

用 GC-MS 进行甲基对硫磷的细菌降解产物研究*

王凌¹ 刘斌² 郑立³ 黎先春³

(1. 防化研究院 北京 102205)

(2. 厦门大学化学化工学院 厦门 361005)

(3. 国家海洋局第一研究所 青岛 266061)

摘要 用青岛曹家汶河口沉积物中分离出的细菌进行水体中甲基对硫磷的细菌降解研究,研究表明,该菌对甲基对硫磷具有显著的降解性。采用气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术对甲基对硫磷及其细菌降解产物进行分析,利用 GC-MS 的 G1701DAMSD 数据处理软件推断新产生化合物的结构。结果表明,在降解菌的存在下,甲基对硫磷发生取代、氧化、还原等一系列反应,产生对硝基酚等相应的降解产物。从甲基对硫磷及其降解产物的分子结构式来分析,推断可能与细菌本身的代谢有关。

关键词 甲基对硫磷 细菌 降解 GC-MS

引言

甲基对硫磷(O,O-二甲基-O-对硝基苯基硫代磷酸酯)是一种剧毒有机磷农药,具有高效杀虫、杀螨作用,长期以来被广泛应用,是我国环境污染物黑名单中所列主要有机污染物之一。甲基对硫磷主要由苯基和硫代磷酸基两部分构成(见图1)。

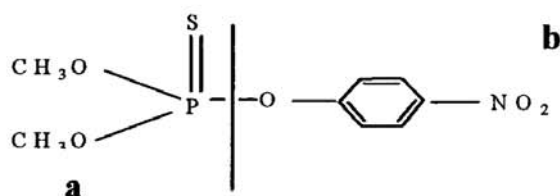


图1 甲基对硫磷的分子结构式.

a 硫代磷酸基 (Thiophosphoric moiety);

b 苯基 (benzene group)

有机磷农药具有较高的毒性,在环境中有一定残留水平,在生物体内易形成具有生物活性的轭合残留和结合残留,对人体健康或生态环境构成潜在威胁。在其生产和使用过程中,大量残留物会随雨水冲刷、土壤渗透或废水排放等进入水体。在水体中,有机磷的降解可以通过几个途径同时发生,如水解、光催化氧化降解、微生物降解以及其他的降解过程等,研究证实,微生物降解是其彻底矿化降解的主要方式^[1~4]。

气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)是将气相色谱与质谱仪串联起来,成为一个整体使用的检测技术。它既具有气相色谱高分离效能,也具备质谱准确鉴定化合物结构的特点,可达到同时定性、定量的

检测目的。用于农药残留量检测工作,特别是应用于农药代谢物、降解物的检测和多残留检测等,具有突出的优点。在农药生物修复的研究中,气-质联用方法对明确农药微生物降解过程中的中间产物,阐明降解途径和机理具有重要作用^[5,6]。

本文用从青岛曹家汶河口沉积物样品中分离出的有机磷高效降解细菌,研究其在水体中对甲基对硫磷的降解性能,并采用 GC-MS 联用技术对甲基对硫磷降解产物的表征和降解机理进行探讨。

1 实验部分

1.1 主要试剂

甲基对硫磷(国家农药质检中心(沈阳),纯度 $\geq 99.1\%$);甲醇、丙酮和乙腈均为 HPLC 级(Merck, Darmstadt, Germany);其它试剂包括磷酸铁为分析纯(上海化学试剂公司);蛋白胨、酵母粉为优级纯(杭州生物制剂有限公司);实验用水为用 Millipore Milli-Q⁵⁰(Millipore Corp., Waltham, MA, USA)新鲜制备的去离子水(18M Ω)。

1.2 仪器

HP-6890 气相色谱仪带质谱检测(MSD-5973);7683 自动进样器;G1701DAMSD 数据处理软件;色谱柱为 HP-5MS 石英毛细管柱(25m \times 0.25mm i.d. \times 0.25 μ m,美国惠普公司)。

AlltechC18-SPE 柱(200mg/3mL/50 μ g)(Alltech 公司,美国);Milli-Q50 超纯水处理系统(Millipore 公司,美国);CaliperTurboVapII 氮吹蒸发器(caliperlife-

* 基金项目 国家 863 项目(项目编号 2003AA635180)

sciences, 美国); TOMY Autoclave SS-325 高压灭菌锅 (TOMY 公司, 日本); HZQ-F160A 型高低温恒温振荡培养箱 (上海一恒科技有限公司)。

1.3 细菌降解实验

在三角瓶中加入一定量的蛋白胨、磷酸铁、酵母膏和去离子水, 用玻璃棒搅拌使之溶解, 调 pH 至 7.2~7.6, 用纱布和牛皮纸封口, 放入高压灭菌锅中, 121℃, 灭菌 30min。

在无菌操作室, 紫外线灭菌 30min 后进行如下操作: 在一定量液体培养基中加入 1000mg/L 的甲基对硫磷丙酮贮备液, 搅拌均匀, 使混合液中甲基对硫磷的最终浓度为 1mg/L, 然后分装于 80mL 三角瓶中, 每个瓶中 20mL, 分为 2 组, 其中 1 组接种 L-10 菌株, 一组作为空白, 每组三个平行样。25℃ 恒温振荡 (130rpm) 7 天。剩余的培养液作为初始空白。

1.4 样品的处理

取适量培养液, 8000r/min, 离心 10min。SPE-C18 小柱分别依次用 5mL 甲醇、5mL 乙腈和 5mL MilliQ 水活化, 然后取 20mL 离心过的培养液过柱, 20mL 乙腈洗脱, 用蠕动泵控制流速 2~3 mL/min。收集洗脱液用氮吹仪吹干, 再加入 1mL 乙腈溶出, 转入进样瓶中。供测试。

2.5 气相色谱-质谱 (GC-MS) 操作条件

色谱条件: 进样口温度 250℃; 检测器温度 280℃; 载气为高纯氦气, 流量 1.0mL/min; 柱前压 7.63psi。柱温采用程序升温: 初始温度 50℃, 以 10℃/min 升温至 260℃, 保持 3min。初始状态为不分流进样。

质谱条件: 接口温度 280℃, 电子轰击 (EI) 离子源, 电子能量 70eV, 离子源温度 230℃, 四极杆温度 150℃, 质量扫描范围 50~450, 溶剂延迟 3min。采用全扫描方式 (SCAN) 检测。

2 结果与讨论

2.1 细菌对甲基对硫磷的降解效果

将降解一周后的培养液经前处理后, 进行 GC/MS 全扫描分析, 进样量均为 1μL。获得各样品的气相色谱图 (见图 2)。图 2a 中保留时间为 12.68min 的化合物 1 和保留时间为 16.69min 的化合物 2, 根据 GC-MS 数据库和甲基对硫磷标样判别分别是对硝基苯酚和甲基对硫磷。采用保留时间定性的方法, 从图 2b 和图 2c 中可看出, 甲基对硫磷经细菌降解一周后, 原来的甲基对硫磷峰消失, 分别出现编号为 3、4、5 等一些新峰; 而没有接种细菌的样品, 甲

基对硫磷的峰仍然很高, 说明甲基对硫磷非微生物降解的程度较低。

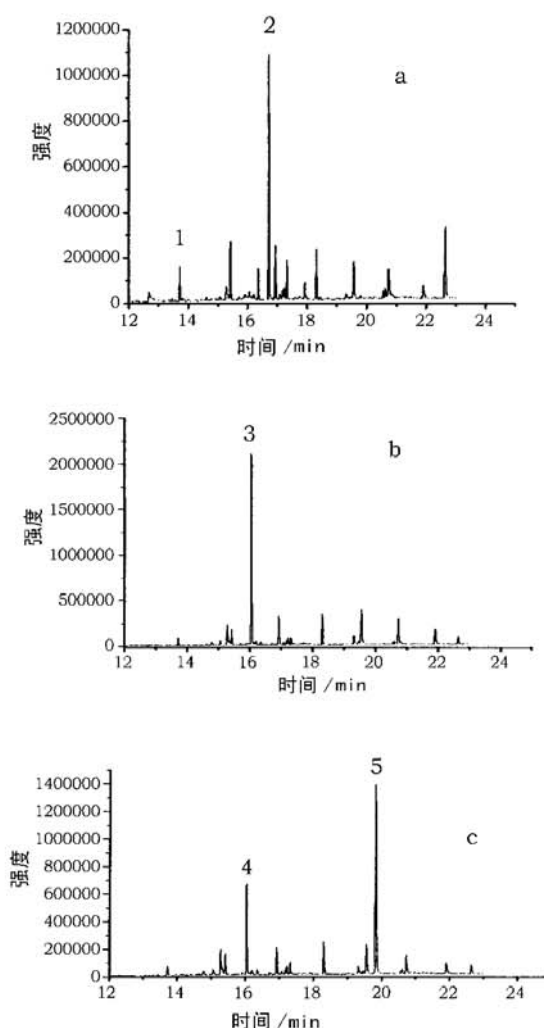


图 2 甲基对硫磷溶液降解一周后的 GC 图

a 无菌 b L-10 菌 c S-2 菌

2.2 降解产物的 GC-MS 鉴别

利用 GC-MS 的 G1701DAMSD 数据处理软件推断新产生化合物的结构 (见表 1)。

2.2.1 化合物 1 和化合物 2 的鉴别 图 3 是无菌条件下甲基对硫磷降解产物质谱图。图 3a 中 m/z 139 的化合物是甲基对硫磷一个重要的自发降解或光降解产物。 m/z 109 的碎片是由硝基苯失去一个 NO 分子产生的。

图 3b 中 m/z 263 为分子离子峰, m/z 125 的碎片是甲基对硫磷结构中的硫代磷酸基部分 (见图 1a), 在失去硝基苯基部分 (见图 1b) 后形成的; 硝基苯基部分在失去一个 NO 分子, 得到一个氢原子后形成 m/z 为 109 的基峰。接着, 氧原子丢失, 形成 m/z 93 的奇电子离子 $(C_6H_5O)^+$ 。

2.2.2 化合物 3 和化合物 4 的鉴别 图 4 是细菌 L-10 和 S-2 存在下甲基对硫磷降解产物的质谱图。由 GC/MS 图谱可知, 图 2b 和图 2c 中的峰 3 和 4 看起来像相同的化合物, 因为它们在气相色谱图上的

表 1 GC-MS 推断出的结构图

化合物	结构式	保留时间 (min)	选择离子碎片 (m/z)
1	<chem>Oc1ccc(cc1)[N+](=O)[O-]</chem>	12.68	139, 109, 93, 81, 65, 53
2	<chem>COP(=S)(OC)Oc1ccc(cc1)[N+](=O)[O-]</chem>	16.69	263, 125, 109, 93, 79, 63
3 and 4	<chem>CCOP(=S)(O)Oc1ccc(cc1)N</chem>	16.05	233, 124, 108, 93, 79, 63
5	<chem>CCOP(=S)(O)Oc1ccc(cc1)NC(=O)C</chem>	19.84	275, 233, 124, 108, 93, 79, 63

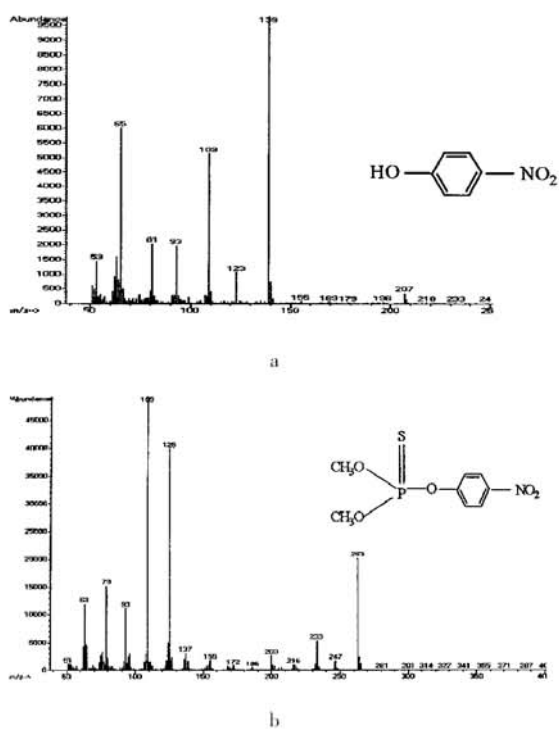


图 3 无菌条件下甲基对硫磷降解一周后各产物的 GC-MS/EI 图

a 化合物 1 b 化合物 2

保留时间相同,均为 16.05min,同时,它们质谱图(见图 4a,4b)中的离子碎片峰也非常相似。它们同样含有 m/z233 的分子离子。推断是在碰撞电离(EI)条件下,氧原子和苯基间相连接的键断裂,接着,硫代磷酸基部分失去一个氢氧根产生 m/z124 的碎片,再进一步失去一个氧原子形成 m/z108 的峰。

2.2.3 化合物 5 的鉴别 图 2c 中保留时间为 19.84min 的化合物 5 对应的 GC/MS 质谱图图 4c 上 m/z275 的离子碎片。m/z233 的离子是由分子离子失去一个 $(CH_3)_2O^+$ 产生的,该奇电子离子与硫代

磷酸基部分上的异丙基相对应。氧原子和苯基之间的键断裂形成 $(C_6H_5NO_2)^+$,对应 GC/MS 质谱图——图 4 上 m/z124 的离子峰,接着,失去一个氧原子形成 m/z108 的离子峰,或失去一个 HNO 形成 m/z93 的离子峰。

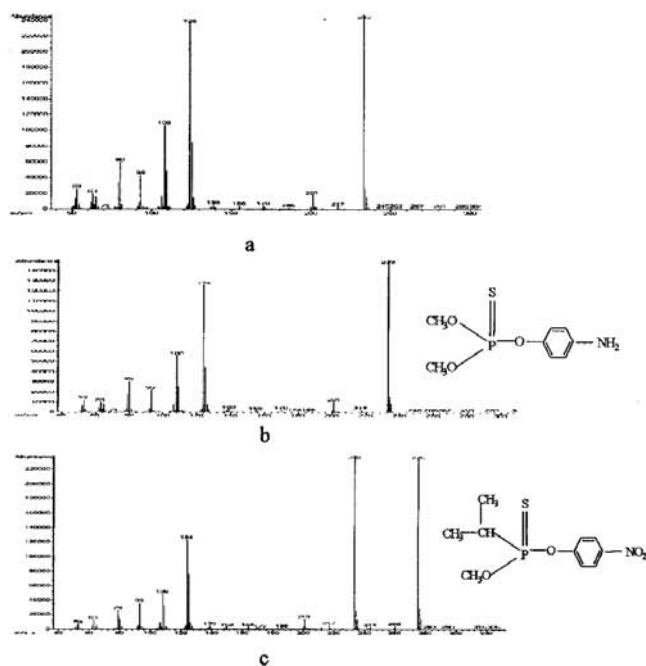


图 4 有菌条件下甲基对硫磷降解一周后各产物的 GC-MS/EI 图

a 化合物 3 b 化合物 4 c 化合物 5

5 结论

本文用 GC/MS 研究甲基对硫磷的微生物降解产物。采用气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术对甲基对硫磷及其细菌降解产物进行分析,利用 GC-MS 的 G1701DA MSD 数据处理软件推断新产生化合物的结构。结果表明,在降解菌的存在下,甲基对硫磷发生取

代、氧化、还原等一系列反应,产生对硝基酚等相应的降解产物。从甲基对硫磷及其降解产物的分子结构式来分析,推断可能与细菌本身的代谢有关。

有关甲基对硫磷在水体中细菌降解产生的中间产物,在环境中的归宿、迁移转化规律及其毒理效应还有待进一步研究。

参考文献

1 Mageong Y C, Joseph E P. Sererospesific enzymetic hydrolysis of phosphorus - sulfur bond in chiral organophosphate triesters1 *Bioorganic & Med chem lett* 1994, 4 (2) : 1473 ~ 1478

- 2 Angelica M B et al. A theoretical approach to the mechanism of biological oxidation of organophosphorus pesticide1 *Toxicology*, 2000, 149 : 63 ~ 68
- 3 阮少江等. 微生物酶催化甲胺磷降解机理初探, *武汉大学学报*, 2000, 46 (4) : 471 ~ 474
- 4 石利利, 林玉锁等. 农村生态环境, 2002, 18 (3) : 26 ~ 29
- 5 Hirahara Y, Tsumura Y, Nakamura Y, et al. 1997. Analysis of phenolrin and its metabolite 3-phenoxybenzoic acid (PBA) in agricultural products by GC and ion 7 trap GC/ MS. *J. Food Prot.*, 1997, 60 (3) : 305 ~ 309
- 6 Molto JC, Lejeune B, Prognon P, et al. 1994. GC MS determination of organochlorine pesticides in five meccinal plants. *J. Environ Anal Chem* 1994, 64 (2) : 81 ~ 91

Identification of biodegradation products of methyl parathion in aqueous environment using GC-MS spectrometry

Wang Ling¹ Liu Jie² Zheng Li³ Frank S C Lee³

(1. Chemical Defence Academe, Beijing, 102205)

(2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005)

(3. First Institute of Oceanography, QingDao 266061)

Abstract The biodegradation of the organophosphorus insecticide methyl parathion in aqueous suspensions by bacteria isolated from river sediment has been studied. The biodegradation process was found to be highly efficient, with the formation of several intermediates that were identified using GC-MS spectrometry. Unlike photocatalytic degradation of methyl parathion, from which the main degradation intermediates include primarily methyl paraoxon and 4-nitrophenol, the degradation products from biodegradation are more diverse because of the complexity of biodegradation processes. Data were processed using Analyst G1701DA MSD software from Agilent.

Key words Methyl parathion Degradation Bacteria GC-MS

(下接第 44 页)

通,或多或少存在一定的磨损或脏污,使得水印条码也存在一定的退化现象,当退化现象严重时,会影响水印条码检测,应结合退化现象的自身特点,需要设计具有线性时间复杂度且效果好的复原算法。

4 结论

本文采用 TMS320VC5409 数字信号处理器、MSP430 单片机为主要器件,设计一套识别系统。从实验结果来看,基本达到对欧元水印条码进行有效、准确、快速识别的目的,但是由于水印的自身特点,

水印条码的退化现象,以及实验条件简陋等方面原因,得到的相关度比较低。下一步,打算采用大量的欧元纸币样本进行实验研究,并应用欧元假币与真币进行对比实验,以进一步提高系统检测的可靠性。并且要在系统中加入红外检测、磁检测、厚度检测等纸币鉴别功能,使系统与现代验钞机相结合。

参考文献

- 1 从森. 基于 DSP 的图像采集处理系统,沈阳工业大学硕士学位论文,2003
- 2 Texas Instruments, TMS320VC54x DSP Reference Set Volume I, CPU and Peripherals, 1999

The research of detection system of watermark bar of euros based on DSP

Ma Xiaoyan Liu Tiegeng Yang Yong Zhang Xiaojun

(College of Precision Instrument and Optoelectronics Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072)

Abstract Watermark bars are one of the new anti-counterfeit technologies applied by Euros. Because they carry Euros' special information so it is promising and practical to make research on the method to detect watermark bars quickly and accurately. This essay introduces our research on the detection system of watermark bars in Euros. The work use DSP and MCU as the main part to identify counterfeit notes efficiently and fleetly by the detection of watermark bars. We have made experiments by the detection system and get the signals and output. Made analyze of the results and experiment curves of watermark bars of different Euros of different value. And computed the correlation coefficient of watermark bars' curve and bring the advanced plan.

Key words Euros Watermark bars Detection Identify