

三维荧光技术结合化学计量学二阶校正方法 定量分析红葡萄酒中噻菌灵和麦穗宁

钟秀娣¹, 刘怡虹¹, 李勇², 吴平平¹, 吴海龙², 李耀群^{1*}

(1. 厦门大学化学化工学院化学系, 谱学分析与仪器教育部重点实验室, 厦门 361005;

2. 湖南大学化学化工学院, 化学生物传感与计量学国家重点实验室, 长沙 410082)

摘要 噻菌灵和麦穗宁是被广泛应用于预防治疗蔬菜水果病害的苯并咪唑类杀菌剂, 二者的荧光光谱重叠严重, 常规的荧光方法难以实现同时直接定量分析。本文将激发发射三维荧光技术分别与平行因子分析 (PARAFAC) 算法和交替三线性分解 (ATLD) 算法相结合直接用于定量分析红葡萄酒中噻菌灵和麦穗宁的残留含量。当体系主成分数为3时, ATLD和PARAFAC获得预测样品中噻菌灵和麦穗宁的平均回收率分别为 (105.8±2.7) %、(102.1±10.1) %和 (102.4±7.6) %、(103.1±9.5) %。本方法可简单、快速、经济、同时地分析红葡萄酒中噻菌灵和麦穗宁含量。

关键词 噻菌灵; 麦穗宁; 红葡萄酒; 交替三线性分解算法; 平行因子分析算法

Three-Dimensional Fluorescence Technique Coupled with Chemometric Second-Order Calibration Method for Simultaneous Detection of Thiabendazole and Fuberidazole in Red Wine

Zhong Xiudi¹, Liu Yihong¹, Li Yong², Wu Pingping¹, Wu Hailong², Li Yaoqun^{1*}

(1. Department of Chemistry and the MOE Key Laboratory of Spectrochemical Analysis & Instrumentation, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005

2. State Key Laboratory of Chemo/Biosensing & Chemometrics College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University, Changsha 410082)

Abstract: Thiabendazole (TBZ) and fuberidazole (FBZ) are a class of benzimidazole fungicides and have been widely applied to protect vegetables and fruits. Conventional fluorescence spectrum analysis method can hardly simultaneously detect TBZ and FBZ due to their serious spectral overlap. The simultaneous determination of TBZ and FBZ in red wine by excitation-emission fluorescence matrices (EEMs) combined with parallel factor analysis (PARAFAC) and alternating tri-linear decomposition (ATLD) was developed in this study. The prediction recoveries of TBZ and FBZ in the prediction set by PARAFAC and ATLD were (105.8±2.7)%, (102.1±10.1)% and (102.4±7.6)%, (103.1±9.5)% respectively, when the principal component number was 3. The method is simple, fast, low-cost, and suitable for the simultaneous determination of TBZ and FBZ in red wine.

Key Words: Thiabendazole; Fuberidazole; Red wine; PARAFAC; ATLD

噻菌灵和麦穗宁是高效、广谱、具有内吸杀菌活性的苯并咪唑类杀菌剂, 被广泛应用于蔬菜水果等农作物的生产、存储及保鲜过程^[1], 若使用不当, 会导致其在葡萄及葡萄制品中残留, 并通过食物链进入到人体内, 对人体健康造成一定的危害。这类杀菌剂残留周期长, 具有一定的毒性, 各国分别制定其在食品中的最大残留限量标准^[2], 欧盟规定黄瓜和西红柿中噻菌灵的最大残留限量为0.05 mg/kg; 我国规定大米中噻菌灵残留量不得超过0.2 mg/kg。因此, 建立红葡萄酒

中噻菌灵和麦穗宁残留的快速同时检测方法具有重要的现实意义。红葡萄酒由于富含色素、葡萄糖、氨基酸等多种营养成分及多种酚类化合物而导致其基体复杂, 目前已建立的用于葡萄及葡萄酒中农药残留的分析方法有高效液相色谱法及液相色谱联合质谱法^[3,4], 其繁琐耗时的样品前处理步骤容易造成目标检测物的损失; 有机溶剂的大量消耗, 昂贵的仪器成本及维护费用均不利于方法的推广应用及样品的快速筛查。

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (21127005, 21375111); 福建省科技重点项目 (2009Y0046)

作者简介: 李耀群, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事分子发光研究, Email: yaoqunli@xmu.edu.cn

荧光检测法有灵敏度高、样品前处理简单、仪器成本较低等优点,噻菌灵和麦穗宁本身具有荧光性质,建立噻菌灵和麦穗宁的简单、快速、经济的荧光检测方法是可行的。由于噻菌灵和麦穗宁的荧光光谱重叠严重,且红葡萄酒样品基体复杂,常规的荧光法难以实现对红葡萄酒中二者的同时直接定量分析。化学计量学是一门通过统计学或数学方法将对化学体系的测量值与体系的状态之间建立联系的学科,它应用数学、统计学和其他方法和手段(包括计算机)选择最优试验设计和测量方法,并通过对测量数据的处理和解析,最大限度地获取有关物质系统的成分、结构及其他相关信息。本文通过测量样品的三维荧光数据,分别与平行因子分析(PARAFAC)算法和交替三线性分解(ATLD)算法等化学计量学二阶校正方法相结合^[5,6],实现在有背景光谱干扰物存在的条件下对红葡萄酒中感兴趣的组分噻菌灵和麦穗宁进行解析及直接定量检测。这种方法以“数学分离”代替“物理分离”,避免了繁琐耗时的样品前处理及净化步骤,红葡萄酒样品只需经过简单的稀释处理,即可得到准确可靠的检测结果。该方法简单、快速、经济,并可用于大量红葡萄酒样品中噻菌灵和麦穗宁的同时筛查。

1 材料与方法

1.1 化学计量学二阶校正方法

化学计量学二阶校正方法是基于三维数据矩阵解析的思路,对三维响应矩阵进行三线性分解,获得A、B、C矩阵,由C矩阵相对浓度值与该组分校正样的标准浓度作图或作简单线性回归,获得浓度的校正方程,由该方程根据C矩阵相对浓度值可获得预测样中该组分的实际浓度,实现在未知干扰组分存在的条件下对感兴趣组分进行同时定量分析。平行因子分析(PARAFAC)算法和交替三线性分解(ATLD)算法是目前常用的二阶校正方法,它们已经广泛应用于很多领域中^[7-9]。

1.2 仪器

所有荧光光谱的扫描均在实验室自制的多功能荧光仪上实现^[10],150 W的氙灯作光源,负高压PMT = -800 V,激发和发射单色器光谱通带均为5 nm,扫描速度为480 nm/min,使用C语言编写的软件来控制荧光仪,实验使用1 cm×1 cm石英比色皿。

1.3 试剂

噻菌灵标准品(TBZ, 10 mg),麦穗宁标准品(FBZ, 10 mg)购自百灵威上海分公司;甲醇为色谱纯,其他所用试剂均为分析纯,均购自上海国药试剂公司;实验所用超纯水由Milli-Q水净化系统制备。

红葡萄酒样品来自厦门超级市场。

1.4 实验方法

标准溶液的配制:准确称取一定量的噻菌灵(thiabendazole, TBZ)、麦穗宁(fuberidazole, FBZ)标准品,分别用甲醇定容到25 mL的棕色容量瓶中,得到100 mg/L噻菌灵和麦穗宁的标准溶液保存于冰箱中,使用时逐级稀释至所需要的浓度。

缓冲溶液:使用H₃PO₄和NaH₂PO₄配制成pH = 1~6的缓冲溶液。使用NaH₂PO₄和Na₂HPO₄配制成pH = 7~9的缓冲溶液。

人工合成样品的配制:取13个5 mL的容量瓶,加入一定量的噻菌灵和麦穗宁标准溶液,用pH = 1的磷酸盐缓冲液稀释至刻度,摇匀,得到不同浓度配比的噻菌灵和麦穗宁两组分的混合标准溶液(浓度如表1所示),其中1~7作为校正样品集,8~13作为预测样品集。

实际样品的配制:分别取一定量的噻菌灵和麦穗宁标准溶液于8个5 mL的容量瓶中,再加入0.1 mL的红葡萄酒样品,用pH = 1的磷酸盐缓冲液稀释至刻度,浓度如表3。

取2 mL上述溶液于1×1 cm石英比色皿中,进行三维荧光扫描,同时对pH = 1的磷酸盐缓冲液空白样品进行三维荧光扫描,重复3次,扣除空白样品的平均值,以减少溶剂空白引起的散射影响。

三维(3D)扫描选择发射(EM)模式,激发波长范围为295~335 nm,间隔2 nm;发射波长范围为345~455 nm,间隔1 nm。扫描速度为480 nm/min。本实验获取的三维荧光数据矩阵通过基于MATLAB软件编写的交替三线性分解算法(ATLD)程序和平行因子分析算法(PARAFAC)程序进行解析。

2 实验结果与讨论

2.1 样品处理

由图1(a)和图1(b)可知,噻菌灵和麦穗宁在酸性水溶液中的荧光信号比在中性和碱性水溶液中的荧光信号强,因此我们用pH=1的磷酸盐缓冲液对红葡萄酒样品进行简单稀释处理后,在酸性条件下,采用激发发射矩阵荧光结合PARAFAC算法和ATLD算法直接快速分析红葡萄酒溶液中的噻菌灵和麦穗宁的方法。用“数学分离”代替“物理分离”,避免了繁琐耗时样品处理过程,缩短了整个分析时间。

2.2 三维荧光光谱

按照实验设计的方法,实验扫描得到200 ng/mL噻菌灵标准溶液、10 ng/mL麦穗宁标准溶液以及稀释后未加标的红葡萄酒溶液的三维荧光光谱图(见图2),三者的三维荧光光谱图重叠严重,无法直接进行定量分析,因此采用PARAFAC和ATLD算法对三维荧光光谱进行解析。

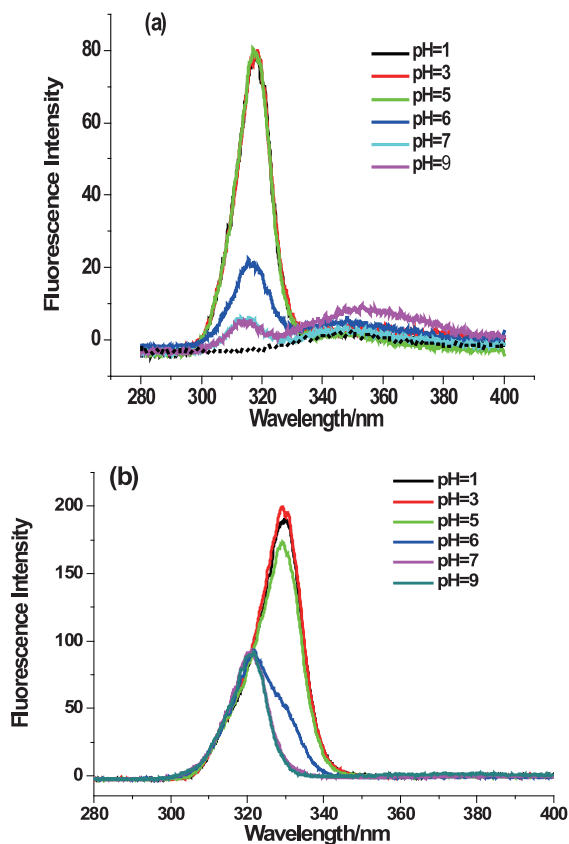


图1 (a) 噻菌灵在不同pH的磷酸-磷酸盐缓冲溶液中的荧光信号
(b) 麦穗宁在不同pH的磷酸-磷酸盐缓冲溶液中的荧光信号
Figure 1 (a) The signal of TBZ in phosphoric acid- phosphate buffer at different pH; (b) The signal of FBZ in of phosphoric acid- phosphate buffer at different pH

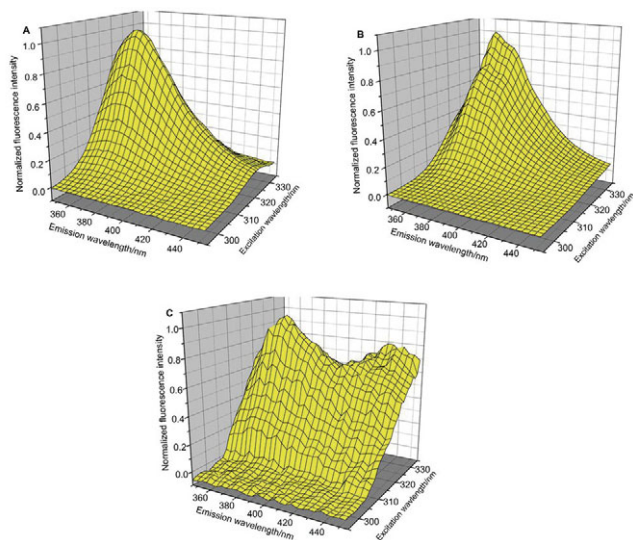


图2 噻菌灵 (A)、麦穗宁 (B) 和未加标红葡萄酒 (C) 的三维荧光光谱图
Figure 2 The three-dimensional fluorescence spectra of TBZ (A), FBZ (B) and red wine sample (C)

2.3 人工合成样的测定

表1 校正样和预测样中噻菌灵和麦穗宁的浓度
Table 1 The concentrations of TBZ and FBZ in the calibration and test samples

编号	校正集 (ng/mL)		编号	预测集 (ng/mL)	
	TBZ	FBZ		TBZ	FBZ
1	100	60	8	600	20
2	200	50	9	100	20
3	100	10	10	400	50
4	300	50	11	200	60
5	500	60	12	300	40
6	400	30	13	500	60
7	200	40			

采用PARAFAC和ATLD算法解析校正集和预测集的三维荧光数据形成的数据阵 (20×110×15)，分别得到校正集中噻菌灵和麦穗宁的预测浓度和真实浓度的线性拟合曲线及相关系数(如表2所示)。ATLD和PARAFAC获得预测集样品中噻菌灵和麦穗宁的平均回收率分别为 (105.8±2.7)%、(102.1±10.1)%和 (102.4±7.6)%、(103.1±9.5)%。

表2 校正集中预测浓度和真实浓度的线性拟合曲线及相关系数
Table 2 The linear curve fitting and correlation coefficient of prediction values and real values by ATLD and PARAFAC

算法	线性拟合曲线		相关系数	
	TBZ	FBZ	TBZ	FBZ
ATLD	$Y=-1.337+1.012X$	$Y=1.637+0.965X$	0.994	0.991
PARAFAC	$Y=1.912+1.002X$	$Y=1.437+0.969X$	0.988	0.991

通过线性拟合曲线和相关系数，分别得到基于ATLD和PARAFAC算法的激发、发射光谱 (如图3所示)。由图可知，采用PARAFAC和ATLD算法解析得到的噻菌灵和麦穗宁的激发、发射荧光光谱图与红葡萄酒溶液中两者的激发、发射荧光光谱图非常接近，且与两组分各自的真实光谱十分相似。这表明两种算法解析的结果可靠，均可用于红葡萄酒水溶液中噻菌灵和麦穗宁的解析及定量分析。

2.4 红葡萄酒中噻菌灵和麦穗宁的分析

用核一致诊断法 (the core consistency diagnostic) [11]对得到的校正样和实际样的三维数据阵 (20×110×15) 进行分析。对于前三个因子的核一致值都接近于1，第四个因子的核一致值接近于0，所以确定三维数据阵的主成分数为3。分别用PARAFAC和ATLD算法在因子数为3时对加标红葡萄酒样品进行解析，得到的噻菌灵和麦穗宁的浓度和回收率如表3所示。实验结果表明：PARAFAC和ATLD算法与三维荧光法联用能够同时直接快速的定量测定红葡萄酒稀释液中的噻菌灵和麦穗宁，实验结果良好，红葡萄酒中其它组分和背景干扰的存

在不影响对二者的测定。

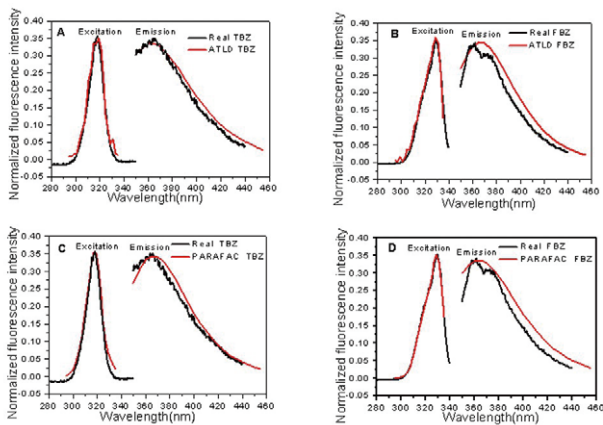


图3 ATLD解析噻菌灵 (A) 和麦穗宁 (B) 的谱图与真实谱图;
PARAFAC解析噻菌灵 (C) 和麦穗宁 (D) 的谱图与真实谱图
Figure 3 The parsed spectrum in ATLD and real spectrum of TBZ (A)
and FBZ (B); The parsed spectrum in PARAFAC and real spectrum
of TBZ (A) and FBZ (B).

表3 基于ATLD和PARAFAC算法得到加标红葡萄酒样品中
噻菌灵和麦穗宁的预测浓度及回收率

Table 3 Prediction concentration and recoveries of the spiked
red wine sample by ATLD and PARAFAC

实际 样品	添加浓度 (ng/mL)		ATLD				PARAFAC			
			预测浓度 (ng/mL)		回收率 (%)		预测浓度 (ng/mL)		回收率 (%)	
	TBZ	FBZ	TBZ	FBZ	TBZ	FBZ	TBZ	FBZ	TBZ	FBZ
1	600	50.0	587	51.4	97.8	102.8	582.6	50.1	97.1	100.2
2	350	40.0	348	38.9	99.4	97.4	346.9	37.9	99.1	94.7
3	300	60.0	307	58.3	102.3	97.1	308.4	58.3	102.8	97.2
4	100	50.0	77.3	47.8	77.3	95.5	91.6	48.2	91.6	96.3
5	200	30.0	179	26.6	89.4	88.6	183.2	26.5	91.6	88.2
6	150	20.0	184	26.0	122.7	130.0	193.9	25.6	129.3	128.4
7	100	10.0	89.9	12.5	89.9	125.5	84.6	12.8	84.6	128.3
8	450	60.0	439	61.6	97.4	102.8	429.1	60.8	95.3	101.4

3 结论

本研究利用化学计量学二阶校正方法的优势, 分别将PARAFAC和ATLD算法与激发发射荧光光谱联合使用, 建立了对红葡萄酒样品中噻菌灵和麦穗宁快速同时检测的方法。该方法能够解决噻菌灵和麦穗宁光谱严重重叠引起的难以分辨问题, 可实现在未知干扰组分共存情况下同时快速定量分析红葡萄酒中噻菌灵和麦穗宁两组分的同时快速定量分析; 利用“数学分离”代替“物理分离”的思路, 可避免常规仪器分析方法中繁琐、费时的样品预分离和纯化步骤, 缩短分析时间; 在用于基体复杂的红葡萄酒样品中噻菌灵和麦

穗宁的同时检测时, 实验结果令人满意, 方法简单快速。

参考文献

- [1] Llorent M E J, Fernández D C M, Ruiz M A, *et al.* Talanta, 2012, 96: 190-194.
- [2] 赵丹宇. 食品市场准入与卫生标准. 中国食品卫生杂志, 2002, 14: 25-25.
- [3] NY/T1680-2009. 蔬菜水果中多菌灵等四中苯并咪唑类农药残留量的测定高效液相色谱法. 中华人民共和国国家标准.
- [4] Pérez O P, Gilbert L B, García R J F, *et al.* Journal of Chromatography A, 2012, 1249: 2-40.
- [5] Escandar G M, Olivieri A C, Faber N K M, *et al.* Trends in Analytical Chemistry, 2007, 26: 752-765.
- [6] Zhu S H, Wu H L, Xia A L, *et al.* Analytical sciences: the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry, 2007, 23: 1173-1177.
- [7] Wu H, Yu R, Oguma, K. Trilinear component analysis in modern analytical chemistry. Analytical Sciences, 2001, 17: 1483-1486.
- [8] Da S J C, Novais S A. Analyst, 1998, 123: 2067-2070.
- [9] Harshman R A. Foundations of the PARAFAC procedure: Models and conditions for an explanatory “multimodal factor analysis”. UCLA Working Papers in Phonetics, 1970, 16: 1-84.
- [10] Li X Y, Li N, Luo H D, *et al.* Journal of agricultural and food chemistry, 2011, 59: 5899-5905.
- [11] Bro R, Kiers H A. A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models. Journal of Chemometrics, 2003, 17: 274-286.