

# 鲁米诺- $\text{H}_2\text{O}_2$ 流动注射化学发光法 测定乐果

吴晓苹 涂貌贞

(福州大学化学化工学院 福州市鼓楼区工业路 523 号 350002)

**摘 要** 在碱性介质中, 乐果能够有效增强鲁米诺- $\text{H}_2\text{O}_2$  体系的化学发光, 据此建立了测定乐果的流动注射化学发光分析方法, 并对反应的机理进行了探讨。在最佳条件下, 乐果-鲁米诺- $\text{H}_2\text{O}_2$  体系化学发光强度在 2s 内达到了最大值, 乐果在  $5.0 \times 10^{-8}$ — $1.0 \times 10^{-5}$  g/mL 范围内呈良好的线性关系, 检出限 ( $S/N = 3$ ) 为  $1.5 \times 10^{-8}$  g/mL。该体系应用于加标蔬菜样品测定, 乐果测定回收率为 108.0%—119.3%, 测定偏差为 2.7%—4.6%。化学发光的机理可能是由于乐果先被过氧化氢氧化生成过氧化磷酸盐, 过氧化磷酸盐氧化鲁米诺生成激发态, 从而产生发光。

**关键词** 流动注射化学发光法, 乐果, 鲁米诺。

中图分类号: O657.39

文献标识码: B

文章编号: 1004-8138(2007)05-0921-05

## 1 前言

乐果 [Dimethoate, *o, o*-二甲基-*S*-(*N*-甲基氨基甲酰甲基)二硫代磷酸酯] 为广谱内吸性杀虫、杀螨剂, 广泛应用于防治蔬菜和粮食上的蚜虫、叶蝉及某些蚧类、螨类害虫。乐果能使 DNA 的鸟嘌呤发生甲基化, 因此具有许多潜在危害<sup>[1]</sup>。加强对蔬菜食品中乐果残留的监测分析, 对保障食品安全和人类健康具有实际意义。

目前用于检测乐果残留的方法主要有气相色谱法/气质联用 GC-MS<sup>[2,3]</sup>、液质联用 (LC-MS)<sup>[4,5]</sup>、免疫分析法<sup>[6,7]</sup>、酶抑制法<sup>[7,8]</sup> 和化学发光技术<sup>[9,10]</sup> 等。质谱、免疫分析和酶分析检测较灵敏, 适用对象广泛, 但质谱仪器昂贵、成本高, 而免疫分析和酶抑制法的操作技术要求高、时间长, 不适合于快速检测。化学发光分析技术由于具有检测灵敏、简便、快速、成本低的特点, 近年来在农药残留分析上的应用备受关注。Ayyagari 等<sup>[11]</sup> 利用有机磷抑制碱性磷酸酯酶催化发光, 测定了乐果等有机磷农药残留, 检出限为 500ppb; Moris 等<sup>[12]</sup> 利用有机磷农药和氨基甲酸酯抑制 AChE 酶活性的特征, 结合酶催化发光技术检测了乐果等有机磷和氨基甲酸酯农药多残留。应用非酶试剂化学发光反应, 如鲁米诺-Ce(IV) 等化学发光体系, 也可以直接测定敌敌畏<sup>[13]</sup>、甲基对硫磷<sup>[14]</sup>、对硫磷<sup>[15]</sup> 等有机磷农药, 在农残测定中显示了良好的应用前景。目前, 鲁米诺- $\text{H}_2\text{O}_2$  体系分析检测乐果的研究尚未见报道。

本文基于碱性条件下乐果能增强鲁米诺- $\text{H}_2\text{O}_2$  化学发光的特征, 结合流动注射分析技术, 研究建立了一种快速、简便、高灵敏的乐果催化化学发光分析的新方法, 对反应的机理进行了探讨, 并应用于蔬菜中乐果残留量的测定, 结果令人满意。

国家自然科学基金项目 (20575012), 福建省科技厅重点项目 (2005Y015) 资助项目

联系人, 电话: (0591) 87893229; E-mail: wapple@fzu.edu.cn

作者简介: 吴晓苹 (1972—), 女, 福建省漳州市人, 副教授, 博士, 主要从事生物和环境分析。

收稿日期: 2007-06-19; 接受日期: 2007-06-30

## 2 实验部分

### 2.1 仪器和试剂

IFEM-D 型流动注射化学发光分析仪(西安瑞迈电子科技有限公司); pH S-3C 型精密酸度计(上海大普仪器厂);

鲁米诺溶液( $1.0 \times 10^{-2}$  mol/L): 称取 0.1772g 鲁米诺(Sigma, USA), 用 60mL  $0.01$  mol/L 的 NaOH 溶液溶解, 用二次蒸馏水定容至 100mL, 低温避光保存;

乐果标准液( $6.8 \times 10^{-5}$  g/mL): 称取 3.4mg 乐果(Sigma, USA), 少量乙腈溶解, 二次蒸馏水定容至 50mL, 使用时用二次蒸馏水逐级稀释;

$H_2O_2$  每次实验前重新配置; 实验用水均为二次蒸馏水, 所有试剂均为分析纯。

### 2.2 样品制备

提取: 称取 5.0g 白菜样品于 50mL 匀浆杯内, 加入 25mL 乙酸乙酯, 5g 无水硫酸钠, 匀浆 2min, 3000r/min 离心 3min, 过滤; 在残渣中加入 20mL 乙酸乙酯匀浆 1min, 合并滤液, 用旋转蒸发仪浓缩至干, 石油醚定容至 20mL。

净化: 用 10mL 石油醚淋洗层析柱(脱脂棉; 填料包括 3.0g 无水硫酸钠, 5g 5% 水灭活弗罗里硅土, 3.0g 无水硫酸钠), 加入 2mL 石油醚提取液, 用 30mL 乙酸乙酯淋洗, 收集淋洗液,  $N_2$  吹干, 应用二次蒸馏水定容 10mL。

### 2.3 实验方法

流动注射化学发光反应装置如图 1 所示, 采样体积为  $100\mu L$ , 阀池距为 5.5cm。鲁米诺和过氧化氢经过泵先混合后由载液推动, 通过六通进样阀注入 T 形阀混合后, 快速送入发光池, 以 CL 检测器进行检测, 以相对峰高进行定量。

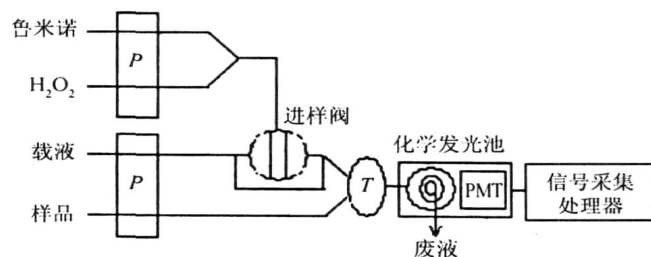


图 1 流动注射化学发光分析流程图

P——蠕动泵; T——T 型阀; PMT——光电倍增管。

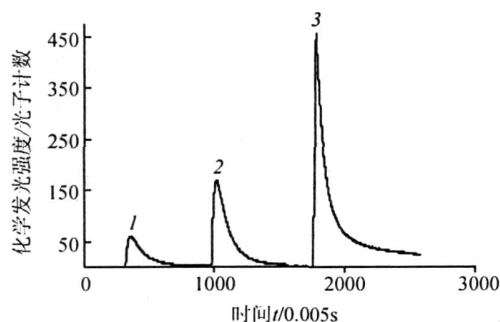
## 3 结果与讨论

### 3.1 化学发光研究

结合流动注射技术, 考察乐果对鲁米诺- $H_2O_2$  化学发光的增强反应。图 2 表明, 鲁米诺- $H_2O_2$  体系化学发光在 2s 内达到峰值。未加入乐果时, 实验中发光体系的发光强度较低; 随着乐果的加入量, 鲁米诺- $H_2O_2$  体系化学发光得到明显的增强, 当乐果浓度为  $6.8 \times 10^{-6}$  g/mL 时, 鲁米诺- $H_2O_2$  体系发光值即增强了 9 倍左右, 表明体系可以用于测定微量乐果。

### 3.2 介质优化

在碱性介质下, 考察了 pH 在 11.5—13.5 范围的三种碱性缓冲介质  $NaHCO_3$ -NaOH、 $NaH_2PO_4$ -NaOH、 $Na_2B_4O_7$ -NaOH 对鲁米诺-过氧化氢-乐果体系发光增强值( $\Delta I$ )的影响。图 3 表明, pH 为 12.8 的  $Na_2B_4O_7$ -NaOH 缓冲溶液对体系发光增强作用最大, 以下实验选择 pH 12.8 的  $Na_2B_4O_7$ -NaOH 缓冲溶液作为载液。

图2 鲁米诺-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-乐果体系流动注射发光谱图

鲁米诺:  $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ ;  $\text{H}_2\text{O}_2$ :  $0.07 \text{ mol/L}$ ;  
缓冲液:  $\text{NaHCO}_3\text{-NaOH}$ , pH 11.5; 乐果浓度 ( $\text{g/mL}$ ):  
1——0; 2—— $6.8 \times 10^{-7}$ ; 3—— $6.8 \times 10^{-6}$ 。

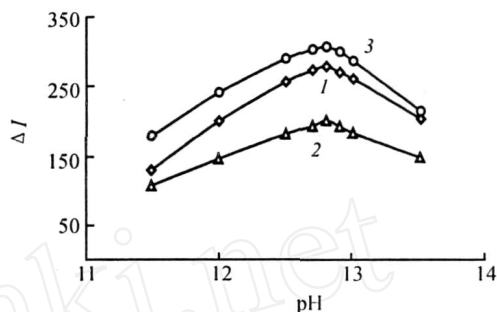


图3 介质及pH值对发光强度的影响

乐果:  $6.8 \times 10^{-7} \text{ g/mL}$ ; 鲁米诺:  $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ ;  
 $\text{H}_2\text{O}_2$ :  $0.07 \text{ mol/L}$ ; 流速:  $2.5 \text{ mL/min}$ ; 1—— $\text{NaHCO}_3\text{-NaOH}$ ;  
2—— $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ ; 3—— $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-NaOH}$ 。

### 3.3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度优化

考察了在  $0.01\text{--}0.3 \text{ mol/L}$  范围内的不同浓度的  $\text{H}_2\text{O}_2$  对体系发光增强值的影响, 以载液流速为  $2.5 \text{ mL/min}$ , 如图4所示, 在  $0.01\text{--}0.07 \text{ mol/L}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度范围内, 体系发光增强值随着  $\text{H}_2\text{O}_2$  的加入量增大而增强, 当  $\text{H}_2\text{O}_2$  的浓度为  $0.07 \text{ mol/L}$  时, 体系具有最大的化学发光增强值; 随着  $\text{H}_2\text{O}_2$  的量继续增加, 发光背景增强, 发光增强值降低。实验选择  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度为  $0.07 \text{ mol/L}$ 。

### 3.4 鲁米诺浓度优化

在浓度为  $1.0 \times 10^{-5}\text{--}5.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$  范围, 研究了鲁米诺对发光增强值的影响。以载液流速为  $2.5 \text{ mL/min}$ , 如图5所示, 当鲁米诺溶液浓度为  $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$  时, 发光增强值  $\Delta I$  最大。因此, 鲁米诺溶液最优化浓度选择  $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 。

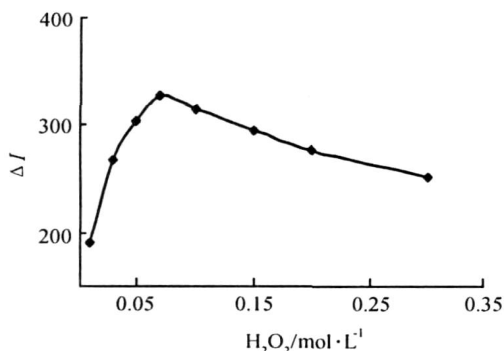


图4 过氧化氢浓度对发光增强值的影响

乐果:  $6.8 \times 10^{-7} \text{ g/mL}$ ; 鲁米诺:  $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 。

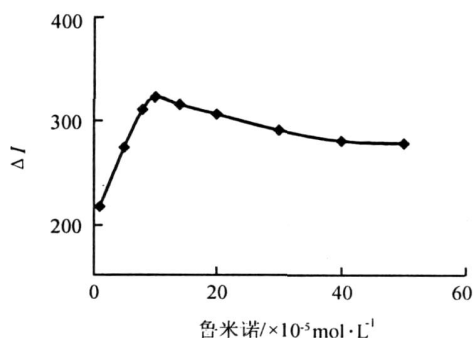


图5 鲁米诺浓度对发光增强值的影响

乐果:  $6.8 \times 10^{-7} \text{ g/mL}$ ;  $\text{H}_2\text{O}_2$ :  $0.07 \text{ mol/L}$ 。

### 3.5 流速优化

考察了泵转速在  $30\text{--}99 \text{ r/min}$  范围内对发光增强值的影响。随着泵转速的增大, 溶液混合程度和流动速度增大, 有利于反应溶液在短时间内到达发光池, 逐渐实现化学发光与溶液输送的同步性, 减少因输送延迟而处在发光衰减阶段检测的不利情况; 当主泵转速为  $70 \text{ r/min}$ , 载液流速为  $2.5 \text{ mL/min}$ , 鲁米诺- $\text{H}_2\text{O}_2$  体系发光增强值最大, 随后, 泵速继续增大, 出现溶液尚未完全发光就被推出检测池, 检测的发光强度降低。故而实验选择泵转速为  $70 \text{ r/min}$ , 流速  $2.5 \text{ mL/min}$ 。

### 3.6 干扰测定

考察共存物质的干扰情况,当样品中乐果为  $1.0 \times 10^{-7} \text{ g/mL}$  时,在测定偏差小于 5% 的情况下,1000 倍的  $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{Br}^-$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{CO}_3^{2-}$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{PO}_4^{3-}$ , 400 倍的  $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{NH}_4^+$ , 100 倍的淀粉、葡萄糖等物质不干扰测定;  $\text{Pb}^{2+}$  (10 倍)、 $\text{Hg}^{2+}$  (10 倍) 和  $\text{Fe}^{3+}$  (0.2 倍) 具有干扰,  $\text{Cu}^{2+}$ 、VC、VB 存在干扰。  $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$  和  $\text{Cu}^{2+}$  可以通过添加  $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$  EDTA 进行掩蔽, VC、VB 可通过净化消除。

### 3.7 分析应用

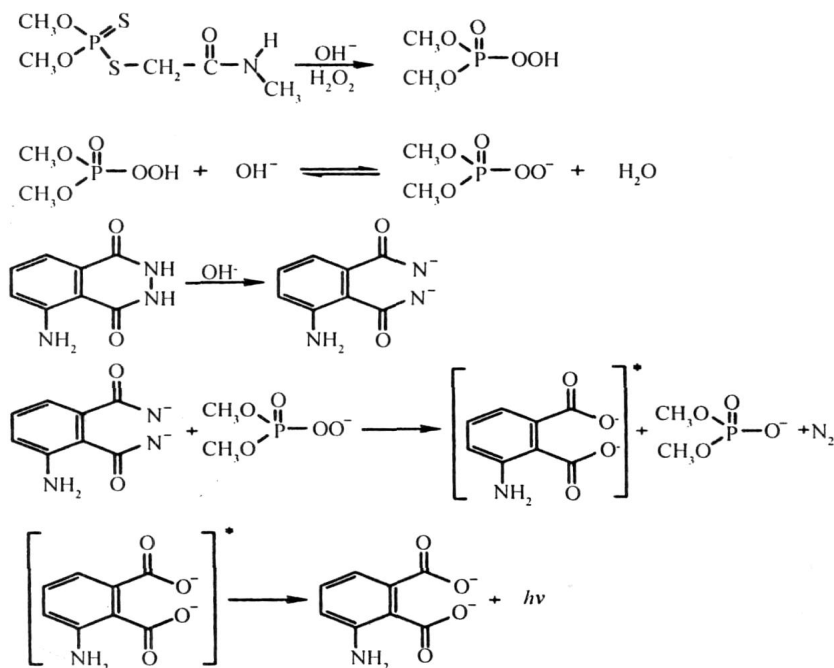
在最优条件下,乐果测定的线性浓度范围为  $5.0 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-5} \text{ g/mL}$ , 线性方程为  $\Delta I = 8.632 \times 10^8 C (\text{g/mL}) - 12.547$ ; ( $r^2 = 0.9963$ ), 最低检出限 ( $S/N = 3$ ) 为  $1.5 \times 10^{-8} \text{ g/mL}$ ; 对含有  $1.0 \times 10^{-7} \text{ g/mL}$  乐果的标准溶液进行重现性测定,  $RSD = 1.9\%$  ( $n = 11$ )。测定白菜模拟样品,在乐果加标浓度在  $0.5 \sim 3.0 \text{ g/mL}$  时,回收率为  $108.0\% \sim 119.3\%$ , 见表 1。测定偏差为  $2.7\% \sim 4.6\%$ 。

表 1 白菜样品的乐果加标回收率

| 样品 | 起始浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ ) | 加入值 ( $\mu\text{g/mL}$ ) | 测得值 (平均值 $\pm$ S.D) ( $\mu\text{g/mL}$ ) | 平均回收率 (%) |
|----|---------------------------|--------------------------|------------------------------------------|-----------|
| 1  | 0.0                       | 0.5                      | $0.56 \pm 0.02$                          | 112.0     |
| 2  | 0.0                       | 1.0                      | $1.08 \pm 0.05$                          | 108.0     |
| 3  | 0.0                       | 3.0                      | $3.58 \pm 0.01$                          | 119.3     |

## 4 机理探讨

根据文献<sup>[15]</sup>, 有机磷酸酯农药(如甲基对硫磷、对硫磷等)与鲁米诺-过氧化氢体系的化学发光反应机理可能为: 过氧化氢先氧化对硫磷生成过氧化磷酸盐, 过氧化磷酸盐氧化鲁米诺生成激发态的 3-氨基邻苯二甲酸根离子, 激发态的 3-氨基邻苯二甲酸根离子回到基态, 产生化学发光。乐果也属于有机磷酸酯农药, 结构与功能基团与甲基对硫磷等相似, 因此可以认为可能的反应机理如下式所示:



## 参考文献

- [1] Shama Y, Bashir S, Irshad M *et al* Dimethoate-Induced Effects on Antioxidant Status of Liver and Brain of Rats Following Sub-chronic Exposure[J]. *Toxicology*, 2005, **215**(3): 173—181.
- [2] Hercegov á A, D "om "ot "orov á M, Matisov á E *et al* Fast Gas Chromatography with Solid Phase Extraction Clean-up for Ultra-trace Analysis of Pesticide Residues in Baby Food[J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, **1084**(1—2): 46—53.
- [3] Liapis K S, Aplada- Sarlis P, Kyriakidis N V. Rapid Multi-Residue Method for the Determination of Azinphos Methyl, Bromopropylate, Chlorpyrifos, Dimethoate, Parathion Methyl and Phosalone in Apricots and Peaches by Using Negative Chemical Ionization Ion Trap Technology[J]. *Journal of Chromatography A*, 2003, **996**(1—2): 181—187.
- [4] Alves C G, Apendurada M F. Assessment of Pesticide Contamination in Soil Samples from an Intensive Horticulture Area, Using Ultrasonic Extraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry[J]. *Talanta*, 2005, **65**(5): 1179—1189.
- [5] Camen Ferrer, M. Jose Gómez, Juan F. García-Reyes Determination of Pesticide Residues in Olives and Olive Oil by Matrix Solid-Phase Dispersion Followed by Gas Chromatography/Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, **1069**(2): 183—194.
- [6] Rodrigues A M, Ferreira V, Cardoso V V *et al* Determination of Several Pesticides in Water by Solid-Phase Extraction, Liquid Chromatography and Electrospray Tandem Mass Spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, **1150**(1—2): 267—278.
- [7] Schmuck G, Ahr H J. Improved In Vitro Method for Screening Organophosphate-Induced Polyneuropathy[J]. *Toxicology in Vitro*, 1997, **11**(3): 263—270.
- [8] Babczyska A, Wilczek G, Migula P. Effects of Dimethoate on Spiders from Metal Pollution Gradient[J]. *Science of the Total Environment*, 2006, **370**(2—3): 352—359.
- [9] 钟树明, 袁东星, 金晓英. 植物酶抑制技术用于检测蔬菜中有机磷及氨基甲酸酯类农药残留[J]. *环境化学*, 2002, **21**(2): 189—193.
- [10] Moris P, Alexandre I, Roger M, Remacle J. Chemiluminescence Assays of Organophosphorus and Carbamate Pesticides[J]. *Analytica Chimica Acta*, 1995, **302**(1): 53—59.
- [11] Ayagari M S, Kamrkar S, Pande R *et al* Biosensors for Pesticide Detection Based on Alkaline Phosphatase Catalyzed Chemiluminescence[J]. *Materials Science and Engineering*, 1995, **C2**: 191—196.
- [12] Wang J N, Zhang C, Wang H X *et al* Development of a LuminoI-Based Chemiluminescence Flow-Injection Method for the Determination of Dichlorvos Pesticide[J]. *Talanta*, 2001, **54**(6): 1185—1193.
- [13] Chouhana R S, Babua K V, Kumarc M A *et al* Detection of Methyl Parathion Using Immuno-Chemiluminescence Based Image Analysis Using Charge Coupled Device[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2006, **21**(7): 1264—1271.
- [14] Liu X Y, Du J X, Lu J R. Determination of Parathion Residues in Rice Samples Using a Flow Injection Chemiluminescence Method[J]. *Luminescence*, 2003, **18**(5): 245—248.
- [15] 饶志明, 王建宁, 李隆弟, 张新荣. 流动注射化学发光测定甲基对硫磷[J]. *分析化学*, 2001, **29**(4): 373—377.

## Determination of Dimethoate by Flow-Injection Chemiluminescence with LuminoI-Hydrogen Peroxide System

WU Xiao-Ping TU Mao-Zhen

(Institute of Chemistry and Chemical Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350002, P. R. China)

**Abstract** A simple and convenient flow-injection chemiluminescence (FL-CL) method for the determination of dimethoate was developed based on the observation that dimethoate can greatly enhance the CL between luminoI and  $\text{H}_2\text{O}_2$  in an alkaline solution. The intensity of CL in this system reaches a maximum within 2 s under the optimum conditions. The linear range for dimethoate is  $5.0 \times 10^{-8}$ — $1.0 \times 10^{-5}$  g/mL with a detection limit of  $1.5 \times 10^{-8}$  g/mL ( $S/N = 3$ ). This method was applied to the determination of dimethoate in fortified vegetable samples with recovery of 108.0%—119.3%, and the RSD of 2.7%—4.6%. The CL reaction is probably triggered by the interaction of  $\text{H}_2\text{O}_2$ -dimethoate, and then the resulted peroxide phosphate induces the oxidation of luminoI to form an excited state intermediate, which instantly transits to ground state with an emission of CL.

**Key words** Flow-Injection Chemiluminescence, Dimethoate, LuminoI