

除草剂丁草胺的分析测定及其微生物降解产物研究

赵淑莉¹, 谭文捷², 何绪文²

(1. 中国环境监测总站, 北京 100029; 2. 中国矿业大学(北京校区)化学与环境工程学院, 北京 100083)

摘要:用高效液相色谱对除草剂丁草胺(N-丁氧甲基氯-25-氯-25,65-二乙基乙酰替苯胺)的测定方法及其在水溶液中的微生物降解进行了研究。结果表明,采用 BDS C18 柱和紫外检测器,以乙腈和水为流动相(体积比为 8:2),在波长 215 nm 下进行检测,丁草胺的变异系数和平均回收率分别为 1.24% 和 99.58%;在 1~20 mg·L⁻¹ 的浓度范围内具有良好的线性关系,可以用来定量检测水介质中丁草胺的浓度水平。未灭菌水中丁草胺的降解速率比灭菌水中快,接种微生物后丁草胺的降解速率明显加快,说明微生物是丁草胺降解的主要因素,接种用的细菌能快速降解水溶液中的丁草胺。GC-MS 分析结果表明,降解产物只有一种主要化合物。

关键词:丁草胺; 高效液相色谱; 微生物; 降解产物

中图分类号:X172.0657.72 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2005)05-0989-05

Decomposition Products of Herbicide Butachlor in Water Media

ZHAO Shu-li¹, TAN Wen-jie², HE Xu-wen²

(1. China National Environmental Monitoring Center, Beijing 100029, China; 2. School of Chemical and Environmental Engineering, China University of Mining & Technology, Beijing 100083, China)

Abstract: Determination and biodegradation of herbicide butachlor (N-butoxymethyl-25-chloro-25,65-diethyl acetanilide) in water media was investigated using high performance liquid chromatography (HPLC). The sample was separated on BDS C₁₈ column, with methanol-water (80/20, V/V) as mobile phase. The herbicide samples were detected at 215 nm with UV detector. The average recovery is 99.58% with a coefficient of variation 1.24% for butachlor. The linear range of the developed method is 1~20 mg·L⁻¹. The method is proved to be accurate, rapid and reproducible. Biodegradation of herbicide butachlor in water media was investigated using a kind of bacteria, *Bacillus amyloliquefaciens*. The bacteria were separated from the paddy field in Beijing. The biodegradation experiment was carried out under the conditions of pH7.2 and 30 °C. The biodegradation rate of butachlor in bacteria-containing water is faster than that in the media without bacteria, which indicated that bacteria are the main factor for butachlor degradation. The degradation ratio of butachlor in sterilized water and bacteria-containing water in ten days reached 30% and 70% respectively. The degradation ratio of butachlor in water containing inoculated and purified bacteria in ten days can reach 95%. This result indicated that the bacteria separated from the soil samples can degrade butachlor with high efficiency. Samples after reaction were removed and filtered through cellulose-regenerated filter (0.45 μm pore size) and subject to HPLC analysis. The HPLC results showed that there were two kinds of degradation products. Liquid-liquid extraction was performed three times with 10 mL of dichloromethane. The organic extracts were concentrated in a rotatory evaporator to 0.5 mL and subject to gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis and only one compound was identified.

Keywords: butachlor; HPLC; bacteria; biodegradation products

丁草胺(N-丁氧甲基氯-25-氯-25,65-二乙基乙酰胺苯胺)是一种高效的选择性芽前除草剂。目前丁草胺已成为中国和世界水稻田首选的除草剂与杀稗剂之一^[1]。文献报道检测丁草胺等酰胺类除草剂的方法多为气相色谱法^[2-5],但它仅适用于分析沸点低的样品,而且不能直接测定含水样品。近年新发展起来的高效液相色谱技术恰好能弥补气相色谱法的不足,可对80%的有机物进行分离和分析,尤其适用于极性较强、沸点高、分子量大的化合物。目前只有少量关于采用高效液相色谱法分析检测丁草胺的文献报道^[6,7],且均未对其分析方法进行详细描述。

本文利用本实验室现有的液相色谱仪,选用合适的色谱柱,通过改变流动相的类型和配比来寻找合适的分析测试条件,为丁草胺在水环境中的识别和定量化研究提供科学方法。此方法不仅能定量检测丁草胺,而且可初步检测出丁草胺的微生物降解产物。同时,采用本实验室分离出来的高效降解菌对丁草胺的微生物降解进行了初步的研究,并用液相色谱和气质联机对其降解产物进行鉴定。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

丁草胺标样购于国家农药质检中心,浓度为93.1%;重蒸馏水;乙腈(色谱纯);二氯甲烷(色谱纯)。

菌种为本实验室自行分离出来的高效降解菌,经鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。其形态特征为:革兰氏阳性,菌体杆状、形成芽孢,芽孢卵圆形,孢囊膨大,最适生长温度28℃~30℃。生理生化性质:还原硝酸盐,水解淀粉,可发酵D-葡萄糖、L-阿拉伯糖、甘露醇、D-木糖,接触酶阳性,氧化酶阴性。

HITACHI U-3210型紫外-可见分光光度计;HITACHI D-2500型高效液相色谱仪,带L-4200型紫外检测器和色谱工作站;Turbomass气相色谱质谱联用仪;KQ-500DB型超声波振荡器;旋转蒸发器。

1.2 试验方法

1.2.1 色谱条件

色谱柱:Hypersil BDS C₁₈柱(5 μm)4.0 mm×200 mm;流动相:乙腈-水;流速:1.0 mL·min⁻¹;检测波长:215 nm;进样量:10 μL。

1.2.2 标准溶液的配制

以甲醇为溶剂将丁草胺配成1 g·L⁻¹标准储备

液,用二次蒸馏水稀释丁草胺储备液制成一系列不同浓度的丁草胺标准溶液,浓度依次为1、2、5、8、10、15、20 mg·L⁻¹。

1.2.3 反应液的配制

将基础培养基和所有反应器具用高压灭菌锅进行灭菌,向灭菌后的基础培养基中加入一定量的丁草胺储备液配成反应液,调节反应液pH值为7.2。考虑到丁草胺的水解,反应液用时现配。取90 mL反应液分别放入250 mL锥形瓶中,向各瓶反应液中加入制备好的菌悬母液10 mL,用通气塞塞好。将锥形瓶放入空气浴摇床中,控制温度30℃避光培养,每24 h取样一次。将取出的样品过0.45 μm滤膜后,用高效液相色谱法测定丁草胺浓度随时间的变化情况,反应一段时间后,用HPLC和GC-MS检测丁草胺残留浓度和降解产物。

1.2.4 降解产物的提取

根据液相色谱的分析结果,选出合适的反应液作为提取降解产物的对象。将待提取的反应液倒入250 mL分液漏斗中,加入少许无水硫酸钠,用二氯甲烷10、5、5 mL分3次振荡萃取,合并萃取液,经无水硫酸钠柱脱水,将馏出液用旋转蒸发器浓缩至1 mL,用气质联机进行检测,鉴定丁草胺的微生物降解产物。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

用紫外-可见分光光度计对丁草胺的水溶液和乙腈溶液进行波长扫描,扫描结果如图1所示,丁草胺在水溶液和乙腈溶液中的最佳吸收波长均小于200 nm,在210 nm附近都存在一较弱吸收峰,可以看出丁草胺在两种体系中的紫外吸收光谱稍有差异但不太大。由于所使用液相色谱的紫外检测器的扫描范围在200 nm以上,而丁草胺在215 nm左右有明显的吸收峰,故选用215 nm作为样品的检测波长。

以苯胺类专用柱^[8]Hypersil BDS C₁₈为固定相,以一定比例的乙腈-水为流动相。改变乙腈-水的组成比例和流动相的流速进行试验。图2列出了不同流动相配比时丁草胺的液相色谱结果,从图中可以看出,流动相中乙腈含量越高,保留时间越短,但基线稳定程度和峰形宽窄、大小和对称性均有所不同。其中乙腈/水(V/V)的比值为8:2、流速为1.0 mL·min⁻¹时,保留时间、色谱峰的对称性、峰形和大小等效果最佳。因此,流动相中乙腈/水(V/V)的比值为8:2,流速为1.0 mL·min⁻¹。

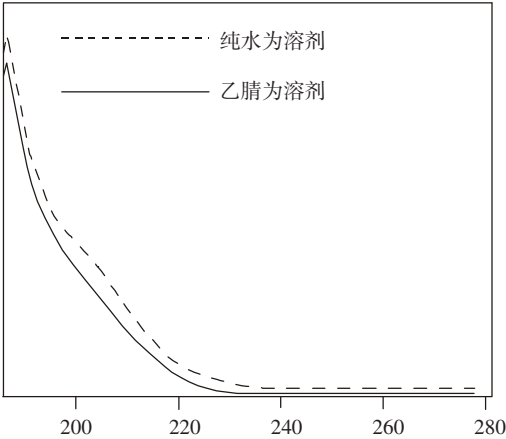


图 1 丁草胺在水溶液和乙腈中的紫外吸收光谱

Figure 1 Absorbance spectra of butachlor in water and acetonitrile

2.2 精密度的测定

按上述色谱条件,对同一样品进行了 6 次重复测定,测定结果见表 1。丁草胺的标准偏差为 0.16,变异系数为 1.24%,表明该方法的重现性良好。

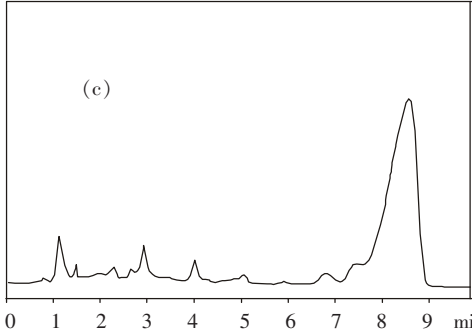
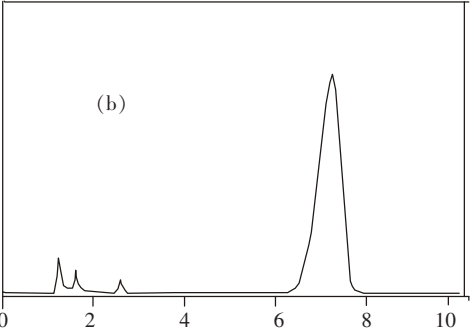
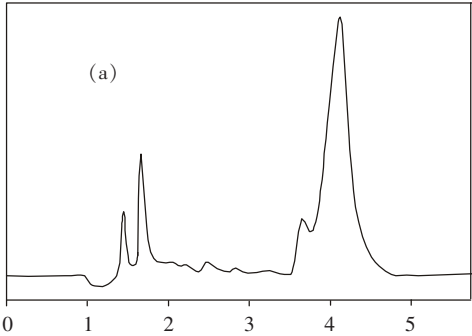
2.3 准确度的测定

方法的准确度采用加标回收率^[9]来表示。向溶液中分别加入不同量的丁草胺储备液,配成添加浓度分别为 0.5、1、2、10、15、20 mg·L⁻¹ 的丁草胺溶液,在相同测试条件下进行测试,每份溶液重复测定 3 次,由峰面积和标准曲线求出丁草胺的浓度,计算各实测平均值及回收率。试验和计算结果如表 2 所示。丁草胺的回收率在 94.13%~103.16%之间,平均回收率为 99.58%,表明该方法准确可靠。

2.4 线性相关性测定

以甲醇为溶剂将丁草胺配成 1 g·L⁻¹ 标准储备液,用二次蒸馏水稀释丁草胺储备液制成一系列不同浓度的丁草胺标准溶液:1、2、5、8、10、15、20 mg·L⁻¹。

在选定的色谱条件下,待仪器稳定后,测定一系列标准溶液,绘出标准曲线,见图 3。该条件下丁草胺的保留时间为 6.3 min,在整个范围内线性相关性良好。当丁草胺浓度低时,峰面积与浓度之间的线性关系并不很好,浓度低于 0.5 mg·L⁻¹ 时已发生了偏移,表明超出了仪器的线性范围。所以本方法的最小检出浓度为 0.5 mg·L⁻¹,最小检知量为 5×10⁻⁹ g。对丁草胺



a.纯乙腈;b.乙腈/水(V/V)8:2;c. 乙腈/水(V/V)6:4

图 2 不同流动相时丁草胺的液相色谱图

Figure 2 HPLC diagrams of butachlor using different mobile phase

浓度进行分析测定的线性范围在 0.5 mg·L⁻¹ 以上,在线性范围内进行回归分析,得出其回归方程为

$$y=7\,530.4x+18\,142 \quad r^2=0.999$$

式中: y 为丁草胺的峰面积, x 为丁草胺的浓度。根据线性范围可知本方法适用于溶液中丁草胺浓度较高时的测定,当丁草胺浓度低于 0.5 mg·L⁻¹ 时,测定结果误差较大,可先浓缩后再进行高效液相测定。

2.5 微生物降解试验

表 1 方法精密度测定结果

Table1 Reproducibility results of the analysis method

分析样	6 次测定结果/mg · L ⁻¹			平均值/mg · L ⁻¹	标准偏差	变异系数(%)
丁草胺	15.13	14.86	14.85	15.03	0.16	1.24
	14.97	15.12	15.23			

表 2 方法准确度测定结果

Table 2 Accuracy results of the analysis method with fortified samples

添加量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	实测平均值 $\text{X}/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	回收率/%
0.5	0.52	103.16
1	0.98	98.22
2	1.88	94.13
10	10.08	100.83
15	15.10	100.65
20	20.10	100.50

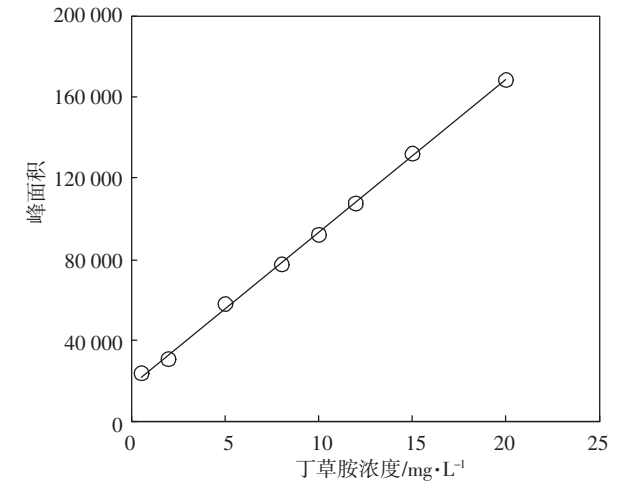


图 3 丁草胺浓度和峰面积的关系

Figure 3 Relation between concentrations of butachlor and peak areas

2.5.1 丁草胺残留量分析

从图 4 可以看出，丁草胺在灭菌水中降解缓慢，10 d 后丁草胺的降解率为 30%左右，而未灭菌水中丁草胺的降解速度明显比灭菌水中的快。这是因为未灭菌水中含有微生物，而微生物是环境中农药降解的主要原因^[10]，所以未灭菌水中丁草胺的降解速率较快，10 d 后的降解率为 70%左右。在接种了本实验室自行分离出的高效降解菌后，丁草胺的降解率明显加快，10 d 后降解率可到达 95%以上。说明分离出的降解菌能在短期内有效降解丁草胺。

2.5.2 微生物降解产物分析

提取丁草胺微生物降解实验过程中的反应液进液相色谱，采用上述方法进行检测，检测结果如图 5 所示。从图中可以看出，反应后，丁草胺的吸收峰明显降低，而且出现了 2、3 两种降解产物峰，这说明本文建立的方法不仅可以用来检测丁草胺，而且能够初步检测丁草胺的降解产物。根据出峰时间还可以初步判断出，降解产物的极性要比丁草胺强，但不能确定降解产物的成分。要分析丁草胺微生物降解产物的成

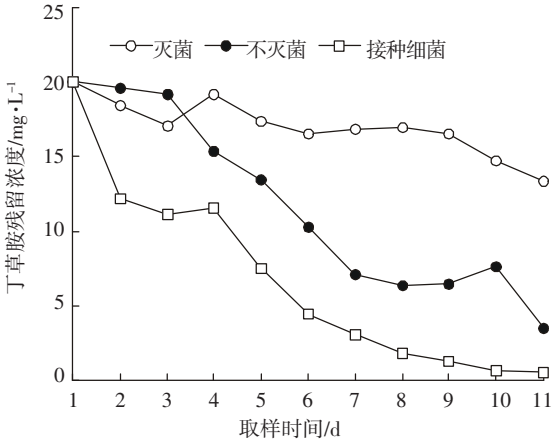


图 4 水溶液中丁草胺残留量变化

Figure 4 Variation of butachlor residues in water

分,还需要通过色质联机进行鉴定。

2.5.3 色质联机结果

气质联机的检测条件为：色谱柱:DB-5,30 m×0.25 μm；进样口温度:250 ℃；柱温:100 ℃保持 1

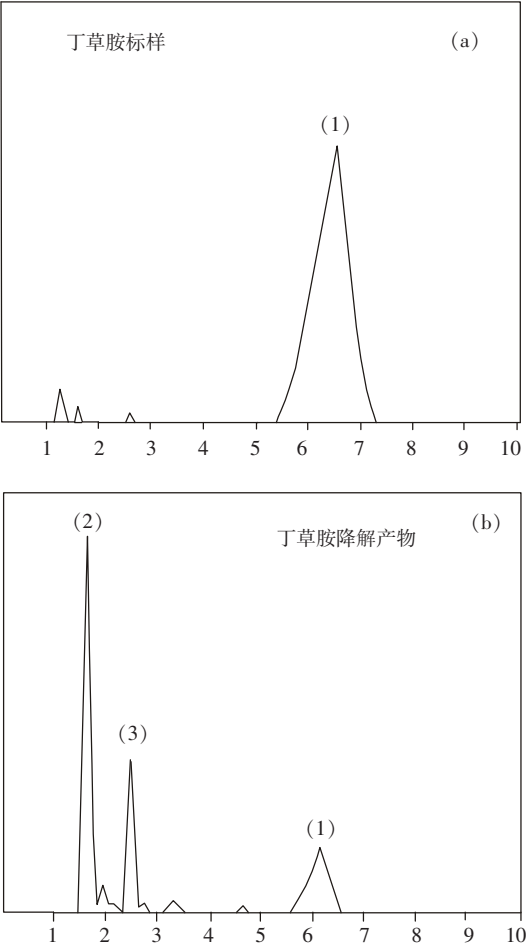


图 5 丁草胺降解产物的 HPLC 结果

Figure 5 HPLC diagrams for biodegradation products of butachlor

min,以 $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速率程序升温至 $300\text{ }^{\circ}\text{C}$,保持 1 min ;GS/MS 接口温度: $300\text{ }^{\circ}\text{C}$;检测室温度: $200\text{ }^{\circ}\text{C}$;电离方式:EI;电子能量: 70 eV ;载气:99.999% 的 He, $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。质谱:全扫描,EI 33–600 amu。

图6是丁草胺及其降解产物的总离子流图和质谱图。

由丁草胺降解前后的总离子流图可以看出,降解后的总离子流图上出现了多处产物峰,说明丁草胺微生物降解会产生多种产物。其中 12.93 min 和 17.37 min 的产物最明显,经质谱分析可知, 12.93 min 的峰是丁草胺主要的一种降解产物,分子结构式如图所示,这与文献报道相符^[11]。而 17.37 min 的峰是一种微生物代谢产物。其他峰值由于所用谱库有限,未能鉴定出是何种产物。

3 结论

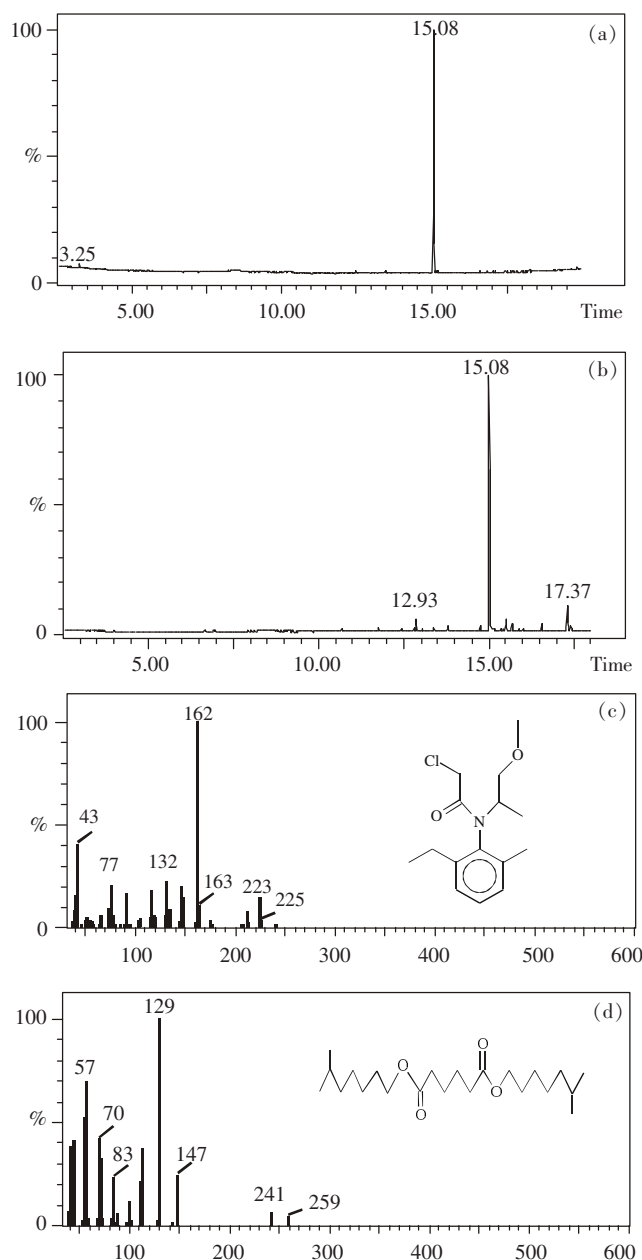
(1)无论从方法的精密度还是准确度均可看出,采用高效液相色谱定量检测丁草胺方法的重现性和准确度都能满足要求,并且操作简单,是分析水溶液中丁草胺的较为理想的方法。在选定的色谱条件下,不仅能够准确分析丁草胺的含量,还能对丁草胺的水解产物进行初步的鉴定。

(2)未灭菌水中丁草胺的降解速度明显比灭菌水中的快,这是由于未灭菌水中含有微生物,而微生物是环境中丁草胺降解的主要原因。分离出的降解菌能在短期内有效降解丁草胺。

(3)将反应后丁草胺溶液用二氯甲烷萃取后进行色谱联机分析,只鉴定出一种丁草胺微生物降解产物和一种微生物代谢产物。

参考文献:

- [1] 唐除痴. 农药化学[M]. 天津:南开大学出版社,1998.
- [2] ZBG2504–1989,中华人民共和国专业标准.丁草胺乳油[S].
- [3] 安 琼,骆永明. 水田土壤中除草剂丁草胺残留的测试方法及其应用[J].土壤,2000(2).
- [4] Bushra A, Farah M A, Ali M N, et al. Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor[J].*Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2002, 518(2):135–144.
- [5] 虞云龙,杨基峰,等.作物种类对根际土壤中丁草胺降解的影响[J].农药学报,2004,6(1):46–52.
- [6] Zheng H, Ye C. Photodegradation of acetochlor and butachlor in waters containing humic acid and inorganic ion[J]. *Bull Environmental contamination and toxicology*, 2001(67):601–608.
- [7] 石国荣,刘惠言,姜辉霞,刘祥华. 高效液相色谱法分析复配除草剂中苄嘧磺隆和丁草胺[J]. 精细化工中间体, 2003,33(1).



(a) 丁草胺标样总离子流图; (b) 丁草胺微生物降解后总离子流图; (c) 12.93 min 时产物的质谱图; (d) 17.37 min 时产物的质谱图

图6 丁草胺及其降解产物的总离子流图和质谱图

Figure 6 TIC chromatograms and mass spectrums of butachlor and its biodegradation products

- [8] 赵淑莉. 环境样品中苯胺类化合物的分析方法研究[D]. 北京:中国科学院生态研究中心博士学位论文, 1998.
- [9] 盛 骤,解式千,潘承毅. 概率论与数理统计[M]. 北京:高等教育出版社, 1989.
- [10] Guy Soulas, Bernard Lagacherie. Modelling of microbial degradation of pesticides in soils[J]. *Biol Fertil Soils*, 2001, 33:551–557.
- [11] Y L Yu a, Y M Luo c. Rapid degradation of butachlor in wheat rhizosphere soil[J]. *Chemosphere*, 2003, 50: 771–774.