

分散固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定水产品中的地西洋

曾军杰^{1,2}, 陈思^{1*}, 张小军¹, 严忠雍¹

(1. 浙江省海洋水产研究所, 浙江舟山 316021; 2. 浙江海洋大学海洋与渔业研究所, 浙江舟山 316021)

摘要 [目的] 建立一种测定水产品地西洋农药残留的分散固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法。[方法] 样品先后经 1% 氨水-乙腈和 1% 乙酸-乙腈进行提取, PSA:C₁₈:无水 MgSO₄ = 1:0.5:3 为吸附剂进行分散固相萃取净化, C₁₈ 柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) 分离, 0.1% 甲酸 5 mmol/L 乙酸铵:甲醇(90:10) 为初始流动相, 结合超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS) 进行定量分析。[结果] 添加样品的回收率为 92.5%~95.4%, 相对标准偏差(RSD) 为 5.2%~7.3%, 检出限为 1.0 μg/kg。[结论] 该方法灵敏度、精密性、回收率均能满足水产品中地西洋的快速分析测定。

关键词 水产品; 分散固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱; 地西洋; 农药残留

中图分类号 TS 254.7 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2021)12-0198-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.12.052



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Determination of Diazepam in Aquatic Products by Dispersive Solid Phase Extraction-Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

ZENG Jun-jie^{1,2}, CHEN Si^{1*}, ZHANG Xiao-jun¹ et al (1. Marine Fisheries Research Institute of Zhejiang, Zhoushan, Zhejiang 316021; 2. Marine and Fishery Institute, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, Zhejiang 316021)

Abstract [Objective] A method for the determination of diazepam pesticide residues in aquatic products by dispersive solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry was established. [Method] The samples were successively extracted by 1% ammonia water-acetonitrile and 1% acetic acid-acetonitrile, and purified by dispersive solid phase extraction with PSA:C₁₈:anhydrous MgSO₄ = 1:0.5:3 as adsorbent, C₁₈ column (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) separation, 0.1% formic acid 5 mmol/L ammonium acetate: methanol (90:10) as the initial mobile phase, combined with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) for quantitative analysis. [Result] The recoveries of the added samples were 92.5%~95.4%, and the relative standard deviations (RSD) were 5.2%~7.3%. The detection limit was 1.0 μg/kg. [Conclusion] The sensitivity, precision and recovery rate of this method can meet the requirements of rapid analysis and determination of diazepam in aquatic products.

Key words Aquatic products; Dispersive solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; Diazepam; Pesticide residues

地西洋, 又名安定, 是苯二氮卓类药物(BDZ), 为第二代催眠药^[1]。在临床上主要用于治疗失眠^[2], 但患者长期使用^[3], 会出现依赖性和耐药性, 停药后又易出现易怒、情绪激动、幻听等症^[4], 导致失眠加重^[5-7]。在家禽家畜养殖业中使用这类药物的现象时有发生, 通常养殖者用药来促进家禽家畜生长, 达到增肥的目的^[8], 但在水产养殖业中较少投入使用。近年来, 不少水产养殖者和商贩为了达到提高水产品成活率目的^[9-12], 在养殖和运输环节中频繁使用地西洋来延缓鱼类的新陈代谢, 减轻鱼体的环境压力。我国农业部 235 号公告已明确规定在动物性食品中不得检出地西洋; 农业部 176 号公告也规定严禁在饲料和动物饮用水中使用地西洋等精神类药物。据相关报道, 近年来全国已有多个省份水产品中地西洋残留检出的事件发生^[13]。2020 年, 笔者在一次鱼类药物残留大排查中发现, 多例水产品含有地西洋, 并且检出水平较高, 这必将给居民的水产品消费安全带来巨大的隐患。

目前地西洋的检测方法较多, 主要有气相色谱-串联质谱法(GC-MS)^[14-17]、高效液相色谱法(HPLC)^[18-19]和高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)^[20-22]等, 超高效液相色谱-

串联质谱法(UPLC-MS/MS)拥有超高效液相快速、有效的分离能力和串联质谱的精准灵敏度, 是一种快速发展的分析技术^[23]。将超高效液相色谱-串联质谱法与分散固相萃取技术相结合^[24]是目前比较流行的检测方式, 兼具两者的优点, 可以真正实现多种兽药残留的快速检测。该研究使用分散固相萃取技术进行前处理, 超高效液相色谱-串联质谱法为检测方法, 实现了地西洋残留的快速检测, 为分散固相萃取前处理方式在水产品领域的应用提供更强的保障。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 地西洋(DXP)、氘代地西洋(DXP-D5), 纯度均>98%, 美国 Sigma 公司; 甲酸、甲醇、乙腈、乙酸铵, 色谱纯, 德国 Merck 公司; MgSO₄(分析纯)、氨水(分析纯)、PSA(粒径 40~60 μm)、C₁₈(粒径 50 μm), 上海国药集团。

1.2 仪器与设备 ACQUITYTM 超高效液相色谱仪、ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 美国 Waters 公司; 3-30K 高速冷冻离心机, Sigma 公司; MX-S 涡旋搅拌器, 美国 Scilogex 公司; N-EVAP-112 氮吹仪, 美国 Organomation 公司。

1.3 溶液的制备

1.3.1 吸附剂的制备。 取 PSA、C₁₈、MgSO₄ 适量, 按照 1:0.5:3 的比例混匀, 放入烘箱烘干, 备用。

1.3.2 标准曲线溶液的制备。 分别准确称取 1 mg 地西洋和氘代地西洋固体标准物质, 用甲醇溶解定容至 100 mL, 配成

基金项目 2020 年海洋水产科研项目“水产品中危害因子的新型快速精准检测技术开发”。

作者简介 曾军杰(1990—), 男, 浙江舟山人, 助理工程师, 硕士, 从事天然产物的提取与分离研究。* 通信作者, 助理研究员, 博士, 从事水产品质量安全研究。

收稿日期 2020-11-06; **修回日期** 2020-12-03

10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的中间使用液,于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下避光保存。中间使用液再次稀释,配制成 100 ng/mL 使用液,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光备用。

1.4 UPLC-MS 条件

1.4.1 色谱条件。 ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm);柱温 40 $^{\circ}\text{C}$;样品室温度 10 $^{\circ}\text{C}$;进样量 1.0 μL ;流动相为 0.1%甲酸 5 mmol/L 乙酸铵水溶液(A)、甲醇(B);流速 0.3 mL/min;洗脱条件:0~0.5 min,10% B;0.5~

2.5 min,30% B;2.5~5.0 min,95% B;5.0~7.5 min,95% B;7.5~1.0 min,10% B。

1.4.2 质谱条件。电喷雾离子源(ESI⁺);扫描方式为多反应监测(MRM);毛细管电压 3.2 kV;锥孔电压 38 V;脱溶剂气温度 380 $^{\circ}\text{C}$;离子源温度 120 $^{\circ}\text{C}$;碰撞池压力 0.003 hPa;锥孔气流量 50 L/h;干燥气体流速 600 L/h。地西洋及其氘代物的质谱参数如表 1 所示。

表 1 MRM 监测模式下地西洋及其氘代物的质谱参数

Table 1 Mass spectrometric parameters of diazepam and its deuterons in MRM monitoring mode

化合物 Compound	母离子 Parent ion (m/z)	子离子 Daughter ion (m/z)	保留时间 Retention time//min	锥孔电压 Cone voltage V	碰撞能量 Collision energy//eV
地西洋 Diazepam	285.1	193.1,154.1	6.55	38	30,24
氘代地西洋 Deuterated diazepam	290.1	154.1	6.54	38	24

1.5 样品前处理

1.5.1 提取。称取样品 1 g 于 15 mL 离心管中,准确加入 50 μL 混合内标使用液,涡旋 30 s。加入 5 mL 1%氨水-乙腈溶液、2.5 g 氯化钠,涡旋提取 1 min,超声提取 10 min,以 6 000 r/min 离心 5 min。收集上清液。剩余混合物中再加入 5 mL 1%氨水-乙腈溶液,重复提取 1 次,合并 2 次上清液,待净化。

1.5.2 净化。将吸附剂加入“1.5.1”提取液中,旋紧螺旋盖,高速涡旋 1 min,6 000 r/min 离心 5 min。

1.5.3 浓缩、转溶。合并所有有机相溶液,于 40 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹至干。准确加入 1.0 mL 10% 甲醇溶液溶解残渣,涡旋混合 1 min,经 0.22 μm 滤膜过滤后上机检测。

2 结果与分析

2.1 质谱条件的优化 以 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速将标准溶液打入离子源,在正离子模式下进行扫描,对毛细管电压和锥孔电压进行优化,确定地西洋的毛细管电压、锥孔电压分别为 3.2 kV 和 38 V。用二级质谱将母离子击碎,选取经碰撞后响应值较高的 2 个子离子分别为定量离子和定性离子,并进行优化,如图 1 所示。

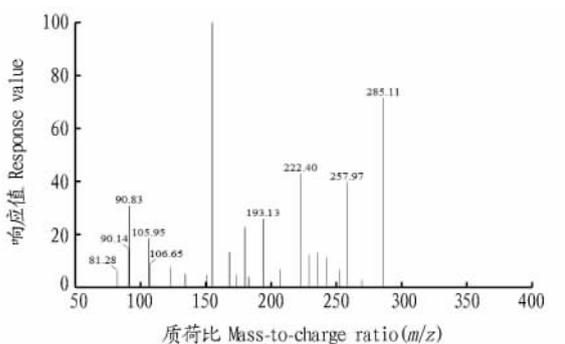


图 1 地西洋的二级质谱图

Fig.1 The second-stage mass spectrum of diazepam

2.2 色谱条件的优化 该试验以 C_{18} 色谱柱作为色谱分析柱,分别选择乙腈-水、甲醇-水、0.1%甲酸 5 mmol/L 乙酸铵水溶液-乙腈体系以及 0.1%甲酸 5 mmol/L 乙酸铵水溶液-甲醇体系作为流动相,发现乙腈-水、甲醇-水均能完全出峰,

但甲醇作为有机相时峰形比乙腈好,响应值高,同时在水相中加入 0.1%甲酸和 5 mmol 乙酸铵,改善了被待测物质的峰形,这是由于有机酸和挥发性盐提高了他们的分离度和离子化效率,图 2~3 为待测物质的色谱图。

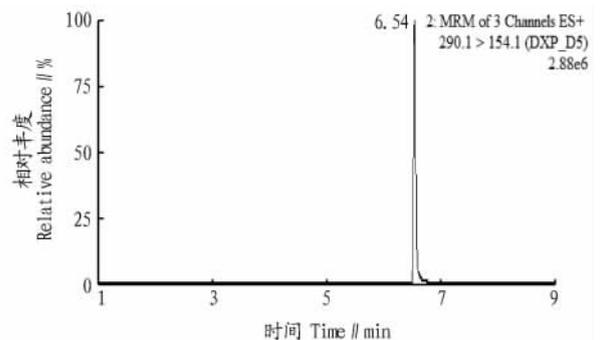


图 2 氘代地西洋色谱图

Fig.2 Chromatograms of deuterated diazepam

2.3 前处理优化

2.3.1 提取条件的优化。地西洋极性偏弱,易溶于甲醇、乙腈、乙酸乙酯等溶剂,不溶于水。该试验选取 1%氨水乙腈、1%乙酸乙腈、乙酸乙酯和甲醇 4 种提取溶剂进行比较,4 种溶剂提取效率如图 4 所示。

试验表明甲醇提取,地西洋回收率较好(93.9%),但部分油脂被萃到提取液中,对仪器(UPLC-MS/MS)响应值有明显的抑制作用。1%氨水乙腈提取地西洋回收率 91.7%,故选择乙腈超声 10 min,提取 2 次保证提取率的最大化。

2.3.2 净化条件的选择。目前,在对地西洋报道的已有文献中,多以 HLB、 C_{18} 等 SPE 净化柱为主,该试验以分散固相萃取为前处理方式,对 MgSO_4 、HLB、PSA、 C_{18} 以及吸附剂进行对比,净化效果见图 5。结果表明弱阳离子(HLB、 C_{18})等 SPE 柱净化回收率一般,回收率无法满足水产品检测的需求; MgSO_4 、PSA 能够去除样品中的脂肪酸、糖类物质等不同杂质,平均回收率高于 SPE 的方法,并且净化效果明显,但回收率过低,也无法满足水产品的检测需求;混合吸附剂在除去大部分杂质的同时,回收率达到 93.2%,符合水产品检测回收率 70%~120% 的要求,故选用混合吸附剂。

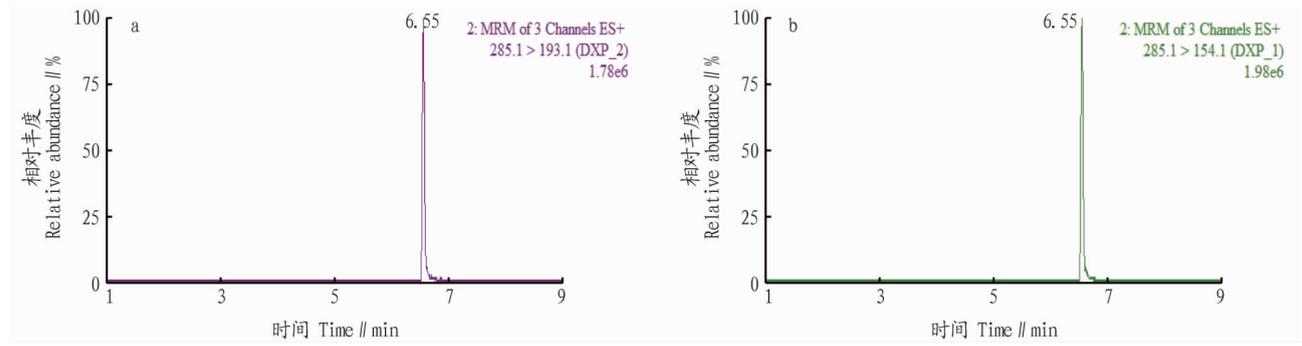


图3 地西洋定性离子(a)和定量离子(b)色谱图

Fig.3 Chromatograms of qualitative ion (a) and quantitative ion (b) of diazepam

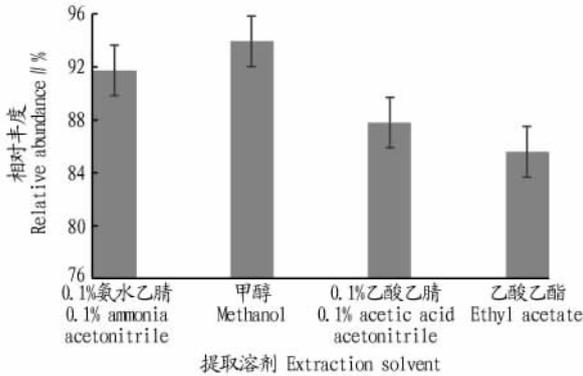


图4 不同提取溶剂对地西洋的提取效果

Fig.4 The extraction effect of different extraction solvents on diazepam

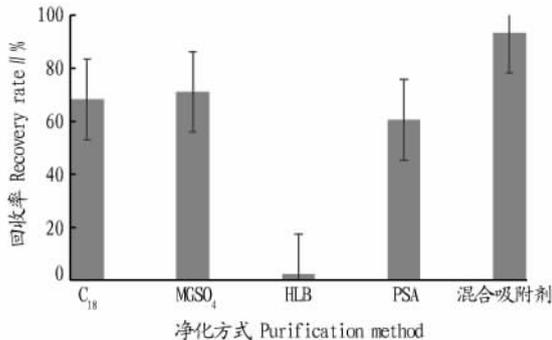


图5 不同净化方式对地西洋的净化效果

Fig.5 The purification effect of different purification methods on diazepam

2.3.3 吸附剂使用量的优化。分别将 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 g 的 PSA 用于净化试验,比较 PSA 不同使用量的净化效果,结果如图 6 所示。试验表明,当 PSA 用量为 0.2~0.8 g 时,目标物质回收率在 92%~95%,回收率均比较理想,但是考虑到伴随着使用量增加,杂质去除效率更好,因此选用使用量最大的。当使用量在逐渐增加,回收率明显降低,此时吸附剂足够吸附杂质,分析原因可能是吸附剂中 PSA 成分中氨基游离出来,与目标物质中某些基团发生化学反应。综上所述,选择 PSA 的使用量为 0.8 g,既保证了净化后样品的纯净,又保证试验回收率满足试验方法。

2.4 方法学验证

2.4.1 检出限、定量限及线性关系。取草鱼空白样品,按照

“1.5”的前处理方法,得到空白基质溶液,配成 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0 ng/mL 的空白基质混合标准工作曲线,以待测物质的峰面积(y)和相应的浓度(x)绘制标准曲线,得出线性回归方程为 $y = 0.659\ 359x - 0.042\ 260\ 9$ ($r = 0.997$),表明地西洋浓度在 0.5~50.0 $\mu\text{g/L}$ 与峰面积的线性关系良好。根据 7 个空白样品的基线噪音求其平均值,按 3 倍信噪比计算其方法检测限 (LOD),10 倍信噪比计算其方法定量限 (LOQ),该化合物检出限和定量限分别为 0.5 和 1.0 $\mu\text{g/kg}$ 。

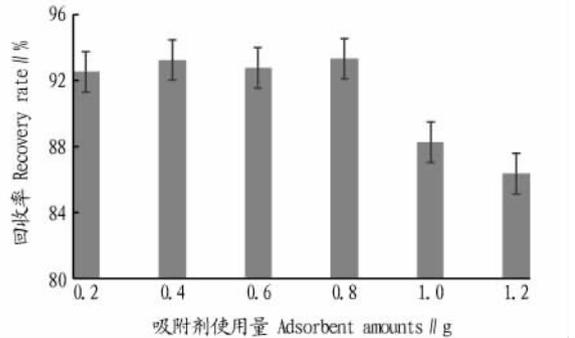


图6 不同吸附剂使用量对地西洋的净化效果

Fig.6 The purification effect of different adsorbent amounts on diazepam

2.4.2 回收率和精密度。通过加标回收试验来评价方法的准确性、精密度和回收率,标准曲线见图 7。在前处理前,将混合标准溶液加至 1 g 草鱼基质中,然后按照“1.5”方法进行前处理。其中,混合标准工作液分为 1.0、2.0、5.0 ng/mL 这 3 个水平,每个平行测定 3 次。从表 2 可以看出,平均回收率为 92.5%~95.4%,相对标准偏差 (RSD) 为 5.2%~7.3%,表明该方

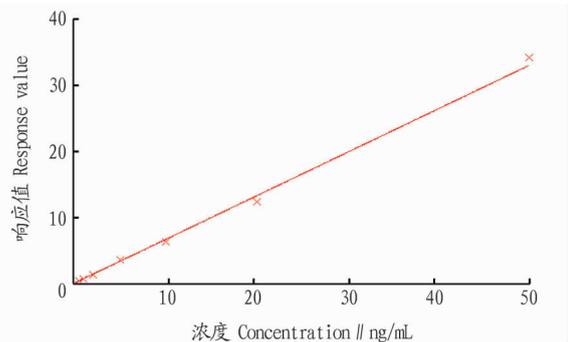


图7 地西洋标准曲线

Fig.7 The standard curve of diazepam

表 2 回收率、精密度和 RSD

Table 2 Recovery, precision and RSD

加标浓度 Standard concentration//ng/mL	回收率 Recovery rate//%	RSD %
1.0	92.5	5.2
2.0	95.4	7.1
5.0	94.9	7.3

法重现性强、准确性高、回收率高,能够满足日常检测的要求。

2.5 实际样品检测 利用已建立的方法进行草鱼体内地西洋残留量的测定。试验表明,在一次鱼类药物残留大排查中,200 个抽查样品中有 7 个草鱼样品检出地西洋,最高的残留量为 20.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$,该方法能够准确测定水产品中地西洋残留量。

3 结论

本研究采用分散固相萃取技术,通过对质谱、色谱、提取溶剂、净化条件的优化,结合 UPLC-MS/MS 技术,建立了水产品中地西洋快速定量分析方法。分散固相萃取能够降低样品基质效应的影响。通过质谱的全扫描模式下的精确质量母离子作为定量离子,更适合样品中目标化合物的快速筛查。经实际样品检测确证,该方法快速、准确、灵敏,满足水产品中地西洋的检测分析。

参考文献

- [1] 邹叔聘,王朝阳,刘博,等.地西洋对胶质瘤术后睡眠障碍患者神经内分泌免疫因子表达水平的影响[J].中国医师杂志,2018,20(11):1692-1694.
- [2] WOODCOCK B G, KOSTEV K, SHIN J Y. Benzodiazepine prescribing in the elderly in Germany and Korea: A comparison of two observational studies[J]. Int J Clin Pharmacol Ther, 2017, 55(6):480-482.
- [3] 彭莉蓉,杨世民,杨敏.2008~2010 年二类精神药品应用分析[J].西北药学杂志,2001,26(6):471-473.
- [4] 王立友,李娜,王芳,等.长期应用地西洋对豚鼠耳蜗微音器电位的影响[J].西北药学杂志,2016,31(4):386-388.
- [5] 李积东,韵海霞,车胜荣.镇静催眠药研究新进展[J].西北药学杂志,

- 2001,16(5):231-232.
- [6] 李林艳,徐建.苯二氮类药物依赖及其防治[J].药物不良反应杂志,2012,14(4):228-231.
- [7] O' BRIEN C P. Benzodiazepine use, abuse, and dependence [J]. J Clin Psychiatry, 2005, 66(S2):28-33.
- [8] 宿书芳,孙立臻,薛霞,等.通过式固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定水产品中地西洋[J].色谱,2020,38(7):791-797.
- [9] 李晋成,刘欢,吴立冬,等.动物体内麻醉剂残留检测技术研究进展[J].食品科学,2014,35(5):251-256.
- [10] 刘长琳,何力,陈四清,等.鱼类麻醉剂研究综述[J].渔业现代化,2007,34(5):21-25.
- [11] 吕海燕,王群,刘欢,等.鱼用麻醉剂安全性研究进展[J].中国渔业质量与标准,2013,3(2):24-28.
- [12] KE C L, LIU Q, LI L, et al. Residual levels and risk assessment of eugenol and its isomers in fish from China markets [J]. Aquaculture, 2018, 484:338-342.
- [13] 王守英,孔聪,杨光昕,等.上海市售水产品地西洋及去甲地西洋残留调查分析[J].农产品质量与安全,2020(3):31-35,67.
- [14] 汪丽萍,李翔,孙英,等.气相色谱/质谱法测定猪肉中 4 种苯二氮类镇静剂残留[J].分析化学,2005,33(7):951-954.
- [15] 李文海,蔺大伟,孙红雷,等. ASE-GC/MS 法检测血液中的常见镇静安眠类药物[J].中国法医学杂志,2014,29(5):451-454.
- [16] 王占良,张建丽,张亦农.气相色谱-质谱联用法检测保健品中 8 种安眠镇静类药物[J].质谱学报,2009,30(5):282-286.
- [17] BOTREL B M C, ABREU D C P, SACZK A A, et al. Residual determination of anesthetic menthol in fishes by SDME/GC-MS [J]. Food Chem, 2017, 229:674-679.
- [18] 徐硕,金鹏飞,广咏梅,等. HPLC 法检测中成药及保健品中非法添加的 10 种镇静催眠类药物[J].西北药学杂志,2019,34(2):181-185.
- [19] 郭志磊,范捷,于洋.固相萃取-高效液相色谱法同时测定人血浆中地西洋、咪达唑仑及其代谢产物的浓度和临床应用[J].中国医院药学杂志,2016,36(10):825-829.
- [20] 禚开智,梁振纲,陈文慧,等. QuEChERS 提取-高效液相色谱-串联质谱法同时测定鱼肉中 5 种麻醉剂的残留量[J].理化检验(化学分册),2018,54(12):1405-1409.
- [21] 倪峰飞,顾华,冯永巍,等. UPLC-MS/MS 同时测定水产品中 4 种丁香酚类麻醉剂残留量[J].质谱学报,2018,39(4):451-458.
- [22] 张倩勉. HPLC-MS 法测定猪肉中地西洋等 5 种禁用药物的残留量[J].安徽农业科学,2016,44(25):71-75.
- [23] 冯楠,路勇,姜洁,等. QuEChERS-超高效液相色谱串联质谱法快速筛查食品中 73 种有毒有害物质[J].食品科学,2013,34(16):214-220.
- [24] 黄丽英,邹圆,陆强,等.分散固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定禽蛋中 4 种内外源性孕激素[J].食品科学,2018,39(16):295-300.

(上接第 191 页)

表 5 六味地黄丸中没食子酸含量

Table 5 Gallic acid content in Liuwei Dihuang Pills mg/g

编号 No.	超声辅助萃取法 Ultrasonic assisted extraction method	浸渍提取法 Impregnation method
厂家 1 Manufacturer 1	1.082 7	0.924 2
厂家 2 Manufacturer 2	0.993 6	0.803 8
厂家 3 Manufacturer 3	0.938 4	0.773 5

过单因素试验,分别研究溶剂比例(甲醇:0.1%乙酸)、超声温度、超声时间和超声功率对没食子酸提取量的影响,根据单因素试验结果设计 $L_9(3^4)$ 的正交试验。分析正交试验数据,确定影响没食子酸提取量的因素顺序为溶剂比例>超声温度>超声时间>超声功率,最优组合为 $A_1B_2C_3D_3$,即溶剂比例(甲醇:0.1%乙酸)2:8、超声温度 40 $^{\circ}\text{C}$ 、超声时间 30 min、超声功率 180 W。超声辅助萃取法与浸渍提取法相比,六味地黄丸中没食子酸提取量增加了 17.14%~23.62%。

参考文献

- [1] 陈玉武,薛慧.制黄肉免疫活性成分的化学研究[J].中日友好医院学报,1992,6(S1):231-234.
- [2] SANAE F, MIYAIICHI Y, HAYASHI H. Endothelium-dependent contraction of rat thoracic aorta induced by gallic acid [J]. Phytother Res, 2003, 17(2):187-189.
- [3] 邓秀霞,李琴,王留留.山茶黄果核中没食子酸的提取及检测方法[J].农业机械,2011(32):137-140.
- [4] 刘丽艳.分心木中没食子酸的提取工艺研究[J].广东化工,2018,45(2):42-43.
- [5] 柯发敏,侯杰荣,余昕,等.赶黄草中没食子酸的提取方法比较研究[J].食品研究与开发,2016,37(7):75-77.
- [6] 吴春燕,芒果叶中没食子酸的提取研究[J].化工技术与开发,2012,41(10):20-22.
- [7] 刘忠英,高展,罗赛,等.普洱茶没食子酸的提取分离工艺研究[J].西南师范大学学报(自然科学版),2015,40(4):47-52.
- [8] 陈方平,金淳,魏加球.倍花酸水解法制工业没食子酸[J].林产化学与工业,1989,9(1):34-41.
- [9] 陈茜文,谷文众,王贵武.倍花浸提液水解制备没食子酸的工艺[J].中南林业科技大学学报,2008,28(5):132-135.
- [10] 王蔚文,李务强.没食子酸发酵新工艺(简报)[J].林化科技通讯,1986(3):15-17.
- [11] 杨顺楷,杨亚力.酶法转化五倍子单宁酸生产没食子酸[J].精细与专用化学品,2005,13(5):12-13,15.