

氯硝柳胺乙醇胺盐降解规律研究 光解液氯硝柳胺乙醇胺盐含量测定

戴建荣¹, 曹建平², 李洪军¹, 汪伟¹, 廖慨², 陶永辉¹, 梁幼生^{1*}

[摘要] 目的 了解氯硝柳胺乙醇胺盐(NES)在水体中的光解规律。方法 实验室配置 pH 5 的 0.05 μg/ml、pH 7 的 0.5 μg/ml 和 pH 9 的 2.5 μg/ml NES 溶液, 采用氙灯光源作为模拟日光照射, 照射后 0.5、1、2、4、8、16、24、48、72、96 h 采集光解液, 高效液相色谱法测定光解液中 NES 含量, 同时设无光照对照试验, 计算其半衰期。结果 在氙灯光照射条件下, NES 快速降解, 8 h 3 种 pH 值的 NES 溶液下降率分别为 83.4%、78.8% 和 41.3%, 24 h 下降率分别为 92.1%、88.5% 和 95.8%。NES pH 5 半衰期为 8.98 h、pH 7 为 10.34 h、pH 9 为 9.16 h。无光照条件下放置 12 d 溶液浓度稳定。结论 NES 可在水中快速光解。

[关键词] 氯硝柳胺乙醇胺盐; 光解; 高效液相色谱(HPLC); 半衰期

[中图分类号] R383.24 [文献标识码] A

Studies on degradation mechanism of niclosamide ethanolamine salt in photolysis solution

Dai Jianrong, Cao Jianping, Li Hongjun, Wang Wei, Liao Kai, Tao Yonghui, Liang Yousheng*

1 Jiangsu Institute of Parasitic Diseases, Key Laboratory on Technology for Parasitic Disease Prevention and Control, Ministry of Health, Jiangsu Provincial Key Laboratory on Molecular Biology of Parasites, Jiangsu Provincial Key Subject on Parasitic Diseases, Wuxi 214064, China; 2 College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, China

* Corresponding author

[Abstract] Objective To understand the photolysis mechanism of niclosamide ethanolamine salt (NES) in water body. Methods NES was formulated into solutions of pH 5 (0.05 μg/ml), 7 (0.5 μg/ml) and 9 (2.5 μg/ml), respectively. The xenon gas lamp was used as the simulated sunlight. After 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72, 96 h of the illumination, the photolysis solutions were collected to determine the amount of NES by using the high-performance liquid chromatography method (HPLC), and the experiment without illumination was also set as the control. The half life was calculated. Results Under the illumination of xenon gas lamp, the NES degraded rapidly. The degradation rates were 83.4%, 78.8% and 41.3%, respectively for 8 h and 92.1%, 88.5% and 95.8%, respectively for 24 h. The half life of NES was 8.98 h for pH 5, 10.34 h for pH 7, 9.16 h for pH 9. The solution could keep stable for 12 d without illumination. Conclusion Photolysis of NES can occur quickly in water.

[Key words] Niclosamide ethanolamine salt (NES); Photolysis; High-performance liquid chromatography (HPLC); Half life

氯硝柳胺因其杀螺效果好, 对哺乳动物毒性低, 被 WHO 推荐为惟一现场使用的化学灭螺药^[1]。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进行现场灭螺, 每年使用量在 3 200 以上。大量氯硝柳胺在江湖洲滩长期反复使用, 是否会导致环境污染, 引起了广泛关注^[2-4]。本研究首先在

实验室模拟光照条件下对氯硝柳胺的降解进行研究, 以期在现场研究氯硝柳胺降解、转化、迁移规律奠定基础。

材料与方法

1 试剂

NaOH、HCl、十水四硼酸钠 (Na₂B₄O₇ · 10H₂O)、邻苯二甲酸氢钾、磷酸二氢钾, 以上试剂均为分析纯; 甲醇、丙酮、六甲基苯均为进口色谱纯; 氯硝柳胺乙醇胺盐 (NES) 含量 > 98%, 由江苏省药物研究所合成提供。

2 溶液配制

2.1 0.1 mol/L NaOH 溶液 称取 2.0 g NaOH 固体,

[基金项目] 江苏省自然科学基金 (BK200602)

[作者单位] 1 江苏省血吸虫病防治研究所、卫生部寄生虫病预防与控制技术重点实验室、江苏省寄生虫分子生物学重点实验室、江苏省寄生虫病学重点学科 (无锡 214064); 2 厦门大学海洋与环境学院

[作者简介] 戴建荣, 男, 博士, 研究员。研究方向: 血吸虫病防治及钉螺控制

* 通讯作者 E-mail: liangys8@yahoo.com.cn

加去离子水搅拌溶解, 转移至 500 mL 容量瓶中, 稀释至刻度。

2.2 0.1 mol/L HCl 溶液 量取 2.13 mL 盐酸 (AR 级, 2.535 g) 于 250 mL 容量瓶中, 并用去离子水稀释至刻度。

2.3 0.025 mol/L 四硼酸钠溶液 称取十水四硼酸钠 2.3836 g 于烧杯中, 加去离子水溶解, 并移至 250 mL 容量瓶中, 再用去离子水稀释至刻度。

2.4 0.1 mol/L 邻苯二甲酸氢钾溶液 称取邻苯二甲酸氢钾 10.2115 g 于烧杯中, 加去离子水溶解, 并移至 500 mL 容量瓶中, 再用去离子水稀释至刻度。

2.5 0.1 mol/L 磷酸二氢钾溶液 称取磷酸二氢钾 6.805 g 于烧杯中, 加去离子水溶解, 并移至 500 mL 容量瓶中, 再用去离子水稀释至刻度。

3 缓冲溶液配制

3.1 pH 5 缓冲溶液 于 500 mL 容量瓶中, 加入 250 mL 0.1 mol/L 邻苯二甲酸氢钾和 113 mL 0.1 mol/L NaOH 溶液, 混匀, 再用去离子水稀释至刻度。

3.2 pH 7 缓冲溶液 于 1000 mL 容量瓶中, 加入 500 mL 0.1 mol/L 磷酸二氢钾溶液及 297 mL 0.1 mol/L NaOH 溶液, 混匀, 加去离子水稀释至刻度。

3.3 pH 9 缓冲溶液 于 500 mL 容量瓶中, 加入 0.025 mol/L 四硼酸钠溶液 250 mL, 0.1 mol/L HCl 溶液 23 mL, 混匀, 再用去离子水稀释至刻度。

以上缓冲液在使用前均采用 0.2 μm 滤膜过滤灭菌。

4 标准溶液的配制

4.1 NES 标准溶液 称取 NES 10 mg 用甲醇溶解, 并移至 100 mL 棕色容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度 (100 μg/mL), 再用锡箔纸包好, 于 4 °C 保存。

4.2 内标液六甲基苯 称取 25 mg 六甲基苯, 溶于 50 mL 容量瓶中, 获得浓度为 0.50 mg/mL 的内标液, 冷藏保存。

4.3 NES 标准工作溶液 用 NES 标准溶液稀释配制浓度为 0.2, 1, 0.5, 0.25, 0.100 μg/mL 并加入内标液使其浓度为 25.0 μg/mL。

4.4 内标六甲基苯线性工作溶液 用六甲基苯标准溶液稀释分别配制浓度为 0.25, 2.5, 5.0, 12.5, 25.0, 50.0 μg/mL 的内标工作溶液。

5 NES 光降解溶液的配制

5.1 pH 5 0.05 μg/mL 光降解溶液 移取 100 μg/mL NES 标准溶液 0.5 mL 于 1000 mL 棕色容量瓶中, 并用 pH 5 缓冲溶液稀释至刻度。

5.2 pH 7 0.5 μg/mL 光降解溶液 移取 100 μg/mL NES 标准溶液 5 mL 于 1000 mL 棕色容量瓶中, 并用 pH

7 缓冲溶液稀释至刻度。

5.3 pH 9 2.5 μg/mL 光降解溶液 移取 100 μg/mL NES 标准溶液 25 mL 于 1000 mL 棕色容量瓶中, 并用 pH 9 缓冲溶液稀释至刻度。

6 光解装置

自制光解装置 (图 1), 采用氙灯光源作为日光模拟光源, 用 Ocean Optics USB4000-UV-VIS 型即插即用微型光纤光谱仪测定日光 (图 2) 和氙灯光强 (图 3)。

7 光解实验

于 1, 2, 3, 4 号光解管中分别加入 160 mL pH 5 的 0.05 μg/mL NES 溶液; 5, 6, 7, 8 号光解管中分别加入 160 mL pH 7 的 0.5 μg/mL NES 溶液; 9, 10, 11 号光解管中分别加入 180 mL pH 9 的 2.5 μg/mL NES 溶液; 12 号管中加去离子水, 作为温度观察。在 1~11 号管中充入高纯氮气, 以除去空气, 打开电源, 启动氙灯, 调节冷却水控制光解温度为 26 °C。光解液成分测定的采样光照时间为 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72, 96 h。pH 5, pH 7 溶液取液量为 50 mL, pH 9 溶液取液量为 40 mL。同时设 pH 5, pH 7, pH 9 无光照试验溶液, 分别取样 50 mL, 取样时间为 2, 16, 20, 48, 96, 192, 288 h。

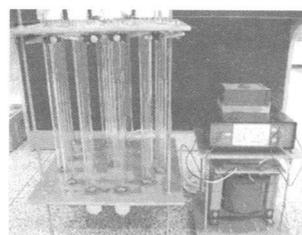


图 1 光解装置

Fig. 1 Equipment of photolysis

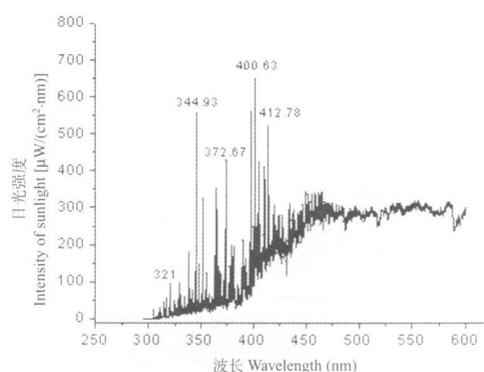


图 2 日光谱图

Fig. 2 Spectrum of luminous intensity of natural sunlight

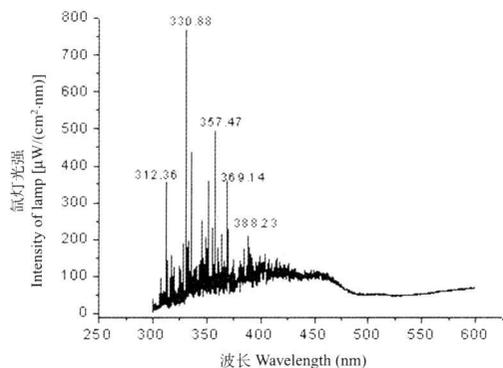


图 3 氙灯光强谱图

Fig 3 Spectrum of luminous intensity of xenon gas lamp

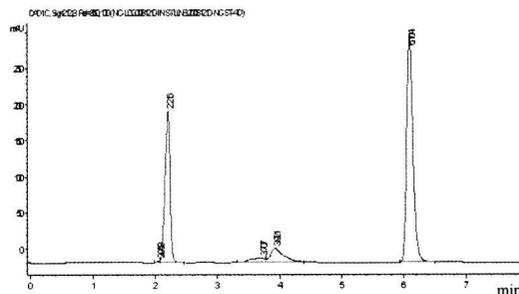


图 4 212 nm波长 HPLC测定 NES和内标色谱图

Fig 4 HPLC chromatogram of NES and internal standard for the wavelength of 212 nm

8 样品处理

8.1 固相萃取 (SPE)小柱预处理 SPE小柱以 3倍柱体积的甲醇洗脱,再用 3倍柱体积的去离子水洗脱后备用。

8.2 光解液样品处理 取一定量的光解液样品溶液,过上述预处理过的 SPE小柱 (过柱速度以下滴溶液成液滴状为最佳),然后以 3倍柱体积的去离子水洗涤,再以 3倍柱体积的甲醇洗脱,并收集洗脱液,洗脱液过无水硫酸钠柱,再用氮气吹至 1.0 ml加内标液,进行高效液相色谱 (HPLC)分析。

9 NES和内标 HPLC测定方法

HP1100型高效液相色谱仪包括 DAD紫外检测器 (美国 Agilent公司),色谱条件为: Thermo ODS HYPERSEL型色谱柱,大小为 250 mm×4.6 mm×5 μm,选用甲醇洗脱液,流速为 0.8 ml/min,手动进样。经 DAD对 200~400 nm扫描发现 NES和内标在 212 nm波长处都有吸收峰 (图 4),且 NES在 332 nm波长处有一特征吸收 (图 5),故选择 212 nm和 332 nm作为 NES测定波长。NES 212 nm测定工作曲线为: $y=0.2533x-9.5921$, $R^2=0.9996$ 332 nm测定工作曲线 $y=1.4907x-4.9854$, $R^2=0.9998$ 保留时间 2.216 min。内标 212 nm测定工作曲线为: $y=0.1286x-2.3484$, $R^2=0.9943$ 保留时间 6.104 min。NES和内标浓度与峰面积有良好的线性关系,回收率>80%,据此工作曲线测定 NES的浓度; NES的半衰期 ($t_{1/2}$)通过观察样品间隔时间内样品浓度 C_t 与 0时间初始浓度 C_0 平均比值的自然对数线性回归分析,由 $\ln(C_t/C_0) = -kt$, $t_{1/2} = \ln(0.5)/k$ 计算获得。

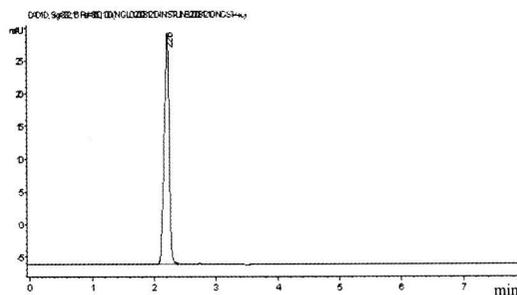


图 5 332 nm波长 HPLC测定 NES色谱图

Fig 5 HPLC chromatogram of NES for the wavelength of 332 nm

结 果

1 无光照时 NES测定

在 pH5的 0.05 μg/ml NES溶液避光放置 8 d 药物浓度为 0.0436~0.0317 μg/ml, pH7的 0.5 μg/ml NES溶液避光放置 12 d 药物浓度为 0.5361~0.4620 μg/ml, pH9的 2.5 μg/ml NES溶液避光放置 12 d 药物浓度为 2.2533~1.9257 μg/ml。可见在 pH5~9,浓度为 0.05~2.5 μg/ml 的无光照条件下 NES比较稳定 (表 1)。

表 1 氯硝柳胺在无光照条件下浓度变化

Table 1 Changes of concentration of NES without illumination

时间 Time (h)	氯硝柳胺浓度 Concentration of NES ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	pH 5	pH 7	pH 9
2	0.0436	0.5361	2.2533
20	0.0381	0.5036	2.1371
48	0.0317	0.5284	1.9257
96	0.0325	0.4620	2.0043
192	0.0355	0.5010	2.1279
288	—	0.5190	2.0289

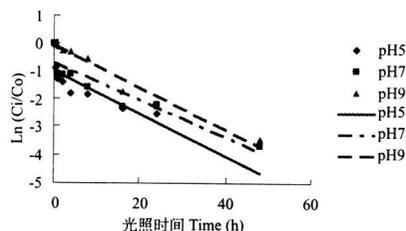


图 6 NES浓度与光照时间的变化曲线
Fig 6 Variation curve of concentration of NES and illumination time

2 不同光照时间光解液中 NES测定

在 pH 为 5、7、9 浓度为 0.05、0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的光照条件下, NES 快速降解, 8 h NES 下降率分别为 83.4%、78.8% 和 41.3%; 24 h NES 下降率分别为 92.1%、88.5% 和 95.83%。pH 5 溶液半衰期为 8.98 h, pH 7 溶液为 10.34 h, pH 9 溶液为 9.16 h (表 2 图 6)。

表 2 不同光照时间测定 NES 浓度结果
Table 2 Concentrations of NES determined with different illumination time

光照时间 Time (h)	NES 浓度 Concentration of NES ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	pH 5	pH 7	pH 9
0	0.0392	0.3737	2.1608
0.5	0.0165	0.3809	2.1186
1	0.0111	0.1189	1.9634
2	0.0098	0.1199	1.7174
4	0.0066	0.1240	1.6494
8	0.0065	0.0793	1.2690
16	0.0038	0.0385	0.3988
24	0.0031	0.0429	0.0901
48	0.0026	0.0092	0.0695
72	0.0000	0.0000	0.0360
96	0.0000	0.0000	0.0124

讨 论

药物灭螺仍是我国控制血吸虫病的重要措施之一, 全国每年药物灭螺面积在 8 亿 m^2 以上, 氯硝柳胺用量在 3 200 左右, 且已经连续使用 16 年, 持续大量的氯硝柳胺用于江湖洲滩灭螺^[5,6], 其降解完全依赖于环境代谢。为确保公共安全和环境安全, 必须了解氯硝柳胺的降解动力学机制。本次研究显示, NES 在无光照条件下, 12 d 保持稳定, 证明 NES 不被水解; 在光照条件下, 则快速光解, pH 5 (浓度为 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、pH 7 (浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、pH 9 (浓度为 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的 NES 溶液, 24 h 下降率分别为 92.1%、88.5% 和 95.8%; 半衰期分别为 8.98、10.34、9.16 h。因此, NES 在水中无光照时不水解, 保持稳定, 对于灭螺则可以维持其杀螺活性, 发挥较好的杀螺作用, 但对于环境, 则有较大的负荷, 有积蓄的可能。NES 若在水中遇光照则可分解, 且光照强, 半衰期短, 则可影响其杀螺活性, 降低杀螺效果; 但对于环境, 则因 NES 快速分解, 可降低对环境的负荷。

本研究初步建立了室内光解液中氯硝柳胺的测定方法, 为进一步研究 NES 降解规律奠定了基础。有关 NES 降解产物及其转归, 现场应用后在土壤、水体中的分布, 有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Division of Control of Tropical Diseases. The role of mollusciciding in schistosomiasis control [R]. WHO/SCHISTO/92. Geneva, Switzerland, 1992: 107.
[2] Graebing RW, Chib JS, Hubert TD, et al. Metabolism of niclosamide in sediment and water systems [J]. J Agric Food Chem. 2004; 52(19): 5924-5932.

收峰内。仪器机身轻便小巧,规格为 2.5 cm×9 cm×2.4 cm,仪器的按键和程序设计既具人性化特征,又考虑到了功能的多样性(图 4)。



图 4 氯硝柳胺现场检测仪实物图

Figure 4 The picture of the detector used in field

讨 论

氯硝柳胺含量测定的分析方法包括色谱法、紫外分光光度法等^[3-6]。紫外分光光度法的原理基于氯硝柳胺在 330 nm 处有最大吸收峰值,但因对 330 nm 紫外光产生吸收的物质很多,因此该方法选择性较差。色谱法对组分进行了有效分离,提高了选择性,但其对仪器要求高,不适用于现场检测。本课题组前期报道了一种用可见分光光度计检测氯硝柳胺含量的方法^[7],通过萃取-反萃取法对河水中的氯硝柳胺进行富集,并在碱性条件下,根据其在 375 nm 的 A 值测定水样中的氯硝柳胺。但此法操作较烦琐,且由于酯类物质在水中有一定的溶解度,萃取效率较低。为探索更适合现场应用的检测方法,本研究采用直接萃取后测有机相 A 值的方法,有效增加了萃取比,进而提高了检测氯硝柳胺的灵敏度,并进一步开发了一种便携且灵敏的光度计进行氯硝柳胺浓度的现场检测。

本研究吸收光谱曲线最大吸收峰与文献[7]相比略有红移的可能原因是,碱性条件下氯硝柳胺阴离子与 CTAB 形成疏水性的离子络合物,由于离子络合物的截光面积比氯硝柳胺大,使分子中电子跃迁所需能量略有降低,导致最大吸收光波长变大。氯硝柳胺和萃取剂浓度不变,NaOH 标准溶液用量 < 0.5 ml 时, A 值较低,提示 NaOH 的作用可能是形成强碱性条件,使氯硝柳胺形成相应阴离子,以便与 CTAB 形成离子络合物而被萃取。当碱性较弱时,形成离子络合物产率较低。氯硝柳胺浓度和 NaOH 用量不变,萃取剂中 CTAB 浓度 > 5 mmol/L 时, A 值随其浓度的增加反而降低,原因可能在于过量的 CTAB 会包裹在络合物周围而形成胶束,此胶束中 CTAB 亲油层向内,亲水层向外,从而增大了氯硝柳胺在水中的溶解性,导致氯仿相的 A 值反而降低。

(无锡市疾病预防控制中心钮伟民主任技师对现场检测仪器的研制提供了大力支持,在此致谢)

[参考文献]

- [1] 王锐. 灭螺药物的历史与现状[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2003 15(6): 487
- [2] 徐世芳, 王晗, 姜丽霞. 氯硝柳胺不同剂型及灭螺的研究进展[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2005 17(6): 478-479
- [3] 黄铁昕, 洪青标, 孙乐平, 等. 氯硝柳胺乙醇胺盐粉剂杀灭钉螺效果的研究[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2003 15(4): 255-258
- [4] 戴建荣, 朱荫昌, 黄铭西. 灭螺药物的研究进展[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2000 12(3): 189-192
- [5] Schrejer TM, Dawson VK, Choi Y, et al. Determination of niclosamide residues in rainbow trout and channel catfish fillet tissue by high-performance liquid chromatography[J]. J Agric Food Chem, 2000 48(6): 2212-2215.
- [6] Sobodka OM, Donets GA. Determination by HPLC of impurities of salicylic acid anilides in technical phenasale[niclosamide][J]. Farm Zh (Kiev), 1990(6): 58-59
- [7] 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

[收稿日期] 2009-02-19 [编辑] 邓瑶

(上接第 208 页)

- [3] 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): 234-235
- [4] 戴建荣, 梁幼生, 李洪军, 等. 氯硝柳胺悬浮剂的毒性评价[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2007 19(6): 415-417.

- [5] 郝阳, 吴晓华, 郑浩, 等. 2007 年全国血吸虫病疫情通报[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2008 20(6): 401-404
- [6] Dai JR, Wang W, Jiang YS, et al. A novel molluscicidal formulation of niclosamide[J]. Parasitol Res, 2008 103(2): 405-412

[收稿日期] 2009-02-24 [编辑] 杭盘宇