

### 水产养殖环境（水体、底泥）中地西洋的 测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of diazepam in water and sediment from aquaculture environments—  
Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method

地方标准信息服务平台

2024 - 05 - 13 发布

2024 - 07 - 13 实施



## 目 次

前言.....	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 方法原理.....	1
5 试剂与材料.....	1
6 仪器与设备.....	2
7 样品.....	2
8 测定步骤.....	3
9 结果计算和表述.....	5
10 检测方法的灵敏度、准确度和精密度.....	5
附录 A（资料性） 地西洋标准溶液特征离子质量色谱图.....	6

地方标准信息服务平台



## 前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由湖南省农业农村厅提出。

本文件由湖南省农业标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：湖南省水产科学研究所、农业农村部渔业产品质量检验检测中心（长沙）、澧县农产品质量安全检测中心、邵阳县畜牧水产事务中心。

本文件主要起草人：李小玲、万译文、杨霄、索纹纹、谢仲桂、崔先锋、曾春芳、雷琴、谢玉昆、何咏、陈湘艺、黄向荣、张永勇、尹升福、刘伶俐、洪波、黄华伟、肖维。

地方标准信息服务平台



# 水产养殖环境（水体、底泥）中地西洋的测定 液相色谱-串联质谱法

## 1 范围

本文件描述了水产养殖环境（水体、底泥）中地西洋的液相色谱-串联质谱测定方法。  
本文件适用于水产养殖环境（水体、底泥）中地西洋的测定。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

- GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
- GB 17378.5 海洋监测规范 第5部分：沉积物分析
- SC/T 9102.3 渔业生态环境监测规范 第3部分：淡水

## 3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

## 4 方法原理

底泥试样经氨化乙酸乙酯提取，氮气浓缩。底泥试液、水体试样加入甲酸酸化，固相萃取柱富集净化，液相色谱串联质谱仪测定，内标法定量。

## 5 试剂与材料

### 5.1 试剂

- 5.1.1 水：GB/T 6682 规定的一级水。
- 5.1.2 乙腈（ $\text{CH}_3\text{CN}$ ）：色谱纯。
- 5.1.3 乙酸乙酯（ $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ ）：色谱纯。
- 5.1.4 甲酸（ $\text{HCOOH}$ ）：色谱纯。
- 5.1.5 氨水（ $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ）：分析纯，浓度为 25%~28%。

### 5.2 溶液配制

- 5.2.1 1%氨水-乙酸乙酯：取氨水 5 mL，用乙酸乙酯稀释至 500 mL。
- 5.2.2 1%甲酸-水溶液：取甲酸 10 mL，用水稀释至 1000 mL。
- 5.2.3 5%氨水-乙腈溶液：取氨水 25 mL，用乙腈稀释至 500 mL。
- 5.2.4 0.1%甲酸-水溶液：取甲酸 1 mL，用水稀释至 1000 mL。

### 5.3 标准品

5.3.1 地西洋 (Diazepam,  $C_{16}H_{13}ClN_2O$ , CAS 号: 439-14-5)。

5.3.2 氘代地西洋 (Diazepam- $D_5$ ,  $C_{16}H_8D_5ClN_2O$ , CAS 号: 65854-76-4)。

### 5.4 标准溶液配制

5.4.1 标准储备液 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ): 取地西洋标准品 10 mg, 精密称定, 用乙腈溶解并稀释至 100 mL, 配制成浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准储备液。-18  $^{\circ}\text{C}$  避光保存, 有效期 12 个月。

5.4.2 内标储备液 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ): 取氘代地西洋标准品 10 mg, 精密称定, 用乙腈溶解并稀释至 100 mL, 配制成浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的内标储备液。-18  $^{\circ}\text{C}$  避光保存, 有效期 12 个月。

5.4.3 标准中间液 (1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ): 准确移取地西洋标准储备液 1 mL, 于 100 mL 容量瓶中, 用乙腈稀释至刻度, 配制成浓度为 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准中间液。-18  $^{\circ}\text{C}$  避光保存, 有效期 6 个月。

5.4.4 内标中间液 (1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ): 准确移取氘代地西洋标准储备液 1 mL, 于 100 mL 容量瓶中, 用乙腈稀释至刻度, 配制成浓度为 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的内标中间液。-18  $^{\circ}\text{C}$  避光保存, 有效期 6 个月。

5.4.5 标准使用液 (0.10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ): 准确移取 5 mL 地西洋标准中间液于 50 mL 容量瓶中, 用乙腈稀释至刻度, 配制成浓度为 0.10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准使用液。4  $^{\circ}\text{C}$  避光保存, 现配现用。

5.4.6 内标使用液 (0.10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ): 准确移取 5 mL 氘代地西洋内标中间液于 50 mL 容量瓶中, 用乙腈稀释至刻度, 配制成浓度为 0.10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的内标使用液。4  $^{\circ}\text{C}$  避光保存, 现配现用。

### 5.5 材料

5.5.1 混合型强阳离子交换固相萃取小柱: 150 mg/6 mL, 或相当者。

5.5.2 聚四氟乙烯滤膜: 0.22  $\mu\text{m}$ 。

5.5.3 玻璃纤维滤膜: 0.45  $\mu\text{m}$ 。

## 6 仪器与设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪: 配有电喷雾离子源。

6.2 分析天平: 感量 0.01 g 和 0.00001 g。

6.3 冷冻干燥机。

6.4 涡旋混合器。

6.5 高速离心机: 转速大于等于 8000 r/min。

6.6 超声波清洗器。

6.7 固相萃取装置。

6.8 氮吹仪。

## 7 样品

### 7.1 样品采集

水样和底泥样品按照 SC/T 9102.3 规定的方法进行采集。

### 7.2 试样制备

水样采样量应不少于 1 L, 经 0.45  $\mu\text{m}$  玻璃纤维滤膜过滤, 置于棕色样品瓶中, 0  $^{\circ}\text{C}$ ~4  $^{\circ}\text{C}$  避光保存, 一周内完成分析。底泥样品采样量应不少于 500 g, 于 -20  $^{\circ}\text{C}$  预冷冻 24 h, 经冷冻干燥机 (-50  $^{\circ}\text{C}$ ,



真空度小于 20 Pa, 冷冻干燥 10 h) 冻干, 剔除石块和植物体等异物, 用研钵研磨后过孔径 0.25 mm 网筛, 置于棕色样品瓶中, 0 °C~4 °C 避光保存, 一个月内完成分析。

### 7.3 空白试样制备

选取不含地西洋的同类样品, 按照 7.2 进行制备。

## 8 测定步骤

### 8.1 提取

#### 8.1.1 水

准确移取 100 mL 试样置于离心管中, 加入 100  $\mu$ L 内标使用液, 加入 1 mL 甲酸酸化, 涡旋震荡, 充分混合, 8000 r/min 离心 5 min, 待净化。

#### 8.1.2 底泥

称取 2 g (准确至 $\pm$ 0.02 g) 试样于 50 mL 离心管中, 加入 3 mL 水润湿, 加入 100  $\mu$ L 内标使用液, 加入 15 mL 1%氨水-乙酸乙酯, 涡旋混合 2 min, 超声提取 10 min, 8000 r/min 离心 5 min, 取上清液转移至 25 mL 比色管中, 残渣用 10 mL 1%氨水-乙酸乙酯重复提取一次, 合并提取液, 45°C 氮气吹干, 加入 5 mL 乙腈溶解, 加入 250  $\mu$ L 甲酸涡旋混合, 待净化。

### 8.2 净化

混合型强阳离子交换固相萃取小柱依次用 3 mL 乙腈和 3 mL 1%甲酸-水溶液活化。预处理水样和底泥提取试样全部转移过柱, 控制流速不超过 5.0 mL/min。待试样全部通过小柱后, 用 3 mL 1%甲酸-水溶液和 3 mL 乙腈淋洗, 减压抽干, 用 3 mL 5%氨水-乙腈溶液洗脱。收集洗脱液, 于 45°C 下氮气吹至近干。加入 1 mL 乙腈溶解残渣, 过 0.22  $\mu$ m 聚四氟乙烯滤膜, 供液相色谱-串联质谱仪测定。

### 8.3 底泥试样含水率测定

按照 GB 17378.5 规定的方法进行测定。

### 8.4 标准曲线制备

分别移取标准使用液和内标使用液, 用乙腈配制成地西洋的质量浓度为 0.5  $\mu$ g/L、1.0  $\mu$ g/L、5.0  $\mu$ g/L、10.0  $\mu$ g/L、20.0  $\mu$ g/L、50.0  $\mu$ g/L, 氘代地西洋质量浓度为 10.0  $\mu$ g/L 的系列标准工作液, 供液相色谱-串联质谱仪测定。以待测物和内标物特征离子质量色谱峰峰面积比值为纵坐标、对应的标准溶液浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程和相关系数。

### 8.5 测定

#### 8.5.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下:

- 色谱柱: C<sub>18</sub> (100 mm $\times$ 2.1 mm, 粒径 2.6  $\mu$ m), 或相当者;
- 流动相: A 为乙腈, B 为 0.1%甲酸-水溶液。梯度洗脱条件见表 1;
- 进样量: 5  $\mu$ L;
- 流速: 0.3 mL/min;

e) 柱温：40℃。

表1 流动相梯度洗脱条件

时间 min	A %	B %
0	10	90
0.5	10	90
4.0	95	5
6.0	95	5
6.1	10	90
8.5	10	90

### 8.5.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

- 离子源：电喷雾离子源；
- 扫描方式：正离子扫描；
- 检测方式：多反应监测（MRM）；
- 喷雾电压：5.5 kV；
- 脱溶剂气温度：550 ℃；
- 多反应监测母离子、子离子、去簇电压和碰撞能量见表 2。

表2 多反应监测母离子、子离子、去簇电压和碰撞能量

化合物名称	母离子 m/z	子离子 m/z	去簇电压 V	碰撞能量 eV
地西洋	285.1	193.1 <sup>a</sup>	100	44
		154.1	100	40
氘代地西洋	290.1	154.1 <sup>a</sup>	100	40
<sup>a</sup> 定量离子。				

### 8.5.3 定性测定

在相同测试条件下，试样中待测物的保留时间与标准工作液中待测物的保留时间一致，偏差在±2.5%以内，且试样中待测物定性离子的相对丰度与浓度相当的标准溶液对应的定性离子的相对丰度一致。其允许偏差见表 3。

表3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度/%	>50	>20~50	>10~20	≤10
允许偏差/%	± 20	± 25	± 30	± 50

### 8.5.4 定量测定

按 8.5.1 和 8.5.2 设定仪器条件，取标准工作溶液、试样溶液、空白试样溶液等体积进样测定，内标法定量。标准工作溶液和试样溶液中目标物的响应值均应在仪器检测线性范围内。地西洋标准溶液特征离子质量色谱图参见附录 A。

## 8.6 空白实验

按照 8.1~8.5 相同的测定步骤进行空白试样（见 7.3）的测定。

## 9 结果计算和表述

### 9.1 水样中地西洋含量

水样中地西洋含量按式（1）计算。计算结果应扣除空白值，保留 2 位有效数字。

$$X_1 = \frac{C_i \times V}{V_0} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

$X_1$  ——试样中地西洋的含量，单位为微克每升（ $\mu\text{g/L}$ ）；

$C_i$  ——从标准工作曲线得到的待测物溶液浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g/L}$ ）；

$V$  ——试样最终定容体积，单位为毫升（mL）；

$V_0$  ——试样体积，单位为毫升（mL）；

### 9.2 底泥中地西洋含量

底泥中地西洋含量按式（2）计算。计算结果应扣除空白值，保留 2 位有效数字。

$$X_2 = \frac{C_i \times V}{m \times (1-w)} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

$X_2$  ——试样中地西洋的含量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g/kg}$ ）；

$C_i$  ——从标准工作曲线得到的待测物溶液浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g/L}$ ）；

$V$  ——试样最终定容体积，单位为毫升（mL）；

$m$  ——试样质量，单位为克（g）；

$w$  ——试样含水率，单位为质量分数（%）。

## 10 检测方法的灵敏度、准确度和精密度

### 10.1 灵敏度

本方法在水产养殖环境水中地西洋的检出限为 0.01  $\mu\text{g/L}$ ，定量限为 0.02  $\mu\text{g/L}$ ；在水产养殖环境底泥中地西洋的检出限为 0.5  $\mu\text{g/kg}$ ，定量限为 1.0  $\mu\text{g/kg}$ 。

### 10.2 准确度

本方法水在 0.02  $\mu\text{g/L}$ ~2  $\mu\text{g/L}$  添加浓度水平上的回收率为 70%~120%；底泥在 1  $\mu\text{g/kg}$ ~100  $\mu\text{g/kg}$  添加浓度水平上的回收率为 70%~120%。

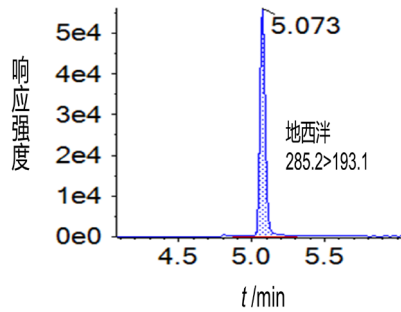
### 10.3 精密度

本方法的批内相对标准偏差小于等于 10%，批间相对标准偏差小于等于 15%。

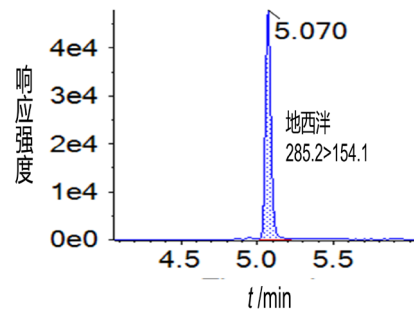
附录 A  
(资料性)

地西洋标准溶液特征离子质量色谱图

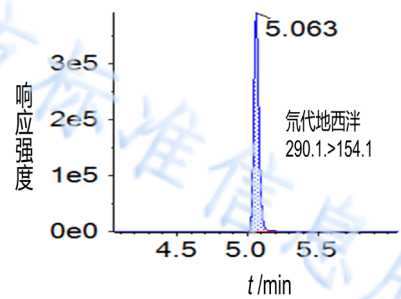
地西洋标准溶液特征离子质量色谱图见图A.1。



a) 地西洋定量离子色谱图



b) 地西洋定性离子色谱图



c) 氘代地西洋定量离子色谱图

图A.1 地西洋标准溶液特征离子质量色谱图 (5  $\mu$ g/L)