 38 650 | 13 030 | 3 304 | 0 | 0.85 | 0.00 | 0.00 | 39 090 |

2.2 螺情 2005~ 2007 年钉螺面积、活螺密度略有下降, 未查见阳性钉螺 (表 2)。

3 讨论

西昌市属大山型血吸虫病重流行区, 经过连续 3 年人畜防治, 人群血吸虫感染率从 2.57% 降至 0.27%, 下降明显。3 年未

查见阳性钉螺, 这可能与沟渠硬化及加强灭螺有关。今后要进一步改造有螺环境, 加大防治力度, 以尽早达到血吸虫病传播控制标准。

[收稿日期] 2008-08-15 [编辑] 沈怡平