

高效液相色谱法分析水稻和稻田中的氯硝柳胺乙醇胺盐残留

伍一红^{1,2}, 龚道新^{1,2*}, 彭筱^{1,2}, 谢惠^{1,2}, 韩宝禄^{1,3}

(1. 湖南农业大学资源环境学院, 湖南 长沙 410128; 2. 湖南农业大学农业环境保护研究所, 湖南 长沙 410128; 3. 中国环境科学研究院, 北京 100012)

摘要: 建立了高效液相色谱(HPLC)测定水稻和稻田中氯硝柳胺乙醇胺盐残留量的分析方法。稻田水和稻秆样品中的氯硝柳胺乙醇胺盐残留用碱性乙酸乙酯直接提取;而稻田土壤、糙米和谷壳样品则先经碱性乙醇提取,再用乙酸乙酯进行萃取。萃取物经弗罗里硅土柱净化后,经 Welchrom C18 柱分离,采用紫外检测器检测,外标法定量。在 0.01 ~ 10.00 mg/L 范围内,氯硝柳胺乙醇胺盐的峰面积与其质量浓度间呈良好的线性关系,相关系数为 0.999 8。在稻田水、土壤、稻秆、糙米和谷壳中添加 0.01 ~ 5.00 mg/kg 的氯硝柳胺乙醇胺盐,其平均回收率为 93.47% ~ 100.9% 相对标准偏差为 1.46% ~ 5.82% 符合农药残留量分析与检测的技术要求。该方法简便、快速,灵敏度高,重现性好,可用于环境系统中氯硝柳胺乙醇胺盐残留量的分析与检测。

关键词: 高效液相色谱法; 氯硝柳胺乙醇胺盐; 残留分析; 水稻; 稻田

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2011)11-1098-05

Determination of niclosamide ethanolamine residue in rice and paddy field by high performance liquid chromatography

WU Yihong^{1,2}, GONG Daoxin^{1,2*}, PENG Xiao^{1,2}, XIE Hui^{1,2}, HAN Baolu^{1,3}

(1. College of Resource and Environment, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;
2. Institute of Agricultural Environmental Protection, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;
3. Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China)

Abstract: A high performance liquid chromatographic (HPLC) method was established for the analysis of niclosamide ethanolamine residue in rice and paddy field. The paddy water and plant were extracted with alkaline ethylacetate, while the paddy soil, rice husk and unpolished rice were first extracted with alkaline ethanol, and then with ethylacetate. The extracts were then cleaned-up by a Florisil column and detected by high performance liquid chromatography with an ultraviolet detector (UVD) on a Welchrom C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The calibration curve showed good linearity from 0.01 mg/L to 10.00 mg/L with the correlation coefficient more than 0.999 8. The average recoveries of this method were from 93.47% to 100.9% with the relative standard deviations of 1.46% - 5.82% at the spiked levels of 0.01 - 5.00 mg/kg. This method is fast, simple, sensitive, reproducible and practical for the determination of niclosamide ethanolamine residue in paddy fields, and can meet the requirement of the determination of pesticide residues.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); niclosamide ethanolamine; residue analysis; rice; paddy fields

氯硝柳胺乙醇胺盐又名杀螺胺乙醇胺盐(niclosamide ethanolamine),属酰胺类化合物,是一种很强的杀软体动物剂,具有胃毒作用,对螺卵、

血吸虫尾蚴等有强杀灭作用。1958年在第6届国际热带医学和疟疾大会上 Gonnert 和 Scllraufstatter 报告了氯硝柳胺(杀螺胺)并申请了专利^[1]。氯

* 通讯联系人: 龚道新, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事农药残留分析及其生态毒理与环境行为等研究. Tel: (0731) 84617710, E-mail: gdx4910@163.com.

基金项目: 农业部农药残留试验项目(No. 2010P0025).

收稿日期: 2011-05-21

硝柳胺对螺类的杀灭效果好, 约高于五氯酚钠 5~8 倍, 但氯硝柳胺难溶于水, 使用不方便。氯硝柳胺乙醇胺盐最早由德国 Bayer A G 开发, 因其在水中溶解度大而得到大面积推广应用, 世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 推荐其为唯一可使用的化学灭螺药。自 1992 年世界银行贷款中国血吸虫病控制项目实施后, 我国一直使用氯硝柳胺乙醇胺盐进行现场灭螺, 每年使用量在 3 200 t 以上, 因而已引起科研工作者的广泛关注。

目前, 国内外有关氯硝柳胺乙醇胺盐的研究主要集中在其毒理和灭螺效果方面。重要的经济农作物如水稻、燕麦、草、甘蔗、芥子等, 在灭螺浓度下, 不受氯硝柳胺乙醇胺盐的影响, 但在长期高剂量 (10 mg/L, 2 个月或更长) 使用时会引起水稻的轻度的枯萎^[1]。将棉籽、小麦、葫芦芭、玉米、大豆、小扁豆、大麦和亚麻籽浸泡于 5 mg/L 的 70% 氯硝柳胺乙醇胺盐可湿性粉剂中, 未发现其对种子的发芽、根的形成和生长有什么影响。此外, 氯硝柳胺乙醇胺盐对香蕉、橙树、柑橘等没发现有毒副作用^[1]。我国一直以氯硝柳胺乙醇胺盐为杀螺首选药, 氯硝柳胺乙醇胺盐低浓度对螺有很高的毒性, 对环境很少有污染; 对哺乳动物几乎无毒, 进入食物链不产生副作用; 对皮肤等无刺激性; 对鱼等水生生物毒性大^[2,3]。但在致畸和致突变效应方面的研究结果则令人担忧^[1]。

氯硝柳胺的分析方法有化学滴定法^[4]、紫外分光光度计法^[5,6]和高效液相色谱法 (HPLC)^[7-10]。对氯硝柳胺乙醇胺盐的检测只见对其原药的纯度进行检测^[11-13], 简单定性, 抗干扰能力差, 不适合用于其残留检测。而关于氯硝柳胺乙醇胺盐在各种作物中的残留测定暂未见报道。目前, 中国、联合国粮食及农业组织 (FAO) /WHO、美国及欧盟等均未制定氯硝柳胺乙醇胺盐在大米中的最高允许残留量 (MRL)。我国制定的氯硝柳胺在大米中的 MRL 值为 3.00 mg/kg^[14]。本文采用 HPLC 较为系统地研究并建立了氯硝柳胺乙醇胺盐在水稻和稻田系统中的残留分析与检测方法。该方法操作简便、快速、准确, 分离效果好, 准确度和精密度均能达到定性与定量分析要求。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

HP-1100 型高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司), 2HWY-2102 型双层大容量恒温培养振荡器 (上海智城分析仪器制造有限公司), DF20 型电热

鼓风干燥箱 (北京西城区医疗机械二厂), RE-2000 型旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂), SHZ-D 型循环水真空泵 (巩义市子华仪器有限责任公司), pHS-3C 型 pH 仪 (上海精密科学仪器有限公司雷磁仪器厂)。

氯硝柳胺乙醇胺盐标准品 (纯度大于 98.59%, 浙江平湖农药厂提供); 甲醇为色谱纯试剂; 乙酸乙酯、无水乙醇、氯化钠、三乙胺均为分析纯试剂; 无水硫酸钠 (用前于 400 °C 下烘 4.0 h); 氨水 (含量为 25%~28%); 弗罗里硅土 (Florisil) (用前于 650 °C 活化 6.5 h, 再加 5% 的去离子水去活); 饱和氯化钠溶液 (温度为 20 °C 时, 在 100 g 蒸馏水中加入 36 g 氯化钠配制而成)。

1.2 样品制备

1.2.1 样品的提取

稻田水: 准确量取用定性快速滤纸过滤后的稻田水样 100.0 mL, 置于 250 mL 分液漏斗中, 加入 0.2 mL 氨水调节 pH 值为 9~10, 再加入 20 mL 饱和氯化钠溶液, 摇匀后分别用 40、40、20 mL 乙酸乙酯萃取 3 次, 合并乙酸乙酯萃取相, 于 45 °C 水浴真空旋转蒸发至近干, 冷却后用甲醇定容至 5.0 mL, 待 HPLC 检测。

稻田土壤、谷壳和糙米样品: 准确称取过 10 目筛的稻田土壤样品 10.0 g (或过 20 目筛的糙米 10.0 g、谷壳样品 10.0 g), 置于 250 mL 具塞三角瓶中, 加入 60 mL 乙醇, 并用 1.6 mL 氨水调节 pH 值为 9~10, 在恒温 (25 °C) 振荡器中振荡 30 min, 然后用布氏漏斗减压抽滤, 再分别用 20、20 mL 乙醇洗涤残渣和抽滤瓶 2 次, 合并洗涤液, 无损转入 250 mL 具塞三角瓶中, 于 50 °C 水浴真空旋转蒸发至近干。将其无损转入 250 mL 分液漏斗中, 加入 30 mL 20% 氯化钠溶液, 分别用 30、30、20 mL 乙酸乙酯萃取 3 次, 合并乙酸乙酯萃取相, 于 45 °C 水浴真空旋转蒸发至近干, 冷却后用 10 mL 二氯甲烷-甲醇 (90:10, v/v) 混合液溶解, 待弗罗里硅土柱净化。

稻秆样品: 准确称取剪碎的长为 0.5 cm 左右的稻秆样品 15.0 g, 置于 250 mL 具塞三角瓶中, 加入 60 mL 乙酸乙酯, 并用 1.6 mL 氨水调节 pH 值为 9~10, 在恒温振荡器中振荡 30 min, 然后用布氏漏斗减压抽滤, 再用 20、20 mL 乙酸乙酯洗涤残渣和抽滤瓶 2 次, 合并洗涤液, 无损转入 250 mL 具塞三角瓶中, 于 45 °C 水浴真空旋转蒸发至近干, 冷却后用 10 mL 二氯甲烷-甲醇 (90:10, v/v) 混合液溶解, 待弗罗里硅土柱净化。

1.2.2 净化

将少许脱脂棉、2 cm 厚无水硫酸钠、5 g 弗罗里硅土、2 cm 厚无水硫酸钠从下至上依次装填至玻璃柱管(20 cm(长) × 1.5 cm(内径))中制成弗罗里硅土净化柱。先用 20 mL 二氯甲烷-甲醇(90:10, v/v)混合液预淋,再将上述提取浓缩液无损移入该柱中,用二氯甲烷-甲醇(90:10, v/v)混合液洗脱,每次 10 mL,共 8 次;收集洗脱液,于 45 °C 水浴中真空旋转蒸发至近干,冷却后用甲醇溶解定容至 5.0 mL,待 HPLC 检测。

1.3 液相色谱条件

Welchrom C18 不锈钢色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm; 月旭材料科技(上海)有限公司);流动相:甲醇-水(用三乙胺调节 pH 值为 11.5)(54:46, v/v);流速:0.8 mL/min;检测波长:238 nm;柱温:25 °C;进样量:20.0 μL。

2 结果与讨论

2.1 提取溶剂的选择

因稻田的水、土壤、稻秆、糙米和谷壳中的杂质及色素不尽相同,故分别选用不同的提取剂进行提取。对稻田水样品,分别考察了以乙酸乙酯、二氯甲烷、氨水-乙酸乙酯、氨水-二氯甲烷作提取溶剂的提取效果。结果表明,二氯甲烷、氨水-二氯甲烷作提取溶剂时基本不出峰,乙酸乙酯作提取溶剂的回收率低,而氨水-乙酸乙酯作提取溶剂的杂质少,分离好,回收率都在 90% 以上。对稻田土壤、谷壳和糙米样品,分别以甲醇、乙醇、乙腈、乙酸乙酯、甲醇-氨水、乙醇-氨水、乙酸乙酯-氨水作提取溶剂进行提取。以前 5 种溶液作提取溶剂时的回收率较低(50%左右);后 2 种混合溶液作提取溶剂时的回收率均达 90% 以上。考虑到乙酸乙酯比乙醇的毒性相对较大一些,故选用乙醇-氨水作提取溶剂。稻秆样品分别选用乙醇-氨水、乙酸乙酯-氨水作提取溶剂,回收率均较好,但用乙醇-氨水作提取溶剂时提取液的颜色较深,不利于净化,故选用乙酸乙酯-氨水作提取溶剂。研究还发现,在碱性条件下氯硝柳胺乙醇胺盐更易于进入有机相,相对回收率较高。本文最终选择了 1.2.1 节所述样品提取溶剂。

2.2 柱净化条件的选择

分别以乙酸乙酯-石油醚(2:8, v/v)、丙酮-正己烷(1:9, v/v)、甲醇-二氯甲烷(1:9, v/v)作为洗脱液对弗罗里硅土净化柱进行洗脱,每次 10 mL,共 8 次。结果表明,前 2 种溶液洗脱时目标化合物与

杂质的分离效果不理想,而用甲醇-二氯甲烷(1:9, v/v)溶液洗脱时的总回收率达 102%,且目标化合物与杂质分离良好,符合残留分析与检测的要求。因此选用甲醇-二氯甲烷(1:9, v/v)作为洗脱液,用量为 80 mL。

2.3 色谱条件的优化

在实际检测中,既要保证目标化合物的完全分离,又要保证出峰时间不能太早或太晚。出峰时间太早,样品分离度不好,目标化合物易与杂质重叠;出峰时间太晚,耗时太多,影响工作效率。同时最重要的是要保证目标化合物检测的灵敏度。本试验分别以甲醇-水、甲醇-水(用三乙胺调节 pH)作为流动相,并通过改变甲醇的比例来调整流动相的洗脱强度。结果表明,以甲醇-水(用三乙胺调节 pH 值为 11.5)(54:46, v/v)为流动相时的出峰时间、峰形、灵敏度等方面均较好,故选择其为流动相。

2.4 方法的线性关系

用外标法进行定量分析。称取一定量的氯硝柳胺乙醇胺盐标准品,用甲醇配制一定质量浓度的氯硝柳胺乙醇胺盐标准母液,再用梯度稀释法配制质量浓度分别为 0.01、0.10、0.50、1.00、5.00、10.00 mg/L 的标准工作溶液,按 1.3 节所述的条件进行 HPLC 测定。以氯硝柳胺乙醇胺盐标准工作溶液的质量浓度(x , mg/L)对其所对应的色谱峰面积(y)做标准曲线,得到回归方程为 $y = 119.55x - 0.5994$ 。结果表明,氯硝柳胺乙醇胺盐在 0.01 ~ 10.00 mg/L 之间具有良好的线性关系,相关系数(r)为 0.9998。

2.5 方法的回收率、精密度和最低检测浓度

在稻田水、稻田土壤、稻秆、谷壳和糙米的空白样品中,分别添加氯硝柳胺乙醇胺盐的标准溶液,每个浓度水平样品重复 5 次,按 1.2 节所述的提取和净化步骤处理后,再按 1.3 节所述条件进行测定,计算平均加标回收率和相对标准偏差(RSD)(见表 1)。结果表明,氯硝柳胺乙醇胺盐的加标回收率和 RSD 均在《农药残留试验准则》^[15]允许的范围(70%~110%)内。

《农药残留试验准则》^[15]中最低检测浓度的定义为:经添加回收试验,能够满足回收率和精密度要求的最小添加浓度。本试验通过添加回收试验确定氯硝柳胺乙醇胺盐的最低检测浓度分别为:稻田水 0.01 mg/L,稻田土壤 0.03 mg/kg,稻秆和糙米均为 0.05 mg/kg,谷壳 0.10 mg/kg。氯硝柳胺乙醇胺盐标准溶液、空白样品及加标样品的色谱图见图 1。

表 1 氯硝柳胺乙醇胺盐在稻田水、稻秆、谷壳、糙米和土壤中的加标回收率及其相对标准偏差 ($n=5$)Table 1 Recoveries and relative standard deviations (RSDs) of niclosamide ethanolamine spiked in paddy water, paddy plant, rice husk, unpolished rice and paddy soil ($n=5$)

Sample	Spiked/(mg/kg [*])	Recovery/%	RSD/%	Sample	Spiked/(mg/kg [*])	Recovery/%	RSD/%
Paddy water	0.01	97.45	5.82	Unpolished rice	0.05	99.87	3.18
	1.00	95.84	4.49		1.00	93.47	2.44
	5.00	99.45	1.98		5.00	98.50	1.65
Paddy plant	0.05	96.13	4.99	Paddy soil	0.03	96.39	4.48
	1.00	95.16	3.41		1.00	94.54	3.06
	5.00	99.24	1.50		5.00	99.40	2.60
Rice husk	0.10	100.90	5.49				
	1.00	92.88	3.35				
	5.00	98.86	1.46				

* Because the density of water at 4 °C is 1.0 g/mL, the mg/L equals about mg/kg.

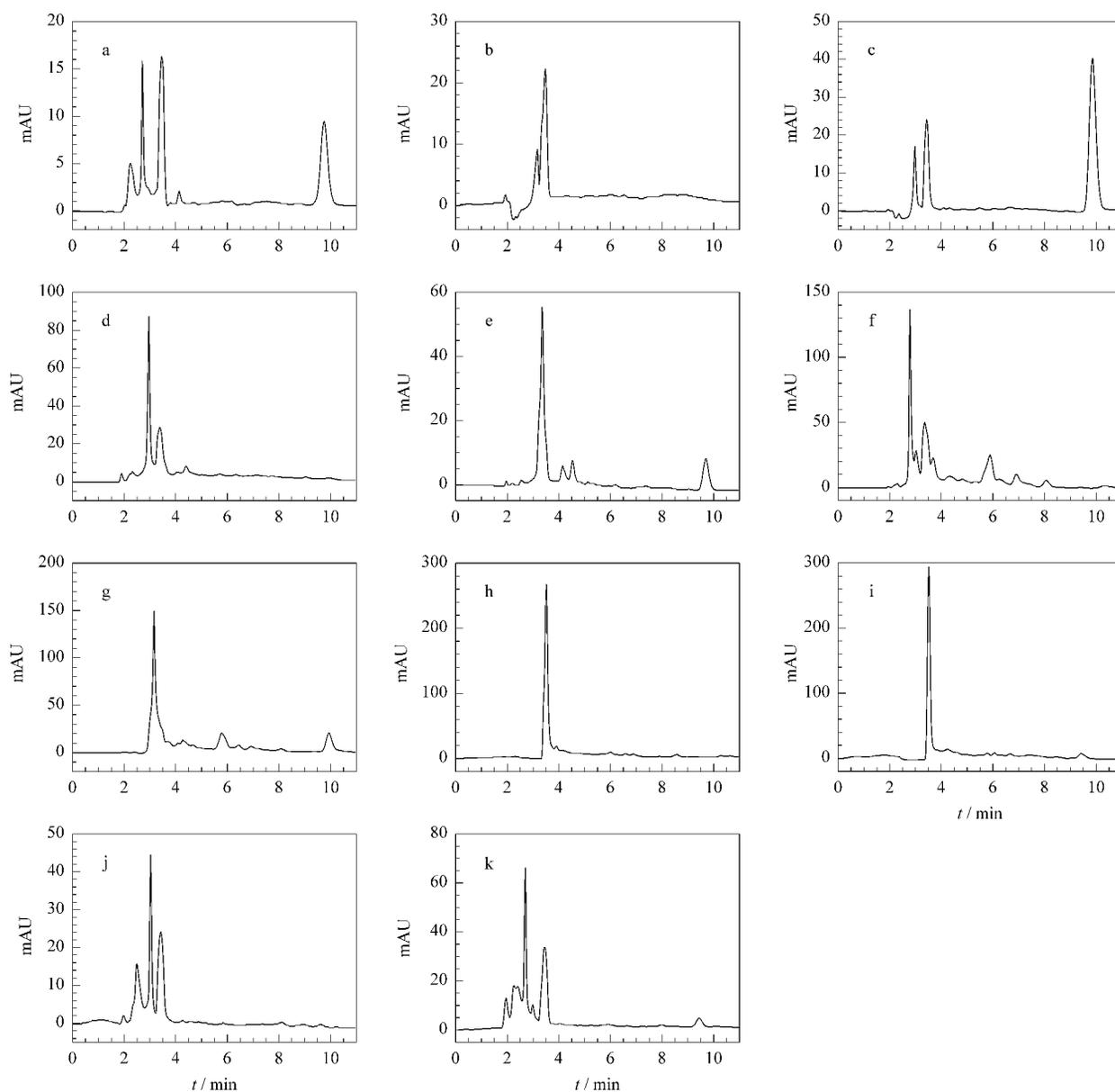


图 1 氯硝柳胺乙醇胺盐标准溶液 (1.0 mg/L)、空白样品及其加标 (0.5 mg/kg) 样品的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of niclosamide ethanolamine standard solution (1.0 mg/L), blank and spiked samples (0.5 mg/kg)

a. niclosamide ethanolamine standard solution; b. blank paddy water; c. spiked blank paddy water; d. blank paddy soil; e. spiked blank paddy soil; f. blank paddy plant; g. spiked blank paddy plant; h. blank rice husk; i. spiked blank rice husk; j. blank unpolished rice; k. spiked blank unpolished rice.

2.6 方法的应用

对采集于施以不同含量氯硝柳胺乙醇胺盐、不

同施药次数的稻田土壤、稻秆、谷壳和糙米样品进行氯硝柳胺乙醇胺盐残留检测 部分结果见表 2。

表 2 氯硝柳胺乙醇胺盐在稻田土壤、稻秆、谷壳和糙米中的残留量

Table 2 Contents of niclosamide ethanolamine residues in paddy soil , paddy plant , rice husk and unpolished rice		mg/kg							
Spray time	Interval time/d	630 a. i. g/hm ² of spray dose				945 a. i. g/hm ² of spray dose			
		Paddy soil	Paddy plant	Rice husk	Unpolished rice	Paddy soil	Paddy plant	Rice husk	Unpolished rice
2	42	0.073	0.520	0.382	0.120	0.116	0.834	0.480	0.204
	52	0.052	0.186	0.270	0.108	0.068	0.314	0.310	0.170
	62	0.039	0.159	0.198	0.061	0.056	0.298	0.211	0.074
3	42	0.094	0.670	0.484	0.130	0.138	0.945	0.549	0.251
	52	0.063	0.191	0.375	0.116	0.076	0.548	0.367	0.176
	62	0.047	0.180	0.290	0.067	0.065	0.323	0.238	0.084

a. i. : available ingredient.

3 结语

采用碱性有机溶剂对稻田水、土壤、稻秆、谷壳和糙米样品中的氯硝柳胺乙醇胺盐残留进行提取, Florisil 柱净化, 高效液相色谱测定。该方法具有操作简单、分离效果好、线性范围宽、回收率高、精密度好和分析效率高等特点, 符合农药残留量分析与检测的要求。

参考文献:

[1] Zhang T. Chinese Journal of Schistosomiasis Control (张涛. 中国血吸虫病防治杂志), 2002, 14(3): 234
 [2] Dai J R, Huang M X, Zhu Y C. Chinese Journal of Schistosomiasis Control (戴建荣, 黄铭西, 朱荫昌. 中国血吸虫病防治杂志), 2000, 12(3): 189
 [3] Dai J R, Liang Y S, Li H J, et al. Chinese Journal of Schistosomiasis Control (戴建荣, 梁幼生, 李洪军, 等. 中国血吸虫病防治杂志), 2007, 19(6): 415
 [4] Jin L Z, Cao L J, Qiu S H, et al. Chinese Journal of Health Laboratory Technology (金良正, 曹丽军, 裘淑华, 等. 中国卫生检验杂志), 2007, 17(8): 1440
 [5] Liu Y H, Luo B R, Wang S W, et al. Journal of Dali College (刘榆华, 罗秉荣, 王尚位, 等. 大理学院学报), 2004, 3

(5): 48

[6] Ji Z P, Jiang Y F, Wang S X, et al. Chinese Journal of Schistosomiasis Control (嵇正平, 姜友富, 汪世新, 等. 中国血吸虫病防治杂志), 2005, 17(6): 430
 [7] Wang J N, Long H, Xiao T, et al. West China Journal of Pharmaceutical Sciences (王娇娜, 龙海, 肖同, 等. 华西药学杂志), 2006, 21(4): 401
 [8] Hubert T D, Bernardy J A, Vue C, et al. J Agric Food Chem, 2005, 53: 5342
 [9] Schreiber T M, Dawson V K, Choi Y, et al. J Agric Food Chem, 2000, 48(6): 2212
 [10] Ding L, Lü C Y, Feng J L, et al. Chinese Journal of Health Laboratory Technology (丁力, 吕昌银, 冯家力, 等. 中国卫生检验杂志), 2007, 17(12): 2153
 [11] Wang A H, Shao J G. Anhui Chemical Industry (王爱华, 邵建果. 安徽化工), 2006(4): 67
 [12] Yang J Z, Zhu C M. Pesticide Science and Administration (杨俊柱, 朱传明. 农药科学与管理), 2006, 25(7): 12
 [13] Sun H, Chen A Y, Yu X F, et al. Zhejiang Chemical Industry (孙海, 陈岸燕, 余晓峰, 等. 浙江化工), 2008, 39(12): 25
 [14] Zhang Z H. Standards of Rational Use of Pesticides and Maximum Residue Limit. Beijing: Chemical Industry Press (张志恒. 农药合理使用规范和最高残留限量标准. 北京: 化学工业出版社), 2007
 [15] NY/T 788-2004