

GC/MS和GC/FTIR分析细菌降解呋喃丹的产物

武俊¹, 洪青^{1,2}, 陈一楠¹, 李顺鹏^{1*}

- 1 南京农业大学生命科学学院, 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 江苏 南京 210095
2 中国科学院南京土壤研究所, 土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 江苏 南京 210008

摘要 采用液体萃取法在不同的降解时期提取了细菌 CDS-1 (*Sphingomonas sp.*) 降解呋喃丹的产物, 经气谱-质谱联用 (GC/MS) 分析, 分离鉴定出呋喃丹的首步代谢产物呋喃酚。通过化合物谱行为分析, 基本确定了分子量为 182 的未知化合物为 2-羟基-3-叔丁醇基-苯酚, 并且确定其为呋喃酚的下一步代谢产物。经气质联用与气谱-傅里叶红外光谱联用 (GC/FTIR) 分析, 确定细菌在降解呋喃丹后期产生的具有刺激性气味的物质的主要成分为藏茴香酮。

主题词 呋喃丹; 2-羟基-3-叔丁醇基-苯酚; 气谱-质谱联用; 气谱-傅里叶红外光谱联用; 藏茴香酮
中图分类号: Q935 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-0593(2006)09-1716-04

引言

呋喃丹 (Carbofuran) 是上个世纪使用最广泛的农药之一; 作为胃毒或触杀型杀虫剂的代表, 能够十分有效地防治水稻的主要害虫及土壤中的大部分害虫^[1]。呋喃丹是乙酰胆碱酯酶的抑制剂, 而乙酰胆碱酯酶是神经中枢系统传输信号过程中的一种重要的酶。因此它对哺乳动物的急性毒性极大^[2]。在呋喃丹降解方面, 有研究人员尝试过化学和物理的方法, 如臭氧、紫外线、过氧化氢等^[3, 4]。但是这些方法从成本和效果上来说都不如生物修复 (Bioremediation) 法好, 而生物修复的关键是获得具有呋喃丹降解功能的微生物。目前已有不少关于微生物降解呋喃丹的报道^[5-8], 并已阐明呋喃丹的首步降解途径为呋喃丹的氨基甲酸酯键发生水解断裂生成呋喃酚^[7, 8], 然而从呋喃酚往下的降解过程一直未见有报道。

本研究利用 GC/MS 对本实验室分离的细菌 CDS-1 (*Sphingomonas sp.*)^[9] 降解呋喃丹的产物进行了分析, 验证了呋喃丹首先发生水解反应生成呋喃酚; 根据质谱行为、利用所检测到的 MS 谱图推导出呋喃酚的开环产物 (分子量为 182): 2-羟基-3-叔丁醇基-苯酚。同时利用 GC/MS, GC/FTIR 对细菌在降解后期产生的挥发性物质进行了分析, 确定其成分为藏茴香酮。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

GC/MS 联用仪 (HP5890/5972); GC/FTIR 联用仪 (550); 呋喃丹 (> 98%), 购于太仓鲍利葛化工有限公司。

1.2 样品制备

CDS-1 用 LB 培养数天, 10 000 rpm, 5 min 离心得到菌体。用无菌水反复润洗多遍, 去除残留养分。将 CDS-1 加入含有呋喃丹的液体无机盐培养基中, 30 °C 摇床培养。在降解的不同时期分别取样。将样品以 10 000 rpm 离心 5 min。收集上清液, 加入等体积丙酮, 剧烈震荡 1 min, 静置。加入氯化钠, 使混合相中的水相成为饱和氯化钠溶液。再剧烈震荡 1 min, 20 °C 条件下静置 5 min, 使水相与丙酮相分层。移出丙酮相, 过无水硫酸钠柱, 收集流出的丙酮, 用氮气吹干, 定容至 0.5 mL, 供 GC/MS 分析。

1.3 GC/MS 与 GC/FTIR 条件

GC/MS 条件色谱柱: HP-5—30 m × 0.25 mm × 0.25 μm; 进样口温度 250 °C; 起始温度 100 °C, 保留 3 min; 升温速率 10 °C · min⁻¹; 终止温度 300 °C, 保留 5 min。MS 传输线温度 300 °C。电离电压 70 eV。载气 He, 流速 1 mL · min⁻¹。柱头压 100 kPa。

GC/FTIR 条件色谱柱: HP-5—30 m × 0.25 mm × 0.53 μm; 进样口温度 250 °C; 起始温度 100 °C, 保留 3 min; 升温速率 10 °C · min⁻¹; 终止温度 300 °C, 保留 5 min。红外分辨

收稿日期: 2005-05-18, 修订日期: 2005-11-02

基金项目: 国家自然科学基金 (30400013, 40471073) 和江苏省农业科技计划 (BG2005322) 资助项目

作者简介: 武俊, 1978 年生, 南京农业大学生命科学学院博士研究生 * 通讯联系人

率 8; 采集扫描次数 16。

2 结果与讨论

图 1 为检测到的呋喃酚的 MS 谱图。图 2 为检测到的分子量为 182 的物质(M)的 MS 谱图。

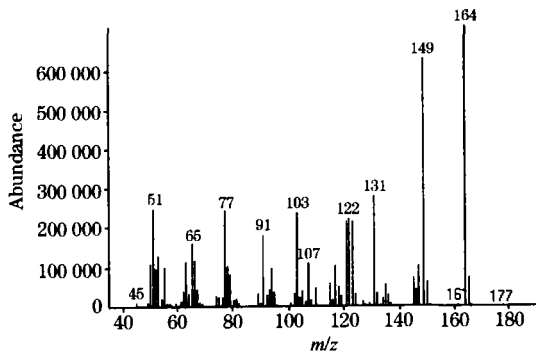


Fig. 1 MS spectrum of carbofuran-7-phenol

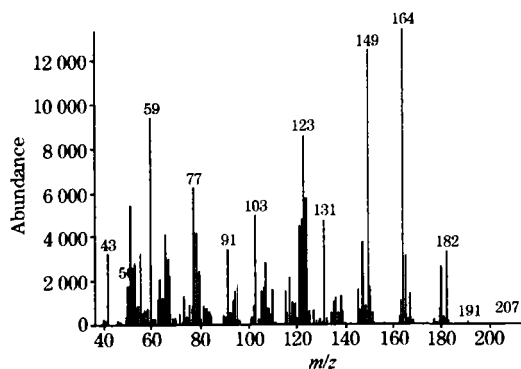
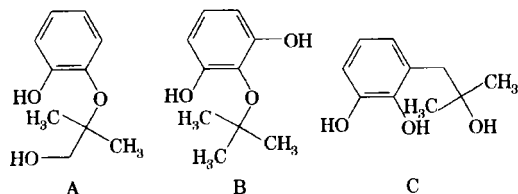


Fig. 2 MS spectrum of M

为确定其结构, 首先将其 MS 谱图与呋喃酚标准谱图相比较, 发现 M 谱图的整体地貌与呋喃酚的谱图较为相似, 在分子量上接近(M 为 182, 呋喃酚为 164), 故粗略推断 M 为呋喃酚的下一步代谢产物。比较 M 与呋喃酚的分子离子峰可以发现, 二者在分子量上仅相差 18。考虑到该物质是由细菌转化呋喃酚而得到, 根据质谱分析中的氮规律以及无碳培养基的培养条件, 在呋喃酚上修饰上含 N 基团的可能性很小, 故推断这相差的 18 很可能是一分子 H₂O。由于 M 分子中苯环的存在, 注定这一分子 H₂O 只能加在呋喃环上(否则苯环结构将被破坏, 质谱图中 $m/z=77, 91$ 的峰不会出现), 考虑到呋喃环除了与苯环共用的一个双键外其余键均已饱和这一先决条件, 推测呋喃环被开环。综上所述, 再参照同类型化合物西维因的降解方式^[10], 得到下述 3 个可能的开环产物(C₁₀H₁₄O₃), 见 Scheme 1。

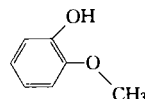
依据 M 的质谱图结合质谱行为分析对以上 3 种化合物逐一进行分析对比, A: 该化合物属于醚类化合物。根据自苯基乙基醚开始, 以上的醚类能进行侧链麦氏重排裂解, 生成酚性离子的规律^[11], 该化合物在质谱中进行麦氏重排裂

解形成 c1ccc(O)cc1[OH+] $m/z(M')$ (110)。



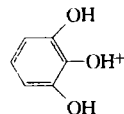
Scheme 1 Three products

根据邻苯二酚在质谱中的裂解行为可得到 $M'-H_2O$ 产生 $m/z(92)$; $M'-H_2O-CO$ 产生 $m/z(64)$ 的碎片离子峰(中强峰)^[11], 这与本质谱图相去甚远。但从总体来看 $M-H_2O-CH_3$ 可产生 $m/z(149)$, 随后再裂解产生

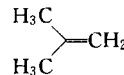


(M'')。但是根据邻甲氧基苯酚在质谱中的裂解行为可知 M'' 再裂解会产生 $M''-CH_3$ 即 $m/z(109)$ 、 $M''-CH_3-CO$ 即 $m/z(81)$ 与 $M''-CH_3-CO-CO$ 即 $m/z(53)$ 的碎片峰^[11]。在这张质谱图中上述碎片峰表现的均不明显。综上所述, A 的可能性可以排除。

B: 该化合物仍属于醚类化合物。由于侧链含有叔丁基团, 根据麦氏重排裂解的规律^[11], 应该在图谱中找到 $m/z(126)$ 即 $M-C_4H_8$ 与 $m/z(56)$ 的中强峰。随后由重排产物

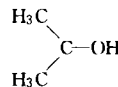


(M') 邻苯三酚在质谱中的裂解方式可以知道 M' 在质谱中首先 $M'-H_2O$ 产生 $m/z(108)$, 然后连续失去两个 CO, 即 $M'-H_2O-CO$; $M'-H_2O-CO-CO$ 分别产生 $m/z(80)$ 与 $m/z(52)$ ^[11]。而另一重排产物

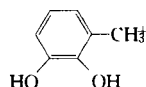


(M'') 在质谱中应产生 $M''-CH_3$ 即 $m/z(41)$ 的碎片离子峰。在 M 化合物谱图的相同位置察看相应的峰可以发现在以上位置的碎片离子峰均表现不明显, 有些则根本没有碎片峰, 所以 B 的可能性也可以排除。

C: 由于有机化合物分子在质谱中基本裂解方式中苯基裂解强度最大^[11], 根据荷质比在谱图中发现 $m/z(59)+m/z(123)=m/z(182)$, 同时找到 $m/z(124)$ 的峰, 可基本断定 M 谱图中 $m/z(59)$ 为

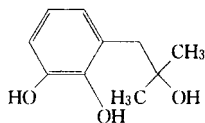


(M''); $m/z(124)$ 为



(M')。根据 M' 即 3-甲基苯酚在质谱中的定向裂解方

式^[11]可以得出图 2 中的 m/z (123) 为 $M' - H$; m/z (106) 为 $M' - H_2O$; m/z (78) 为 $M' - H_2O - CO$; m/z (77) 为 $M' - H_2O - CO - H$ 。 m/z (91) 与 m/z (95) 在 3-甲基儿茶酚的标准质谱图也存在, 是碎片裂解后的重排产物。 m/z (43) 是 $M'' - CH_3 - H$ 所产生的碎片离子峰。 m/z (182) 为 M^+ ; 从总体考虑 M 的支链是一个类似于叔醇类的结构, 借鉴叔丁醇在质谱中的裂解行为方式可知叔丁醇的主要裂解是 α 裂解失去甲基后再脱水^[11], 故 m/z (149) 是 $M - CH_3 - H_2O$ 。 至于 m/z (164) 则是由 M 物质受电子轰击经 $M - CH_3$ 裂解途径产生的。 由此 M 质谱图中所有的峰都得到了合理的解释, 由于推翻了 A, B 两种物质, 再参比呋喃酚的质谱图基本可确定 M 物质即为



(2-羟基-3-叔丁基-苯酚)。

在呋喃丹降解后期培养液中会产生具有刺激性气味的物质。 利用 GC/MS 对降解后期的产物进行检测, 发现了藏茴香酮的存在。 图 3 是 GC/MS 检测的降解后期的 GC 谱图, 其中藏茴香酮的保留时间为 6.55 min。 图 4 和图 5 是藏茴香酮的 MS 谱图与 FTIR 谱图。

3 小 结

本研究综合利用多种分析方法研究细菌 CDS-1 (*Sphingomonas* sp.) 降解呋喃丹的产物尚属首次。 利用 GC/MS 检测到呋喃丹的代谢物呋喃酚的存在, 同时利用 MS 谱图结合化合物质谱行为推导出呋喃酚的开环产物 2-羟基-3-叔丁基-苯酚。 利用 GC/MS, GC/IR 确定降解后期产生的具有刺激性气味的化合物为藏茴香酮。 这些结果对于阐述细菌代谢呋喃丹的途径有较高的理论意义。

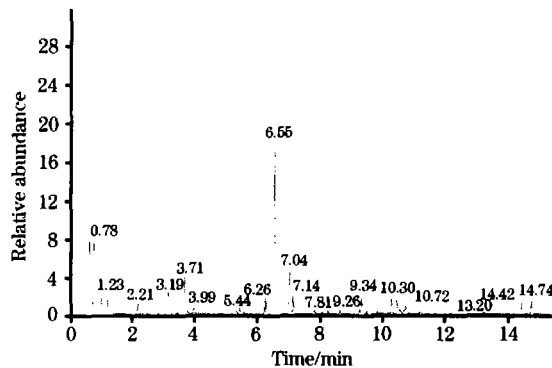


Fig. 3 GC spectrum of the final phase of the degradation of carbofuran by CDS-1

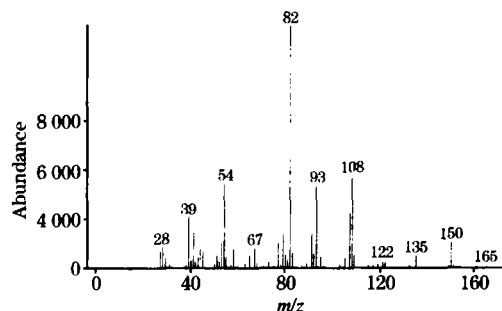


Fig. 4 MS spectrum of carvone

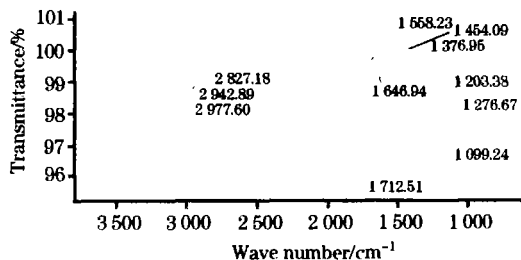


Fig. 5 Fourier transform infrared spectrum of carvone

参 考 文 献

- [1] SHA Ji-jun(沙家骏). The Manual of Chemical Products(化工产品手册). Beijing: Chemical Industry Press(北京: 化学工业出版社), 2000. 168.
- [2] Chapalmandugu S, Chaudhury G R. Crit. Rev. Biotech., 1992, 12: 357.
- [3] Bachman J, Patterson H. Environ. Sci. Technol., 1999, 33: 874.
- [4] Battachaya A, Raha P, Das A, et al. Chemosphere, 1994, 291: 55.
- [5] Rasul Chaudhry G, Ali A N. Appl. Environ. Microbiol., 1988, 54: 1414.
- [6] Edward T, Richard S H, David B, et al. Appl. Environ. Microbiol., 1993, 59: 3339.
- [7] Xiu H F, Li T O, Andrew O. Appl. Environ. Microbiol., 1997, 63: 1332.
- [8] Karns J S, Mulbry W W, Nelson J O, et al. Pesticide Biochemistry and Physiology, 1986, 25: 211.
- [9] WU Jun, XU Jian-hong, HONG Qing, et al(武俊, 徐剑宏, 洪青, 等). Acta Scientiae Circumstantiae(环境科学学报), 2004, 24(2): 338.
- [10] LI Shun-peng(李顺鹏). Environmental Biology(环境生物学). Beijing: Chinese Agriculture Press(北京: 中国农业出版社), 2002. 232.
- [11] CONG Pu-zhu, SU Ke-man(丛浦珠, 苏克曼). Analysis of the Mass Spectrometry(质谱分析). Beijing: Chemical Industry Press(北京: 化学工业出版社), 2000. 243, 212, 221, 213, 3, 219, 199.

Analysis of the Degrading Products of Carbofuran by *Sphingomonas* sp. with GC/MS and GC/FTIR

WU Jun¹, HONG Qing^{1, 2}, CHEN Yan¹, LI Shun-peng^{1*}

1. College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Key Lab of Microbiological Engineering Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Nanjing 210095, China

2. Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Nanjing 210008, China

Abstract In different degrading phases, the degrading products of carbofuran by CDS-1(*Sphingomonas* sp.) were extracted by acetone. According to the analysis of gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS), carbofuran-7-phenol was identified as the initial degrading product, and an unknown metabolite with molecular weight of 182 was determined as 2-hydroxy-3-tertiary-butylalcohol-phenol, which was the next degrading product of carbofuran-7-phenol. According to the analysis of GC/MS and gas chromatography/Fourier transform infrared spectrum (GC/FTIR), the main component of the compounds that appeared in the final phase of degradation which could produce volatile pungent odor, was identified as carvone.

Keywords Carbofuran; 2-hydroxy-3-tertiarybutylalcohol-phenol; GC/MS; GC/FTIR; Carvone

(Received May 18, 2005; accepted Nov. 2, 2005)

* Corresponding author