

无鞘流毛细管电泳-电喷雾串联质谱用于面粉中 荧光增白剂的高灵敏检测

王安平, 陈楚诗, 杨巾栏*, 杨 丽*

(东北师范大学, 吉林 长春 130024)

摘要:食品中残留的过量荧光增白剂(FWAs)对人体健康存在潜在威胁,因此,开发准确、高灵敏的FWAs检测方法在食品安全监测方面具有重要意义。本工作提出了利用无鞘流接口的毛细管电泳-电喷雾串联质谱(CE-ESI-MS/MS)的方法,以实现面粉样品中6种FWAs的高灵敏检测。实验采用超声辅助液相萃取法进行样品前处理,以减小复杂样品中基质效应的干扰。以氯仿-甲醇(3:2, v/v)溶液作为萃取剂,在30℃下对样品中的FWAs进行萃取。萃取完成后,经离心、氮气吹干后用氯仿-甲醇(1:4, v/v)复溶后检测。无鞘流CE-ESI-MS/MS方法采用正离子(ESI⁺)和多反应监测(MRM)模式,利用二级质谱对6种目标物同时进行定性定量分析,从而提高方法的检测通量和灵敏度。结果显示,本方法具有较宽的线性范围、良好的线性关系和较低的方法检出限(0.04~0.67 ng/g),在实际样品中3个水平下的加标回收率良好(86.2%~103.7%),日间和日内重复性(RSD)分别不大于11.5%和10.2%。上述研究表明,本方法适用于复杂基质中多种FWAs的准确、高灵敏检测,在面粉样品的质量评估和FWAs的污染监控方面具有潜在的应用价值。

关键词:毛细管电泳;无鞘流电喷雾电离串联质谱;荧光增白剂;面粉

中图分类号:O658

文献标识码:A

Highly sensitive detection of fluorescent whitening agents in flour using sheathless capillary electrophoresis- electrospray ionization-tandem mass spectrometry

WANG Anping, CHEN Chushi, YANG Jinlan*, YANG Li*

(Northeast Normal University, Changchun 130024, China)

Abstract: Fluorescent whitening agents (FWAs) are dyes that emit visible blue or blue-purple fluorescence upon ultraviolet-light absorption. Taking advantage of light complementarity, FWAs can compensate for the yellow color of many substances to achieve a whitening effect; thus, they are used extensively in various applications. FWAs are generally stable, but their presence in the environment can lead to pollution and accumulation in the body through the food chain. Recent studies have revealed that some types of FWAs, such as coumarin-based FWAs, may exhibit photo-induced mutagenic effects that can trigger allergic reactions in humans and even pose carcinogenic risks. Hence, the development of an accurate and highly sensitive method for detecting FWAs in food-related samples is a crucial endeavor. Owing to the high polarity and structural similarity of FWAs, the accurate determination of these substances in complex food samples requires an analytical method that offers both efficient separation and sensitive detection. Capillary electrophoresis (CE) exhibits essential features such as high separation efficiency, short analysis times, very small sample injection requirements, minimal use

收稿日期:2023-11-28

* 通讯联系人.Tel:(0431)85099762,E-mail:yangl330@nenu.edu.cn(杨丽);E-mail:yangjl282@nenu.edu.cn(杨巾栏).

基金项目:国家自然科学基金(22074014);吉林省高等教育教学改革研究课题(131003552).

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 22074014); Research Subject of Higher Education Teaching Reform in Jilin Province (No. 131003552).

of organic solvents, and simple operation. Thus, it is often used as an effective alternative to liquid chromatographic techniques. Over the past few decades, electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) has been utilized as a highly sensitive and accurate detection method in numerous chemical analytical fields because it enables the analysis of molecular structures. By combining the high separation efficiency of CE with the high sensitivity of ESI-MS, a powerful tool for identifying and quantifying trace amounts of FWAs in food samples may be obtained. In this study, we present a method based on sheathless CE coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) for the simultaneous detection of six trace FWAs in flour. In the proposed method, the CE separation device is directly coupled to the mass spectrometer through a sheathless interface without the need for a sheath liquid for electric contact, thereby avoiding the dilution of the analytes and improving detection sensitivity. Various conditions that could affect extraction recovery, separation efficiency, and detection sensitivity were evaluated and optimized. The FWAs were effectively extracted from the sample matrix with reduced matrix effects by ultrasonic-assisted extraction at a temperature of 30 °C for 20 min using CHCl₃-MeOH (3:2, v/v) as the extraction solvent. The extract was centrifuged, dried under N₂, and reconstituted in CHCl₃-MeOH (1:4, v/v) for subsequent analysis. During the detection process, the CE device was coupled to the ESI-MS/MS instrument via a highly sensitive porous spray needle, which served as the sheathless electrospray interface. The target FWAs were scanned in positive-ion mode (ESI⁺) to ensure the stability and intensity of the obtained signals. Additionally, multiple-reaction monitoring (MRM) mode and MS/MS analysis were used to simultaneously quantify the six targets with high selectivity. The developed sheathless CE-ESI-MS/MS method detected the FWAs with high sensitivity over wide linear ranges with low method limits of detection (0.04–0.67 ng/g). The recoveries of the six target FWAs at three spiked levels were between 77.5% and 97.2%, with good interday (RSD ≤ 11.5%) and intraday (RSD ≤ 10.2%) precision. Analyses of the six target FWAs in eight commercial flour samples were performed using this method, and four positive samples were identified. These results demonstrate that the proposed CE-ESI-MS/MS method is a promising strategy for the determination of trace FWAs in complex food sample matrices with efficient separation and high sensitivity.

Key words: capillary electrophoresis (CE); sheathless electrospray ionization-tandem mass spectrometry (sheathless ESI-MS/MS); fluorescent whitening agents (FWAs); flour

荧光增白剂(FWAs)是一类含有芳香环和取代基的复杂有机物,其结构中形成的连续共轭体系在吸收紫外光后可激发出可见的蓝色或蓝紫色荧光^[1]。利用光的互补性,FWAs能够实现去黄增白的效果,而不会对基质造成损害,因此被广泛应用于纸制品、洗涤剂、包装材料等产品中^[2-5]。然而多数

情况下,FWAs的结构稳定,不易降解或代谢。因此,环境中存在的FWAs会导致持久污染,甚至通过食物链在人体中积累^[6-8]。研究表明,某些类型的FWAs具有光诱导诱变作用,可引起人类的过敏反应,甚至具有潜在的致癌性^[9,10]。鉴于这些潜在风险,世界各地的国家食品安全部门严格禁止在食

引用本文:王安平,陈楚诗,杨巾栏,杨丽. 无鞘流毛细管电泳-电喷雾串联质谱用于面粉中荧光增白剂的高灵敏检测. 色谱,2024,42(6):590-598.

WANG Anping, CHEN Chushi, YANG Jinlan, YANG Li. Highly sensitive detection of fluorescent whitening agents in flour using sheathless capillary electrophoresis-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. Chinese Journal of Chromatography, 2024, 42(6):590-598.

品或食品接触材料中添加 FWAs^[11-13]。因此,对食品样品中 FWAs 实现同时准确的灵敏检测至关重要。然而,由于不同种类的 FWAs 往往具有较高的极性和相似的结构,复杂食品样品中 FWAs 的检测需要兼具高效的分离能力和较高的灵敏度^[14,15]。近年来,人们不断开发出针对复杂样品中 FWAs 的检测方法^[16,17]。毛细管电泳(CE)是一种高效分离技术,具有分离效率高、分析时间短、进样量极低、有机溶剂消耗量少以及操作简单等特点^[18-21],被认为是液相色谱技术的有效补充方法。一些研究利用 CE 结合紫外(UV)或激光诱导荧光(LIF)检测,对食品和食品包装材料中的几种 FWAs 进行分析^[22-24]。虽然基于 CE-UV 和 CE-LIF 的检测方法可以高效分离 FWAs,但检测灵敏度相对较低,且对成分结构的鉴别能力不足。在过去的几十年里,电喷雾电离质谱(ESI-MS)凭借灵敏度高、分析质量范围广以及强大的定性能力,被广泛应用于分析化学的许多领域^[25-28]。CE-ESI-MS 结合了 CE 的高分离效率和 ESI-MS 的高灵敏度和分子鉴定能力,尤其适用于食品样品中微量 FWAs 的定性和定量分析。然而,据我们所知,目前尚无 CE-ESI-MS 技术在 FWAs 检测方面的相关报道。

本工作利用毛细管电泳-无鞘流电喷雾电离串联质谱(无鞘流 CE-ESI-MS/MS)联用技术,提出一种用于面粉样品中 FWAs 的高灵敏检测方法。在无鞘流 CE-ESI-MS/MS 技术中,分析物经 CE 分离后通过无鞘流界面直接实现质谱的电喷雾离子化和检测。无鞘流型接口不需要鞘流进行电接触,有效避免了分析物的稀释,显著提高了检测灵敏度。研究表明,无鞘流 CE-ESI-MS/MS 技术不仅具备高效的分离能力,还具有高灵敏度,在复杂食品样品基质中微量 FWAs 的检测方面展现出潜在的应用价值。本文系统考察和优化了可能影响萃取回收率、分离效率和检测灵敏度的相关影响因素,并在最优条件下对该分析方法的分析性能做出了评估,成功实现了 8 种商业面粉样品中 6 种 FWAs 的同时定性定量分析。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

毛细管电泳仪(CESI 8000 plus)与质谱仪(Triple TOF 4600)(AB Sciex, USA)。

6 种荧光增白剂标准品 7-二乙氨基-4-甲基香豆

素(FWA52)、1,2-双(5-甲基-2-苯并恶唑基)乙烯(FWA135)、2,5-双(5-叔丁基-2-苯并恶唑基)噻吩(FWA184)、2,5-双(苯并恶唑-2-基)噻吩(FWA185)、1,4-双(2-苯并恶唑基)萘(FWA367)、4,4-双(2-苯并恶唑基)二苯乙烯(FWA393)(纯度均>98%)以及三氯甲烷(CH_3Cl)均购自鼎国生物技术有限公司(北京)。色谱纯氨水、乙腈和醋酸铵(NH_4Ac)购自阿拉丁生化科技股份有限公司(上海),甲醇(色谱纯)购自赛默飞世尔有限公司(上海)。所有实验用水均为使用 Milli-Q 超纯水系统净化制得的超纯水。CE 系统中使用的两根熔融硅毛细管均购自英诺生物技术有限公司(深圳)。

实际样品检测中使用的 8 种面粉样品(面包粉 1 种、小麦粉 1 种、高筋面粉 2 种、中筋面粉 1 种、雪花粉 3 种)均购自当地超市,密闭保存在离心管中置于阴凉避光处备用。

1.2 溶液配制

6 种荧光增白剂的储备溶液(1 g/L)由氯仿-甲醇(1:4, v/v)溶解配制,并置于棕色玻璃瓶中 4 °C 密封保存,使用前用甲醇稀释到所需浓度。CE 缓冲体系:以甲醇-乙腈(4:1, v/v)溶解的 20 mmol/L 醋酸铵溶液,并用氨水调节至 pH = 10。试验试剂实验当天配制,使用前超声 10 min 并用孔径为 0.22 μm 的聚醚砜(PES)膜过滤。

1.3 无鞘流 CE-ESI-MS/MS 检测条件

毛细管电泳仪与质谱仪通过无鞘流型电喷雾接口实现联用,进行所有后续的分析实验。

总长为 90 cm 的熔融硅毛细管(30 μm i. d., 150 μm o. d.)用于 CE 分析,其有效分离长度为 85 cm。毛细管出口端设计为多孔尖端,作为无鞘流 CE-ESI-MS/MS 的无鞘流接口界面。多孔尖端的制备及其与 ESI-MS 的耦合过程与我们之前的研究^[28]类似,具体步骤如下:将毛细管的一端用砂纸打磨光滑齐平,之后在距离其末端 5 cm 处,通过火焰剥离去除聚酰亚胺涂层,用乙醇将其外壁擦拭干净。将处理好的毛细管插入含有 6 mL 新配制的 48% (质量分数) HF 溶液和 100 μL 辛醇的 10 mL 离心管中,并持续向毛细管内通入 N_2 。离心管中上层的辛醇可以避免 HF 腐蚀未去除涂层部分毛细管外壁, N_2 的持续通入可以防止 HF 通过内部虹吸作用刻蚀毛细管内壁,避免毛细管在腐蚀过程中堵塞。HF 刻蚀过程在通风橱中完成,并保持温度为恒温 25 °C。当 HF 刻蚀时间持续约 20 min 后,将毛细管

尖端部分依次浸入 2.5 mol/L NaOH 中 2 h、超纯水中 3 h,以去除刻蚀过程中毛细管壁残留的多余酸和碱。

CE 系统由分离毛细管和导电液毛细管组成。以经末端多孔刻蚀的 90 cm 毛细管作为分离毛细管,导电液毛细管选用未处理的 80 cm 熔融石英毛细管(50 μm i. d., 365 μm o. d.),二者均安装在 Opti MS 保护卡盒中。CE 分析在 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温条件下进行,分离电压为 +25 kV,辅助压力为 34.5 kPa,进样条件为 10 s \times 34.5 kPa,在分离毛细管和导电液毛细管中均充入 CE 缓冲体系。采用正离子模式(ESI^+)及多反应监测(MRM)模式进行质谱检测,具体参数如下:离子喷雾电压(ISVF)1 600 V,界面加热温度 50 $^{\circ}\text{C}$, gas 1/gas 2/气帘气分别设置为 0/0/0.06 MPa。

在无鞘流 CE-ESI-MS/MS 分析运行之前,在 0.69 MPa 的压力下依次用甲醇(10 min)、水(5 min)、0.1 mol/L NaOH 溶液(2 min)和水(5 min)冲洗和平衡分离毛细管,然后用缓冲体系冲洗 10 min。在两次运行之间,分离毛细管在 0.69 MPa 压力下分别用 0.1 mol/L NaOH 溶液、水和缓冲体系冲洗 4 min,导电液毛细管在 0.5 MPa 压力下用缓冲体系冲洗 3 min。每天实验结束后,分离毛细管和导电液毛细管分别在 0.69 MPa 和 0.5 MPa 压力下用水和甲醇分别冲洗 5 min。

1.4 样品预处理

本文采用超声辅助萃取法对面粉样品进行处理。准确称取固体面粉样品各 0.5 g 于 10 mL 玻璃离心管中,加入 5 mL 氯仿-甲醇(3:2, v/v)涡旋混匀 1 min,将盛有混合溶液的玻璃离心管放入超声波清洗器中,在 30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下超声萃取 20 min。萃取结束后,上述混合物在 5 000 r/min 下离心 10 min,收集的上清液经有机滤膜过滤、 N_2 吹干后再用氯仿-甲醇(1:4, v/v)溶解,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光保存以备后续无鞘流 CE-ESI-MS/MS 检测。

2 结果与讨论

2.1 FWAs 萃取条件优化

高效提取样品中的目标物对于降低基质效应以及提高方法检测灵敏度至关重要。依据“相似相溶”的原则,本工作采用超声辅助萃取法对待测物质进行萃取,通过超声波增大物质分子的运动频率和速度,提高溶剂穿透力,加速目标成分进入溶剂,

从而加速萃取过程。为获得最佳的萃取效果,我们对萃取剂的种类、用量、萃取时间和萃取温度进行了优化。

6 种目标 FWAs 中,FWA393 和 FWA367 仅溶于氯仿,其余 4 种 FWAs 易溶于甲醇和乙腈。因此,本研究采用氯仿-甲醇或氯仿-乙腈的混合溶液作为萃取溶剂。为了最大限度地提高回收率并尽量减少有机溶剂的用量,我们考察了氯仿-乙腈(2:3, v/v, 下同)、氯仿-甲醇(2:3)、氯仿-乙腈(3:2)、氯仿-甲醇(3:2)、氯仿-乙腈(4:1)、氯仿-甲醇(4:1)6 种溶剂对加标样品中待测物质的萃取效果。如图 1a 所示,当选择氯仿与乙腈混合溶液作为萃取溶剂时,FWA393 的回收率始终低于 65%,这可能是由于 FWA393 在乙腈中溶解度较差导致。使用氯仿与甲醇混合溶液作为萃取溶剂时 FWA393 的回收率明显提高,且在氯仿-甲醇(3:2)时各物质萃取效果最佳(回收率 83%~97%),故选择氯仿-甲醇(3:2)作为最优萃取溶剂。萃取溶剂体积的优化结果显示(图 1b),在添加 20 ng/g FWAs 混合标准品的 0.5 g 面粉样品中,5 mL 萃取溶剂体积获得了最佳的回收率。图 1c、1d 显示了萃取时间和温度对每个目标物回收率的影响。图 1c 结果显示,各目标物的回收率在 20 min 内逐渐增加,继续延长时间对物质萃取没有明显促进效果。图 1d 的结果表明,当萃取温度 ≥ 30 $^{\circ}\text{C}$ 时,各目标物的回收率达到最优值。综上,得到优化后的萃取条件(见 1.4 节)。

2.2 CE 分离与无鞘流 ESI-MS/MS 条件优化

为了实现样品中 FWAs 的灵敏检测,首先优化了质谱检测条件。将 FWAs 标准溶液通过 Nano ESI 接口注入质谱仪,并采用全扫描模式分析,扫描范围为 m/z 50~500。对比了质谱正、负离子模式下的信号强度,结果显示正离子模式下信号强度远高于负离子模式,故选择正离子模式进行后续的检测。在正离子扫描模式下,对每种目标物的去簇电压(DP)和碰撞能量(ColE)分别进行了优化,以增强各母离子的碎片峰在二级质谱模式下的信号强度。每种物质产生的两种碎片离子峰分别用于定性和定量。表 1 详细列出了 6 种目标化合物的结构信息和优化的质谱参数。在最优条件下,各物质定量和定性特征峰如图 2 所示。

为了提高方法的分析性能,考察和优化了影响 CE 分离的一些重要因素,包括缓冲体系的组成、pH 和分离辅助压力等。由于 MS 分析需要低电导率、

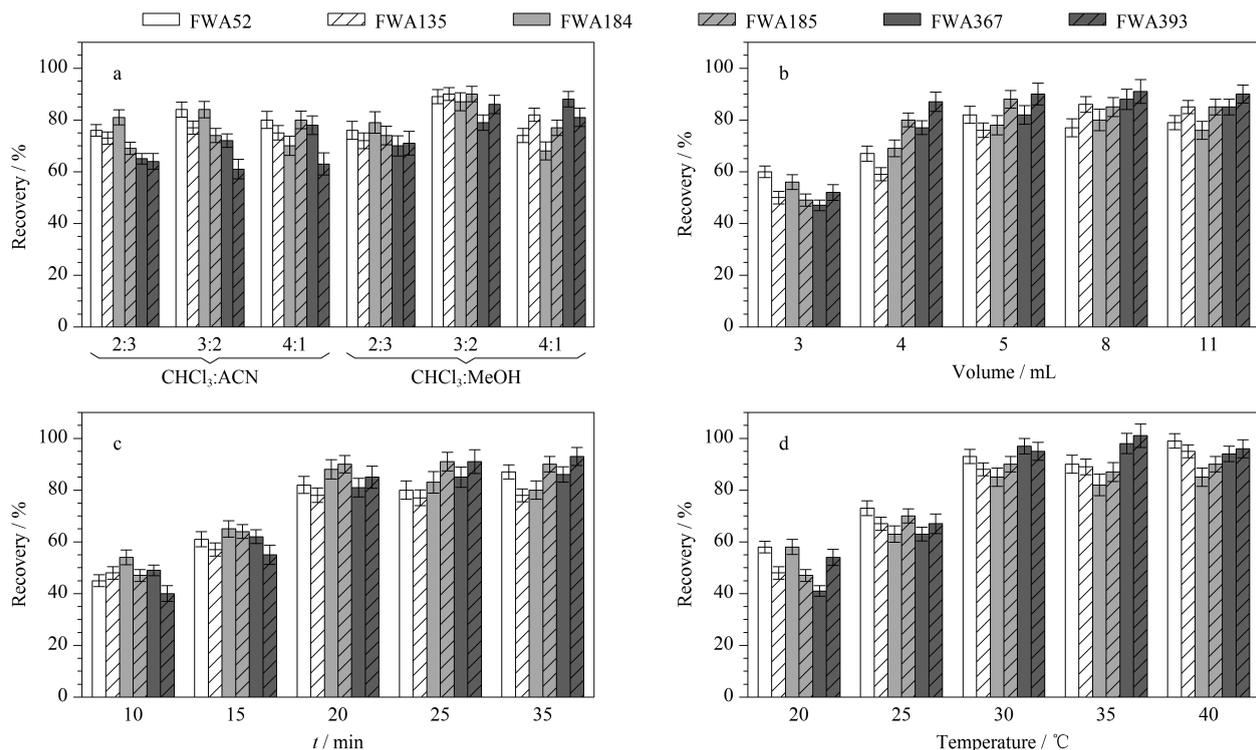


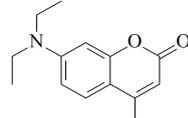
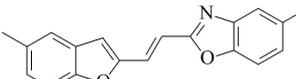
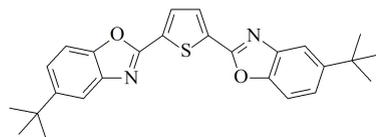
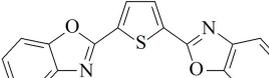
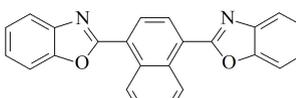
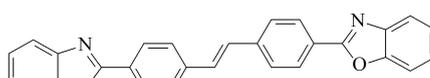
图 1 萃取条件对 FWAs 回收率的影响 ($n=3$)

Fig. 1 Effect of extraction conditions on the recoveries of the fluorescent whitening agents (FWAs) ($n=3$)

a. compositions of the extraction solvents; b. volume of the extraction solvent ($\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$, 3:2, v/v); c. extraction time; d. extraction temperature.

表 1 6 种目标 FWAs 的结构信息和 ESI-MS/MS 参数

Table 1 Structure information and ESI-MS/MS parameters of the six target FWAs

FWA	Molecular formula	Chemical structure	$[M+H]^+$	DP/V	ColE/eV
FWA52	$\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{NO}_2$		232.1650	30	40
FWA135	$\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$		291.1510	30	40
FWA184	$\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$		431.2328	40	40
FWA185	$\text{C}_{18}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$		319.0953	40	45
FWA367	$\text{C}_{24}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$		363.1595	50	40
FWA393	$\text{C}_{28}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$		415.2624	50	45

DP: declustering potential; ColE: collision energy.

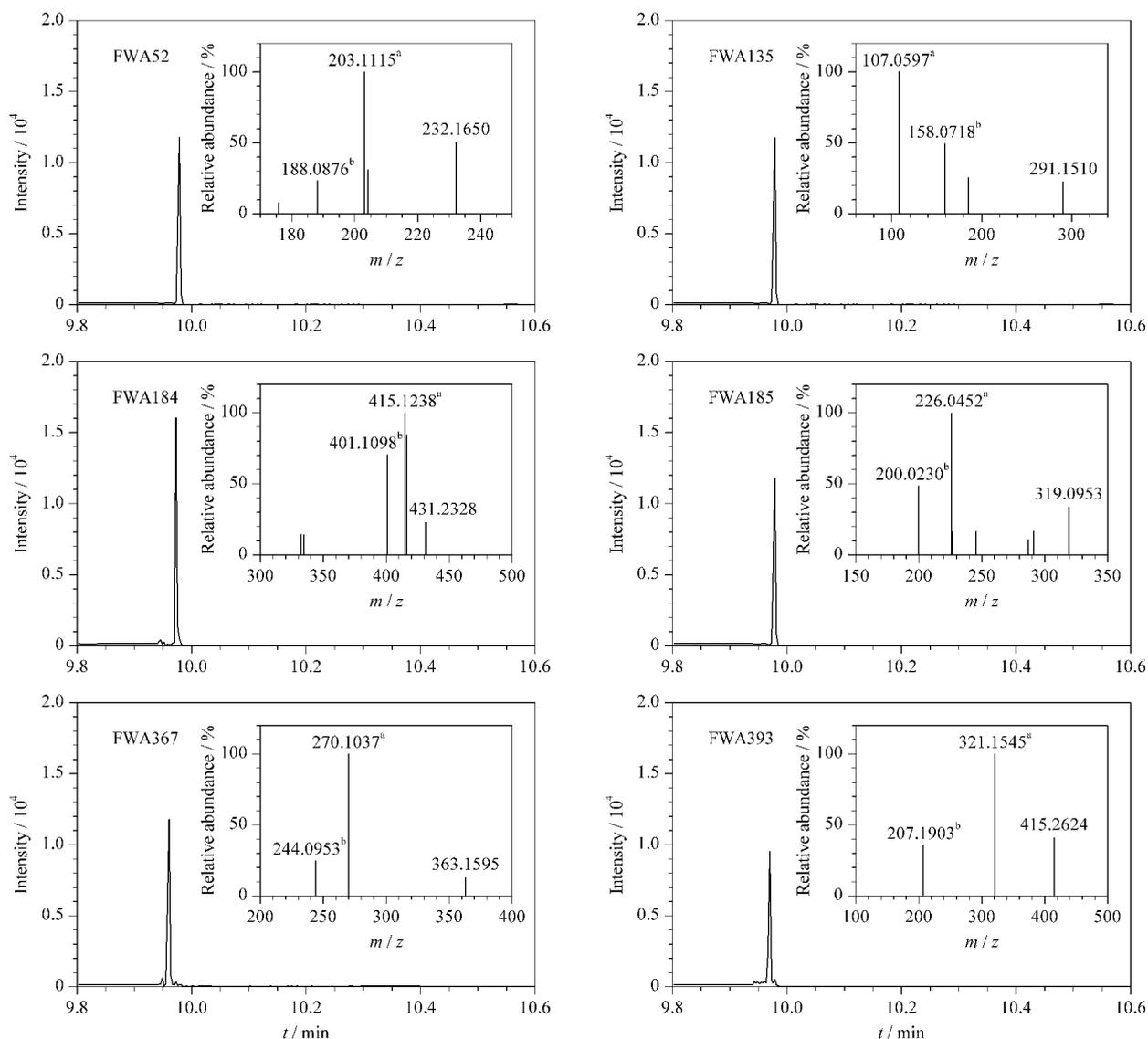


图 2 无鞘流 CE-ESI-MS/MS 检测 6 种 FWAs 的提取离子流图

Fig. 2 Extracted ion electropherograms of the six FWAs by sheathless CE-ESI-MS/MS

Standard solution of each FWA: 100 mg/L. Injection: 34.5 kPa for 10 s; separation voltage: +25 kV; separation auxiliary pressure: 34.5 kPa. The inset figures are the mass spectra of FWAs. a. qualitative ion in MRM mode; b. quantitative ion in MRM mode.

易挥发的背景体系,故本实验选择了有利于 ESI 离子化的常用缓冲体系醋酸铵作为初始的缓冲体系,并考察了其酸碱性对 ESI 离子化效率的影响。首先对比了使用酸性缓冲体系(20 mmol/L 醋酸铵以甲醇(添加 20% (体积分数)HAc)溶解(pH=4.3))和碱性缓冲体系(20 mmol/L 醋酸铵以甲醇溶解后用 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 调至 pH=10)进行测试时得到的总离子流图的信号强度。结果显示,使用酸性缓冲体系对信号产生了明显的抑制,而采用相同浓度碱性缓冲体系时信号强度高、峰形对称且分析速度更快。这是由于在两种缓冲体系条件下,6 种目标物均带负电,而高 pH 的缓冲体系电渗流更大,使得碱性缓冲

体系下峰的迁移时间更短。因此,我们选择碱性缓冲体系进行后续实验。

系统考察了碱性缓冲体系的 pH 值、乙腈添加量及分离辅助压力对各物质信号强度和峰形的影响。如图 3a 所示,随着缓冲体系 pH 的升高,各物质的色谱峰变窄,但当 pH=11 时各物质峰形出现分叉,这可能是由于 ESI 在碱性较高的条件下喷雾不稳定造成的,而 pH=10 条件下各物质峰形最佳。为进一步改善喷雾效果并获得更高的检测信号,我们向缓冲体系中添加不同体积分数的乙腈,如图 3b 所示,当乙腈体积分数为 20% 时,5-FWA367 和 6-FWA393 两种物质的信号峰强度有明显改善,继

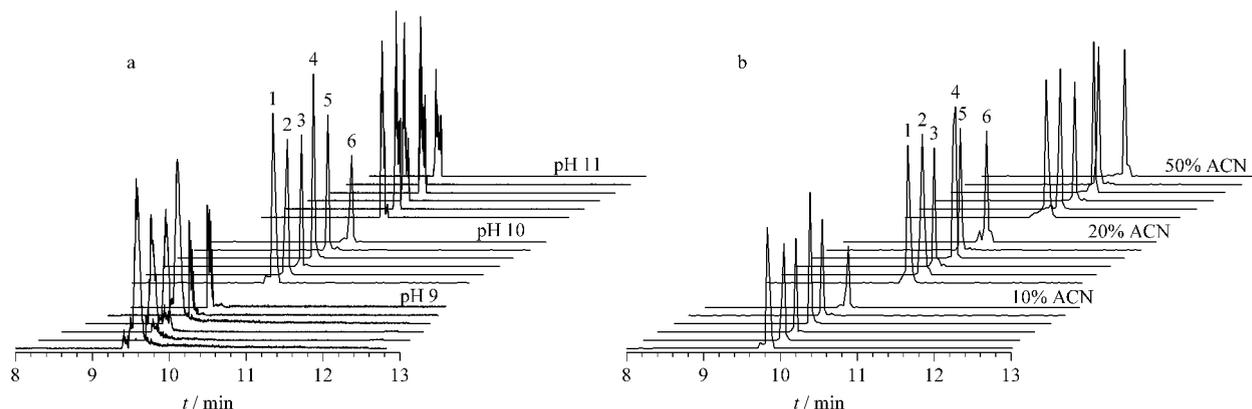


图 3 不同 CE 条件下 6 种荧光增白剂的提取离子流图

Fig. 3 Extracted ion electropherograms of the six FWAs under different CE conditions

a. pH of buffer solution; b. ACN volume fraction in buffer solution. The concentration of FWA393 is 200 mg/L, and 100 mg/L for other five FWAs.

1. FWA52; 2. FWA135; 3. FWA184; 4. FWA185; 5. FWA367; 6. FWA393.

续增加乙腈的体积分数对信号无明显影响,故选择添加 20% 作为乙腈的最佳体积分数。此外我们对 20.7、34.5、61.0 kPa 分离辅助压力下的对检测信号,结果表明分离辅助压力为 34.5 kPa 时,各物质的峰形和信号强度达到最佳。综上,我们选择以甲醇-乙腈 (4:1, v/v) 溶解的 20 mmol/L 醋酸铵溶液,并用氨水调节至 pH=10 作为最优缓冲体系。pH=10, 添加 20% 乙腈的醋酸铵缓冲体系,并在 34.5 kPa 分离辅助压力下进行检测。

2.3 分析性能评估

为评估本方法对面粉样品中 6 种荧光增白剂的分析性能,在优化的最佳实验条件下对 6 种荧光增白剂进行了分析。结果表明,本方法对各目标物均具有较宽的线性范围和良好的线性关系 ($R^2 \geq 0.989$) (见表 2)。通过对未经超声辅助萃取预处理的加标样品直接进行无鞘流 CE-ESI-MS/MS 分析,在信噪比 $S/N=3$ 和 $S/N=10$ 条件下分别对每种

FWA 的仪器检出限 (iLOD) 和定量限 (iLOQ) 进行了评估。如表 2 中结果显示,各目标物的 iLOD 与 iLOQ 分别为 0.35 ~ 2.20 ng/g 与 1.00 ~ 6.50 ng/g。方法的检出限和定量限 (mLOD, $S/N=3$ 和 mLOQ, $S/N=10$) 通过对加标样品进行超声提取后的无鞘流 CE-ESI-MS/MS 分析结果评估,分别为 0.04 ~ 0.67 ng/g 与 0.20 ~ 2.20 ng/g,表明该方法具有较高的灵敏度,可以满足实际食品样品中 FWAs 的检测需求。日内和日间重复性分别通过计算一天内连续 5 次试验和连续 5 天试验结果的 RSD 值进行评估,结果显示峰迁移时间与峰面积的 RSD 值分别不大于 9.1% 和 10.7%,表明方法具有良好的重复性。

由于面粉样品中基质成分复杂,为了减少基质对测定结果的影响,我们对基质效应 (ME) 进行了评估。通过在空白面包粉基质和溶剂氯仿-甲醇 (1:4, v/v) 中分别添加不同浓度的 FWAs 混合标准品,

表 2 各物质的线性范围、回归方程、相关系数、mLODs、mLOQs、iLODs、iLOQs、ME 及重复性

Table 2 Linear ranges, regression equations, correlation coefficients (R^2), mLODs, mLOQs, iLODs, iLOQs, matrix effects (MEs) and repeatabilities

Compound	Linear range/ (ng/g)	Regression equation	R^2	mLOD/ (ng/g)	mLOQ/ (ng/g)	iLOD/ (ng/g)	iLOQ/ (ng/g)	ME	Repeatabilities (RSDs/%)	
									T	A
FWA52	0.2-25	$y = 23.37x + 93.29$	0.989	0.07	0.20	0.55	1.75	1.04	7.3	9.7
FWA135	0.5-25	$y = 20.26x + 22.35$	0.990	0.16	0.50	1.20	3.50	0.80	8.1	8.7
FWA184	0.3-25	$y = 154.49x + 38.71$	0.993	0.04	0.28	0.35	1.00	0.90	6.9	9.0
FWA185	0.5-50	$y = 23.38x + 51.05$	0.994	0.17	0.50	1.20	3.45	1.15	7.4	10.3
FWA367	0.5-50	$y = 10.63x + 2.85$	0.991	0.17	0.50	1.00	3.20	0.87	9.1	10.2
FWA393	2.2-100	$y = 59.83x + 66.82$	0.996	0.67	2.20	2.20	6.50	1.02	6.9	10.7

mLOD: limit of detection of methodology ($S/N=3$); mLOQ: limit of quantification of methodology ($S/N=10$); iLOD: instrumental limit of detection ($S/N=3$); iLOQ: instrumental limit of quantification ($S/N=10$); RSDs: relative standard deviations ($n=5$); T: migration time; A: peak area.

并利用无鞘流 CE-ESI-MS/MS 检测,得出了基质背景下和溶剂中各物质的标准曲线。通过计算每种目标物质在空白基质($k_{\text{基质}}$)和溶剂($k_{\text{标准}}$)中的两条标准曲线的斜率之比进行 ME 的评估。6 种荧光增白剂的 ME 范围为 0.80~1.15(见表 2),表明样品经超声辅助萃取处理后,其基质效应可以忽略。

回收率试验通过向空白面粉样品中加入荧光增白剂标准品作为分析样品来进行。为验证本方法在面粉实际样品检测中的可行性,我们在无 FWAs 的空白面粉样品中加入不同含量的混合标准品(1 倍、2 倍和 10 倍 mLOQ)。如表 3 所示,6 种 FWAs 的加标回收率为 86.2%~103.7%,日内重复性($n=5$)和日间重复性($n=5$)分别不大于 10.2%和 11.5%。实际样品中较高的回收率和良好的重复性表明本方

法适用于面粉样品中 FWAs 的同时准确检测。

采用所建立方法对市售的 8 种不同品牌的面粉中 6 种荧光增白剂进行了检测分析,在 4 种面粉样品中检出不同种类的荧光增白剂,其中 FWA184 在 3 个样品中均被检出,含量分别为 20.35、40.40 和 67.20 ng/g; FWA185 和 FWA393 分别仅在一种样品中被检出,含量分别为 60.50 ng/g 和 15.70 ng/g;其余 3 种 FWAs 均未在样品中检出。由于 FWAs 在生产过程中禁止作为食品添加剂使用,市售面粉样品中 FWAs 的阳性检测结果可能源于食品包装的迁移或非法添加。图 4 给出了 4 个阳性样品的提取离子流图。

表 4 中,我们将无鞘流 CE-ESI-MS/MS 技术与其他技术对面粉中 FWAs 的检测性能进行了对比。

表 3 3 种不同加标水平下方法的平均回收率和重复性

Table 3 Mean recoveries and repeatabilities of the proposed method at three spiked levels

Compound	Added/(ng/g)			Recoveries (RSDs)/% ($n=5$)			Repeatabilities (RSDs)/% ($n=5$)	
	1×mLOQ	2×mLOQ	10×mLOQ	1×mLOQ	2×mLOQ	10×mLOQ	Intraday	Interday
FWA52	2.0	4.0	20.0	102.2 (7.4)	92.4 (9.2)	89.2 (8.7)	8.9	9.1
FWA135	4.5	9.0	45.0	90.4 (7.9)	89.5 (9.2)	101.4 (9.6)	10.2	11.5
FWA184	1.5	3.0	15.0	100.2 (6.9)	86.2 (7.2)	91.2 (9.0)	7.9	9.4
FWA185	5.0	10.0	50.0	95.3 (7.4)	101.9 (9.5)	92.6 (6.3)	8.6	10.2
FWA367	5.0	10.0	50.0	87.4 (6.5)	88.2 (8.7)	92.7 (7.8)	9.6	11.3
FWA393	15.0	30.0	150.0	103.7 (9.8)	88.6 (9.4)	87.5 (10.2)	7.8	10.7

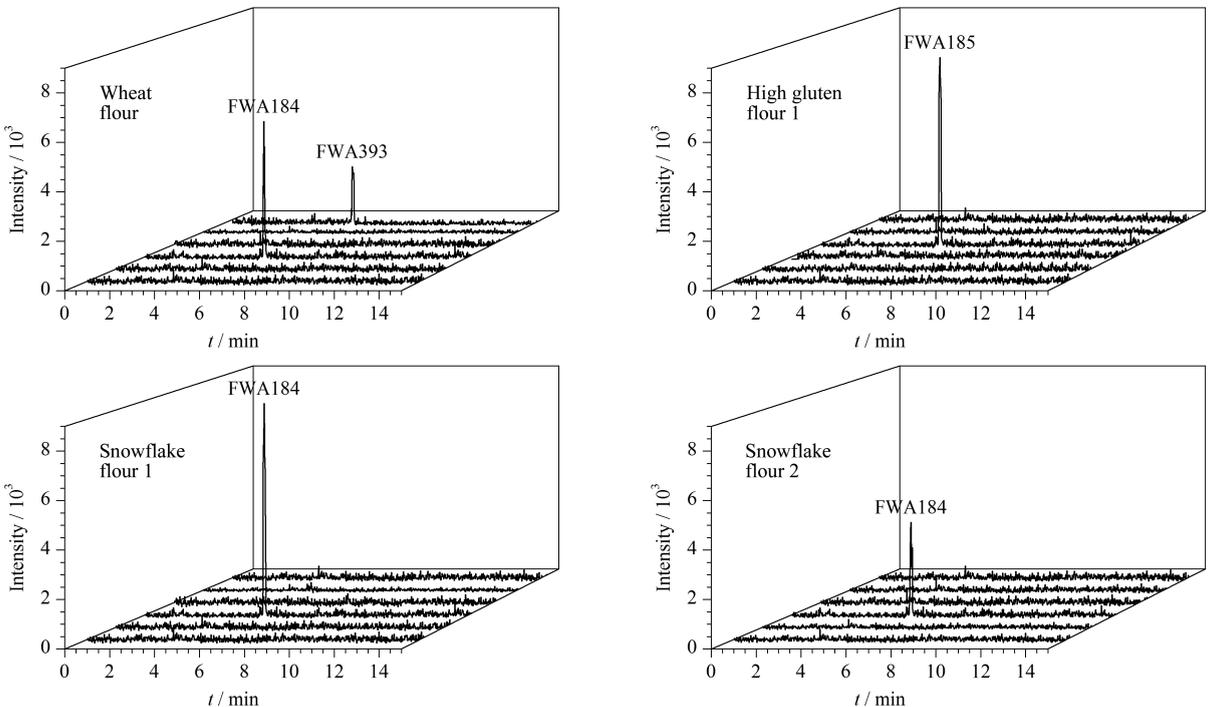


图 4 4 种阳性面粉样品经无鞘流 CE-ESI-MS/MS 检测得到的提取离子流图

Fig. 4 Extracted ion electropherograms of four positive flour samples using sheathless CE-ESI-MS/MS

The conditions for sheathless CE-ESI-MS/MS are the same as in Fig. 2.

可以看出,得益于 CE 的高效分离和 MS 的高灵敏检测,采用本方法检测面粉样品中的 FWAs 具有较高的灵敏度和较宽的线性范围。此外,由于毛细管小体积的优势,单次检测所需的进样量低至纳升级,检测中消耗的试剂量也相对较少,符合绿色化学的理念。

表 4 本文方法与其他方法对面粉中 FWAs 的检测性能的比较
Table 4 Comparison of this method with other methods for the detection of FWAs in flour

Injection volume/ μL	Analysis method	Pre-treatment	Target	LOD/ (μg/L)	Linear range/ (μg/L)	Ref.
5.0	UPLC-MS/MS	UAE	FWA52	0.2 ^a	0.2-20.0	[29]
			FWA135	0.2 ^a	0.2-20.0	
			FWA185	0.5 ^a	0.5-50.0	
			FWA393	2.0 ^a	2.0-200	
			FWA367	0.5 ^a	0.5-50.0	
			FWA368	2.0 ^a	2.0-200	
			FWA184	0.2 ^a	0.2-20.0	
10	HPLC-MS/MS	LPE	FWA135	1.10	1.0-64.0	[14]
			FWA140	0.50	2.0-64.0	
			FWA162	1.75	0.2-64.0	
			FWA184	1.35	0.1-32.0	
			FWA185	0.70	0.2-64.0	
			FWA367	1.05	1.0-64.0	
			FWA393	2.65	1.0-64.0	
10	HPTLC-MS	UAE	FWA184	18	100-2000	[8]
			FWA367	21	100-2000	
Solid 0.001	MM-IR sheathless CE-ESI-MS/MS	-	FWA393	10	-	[16] this work
			FWA52	0.07	0.2-25	
			FWA135	0.16	0.5-25	
			FWA184	0.04	0.3-25	
			FWA185	0.17	0.5-50	
			FWA367	0.17	0.5-50	
			FWA393	0.67	2.2-100	

a: LOQ; MM-IR: multi-molecular infrared spectroscopy; UAE: ultrasonic-assisted extraction; LPE: liquid phase extraction.

3 结论

本工作建立了一种利用无鞘流 CE-ESI-MS/MS 实现食品样品中 FWAs 同时高灵敏检测的方法,系统考察了可能影响 CE 分离、质谱检测和超声波辅助萃取的相关实验条件,在最优条件下评估了该方法对 6 种 FWAs 的检测性能。结果显示,该方法能够在较宽的线性范围内对 FWAs 进行准确、灵敏的分析,具有较低的检出限和较高的重复性。该方法成功应用于商业面粉样品中 6 种 FWAs 的同时定性定量分析。上述结果表明,CE 与无鞘流 ESI-MS/MS 的结合能够实现食品样品中微量 FWAs 的准确定量分析,在食品安全领域具有重要的应用价值。

参考文献:

- [1] Shen Y J, Ren S W. *Dyes Pigments*, 1991, 15(2): 157
- [2] Wu Z J, Xu Y S, Li M C, et al. *RSC Adv*, 2016, 6(22): 17941
- [3] Song Y Z, Zhang X X, Ma B, et al. *Anal Chim Acta*, 2017, 995: 85
- [4] Stoll J, Giger W. *Anal Chem*, 1997, 69(13): 2594
- [5] Salas H, Gutiérrez-Bouzán C, López-Grimau V, et al. *Materials*, 2019, 12(3): 785
- [6] Wu Q, He B W, Guo R Y, et al. *Environ Pollut*, 2021, 291: 118235
- [7] Zhou W L, Ding L, Cheng Y H, et al. *Food Addit Contam Part A*, 2022, 39: 1337
- [8] Chen Y S, Huang C H, Xu X M. *Anal Methods-UK*, 2021, 14(6): 814
- [9] Jung H, Seok S H, Han J H, et al. *J Appl Toxicol*, 2011, 32(9): 654
- [10] Zhao L, Liu J, Guo R, et al. *RSC Adv*, 2017, 7(44): 27796
- [11] GB 2760-2014
- [12] GB 9685-2016
- [13] 2011/10/EC
- [14] Li R, He C M, Bo Y N, et al. *Chinese Journal of Chromatography*, 2017, 35(2): 162
李蓉, 何春梅, 薄艳娜, 等. 色谱, 2017, 35(2): 162
- [15] Chen H C, Wang S P, Wang H, et al. *J Chromatogr A*, 2006, 1102(2): 135
- [16] Pan Q, Xie J, Lin L, et al. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2020, 250(10): 119353
- [17] Yang S W, Fang W L, Wang X, et al. *Anal Chim Acta*, 2023, 1284(10): 341997
- [18] Van Schepdael A. *TrAC-Trends Anal Chem*, 2023, 160(2): 116992
- [19] Liu M X, Li X J, Bai Y, et al. *Chinese Journal of Chromatography*, 2020, 38(3): 317
刘明霞, 李向军, 白玉, 等. 色谱, 2020, 38(3): 317
- [20] Wen Y L, Shao Y C, Zhao X Y, et al. *Chinese Journal of Chromatography*, 2023, 41(5): 377
温亚伦, 邵宇辰, 赵新颖, 等. 色谱, 2023, 41(5): 377
- [21] Wang G X, Chen Y L, Lü W J, et al. *Chinese Journal of Chromatography*, 2023, 41(10): 835
王国秀, 陈永雷, 吕文娟, 等. 色谱, 2023, 41(10): 835
- [22] Wang S P, Huang S P. *Electrophoresis*, 2001; 22(11): 2222
- [23] Zhai H Y, Yuan K S, Yu X, et al. *Electrophoresis*, 2015, 36(20): 2509
- [24] Wang Q, Yang G L, Zhang L. *Chinese Journal of Chromatography*, 2007, 35(3): 341
王全, 杨更亮, 张骊. 色谱, 2007, 35(3): 341
- [25] Zhang H Z, Li F, Kang J W. *Chinese Journal of Chromatography*, 2023, 41(2): 160
张含智, 李凤, 康经武. 色谱, 2023, 41(2): 160
- [26] Su Y, Zhu Y, Fang Q. *Lab Chip*, 2013, 13(10): 1876
- [27] Chi Z M, Yang L. *Chinese Journal of Chromatography*, 2022, 40(6): 509
迟忠美, 杨丽. 色谱, 2022, 40(6): 509
- [28] Wang A P, Liu J N, Yang J L, et al. *Anal Chim Acta*, 2023, 1239: 340750
- [29] Wu Y L, Xian Y P, Guo X D, et al. *Food Chem*, 2018, 243: 162