

学校编码：10384 分类号：_____ 密级：_____

学号： B9834005 UDC：_____

学 位 论 文

水样中痕量有机磷农药残留的酶抑制法测定和膜萃取法 富集的研究及其应用

许 鹏 翔

指导教师姓名 袁东星 教授

申请学位级别 博士 专业名称 环境科学

论文提交日期 2001.6 论文答辩日期 2001.7

学位授予单位和日期 厦门大学

答辩委员会主席 杨芑原 教授

评阅人 黄国兰 教授

贾金平 教授

张展霞 教授

杨芑原 教授

许昆灿 研究员

2001 年 7 月

ENZYME INHIBITION AND MEMBRANE EXTRACTION
APPLIED IN ANALYSIS OF ORGANOPHOSPHORUS
PESTICIDE RESIDUES IN WATER SAMPLES

A Dissertation Presented

By

XU Pengxiang

Supervisor: Prof. YUAN Dongxing

Submitted to the Graduate College of Xiamen University for the

Degree of

DOCTOR OF PHILOSOPHY

July, 2001

Environmental Science Research Center, Xiamen University

目录

摘要	I
Abstract	III
第 1 章 引言	1
1.1 农药	1
1.1.1 农药的分类	1
1.1.2 农药在农业生产中的地位和作用	2
1.1.3 农药残留检测的必要性	3
1.2 有机磷农药	4
1.2.1 有机磷农药的生产和使用情况	5
1.2.2 有机磷农药的危害	5
第 1 章 参考文献	7
第 2 章 环境水样中残留有机磷农药的检测	8
2.1 环境水样中有机磷农药残留的预处理	8
2.1.1 液液萃取	8
2.1.2 固相萃取	9
2.1.3 固相微萃取	10
2.2 环境水样中有机磷农药残留的分析测定	11
2.2.1 理化分析测定法	11
2.2.2 生物测定法	15
2.3 本研究课题的提出	19
第 2 章 参考文献	20
第 3 章 植物水解酶的制备及其在有机磷农药检测中的应用研究	26
3.1 实验部分	27

3.1.1 主要仪器、试剂和材料	27
3.1.2 实验方法	27
3.2 结果与讨论	29
3.2.1 植物水解酶和 2,6-二氯乙酰肼酚的反应体系	29
3.2.2 植物水解酶和乙酸-β-萘酯/固蓝 B 盐的反应体系	33
3.2.3 两种检测体系的比较	39
3.2.4 水样中有机磷农药残留的测定	39
3.3 本章小结	42
第 3 章 参考文献	43
第 4 章 水样中痕量有机磷农药残留的膜萃取-气相色谱测定	44
4.1 实验部分	44
4.1.1 主要仪器、试剂和材料	44
4.1.2 实验方法	45
4.2 结果与讨论	46
4.2.1 萃取膜的萃取容量	46
4.2.2 萃取膜的萃取效果	48
4.2.3 水样的酶膜萃取-气相色谱法分析	52
4.2.4 萃取机理初探	53
4.3 本章小结	55
第 4 章 参考文献	56
第 5 章 福建 S 河水体中总磷、活性磷和有机磷农药中间体的监测	57
5.1 实验部分	57
5.1.1 主要仪器、试剂和材料	57
5.1.2 样品的采集	58
5.1.3 实验方法	61
5.2 结果与讨论	62

5.2.1 水样分析	62
5.2.2 数据结果	63
5.2.3 三甲酯和精胺含量	65
5.2.4 总磷、活性磷和有机磷的分析	67
5.3 关于 S 河中有机磷农药污染的结论	71
5.4 本章小结	72
第 5 章 参考文献	73
结束语	74
攻读博士学位期间已发表、待发表及交流的论文	76
致谢	78

摘 要

加强环境水体中痕量有机磷农药残留的监测,对于保护生态环境,保障人类健康,避免和减少不必要的生命财产损失等,具有重要的理论和实践意义。液液萃取是水样预处理的传统方法。近年来又有固相萃取和固相微萃取法,使水样的预处理大大简化。生物测定法中的酶抑制法高效、灵敏,但由于酶的保存条件苛刻,使其应用受到一定的限制。作为一般仲裁方法或标准方法的气相色谱法灵敏、准确,成为最主要的分析方法。结合各种方法的优点,发展更灵敏更实用的技术,是研究者的目标。

本论文共五章,研究了环境水样中痕量有机磷农药残留的检测新方法,揉合了酶抑制法、膜萃取法和气相色谱法,并应用于真实河水样中有机磷农药中间体的监测。各章包含以下主要内容:

第 1 章简要介绍了农药的分类,农药在农业生产中的地位和作用以及农药检测的必要性。也介绍了有机磷农药的生产和使用情况,并对有机磷农药的危害进行了阐述。

第 2 章就环境水样中有机磷农药残留的检测方法进展进行了综述。检测过程可分为样品的预处理和分析测定两个部分。介绍了传统的液液萃取法以及固相萃取和固相微萃取等样品预处理技术,以及理化分析测定法和生物测定法等有机磷农药残留的分析方法。

第 3 章对几种不同来源的植物水解酶进行了筛选,并对酶的制备条件进行了优化。选定精面粉作为植物水解酶的来源,采用纯净水萃取,不仅操作简单,而且所获得的植物水解酶活性高。建立了植物水解酶—乙酸- β -萘酯/固蓝 B 盐反应体系测定水样中痕量有机磷农药的方法,该方法操作简单,检测限低,具有较好的实用价值。

第 4 章根据固相萃取的基本原理,把植物酶和具有不同化学吸附能力的几种化合物涂渍在滤膜上,制成各种萃取膜。对萃取膜的性能进行了比较,对萃取机理进行了讨论。分别采用这些萃取膜对水样中的有机磷农药和农药中间体残留进行萃取富集,然后用气相色谱-火焰光度检测器进行分析检测。方法十分简便,灵敏度和选择性均高,有望在水体中痕量有机磷农药残留的检测中得到应用。

第 5 章对临近某农药厂的某河流进行监测。选取农药厂生产有机磷农药时专用的中间体化合物三甲酯和精胺作为指示化合物，并同时监测总磷和活性磷。所建立的戊二醛膜萃取—气相色谱法分析测定有机磷农药及中间体的方法实用可行，具有简单方便、成本低，灵敏度高、回收率好、可靠性强等优点。分析结果与农药厂的生产情况和排污情况等相吻合，证明所建立的方法实用可行。

本研究的创新之处，在于萃取膜的制作。基于固相萃取的原理，将酶和其它化学吸附剂与滤膜结合起来，制成萃取膜，有效地提高了样品预处理的效率和选择性，同时有效地降低了样品预处理的耗时和成本，尽量避免样品预处理过程中所使用的毒性有机溶剂对环境的污染。

本研究的另一特色，是将所建立的方法应用于整个实际监测计划，而不仅仅是取几个实际样品作为验证。应用国际通用的数据质量控制法，确保数据的可靠性。实践表明所建立的分析方法实用可行。

关键词： 有机磷农药，植物水解酶，膜萃取，气相色谱

Abstract

Organophosphorus pesticide (OP) is a kind of pesticides that has high production and widely use in the world. The invention and uses of OP have brought notable economic benefits to the farming, at the same time some deleterious effects on human beings. Strengthen the monitoring of OP residues in environmental water samples has great significance. Liquid-liquid extraction (LLE) is the traditional pretreatment for water samples. The use of solid-phase extraction (SPE) and solid-phase micro extraction (SPME) has greatly simplified the processing. Determine of OP residues with enzyme is efficient and sensitive. Gas chromatography has the advantages of being simple, fast, sensitive and accurate, becoming the major technique of OP residues analysis. More studies are carrying out to seek more practical analytical methods.

This dissertation develops the determination method of trace OP residues in water samples, including enzyme inhibition and membrane extraction. The established technique has been applied to the monitoring of OP midbodies in river water samples. The main contents are summarized as the following:

In the 1st chapter, the classification and the determination essence of pesticide, the status and the role of pesticide in farming production were briefly introduced.

The development of determination methods for OP residues in water samples was reviewed in the 2nd chapter. The pretreatment methods such as LLE, SPE and SPME, the analytical methods of physicochemistry and biology were also summarized.

The plant hydrolyzed-enzyme that extracted form different materials was selected and the preparation conditions were optimized in the 3rd chapter. It was found that the enzyme extracted form refined wheat flour with pure water had high activity. The proposed analytical method with plant hydrolyzed-enzyme-naphthyl acetate/fast blue B salt had the advantages of simple operation and low detection limit.

In the 4th chapter, the membranes that coated with plant hydrolyzed-enzyme or other chemical compounds were prepared for the extraction of trace OP and their midbodies in water. The extracted OP was analyzed with gas chromatography-pulsed flame photometric detector (GC-PFPD). The suggested method was highly sensitive, selective, cheap and reliable, and prospective in determining trace OP in environmental waters.

A survey study was carried out in the 5th chapter. OP midbodies, trimethyl ester and spermine, were chosen as indicator compounds. The parameters such as total phosphorus and dissolved inorganic phosphorus were also monitored. The results showed that the established technique was practical, feasible and reliable.

The innovation of the study is the preparing of extraction membranes. Combining plant hydrolyzed-enzyme or other chemical compounds with filter membrane has greatly improved the efficiency and selectivity of sample pretreatment, reduced the time and cost of sample pretreatment, and prevented the pollution of toxic organic solvent.

Applying the established technique throughout the survey of a river water, but not just several real water samples, is another feature of the study. Data quality control method was used to guarantee the data reliability. Results show that the established method is practical and feasible.

Key words :

Organophosphorus pesticide, Plant hydrolyzed-enzyme, Membrane extraction, Gas chromatography

第1章 引言

1.1 农药

农药是用来保护农作物、防治病虫害、消除杂草、消灭动物体内外寄生虫和调节植物生长的药剂。与其它方法相比，利用农药进行化学防治的特点是：作用快速，能及时控制有害生物的发展和蔓延；农药品种剂型多，可根据不同防治对象择优选用，作到对症施药，防治效果好；可采用高效率的喷撒机具，对大面积发生的病虫害实施歼灭性的防治。由于化学防治方法的快速、灵活、高效，故受到农民的欢迎，成为防治农作物病虫害的最重要的手段。我国农作物病虫害防治中，化学防治占90%以上。

1.1.1 农药的分类

目前国际市场上，按有效成分种类计，农药有2000种左右，大量商品化的约500余种。从防治对象来说，农药主要可分为七大类。

1. 杀虫剂 用于防治有害昆虫的农药称为杀虫剂。它是各类农药中使用最早、最广泛的一类。20世纪70年代之前，它的使用量一直处于各类农药之首。其后由于除草剂的兴起及其在发达国家的大量使用，杀虫剂才在世界农药的总销售额中退居第二位。有机磷杀虫剂，是我国产量最大的一类农药，约占我国全部农药产量的一半左右。这类杀虫剂几乎都是具有神经毒性作用的触杀剂，其中有许多属于高毒药剂，农药急性中毒事故大多数与有机磷农药有关。

2. 杀螨剂 用于防治蜱螨类有害生物的农药，称为杀螨剂。在农业上为害严重的蜱螨类有数十种之多，它们个体小、繁殖快，有独特的形态结果和生活习性，防治十分困难。一个好的杀螨剂应当符合以下要求：杀螨力强，对成螨、若螨和卵都有效；残效期长；对人畜低毒，对植物安全，对益虫和螨类天敌无害；化学性质稳定，不易分解，可与其它农药混用，兼治虫害和病害。因此理想的杀螨剂的开发比较困难。

3. 杀菌剂 用于防治真菌和细菌性病害的农药称为杀菌剂。虽然人类很早

就对病原菌的防治方法进行了研究，但真正认识病原菌是在巴斯德建立微生物概念后才开始的。杀菌剂对高等动物和人畜的毒性一般都比较低，对人畜的神经系统危害极小。杀菌剂的开发大体上经历了无机杀菌剂、有机保护性杀菌剂和内吸杀菌剂三个历史阶段。

4. 杀线虫剂 用于防治危害植物根部线虫的农药。植物线虫以各种形式出现在几乎所有的农作物上，对农作物的产量及质量均有影响，危害性大。在农药中，杀线虫剂的历史是比较短的，但日益受到重视，发展也很快。

5. 除草剂 用于防除农田杂草的农药。这是种类很多的一类农药，绝大部分属于低毒农药。杂草是人们非有意识栽培的植物，农田杂草是农田中作物以外的非栽培植物。杂草每年使世界农业减产 10% 左右，占病虫草害的 42%。采用除草剂的化学防治，不但具有省工、省力、高效、增产增收等直接经济效益，而且可以大大解放农业劳动力。

6. 杀鼠剂 鼠类危害是世界性的灾害。鼠类不仅传播疾病、危害人体健康，而且糟蹋粮食，造成农作物减产。据统计，全世界每年生产的粮食约有 20% 被鼠类夺走。用杀鼠剂控制鼠害方法简便、效果显著、成本低廉，因而易被群众接受，使用非常广泛。但杀鼠剂这类药剂对人畜都是很危险的，必须高度重视其安全使用问题。

7. 植物生长调节剂 为了控制植物生长，人们模拟植物激素的分子结构合成了具有类似天然植物激素活性的物质，这些人工合成的化学物质称为植物生长调节剂。植物生长调节剂一般具有促进或抑制生长的效应。

1.1.2 农药在农业生产中的地位和作用

据统计，世界农作物的病虫草害，每年使粮食减产 50%（华小梅，1996）。表 1-1 给出了世界粮食产量因病、虫、草害损失的估计数据。农药在防治病虫草害，保证农作物高产稳产方面起着十分重要的作用。如不施用农药，因受病、虫、草害的影响，人均粮食将损失 1/3。停止使用杀菌剂，作物的损失将增加 3%；如果不使用除草剂，作物损失将增加 1%。使用农药带来的收益大体上为农药费用的 4 倍。据美国估计，不使用农药，作物损失达 100 亿美元，

使用农药的费用大约是 25 亿美元，即农药投入 1 美元，可回收 4 美元。大量事实表明，农药的作用是不容置疑的。从不使用农药的自然农业发展到使用农药的现代农业，农药作出了积极的贡献。

表 1-1 世界粮食产量因病、虫、草害损失的估计 (%)

Tab.1-1 The loss of food caused by diseases, insects and weeds (%)

作物	虫害损失	病害损失	草害损失	累计
水稻	27.5	9.0	10.6	47.1
玉米	13.0	9.6	13.1	35.7
小麦	5.0	9.5	9.8	24.4
其它谷类作物	6.2	8.8	12.4	27.4
马铃薯	6.0	22.2	4.1	32.3

我国是一个有 12 亿多人口的农业大国，要养活我国众多的人口，就需要大量的粮食。而我国人均耕地面积仅有 1.1 亩。由此可见，要解决我国的粮食问题，必须提高单位面积产量。这除了进一步改进栽培技术、改良品种等以外，使用农药自然是一个主要的手段。总之，当今世界的农业离不开农药，可以预见，农药将会得到更大的发展。

1.1.3 农药残留检测的必要性

农药的使用是农业生产上的一次飞跃，但任何事物都有其两面性，农药的使用也带来了许多环境问题。由于农药是一类有毒化学物质，而且是人们主动投加到环境当中的，长期大量使用，对土壤、大气和水体将造成污染，对环境生物安全和人体健康亦将产生较大的不利影响。因此，农药残留问题是人们极为关注的。

1. 农药残留

农药残留是指由于喷施农药后存留在环境和食品、饲料中的农药及其降解代谢产物、杂质，也包括环境背景中原有农药的残留。当无限制和无知地使用农药时，更容易产生高农药残留量。一般来说农药残留量是指农药母体物及其代谢物残留量的总和。农药残留时间的长短、残留数量的大小和残留物毒性的

高低，决定了它们对人类和环境的危害程度。

2. 农药对环境的污染

所谓农药环境污染，是指由于人类活动直接或间接地向环境中排入了超过其自净能力的农药，从而使环境的质量降低，以至影响人类及其他环境生物安全的现象。农药对生态环境的危害影响首先表现在它对环境介质的污染。

土壤是农药在环境中的“贮藏库”与“集散地”，施入农田的农药大部分残留于土壤环境介质中。研究表明，使用的农药的 80%~90% 将最终进入土壤。残留在土壤中的农药可被作物吸收，进入土壤的农药能杀害某些土壤微生物和土壤生物，破坏土壤的生态环境。

农药可从土壤、水及植物表面挥发逸失，进入大气中，也可由农药生产、加工企业的废气排放直接进入大气。大气中的残留农药将随着大气的运动而扩散，使大气污染的范围不断扩大，甚至扩散至全球。大气中残留农药的浓度虽然很低，但由于其影响范围很广，并且随着降水又进入土壤和水体，因此也不容忽视。

农田施药后，由于地表水的流动、降水或灌溉使得农药进入水体；农药生产、加工企业废水的排放等也是农药进入水体、对水体造成污染的来源。目前在地球的地表水域中，基本上已找不到干净的、未受农药污染的水体了。除地表水体以外，地下水源也普遍受到了农药的污染。农药对于饮用水以及饮用水源的污染，对人体健康构成重大威胁，已经受到人们的极大关注。

1.2 有机磷农药

有机磷农药是 20 世纪 30 年代末问世的第二代人工合成农药（颜世伟，1990），德国 G.Schradev 公司首先合成了有机磷杀虫剂（张一宾，1999）。几十年来，由于此类农药相对而言具有药效高、使用方便、多数具内吸作用、易在自然条件下降解等特点，从品种与产量均成为各类农药及杀虫剂之首。在杀菌剂、除草剂、植物生长调节剂等其他农药种类中也涌现了不少有机磷产品。

1.2.1 有机磷农药的生产和使用情况

至 20 世纪 50、60 年代，有机磷农药已在世界范围内广泛推广，成为世界

上生产和使用最多的农药品种。目前，世界上有机磷农药商品已达上百种，特别在杀虫剂方面，有机磷类长年来鳌居榜首。1991年世界有机磷杀虫剂的销售额为33.71亿美元，占杀虫剂的39%；1996年，有机磷杀虫剂的销售额为33.05亿美元，占杀虫剂的37.8%。估计2001年，有机磷杀虫剂的销售额亦可达30.5亿美元，占杀虫剂的34.7%。可见，有机磷农药在世界农药中具有举足轻重的地位。

我国从1956年开始研制生产有机磷农药，现已能生产出40多个品种以供应国内市场，已成为世界农药生产大国之一（钱莹，1997）。自1982年六六六、DDT相继停产、限用、禁用后，有机磷农药的比重就更为突出。1986至1989年，我国农药产量从 $1.346 \times 10^5 \text{t}$ 增加到 $2.062 \times 10^5 \text{t}$ 。1989年有机磷农药的使用量达 $1.103 \times 10^5 \text{t}$ ，占当年农药总用量的52.8%，占当年杀虫剂农药总用量的77.0%以上（李忠成，1994）。除敌敌畏、敌百虫、乐果、氧化乐果、对硫磷、甲基对硫磷等用量仍然较大外，近年来用量有较大增长的品种是甲胺磷。1997年，按化工部统计，农业用农药的总产量为 $3.57 \times 10^5 \text{t}$ ，其中有机磷农药为 $2.0 \times 10^5 \text{t}$ 左右，约占农药的57%；而有机磷杀虫剂约为 $1.7 \times 10^5 \text{t}$ ，占农药的50%左右，占杀虫剂的70%以上。在年生产量一万吨以上的四个农药品种中，有机磷占了三席，分别是敌敌畏、乐果和甲胺磷（潘元海，1999）。

1.2.2 有机磷农药的危害

有机磷农药的发明和广泛应用，一方面给农业带来显著的经济效益，如粮食亩产量的大大提高，另一方面也给人们的生活带来了一些副作用，甚至危害人类的健康和生命安全。

尽管有机磷农药属非持久性农药，但其大量使用必然会对环境产生负面影响，对人、畜构成威胁，在某些环境条件下也会有较长的残存期并在动物体内产生蓄积作用。

我国近十年来发生的农药中毒事故大多数为高毒有机磷农药引起，其中以对硫磷最多，部分地区占80%左右。另外，粮食、蔬菜中有机磷农药污染也较为严重。如1982~1989年农业部在全国六省市进行的粮食农药调查中，江苏省

武进县九个稻谷样品中全部检出甲胺磷。蔬菜中农药污染以有机磷农药甲胺磷、乐果、敌敌畏、甲基对硫磷为主。影响极坏的 1988 年 10 月香港市民因食用被甲胺磷污染了的菜心而发生的中毒事故是典型代表（单正军，1997）。

有机磷农药对水的污染，尤其是对饮用水以及饮用水源的污染，对人体健康威胁很大，是国内外有关领域极为关注的课题。农药一旦进入地下水，则极难降解，净化也就相当困难。美国已设立专门机构对农药地下水污染问题进行检测。而欧共体早在 1980 年布鲁塞尔会议上就通过了水中农药残留标准。因此，分析检测能否给出可靠数据是确认水体农药污染程度的关键。建立一种水体中痕量有机磷农药残留检测的灵敏、快速、可靠的分析方法已是势在必行。

第 1 章 参考文献

单正军，朱忠林，华小梅，环境保护，1997，7:40

华小梅，单正军，环境科学进展，1996，4(2):33

李忠成, 农药, 1994, 33(1):2

潘元海, 魏爱雪, 赵国栋, 温美娟, 蒋可, 环境科学进展, 1999, 7(1):32

钱莹, 苏小川, 广西科学院学报, 1997, 13(2):22

颜世伟, 农药, 1990, 1:47

张一宾, 孙晶, 农药, 1999, 38(7):1

厦门大学博硕士论文摘要库

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库