

# 有机磷农药多残留检测化学发光标记物的合成及鉴定

刘涛<sup>1</sup>, 孟超<sup>1</sup>, 姚鑫<sup>1</sup>, 李景娜<sup>1</sup>, 程燕<sup>1</sup>, 刘晓宇<sup>1,2\*</sup>

(1. 华中农业大学食品科技学院, 武汉 430070; 2. 环境食品学教育部重点实验室, 武汉 430070)

**摘要:** 目的 以 *O,O*-二乙基硫代磷酰氯和鲁米诺为原料, 合成一种新型的化学发光标记物, 用于后续的二乙氧基类有机磷农药多残留化学发光免疫法检测。方法 取鲁米诺和 *O,O*-二乙基硫代磷酰氯溶于二氯甲烷中, 以三乙胺作为缚酸剂, 冰浴下反应 8 h 后分出有机层, 产物经柱层析纯化, 即得到化学发光标记物。结果 产物经紫外、红外鉴定, 实验结果表明反应产物即为所需的化学发光标记物, 产物在 BPCL 上进行发光特性测定, 表现出较强的发光能力, 最大发光强度达到 9000 mV。结论 本方法合成的化学发光标记物具有较强的发光能力, 能用于后续的二乙氧基类有机磷农药多残留的化学发光免疫检测。

**关键词:** *O,O*-二乙基硫代磷酰氯; 鲁米诺; 化学发光标记物; 鉴定

## Synthesis and identification of chemiluminescent markers used in the multi-residue determination of organophosphorus pesticides

LIU Tao<sup>1</sup>, MENG Chao<sup>1</sup>, YAO Xin<sup>1</sup>, LI Jing-Na<sup>1</sup>, CHENG Yan<sup>1</sup>, LIU Xiao-Yu<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. Key laboratory of Environment Correlative Dietology, Ministry of Education, Wuhan 430070, China)

**ABSTRACT: Objective** Chemiluminescent markers were synthesized using *O,O*-diethylthiophosphoryl chloride and luminol for the multi-residue determination of organophosphorus pesticides. **Methods** Luminol and *O, O*-diethyl phosphoryl chloride were added to dichloromethane under ice-cooling with triethylamine as acid binding agent. After 8 h, the organic layer was separated and purified by column chromatography. **Results** The product was the chemiluminescent markers after indentation using UV and IR. It had a strong luminescent ability on the BPCL, and the maximum luminous intensity reached 9000 mV. **Conclusion** The chemiluminescent markers synthesized by this method had a strong luminescence capability, and it could be used in the multi-residue determination of organophosphorus pesticides.

**KEY WORDS:** *O,O*-diethylthiophosphoryl chloride; luminol; chemiluminescent markers; identification

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171694)、湖北省研究与开发计划项目(2010BBB022)、中央高校基本科研业务费专项(2011PY094)、华中农业大学国家级大学生创新创业训练计划项目(20130504035)

**Fund:** Supported by the National Natural Science Foundation of China(31171694), Project of Research and Development of Hubei Province of China(2010BBB022), Fundamental Research Funds for the Central Universities(2011PY094)and National Undergraduate Training Programs for Innovation and Entrepreneurship of Huazhong Agricultural University(20130504035)

\*通讯作者: 刘晓宇, 博士, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为食品安全与农业资源综合利用。E-mail: liuxiaoyu@mail.hzau.edu.cn

\*Corresponding author: LIU Xiao-Yu, Professor, College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China. E-mail: liuxiaoyu@mail.hzau.edu.cn

## 1 引言

有机磷农药产生于二十世纪 30 年代, 由于具有高效、广谱、低毒、经济等特点, 被广泛应用于农业生产中<sup>[1-3]</sup>。但给农业带来经济效益的同时, 其在环境中的残留问题也越来越严重, 引起的食品中毒事件时有发生, 造成了巨大的经济损失。目前, 对于有机磷农药的检测方法主要有高效液相色谱法(high performance liquid chromatography)<sup>[4]</sup>、气相色谱法(gas chromatography)<sup>[5]</sup>以及气相色谱-质谱(gas chromatograph-mass spectrometer-computer)等。虽然这些方法的灵敏度和可靠性都较高, 但这些方法不仅需要昂贵的仪器, 还需要专业的操作人员, 分析费用较高; 再加上有机磷农药品种繁多且复配使用现象严重, 分解产物复杂多样, 有机磷农药单残留检测已经不能满足现场快速检测的要求<sup>[6-8]</sup>。

1977 年, Halmann 等<sup>[9]</sup>将高特异性的抗原抗体反应与高灵敏度的化学发光反应结合起来, 创建了化学发光免疫分析方法(chemiluminescent immunoassay, CLIA)。相比于气相、液相等经典检测分析方法, 化学发光免疫分析法具有专一性强, 分析速度快, 准确度高, 操作系统简单, 成本较低, 在连续使用时所需要费用较低等优点<sup>[10,11]</sup>。由于免疫分析法的引入, 化学发光免疫分析法能特异性地识别具有相同抗原决定簇的一类农药, 适用于农药的多残留检测分析, 在现场快速检测中具有良好的市场前景。

为了建立二乙氧基类有机磷农药的多残留化学发光免疫分析法, 本文合成了二乙氧基类有机磷农药的通用发光标记物。在免疫反应中, 此化学发光标记物和二乙氧基类有机磷原药竞争性地与抗二乙氧基类有机磷农药多克隆抗体相结合。竞争反应完全后, 分离出化学发光标记物与多克隆抗体的复合物, 反应生成的复合物的量与所加入的有机磷原药的量成一定的线性关系, 加入的原药的量越多, 反应生成的化学发光标记物与多克隆抗体复合物的量就越少。然后在 BPCL 微弱发光测量仪上检测复合物的发光强度, 发光强度由复合物的量决定, 由此原理可间接测定所加入的原药的量<sup>[12]</sup>。本文所合成的化学发光标记物具有良好的发光性能, 为二乙氧基类有机磷农药多残留化学发光免疫分析法的建立奠定了基础。

## 2 材料与方 法

### 2.1 仪器与试剂

BPCL 微弱发光测量仪(中科院生物物理研究所); UV-1700 紫外可见分光光度计(日本岛津仪器公司); NEXUS470 傅立叶红外光谱仪(美国 Nicolet 公司); DF-101S 集热式恒温加热磁粒搅拌仪(武汉科尔仪器设备有限公司); N-1000 旋转蒸发仪(上海爱郎仪器有限公司)。

*O,O*-二乙基硫代磷酰氯(美国 Sigma 公司, 99.8%); 鲁米诺(美国 Sigma 公司, 99.8%); 二氯甲烷(美国 Sigma 公司, 99.8%); 乙酸乙酯(国药集团化学试剂有限公司, 99.5%); 石油醚(国药集团化学试剂有限公司 99.5%); 三乙胺(国药集团化学试剂有限公司, 99.5%)。

### 2.2 试验方法

#### 2.2.1 化学发光标记物的合成

*O,O*-二乙基硫代磷酰氯是合成二乙氧基类有机磷农药的重要原料, *O,O*-二乙基硫代磷酰基是有机磷农药中的常见基团, 含有此基团的有毒死蜱、二嗪农、乙拌磷、对硫磷等 20 余种硫代磷酸酯类农药<sup>[13]</sup>。因此, 本实验选择 *O,O*-二乙基硫代磷酰氯为原料来合成化学发光标记物, 合成路线见图 1。

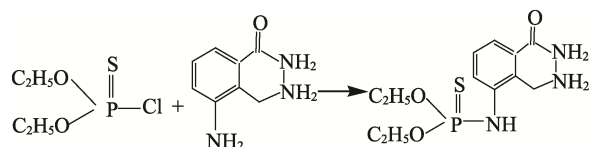


图 1 化学发光标记物的合成

Fig. 1 Synthesis of chemiluminescent markers

取鲁米诺 0.02 g(约 0.0113 mmol)溶于 20 mL 干燥的二氯甲烷中, 加入 10 mL 三乙胺, 于冰浴下, 缓慢滴入 0.0188 g(约 0.1 mmol) *O,O*-二乙基硫代磷酰氯, 自然升至室温, 搅拌 8 h, 倾入 30 mL 质量分数为 1% 的盐酸中, 分出有机层, 再用 2×20 mL 的二氯甲烷萃取水层, 合并有机相, 最后用 2×20 mL 的蒸馏水洗涤有机层, 无水硫酸钠干燥, 高真空旋蒸近干<sup>[14-16]</sup>。

#### 2.2.2 合成产物的纯化

##### 2.2.2.1 洗脱液的选择

层析液采用乙酸乙酯和石油醚体系。配置不同配

比的层析液进行薄层层析实验, 得出产物中各种物质在不同层析液中的  $R_f$  值, 从而选择最佳配比的层析液和洗脱液对产物进行分离纯化。

### 2.2.2.2 柱层析纯化

产物的纯化采用过硅胶柱层析的方法。装柱时用湿法装柱, 这样能保证硅胶柱比较结实, 而且没有气泡。取适量的 100~200 目的柱层层析硅胶, 加入干硅胶一倍体积的石油醚及五分之一体积的三乙胺, 用玻璃棒充分搅拌。选用 2×20 cm 的层析柱, 将匀浆一次倾入层析柱内, 填柱高度约为 10 cm。硅胶上方再加入 0.5 cm 左右的无水硫酸钠以保证硅胶上表面在层析过程加入层析液时保持平整。打开层析柱的阀门, 放掉上层多余的石油醚, 当石油醚液面跟无水硫酸钠上表面持平时, 关闭层析柱下方阀门。

将实验得到的粗产物溶于尽可能少的二氯甲烷中(0.3~1 mL), 沿层析柱壁缓缓加入。为保证洗脱时柱内压力稳定, 将洗脱液转移至分离漏斗中, 置于层析柱上方, 控制分离漏斗的流速, 使其等于洗脱液从层析柱内流出的流速。每 5 mL 收集一管, 共收集 60 管, 全部进行点样跑板, 合并  $R_f$  值相同的收集管并高真空旋蒸近干, 即得到纯度较高的单一产物。

### 2.2.3 产物的表征

#### 2.2.3.1 紫外表征

分别配置二乙氧基硫代磷酰氯、物质 a 和物质 b 的二氯甲烷溶液以及鲁米诺的氢氧化钠溶液, 进行 200~500 nm 波长扫描。

#### 2.2.3.2 红外表征

由于合成产物是淡黄色油状物, 所以红外表征时采用涂布法。先将产物溶于少量的二氯甲烷中, 再取少量的溶液涂布于 KBr 薄片上, 待二氯甲烷挥干后进行测定。

### 2.2.4 化学发光标记物的发光动力学测定

分别取一定量的鲁米诺溶液和化学发光标记物溶液, 用 0.01 mol/L 的碳酸盐缓冲液(pH 9.6)定容至 10 mL, 然后分别取 300  $\mu$ L 加入到测量杯中, 注入 0.5 mmol/L 的  $H_2O_2$  溶液 200  $\mu$ L, 于 BPCL 微弱发光测量仪上检测, 记录动态曲线<sup>[17]</sup>。

## 3 结果与分析

### 3.1 化学发光标记物的合成

刚开始加入鲁米诺时, 鲁米诺不溶于二氯甲烷

中, 搅拌一段时间后, 溶解性没有增强。待加入  $O,O$ -二乙基硫代磷酰氯反应一段时间后, 鲁米诺溶解, 溶液呈淡黄色。加入盐酸溶液后, 溶液立刻分层, 下层是淡黄色的油状液体。高真空旋蒸后得到淡黄色的油状产物, 由实际产物量与理论产物量之比得出产物得率为 22.3%。

### 3.2 产物的纯化

#### 3.2.1 洗脱液的选择

经初步点板反应发现产物中存在两种物质, 表 1 为产物中的两种物质在不同配比的层析液里的  $R_f$  值。分析表 1 中数据可得, 当乙酸乙酯: 石油醚=3:4 时, 两种产物的  $R_f$  值相差最大, 因此, 选择乙酸乙酯: 石油醚=3:4 为层析液。根据洗脱液的选择原则: 一般以待分离样品  $R_f$  值在 0.2~0.3 为宜<sup>[18]</sup>, 综合考虑两者的  $R_f$  值之差, 最终选择乙酸乙酯: 石油醚=1:2 为洗脱液, 对产物进行洗脱纯化。

表 1 产物中两种物质的  $R_f$  值( $n=3$ )  
Table 1  $R_f$  value of the two substances in the product ( $n=3$ )

乙酸乙酯: 石油醚	$R_{f1}$	$R_{f2}$	
4:3	0.890	0.780	0.110
6:5	0.780	0.700	0.080
1:1	0.720	0.520	0.200
5:6	0.710	0.540	0.170
3:4	0.700	0.475	0.225
1:2	0.680	0.470	0.210
1:3	0.226	0.170	0.056
1:4	0.200	0.100	0.100
2:7	0.245	0.150	0.095
4:13	0.222	0.111	0.111

#### 3.2.2 柱层析纯化结果

对收集到的 60 管洗脱液全部进行点板反应, 实验结果如下: 1~10 管无任何物质, 11~18 管为同一种物质, 记为物质 a, 22~45 管为同一种物质, 记为物质 b, 46~60 管无任何物质。分别将 11~18 管和 22~45 管合并, 并减压浓缩近干。

### 3.3 产物的表征

#### 3.3.1 紫外表征结果

分别取二乙氧基硫代磷酰氯、物质 a 和物质 b

的二氯甲烷溶液以及鲁米诺的氢氧化钠溶液进行 200~500 nm 波长扫描, 扫描结果如图 2 所示。四种物质的最大吸收峰均在 200~400 nm 之间, 物质 a 和二乙氧基硫代磷酸氯的紫外图谱基本相同, 可以初步判断物质 a 是未反应的少量的二乙基硫代磷酸氯。物质 b 出现了三个大的吸收峰, 与二乙基硫代磷酸氯相比, 其最大吸收峰向长波方向发生了移动, 这是因为分子中引入了鲁米诺中的共轭基团, 最大吸收峰发生了红移, 红移到了 235 nm 处, 属于 K 吸收带。物质 b 的另两个吸收峰出现的位置及峰形与鲁米诺基本相似, 只是发生了很小的位移, 这两个吸收峰一个在 305 nm 处, 另一个在 356 nm 处, 均属于 B 带吸收, 是由分子中引入了苯环的原因。由此可初步推断物质 b 就是二乙基硫代磷酸氯与鲁米诺的偶联产物。

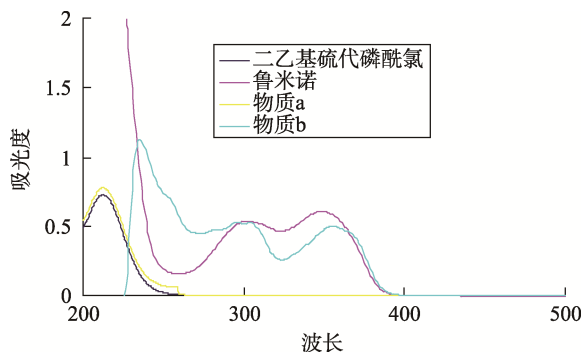


图 2 二乙氧基硫代磷酸氯、物质 a、物质 b 和鲁米诺紫外图谱

Fig. 2 UV spectrum of *O, O*-diethyl phosphoroyl chloride, substance a, substance b and luminol

### 3.3.2 红外表征结果

采用涂布法分别对二乙基硫代磷酸氯、物质 a 和物质 b 进行了红外扫描, 扫描结果如图 3、图 4、图 5 所示。图 4 为物质 a 的红外图谱, 其与二乙基硫代磷酸氯的红外图谱基本一致, 由此可进一步推出物质 a 就是二乙基硫代磷酸氯。对比物质 b 和二乙基硫代磷酸氯的红外图谱, 可发现, 两者在  $2980\text{ cm}^{-1}$  处均有一个强的吸收峰, 此吸收峰是  $\text{C}-\text{CH}_3$  的吸收峰; 物质 b 在  $1764\text{ cm}^{-1}$  处出现了一个新的强吸收峰, 这是  $\text{C}=\text{O}$  键的吸收峰;  $1601\text{ cm}^{-1}$  和  $1464\text{ cm}^{-1}$  为鲁米诺的苯环上的  $\text{C}-\text{C}$  双键骨架吸收峰;  $1034\text{ cm}^{-1}$  为  $\text{P}-\text{N}$  键的吸收峰; 在  $809\text{ cm}^{-1}$  处出现了一个较强的吸收峰, 在  $651\text{ cm}^{-1}$  处出现了一个中等强度的吸收峰,

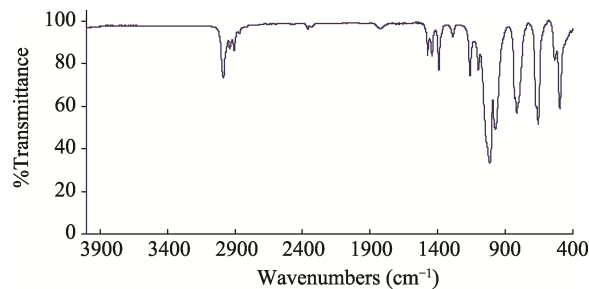


图 3 二乙基硫代磷酸氯红外图谱

Fig. 3 Infrared spectra of *O, O*-diethylthiophosphoryl chloride

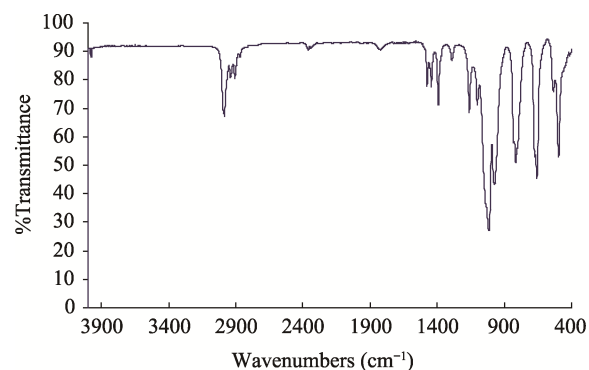


图 4 物质 a 的红外图谱

Fig. 4 Infrared spectra of substance a

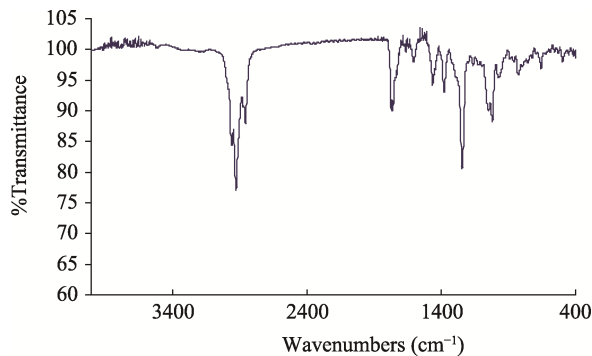


图 5 物质 b 的红外图谱

Fig. 5 Infrared spectra of substance b

这两个吸收峰是分子中引入的鲁米诺的苯环 1,2,3 取代特征吸收峰<sup>[19]</sup>。综上可得, 物质 b 即为目标产物。

### 3.4 化学发光标记物的发光动力学测定结果

图 6 为鲁米诺和合成的化学发光标记物的发光动力学曲线, 相比于鲁米诺, 化学发光标记物的发光强度有所下降, 这是因为鲁米诺上连接了新的基团, 对其发光性能有一定的影响, 使其最大发光强度降

低<sup>[11]</sup>, 但是, 此化学发光标记物仍表现出了较好的发光动力学, 最大发光强度达到 9000 mV, 可以用于后续的实验研究。

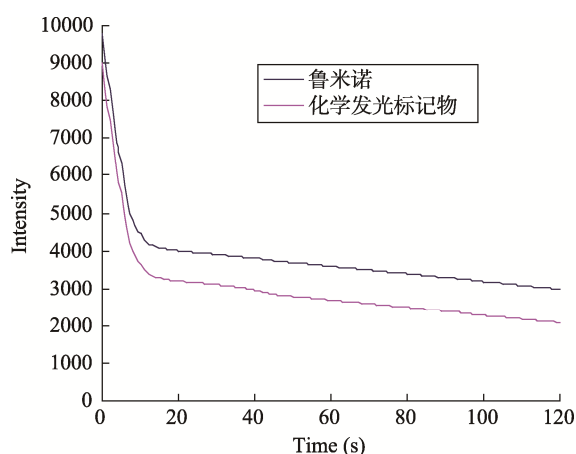


图 6 化学发光标记物和鲁米诺的发光动力学曲线

Fig. 6 Luminescence kinetics of chemiluminescent markers and luminol

## 4 结 论

本文选择二乙氧基类有机磷农药的中间合成原料 *O,O*-二乙基硫代磷酰氯作为通用半抗原, 与鲁米诺进行偶联反应, 合成化学发光标记物。本文所用的合成方法操作简单, 具有较高的产率, 合成产物经紫外、红外表征, 鉴定结果表明合成的产物即是所需的化学发光标记物, 鲁米诺成功地偶联到了 *O,O*-二乙基硫代磷酰氯上。发光动力学测定结果表明由于新基团的引入, 鲁米诺的发光能力有所下降, 但是此化学发光标记物仍表现出较好的发光动力学, 能用于后续的试验检测。

## 参考文献

- [1] 陈道勇, 杨略, 郭嘉, 等. 有机磷农药残留的分析检测及最新研究进展 [J]. 河南化工, 2011, 28(1): 7-12.  
Chen DY, Yang L, Guo J, *et al.* The latest research progress of analysis and detection of organophosphorus pesticide residues[J]. Henan Chem Ind, 2011, 28(1): 7-12.
- [2] 江英志, 谢桂勉. 有机磷农药多残留检测研究进展[J]. 安徽农业科学, 2010, (17): 9060-9061.  
Jing YZ, Xie GM. Research progress of multi-residue determination of organophosphorus pesticides[J]. J Anhui Agric Sci, 2010, (17): 9060-9061.
- [3] 祁志军, 寇立泉, 王东方, 等. 有机磷杀虫剂多残留免疫分析技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(1): 27-37.  
Qi ZJ, Kou LQ, Wang DF, *et al.* Research advance on multi-residue immunoassay of organophosphorus pesticides[J]. J Food Safe Qual, 2013, 4(1): 27-37.
- [4] Xiong J, Tang X, Zhou G, *et al.* Dispersive solid phase extraction coupled with HPLC-UV for simultaneous determination of chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in soil samples[J]. Anal Methods, 2013, 5(2): 536-540.
- [5] Hu C, He M, Chen B, *et al.* A sol-gel polydimethylsiloxane/polythiophene coated stir bar sorptive extraction combined with gas chromatography-flame photometric detection for the determination of organophosphorus pesticides in environmental water samples[J]. J Chromatogr A, 2013, 1275: 25-31.
- [6] 张燕, 杨金易, 曾道平, 等. 化学发光免疫分析技术及其在食品安全检测中的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(5): 1422-1427.  
Zhang Y, Yang JY, Zeng DP, *et al.* Research progress on chemiluminescence immunoassay technique and its application in food safety detection[J]. J Food Safe Qual, 2013, 4(5): 1422-1427.
- [7] 谢桂勉, 沈玉栋, 孙远明. 农兽药多残留免疫分析检测方法研究进展[J]. 现代农业科技, 2010, (11): 352-354.  
Xie GM, Shen YD, Sun YM. Research advance on multi-residue determination of pesticides and veterinary drugs based on immunoassay methods[J]. Food Sci, 2010, (11): 352-354.
- [8] 李永祥, 徐振林, 王弘, 等. 二甲氧基硫代磷酸酯类农药多残留免疫分析方法研究[J]. 分析化学, 2010, 38(11): 1550-1555.  
Li YX, Xu ZL, Wang H, *et al.* Development of broad-specificity immunoassay for detection of *O,O*-Dimethyl organophosphorus pesticides[J]. Chin J Anal Chem, 2010, 38(11): 1550-1555.
- [9] Halmann M, Velan B, Sery T. Rapid identification and quantitation of small numbers of microorganisms by a chemiluminescent immune reaction [J]. Appl Environ Microbiol, 1977, 34(5): 473-477.
- [10] 汪晨, 吴洁, 宗晨, 等. 化学发光免疫分析方法与应用进展[J]. 分析化学, 2012, 40(1): 3-10.  
Wang C, Wu J, Zong C, *et al.* Chemiluminescent Immunoassay and Its Application[J]. Chin J Anal Chem, 2012, 40(1): 3-10.
- [11] 赵利霞, 李振甲, 魏彦林, 等. 化学发光免疫分析[J]. 世界科技研究与发展, 2004, 26(4): 24-33.  
Zhao LX, Li ZJ, Wei YL, *et al.* Chemiluminescence immunoassay[J]. World Sci-Tech R & D, 2004, 26(4): 24-33.
- [12] Shim JY, Kim YA, Lee YT, *et al.* Monoclonal Antibody-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for the Organophosphorus Insecticide *O*-Ethyl-*O*-4-Nitrophenyl Phenylphosphonothioate (EPN). J Agric Food Chem, 2010, 58(9): 5241-5247

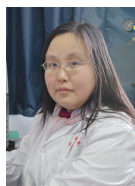
- [13] 张敏, 唐建设, 程国华, 等. 有机磷农药通用人工抗原的合成与鉴定[J]. 生态毒理学报, 2008, 3(2): 201–205.  
Zhang M, Tang JH, Cheng GH, *et al.* Synthesis and identification of generic antigen for organophosphorus pesticides[J]. Asian J Ecotoxicol, 2008, 3(2): 201–205.
- [14] 江定心, 徐汉虹, 安玉兴. O, O-二甲基硫代磷酰胺(胼) 衍生物的合成及除草活性[J]. 华南农业大学学报, 2008, 29(4): 35–37.  
Jiang DX, Xu HH, An YX. Synthesis and herbicidal activity of o, o-dimethyl phosphonothionic amides (hydrazines) derivatives[J]. J South China Agric Univ, 2008, 29(4): 35–37.
- [15] 赵文浩, 梁宏艳, 陈海燕, 等. 硫代磷酰胺合成及杀虫活性研究[J]. 有机化学, 2009, 2(12): 2026–2029.  
Zhao WH, Liang HY, Chen HY, *et al.* Synthesis of O, O-Diethyl-N-[2-(3-acetyl-2,2-dimethyl-cyclobutyl)-acetamido] thiophosphoramidate and its insecticidal activity[J]. Chin J Organic Chem, 2009, 29(12): 2026–2029.
- [16] 李志成, 王辉辉, 买文鹏等. 酰胺的合成方法综述[J]. 广东化工, 2013, 40(3): 62–63, 90.  
Li ZC, Wang HH, Mai WP, *et al.* Synthetic Methods of the Amide[J]. Guangdong Chem, 2013, 3(40): 62–63, 90.
- [17] 张丽, 杨迎春, 吉爱军, 等. 鲁米诺-过氧化氢体系流动注射化学发光法测定乐果[J]. 四川师大学报: 自然科学版, 2008, 31(2): 250–252.  
Zhang L, Yang YC, Ji AJ, *et al.* The determination of dimethoate by flow injection chemiluminescence method in luminal- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system[J]. J Sichuan Normal Univ( Natural Science), 2008, 25(2): 250–252.
- [18] 冷丰收. 浅谈柱层析的几个技巧[J]. 华章, 2010, 32: 160.  
Leng FS. Few tips of column chromatography[J]. Magnificent Writing, 2010, 32: 160.
- [19] 张金树, 程博闻, 任元林. 1, 4-二(O, O-二乙基硫代磷酰亚胺基) 苯的合成及表征[J]. 应用化学, 2007, 24(7): 832–834.  
Zhang JS, Cheng BW, Reng Y. Synthesis and Characterization of 1, 4-Di(O, O-diethyl thiophosphoryl imines) benzene[J]. Chin J Appl Chem, 2007, 24(7): 832–834.

(责任编辑: 赵静)

### 作者简介



刘涛, 硕士, 主要研究方向为食品安全。  
E-mail: 594057517@qq.com



刘晓宇, 博士, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为食品安全与农业资源综合利用。  
E-mail: liuxiaoyu@mail.hzau.edu.cn