



中华人民共和国水产行业标准

SC/T 9453—2025

水产养殖环境(水体、底泥)中地西洋及其代谢物的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of diazepam and its metabolites in water and sediment from
aquaculture environments by liquid chromatography-tandem mass
spectrometry method

2025-04-27 发布

中华人民共和国农业农村部 发布



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。

本文件由农业农村部渔业渔政管理局提出。

本文件由全国水产标准化技术委员会渔业资源分技术委员会(SAC/TC 156/SC 10)归口。

本文件起草单位：中国水产科学研究院南海水产研究所、浙江省水产技术推广总站、广东中检达元检测技术有限公司、中国水产科学研究院黄海水产研究所、广东达元绿洲食品安全科技股份有限公司。

本文件主要起草人：王旭峰、黄珂、柯常亮、肖雅元、李纯厚、王强、王扬、王鼎南、李诗言、梁科、朱文亮、虞为、谭志军、孙晓杰、方武龙、周凡。



水产养殖环境(水体、底泥)中地西泮及其代谢物的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件描述了液相色谱-串联质谱法测定水产养殖环境(水体、底泥)中地西泮及其代谢物的原理、试剂和材料、仪器设备、样品、试验步骤、试验数据处理和检测方法灵敏度、准确度、精密度。

本文件适用于水产养殖环境(水体、底泥)中地西泮、去甲西泮、奥沙西泮、替马西泮残留量的测定。

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

SC/T 9102.2 渔业生态环境监测规范 第2部分:海洋

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 原理

水样经二氯甲烷提取,N-丙基乙二胺净化;底泥样品冷冻干燥,经1%氨水-乙酸乙酯提取,采用混合型强阳离子交换固相萃取小柱富集与净化,液相色谱串联质谱仪测定,内标法定量。

5 试剂和材料

实验用水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 乙腈(CH_3CN):色谱纯。

5.1.2 二氯甲烷(CH_2Cl_2):分析纯。

5.1.3 乙酸乙酯($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$):分析纯。

5.1.4 甲酸(HCOOH):色谱纯。

5.1.5 氨水($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$):分析纯,浓度 $> 25\%$ 。

5.1.6 碳酸钠(Na_2CO_3):分析纯。

5.2 溶液配制

5.2.1 10% Na_2CO_3 溶液:称取 10 g 碳酸钠(5.1.6),加入实验用水溶解,稀释至 100 mL,混匀。

5.2.2 1%氨水-乙酸乙酯溶液:移取 10 mL 氨水(5.1.5),加入 990 mL 乙酸乙酯(5.1.3)中,混匀。

5.2.3 1%甲酸溶液:移取 10 mL 甲酸(5.1.4),加入 990 mL 实验用水中,混匀。

5.2.4 5%氨水-乙腈溶液:移取 25 mL 氨水(5.1.5),加入 475 mL 乙腈(5.1.1)中,混匀。

5.2.5 80%乙腈溶液:移取 80 mL 乙腈(5.1.1),加入 20 mL 实验用水,混匀。

5.2.6 0.1%甲酸溶液:移取 1 mL 甲酸(5.1.4),加入实验用水,定容至 1 000 mL,混匀。

5.3 标准品

5.3.1 地西洋、去甲西洋、奥沙西洋、替马西洋标准品,标准物质信息详见附录 A。

5.3.2 地西洋-D₅、去甲西洋-D₅、奥沙西洋-D₅、替马西洋-D₅ 标准品,内标物信息详见附录 A。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 混合标准储备液(100 μg/mL):称取地西洋、去甲西洋、奥沙西洋和替马西洋标准品(5.3.1)各 10 mg,精密称定,用乙腈(5.1.1)溶解并定容于 100 mL 棕色容量瓶,配制成浓度为 100 μg/mL 的标准储备液,于-20℃以下避光保存,有效期 12 个月。

5.4.2 混合内标储备液(100 μg/mL):称取地西洋-D₅、去甲西洋-D₅、奥沙西洋-D₅、替马西洋-D₅ 标准品(5.3.2)各 10 mg,精密称定,用乙腈(5.1.1)溶解并定容于 100 mL 棕色容量瓶,配制成浓度为 100 μg/mL 的内标储备液,于-20℃以下避光保存,有效期 12 个月。

5.4.3 混合标准中间液(10.0 μg/mL):准确移取 1 mL 混合标准储备液(5.4.1),于 10 mL 棕色容量瓶中,用乙腈(5.1.1)定容,混匀,于-20℃以下避光保存,有效期 6 个月。

5.4.4 混合内标中间液(10.0 μg/mL):准确移取 1 mL 混合内标储备液(5.4.2),于 10 mL 棕色容量瓶中,用乙腈(5.1.1)定容,混匀,于-20℃以下避光保存,有效期 6 个月。

5.4.5 混合标准使用液(0.10 μg/mL):准确移取 1 mL 标准中间液(5.4.3)于 100 mL 棕色容量瓶中,用乙腈(5.1.1)定容,混匀,于 4℃以下避光保存,现用现配。

5.4.6 混合内标使用液(0.10 μg/mL):准确移取 1 mL 内标中间液(5.4.4)于 100 mL 棕色容量瓶中,用乙腈(5.1.1)定容,混匀,于 4℃以下避光保存,现用现配。

5.5 材料

5.5.1 玻璃纤维滤膜:孔径 0.45 μm。

5.5.2 N-丙基乙二胺:40 μm ~ 60 μm 粒径范围,100 Å 平均孔径。

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

5.5.4 微孔滤膜:0.22 μm,有机相。

6 仪器设备

6.1 液相色谱串联质谱仪:配电喷雾离子源。

6.2 冷冻干燥机。

6.3 旋转蒸发仪。

6.4 氮吹仪。

6.5 分液漏斗。

6.6 鸡心瓶。

6.7 天平:感量 0.01 g 和 0.000 1 g。

6.8 涡旋混合器。

6.9 玻璃砂芯过滤装置。

6.10 低速离心机:转速≥4 000 r/min。

6.11 筛网:孔径 100 目。

6.12 高速离心机:转速≥10 000 r/min。

6.13 固相萃取装置,带真空泵。

6.14 超声波振荡器,频率 40 kHz。

7 样品

7.1 样品采集与保存

7.1.1 海水样品和淡水样品分别按照 SC/T 9102.2 和 SC/T 9102.3 的要求采集和保存。水样采样量应

不少于 1 L,经 0.45 μm 玻璃纤维滤膜(5.5.1)过滤,置于棕色玻璃瓶中 0 $^{\circ}\text{C}$ ~ 4 $^{\circ}\text{C}$ 密封避光保存,一周内完成分析。

7.1.2 底泥样品按照 SC/T 9102.2 和 SC/T 9102.3 的要求采集和保存。样品采样量应不少于 500 g,于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 以下预冷冻 24 h,经冷冻干燥机(-50 $^{\circ}\text{C}$ 以下,真空度 < 20 Pa,冷冻干燥 24 h ~ 48 h)冻干,研磨过 100 目筛网(6.11),置于棕色广口玻璃瓶中 0 $^{\circ}\text{C}$ ~ 4 $^{\circ}\text{C}$ 密封避光保存,一个月内完成分析。

7.2 样品处理

7.2.1 水样

准确移取 100 mL 水样(7.1.1),置于分液漏斗中,加入 20 mL 二氯甲烷(5.1.2)和 10 mL 10% Na_2CO_3 溶液(5.2.1),再加入 100 μL 混合内标使用液(5.4.6),振荡提取 5 min,静置分层,收集下层清液于鸡心瓶中。加入 20 mL 二氯甲烷(5.1.2),重复提取一次。合并提取液,45 $^{\circ}\text{C}$ 旋蒸至近干,加入 1 mL 80%乙腈溶液(5.2.5)溶解,溶液转移至 2 mL 离心管,加入 100 mg N-丙基乙二胺(5.5.2),涡旋混合 1 min,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液过 0.22 μm 有机相微孔滤膜(5.5.4),供液相色谱串联质谱仪(6.1)测定。

7.2.2 底泥

准确称取制备的底泥样品(7.1.2)2 g(精确至 0.01 g),置于 50 mL 离心管中,加入 100 μL 混合内标使用液(5.4.6)和 5 mL 水,涡旋混合 1 min,静置 30 min,然后加入 15 mL 1%氨水-乙酸乙酯溶液(5.2.2)涡旋混合 2 min,超声提取 10 min,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 4 000 r/min 离心 5 min,取上清液。残渣加入 10 mL 1%氨水-乙酸乙酯溶液(5.2.2),重复提取一次。合并提取液,45 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干,加入 5 mL 乙腈(5.1.1)和 250 μL 甲酸(5.1.4),涡旋混合 2 min,得到溶液 A,备用。

用 5 mL 乙腈(5.1.1)和 5 mL 1%甲酸溶液(5.2.3)预活化固相萃取小柱(5.5.3)。取溶液 A 过柱,保持柱流速小于 1.5 mL/min,再用 5 mL 1%甲酸溶液(5.2.3)和 5 mL 乙腈(5.1.1)淋洗,弃去流出液,用 4 mL 5%氨水乙腈溶液(5.2.4)洗脱,收集洗脱液,于 45 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹至近干,加入 1 mL 80%乙腈溶液(5.2.5)溶解,过 0.22 μm 有机相微孔滤膜(5.5.4),供液相色谱串联质谱仪(6.1)测定。

8 试验步骤

8.1 标准工作曲线的制备

准确移取适量混合标准使用液(5.4.5)和混合内标使用液(5.4.6),用 80%乙腈溶液(5.2.5)稀释,配制成地西泮、去甲西泮、奥沙西泮、替马西泮浓度为 0.50 $\mu\text{g/L}$ 、1.00 $\mu\text{g/L}$ 、5.00 $\mu\text{g/L}$ 、10.0 $\mu\text{g/L}$ 、20.0 $\mu\text{g/L}$ 、50.0 $\mu\text{g/L}$ 的标准溶液,内标物浓度为 10.0 $\mu\text{g/L}$ 。也可根据仪器灵敏度适当增加或减少内标物浓度,或根据检测试样中地西泮、去甲西泮、奥沙西泮、替马西泮浓度调整配制至少 6 个浓度点的标准工作系列。以地西泮、去甲西泮、奥沙西泮、替马西泮与对应内标物的浓度比为横坐标,以地西泮、去甲西泮、奥沙西泮、替马西泮与对应内标物的峰面积比为纵坐标,绘制标准工作曲线。

8.2 仪器参考条件

8.2.1 液相色谱条件

液相色谱的参考条件如下:

- 色谱柱: C_{18} 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm,1.7 μm),或性能相当者;
- 流动相:A 为乙腈(5.1.1),B 为 0.1%甲酸溶液(5.2.6),梯度洗脱条件见表 1;
- 流速:300 $\mu\text{L/min}$;
- 柱温:40 $^{\circ}\text{C}$;
- 进样量:5 μL 。

表 1 梯度洗脱条件

时间 min	A %	B %
0.00	15.0	85.0
3.00	95.0	5.0
3.40	95.0	5.0
3.50	15.0	85.0
5.00	15.0	85.0

8.2.2 质谱条件

质谱测定参考条件如下：

- a) 离子源：电喷雾电离(ESI)；
- b) 扫描模式：正离子扫描；
- c) 离子源温度：150 ℃；
- d) 脱溶剂气温度：400 ℃；
- e) 毛细管电压：3.0 kV；
- f) 源补偿电压：50 V；
- g) 碰撞气流量：0.15 mL/min；
- h) 检测方式：多反应监测(MRM)；
- i) 定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞能参考值见表 2。

表 2 母离子、子离子对、锥孔电压和碰撞能

化合物	母离子 m/z	子离子 m/z	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
地西洋	285.1	222.1 ^a	68	30
		154.1		20
去甲西洋	271.0	140.0 ^a	70	22
		165.0		26
奥沙西洋	287.1	269.1 ^a	30	12
		241.2		15
替马西洋	301.2	255.1 ^a	40	20
		283.1		15
地西洋-D ₅	290.1	154.1	68	30
去甲西洋-D ₅	276.1	213.1	70	26
奥沙西洋-D ₅	292.1	246.1	30	17
替马西洋-D ₅	306.2	260.1	40	20
^a 定量离子。				

8.2.3 定性分析

按照 8.2.1 和 8.2.2 测试条件，试样溶液中地西洋、去甲西洋、奥沙西洋、替马西洋保留时间与标准溶液中保留时间之间相对偏差在±2.5%以内；且试样溶液中地西洋、去甲西洋、奥沙西洋、替马西洋的定性离子相对丰度应与浓度相当的标准溶液中离子相对丰度一致，其允许偏差应符合表 3 要求。

表 3 定性离子相对丰度最大允许偏差

单位为百分号

定性离子相对丰度	最大允许偏差
>50	±20
> 20~50	±25
>10~20	±30
≤10	±50

8.2.4 定量测定

取试样溶液和标准工作液进样测定,作单点或多点校准,按内标法计算。标准溶液及试样溶液中地西洋、去甲西洋、奥沙西洋、替马西洋的响应值均应在仪器检测的线性范围内。液相色谱-串联质谱多反应监测色谱图见附录 B。

8.2.5 空白试验

除不加试样外,均按 7.2 样品处理步骤进行。

9 试验数据处理

9.1 水样中地西洋、去甲西洋、奥沙西洋、替马西洋的残留量

计算结果以重复性条件下获得的 2 次独立测定结果的算术平均值表示,应扣除空白值。计算结果保留 3 位有效数字。水样中地西洋、去甲西洋、奥沙西洋、替马西洋的残留量按标准曲线校正或公式(1)计算。

$$X_i = c_s \times \frac{A}{A_s} \times \frac{c_i}{c_{si}} \times \frac{A_{si}}{A_i} \times \frac{V}{V_0} \times 1000 \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- X_i ——水样中地西洋、去甲西洋、奥沙西洋、替马西洋残留量的数值,单位为纳克每升(ng/L);
- c_s ——标准溶液中地西洋、去甲西洋、奥沙西洋、替马西洋浓度的数值,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);
- A ——试样溶液中地西洋、去甲西洋、奥沙西洋、替马西洋的色谱峰面积;
- A_s ——标准溶液中地西洋、去甲西洋、奥沙西洋、替马西洋的色谱峰面积;
- c_i ——试样溶液中内标物质量浓度的数值,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);
- c_{si} ——标准溶液中内标物质量浓度的数值,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);
- A_{si} ——标准溶液中内标物的色谱峰面积;
- A_i ——试样溶液中内标物的色谱峰面积;
- V ——试样溶液定容体积的数值,单位为毫升(mL);
- V_0 ——水样体积的数值,单位为毫升(mL)。

9.2 底泥中地西洋、去甲西洋、奥沙西洋、替马西洋的残留量

计算结果以重复性条件下获得的 2 次独立测定结果的算术平均值表示,应扣除空白值。计算结果保留 3 位有效数字。底泥样品中地西洋、去甲西洋、奥沙西洋、替马西洋的残留量按标准曲线校正或公式(2)计算。

$$X_j = c_s \times \frac{A}{A_s} \times \frac{c_i}{c_{si}} \times \frac{A_{si}}{A_i} \times \frac{V}{m} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- X_j ——底泥中地西洋、去甲西洋、奥沙西洋、替马西洋残留量的数值,单位为微克每千克($\mu\text{g/kg}$);
- c_s ——标准溶液中地西洋、去甲西洋、奥沙西洋、替马西洋浓度的数值,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);
- A ——试样溶液中地西洋、去甲西洋、奥沙西洋、替马西洋的色谱峰面积;
- A_s ——标准溶液中地西洋、去甲西洋、奥沙西洋、替马西洋的色谱峰面积;
- c_i ——试样溶液中内标物质量浓度的数值,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);

c_{si} ——标准溶液中内标物质量浓度的数值,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);

A_{si} ——标准溶液中内标物的色谱峰面积;

A_i ——试样溶液中内标物的色谱峰面积;

V ——试样溶液定容体积的数值,单位为毫升(mL);

m ——底泥样品质量的数值,单位为克(g)。

10 检测方法灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

水样中的检出限为 5.0 ng/L ,定量限为 10.0 ng/L ;底泥中的检出限为 $0.5 \mu\text{g/kg}$,定量限为 $1.0 \mu\text{g/kg}$ 。

10.2 准确度

水样中添加浓度为 $10.0 \text{ ng/L} \sim 100.0 \text{ ng/L}$ 时,回收率为 $80\% \sim 120\%$ 。

底泥中添加浓度为 $1.0 \mu\text{g/kg} \sim 10.0 \mu\text{g/kg}$ 时,回收率为 $80\% \sim 120\%$ 。

10.3 精密度

本方法的批内相对标准偏差 $\leq 15\%$,批间相对标准偏差 $\leq 20\%$ 。

附 录 A
(资料性)

地西洋、去甲西洋、奥沙西洋、替马西洋及内标物基本信息

地西洋、去甲西洋、奥沙西洋、替马西洋及内标物中文名、英文名、分子式和 CAS 号见表 A. 1。

表 A. 1 地西洋、去甲西洋、奥沙西洋、替马西洋及内标物中文名、英文名、分子式和 CAS 号

中文名	英文名	分子式	CAS 号
地西洋	Diazepam	$C_{16}H_{13}ClN_2O$	439-14-5
去甲西洋	Nordazepam	$C_{15}H_{11}ClN_2O$	1088-11-5
奥沙西洋	Oxazepam	$C_{15}H_{11}ClN_2O_2$	604-75-1
替马西洋	Temazepam	$C_{16}H_{13}ClN_2O_2$	846-50-4
地西洋-D ₅	Diazepam-D ₅	$C_{16}H_8D_5ClN_2O$	65854-76-4
去甲西洋-D ₅	Nordazepam-D ₅	$C_{15}H_6D_5ClN_2O$	65891-80-7
奥沙西洋-D ₅	Oxazepam-D ₅	$C_{15}H_6D_5ClN_2O_2$	65854-78-6
替马西洋-D ₅	Temazepam-D ₅	$C_{16}H_8D_5ClN_2O_2$	136765-51-0

附 录 B
(资料性)

地西洋、去甲西洋、奥沙西洋、替马西洋及内标物标准溶液多反应监测色谱图

地西洋、去甲西洋、奥沙西洋、替马西洋及内标物标准溶液多反应监测色谱图见图 B. 1。

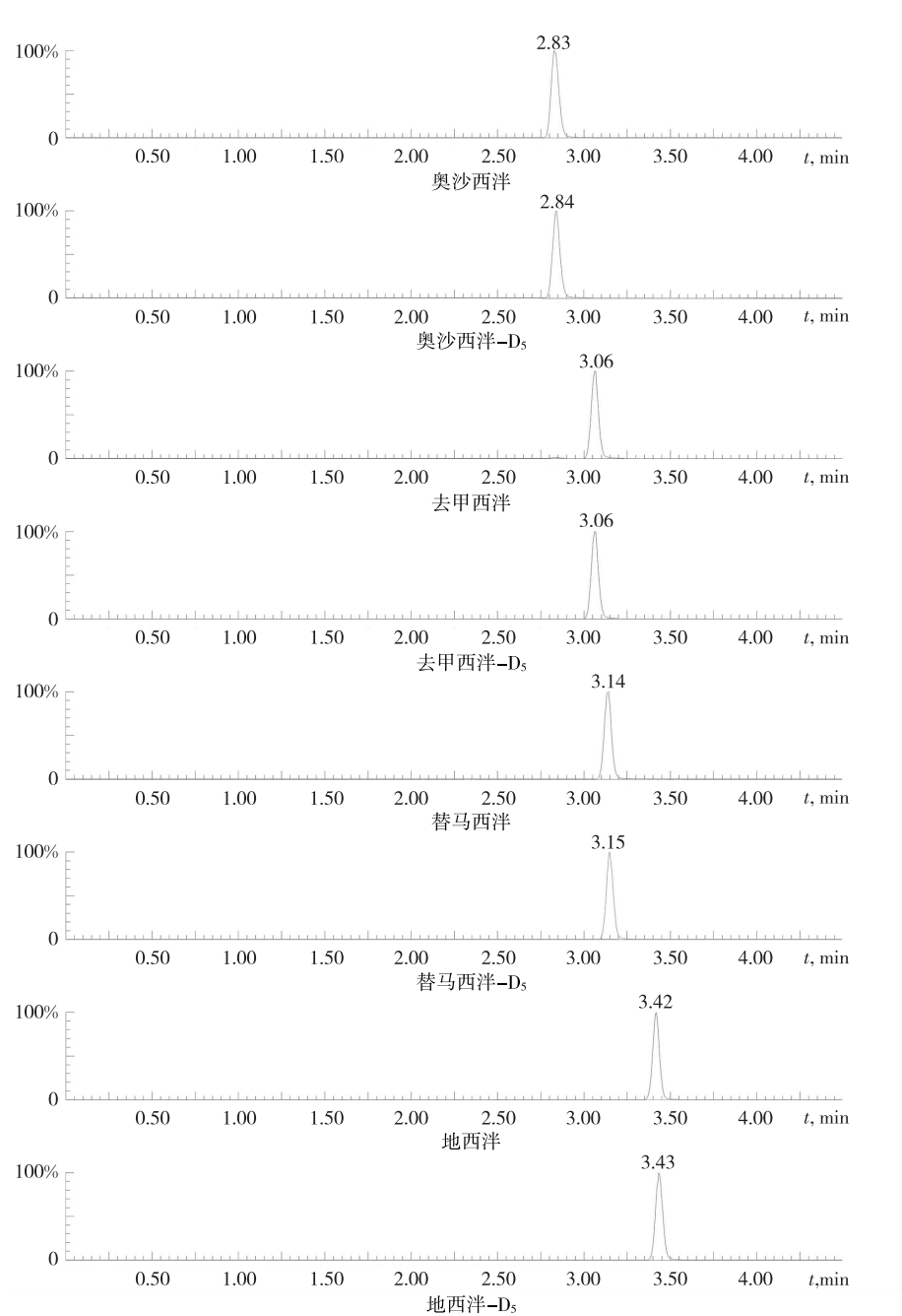


图 B. 1 地西洋、去甲西洋、奥沙西洋、替马西洋及内标物标准溶液多反应监测色谱图 (1.00 μg/L)