

DOI:10.16498/j.cnki.hnnykx.2015.04.032

# 杀螺胺乙醇胺盐原药的反相高效液相色谱测定

曹佳<sup>1,2</sup>, 宋思思<sup>1,2</sup>, 李晓刚<sup>1,2</sup>, 刘一平<sup>3</sup>, 杨雪清<sup>4</sup>

(1. 湖南农业大学植物保护学院, 湖南 长沙 410128; 2. 湖南省生物农药与制剂加工工程技术研究中心, 湖南 长沙 410128; 3. 湖南省农药检定所, 湖南 长沙 410005; 4. 湖南京西祥隆化工有限公司, 湖南 株洲 412005)

**摘要:** 利用反相高效液相色谱法研究了两种色谱柱, 3种流动相对杀螺胺乙醇胺盐分离效果的影响, 并对测定方法进行比较。结果表明, 以 Spursil™ C18 为色谱柱, 流动相为甲醇:水:三乙胺=90:10:0.1 (V/V) 时, 测定值的标准偏差为 0.185, 变异系数为 0.240%, 平均回收率为 97.12%, 线性相关系数为 0.999 9。这说明在该条件下杀螺胺乙醇胺盐的分离效果较好, 同时该方法简单快捷, 可作为分析杀螺胺乙醇胺盐原药的分析方法。

**关键词:** 杀螺胺乙醇胺盐; 氯硝柳胺; 高效液相色谱法; 三乙胺

中图分类号: TQ450.7

文献标识码: A

文章编号: 1006-060X (2015) 04-0102-03

## Determination of Niclosamide Ethanolamine Salt by RP-HPLC

CAO Jia<sup>1,2</sup>, SONG Si-si<sup>1,2</sup>, LI Xiao-gang<sup>1,2</sup>, LIU Yi-ping<sup>3</sup>, YANG Xue-qing<sup>4</sup>

(1. College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, PRC; 2. Hunan Provincial Engineering & Technology Research Center for Bio-pesticide and Formulating Processing, Changsha 410128, PRC; 3. Hunan Agrochemicals Control Institute, Changsha 410005, PRC; 4. Hunan Jingxi Lung Cheung Chemical Industry Co., Ltd, Zhuzhou 412005, PRC)

**Abstract:** In order to analyze the influence of two kinds of chromatographic column, three types of mobile phase on the separating effect of Niclosamide ethanolamine salt, RP-HPLC was used. The results showed that when the chromatographic column was Spursil™ C18, and the mobile phase of methanol, water and trimethylamine was 90 : 10 : 0.1 (V/V), the standard deviation of measured value was 0.185, the variable coefficient was 0.240%, the average recovery rate was 97.12% and the linearly dependent coefficient was 0.999 9. Therefore, we can conclude that under this condition the Niclosamide ethanolamine salt had good separating effect, and the method can be used to measure the active compound of Niclosamide ethanolamine salt because of its simple and rapid.

**Key words:** Niclosamide ethanolamine salt; Niclosamide; HPLC; triethylamine

杀螺胺乙醇胺盐又名氯硝柳胺乙醇胺盐, 属酰胺类杀软体动物剂, 具有胃毒作用, 对螺卵、血吸虫尾蚴等有较强的杀灭作用, 是 WHO 推荐使用的灭螺药<sup>[1-2]</sup>。近年来, 国内外对杀螺胺乙醇胺盐的加工应用<sup>[3]</sup>、杀螺活性<sup>[4]</sup>、残留<sup>[5-6]</sup>及环境毒理<sup>[7]</sup>进行了大量研究报道。目前, 国内外已报道的杀螺胺乙醇胺盐分析方法有电位滴定法<sup>[8]</sup>、分光光度计法<sup>[9]</sup>和高效液相色谱法<sup>[10-12]</sup>。但是, 电位滴定法和分光光度计法的分析时间较长、杂质分离效果不佳。高效液相色谱法用于检测杀螺胺乙醇胺盐的常用方法, 在实际检测中, 相同的色谱条件下, 不同厂家生产的色谱柱对杀螺胺乙醇胺盐的分离效果有差异, 有的甚至达不到分离要求, 而在研究制定高效液相色谱方法时, 选择适宜的流动相也很重

要。因此, 试验拟采用反相高效液相色谱法, 筛选不同的色谱柱及流动相, 以期建立较为完善的杀螺胺乙醇胺盐原药测定方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试仪器设备主要有岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪, 配备 LC-20AT 泵、20  $\mu$ L 定量环以及紫外检测器和 LC-solution 色谱工作站, 色谱柱 Spursil™ C18 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m, 北京迪科马科技有限公司)、C18-WP (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m, 德国 CNW 科技公司)、超声波清洗器、滤膜孔径 0.45  $\mu$ m 的过滤器。试验主要试剂有甲醇 (色谱纯)、超纯水、三乙胺 (分析纯)、杀螺胺标样 (已知质量分数  $\geq$  99%, 某公司)、杀螺胺原药 (湖南京西祥隆化工有限公司)。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 标准溶液及试样的配制 (1) 标准溶液配制。

收稿日期: 2015-03-13

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目 (13JJ5023); 湖南省高等学校科学研究重点项目 (11A053)

作者简介: 曹佳 (1990-), 女, 湖南郴州市人, 硕士研究生, 主要从事农药残留分析与环境行为研究。

准确称取杀螺胺标准品 0.020 0 g 于 50 mL 容量瓶中,加入适量甲醇试剂溶解,置于超声浴槽中约 10 min,取出降至室温后,用甲醇补至刻度线摇匀,再用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后备用。(2)试样配制。准确称取杀螺胺乙醇胺盐 0.020 0 g,操作同(1)。

1.2.2 流动相的影响 以 Spursil™ C18 为色谱柱,分离条件为柱温 25℃,检测波长 230 nm,进样量 10  $\mu\text{L}$ ,当流动相分别为甲醇:水=90:10 (V:V,下同)、甲醇:水:三乙胺=90:10:0.1、甲醇:水:三乙胺=54:46:0.115 时,对流动相的影响进行分析。

1.2.3 色谱柱的影响 在流动相为甲醇:水:三乙胺=90:10:0.1、柱温为 25℃、检测波长 230 nm、流速 1.0 mL/min、进样量 10  $\mu\text{L}$  时,分别采用以 Spursil™ C18 和 Athena C18-WP 两种色谱柱,对色谱柱影响进行分析。

1.2.4 测定 在 1.2.2 和 1.2.3 下,待仪器基线稳定后连续注入数针标准溶液,直至相邻两针的峰面积变化小于 1.5%,按标准溶液、试样溶液、试样溶液、标准溶液的顺序进行测定。

1.2.5 对色谱条件的检测 (1)线性关系检测。称取一定量的杀螺胺标准品,用甲醇配制一定质量浓度的杀螺胺标准溶液,再用梯度稀释法配制成质量浓度分别为 0.10、0.20、0.50、1.00、2.00、5.00、10.00 mg/L 的标准工作液,按条件进行反相高效液相色谱测定。以杀螺胺标准工作液的质量浓度(x, mg/L)对其所对应的色谱峰面积(y)做标准曲线,得到相应的线性关系曲线。(2)精密度的检测。对同一样品分别进行 5 次重复测定,考查样品回收率的标准偏差及变异系数。(3)准确度的检测。称取 5 份已知准确含量的杀螺胺乙醇胺盐试样,分别加入一定量的杀螺胺标准品,按条件进行重复测定,考查平均回收率。

1.2.6 计算 将测得的两针试样溶液和试样溶液前后两针标准溶液中的杀螺胺的峰面积分别进行平均。以质量百分数表示的杀螺胺乙醇胺盐的含量 X 按公式(1)计算:

$$X = \frac{A_2 m_1 P}{A_1 m_2} \quad (1)$$

式中:  $A_1$  表示标准溶液中杀螺胺峰面积的平均值;  $A_2$  表示试样溶液中杀螺胺乙醇胺盐峰面积的平均值;  $m_1$  表示杀螺胺标样的质量 (g);  $P$  表示标准品中杀螺胺的质量百分数(%); 1.186 8 为杀螺胺换算成杀螺胺乙醇胺盐系数。

## 2 结果与分析

### 2.1 流动相影响

由图 1 和图 2 可知,以 Spursil™ C18 为色谱柱,当分别以甲醇:水=90:10 和甲醇:水:三乙胺

=90:10:0.1 作为流动相时,杀螺胺乙醇胺盐的保留时间分别为 4.988 min 和 1.785 min,甲醇与水的比例一样,但是加入三乙胺后,保留时间提前,并且避免了前沿峰。Huber<sup>[13]</sup>提出,三乙胺会和固定相上残留的硅羟基结合,还会与 C18 发生疏水作用,可减弱溶质与固定相的相互作用,促使溶质更快地从固定相上被流动相洗脱。由于三乙胺的这种有机调节剂作用,在液相色谱分析中将其加入到流动相中,在减少样品中碱性组分前沿的同时,对峰形和保留时间也有一定影响。

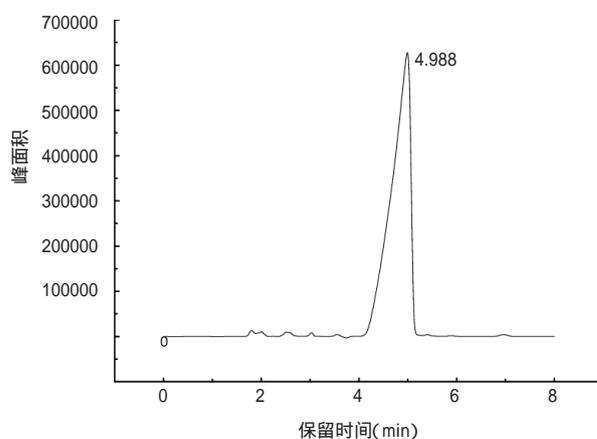


图 1 色谱柱 Spursil™ C18  
(流动相为甲醇:水=90:10)

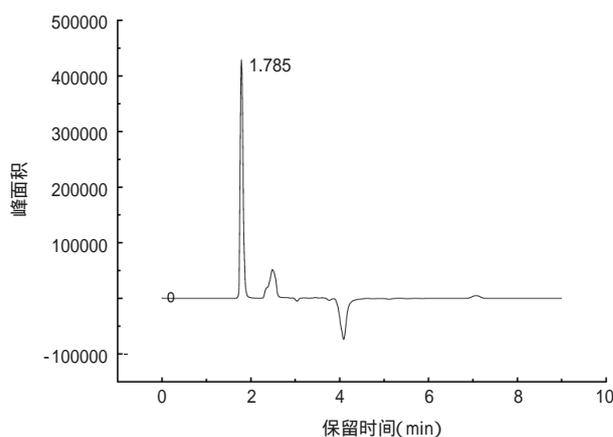


图 2 色谱柱 Spursil™ C18  
(流动相为甲醇:水:三乙胺=90:10:0.1)

以甲醇:水:三乙胺=54:46:0.115 为流动相时,从图 3 中可以看出,样品中的成分没有完全分离。这与伍一红<sup>[5]</sup>在杀螺胺乙醇胺盐在水稻和稻田中的残留及消解动态试验的报道不一致。因此,在具体操作中,要使物质得到较好地分离,使峰形、峰纯度、分离度等达到要求,需要适当调整流动相比例。

### 2.2 色谱柱影响

当流动相及分离条件相同时,分别以 Spursil™ C18 和 Athena C18-WP 作为色谱柱,从图 2 和图 4 中可以看出,样品出峰的时间分别为 1.785 min 和 2.167 min,峰形也都尖锐、对称。两根色谱柱都是高纯度硅胶基质液相色谱柱,但对杀螺胺乙醇胺盐的分离效果

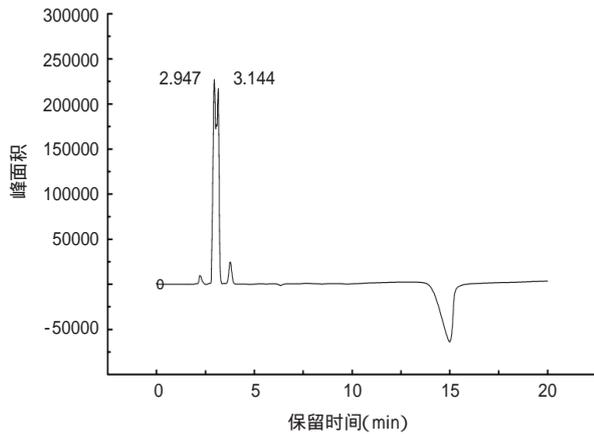


图 3 色谱柱 Spursil™ C18  
(流动相为甲醇：水：三乙胺=54：46：0.115)

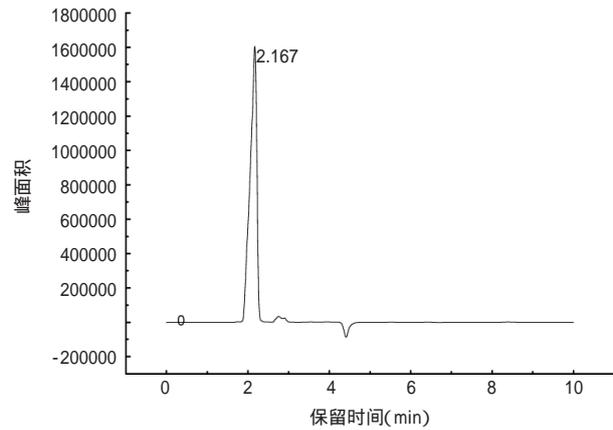


图 4 色谱柱 Athena C18-WP  
(流动相为甲醇：水：三乙胺=90：10：0.1)

却不同,这可能是因为固定相的制备重复性偏差,或不同厂家生产的色谱柱在填料的粒度分布、原材料、硅胶基质表面积等方面均有差异,从而引起保留值的变化。色谱柱表面积增加,则有机相的量与保留值均有所提高,而且硅胶基质表面的硅羟基浓度差异,也能引起保留值及分离选择性的不同<sup>[14-15]</sup>。

### 2.3 色谱条件的检测

2.3.1 线性关系 由表 1 可知,色谱柱为 Spursil™ C18,流动相为甲醇：水：三乙胺=90：10：0.1 时,

线性相关系数为 0.999 9,高于另外两种方法,线性关系最好。

2.3.2 精密度 由表 2 可知,色谱柱为 Spursil™ C18,流动相为甲醇：水：三乙胺=90：10：0.1 时,标准偏差为 0.185,变异系数为 0.240,均低于另外两种方法,精密度最高。

2.3.3 准确度 由表 3 可知,色谱柱 Spursil™ C18、流动相甲醇：水：三乙胺=90：10：0.1 时,平均回收率高于另外两种方法,准确度最高。

表 1 3 种色谱条件线性关系的比较

色谱柱	流动相	线性方程	相关系数
Spursil™ C18	甲醇：水=90：10	y=54 226.75x-3 704.84	0.999 8
Spursil™ C18	甲醇：水：三乙胺=90：10：0.1	y=63 607.71x-55.71	0.999 9
Athena C18-WP	甲醇：水：三乙胺=90：10：0.1	y=65 638.98x-4 392.16	0.999 4

表 2 3 种色谱条件精密度的比较

色谱柱	流动相	含量(%)					平均值(%)	标准偏差(%)	变异系数(%)
		1	2	3	4	5			
Spursil™ C18	甲醇：水=90：10	76.11	77.41	76.68	75.64	75.41	76.25	0.811	1.063
Spursil™ C18	甲醇：水：三乙胺=90：10：0.1	76.75	76.54	76.89	76.69	77.02	76.78	0.185	0.240
Athena C18-WP	甲醇：水：三乙胺=90：10：0.1	78.22	78.04	79.01	78.10	78.27	78.33	0.351	0.448

表 3 3 种色谱条件准确度的比较

色谱柱	流动相	平均回收率(%)
Spursil™ C18	甲醇：水=90：10	96.43
Spursil™ C18	甲醇：水：三乙胺=90：10：0.1	97.12
Athena C18-WP	甲醇：水：三乙胺=90：10：0.1	95.68

## 3 结论

试验结果表明,在流动相中添加适当的改性剂三乙胺,使保留时间提前,分析时间缩短,同时避免了前沿峰,分离效果好。因此,甲醇：水：三乙胺=90：10：0.1 的流动相分离杀螺胺乙醇胺盐的效果更好。

使用不同厂家生产的色谱柱对杀螺胺乙醇胺盐的检测效果有差别,这与色谱柱生产厂家填料等因素有关。因此,在检测分析杀螺胺乙醇胺盐时,色谱柱的选择也需要特别注意,合适的色谱柱可以得到更可信的结果。研究表明,色谱柱 Spursil™ C18 比色谱柱 Athena C18-WP 分离杀螺胺乙醇胺盐的效果要好。

综上所述,色谱柱为 Spursil™ C18,流动相为甲醇：水：三乙胺=90：10：0.1 时,杀螺胺乙醇胺盐的分离效果好,准确度较高,可以作为分析杀螺胺乙醇胺盐原药的定量分析方法。

参考文献：

(下转第 108 页)

### 3 结论

尖孢镰刀菌的不同种和菌株之间产生色素的条件有差异。非致病尖孢镰刀菌菌株 1262 在 pH<7 的培养基上培养时,1262 菌株可产生紫红色色素,在 pH>7 的培养基上培养时,1262 菌株产生少量或者不产生色素。培养温度和光照条件对 1262 菌株色素的产生影响不大。结合已有的研究结果,推断该色素可能为比卡菌素的类似物,有一定的应用价值。尖孢镰刀菌甘蓝专化型菌株 Foc-am, 黑暗条件下不产生色素,光照下可产生橙色色素,而培养基的 pH 和温度对其色素的产生影响不大。结合前人的研究结果,推断该色素可能为一种新的色素,具体功能有待进一步分析确认。

#### 参考文献:

- [1] 张永强,龙婷,牛亚军,等.天然萘醌类化合物口服吸收及代谢研究进展[J].海峡药学,2014,26(7):1-5.
- [2] L. Zheng, Y. Peng, J. Zhang, et al. First report of *Fusarium solani* causing root rot of *Juglans sigillata* in China[J]. Plant Dis, 2015, 99(1): 159.
- [3] Shyamji S, Harshita S, Akhilesh KP. Optimization of various parameters for production of antimicrobial compounds by *Fusarium roseum* FGCC#61[J]. WJPPS. 2014, 3(12): 890-905.
- [4] 孙月娥,邵颖,陈安徽,等.一株串珠镰刀菌内红色素稳定性及部分生理活性研究[J].食品科学,2011,32(19):54-59.
- [5] Muriuki E, Hall C, Sasanya JJ, et al. Purification, analysis and antimicrobial activity of *Fusarium Graminearum* pigment [J]. Plantation Lobby, 2008, 15: 928.
- [6] Alma RS, Carlos DLe ó n-Garc í a De Alba, Guadalupe V, et al. The pigmentation of *Fusarium verticillioides* (Sacc.) as factor of virulence in maize seedlings[J]. Agrono Mesoam, 2011, 22(2): 297-307.
- [7] Medentsev AG, Akimenko VK. Naphthoquinone metabolites of the fungi [J]. Phytochemistry, 1998, 47: 935-959.
- [8] Malz S, Grell MN, Thrane C, et al. Identification of a gene cluster responsible for the biosynthesis of aurofusarin in the *Fusarium graminearum* species complex[J]. Fungal Genet Biol, 2005, 42: 420-433.
- [9] Wilemann P, Willmann A, Straeten M, et al. Biosynthesis of the red pigment bikaverin in *Fusarium fujikuroi*: genes, their function and regulation[J]. Mol Microbiol, 2009, 72(4): 931-946.
- [10] 王政逸,李德葆.尖孢镰刀菌的遗传多态性[J].植物病理学报,2000,(03):193-199.
- [11] 裴月令,曾凡云,彭军,等.尖孢镰刀菌与寄主互作机理研究进展[J].热带生物学报,2014,5(1):92-100.
- [12] 梁丽琴,李健强,杨宇红,等.植物与尖孢镰刀菌的互作机制研究进展[J].中国农学通报,2014,30(21):40-46.
- [13] F. Gawehns, P. M. Houterman, F. Ait Ichou, et al. The *Fusarium oxysporum* effector Six6 contributes to virulence and suppresses I-2-mediated cell death[J]. Mol Plant Microbe In, 2014, 27(4): 336-348.
- [14] Qian-Hao Z, Stuart S, Jennifer T, et al. Long noncoding RNAs responsive to *Fusarium oxysporum* infection in *Arabidopsis thaliana*[J]. New Phytol, 2014, 201(2): 574-584.
- [15] Yolanda MG, James AM, Bruce SM, et al. Field resistance to *Fusarium oxysporum* and *Verticillium dahliae* in transgenic cotton expressing the plant defensin NaD1[J]. J Exp Bot, 2014, 65(6): 1541-1550.
- [16] 崔堂兵,刘清香.尖孢镰刀菌生产萘醌色素的液体发酵条件研究[J].中国生物工程杂志,2010,30(09):56-61.
- [17] 王振辰,顾振芳,陈长华,等.镰刀菌李瑟组研究.镰刀菌李瑟组的生长发育和培养基 pH 值关系的研究[J].微生物学通报,1995,22(1):5-9.
- [18] Medentsev AG, Arinbasarova AI, Akimenko VK. Biosynthesis of naphthoquinone pigments by fungi of the genus *Fusarium*[J]. Prikl Biokhim Mikrobiol. 2005, 41(5): 573-577.
- [19] 蓝江林,肖荣凤,刘波,等.pH胁迫下尖孢镰刀菌生长动力学模型[J].中国生态农业学报,2012,20(11):1532-1538.

(责任编辑:张焕裕)



(上接第 104 页)

- [1] WHO/SCHISTO/92. The role of mollusciciding in schistosomiasis control division of control of tropical disease[R]. Geneva Switzerland, 1992.
- [2] 陈昌.我国的杀螺剂及其应用[J].中国血吸虫病防治杂志,2003,15(5)321-322.
- [3] 方益民,黄轶昕.氯硝柳胺乙醇胺盐粉剂的应用[J].中国血吸虫病防治杂志,2007,19(5)398-400.
- [4] 姜柳,李树风,李新松,等.氯硝柳胺乙醇胺盐纳米剂的制备与杀螺效果[J].中国血吸虫病防治杂志,2006,19(2):102-106.
- [5] 伍一红,龚道新,张素芳,等.杀螺剂乙醇胺盐在水稻和稻田中的残留及消解动态[J].农业环境科学学报,2012,31(2)278-283.
- [6] 严相平,王康蕊,王浦海,等.HPLC法测定泥土中氯硝柳胺的含量[J].农药,2011,50(5)350-351.
- [7] 王飞,戴建荣.氯硝柳胺的毒理学安全性评价研究概况[J].中国人兽共患病学报,2013,29(1)86-90.
- [8] 金良正,曹丽军,袁淑华,等.鱼塘污染灭螺剂氯硝柳胺的快速化学鉴别[J].中国卫生检验杂志,2007,17(8):1440-1441.
- [9] 姜友富,王俊,嵇正平,等.氯硝柳胺现场检测方法和检测仪的研究与开发[J].中国血吸虫病防治杂志,2009,21(3)209-211.
- [10] 林自建,陈茹娟.氯硝柳胺乙醇胺盐高压液相色谱分析[J].四川化工与腐蚀控制,2000,2(3)9-10.
- [11] 杨俊柱,朱传明.50%氯硝柳胺乙醇胺盐可湿性粉剂的高效液相色谱测定[J].农药科学与管理,2006,25(7):12-14.
- [12] 孙海,陈岸燕,余晓峰,等.农药产品中贝螺杀乙醇胺盐的高效液相色谱分析[J].浙江化工,2008,39(12)25-26.
- [13] Huber CG. Micropellicular stationary phases for high-performance liquid chromatography of double-stranded DNA[J]. Journal of Chromatography A, 1998, 806(1)3-30.
- [14] 张庆高.高效液相色谱实用手册[M].北京:化学工业出版社,2008.78.
- [15] McCalley D V. Study of the selectivity, retention mechanisms and performance of alternative silica-based stationary phases for separation of ionised solutes in hydrophilic interaction chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2010, 1217(20)3408-3417.

(责任编辑:成平)