2011 年 6 月
第 1 卷　第 1 期

中 国 渔 业 质 量 与 标 准
Chinese Fishery Quality and Standards

June. 2011
Vol. 1　No. 1

液相色谱串联质谱法测定大菱鲆和鳜鱼体中地西泮及其代谢物残留的研究

于慧娟*，钱蓓蕾，黄冬梅，苏　惠，顾润润，冯　兵

（农业部水产品质量监督检验测试中心（上海），上海 200090）

摘要：建立了高效液相色谱 - 串联质谱（HPLC/MS/MS）测定鱼类样品中地西泮及其代谢物去甲地西泮、替马西泮和奥沙西泮的分析方法。样品用 1% 氨化乙酸乙酯提取，HLB 固相萃取柱净化，乙酸乙酯洗脱。在正离子模式下以电喷雾串联质谱仪进行测定，以氘代地西泮、氘代去甲地西泮、氘代替马西泮和氘代奥沙西泮为内标物，内标法定量。以大菱鲆和鳜鱼为研究对象，在 1.0、10.0 和 50.0 μg/kg 添加水平下，方法平均回收率为 85.7% ~105.6%（批内），相对标准偏差为 2.1% ~7.6%（批内），方法定量限为 1.0 μg/kg（S/N >10）。实验结果表明：该方法简单、快速、准确度高、重复性好，适合于鱼类样品中地西泮及其代谢物残留的检测。［中国渔业质量与标准，2011，1（1）：54 -59］

关键词：地西泮；代谢物；残留；液质联用；大菱鲆；鳜鱼

中图分类号：S94　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：2095 -1833（2011）01 -0054 -06

地西泮，又称安定，是一种中枢神经系统镇静剂，其化学名称为 1 -甲基 -5 -苯基 -7 氯 -1，3 -二氢 -2H -1，4 -苯并二氮卓 -2 -酮。它主要用于人和动物镇静、催眠、癫痫的治疗；畜牧生产中用作动物抗运输应激的药物，亦被大量非法用作动物增重促进剂。地西泮的代谢主要是在肝脏进行，代谢产物共有 5 ~6 种，其中 3 种主要代谢物是去甲地西泮、替马西泮和奥沙西泮。近年来，一些不法分子擅自在水产动物捕捞和运输过程中非法使用地西泮，造成了其在水产品中残留，当人们长期摄入这些含有地西泮残留的水产品后，肝脏负担加重，头脑昏昏沉沉，记忆受损，个别人出现皮疹、白细胞减少及运动神经和肌肉功能受到抑制。为控制地西泮在动物源性食品中的残留，农业部 235 号公告[1]将地西泮规定为“允许作治疗用，但不得在动物性食品中检出”。

目前，地西泮及其代谢物的测定方法有高效液相色谱法（HPLC）[2-6]、高效液相色谱 - 串联质谱法（HPLC - MS/MS）[7-11]、气相色谱质谱法（GC - MS）[12]、气相色谱 ECD 检测器（GC - ECD）[13-14]、固相萃取 - 紫外导数光谱检测[15]、吸收光谱联用仪 - 紫外线（TLC - UV）[16]和酶联免疫法[17]等。HPLC、TLC 等方法受灵敏度限制，无法满足目前残留分析的要求。HPLC/MS/MS 是目前常用的测定方法，可以同时进行地西泮及其代谢物的定性与定量分析，定量下限达 1.0 μg/kg，但测定对象多集中在人体血浆、尿液、头发及猪肌肉、肾脏及肝脏等，对水产品如鱼类产品中地西泮及代谢物的残留检测则未见报道。本研究拟采用高效液相色谱 - 串联质谱联用技术，开发大菱鲆和鳜鱼体中地西泮及其代谢物残留检测方法，在以往研究的基础上，对仪器分析条件和样品前处理方法进行改进和优化，并对方法的有效性进行评价，为鱼类样品中地西泮及其代谢物残留检测标准的制定提供技术支撑。

1　实验部分

1.1　主要仪器

TSQ Quantumn Acesses 高效液相色谱 - 四级杆串联质谱联用仪（塞默飞世尔科技有限公司），3510 超声波清洗器（美国），固相萃取装置（美国 Supelco 公司），Organomation 氮吹仪（美国 Supelco 公司），TDL -60B 离心机（上海安亭科学仪器厂）。

1.2　主要试剂与材料

地西泮、去甲地西泮、奥沙西泮、替马西泮：均为 1 mg/mL 的甲醇溶液（美国剑桥），同位素内标物（D_5 -地西泮、D_5 -去甲地西泮、D_5 -奥沙西泮和 D_5 -替

收稿日期：2011 -04 -21；**接收日期**：2011 -05 -16

资助项目：农财发 2010［49］号，No. 12300

作者简介：于慧娟（1960 -），女，研究员，研究方向为水产品质量安全管理与检测。E -mail：yuhuijuan607@sohu.com

马西泮):均为100 μg/mL的甲醇溶液(美国剑桥)。乙腈、甲醇(液相色谱纯,Sigma公司);正己烷、氯化钠(分析纯,上海国药公司);甲酸、氨水(液相色谱纯,Sigma公司),实验用水为Milli-Q超纯水。固相萃取柱:Oasis HLB 6 mL,200 mg(Waters公司);样品为均质后的阴性大菱鲆和鳜鱼鱼糜。

1.3 标准工作液和内标工作液的配制

1.3.1 混合标准储备液

分别移取一定量的地西泮、去甲地西泮、奥沙西泮和替马西泮,用甲醇稀释配制成浓度均为1 μg/mL的混合溶液,-18 ℃保存。

1.3.2 混合内标工作液

分别移取一定量的同位素内标物,用甲醇稀释配制成浓度均为100 ng/mL的内标工作液,4 ℃保存。

1.4 样品前处理

1.4.1 提取

称取样品2.0 g(精确至0.05 g)置于50 mL离心管中,准确加入50 μL内标工作液,避光放置10 min。加入15 mL 1%氨水的乙酸乙酯(V/V),涡漩混合1 min,超声提取10 min,震荡提取2 min,4 000 r/min离心10 min,将上清液移至鸡心瓶中,残渣按上述方法重复操作一次,合并提取液,35 ℃减压蒸干。

1.4.2 净化

向鸡心瓶中加入3 mL乙腈,6 mL正己烷,涡旋混合至瓶内壁残留物全部溶解下来,然后将鸡心瓶中液体转移至离心管中,4 000 r/min离心5 min,弃去正己烷层。向乙腈层中加入9 mL水,混匀均匀,然后将此液体加入到用5 mL甲醇和5 mL水活化好的HLB固相萃取柱中,待样液全部流出后,分别用5 mL 5%甲醇-水和5 mL水淋洗,真空抽干,用10 mL乙酸乙酯洗脱。洗脱液于35 ℃减压蒸干,用1 mL甲醇-水(1:1,V/V)溶解残渣,经0.22 μm滤膜过滤后,上机测定。

1.5 液相色谱-质谱条件

1.5.1 液相色谱分析条件

色谱柱:Capcell Pak MG Ⅱ C_{18}(100 mm×2.1 mm,3.5 μm),

柱温:25 ℃,进样量:20 μL。

流动相:A-0.1%甲酸水溶液,B-甲醇。梯度洗脱程序:0~2.00 min,95% A;2.1~10.0 min,5% A;10.10~15.00 min,95% A;流速为0.2 mL/min。

1.5.2 质谱条件

电喷雾离子源,正离子扫描,选择反应监测(SRM);

喷雾电压:4 500 V;离子传输毛细管温度:350 ℃;源内碰撞诱导解离电压:16 V;碰撞气压力:1.5 mTorr;鞘气流速:11.0 L/h;辅助气流速:6.0 L/h。定性、定量离子及碰撞能量见表1。

表1 地西泮及其代谢物母离子、子离子及碰撞能量

Tab.1 Qualitative ions, quantitative ions and collision energy for diazepam and its metabolites

化合物	母离子/($m \cdot z^{-1}$)	子离子/($m \cdot z^{-1}$)	碰撞能量/eV
地西泮	285.0	193.0*	32
		222.0	27
去甲地西泮	271.0	140.0*	20
		164.9	20
奥沙西泮	287.0	240.9*	18
		104.1	41
替马西泮	301.0	254.9*	13
		177.0	34
D_5-地西泮	290.0	198.0	27
D_5-去甲地西泮	276.0	213.1	20
D_5-奥沙西泮	292.0	246.0	17
D_5-替马西泮	306.1	260.0	17

注:*为定量离子。

2 结果与讨论

2.1 流动相的优化

为选择最佳的流动相,实验中分别考察了乙腈-0.1%甲酸水溶液和甲醇-0.1%甲酸水溶液两种流动相体系对目标化合物灵敏度和峰形的影响。实验结果表明:以乙腈-甲酸和甲醇-甲酸两种体系为流动相时,目标化合物的质谱信号的响应值存在差别,甲醇-甲酸体系灵敏度高且噪音小,同时安全性和经济性较乙腈-甲酸好,因此将甲醇-0.1%甲酸确定为测定地西泮及其代谢物的最佳流动相。

2.2 离子源条件的优化及定性、定量离子的选取

将浓度分别为1 μg/mL的地西泮及其代谢物混合标准溶液以蠕动泵进样方式注入质谱仪中,在m/z 150~500范围内以正离子模式进行一级质谱全扫描,确定地西泮及代谢物的分子离子峰;以地西泮分子离子峰为母离子,对离子源参数(喷雾电压、鞘气、辅助气、源内碰撞诱导解离电压)进行优化,确定最佳离子源测定参数;然后在不同碰撞能量下分别对目标化合物进行二级全扫描,以确定目标化合物的主要离子碎片,选取离子丰度较高、干扰较小的碎片离子

作为目标化合物的定性离子和定量离子，地西泮及代谢物的定性、定量离子及碰撞能量见表1。

2.3 样品前处理方法的研究

2.3.1 提取剂的研究

文献中报导的用于地西泮及其代谢物提取的提取剂分别有氯仿、二氯甲烷、二氯甲烷－正己烷、乙腈、乙酸乙酯和醚等，提取实验在酸性或碱性条件下进行，提取对象多为人体血浆、头发，饲料和猪肝或猪肾。为了寻找适合水产品－鱼类生物体中地西泮及其代谢物残留物的提取剂，首先对待测物的性质、提取剂的特点及水产品的性质进行了研究，经筛选，确定采用1%氨化乙酸乙酯和1%氨化乙腈做为鱼类生物体中地西泮及其代谢物残留物的提取剂，其原因是：1）该类化合物在酸性条件下易分解，在碱性条件下稳定，并呈分子态存在于样品中，所以提取确定在碱性条件下进行；2）氯仿、二氯甲烷的比重较大，在提取和离心分离后样品悬浮在提取剂的上方，致使提取液较难从离心管中取出，操作难度较大；3）醚类提取剂因沸点低、气味重，易于给操作人员的身体带来危害。

为了评价1%氨化乙酸乙酯和1%氨化乙腈对鱼类样品中地西泮及其代谢物的提取效率和操作的可行性，对阴性的大菱鲆和鳜鱼鱼糜进行标准添加实验，由对比实验可知：两种提取剂对地西泮及其代谢物的提取效率相差不大，回收率均可达到80%以上，但用1%氨化乙腈作提取剂时，由于乙腈为亲水性溶剂，使提取液中含有少量的水，致使在后步的蒸发浓缩过程中易出现爆沸现象，使蒸发浓缩难于正常进行，因此将1%氨化乙酸乙酯确定为最佳提取剂。

2.3.2 净化方法的研究

样品经1%的氨化乙酸乙酯提取后，由于脂溶性杂质较多，上柱液易于乳化，致使直接用HLB固相萃取柱净化时，净化效果差、且固相萃取柱易于堵塞，因此实验中采用先正己烷液－液萃取，去除大部分脂溶性杂质后，再用HLB固相萃取柱进行净化，以达到最佳的去除杂质的目的。实验结果表明，该种净化方法净化效果好，不但去除了大量杂质，消除了干扰，而且易于操作，保证了分析的稳定性，空白样品及标准样品分离谱图见图1～图3。

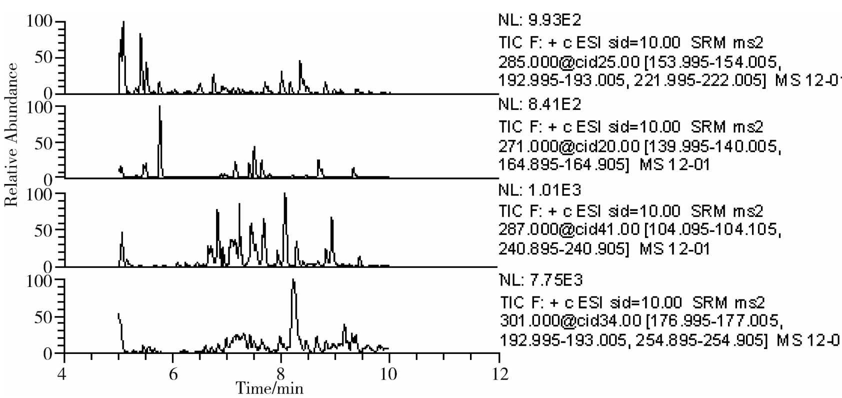

图1 大菱鲆空白样品谱图

Fig. 1 Chromatograms of Turbot blank sample

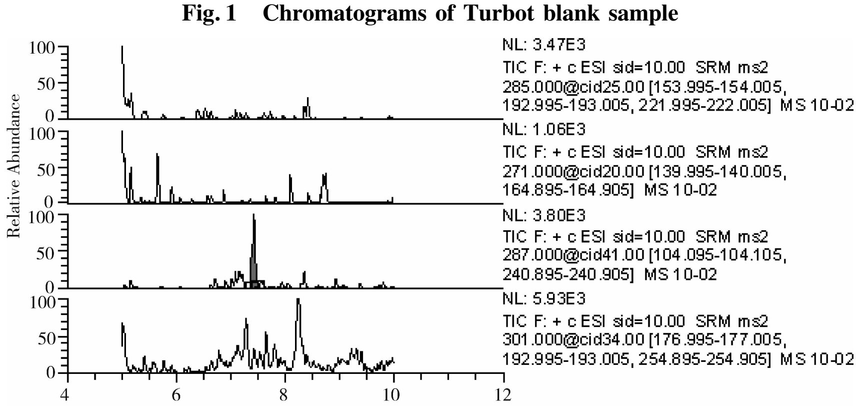

图2 鳜鱼空白样品谱图

Fig. 2 Chromatograms of Mandarinfish blank sample

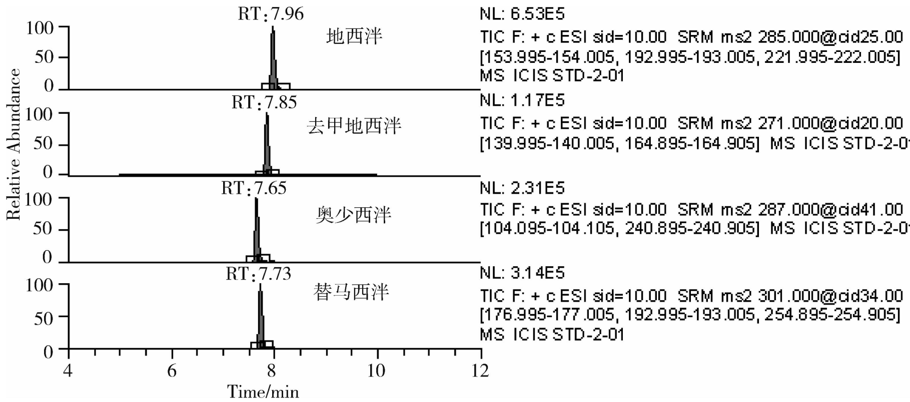

图 3　地西泮及代谢物标准溶液谱图(浓度均为 5 ng·mL^{-1})

Fig. 3　Chromatograms of diazepam and its metabolites standard solution

由样品空白谱图和标样谱图对比可知,该分析方法选择性高,在被测物出峰处样品本底基本无干扰,地西泮及其代谢物定性、定量准确。

2.4　方法有效性评价

采用准确度、精密度、灵敏度和线性范围等几个指标评价方法的有效性。

2.4.1　方法准确度和精密度

为考察方法的准确度及精密度,按 1.4 和 1.5 方法以阴性的鳜鱼和大菱鲆为测试对象,进行标准添加实验,添加水平为 1、10 和 50 μg/kg,每个加标水平做 6 个平行试验,每个水平在 1 个月内重复 4 次,待测药物批内和批间的加标回收率及精密度测定结果见表 2 和表 3。

由表 2 和表 3 的数据可知,地西泮及其代谢物在鳜鱼和大菱鲆鱼糜样品中添加水平为 1、10 和 50 μg/kg时,批内平均回收率和精密度分别在 85.7% ~ 105.6% 和 2.1% ~7.6% 之间,批间平均回收率和精密度分别在 88.9% ~103.9% 和 2.2% ~8.2% 之间,由此可见,该分析方法准确度高,重现性好。准确度和精密度满足药残检测的要求。

表 2　地西泮及其代谢物批内回收率和精密度

Tab. 2　The intra – batch recovery and RSD of diazepam and its metabolites　　n = 6; $\bar{x}$ ± SD

化合物	添加水平/(μg·kg^{-1})	鳜鱼		大菱鲆	
		平均回收率/%	RSD/%	平均回收率/%	RSD/%
地西泮	1.0	85.7 ± 3.97	4.6	100.8 ± 6.25	6.2
	10.0	96.6 ± 7.34	7.6	101.3 ± 4.25	4.2
	50.0	103.6 ± 2.90	2.8	92.7 ± 3.62	3.9
去甲地西泮	1.0	86.8 ± 6.33	7.3	103.0 ± 7.00	6.8
	10.0	97.4 ± 4.87	5.0	93.3 ± 3.64	3.9
	50.0	97.1 ± 3.69	3.8	89.5 ± 1.88	2.1
奥沙西泮	1.0	94.8 ± 6.26	6.6	108.0 ± 4.87	4.8
	10.0	100.5 ± 4.53	4.5	90.6 ± 2.62	2.9
	50.0	95.0 ± 2.10	2.2	95.6 ± 4.68	4.9
替马西泮	1.0	102.9 ± 5.97	5.8	96.4 ± 4.92	5.1
	10.0	105.6 ± 4.01	3.8	102.1 ± 3.78	3.7
	50.0	102.4 ± 2.66	2.6	98.5 ± 4.73	4.8

表 3 地西泮及其代谢物批间回收率和精密度

Tab. 3 The inter - batch recovery and RSD of diazepam and its metabolites n = 4; $\bar{x}$ ± SD

化合物	添加水平/(μg·kg⁻¹)	鳜鱼		大菱鲆	
		平均回收率/%	RSD/%	平均回收率/%	RSD/%
地西泮	0.5	88.9 ±4.46	5.0	99.8 ±6.19	6.2
	1.0	94.6 ±4.07	4.3	101.3 ±5.57	5.5
	10.0	101.6 ±2.54	2.5	94.7 ±3.50	3.7
去甲地西泮	0.5	90.8 ±5.34	5.9	102.7 ±8.42	8.2
	1.0	96.4 ±2.70	2.8	95.3 ±3.72	3.9
	10.0	97.7 ±3.32	3.4	96.5 ±3.86	4.0
奥沙西泮	0.5	95.8 ±6.32	6.6	100.0 ±3.80	3.8
	1.0	97.5 ±4.39	4.5	97.6 ±3.73	2.2
	10.0	97.0 ±2.13	2.2	98.6 ±3.55	3.6
替马西泮	0.5	103.9 ±6.23	6.0	96.4 ±4.82	5.0
	1.0	101.6 ±4.88	4.8	96.1 ±4.64	3.1
	10.0	100.4 ±2.61	2.6	103.7 ±4.46	4.3

2.4.2 方法定量限及线性范围

2.4.2.1 方法的定量限

经实验测得地西泮及其代谢物在加标量为 1.0 μg/kg 时，不论是批内还是批间平均回收率均大于 80.0% ，精密度小于 8.2%，信噪比大于 10，因此将 1.0 μg/kg 定为地西泮及代谢物的定量限。

2.4.2.2 方法的线性范围

将地西泮及代谢物配制成不同浓度的标准溶液，进行分析，以待测物与内标物的峰面积比为纵坐标，待测物的质量浓度为横坐标作线性回归分析。地西泮及其代谢物在浓度为 1 ~250 ng/mL 的范围内呈良好的线性关系，相关系数 R^2 均大于 0.999 0。

表 4 回归方程和线性范围

Tab. 4 Regression equation and linearity range

化合物	回归方程	线性范围(ng·mL⁻¹)	相关系数
地西泮	$Y = 0.068\ 322\ 8X + 0.079\ 525\ 5$	1 ~250	0.999 3
去甲地西泮	$Y = 0.087\ 893\ 3X - 0.642\ 673$	1 ~250	0.999 6
奥沙西泮	$Y = 0.071\ 948\ 2X - 0.358\ 441$	1 ~250	0.999 5
替马西泮	$Y = 0.027\ 986\ 7X + 0.021\ 554\ 7$	1 ~250	0.999 2

2.5 实际样品测定

采用本研究建立的 LC - MS/MS 测定地西泮及其代谢物残留的方法对上海市场上常见的高值鱼类如鲈鱼、鳗鱼、鳜鱼和大菱鲆进行取样，每个品种取 5 个样品进行地西泮及代谢物残留分析，实验结果显示所取样品中均未检出地西泮及其代谢物残留。

参考文献:

[1] 农业部 235 号公告. 动物性食品中兽药最高残留限量[Z]. 2002.

[2] 万捷，夏晖，周宏灏. 高效液相色谱法检测人血浆中安定及其代谢产物的浓度[J]. 色谱，1996，14(4)：303 - 305.

[3] NY/T 934 - 2005，饲料中地西泮的测定 高效液相色谱法[S].

[4] NY/T 1458 - 2007, 饲料中盐酸异丙嗪、盐酸氯丙嗪、地西泮、盐酸硫利达氯嗪和奋乃进的同步测定 高效液相色谱法和液质联用法[S].

[5] Borges K B, Freire E F, Martins I, et al. Simultaneous determination of multibenzodiazepines by HPLC/UV: Investigation of liquid - liquid and solid - phase extractions in human plasma [J]. Talanta, 2009, (78): 233 - 241.

[6] Mahjoub A E, Staub C. Simultaneous determination of benzodiazepines in whole blood or serum by HPLC/DAD with a semi - micro column [J]. J Pharm Biomed Anal, 2000, (23): 447 - 458..

[7] Villain M, Concheiro M, Cirimela V, et al. Screening method for benzodiazepines and hypnotics in hair at pg/mg level by liquid chromatography - mass spectrometry/mass spectrometry [J]. J Chromatography B, 2005, (825): 72 - 78.

[8] Irving R C, Dickson S J. The detection of sedatives in hair and nail samples using tandem LC - MS - MS [J]. Forensic Sci Int, 2007, (166): 58 - 67.

[9] Kintz P, Villain M, Concheiro M, et al. Screen and confirmatory method for benzodiazepines and hypnotics in oral fluid by LC - MS/MS [J]. Forensic Sci Int, 2005, (150): 213 - 220.

[10] Smink B E, Brandsma J E, Dijkhuizen A, et al. Quantitative analysis of 33 benzodiazepines, metabolites and benzodiazepine - like substances in whole blood by liquid chromatography - (tandem) mass spectrometry [J]. J Chromatography B, 2004, (811): 13 - 20.

[11] 黄士新,张文刚,李丹妮. 超高效液相色谱 - 质谱法测定血浆和尿样地西泮[J]. 饲料检测, 2009, (2): 49 - 51.

[12] 金永春,蔡明招,黄晓兰,等. 人血中 10 种常见毒品的 GC - MS 同时检测方法研究[J]. 分析测试学报, 2007, 26(2): 151 - 155.

[13] 张玉洁, 张素霞, 程林丽, 等. GC - μECD 法快速检测猪肉地西泮残留[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(18): 8316 - 8317,8326.

[14] 刘雅红, 李西瑞, 刘戎. 猪血浆与组织中地西泮的 GC - ECD 检测方法[J]. 中国兽医杂志, 2003, 39(9): 46 - 49.

[15] 谭家镒, 姜兆林, 吴玉红. 血、肝、尿中地西泮等 4 种药物的固相萃取 - 紫外导数光谱检测法[J]. 分析化学, 1999, 27(11): 1317 - 1319.

[16] 张胜强, 许清, 胡伟荣. TLC - UV 法检测小鼠体内的安定[J]. 中国药科大学学报, 1995, 28(1): 20 - 22.

[17] 王有月, 贾涛. 违禁药物安定的酶联免疫检测方法探讨[J]. 饲料检测, 2008, (11): 50 - 54.

Determination of diazepam and its residue in turbot and mandarinfish by high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry

YU Huijuan*, QIAN Beilei, HUANG Dongmei, SU Hui, GU Runrun, FENG Bing

(The Fishery Products Quality Inspection and Test Center (Shanghai), Ministry of Agriculture, Shanghai 200090, China)

Abstract: A method for detecting residues of diazepam, nordiazepam, temazepam and oxazepam in aquatic products was developed by using high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry (HPLC/MS/MS). Diazepam and its metabolites was extracted with basic ethyl acetate from the test tissue, then the extract was cleaned up and concentrated on an Oasis HLB cartridge, eluted by ethyl acetate and then analyzed by HPLC - MS/MS. The quantification was performed with internal standard method, the D_5 - diazepam, D_5 - nordiazepam, D_5 - temazepam and D_5 - oxazepam were taken as internal standard. The average recoveries were 85.7% - 105.6% (intraday), the relative standard deviations were 2.1% - 7.6 % (intraday) in the spiked range of 1.0, 10.0 and 50 μg/kg. The limits of quantification (S/N > 10) were 1.0 μg/kg. The results indicated that the method developed is easy, fast, and accurate and is applicable to be used for detection of diazepam and its metabolic residues. [Chinese Fishery Quality and standards, 2011, 1(1): 54 - 59]

Key words: diazepam; metabolites; residue; HPLC/MS/MS; Turbot; Mandarinfish

Corresponding author: YU Huijuan. E - mail: yuhuijuan607@sohu.com