

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250121008

引用格式: 张杨, 韩宇博, 林英扬, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定水产品中 8 种苯二氮卓类镇静药物残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(13): 60–66.

ZHANG Y, HAN YB, LIN YY, *et al.* Determination of drug residues of 8 kinds of benzodiazepine in aquatic products by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(13): 60–66. (in Chinese with English abstract).

超高效液相色谱-串联质谱法测定水产品中 8 种苯二氮卓类镇静药物残留

张 杨, 韩宇博, 林英扬, 张 兵*

(深圳市农产品质量安全检验检测中心, 深圳 518055)

摘 要: 目的 建立超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)测定水产品中地西洋、奥沙西洋、咪达唑仑、氯硝西洋、劳拉西洋、三唑仑、阿普唑仑和硝西洋 8 种苯二氮卓类药物残留的方法。**方法** 样品经含有 0.2%甲酸的 80%乙腈水溶液提取, 采用 Waters PRIME HLB 固相萃取柱净化, 水浴氮吹浓缩后用于检测。样品通过 C₁₈ 色谱柱分离, 以 0.1%甲酸水溶液与甲醇流动相经系统梯度洗脱后, 于 UPLC-MS/MS 选择电喷雾正离子多反应监测模式下分析测定, 基质添加标准曲线, 外标法定量。**结果** 8 种苯二氮卓类药物标准曲线相关系数均大于 0.999, 检出限为 0.064~0.226 µg/kg, 方法的回收率为 70.4%~107.0%, 相对标准偏差为 2.1%~10.2%。**结论** 本方法快速、准确, 可应用于水产品中多种苯二氮卓类镇静药物残留的快速准确筛查和检测。

关键词: 水产品; 药物残留; 苯二氮卓; 镇静剂; 超高效液相色谱-串联质谱法

Determination of drug residues of 8 kinds of benzodiazepine in aquatic products by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZHANG Yang, HAN Yu-Bo, LIN Ying-Yang, ZHANG Bing*

(Shenzhen Inspection and Testing Center of Quality and Safety of Agricultural Products, Shenzhen 518055, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of 8 kinds of benzodiazepines residues, including diazepam, oxazepam, midazolam, clonazepam, lorazepam, triazolam, alprazolam and nitrazepam in aquatic products by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** The sample was extracted by 80% acetonitrile aqueous solution containing 0.2% formic acid, purified by Waters PRIME HLB solid phase extraction column, concentrated by nitrogen blowing in water bath. The residue contents were separated by C₁₈ chromatographic column, eluted by 0.1% formic acid aqueous solution-methanol mobile phase systems, and analyzed by electrospray ion source in positive ion multi-reaction monitoring mode. The quantitative information was obtained by matrix-added calibration with external standard. **Results** The correlation

收稿日期: 2025-01-21

第一作者: 张杨(1984—), 女, 硕士, 工程师, 主要研究方向为水产品质量安全与检测。E-mail: fzebra@163.com

*通信作者: 张兵(1972—), 男, 正高级农艺师, 主要研究方向为食用农产品质量安全检测。E-mail: 303815973@qq.com

coefficient of calibration curves of 8 kinds of benzodiazepines residues were above 0.999. The limits of detection were 0.064–0.226 $\mu\text{g/kg}$, the recovery rates of the method were 70.4%–107.0%, and the relative standard deviations were 2.1%–10.2%. **Conclusion** The method is rapid, simple and accurate, and it is suitable for the determination of benzodiazepine sedative drug residues in aquatic products.

KEY WORDS: aquatic products; drug residues; benzodiazepines; sedativetetracyclines; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

0 引 言

水产品从生产到餐桌的供应链长,其质量安全受到养殖、运输、加工、销售等环节的多种因素影响。随着水产品消费量的增加和鲜活水产品供应需求的上涨,养殖和流通环节中药物残留超标或药物滥用的问题层出不穷。苯二氮卓类药物是临床广泛应用的,具有镇静催眠作用的精神类药物^[1-2]。苯二氮卓类药物结构是由苯和具有两个氮原子的杂环的稠合体形成的二氮卓环组成的,常见的有 1,4-苯二氮卓类、2,3-苯二氮卓类、三唑并苯二氮卓类和噻吩并三唑并苯二氮卓类等类型^[3]。地西洋、奥沙西洋、咪达唑仑、氯硝西洋、劳拉西洋、三唑仑、阿普唑仑和硝西洋都属于苯二氮卓类药物。长期连续摄入此类药物可诱发依赖性,损伤神经系统,引起成瘾、遗忘等不良反应^[4-5]。这类药物可以直接作用于中枢神经系统,增强神经递质 γ -氨基丁酸的抑制性,从而降低神经元的兴奋性,起到松弛肌肉、镇静、催眠和抗惊厥等效果。

残留在水产品中的镇静药物通过食物链进入人体,长期积累则会危害人体健康^[6]。有研究显示,为保证水产品鲜活,减少运输过程中的耗氧量、个体间的擦碰和应激损伤,在水产品运输环节,存在违法使用催眠镇静类药物的情况^[7-8],其中检出较多的为地西洋^[9-15]。饲料^[13]、鱼饵^[14]和环境^[16-19]中该药物的残留也受到人们的广泛关注。中华人民共和国农业部公告第 176 号公布的《禁止在饲料和动物饮用水中使用的药物品种目录》中包括地西洋、艾司唑仑、咪达唑仑、硝西洋、奥沙西洋和三唑仑。GB 31650—2019《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》中规定地西洋仅允许治疗使用,在动物食品中不得检出。农业农村部渔业渔政管理局等发布的《水产养殖用药明白纸 2022 年 1、2 号》中也明确指出地西洋等兽药在我国均未经审查批准用于水产动物,在水产养殖过程中不得使用。

目前苯二氮卓类药物的分析测定方法主要有:酶联免疫法、色谱法、液相色谱-质谱法、气相色谱-质谱法、光谱法等^[20]。其中高效液相色谱-串联质谱法灵敏度高,广泛应用于复杂基质的分析检测。可对水产品中苯二氮卓类药物进行检测的国家标准主要有 SN/T 2113—2008《进出口动物源性食品中镇静剂类药物残留的检测方法 液相色

谱-质谱/质谱法》、SN/T 2624—2010《动物源性食品中多种碱性药物残留量的检测方法 液相色谱-质谱/质谱法》、SN/T 3235—2012《出口动物源性食品中多类禁用药物残留量检测方法 液相色谱-质谱/质谱法》、GB 29697—2013《食品安全国家标准 动物性食品中地西洋和安眠酮多残留的测定 气相色谱-质谱法》、SN/T 3847—2019《出口食品中苯二氮卓类药物残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法》。以上标准的前处理方法都比较烦琐,检测过程耗时较长。目前针对水产品基质的多种苯二氮卓类药物同时快速检测的研究报道较少。本研究通过比较多种固相萃取净化方式,选择省去活化、淋洗、洗脱等步骤的 PRIME HLB 固相萃取小柱净化后浓缩检测,省时且净化效果好。对液相色谱程序进行优化,缩短分离时间,建立了前处理快速、操作简单、试剂消耗少、检测用时短的同时测定水产品中 8 种苯二氮卓类药物(地西洋、奥沙西洋、咪达唑仑、氯硝西洋、劳拉西洋、三唑仑、阿普唑仑和硝西洋)残留的超高效液相色谱-串联质谱分析方法,以期水产品中苯二氮卓类镇静药物的筛查和检测提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

本研究中的鱼类、蛙类等水产品均购自深圳市水产零售市场。实验室用超纯水为 Milli Q 超纯水仪制得。

乙腈、甲醇、甲酸(色谱纯,德国 Merck 公司); Waters Oasis PRIME HLB 固相萃取小柱、Waters Oasis HLB 固相萃取柱(6cc 200 mg)、Waters sep-pak Vac C₁₈ 固相萃取柱(6cc 500 mg)、ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 液相色谱柱(3.0 mm×100 mm, 1.7 μm)(美国 Waters 公司); Agilent PRS 固相萃取柱(3cc 500 mg, 美国 Agilent 公司); 聚四氟乙烯滤膜(0.22 μm , 上海安谱公司)。

分析用标准品地西洋(CAS 号: 439-14-5)、奥沙西洋(CAS 号: 604-75-1)、咪达唑仑(CAS 号: 59467-70-8)、氯硝西洋(CAS 号: 1622-61-3)、劳拉西洋(CAS 号: 846-49-1)、三唑仑(CAS 号: 28981-01-5)、阿普唑仑(CAS 号: 28981-97-7)、硝西洋(CAS 号: 146-22-5)(标准物质质量浓度均为 100 $\mu\text{g/mL}$, 坛墨质检标准物质中心),为乙腈和甲醇中的 8 种兽药混合标准溶液。

1.2 仪器与设备

Agilent 1290 超高效液相色谱仪、AB Sciex Triple Quad™ 5500 质谱仪[配有电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI)](美国 AB Sciex 公司); OA-SYS 水浴氮吹仪(美国 Organomation 公司); BSA2202S-CW 型电子天平[精度 0.01 g, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]; AS 30600BDT 超声波清洗仪(天津奥特赛恩斯仪器有限公司); Bead Ruptor Elite 多功能生物样品均质器(美国 OMNI 公司); MTV-100 型多管旋涡混合仪(杭州奥盛仪器有限公司); Milli-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司); 3-15ks 高速离心机(德国 Sigma 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 前处理方法

取鱼类、蛙类等水产品的可食肌肉部分, 切碎混匀并充分匀浆, 制成试样备用。准确称取 2.50 g(精确到 0.01 g) 试样于 50 mL 具盖的聚丙烯离心管中, 加入 10 mL 80%乙腈水提取液(含 0.2 %甲酸)于多功能生物样品均质器中, 以 2000 r/min 均质提取 5 min, 再超声振荡 5 min 后, 以 9000 r/min 的转速离心 5 min。准确移取 4.0 mL 上清液过 Waters Oasis PRIME HLB 固相萃取柱, 调节过柱流速约 1 滴/s, 收集过滤流出的滤液于另一个干净的 15 mL 聚丙烯离心管中, 在 60 ℃水浴下氮气吹至滤液少于 0.5 mL, 加入复溶液 10%甲醇水溶液(10:90, V:V)定容至 1.00 mL, 用多管旋涡混合仪以 1500 r/min 涡旋振荡 1 min, 溶解残留物, 再经 0.22 μm 的聚四氟乙烯滤膜过滤至 1 mL 进样小瓶中待测。

1.3.2 标准溶液的制备

准确移取甲醇中 8 种苯二氮卓类药物(地西泮、奥沙西泮、咪达唑仑、氯硝西泮、劳拉西泮、三唑仑、阿普唑仑、硝西泮)混合标准溶液 1.00 mL, 用甲醇稀释溶解, 于 10 mL 容量瓶定容, 配制成质量浓度为 10.0 μg/mL 的混合标准储备液, -20 ℃以下避光保存。同样方法再稀释制备 1.00 μg/mL 和 100 μg/L 的混合标准工作溶液。

1.3.3 液相色谱条件

色谱柱: BEH C₁₈ 色谱柱(3.0 mm×100 mm, 1.7 μm); 流动相: A 为含 0.1%甲酸的水溶液, B 为甲醇; 流速: 0.4 mL/min; 柱温: 35 ℃; 进样量: 2 μL; 梯度洗脱程序见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution programs of mobile phase

时间/min	流速/(mL/min)	A 甲酸水溶液/%	B 甲醇/%
0	0.4	90	10
0.50	0.4	90	10
1.00	0.4	10	90
4.00	0.4	10	90
4.10	0.4	90	10
5.00	0.4	90	10

1.3.4 质谱条件

离子源: ESI 源; 扫描方式: 正离子扫描; 检测方式: 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM); 电喷雾电压: 5500 V; 离子源温度: 550 ℃; 气帘气压力: 35.0 psi; 碰撞气压力: 9 psi; 雾化器压力: 55.0 psi; 辅助加热器压力: 55.0 psi。以子母离子的保留时间和丰度比定性, 以峰面积定量。定性离子对、定量离子对、去簇电压及碰撞能量参数见表 2。

表 2 8 种苯二氮卓类药物的质谱参数
Table 2 Mass spectrum parameters of 8 kinds of benzodiazepines

化合物名称	保留时间/min	母离子	子离子	去簇电压/V	碰撞能量/eV
地西泮	3.08	285.1	193.0 [*]	80	40
			154.0	80	36
奥沙西泮	2.90	287.1	269.0 [*]	64	21
			241.1	64	32
咪达唑仑	2.74	326.2	291.3 [*]	94	37
			244.2	94	35
氯硝西泮	2.80	316.1	270.1 [*]	84	35
			241.1	84	48
劳拉西泮	2.87	321.2	275.2 [*]	78	31
			303.1	78	21
三唑仑	2.85	343.1	308.2 [*]	98	36
			239.1	98	53
阿普唑仑	2.89	309.1	274.3 [*]	100	37
			205.1	100	54
硝西泮	2.81	282.1	236.2 [*]	86	32
			108.2	86	49

注: 带*为定量离子。

1.4 数据处理

前处理条件优化相关实验进行 3 个平行样品的测定, 方法学验证进行 6 个平行样品的测定, 实际样品检测进行双平行测定。采用 Analyst®软件采集原始数据, Multi Quant 3.0.2 软件对采集的原始数据进行分析 and 定量, WPS Office 6 软件对数据进行计算并绘制图表。

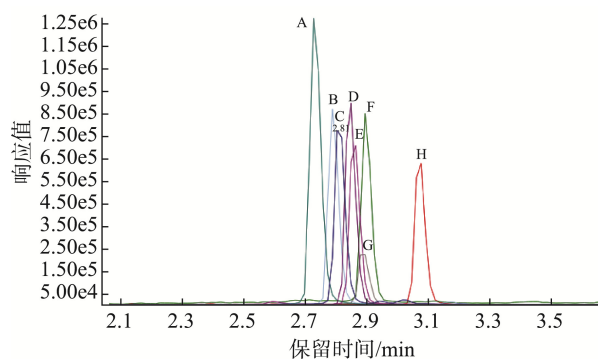
2 结果与分析

2.1 液相色谱-质谱条件优化

将 100 μg/L 的 8 种苯二氮卓类镇静药物混合标准溶液通过针泵进样注入电喷雾质谱仪中, 在正离子模式下, 通过一级和二级质谱扫描, 优化去簇电压获得目标化合物的母离子, 优化碰撞能量, 以响应值较强 2 个特征离子为定量离子和定性离子, 再进行 MRM 确定每个化合物母离子

和子离子的质谱参数,具体谱参数见表 2。

分别以 0.1%甲酸水溶液-乙腈、0.1%甲酸水溶液-甲醇、5 mmol/L 乙酸铵溶液(含 0.1%甲酸)-甲醇这 3 种组合作为流动相,分析目标化合物在各条件下的化合物的响应值强度、基质和峰型情况。经比较,目标化合物在甲醇流动相条件下比乙腈流动相条件的响应值更高,分离效果好。这与朱群英等^[21]、杨霄等^[22]的研究结果一致。5 mmol/L 乙酸铵溶液与 0.1%甲酸水溶液条件下峰型和各物质间的分离效果相似,因此选用 0.1%甲酸水溶液-甲醇作为目标化合物检测的流动相。优化液相色谱流动相的洗脱比例和时间,缩短检测时长,最终确定梯度洗脱程序见表 1。在此液质条件下 8 种苯二氮卓类镇静药物的总离子流色谱图见图 1。



注: A. 咪达唑仑, B. 氯硝西洋, C. 硝西洋, D. 三唑仑, E. 劳拉西洋, F. 阿普唑仑, G. 奥沙西洋, H. 地西洋。

图 1 8 种苯二氮卓类药物 MRM 色谱图

Fig.1 MRM chromatogram of 8 kinds of benzodiazepines

2.2 前处理条件优化

苯二氮卓类镇静药物常用的提取溶剂主要有甲醇、乙腈和乙酸乙酯等。水产品的蛋白和脂肪含量都较高,乙酸乙酯作为提取剂时样品中的脂溶性杂质较多,提取液浑浊,不易净化^[22]。张秋云等^[23]在研究中使用乙酸乙酯提取时的回收率偏低,部分化合物的提取率低,约为 60%,低于乙腈系列提取溶剂。在甲醇与乙腈作为提取溶剂的比较研究中,乙腈系列提取溶剂回收率更高^[24-25]。乙腈可以有效地沉淀蛋白质,且乙腈对糖类和脂肪的溶解度低于甲醇,因此多数研究者均采用乙腈作为主要的提取溶剂。

固相萃取法需要的有机溶剂量较少,萃取时间短,可以在过柱的过程中清除大部分杂质,从而减少基质干扰,苯二氮卓类药物检测的相关研究也较多采用此类净化方式^[26-29]。本研究比较了 Waters Oasis PRIME HLB 固相萃取柱、Waters Oasis HLB 固相萃取柱、Waters sep-pak Vac C₁₈ 固相萃取柱和 Agilent PRS 固相萃取柱这 4 种固相萃取柱的净化效果。结果如图 2 所示, Waters sep-pak Vac C₁₈ 固相萃取柱对硝西洋、奥沙西洋等目标化合物净化后的回收率低

于 50%。C₁₈ 固相萃取柱的单一净化效果不佳^[23,26,30]。Waters Oasis PRIME HLB 固相萃取柱和其他 3 种固相萃取柱相比,实验操作更简便,省去了活化、淋洗、洗脱等的操作步骤,样品提取液直接过柱,有效缩短了前处理时长,对目标化合物的净化效果好,且回收率整体上高于其他 3 种固相萃取柱。因此选择 Waters Oasis PRIME HLB 作为净化小柱。

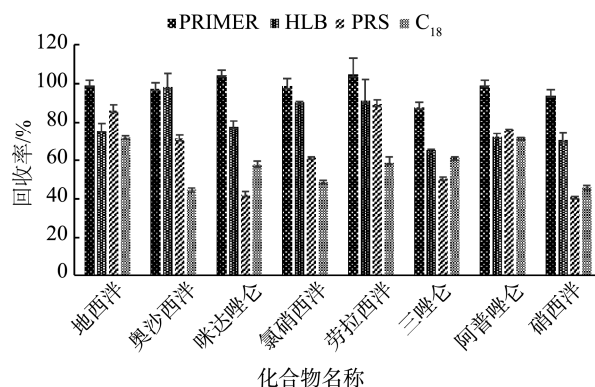


图 2 不同固相萃取柱对 8 种苯二氮卓类药物的净化效果(n=3)

Fig.2 Purification effects of different solid-phase extraction columns on 8 kinds of benzodiazepines (n=3)

药物残留分析过程中常用的浓缩方法有旋转蒸发、氮吹、真空浓缩等,而氮吹方法的干燥速度快,同批次处理样品的个数多、操作简单。研究以 2.00 μg/mL 的 8 种苯二氮卓类药物基质溶液为对象,考察了不同温度下(40、60、80 °C)氮吹对回收率的影响。在这 3 个温度下进行氮吹,温度越高耗时越短,目标化合物的响应值有差异,但相差不大(如图 3 所示),除硝西洋外,在 60 °C 下的回收率均高于 40 °C 和 80 °C,回收率在 70.7%~107.9%之间,此结果与张秋云等^[23]的研究结果不同。40 °C 时氯硝西洋的回收率低于 70%, 80 °C 时硝西洋回收率接近 60%,各目标物的回收率有所降低。因此,氮吹温度选择 60 °C。

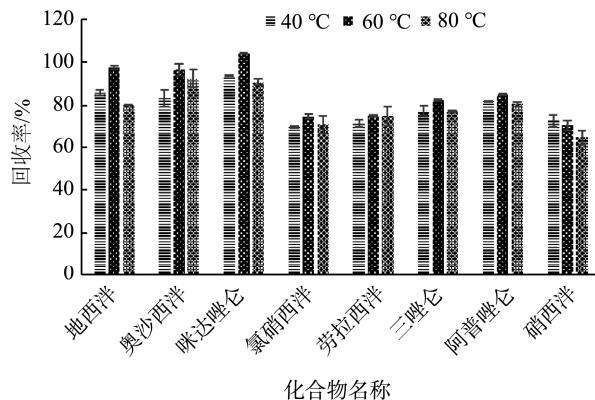


图 3 氮吹温度对 8 种苯二氮卓类药物回收率的影响(n=6)

Fig.3 Effects of nitrogen blowing temperature on the recovery rates of 8 kinds of benzodiazepines (n=6)

2.3 方法评价分析

2.3.1 线性关系、检出限与定量限

向 6 个草鱼空白试样中分别添加适量的 1.00 μg/mL 和 100 μg/L 的混合标准溶液, 制备成 0.50、1.00、4.00、10.00、20.00、50.00 μg/kg 的加标样品, 按照 1.3.1 样品前处理方法, 制备成基质匹配系列混合标准溶液, 于超高效液相色谱-串联质谱仪进行检测, 以各目标化合物的质量浓度为横坐标, 以定量离子的峰面积响应值为纵坐标, 绘制基质标准曲线。标准曲线回归方程和相关系数如表 3 所示, 在 0.50~50.00 μg/kg 浓度范围内线性关系良好, 相关系数 r 均大于 0.99。分别以 3 倍和 10 倍信噪比(S/N), 结合前处理方法, 分别计算各待测物的检出限(limit of detection, LOD)和定量限(limit of quantitation, LOQ), 8 种苯二氮卓类镇静药物的 LODs 为 0.064~0.226 μg/kg, LOQs 为 0.2~0.5 μg/kg, 具体数据见表 3。

表 3 8 种苯二氮的卓类药物线性方程、相关系数、LODs 和 LOQs
Table 3 Linear equation, linear range, correlation coefficient, LODs and LOQs of 8 kinds of benzodiazepines

化合物	线性方程	相关系数(r)	LODs /(μg/kg)	LOQs /(μg/kg)
地西洋	$Y=3.18\times10^4X+9.08\times10^3$	0.99999	0.078	0.2
奥沙西洋	$Y=3.93\times10^4X+6.92\times10^4$	0.99967	0.064	0.2
咪达唑仑	$Y=6.92\times10^4X+3.06\times10^4$	0.99946	0.118	0.5
氯硝西洋	$Y=4.25\times10^4X+5.21\times10^4$	0.99982	0.226	0.5
劳拉西洋	$Y=3.62\times10^4X-1.22\times10^4$	0.99964	0.186	0.5
三唑仑	$Y=4.22\times10^4X-9.30\times10^3$	0.99975	0.094	0.2
阿普唑仑	$Y=1.29\times10^4X+1.39\times10^3$	0.99987	0.159	0.5
硝西洋	$Y=4.33\times10^4X+5.96\times10^4$	0.99972	0.213	0.5

2.3.2 方法回收率和精密度

选取阴性草鱼、牛蛙、鲤鱼、乌鳢、鲫鱼、大口黑鲈的空白基质样品, 进行 0.20(或 0.50)、2.00、5.00 μg/kg 3 水平加标回收实验。每个加标水平做 6 个平行样品实验, 按 1.3.1 中的方法进行样品处理, 供超高效液相色谱-串联质谱仪测定, 其平均回收率和相对标准偏差结果见表 4。结果表明加标回收率在 70.4%~107.0%之间, 相对标准偏差为 2.1%~10.2%, 8 种苯二氮卓类镇静药物的回收率和相对标准偏差满足相应的检测要求, 表明该方法具有良好的准确度和精密度。

2.4 实际样品检测

采用本研究建立的方法, 对本地市场采回的 100 批次的不同水产品样品进行检测, 主要包括草鱼、鲫鱼、福寿鱼、黄颡鱼、乌鳢、多宝鱼、鲈鱼和牛蛙等鲜活水产品种。结果显示, 在 1 份鲫鱼样品中检出地西洋, 含量为 0.615 μg/kg, 其余批次样品中均未检出苯二氮卓类镇静药物残留。

表 4 加标回收和精密度实验结果($n=6$)
Table 4 Standard addition recovery and precision test results ($n=6$)

化合物	基质类型	加标量 /(μg/kg)	平均 回收率/%	相对标准 偏差/%
地西洋	草鱼	0.20, 2.00, 5.00	87.6, 94.3, 94.4	5.4, 3.7, 2.7
	牛蛙	0.20, 2.00, 5.00	90.1, 98.3, 97.2	4.1, 4.3, 3.8
	鲤鱼	0.20, 2.00, 5.00	91.5, 94.8, 93.4	5.5, 4.3, 4.1
	乌鳢	0.20, 2.00, 5.00	94.0, 97.7, 86.4	5.3, 2.3, 3.3
	鲫鱼	0.20, 2.00, 5.00	85.7, 85.0, 82.1	7.1, 3.3, 2.5
	大口黑鲈	0.20, 2.00, 5.00	91.5, 95.6, 90.8	3.2, 5.4, 4.8
奥沙西洋	草鱼	0.20, 2.00, 5.00	89.6, 96.5, 91.7	3.3, 3.9, 5.9
	牛蛙	0.20, 2.00, 5.00	87.1, 98.9, 95.2	6.6, 8.3, 4.5
	鲤鱼	0.20, 2.00, 5.00	81.6, 86.9, 101.6	2.1, 2.4, 8.9
	乌鳢	0.20, 2.00, 5.00	89.3, 89.3, 95.5	2.5, 2.1, 3.3
	鲫鱼	0.20, 2.00, 5.00	76.7, 90.4, 92.3	2.6, 3.1, 4.6
	大口黑鲈	0.20, 2.00, 5.00	78.1, 84.3, 96.3	2.7, 3.5, 6.3
咪达唑仑	草鱼	0.50, 2.00, 5.00	93.7, 87.8, 89.1	6.9, 3.1, 3.7
	牛蛙	0.50, 2.00, 5.00	97.1, 94.6, 91.2	5.4, 4.2, 4.0
	鲤鱼	0.50, 2.00, 5.00	84.6, 94.0, 86.4	7.4, 3.6, 3.9
	乌鳢	0.50, 2.00, 5.00	70.4, 72.8, 74.7	5.0, 3.7, 5.2
	鲫鱼	0.50, 2.00, 5.00	81.3, 74.5, 79.1	4.4, 4.8, 4.6
	大口黑鲈	0.50, 2.00, 5.00	86.1, 92.2, 87.2	8.4, 6.3, 7.1
氯硝西洋	草鱼	0.50, 2.00, 5.00	73.9, 84.6, 90.2	6.2, 3.7, 5.0
	牛蛙	0.50, 2.00, 5.00	83.4, 101.3, 94.4	4.6, 6.8, 7.7
	鲤鱼	0.50, 2.00, 5.00	94.2, 100.6, 95.0	6.1, 2.9, 4.2
	乌鳢	0.50, 2.00, 5.00	88.4, 96.8, 92.7	7.5, 4.8, 4.4
	鲫鱼	0.50, 2.00, 5.00	87.6, 92.5, 94.1	2.3, 3.8, 3.4
	大口黑鲈	0.50, 2.00, 5.00	93.2, 93.6, 95.8	2.1, 5.2, 4.2
劳拉西洋	草鱼	0.50, 2.00, 5.00	74.2, 90.4, 92.6	9.4, 5.5, 4.3
	牛蛙	0.50, 2.00, 5.00	77.6, 94.9, 107.0	10.2, 7.9, 7.1
	鲤鱼	0.50, 2.00, 5.00	94.4, 96.8, 92.7	4.4, 3.4, 5.0
	乌鳢	0.50, 2.00, 5.00	89.0, 94.4, 92.4	5.1, 2.7, 3.8
	鲫鱼	0.50, 2.00, 5.00	88.6, 89.7, 87.3	3.6, 7.2, 6.2
	大口黑鲈	0.50, 2.00, 5.00	90.4, 96.1, 94.7	6.0, 3.6, 4.8
三唑仑	草鱼	0.20, 2.00, 5.00	89.5, 96.9, 94.9	4.3, 3.6, 3.5
	牛蛙	0.20, 2.00, 5.00	90.6, 95.6, 94.8	3.3, 4.0, 5.0
	鲤鱼	0.20, 2.00, 5.00	91.4, 99.5, 92.9	5.0, 2.7, 3.3
	乌鳢	0.20, 2.00, 5.00	82.4, 96.5, 91.2	2.2, 4.7, 4.6
	鲫鱼	0.20, 2.00, 5.00	86.2, 88.1, 83.5	3.6, 3.4, 2.1
	大口黑鲈	0.20, 2.00, 5.00	83.4, 94.6, 87.6	2.4, 6.9, 4.0
阿普唑仑	草鱼	0.50, 2.00, 5.00	90.9, 88.4, 92.0	4.9, 6.2, 3.9
	牛蛙	0.50, 2.00, 5.00	92.9, 95.5, 93.4	5.1, 4.9, 4.2
	鲤鱼	0.50, 2.00, 5.00	88.8, 95.8, 97.4	4.7, 3.6, 2.1
	乌鳢	0.50, 2.00, 5.00	86.8, 92.9, 89.3	5.3, 2.8, 7.1
	鲫鱼	0.50, 2.00, 5.00	85.6, 91.5, 86.2	6.6, 2.6, 3.7
	大口黑鲈	0.50, 2.00, 5.00	86.1, 93.2, 91.1	2.7, 2.6, 2.9
硝西洋	草鱼	0.50, 2.00, 5.00	86.4, 99.5, 94.9	6.6, 5.2, 4.8
	牛蛙	0.50, 2.00, 5.00	76.6, 100.7, 90.1	6.7, 5.6, 4.9
	鲤鱼	0.50, 2.00, 5.00	85.4, 104.1, 97.4	4.7, 3.6, 2.1
	乌鳢	0.50, 2.00, 5.00	86.1, 97.9, 92.2	4.5, 2.6, 3.8
	鲫鱼	0.50, 2.00, 5.00	88.4, 86.2, 91.2	5.6, 4.5, 5.2
	大口黑鲈	0.50, 2.00, 5.00	91.8, 98.0, 95.8	2.8, 5.4, 3.3

3 结 论

本研究建立了快速测定水产品中 8 种苯二氮卓类镇静药物的超高效液相色谱-串联质谱检测方法。样品经含有 0.2% 甲酸的 80% 乙腈水提取, Waters Oasis PRIME HLB 固相萃取小柱净化处理, 实现 8 种苯二氮卓类镇静药物的快速定性定量检测。该方法具有操作简单、灵敏度高、检出限低等优点, 方法学验证表明所建立方法在一定质量浓度范围内呈良好的线性关系、具有较低的 LOD 和 LOQ, 较高的准确度和精密度, 方法回收率为 70.4%~107.0%, 相对标准偏差为 2.1%~10.2%, 与已有食品安全国家标准方法相比, 满足该类药物残留测定的要求, 可以为水产品中苯二氮卓类镇静药物的检测提供参考。

参考文献

- [1] LORENZ-GUERTIN JM, POVYSHEVA N, CHAPMAN CA, *et al.* Inhibitory and excitatory synaptic neuroadaptations in the diazepam tolerant brain [J]. *Neurobiology of Disease*, 2023, 185: 106248.
- [2] CABRÉ CP, ROSENDO ML, BORRULL F, *et al.* A comparative study of SPE- and DLLME-based methods for the determination of opioids and benzodiazepines in urine samples using LC-MS/MS [J]. *Microchemical Journal*, 2025, 208: 112354.
- [3] GAMELI SP, HUESTIS AM, BALLONI A, *et al.* Metabolism and detection of designer benzodiazepines: A systematic review [J]. *Drug metabolism reviews*, 2024, 56(4): 31–32.
- [4] DIHUA W, LI F. Recent findings and advancements in the detection of designer benzodiazepines: A brief review [J]. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 2023, 74(4): 224–231.
- [5] WADHWA M, SALL JW, CHINN GA, *et al.* Neonatal diazepam exposure decreases dendritic arborization and spine density of cortical pyramidal neurons in rats [J]. *Journal of Neurosurgical Anesthesiology*, 2024, 36(3). DOI: 10.1097/ANA.0000000000000979
- [6] GOMEZ-REGALADO MDC, MARTIN J, SANTOS JL, *et al.* Bioaccumulation/bioconcentration of pharmaceutical active compounds in aquatic organisms: Assessment and factors database [J]. *Science of the Total Environment*, 2023, 86: 160638.
- [7] 李芹, 穆树荷, 韩刚, 等. 水产品中镇静剂残留检测技术研究进展[J]. *中国农学通报*, 2021, 37(12): 86–91.
- LI Q, MU SH, HAN G, *et al.* Detection technology of sedative residues in aquatic products: Research progress [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2021, 37(12): 86–91.
- [8] SONGHEE H, NAMJI K, HUISEUNG K, *et al.* Development of an analytical method for detection of anesthetics and sedatives in fish [J]. *Journal of AOAC International*, 2021, 105(3). DOI: 10.1093/jaoacint/qsab155
- [9] 殷雪琰, 王洁琼, 王雨晴, 等. 常州地区水产养殖中地西洋残留检测及来源分析[J]. *中国渔业质量与标准*, 2024, 14(1): 1–8.
- YIN XY, WANG JQ, WANG YQ, *et al.* Determination and Source analysis of diazepam residues in aquaculture in Changzhou Area [J]. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2024, 14(1): 1–8.
- [10] 刘洋锋, 孔聪, 张海燕, 等. 基于高分辨质谱法筛查养殖水体中地西洋含量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(8): 3300–3305.
- LIU YF, KONG C, ZHANG HY, *et al.* Screening of diazepam content in aquaculture water based on high resolution mass spectrometry [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2021, 12(8): 3300–3305.
- [11] 丑亚琴, 冯晚霞, 罗扬, 等. 基于 UPLC-MS/MS 定量检测水产品中地西洋的研究[J]. *食品安全导刊*, 2024(11): 82–84.
- CHOU YQ, FENG WX, LUO Y, *et al.* Research on rapid quantitative detection of diazepam in aquatic products based on UPLC-MS/MS [J]. *China Food Safety Magazine*, 2024(11): 82–84.
- [12] 崔瑞霞, 宋润娜, 赵喜华. 同位素内标法快速筛查分析动物源性食品中地西洋残留[J]. *现代食品*, 2021(12): 168–172.
- CUI RX, SONG RL, ZHAO XH. Rapid screening and analysis of diazepam residues in animal derived food by isotope internal standard method [J]. *Modern Food*, 2021(12): 168–172.
- [13] 马丽莎, 尹怡, 谢文平, 等. QuEChERS-气相色谱质谱法快速测定水产饲料中地西洋残留[J]. *中国渔业质量与标准*, 2022, 12(3): 17–23.
- MA LS, LIN Y, XIE WP, *et al.* Fast determination of diazepam in aquatic feed by gas chromatography-mass spectrometry combined with QuEChERS [J]. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2022, 12(3): 17–23.
- [14] 杨光昕, 汤云瑜, 程逸凡, 等. 鱼饵料中地西洋含量调查及其对水产品养殖影响分析[J]. *中国渔业质量与标准*, 2022, 12(4): 1–9.
- YANG GX, TANG YY, CHENG YF, *et al.* Investigation of diazepam content in fish bait and analysis of its impact on aquaculture [J]. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2022, 12(4): 1–9.
- [15] 阮燕明. QuEChERS 液相色谱串联质谱法测定淡水鱼中地西洋、奥沙西洋和 MS-2223 种镇静剂方法的建立及对云南省淡水鱼中 3 种镇静剂残留的检测[D]. 大理: 大理大学, 2023.
- RUAN YM. Establishment of a QuEChERS liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of diazepam, oxazepam, and MS-222 sedatives in freshwater fish and the detection of three sedative residues in freshwater fish in Yunnan Province [D]. Dali: Dali University, 2023.
- [16] MARTINEZ SAH, MELCHOR-MARTINEZ EM, GONZALEZGONZALEZ RB, *et al.* Environmental concerns and bioaccumulation of psychiatric drugs in water bodies-conventional versus biocatalytic systems of mitigation [J]. *Environmental Research*, 2023, 229: 115892.
- [17] 黄丽, 高磊, 吴松, 等. 地西洋在模拟养殖环境中的含量变化及累积特征[J]. *南方水产科学*, 2024, 20(2): 38–47.
- HUANG L, GAO L, WU S, *et al.* Variation and accumulation characteristics of diazepam in simulated culture environment [J]. *South China Fisheries Science*, 2024, 20(2): 38–47.
- [18] 龚志强. 纳米零价铜高效降解典型养殖水体中的恩诺沙星和地西洋研究[D]. 武汉: 武汉纺织大学, 2023.
- GONG ZQ. Efficient degradation of enrofloxacin and diazepam in typical aquaculture water by nanoscale-zero-valent copper [D]. Wuhan: Wuhan Textile University, 2023.
- [19] KUN C, MIN W, CHEN C, *et al.* Impacts of chronic exposure to sublethal diazepam on behavioral traits of female and male zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 208111747.
- [20] 柯浩堃, 吕赛男, 郝红霞, 等. 苯二氮卓类化合物的检测方法研究

- 进展[J]. 分析实验室, 2020, 39(9): 1110–1116.
- KE HK, LV SN, HAO HX, *et al.* Advances in the detection of benzodiazepines [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2020, 39(9): 1110–1116.
- [21] 朱群英, 朱玉玲, 黄伟华, 等. 同位素内标-液质联用法检测猪肉中的苯二氮卓类药物残留[J]. 现代预防医学, 2017, 44(3): 511–514, 541.
- ZHU QY, ZHU YL, HUANG WH, *et al.* Benzodiazepine drug residues detection in pork by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using isotope internal standard [J]. Modern Preventive Medicine, 2017, 44(3): 511–514, 541
- [22] 杨霄, 万译文, 黄华伟, 等. 分散固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定水产品中 5 种硝基咪唑类和 6 种苯二氮卓类药物[J]. 色谱, 2022, 40(7): 625–633.
- YANG X, WAN ZW, HUANG HW, *et al.* Determination of five nitroimidazoles and six benzodiazepines in aquatic products using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with dispersive solid-phase extraction [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2022, 40(7): 625–633.
- [23] 张秋云, 杨洪生, 谭秀慧, 等. 液相色谱-串联质谱测定水产品中 15 种苯二氮卓类镇静剂的药物残留[J]. 食品与机械, 2022, 38(11): 60–67, 94.
- ZHANG QY, YANG HS, TAN XH, *et al.* Determination of the residues of 15 kinds of benzodiazepine sedatives in aquatic products by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Food & Machinery, 2022, 38(11): 60–67, 94.
- [24] 王小乔, 李坚, 许晓辉, 等. 超滤型高脂基质净化柱结合超高效液相色谱-三重四级杆液质联用法测定鱼肉中七种镇静剂[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(24): 267–274.
- WANG XQ, LI J, XU XH, *et al.* Determination of seven kinds of sedative drugs in fish by MPFC-QuEChERS combined with UPLC-MS/MS [J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(24): 267–274.
- [25] YANG Y, LI X, LIN J, *et al.* A modified QuEChERS-based UPLC-MS/MS method for rapid determination of multiple antibiotics and sedative residues in freshwater fish [J]. Food Chemistry: X, 2024, 22: 101268.
- [26] 张律, 朱波, 赖少阳, 等. 高效液相色谱-三重四级杆质谱法同时测定水产品中 6 种苯二氮卓类镇静剂残留[J]. 卫生研究, 2024, 53(2): 288–293.
- ZHANG L, ZHU B, LAI SY, *et al.* Simultaneous determination of six benzodiazepine sedatives residue in aquatic products by high performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry [J]. Journal of Hygiene Research, 2024, 53(2): 288–293.
- [27] 王旭峰, 王强, 张英侠, 等. 固相萃取净化/超高效液相色谱-串联质谱法测定养殖环境中地西洋及其代谢物[J]. 分析测试学报, 2023, 42(3): 337–343.
- WANG XF, WANG Q, ZHANG YX, *et al.* Determination of diazepam and its metabolites in aquaculture environment samples by solid phase extraction cleanup and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2023, 42(3): 337–343.
- [28] 张建雄, 郑百芹, 王雪松, 等. 基于一种直接通过型 SPE 柱快速检测水产饲料中的地西洋[J]. 饲料研究, 2024, 47(4): 121–125.
- ZHANG JX, ZHENG BQ, WANG XS, *et al.* Rapid detection of diazepam in aquatic feed based on a direct-pass-through SPE column [J]. Feed Research, 2024, 47(4): 121–125.
- [29] 楚瀚, 王新全, 齐沛沛, 等. 液相色谱-串联质谱法检测淡水养殖环境中地西洋及其代谢物[J]. 分析测试学报, 2024, 43(3): 474–480.
- CHU H, WANG XQ, QI PP, *et al.* Determination of diazepam and its metabolites in freshwater aquaculture environment by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2024, 43(3): 474–480.
- [30] 夏婉秋. 两类催眠镇静药的残留检测方法研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2019.
- XIA WQ. Study on residue detection of two kinds of sedative and hypnotic drugs [D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2019.

(责任编辑: 蔡世佳 于梦娇)