



中华人民共和国农业行业标准

NY/T XXXX—202X

畜禽肉中季铵盐的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of quaternary ammonium salt disinfectant in livestock meat by liquid
chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

202X - XX - XX 发布

202X - XX - XX 实施

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畜牧兽医局提出。

本文件由全国屠宰加工标准化技术委员会（SAC/TC 516）归口。

本文件起草单位：略。

本文件主要起草人：略。

畜禽肉中季铵盐的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了畜禽肉中6种季铵盐检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于猪、牛、羊、鸡的肌肉中十二烷基二甲基苄基氯化铵（C12-BAC）、十四烷基二甲基苄基氯化铵（C14-BAC）、十六烷基二甲基苄基氯化铵（C16-BAC）、二癸基二甲基氯化铵（DDAC）、十二烷基三甲基溴化铵（DTAB）、十二烷基二甲基-2-苯氧基-乙基溴化铵季铵盐（DMF）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

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中的药物经乙腈水溶液振荡提取,固相萃取柱净化,C₁₈色谱柱分离,液相色谱-串联质谱仪测定,基质匹配外标法定量。

5 试剂与材料

除另有规定外,所用试剂均为分析纯。水为符合GB/T 6682规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 乙腈（CH₃CN）：质谱纯。

5.1.2 甲酸（HCOOH）：质谱纯。

5.1.3 甲醇（CH₃OH）：色谱纯。

5.1.4 氨水（NH₃·H₂O）：优级纯。

5.1.5 甲酸铵（HCOONH₄）。

5.1.6 氯化钠（NaCl）。

5.1.7 无水硫酸钠（Na₂SO₄）。

5.2 溶液配制

5.2.1 0.1%氨水溶液：取 0.1 mL 氨水，用水稀释并定容至 100 mL。

5.2.2 1%氨水溶液：取 1.0 mL 氨水，用水稀释并定容至 100 mL。

5.2.3 5%甲酸甲醇溶液：取 50 mL 甲酸，用甲醇稀释并定容至 1000 mL。

5.2.4 0.01%甲酸+0.05%甲酸铵溶液：取 0.1 mL 甲酸、0.5 g 甲酸铵用水稀释并定容至 1000 mL。

5.3 标准品

6 种季铵盐标准品的英文名称、CAS 号、分子式和分子量见附录 A，各种标准品的纯度均不小于 98%。

5.4 标准溶液制备

5.4.1 标准储备液（10 mg/mL）：取 6 种季铵盐标准品各 100 mg（以季铵盐的单体计，若所用标准品为相应的盐或含结晶水，应折算成有效成份），精密称定，用甲醇溶解，转移至 10 mL 容量瓶中定容，摇匀，即得。-18℃以下避光保存，有效期 6 个月。

5.4.2 混合标准中间液（100 µg/mL）：精密量取各标准储备液 0.1 mL 于 10 mL 容量瓶中，用甲醇定容至刻度，摇匀，即得。-18℃以下避光保存，有效期 3 个月。

5.4.3 混合标准工作液（10 µg/mL）：精密量取混合标准中间液 1.0 mL 于 10 mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度摇匀，即得。临用现配。

5.5 材料

5.5.1 陶瓷均质子。

5.5.2 再生纤维素（RC）滤膜：0.22 µm。

5.5.3 弱阳离子交换固相萃取柱（150 mg, 6 mL）

6 仪器设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾离子源（ESI）。

6.2 天平：感量 0.00001 g。

6.3 低温离心机：转速 10000 r/min，温度可调范围 0℃~4℃。

6.4 涡旋振荡器。

6.5 氮吹仪。

7 试料的制备与保存

7.1 试料的制备

取适量新鲜或解冻的空白或供试肌肉组织，绞碎，并使均质。

a) 取混匀后的供试样品，作为供试试料；

b) 取混匀后的空白样品，作为空白试料；

c) 取混匀后的空白样品，添加适宜浓度的标准工作液，作为空白添加试料。

7.2 试料的保存

-18℃以下保存。

8 分析步骤

8.1 提取

称取 5 g (精确至 ± 0.05 g) 试样于 50 mL 具塞塑料离心管中, 加入一粒陶瓷均质子, 加入 3 mL 水、10 mL 乙腈、1 g 氯化钠和 4 g 无水硫酸钠, 盖好盖子, 用涡旋振荡器振荡 5 min 后, 于 10000 r/min 下低温离心 10 min。取 4 mL 乙腈上清液, 加入 4 mL 水, 涡旋混匀, 备用。

8.2 净化

取备用液全部过弱阳离子交换固相萃取柱 (5 mL 甲醇, 5 mL 0.1% 稀氨水溶液活化), 依次用 5 mL 1% 氨水溶液, 5 mL 甲醇淋洗, 抽干小柱 3 min, 用 5 mL 5% 甲酸甲醇溶液洗脱, 接收全部洗脱液, 氮吹至近干, 1.0 mL 乙腈溶解, 过 0.22 μ m RC 滤膜, 供液相色谱-串联质谱仪测定。

8.3 基质匹配标准曲线的制备

取新鲜空白试料 5 g (准确至 ± 0.05 g), 按上述步骤提取净化后得到上机溶液作为空白样品提取基质液。配制得到质量浓度为 2 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL 和 200 ng/mL 的系列基质匹配混合标准工作液, 供液相色谱-串联质谱仪测定。以待测物特征离子质量色谱峰面积为纵坐标、以基质匹配标准工作液浓度为横坐标, 绘制标准工作曲线。计算回归方程及相关系数。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下:

- 色谱柱: C_{18} 色谱柱 (50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μ m), 或相当者;
- 流动相: A 相为水+0.01% 甲酸+0.05% 甲酸铵, B 相为乙腈, 梯度洗脱条件见表 1;
- 流速: 0.30 mL/min;
- 柱温: 30 $^{\circ}$ C;
- 进样量: 1 μ L。

表 1 液相色谱梯度洗脱条件

时间 (min)	流速 (mL/min)	A 相 (%)	B 相 (%)
0	0.3	45	55
3.0	0.3	45	55
9.0	0.3	10	90
11.0	0.3	10	90
11.1	0.3	45	55
13.0	0.3	45	55

8.4.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下:

- 离子源: 电喷雾离子源 (ESI);

- b) 扫描方式：正离子扫描；
 c) 毛细管电压：3000V；
 d) 离子源温度：150℃；
 e) 雾化器压力：40psi；
 f) 脱溶剂气温度：350℃；
 g) 脱溶剂气：氮气15 L/min；
 h) 监测方式：多反应监测（MRM）；
 i) 母离子、子离子、锥孔电压及碰撞电压见表2。

表2 6种季铵盐的质谱参数

化合物名称	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
十二烷基二甲基苄基氯化铵（C12-BAC）	304.5/91.0	304.5/91.0	30	28
	304.5/212.1			20
十四烷基二甲基苄基氯化铵（C14-BAC）	332.5/90.9	332.5/90.9	30	25
	332.5/240.2			22
十六烷基二甲基苄基氯化铵（C16-BAC）	360.6/90.9	360.6/90.9	30	27
	360.6/268.2			20
二癸基二甲基氯化铵（DDAC）	326.6/186.1	326.6/186.1	30	28
	326.6/184.1			28
十二烷基三甲基溴化铵（DTAB）	228.4/60.0	228.4/60.0	30	20
	228.4/43.0			27
十二烷基二甲基-2-苯氧基-乙基溴化铵（DMF）	334.5/72.0	334.5/72.0	30	28
	334.5/166.0			25

8.4.3 测定法

8.4.3.1 定性测定

在相同测试条件下，试样溶液与标准溶液中待测物的保留时间相对偏差应在±2.5%之内。且检测到的离子相对丰度，应当与浓度相当的基质匹配标准溶液离子相对丰度一致。其允许偏差应符合表3要求。

表3 定性确证时离子相对丰度的最大允许偏差

离子相对丰度，%	> 50	> 20 ~ 50	> 10 ~ 20	≤ 10
允许的最大偏差，%	±20	±25	±30	±50

8.4.3.2 定量测定

按8.4.1和8.4.2设置仪器条件,取试料溶液和基质匹配标准工作液,作单点或多点校准,按外标法以色谱峰面积定量。试料溶液及基质匹配标准工作液中6种季铵盐的峰面积均应在仪器检测的线性范围之内。6种季铵盐基质匹配标准液特征离子质量色谱图见附录B。

8.5 空白试验

除不称取样品外,按8步骤与测试平行进行测定。

9 结果计算和表述

试样中待测药物的残留量可按以下公式计算,多点校准按公式(1)计算;单点校准按公式(2)计算:

$$X = \frac{\rho \times V_2 \times V \times 1000}{V_1 \times m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X ——试样中被测组分的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

ρ ——从标准曲线查得的试样溶液季铵盐的质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V ——提取时加入乙腈的体积,单位为毫升(mL);

V_1 ——取上清液的体积,单位为毫升(mL);

V_2 ——氮气吹干后复溶液的体积,单位为毫升(mL);

m ——试样质量,单位为克(g)。

$$X = \frac{A \times \rho_s \times V_2 \times V \times 1000}{A_s \times V_1 \times m \times 1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

X ——试样中被测组分的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

A ——试样溶液中季铵盐色谱峰面积;

A_s ——标准溶液中季铵盐的峰面积;

ρ_s ——标准溶液中季铵盐的质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V ——提取时加入乙腈的体积,单位为毫升(mL);

V_1 ——取上清液的体积,单位为毫升(mL);

V_2 ——氮气吹干后复溶液的体积,单位为毫升(mL);

m ——试样质量,单位为克(g)。

计算结果需扣除空白值,测定结果用两次平行测定的算术平均值表示,保留三位有效数字。

10 方法的灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法的检出限为1 $\mu\text{g/kg}$,方法定量限为2 $\mu\text{g/kg}$ 。

10.2 准确度

本方法在 2 $\mu\text{g/kg}$ ~ 100 $\mu\text{g/kg}$ 的添加浓度范围内，回收率为 60% ~ 120 %。

10.3 精密度

本方法的批内相对标准偏差 $\leq 10\%$ ，批间相对标准偏差 $\leq 15\%$ 。

附录 A

(资料性)

6种季铵盐标准品的信息

6种季铵盐的英文名称、CAS号、分子式和分子量见表A.1。

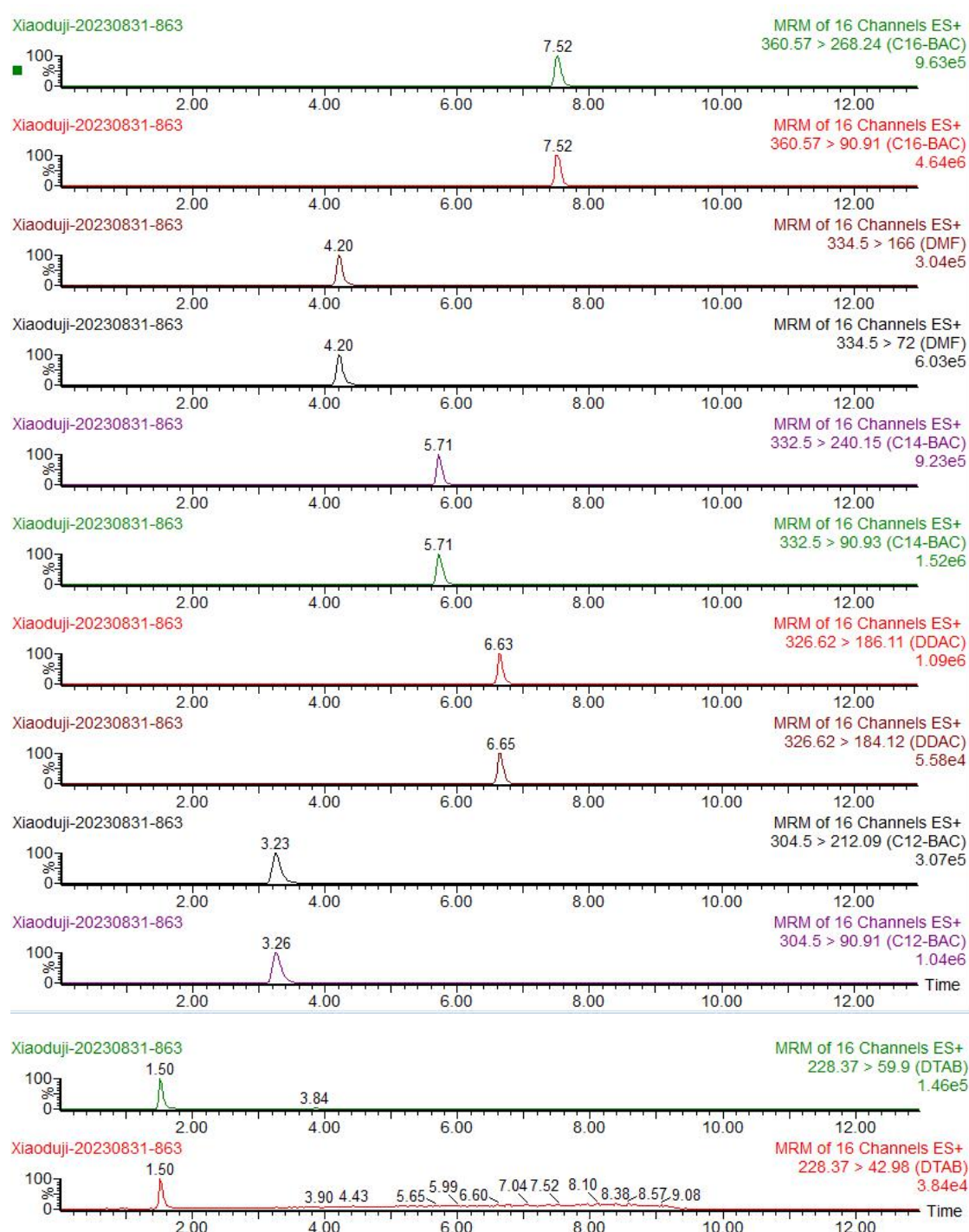
表A.1 6种季铵盐标准品的信息

序号	中文名称	英文名称	CAS 号	分子式	分子量
1	十二烷基二甲基苄基氯化铵	Dodecyl dimethyl benzyl ammonium chloride	139-07-1	C ₂₁ H ₃₈ ClN	339.99
2	十四烷基二甲基苄基氯化铵	Tetradecyl dimethyl benzyl ammonium chloride	139-08-2	C ₂₃ H ₄₂ ClN	368.04
3	十六烷基二甲基苄基氯化铵	Cetyl dimethylamino ammonium chloride	122-18-9	C ₂₅ H ₄₆ ClN	396.09
4	二癸基二甲基氯化铵	Didecyl dimethylammonium chloride	7173-51-5	C ₂₂ H ₄₈ ClN	362.08
5	十二烷基三甲基溴化铵	Dodecyl trimethyl ammonium bromide	1119-94-4	C ₁₅ H ₃₄ BrN	308.34
6	十二烷基二甲基-2-苯氧基-乙基溴化铵	Dodecyl dimethyl-2-phenoxy-ethylammonium	538-71-6	C ₂₂ H ₄₀ BrNO	414.46

附录 B (资料性)

6种季铵盐标准液的特征离子质量色谱图

6种季铵盐标准液的特征离子质量色谱图见图B.1。



图B.1 6种季铵盐标准液的特征离子质量色谱图

农业行业标准《畜禽肉中季铵盐的测定 液相色谱-串联质谱法》（征求意见稿）编制说明

一、工作简况

（一）任务来源和制定背景

制定农业行业标准《畜禽肉中季铵盐的测定 液相色谱-串联质谱法》的任务来源于农业农村部农产品质量安全监管司《关于下达 2023 年农业国家和行业标准制修订项目计划的通知》，序号 171，项目编号为 NYB-23069。本次制定任务是建立猪、牛、羊和鸡肌肉组织中季铵盐残留的检测方法，由农业农村部畜牧兽医局提出，全国屠宰加工标准化技术委员会归口。

季铵盐类化合物是一类阳离子表面活性剂，包括单链季铵盐和双链季铵盐，其具有良好的杀灭微生物作用，在养殖和屠宰行业的日常消毒与疫病防控中得到了广泛使用。由于它具有无腐蚀、无刺激、易溶于水等特点，在新冠疫情期间，我国的新冠控制指南、美国 CDC 和新加坡的消毒指南，更是把季铵盐做为推荐使用的消毒剂。

但在养殖和屠宰环节大量使用季铵盐类消毒剂，导致其在畜禽养殖过程中被摄入、吸入或在屠宰时附着在胴体或肉的表面，造成动物组织中的季铵盐残留。季铵盐虽然安全性较高，但作为化学制剂，在长期体内累积或高浓度附着的情况下，人体摄入后依然有一定的毒副作用，主要表现在中枢神经系统抑制、肌肉震颤、呼吸抑制、心律失常和电解质紊乱等方面。针对复方季铵盐消毒液的安全性研究也显示，季铵化合物可能对脑细胞产生潜在毒性，特别是少突胶质细胞，影响神经信号传输，并可能在具有遗传易感性的人群中引发疾病。因此 2012 年，欧洲食品安全局根据德国风险评估研究所的评估结果，把 DDAC 和 BAC 这两类

季铵盐的限量确定为 0.5 mg/kg。2014 年，欧洲食品安全局根据在来自欧洲 17 个国家的 5472 种食品样本中 DDAC 和 BAC 残留检测的调查结果，决定把 DDAC 和 BAC 在食品中的残留上限再次调整到 0.1 mg/kg，显示季铵盐的安全风险在进一步加剧；而在国际贸易中，由于季铵盐尚未纳入我国出口食品风险监管范畴，大部分企业未开展季铵盐风险评估，导致了我国出口食品因季铵盐含量超标被退回的情况，并造成相关经济损失。所以面对食品安全和国际贸易等多方面的需求，迫切需要制定一种快速、灵敏、高效的检测方法标准。

我国现有的 SN/T 4048-2014《出口食品中季铵盐的测定 液相色谱-质谱/质谱法》标准，虽然适用范围广泛，但主要针对出口食品，只包含了猪肉和牛肝两种畜禽基质，不能覆盖最基本的畜禽产品品类，针对性较差；同时由于该标准颁布时间较早，所涉及的季铵盐种类较少，在 2021 年新颁布的 GB/T 39873-2021《消毒剂中季铵盐的测定 液相色谱-串联质谱法》中，已经列出了 6 种常用的季铵盐，而 SN/T 4048-2014 中只有 5 种，无法满足其相关项目的检测需求。

综上，为填补我国面临的季铵盐检测的技术缺口，保障我国畜禽产品的质量安全和人民群众的身体健康及国际贸易等多方面的需要，急需建立针对畜禽中季铵盐的检测方法，而在畜禽的所有组织中，肌肉组织是占比最大，食用最多，对食用安全影响最大的组织，对肌肉组织的检测，可以最大程度的反应季铵盐的残留状况和降低食用安全风险。因此本研究建立了一种适用于猪、牛、羊、鸡的肌肉中 6 种季铵盐残留的液相色谱-串联质谱检测方法，扩大季铵盐检测适用范围和残留检测种类，该方法灵敏度高，回收率、精密度高，重现性好，能很好地满足实际工作的需求。

(二) 起草单位

标准起草单位包括：中国动物疫病预防控制中心(农业农村部屠宰技术中心)、河北科技大学等。起草人及分工略。

(三) 起草过程

1. 起草查阅文献。2023 年 3-11 月，标准编制工作小组广泛收集国内标准和国际标准，并检索了有关季铵盐检测方法的国内外文献，掌握了当前季铵盐检测方法的研究现状，制定了标准检测方法试验草案，拟订工作计划和工作进度，购买季铵盐相关标准品。

2. 形成标准研究方案稿。2023 年 11 月-2024 年 9 月，按照申报的技术指标要求及查询的参考文献，拟定的试验方案，按试验方案购买相关标准品、试剂和耗材，并对畜禽肉中季铵盐检测的液相色谱串联质谱法的前处理方法和仪器方法进行研究，确定了最终的前处理条件和仪器条件。并开展了方法线性、检测限、定量限、添加回收率、批内批间误差等相关方法学试验，以确定方法最终是否具有可操作性和科学性。

3. 形成标准讨论稿。2024 年 10 月编制工作小组在方法实验过程中认真学习了 GB/T1.1-2009 标准化工作导则关于“标准的结构和编写”，GB/T20001.4“化学分析方法”等有关知识，明确了化学分析方法的编写规则。在 2024 年 10 月完成了该方法标准的征求意见稿和编制说明。形成了《畜禽肉中季铵盐的测定 液相色谱-串联质谱法》标准讨论稿。

4. 征求意见稿审查。2024 年 11 月，根据标委会的要求，起草组组织了行业内 3 位评审专家，于 2024 年 11 月 8 日于北京(视频腾讯会议,会议号:296187090)进行了征求意见稿的审查，审查会专家组成员有：孙志文、李研东、单吉浩、专家组对本标准的征求意见稿进行了审查，结果为通过征求意见稿审查，并经专家

签字后，形成了征求意见稿审技术查会审查意见，起草组针对专家提出的审查意见进行了认真讨论，并逐一给出了处理意见，形成征求意见稿汇总处理表。以此为依据修改完善了征求意见稿标准文本和其标准编制说明。

5、复核验证。2024 年 11-2025 年 2 月，根据要求，起草组联系了畜禽肉品的检测中具有较多工作任务的三家国内相关检测机构（都具备 CMA 和 CATL 资质且长期从事动物产品质量安全检测工作的机构），分别是：农业农村部农产品及加工品质量检验测试中心（北京）、农业农村部动物及动物产品卫生质量检验测试中心、河北省兽药饲料工作总站三家单位，对起草组完善之后的标准方法征求意见稿进行了全面、严格的复核验证。复核验证包括了方法的关键技术参数（方法的定量限、检测限、高中低三个浓度情况下的回收率、批内相对标准偏差、批间相对标准偏差、线性范围、应用范围、基质效应等）进行了验证和复核。相对应的机构盖章复核报告见附录文件，复核结果均能满足标准文本中规定的各项参数指标要求。

6. 公开征求意见（待开展）

二、标准编制原则和确定标准主要内容的依据

（一）编制原则

本标准的编写制定过程中以提高测试方法的选择性、准确度、精密度、检测限和分析效率为总原则，反映科学技术的先进成果和先进经验。

在标准的制定过程中严格遵循国家有关方针、政策、法规和规章，标准的编写规则及表述按照以下的标准进行：

GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准的结构和编写规则的要求》

GB/T 5009.1-2003 《食品卫生检验方法 理化部分 总则》

GB/T 20001.4-2015 《标准编写规则第 4 部分：化学分析方法》

GB/T 1.2《标准化工作导则第 2 部分标准中规范性技术要素内容的确定方法》

在标准制定过程中力求做到：技术内容的叙述正确无误；文字表达准确、简明、易懂；标准的构成严谨合理；内容编排、层次划分等符合逻辑与规定。

（二）主要内容的依据

本标准主要内容中的技术指标、参数、公式、性能要求、试验方法、检验规则等提出和确定的依据，来源于以下标准及相关规定：《兽药残留试验技术规范（试行）》（农牧发[2003]1 号文）；NY/T 1896-2010《兽药残留实验室质量控制规范》中附录 E。GB/T 6682 分析《实验室用水规格和试验方法》；中华人民共和国农业部公告 2386 号《农药残留检测方法国家标准编制指南》。

2.1 方法试验条件的研究

2.1.1 提取溶剂的选择

目标药物在不同溶剂中溶解度不同，因此选择合适的提取溶剂是保证提取效率的关键因素之一。通过文献资料的查询，考察了甲醇、乙腈、甲醇：水（10:3）和乙腈：水（10:3）对基质中目标物提取效果的影响。如图 1 所示，结果表明：甲醇：水提取溶剂和乙腈：水提取溶剂的提取效率明显优于甲醇和乙腈的提取效率，采用乙腈：水（10：3）作为提取溶剂对目标物的提取效率最好。综合考虑，选择乙腈：水作为提取溶剂。

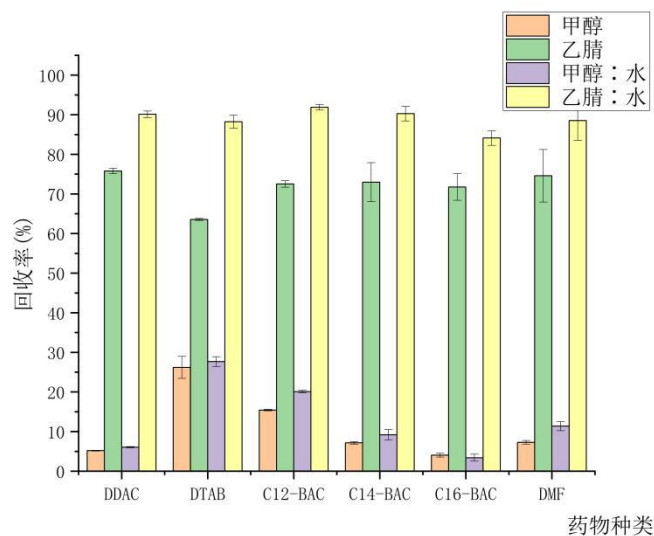


图 1 不同提取溶剂添加回收试验回收率比较 (%)

2.1.2 固相萃取柱的选择

季铵盐在有机溶剂中以阳离子形式存在,目前标准及文献中多采用阳离子交换固相萃取柱对其进行净化。因此,我们首先考察了、弱阳离子交换固相萃取柱 (PWCX)、通用的亲水亲脂平衡固相萃取柱 (HLB) 和 C18 三种固相萃取柱的净化效果。结果如图 2 所示,与其他三种固相萃取柱相比,使用 PWCX 柱时目标化合物回收较高。

同时,我们还比较了 150 mg/6 mL 和 60 mg/3 mL 两种不同规格的 PWCX 固相萃取柱的效果。结果如图 2.1 显示,规格为 150mg/6mL 的 PWCX 固相萃取柱效果更佳。因此,固相萃取柱选择确定为 PWCX 固相萃取柱。

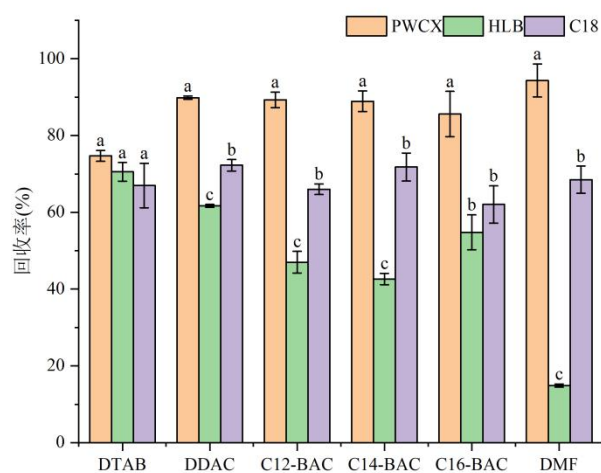


图 2 不同萃取柱添加回收试验回收率比较（%）

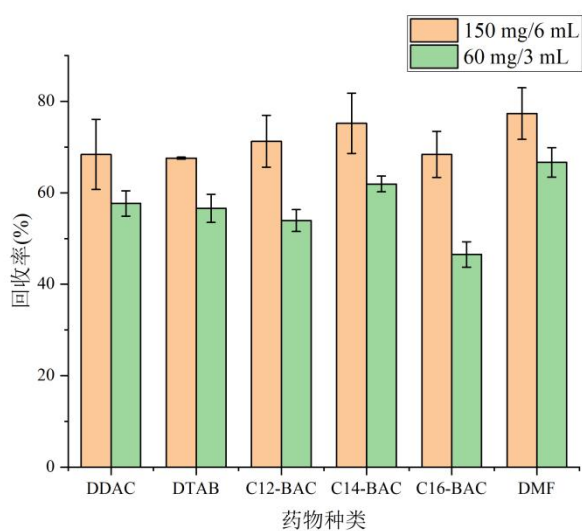


图 2.1 不同规格萃取柱添加回收试验回收率比较（%）

2.1.3 复溶液的优化

进行氮吹后的样品溶液，需要选择合适的复溶液进行复溶。在其他条件一定的情况下，对复溶液中水与乙腈的比例进行考察。设置水与乙腈比例为 1:9、2:8、5:5 和纯乙腈进行实验，以 6 种药物的回收率进行比较，结果如图 3 所示。随着水与乙腈的比例增大，6 种药物的回收率在逐渐减少，因此，最终复溶液确定为

纯乙腈。

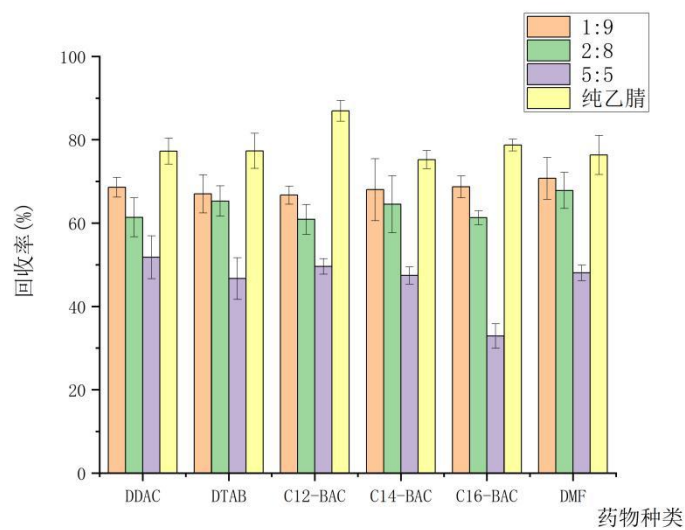


图 3：不同比例复溶液添加回收试验回收率比较（%）

2.1.4 滤膜的选择

上机检测前需要将复溶液进行过滤，以降低复溶液中的杂质对检测结果的影响。将 PES、NL、RC 这 3 种不同型号的滤膜进行对比，以 6 种药物的回收率为参考。结果显示：PES 和 NL 这两种滤膜对季铵盐有一定的吸附作用，经 PES 和 NL 两种滤膜过滤后的复溶液中部分季铵盐药物回收率低，回收率在 50%以下，效果较差；以 RC 滤膜进行过滤后的药物回收率较高，效果最好，因此最终滤膜选择为 RC 滤膜。

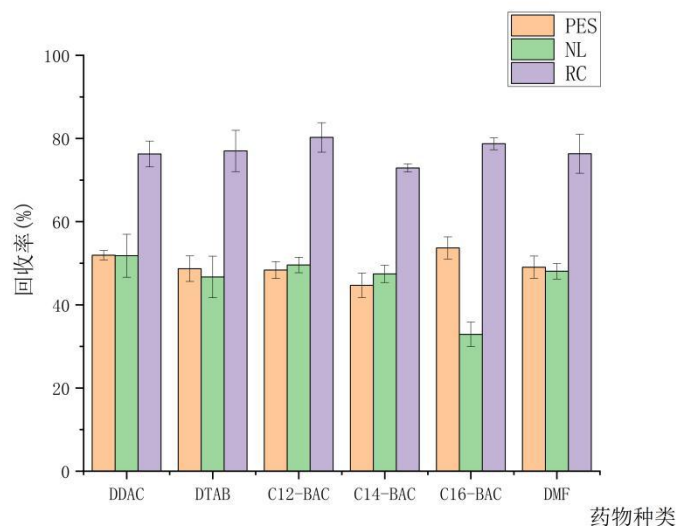


图 4: 不同滤膜添加回收试验回收率比较 (%)

2.1.5 液相色谱柱和流动相的确定

考察 SB-Aq RRHD 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm)、HSS-T3 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm)、BEH-C18 色谱柱 (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 3 种色谱柱对 6 种季铵盐分离效果的影响。发现 6 种目标物在 SB-Aq RRHD 柱和 HSS-T3 柱上峰型不佳, 出现较严重的拖尾, 而在 BEH-C18 柱上各物质峰型、响应、分离度良好。因此, 选择 BEH-C18 色谱柱用于 6 种季铵盐分析。

流动相考察了以乙腈作为有机相, 水相中添加酸碱的种类对色谱分离的影响。结果表明, 采用纯水时, 峰形不佳, 峰较宽。采用 0.01% 甲酸水溶液和 0.01% 甲酸+0.05% 甲酸铵水溶液时目标物峰型最好, 且二者相比后者响应更佳。因此, 最终选择 0.01% 甲酸+0.05% 甲酸铵水溶液和乙腈作为流动相。

2.1.6 监测离子对的确定

将 50 ng/mL 季铵盐混合标准溶液注入质谱仪中, 根据目标化合物的相对分子质量, 设定合适的质谱扫描范围, 对母离子正离子模式下的全扫描质谱进行分

析,各物质的铵根离子峰响应值最高。接着,对各目标化合物依次进行子离子扫描,从而得到主要的子离子碎片,并对响应值高的子离子碎片进行碰撞能优化,确定最终的反应监测离子对、锥孔电压、碰撞能量以及相应参数。

2.2 基质效应

本试验按照前处理方法得到基质空白溶液,添加 50 $\mu\text{g/kg}$ 的 6 种季铵盐类药物混合标准溶液测试基质效应。采用空白混合标准溶液和基质混合标准溶液在相同的色谱质谱条件下进样分析,以两者的质谱响应峰面积比值的百分数来表示基质效应,若 $\text{ME} > 100\%$,则存在基质增强效应;若 $\text{ME} < 80\%$,则为抑制效应;若 ME 为 $80\% \sim 100\%$,则不存在基质效应。结果表明:6 种季铵盐类消毒剂在 4 种基质中存在 ME , ME 为 $35.42\% \sim 94.95\%$ (详见图 5)。部分药物存在基质抑制效应,因此采用基质匹配标准溶液以降低基质干扰。

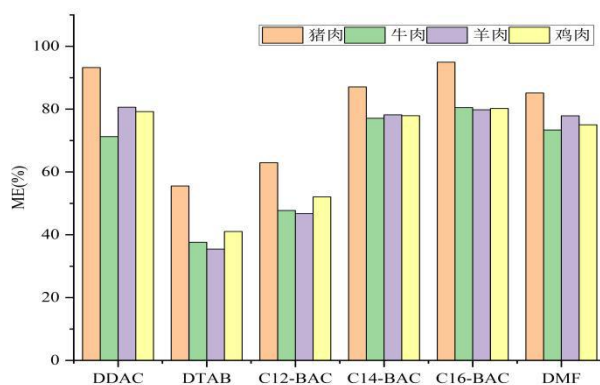


图 5 4 种基质中季铵盐类消毒剂基质效应

2.3 稳定性

2.3.1 标准工作溶液

取适量标准溶液,用洗脱液配制出 100 ng/mL 标准工作溶液,放置于 20°C 下,

在 0h、3h 和 24h 下测定。结果显示，药物标准工作溶液中在 20℃避光下，24h 内面积虽有下降但仍都较为稳定。

2.3.2 储备液

根据“SN/T 4048-2014《出口食品中季铵盐的测定 液相色谱-质谱/质谱法》”资料，季铵盐标准储备液在-18℃以下避光保存，有效期 6 个月。

2.4 材料与方法

2.4.1 材料与试剂

空白的猪、牛、羊和鸡的肌肉采样得到；水：符合 GB/T 6682 规定，一级水；甲醇、乙腈、甲酸铵和甲酸（色谱纯，Fisher 公司）；浓氨水（优级纯，国药集团化学试剂有限公司）；十二烷基二甲基苄基氯化铵（纯度≥98%，德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司）；十四烷基二甲基苄基氯化铵（纯度≥98%，德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司）；十六烷基二甲基苄基氯化铵（纯度≥98%，德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司）；二癸基二甲基氯化铵（纯度≥98%，德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司）；十二烷基三甲基溴化铵（纯度≥98%，德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司）；十二烷基二甲基-2-苯氧基-乙基溴化铵（纯度≥98%，德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司）；Bond Elut QuEChERS 兽残专用萃取盐包（1 g 氯化钠和 4 g 无水硫酸钠）；Poly-Sery PWCX SPE 小柱（150mg/6mL，上海安谱实验科技股份有限公司）；C₁₈ 柱（50 mm×2.1 mm，粒径 1.8 μm，美国 Agilent 公司）。

2.4.2 仪器和设备

超高效液相色谱质谱联用仪（WATERS Xevo TQ-S，美国 Waters 公司）；分析天平和天平（德国梅特勒-托利多公司）；漩涡混合仪（VX-III，TARGIN 公司）；

高速冷冻离心机（德国 Thermo 公司）；固相萃取装置（美国 Varian 公司）；氮吹仪（FV-64，得泰仪器公司）；Millipore 纯化水系统（Milli-Q 公司）。

2.4.3 主要溶液的配制

稀氨水溶液（0.1 %）：取 0.1mL 氨水，用水稀释并定容至 100mL。

0.01%甲酸+0.05%甲酸铵溶液：取 0.1 mL 甲酸，0.5 g 甲酸铵，用水稀释至 1 L，混匀。

淋洗液：取 1.0 mL 氨水，用水稀释并定容至 100 mL。

洗脱液：取 50 mL 甲酸，用甲醇稀释并定容至 1 L，混匀。

季铵盐标准贮备液：取 6 种季铵盐标准品各 100 mg（以季铵盐的单体计，若所用标准品为相应的盐或含结晶水，应折算成有效成份），用甲醇溶解并定容，摇匀，即得。-18℃以下避光保存，有效期 6 个月。

季铵盐混合标准中间液：精密量取各标准储备液 0.1 mL 于 10 mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀，即得。-18℃以下避光保存，有效期 3 个月。

季铵盐混合标准工作液：精密量取混合标准中间液 1.0 mL 于 10 mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度摇匀，即得。临用现配。

2.4.4 样品的制备

取新鲜的空白猪、牛、羊和鸡肌肉绞碎匀质或混匀后作空白对照样品。

取绞碎均质或混匀后的各空白组织样品，添加不同浓度的季铵盐混合标准工作液，充分混合后作检测样品。

2.4.5 提取、净化方法

提取：称取 5 g（精确至 ± 0.05 g）试样于 50 mL 具塞塑料离心管中，加入一粒陶瓷均质子，加入 3 ml 水、10 ml 乙腈和萃取盐包，盖好盖子，用涡旋振荡

器振荡 5 min 后, 于 10000 r/min 下低温离心 10 min。取 4 mL 乙腈上清液, 加入 4 mL 水, 涡旋均匀, 混匀备用。

净化: 提取液全部过 150 mg/6 mL PWCX 柱 (5 mL 甲醇, 5 mL 0.1%稀氨水溶液活化), 依次用 5 mL 1%氨水溶液, 5 mL 甲醇淋洗, 抽干小柱 3 min, 用 5 mL 5%甲酸甲醇溶液洗脱, 接收全部洗脱液, 氮吹至近干, 1.0 mL 乙腈溶解, 过 0.22 μm RC 滤膜, 供液相色谱-串联质谱仪测定。

2.5 基质匹配标准曲线的制备

取新鲜空白试料 5 g (准确至 ± 0.05 g), 按上述步骤提取净化后得到上机溶液作为空白样品提取基质液, 配制得到质量浓度为 2 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL 和 200 ng/mL 的系列基质匹配混合标准工作液, 供液相色谱-串联质谱仪测定。以待测物特征离子质量色谱峰面积为纵坐标、以基质匹配标准工作液浓度为横坐标, 绘制标准工作曲线。计算回归方程及相关系数。

2.6 液相色谱条件

- a) 色谱柱: C18柱 (50 mm $\times$ 2.1 mm, 粒径1.7 μm), 或相当者;
- b) 流动相流动相: A相为水+0.01%甲酸+0.05%甲酸铵, B相为乙腈, 梯度洗脱条件见表1;
- c) 流速: 0.3 mL/min;
- d) 进样量: 1 μL ;
- e) 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

表 1 液相色谱梯度洗脱条件

时间 (min)	流速 (mL/min)	A 相 (%)	B 相 (%)
0.0	0.3	45	55
3.0	0.3	45	55

9.0	0.3	10	90
11.0	0.3	10	90
11.1	0.3	45	55
13.0	0.3	45	55

2.7 质谱条件

质谱参考条件如下：

- a) 离子源：电喷雾离子源（ESI）；
- b) 扫描方式：正离子扫描；
- c) 毛细管电压：3000 V；
- d) 离子源温度：150 °C；
- e) 雾化器压力：40 psi；
- f) 脱溶剂气温度：350 °C；
- g) 脱溶剂气：氮气15 L/min；
- h) 监测方式：多反应监测（MRM）；
- i) 母离子、子离子、锥孔电压及碰撞电压见表3。

表2 6种季铵盐的质谱参数

化合物名称	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
十二烷基二甲基苄基氯化铵 (C12-BAC)	304.5/91.0	304.5/91.0	30	28
	304.5/212.1			20
十四烷基二甲基苄基氯化铵 (C14-BAC)	332.5/90.9	332.5/90.9	30	25
	332.5/240.2			22
十六烷基二甲基苄基氯化铵	360.6/90.9	360.6/90.9	30	27

(C16-BAC)	360.6/268.2			20
二癸基二甲基氯化铵 (DDAC)	326.6/186.1	326.6/186.1	30	28
	326.6/184.1			28
十二烷基三甲基溴化铵 (DTAB)	228.4/60.0	228.4/60.0	30	20
	228.4/43.0			27
十二烷基二甲基-2-苯氧基-乙基溴化 铵 (DMF)	334.5/72.0	334.5/72.0	30	28
	334.5/166.0			25

2.8 方法学考察

2.8.1 检出限 (LOD) 与定量限 (LOQ) 的确定

在空白猪、牛、羊和鸡肌肉中添加一定量的季铵盐混合标准溶液样品经前处理后, 用 HPLC-MS/MS 进行测定, 当检测样品中色谱峰的信噪比大于等于 3 时, 添加季铵盐的浓度即为检出限, 样品中季铵盐峰的信噪比大于等于 10 时, 添加季铵盐的浓度即为定量限。

该分析方法对猪、牛、羊和鸡肉的检测限(S/N>3)为 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 定量限(S/N>10)为 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。结果如表 3 所示:

表 3 畜禽肉中 6 种季铵盐信噪比(S/N)

检测限	药物	离子对	猪肉	羊肉	牛肉	鸡肉
1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	C ₁₂ -BAC	304.5/91.0	112.21	120.96	226.43	96.17
		304.5/212.1	193.14	63.00	137.89	102.92
	C ₁₄ -BAC	332.5/90.9	278.21	119.28	128.32	272.23
		332.5/240.2	235.73	184.64	118.36	182.72

	C ₁₆ -BAC	360.6/90.9	84.37	57.31	124.98	72.01
		360.6/268.2	59.87	31.51	61.91	61.35
	DDAC	326.6/186.1	210.13	121.20	514.88	158.46
		326.6/184.1	98.89	111.16	70.97	150.95
	DTAB	228.4/60.0	53.69	86.59	74.65	149.15
		228.4/43.0	48.47	18.45	7.60	17.11
	DMF	334.5/72.0	450	87.21	122.07	207.10
		334.5/166.0	92.62	23,17	73.72	258.42
2μg/kg	C ₁₂ -BAC	304.5/91.0	214.54	170.78	228.28	333.67
		304.5/212.1	209.44	223.56	135.94	189.94
	C ₁₄ -BAC	332.5/90.9	511.68	266.55	289.83	291.80
		332.5/240.2	392.71	171.40	189.86	128.44
	C ₁₆ -BAC	360.6/90.9	161.05	119.95	148.16	223.98
		360.6/268.2	65.80	59.11	84.46	60.69
	DDAC	326.6/186.1	585	409.06	431.28	296.19
		326.6/184.1	177.22	283.52	66.26	171.96
	DTAB	228.4/60.0	110.54	89.16	36.65	104.36
		228.4/43.0	25.24	21.61	16.99	18.73
	DMF	334.5/72.0	164.73	199.28	35.78	87.61
		334.5/166.0	87.20	203.6	39.13	142.48

2.8.2 方法的线性范围考察

准确量取 10 μg/mL 混合标准工作液适量于容量瓶中,用流动相稀释并定容,制成浓度为 2、10、20、50、100 和 200 ng/mL 的系列标准工作液。供高效液相色谱测定。从低浓度到高浓度依次测定,每一浓度进样 3 针。以测得峰面积平均值为纵坐标,对应的标准溶液浓度为横坐标,绘制各药物对应的标准曲线。求回归方程和相关系数见图 6-图 11。

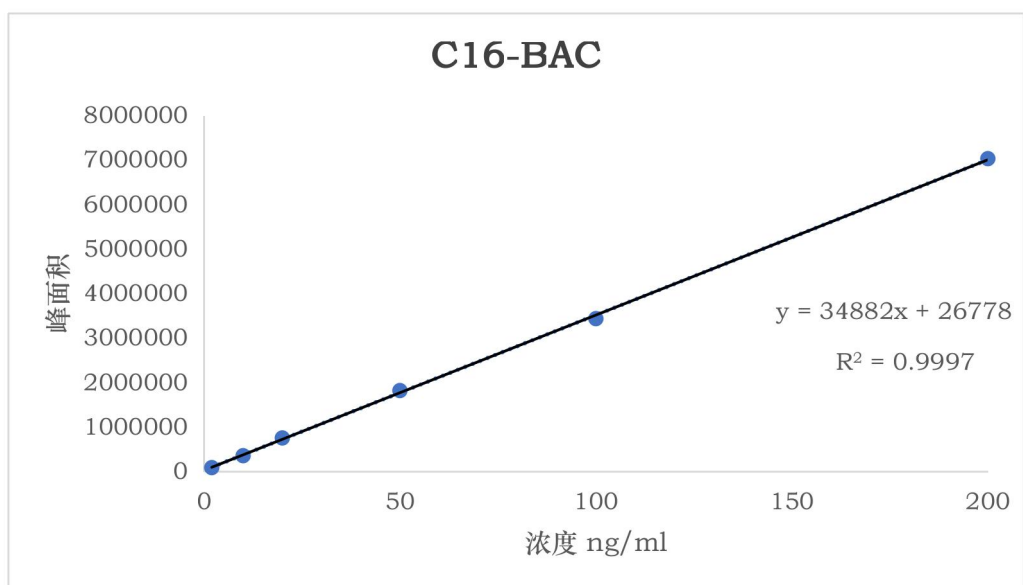


图 6：混合标准溶液中 C16-BAC 标准曲线

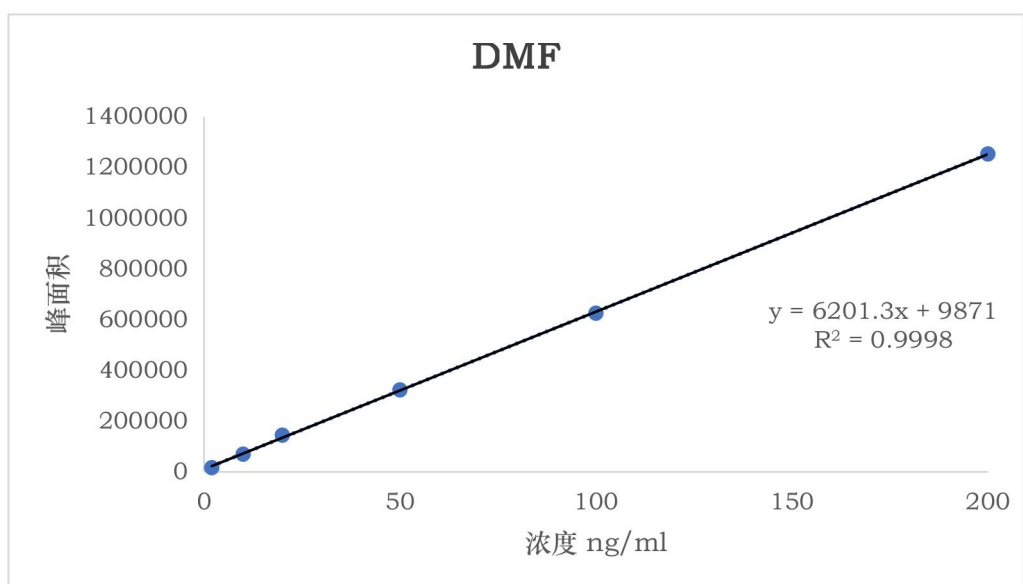


图 7：混合标准溶液中 DMF 标准曲线

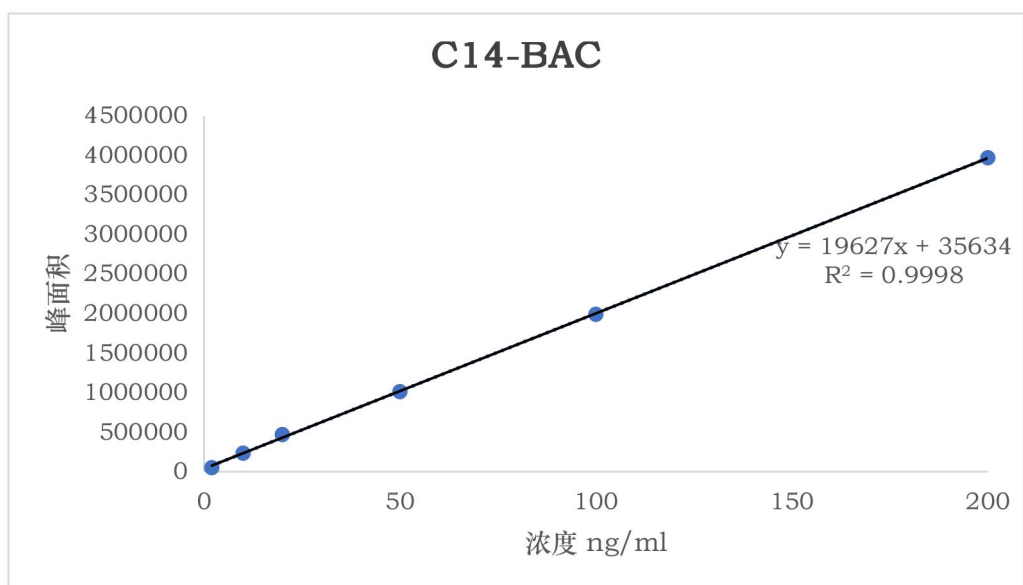


图 8：混合标准溶液中 C14-BAC 标准曲线

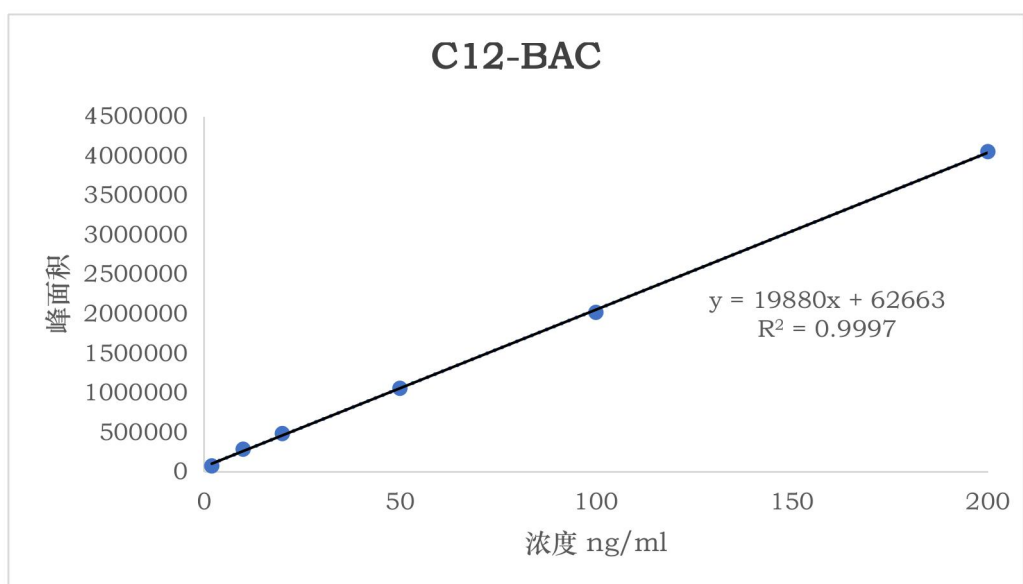


图 9：混合标准溶液中 C12-BAC 标准曲线

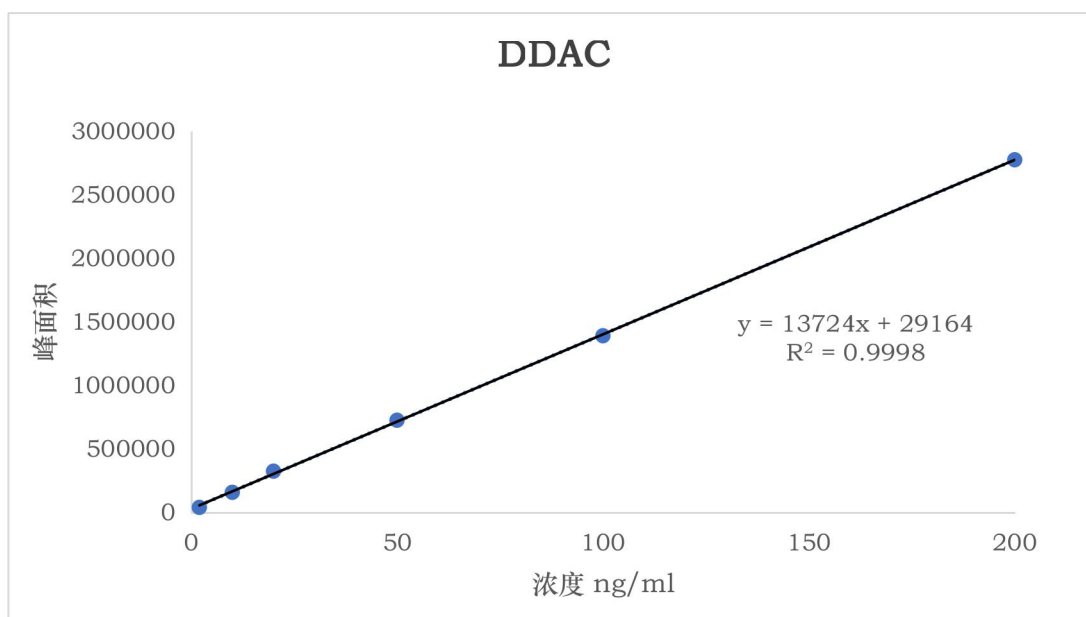


图 10：混合标准溶液中 DDAC 标准曲线

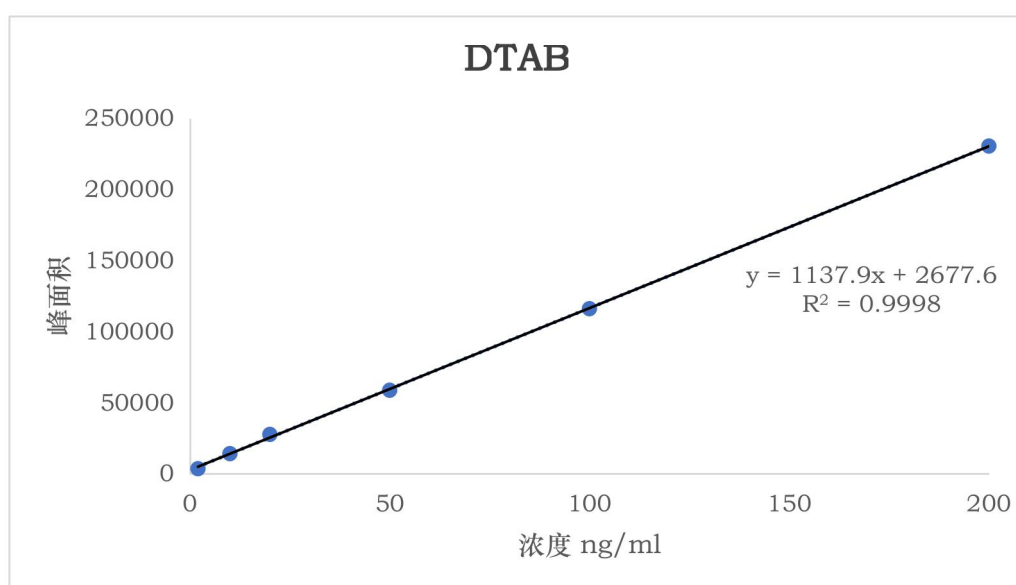


图 11：混合标准溶液中 DTAB 标准曲线

2.8.3 准确度和精密度考察

我国国家标准中并未给出季铵盐类消毒剂在畜禽肉中的最大残留限量 (MRL)，但在 2014 年欧洲食品安全局发布的 (EU) No1119/2014 号条例中，针对 BAC 和 DDAC 在猪肉、牛肉、羊肉和鸡肉中的 MRL 设定为 100 ug/kg。因此根据 (EU) No1119/2014 号条例中季铵盐类药物在不同组织中的 MRL 规定，

在空白试料中添加 3 个不同浓度（定量限、1/2MRL 和 MRL）的季铵盐进行回收率试验，添加浓度分别为 2 ug/kg、50 ug/kg、100 ug/kg 各浓度进行 5 个样品平行试验，重复 3 次，计算回收率及批内、批间相对标准偏差。结果见表 4~表 9。

试验结果表明：本方法在 2 µg/kg ~ 100 µg/kg 添加浓度范围内，猪肌肉、牛肌肉、羊肌肉、鸡肌肉中 6 种季铵盐类药物的回收率范围为 60% ~ 120%。批内相对标准偏差小于 10%，批间相对标准偏差小于 15%。

表 4：畜禽肉中 DTAB 的准确度和精密度测定

待测畜禽肉	药物浓度 (µg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
			1	2	3	4	5			
猪	2	I	68.4	77.0	74.6	71.2	73.2	72.9	4.50	5.68
		II	71.2	72.2	71.0	77.4	68.4	72.0	4.59	
		III	67.6	62.6	63.4	67.4	67.0	65.6	3.66	
	50	I	72.5	79.3	80.2	86.8	82.2	80.2	6.46	5.60
		II	84.2	80.3	80.7	82.0	82.5	81.9	1.92	
		III	90.4	85.8	90.5	83.9	94.7	89.1	4.79	
	100	I	91.3	90.3	87.6	88.5	89.5	89.4	1.62	7.91
		II	94.5	82.5	79.6	78.4	76.4	82.3	8.71	
		III	79.4	76.5	75.6	74.6	75.6	76.3	2.42	
羊	2	I	71.8	72.2	74.0	79.6	77.6	75.0	4.57	4.68
		II	66.4	65.8	62.2	71.6	75.8	68.4	7.82	
		III	74.4	66.2	72.8	71.0	71.8	71.2	4.34	
	50	I	60.5	62.1	60.9	62.2	65.8	62.3	3.35	4.90
		II	70.3	74.2	68.8	62.0	62.0	67.5	7.97	
		III	60.2	62.5	61.8	63.1	61.6	61.8	1.72	
	100	I	77.8	76.6	77.9	77.7	77.1	77.4	0.72	9.93
		II	72.8	72.5	71.1	71.4	71.5	71.9	1.03	
		III	76.5	91.6	97.5	83.5	87.5	87.3	9.12	
牛	2	I	64.8	68.4	70.2	67.0	68.2	67.7	2.94	6.02
		II	63.8	62.4	65.6	67.8	65.0	64.9	3.12	
		III	64.2	75.2	76.0	77.6	72.2	73.0	7.28	
	50	I	64.5	70.4	64.7	63.3	69.1	66.4	4.73	4.43
		II	62.0	60.4	72.0	60.0	63.3	63.5	7.76	
		III	68.3	70.9	73.7	67.8	66.3	69.4	4.21	
	100	I	71.2	71.8	73.2	72.6	75.6	72.9	2.33	9.52

鸡	2	II	70.4	73.5	73.8	73.8	74.8	73.3	2.28	1.79
		III	86.6	84.4	82.4	83.2	92.5	85.8	4.73	
		I	60.0	60.8	61.8	65.4	62.0	62.0	3.33	
	50	II	62.4	60.2	63.8	69.8	62.2	63.7	5.74	5.38
		III	64.8	63.4	63.8	65.8	63.0	64.2	1.77	
		I	106.0	100.7	102.8	118.4	116.2	108.8	7.35	
	100	II	111.6	112.2	115.6	117.8	105.8	112.6	4.06	2.09
		III	100.3	101.8	102.4	99.9	101.8	101.2	1.07	
		I	90.3	87.9	88.8	92.2	90.4	89.9	1.84	
		II	90.6	89.8	92.2	90.5	91.6	90.9	1.05	
		III	83.7	87.3	88.5	85.7	91.3	87.3	3.28	

表 5：畜禽肉中 C12-BAC 的准确度和精密度测定

待测畜禽	药物浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
			1	2	3	4	5			
猪	2	I	71.2	79.8	71.4	87.6	81.2	78.2	8.93	7.96
		II	73.4	77.4	73.6	88.4	84.6	79.5	8.48	
		III	64.2	63.8	64.2	71.0	79.4	68.5	9.90	
	50	I	84.8	91.6	86.2	89.7	84.9	87.4	3.49	4.30
		II	80.2	84.7	80.5	84.3	80.7	82.1	2.69	
		III	84.9	87.6	94.5	92.2	86.7	89.2	4.49	
	100	I	82.3	94.5	90.3	86.5	94.7	89.7	5.94	5.86
		II	73.3	75.7	84.3	82.7	85.9	80.4	6.91	
		III	86.4	80.4	81.7	82.3	80.0	82.2	3.10	
羊	2	I	74.6	75.2	73.2	75.4	74.2	74.5	1.18	5.97
		II	65.6	76.0	74.8	76.8	73.4	73.3	6.14	
		III	65.8	67.0	63.6	69.8	66.8	66.6	3.36	
	50	I	79.3	71.5	83.2	78.3	78.2	78.1	5.37	3.40
		II	66.2	74.3	79.7	84.2	70.0	74.9	9.68	
		III	82.2	77.8	80.4	86.3	73.9	80.1	5.80	
	100	I	89.8	94.9	91.9	86.1	93.7	91.3	3.81	2.28
		II	92.9	87.7	90.2	88.4	94.9	90.8	3.35	
		III	85.2	87.4	88.1	89.3	87.6	87.5	1.71	
牛	2	I	64.2	61.6	62.2	66.6	60.2	63.0	3.96	1.34
		II	62.0	61.8	68.2	61.6	62.4	63.2	4.45	
		III	60.8	62.6	61.8	62.8	60.2	61.6	1.83	
	50	I	80.2	80.4	74.2	78.0	78.5	78.3	3.18	5.29
		II	78.2	74.5	86.0	77.8	83.6	80.0	5.84	
		III	64.5	74.0	73.8	72.4	76.8	72.3	6.42	
	100	I	76.3	79.5	73.6	75.8	76.7	76.4	2.77	4.52
		II	83.5	84.5	82.5	79.9	78.8	81.8	2.95	

		Ⅲ	76.9	75.8	75.5	73.9	74.2	75.3	1.63	
鸡	2	I	69.6	64.6	65.4	66.8	67.8	66.8	2.96	4.52
		Ⅱ	65.8	70.0	66.4	69.6	68.4	68.0	2.76	
		Ⅲ	60.2	62.2	62.4	64.2	63.0	62.4	2.33	
	50	I	84.3	86.3	87.4	94.5	88.7	88.2	4.38	3.28
		Ⅱ	96.0	83.6	90.1	85.7	82.4	87.6	6.36	
		Ⅲ	94.8	96.2	82.9	91.7	99.1	93.0	6.67	
	100	I	80.3	82.8	81.7	82.1	80.4	81.5	1.34	5.60
		Ⅱ	90.7	89.7	92.1	90.5	91.6	90.9	1.04	
		Ⅲ	83.7	87.3	88.6	89.7	91.3	88.1	3.26	

表 6：畜禽肉中 DDAC 的准确度和精密度测定

待测畜 禽肉	药物 浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	测定批 次	回收率 (%)					平均回 收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
			1	2	3	4	5			
猪	2	I	92.0	94.8	99.4	95.6	89.0	94.2	4.16	7.56
		Ⅱ	82.2	85.6	83.8	85.6	80.2	83.5	2.78	
		Ⅲ	89.6	99.6	98.2	96.2	98.4	96.4	4.14	
	50	I	80.7	94.8	93.2	87.6	89.8	89.2	6.22	6.28
		Ⅱ	82.9	81.1	86.5	90.6	84.6	85.1	4.30	
		Ⅲ	73.0	82.0	82.7	74.7	81.1	78.7	5.68	
	100	I	76.8	81.1	80.5	82.4	84.5	81.1	3.49	4.13
		Ⅱ	82.5	85.5	88.7	88.3	89.9	87.0	3.42	
		Ⅲ	77.9	81.7	80.6	81.7	83.2	81.0	2.44	
羊	2	I	73.0	78.0	78.2	78.4	77.8	77.1	2.97	9.42
		Ⅱ	74.0	80.2	77.6	70.2	72.2	74.8	5.41	
		Ⅲ	61.0	63.4	68.4	68.8	60.2	64.4	6.29	
	50	I	82.9	81.8	93.1	90.9	86.2	87.0	5.63	5.37
		Ⅱ	82.0	77.8	82.4	73.5	78.4	78.8	4.58	
		Ⅲ	77.7	80.8	80.6	83.1	78.0	80.1	2.80	
	100	I	88.2	85.3	93.8	88.3	91.2	89.4	3.63	3.62
		Ⅱ	83.7	87.6	85.5	81.1	85.4	84.7	2.86	
		Ⅲ	83.2	89.4	81.3	81.8	81.7	83.5	4.06	
牛	2	I	72.0	62.2	69.0	61.4	64.4	65.8	6.92	2.99
		Ⅱ	65.2	62.4	65.4	63.6	66.2	64.6	2.37	
		Ⅲ	62.4	60.4	64.2	63.0	60.2	62.0	2.77	
	50	I	102.8	117.9	114.5	117.5	112.2	113.0	5.45	4.45
		Ⅱ	101.1	104.0	105.7	106.6	103.3	104.1	2.10	
		Ⅲ	103.8	111.7	102.6	107.6	101.1	105.4	4.08	
	100	I	93.3	97.8	98.7	96.1	94.4	96.1	2.35	4.93

鸡	2	II	90.6	89.7	92.1	90.5	91.6	90.9	1.05	5.22
		III	83.7	82.2	88.5	89.7	91.3	87.1	4.52	
		I	69.8	66.8	70.2	71.0	72.0	70.0	2.80	
	50	II	64.2	65.8	62.2	62.8	66.2	64.2	2.75	3.99
		III	69.6	64.6	78.2	71.4	70.2	70.8	6.90	
		I	102.0	119.8	117.2	111.8	114.6	113.1	6.07	
	100	II	102.2	114.7	118.2	109.8	106.4	110.3	5.79	3.50
		III	104.3	107.8	103.0	105.5	101.9	104.5	2.19	
		I	96.6	94.4	92.4	93.9	92.1	93.9	1.92	
		II	93.5	101.3	97.5	101.8	97.3	98.3	3.45	
		III	90.6	94.4	92.4	90.9	90.7	91.8	1.79	

表 7：畜禽肉中 C14-BAC 的准确度和精密度测定

待测畜 禽肉	药物 浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	测定批 次	回收率 (%)					平均回 收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
			1	2	3	4	5			
猪	2	I	63.2	66.2	62.8	65.2	73.2	66.1	6.35	2.70
		II	65.2	65.8	64.2	63.0	63.6	64.4	1.78	
		III	62.8	65.6	61.0	62.4	61.4	62.6	2.89	
	50	I	100.4	105.2	103.0	107.4	104.9	104.2	2.52	2.44
		II	102.7	101.1	108.3	118.2	111.3	108.3	6.36	
		III	106.5	103.8	104.4	101.6	101.8	103.6	1.96	
	100	I	94.2	93.5	93.5	95.2	93.5	94.0	0.79	7.38
		II	84.5	81.5	80.5	79.9	84.6	82.2	2.70	
		III	84.5	82.6	81.5	82.5	87.8	83.8	2.98	
羊	2	I	70.2	75.8	69.6	78.2	72.2	73.2	5.05	4.09
		II	73.0	77.4	71.2	77.8	74.2	74.7	3.80	
		III	79.6	79.4	77.8	79.2	79.8	79.2	1.00	
	50	I	104.8	111.2	111.9	120.0	101.6	109.9	6.47	4.29
		II	100.5	103.6	101.6	96.5	103.7	101.1	2.92	
		III	109.8	102.0	109.2	112.7	104.7	107.7	3.98	
	100	I	90.6	89.7	92.1	90.5	91.6	90.9	1.05	4.61
		II	89.6	93.0	94.4	90.8	88.5	91.3	2.65	
		III	99.2	96.5	98.5	99.3	99.2	98.5	1.20	
牛	2	I	64.2	60.2	64.2	63.6	60.8	62.6	3.11	7.68
		II	72.2	79.6	67.4	71.2	68.4	71.8	6.69	
		III	65.6	63.8	60.6	63.0	64.2	63.4	2.91	
	50	I	98.2	102.6	98.7	92.5	97.3	97.9	3.71	5.73
		II	100.2	99.6	106.0	97.8	94.7	99.7	4.14	
		III	102.0	116.6	103.6	109.8	112.0	108.8	5.56	
	100	I	89.6	93.0	94.4	90.8	88.5	91.3	2.65	3.37
		II	91.2	96.5	93.5	91.3	93.2	93.1	2.31	

		Ⅲ	89.7	83.8	89.5	86.6	86.3	87.2	2.83	
鸡	2	I	62.4	62.8	64.6	63.0	63.6	63.3	1.35	3.64
		Ⅱ	66.0	64.2	66.2	61.6	64.2	64.4	2.87	
		Ⅲ	66.8	70.8	65.6	66.2	69.8	67.8	3.41	
	50	I	70.9	75.1	73.2	76.3	70.0	73.1	3.67	7.86
		Ⅱ	64.4	63.9	64.5	66.5	66.5	65.1	1.93	
		Ⅲ	81.3	74.6	73.8	78.6	71.8	76.0	5.10	
	100	I	76.8	81.9	80.0	82.6	84.5	81.2	3.60	3.69
		Ⅱ	79.5	85.5	88.7	88.3	89.9	86.4	4.83	
		Ⅲ	77.9	81.7	80.3	81.5	83.6	81.0	2.59	

表 8：畜禽肉中 DMF 的准确度和精密度测定

待测畜 禽肉	药物 浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	测定批 次	回收率 (%)					平均回 收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
			1	2	3	4	5			
猪	2	I	66.6	80.6	69.2	82.4	71.2	74.0	9.55	3.10
		Ⅱ	69.4	71.6	69.2	77.8	72.4	72.1	4.83	
		Ⅲ	67.2	71.0	69.8	68.2	71.6	69.6	2.66	
	50	I	100.2	105.4	99.8	107.9	104.2	103.5	3.37	3.14
		Ⅱ	103.8	103.7	101.8	108.7	108.5	105.3	2.98	
		Ⅲ	98.0	94.6	100.3	99.8	102.6	99.0	3.01	
	100	I	91.2	91.8	93.2	92.6	95.0	92.8	1.58	1.79
		Ⅱ	95.4	93.0	93.8	93.8	94.0	94.0	0.93	
		Ⅲ	91.6	90.4	90.4	91.6	89.6	90.7	0.96	
羊	2	I	71.2	70.0	69.6	74.6	71.0	71.3	2.77	3.46
		Ⅱ	69.6	66.8	65.8	68.2	72.6	68.6	3.87	
		Ⅲ	71.4	77.4	71.8	72.6	74.4	73.5	3.34	
	50	I	115.2	117.0	109.1	103.4	105.5	110.1	5.39	3.91
		Ⅱ	102.8	104.9	101.1	102.7	100.8	102.5	1.59	
		Ⅲ	114.9	112.9	111.0	100.6	107.2	109.3	5.17	
	100	I	97.8	96.6	97.9	97.7	97.1	97.4	0.57	3.67
		Ⅱ	92.8	92.0	91.1	91.4	91.5	91.8	0.73	
		Ⅲ	92.0	90.7	89.7	91.4	92.3	91.2	1.15	
牛	2	I	64.4	65.2	70.0	60.2	62.2	64.4	5.73	2.55
		Ⅱ	63.8	64.2	61.8	60.4	63.4	62.7	2.53	
		Ⅲ	62.2	61.4	60.2	60.8	61.4	61.2	1.22	
	50	I	96.8	106.4	102.9	99.6	101.8	101.5	3.55	3.89
		Ⅱ	99.3	100.5	108.0	100.6	101.5	102.0	3.38	
		Ⅲ	90.6	90.8	100.8	100.4	92.5	95.0	5.38	
	100	I	90.6	89.7	92.1	90.5	91.6	90.9	1.05	5.06

鸡	2	II	83.7	87.2	88.5	89.7	91.3	88.1	3.27	3.13
		III	99.7	93.8	99.5	96.6	96.3	97.2	2.53	
		I	75.8	69.2	65.0	69.6	68.2	69.6	5.65	
	50	II	70.4	68.2	69.6	69.0	71.8	69.8	1.97	4.79
		III	76.2	72.4	70.8	75.6	72.6	73.5	3.12	
		I	67.6	66.3	75.7	71.1	74.6	71.1	5.83	
	100	II	68.2	71.1	73.6	72.9	76.2	72.4	4.10	4.60
		III	76.5	79.6	74.9	78.9	78.7	77.7	2.54	
		I	76.0	75.5	70.9	71.5	71.5	73.1	3.36	

表 9：畜禽肉中 C16-BAC 的准确度和精密度测定

待测畜 禽肉	药物 浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	测定批 次	回收率 (%)					平均回 收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
			1	2	3	4	5			
猪	2	I	65.8	81.8	70.8	79.0	71.2	73.7	8.86	4.69
		II	64.2	65.6	66.2	69.4	71.0	67.3	4.19	
		III	69.4	72.2	71.2	73.6	73.4	72.0	2.40	
	50	I	81.8	80.2	77.3	78.6	82.2	80.0	2.60	4.48
		II	77.1	74.5	81.1	69.3	70.5	74.5	6.48	
		III	82.9	85.3	78.7	76.9	81.5	81.1	4.13	
	100	I	81.0	75.0	74.0	73.5	72.0	75.1	4.62	5.95
		II	80.5	78.5	79.5	80.0	80.5	79.8	1.05	
		III	76.5	81.0	97.5	81.0	87.0	84.6	9.60	
羊	2	I	71.8	66.8	65.4	79.6	68.8	70.5	8.00	4.28
		II	66.2	67.0	63.0	70.4	69.0	67.1	4.22	
		III	74.2	71.4	71.8	73.2	75.0	73.1	2.10	
	50	I	81.0	81.5	90.3	77.0	84.6	82.9	5.94	4.20
		II	81.4	77.1	73.4	75.8	79.7	77.5	4.08	
		III	81.3	86.2	85.8	79.3	86.4	83.8	3.88	
	100	I	80.6	89.7	82.1	80.5	81.6	90.9	4.25	2.17
		II	83.7	87.2	88.5	89.7	91.3	88.1	3.27	
		III	89.7	83.8	89.5	86.6	86.3	87.2	2.82	
牛	2	I	69.4	61.6	62.0	65.2	60.2	63.7	5.79	1.98
		II	64.2	68.2	63.8	62.2	63.6	64.4	3.50	
		III	63.4	61.0	61.2	63.8	60.4	62.0	2.47	
	50	I	62.3	67.1	72.7	74.7	70.5	69.4	7.06	3.65
		II	70.0	70.8	71.3	71.1	73.5	71.4	1.86	
		III	71.6	75.3	73.3	77.7	75.2	74.6	3.07	
	100	I	76.5	71.0	77.5	76.0	77.0	75.6	3.48	2.08
		II	71.2	71.8	73.2	72.6	75.6	72.9	2.33	

		Ⅲ	70.4	73.0	73.8	73.8	74.0	73.0	2.06	
鸡	2	I	65.6	64.6	62.6	70.4	66.0	65.8	4.36	3.31
		Ⅱ	61.4	62.2	64.8	62.4	61.0	62.4	2.37	
		Ⅲ	67.0	65.8	65.0	69.4	64.2	66.3	3.06	
	50	I	71.6	74.3	79.0	84.3	78.4	77.5	6.28	4.28
		Ⅱ	69.6	71.8	74.9	70.6	74.2	72.2	3.17	
		Ⅲ	71.8	73.6	73.6	69.2	71.3	71.9	2.51	
	100	I	77.8	76.6	77.9	77.7	77.1	77.4	0.72	4.03
		Ⅱ	72.8	72.5	71.1	71.4	71.5	71.9	1.03	
		Ⅲ	71.2	71.8	73.2	72.6	75.0	72.8	2.01	

2.8.4 方法的适用范围

通过样品的添加回收实验，证明本方法可适用于包括猪、牛、羊和鸡肉中季铵盐的检测。

2.8.5 实际样品检测

通过对实际的猪肉、羊肉、牛肉和鸡肉样品进行检测，结果显示在实际样品中 C12-BAC、C14-BAC 和 C16-BAC 都有少量检出，表明该方法能适用于实际样品检测。

三、主要试验或验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果

（一）主要试验或验证的分析、综述报告

目前我国颁布的有关畜禽肉中的季铵盐检测主要有 SN/T 4048-2014《出口食品中季铵盐的测定 液相色谱-质谱/质谱法》标准，虽然适用范围广泛，但主要针对出口食品，只包含了猪肉和牛肝两种畜禽基质，不能覆盖最基本的畜禽产品品类，针对性较差；同时由于该标准颁布时间较早，所涉及的季铵盐种类较少，在 2021 年新颁布的 GB/T 39873-2021 《消毒剂中季铵盐的测定 液相色谱-串联质谱法》中，已经列出了 6 种常用的季铵盐，而 SN/T 4048-2014 中只有 5 种，无法满足其相关项目的检测需求。因此本研究建立了一种适用于猪、牛、羊和鸡

的肌肉中 6 种常用季铵盐残留检测的高效液相色谱法。在本项目《畜禽肉中季铵盐的测定 液相色谱-串联质谱法》中，经标准起草组起草本标准方法后，又征求了在国内长期从事兽药残留和非法添加物技术实力较强的三家独立的、畜禽产品认证检测机构进行了本标准的复核验证，三家机构对本标准的技术指标如线性范围、灵敏度（定量限和检测限）、精密度（批内和批间误差）、准确度（三种浓度情况下的回收率检测）和样品的应用范围等进行了全面的复核验证，结果都符合标准起草的要求，符合验证数据和复核验证报告见其它相关的附录文件。

同时，标准起草组还在国内进行了专家征求意见，意见汇总表见相关附录文件。此外，标准起草组邀请了 3 位检测行业专家召开了标准的初审会。初审专家组认为，本标准起草的相关试验论证了本标准中灵敏度（检测限和定量限）、准确度（包括定量限在内的低中高三种浓度的回收率）、精密度（批内相对标准偏差和批间相对标准偏差）、基质匹配标准曲线线性及范围、标准应用范围、试剂和仪器、提取和净化等关键技术指标，以及标准的语言文字、格式等指标，初审专家一致认为起草的标准经过了试验验证和数据分析，技术指标和文字格式均符合相关要求，详见本文中“二、标准编制原则和确定标准主要内容的依据”的详细阐述以及附录的数据论证。

（二）技术经济论证

1.社会效益

本标准的制定和实施，将为我国畜禽产品的质量安全监管提供及时、有力的技术支撑，有效保证我国畜禽产品的质量安全和人民群众的身体健康，显著提高养殖和屠宰企业的质量安全水平，积极杜绝安全风险隐患，使养殖和屠宰行业产品质量再上一个新台阶，实现我国养殖、屠宰行业的长期可持续发展。

2.经济效益

本标准的制定和实施,在不断提高我国养殖和屠宰企业质量安全水平,有效保证我国畜禽产品的质量和人民群众的身体健的同时,其品质品质和经济价值也将得到大幅提升,显著增加其国内外的竞争力和国际信誉;该标准的制定和实施,也将会积极促进并引导养殖和屠宰企业优化消杀手段,有效降低企业投入,合理提高企业收益,使企业在走上可持续性发展、健康发展、绿色发展的道路。

四、与国际标准和国外先进标准的对比情况

未检索到与《畜禽肉中季铵盐的检测》相同或类似的国际与国外标准,仅有欧盟参考实验室(EURL)公布的针对水果蔬菜和牛奶中季铵盐检测的两个推荐检测方法(SRM-26、SRM-27),该两种方法的适用范围,前处理方式与本标准完全不同,且定量限均高于本标准,因此不再进行进一步对比。

五、以国际标准为基础的起草情况

我国国家标准中并未给出季铵盐类消毒剂在畜禽肉中的最大残留限量(MRL),但在2014年欧洲食品安全局发布的(EU)No1119/2014号条例中,针对BAC和DDAC在猪肉、牛肉、羊肉和鸡肉中的MRL设定为100 µg/kg。因此根据(EU)No1119/2014号条例中季铵盐类药物在不同组织中的MRL规定,在空白试料中添加3个不同浓度(定量限、1/2MRL和MRL)的季铵盐进行回收率试验。

六、与现行的法律法规和强制性国家标准的关系

在标准的制订过程中严格贯彻国家有关方针、政策、法律和规章等,严格执行强制性国家标准和行业标准。与相关的各种基础标准相衔接,遵循了政策性和

协调同一性的原则。

目前有 SN/T 4048-2014《出口食品中季铵盐的测定 液相色谱-质谱/质谱法》标准，虽然适用范围广泛，但主要针对出口食品，只包含了猪肉和牛肝两种畜禽基质，不能覆盖最基本的畜禽产品品类，针对性较差；同时由于该标准颁布时间较早，所涉及的季铵盐种类较少，在 2021 年新颁布的 GB/T 39873-2021《消毒剂中季铵盐的测定 液相色谱-串联质谱法》中，已经列出了 6 种常用的季铵盐，而 SN/T 4048-2014 中只有 5 种，无法满足其相关项目的检测需求。因此本研究建立了一种适用于猪、牛、羊和鸡的肌肉中 6 种季铵盐残留的液相色谱-串联质谱检测方法。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准方法作为专业性较强的标准，须具备相关资质能力的实验室进行复核验证。分别由农业农村部农产品及加工品质量检验测试中心（北京）、农业农村部动物及动物产品卫生质量检验测试中心、河北省兽药饲料工作总站三家单位三家单位进行了复核，复核结果均能满足标准文本中规定的各项参数指标要求。复核报告均已附录后，没有重大分歧意见。

八、涉及专利的有关说明

无

九、贯彻标准的要求和措施建议（包括组织实施、技术措施、过渡办法等）

贯彻实施标准需要液相色谱-串联质谱仪和检测实验室中常见的前处理小型仪器设备。液相色谱-串联质谱仪目前在检测实验室中已经非常普及，在地市、县级机构中都已经具备并开展使用。因此本标准方法的实施使用不存在问题。

十、其他应予说明的事项
无

附录：相关实验图谱

图 A.1 标准溶液特征离子质量色谱图 (2 μ g/L)

图 A.2 猪肉基质匹配标准溶液特征离子色谱图 (2 μ g/L)

图 A.3 猪肉空白样品特征离子色谱图

图 A.4 猪肉添加样品特征离子色谱图 (2 μ g/kg)

图 A.5 牛肉基质匹配标准溶液特征离子色谱图 (2 μ g/L)

图 A.6 牛肉空白样品特征离子色谱图

图 A.7 牛肉添加样品特征离子色谱图 (2 μ g/kg)

图 A.8 羊肉基质匹配标准溶液特征离子色谱图 (2 μ g/L)

图 A.9 羊肉空白样品特征离子色谱图

图 A.10 羊肉添加样品特征离子色谱图 (2 μ g/kg)

图 A.11 鸡肉基质匹配标准溶液特征离子色谱图 (2 μ g/L)

图 A.12 鸡肉空白样品特征离子色谱图

图 A.13 鸡肉添加样品特征离子色谱图 (2 μ g/kg)

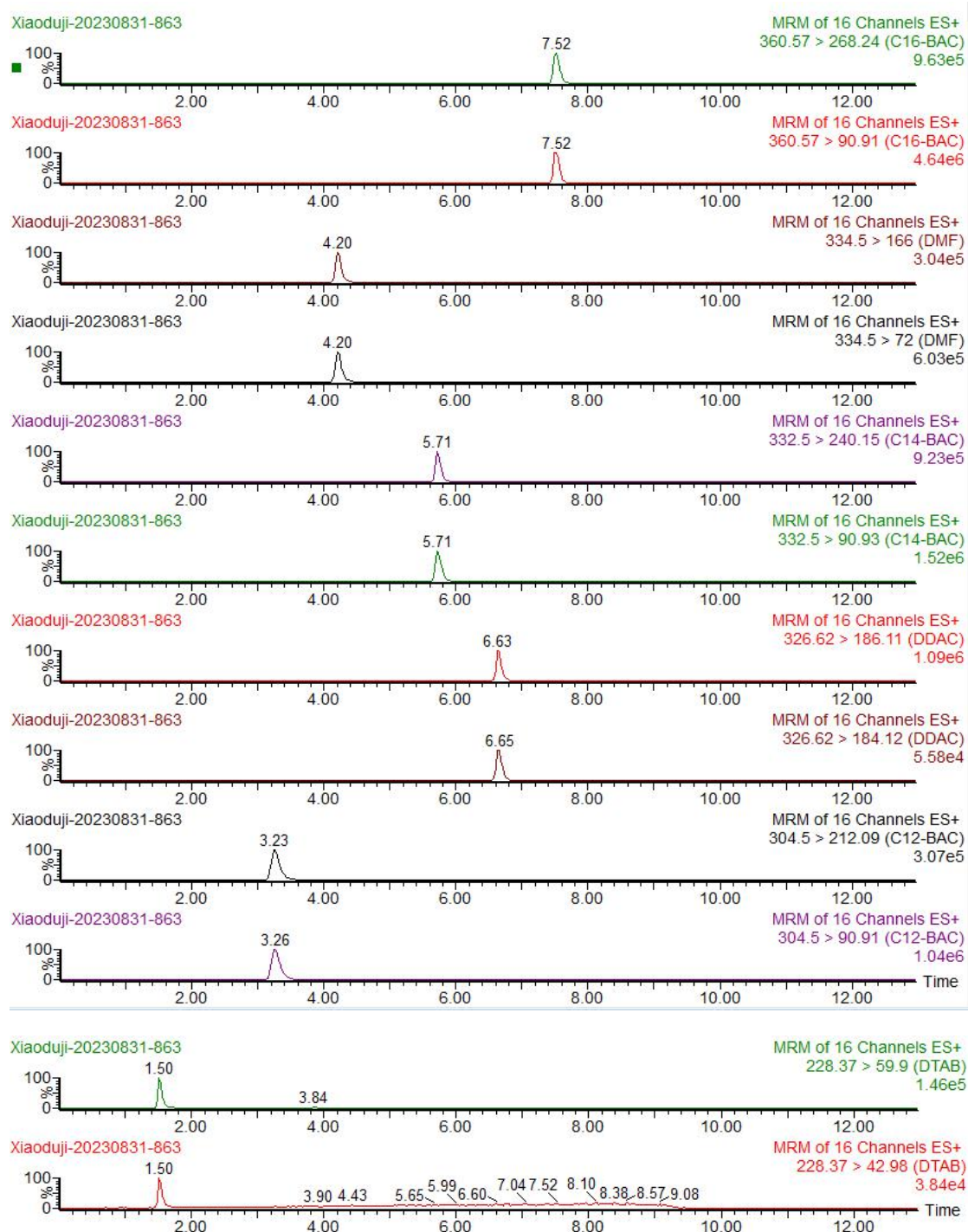


图 A.1 标准溶液特征离子质量色谱图 (2 μg/L)

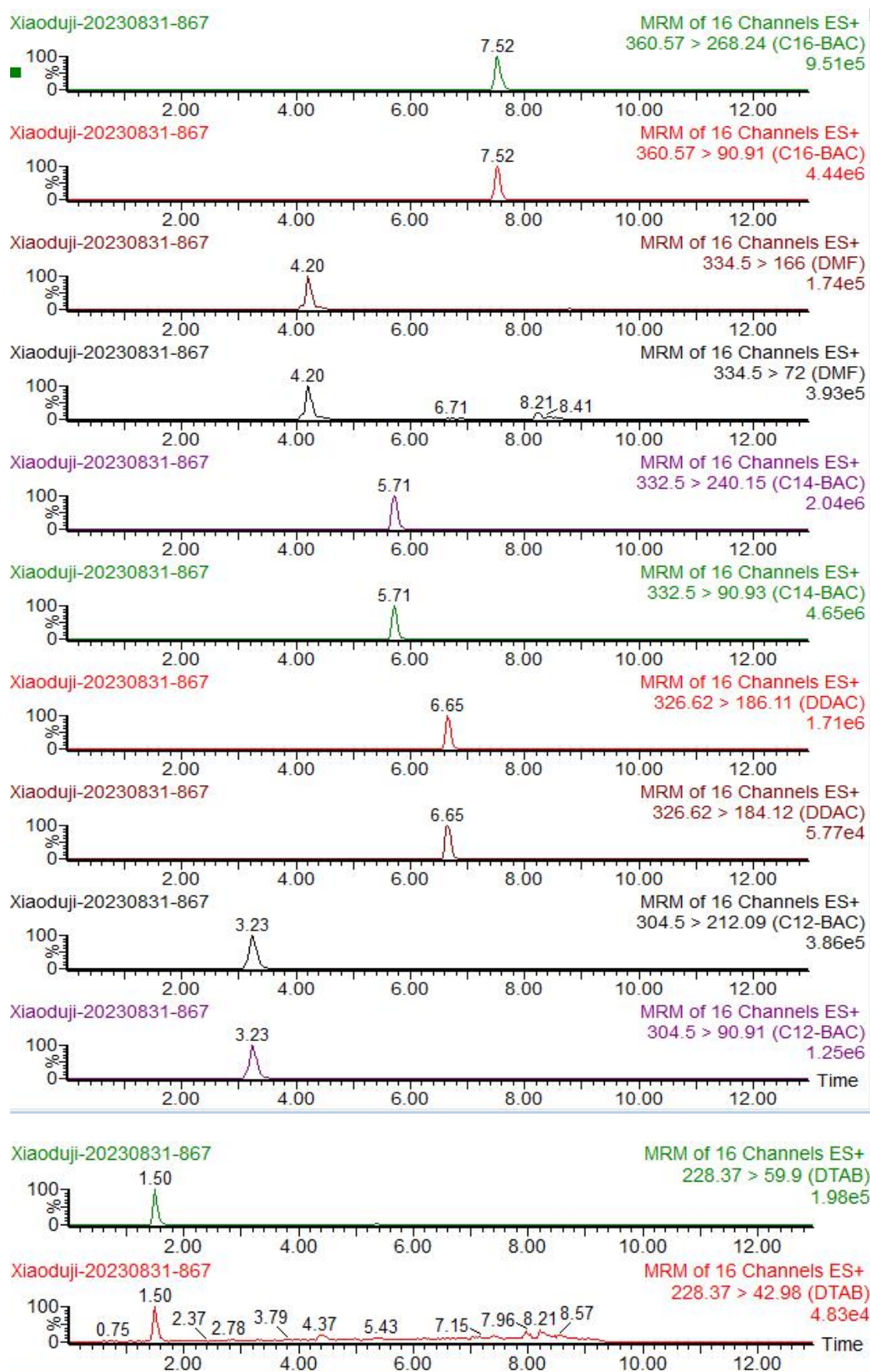
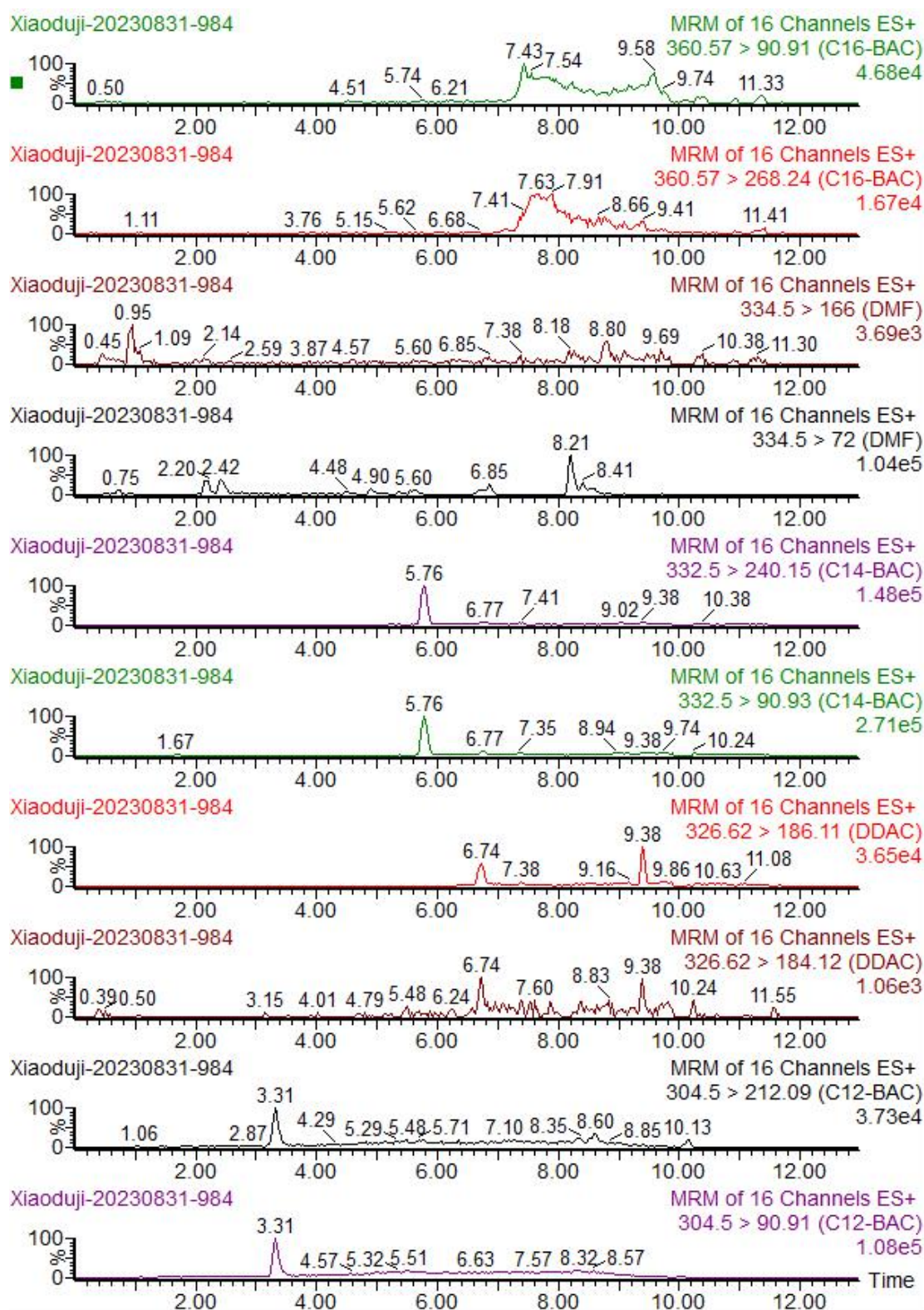


图 A.2 猪肉基质匹配标准溶液特征离子色谱图 (2 μ g/L)



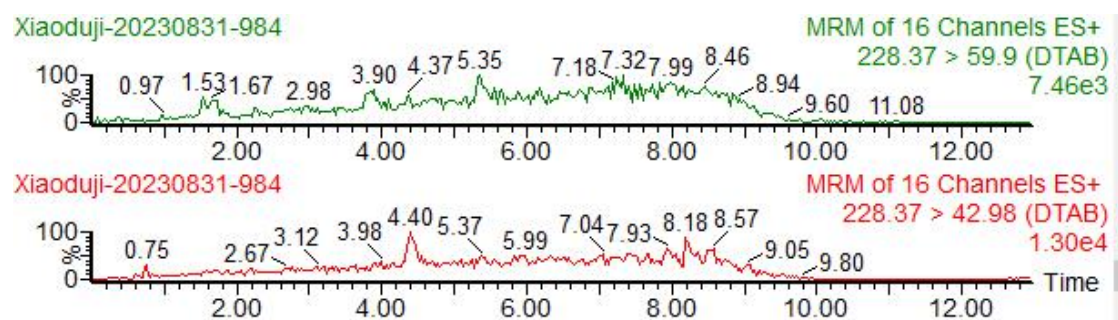


图 A.3 猪肉空白样品特征离子色谱图

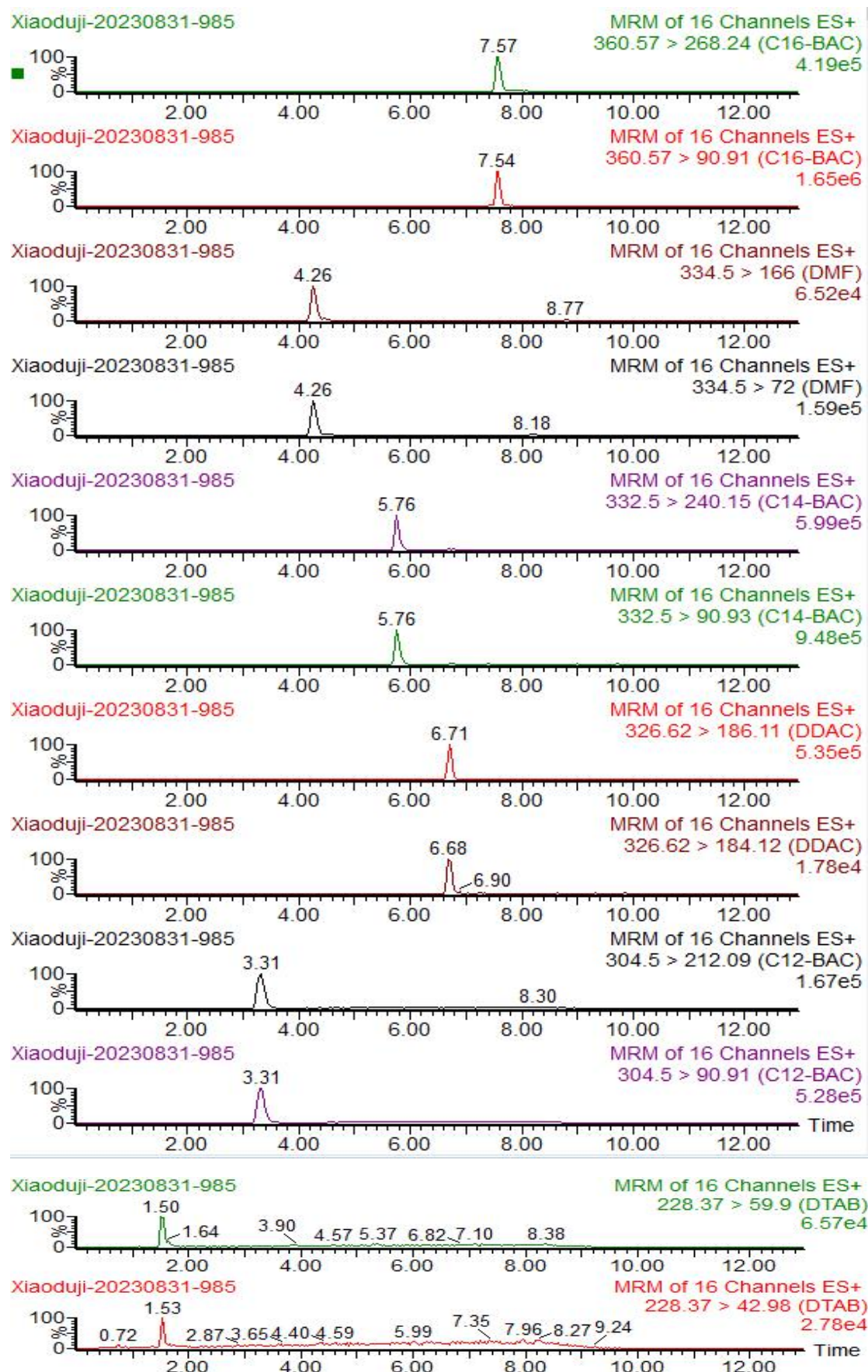


图 A.4 猪肉添加样品特征离子色谱图 (2 μ g/kg)

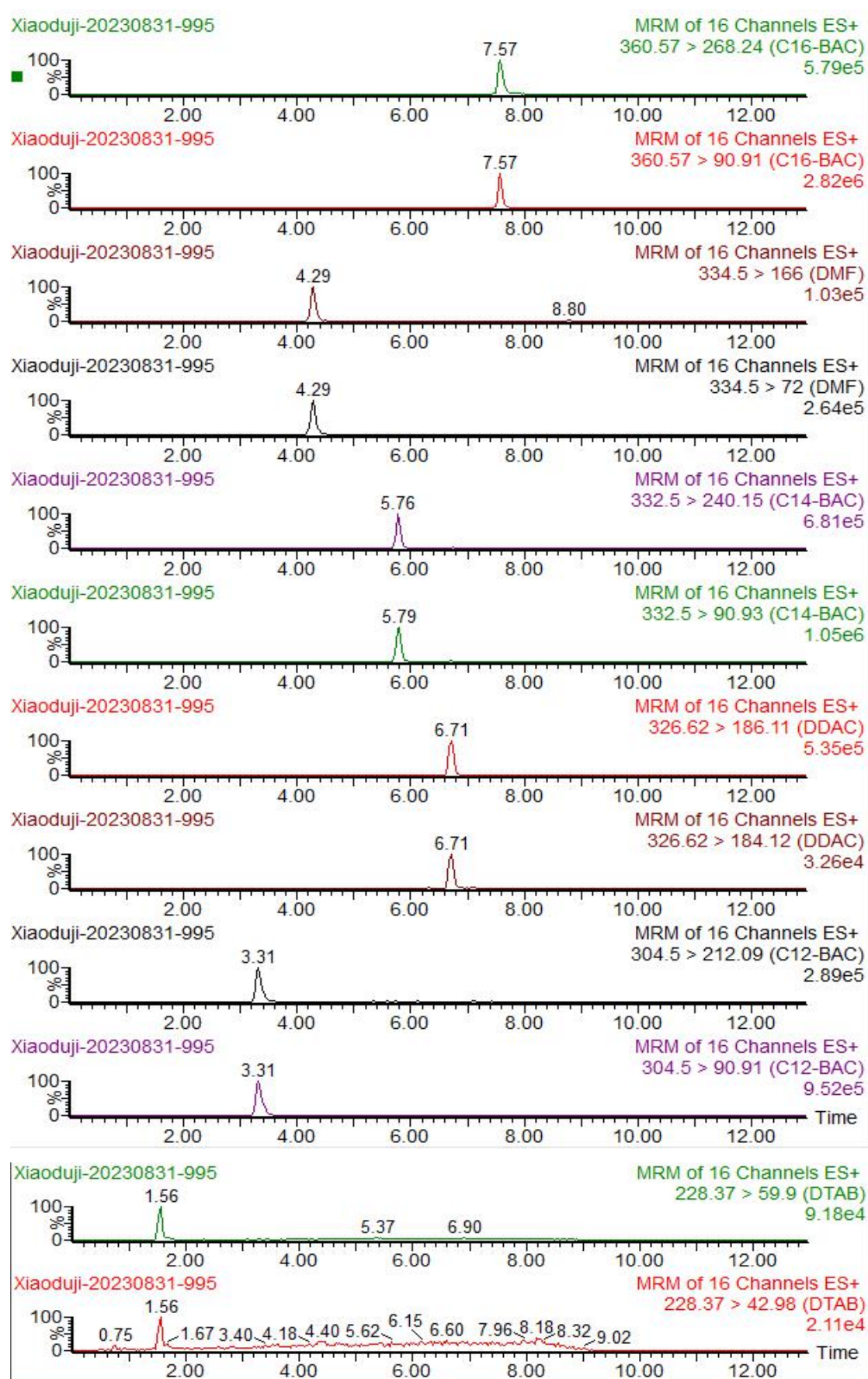
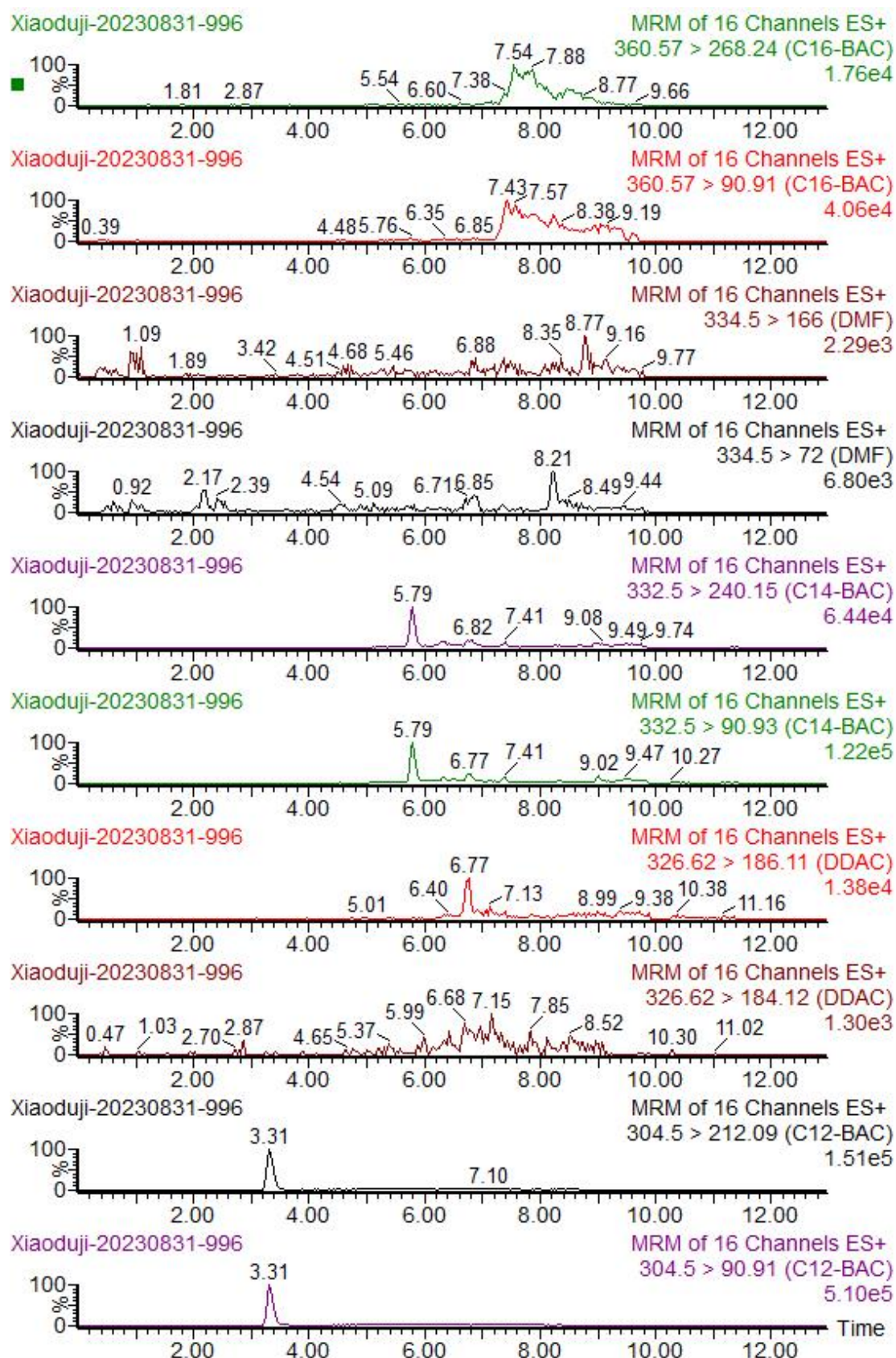


图 A.5 牛肉基质匹配标准溶液特征离子色谱图 (2 μ g/L)



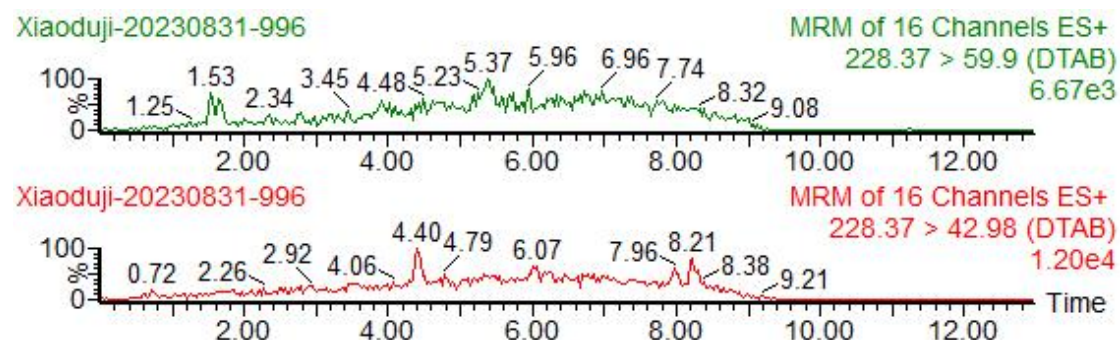
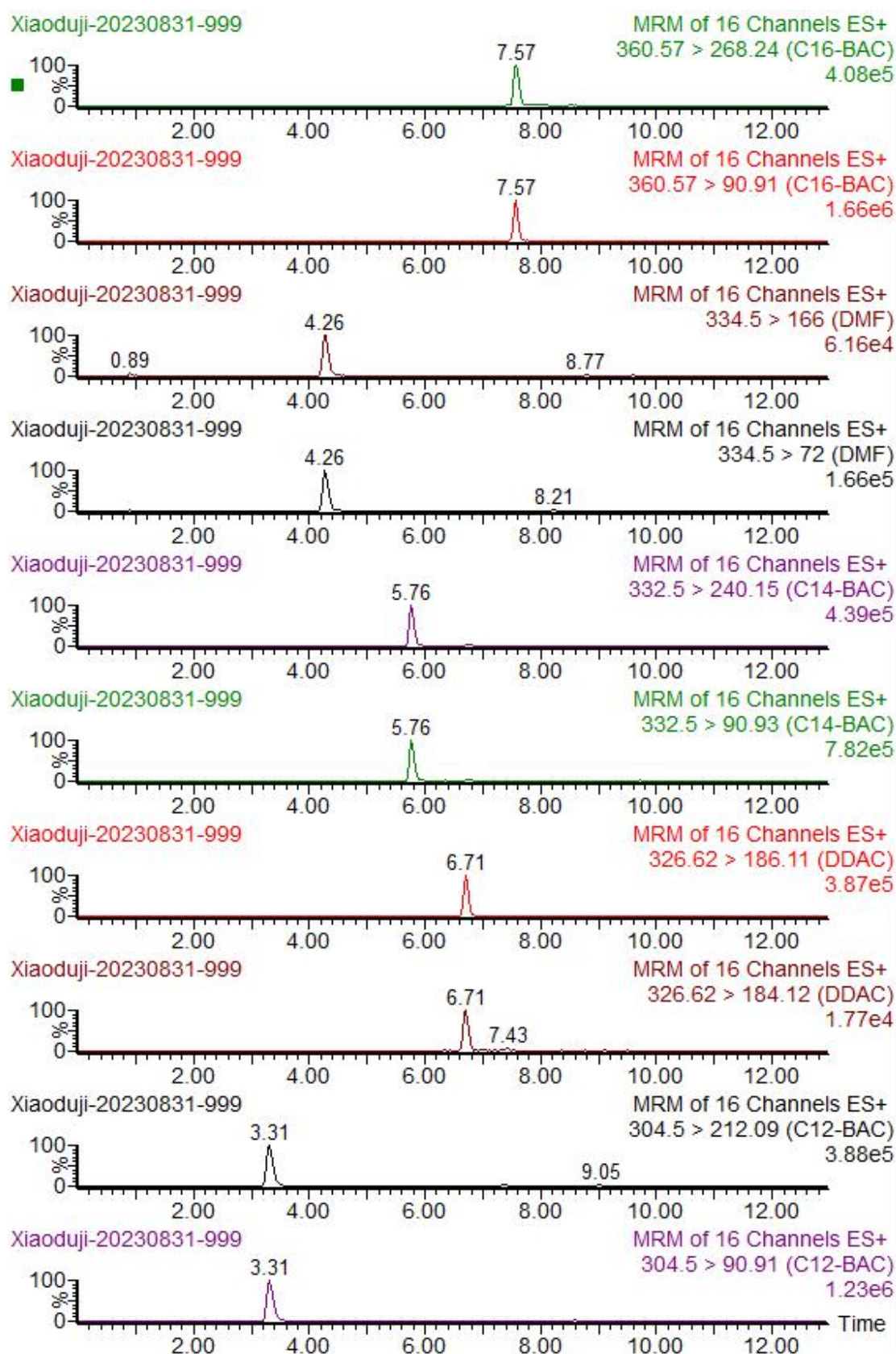


图 A.6 牛肉空白样品特征离子色谱图



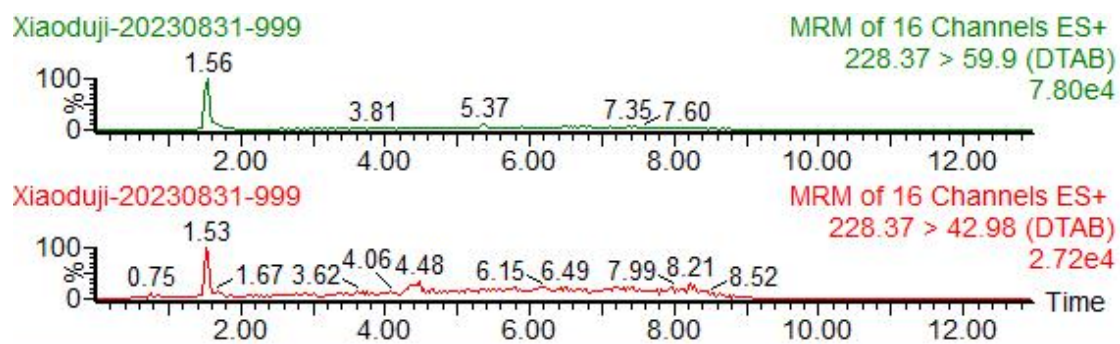


图 A.7 牛肉添加样品特征离子色谱图 (2 μ g/kg)

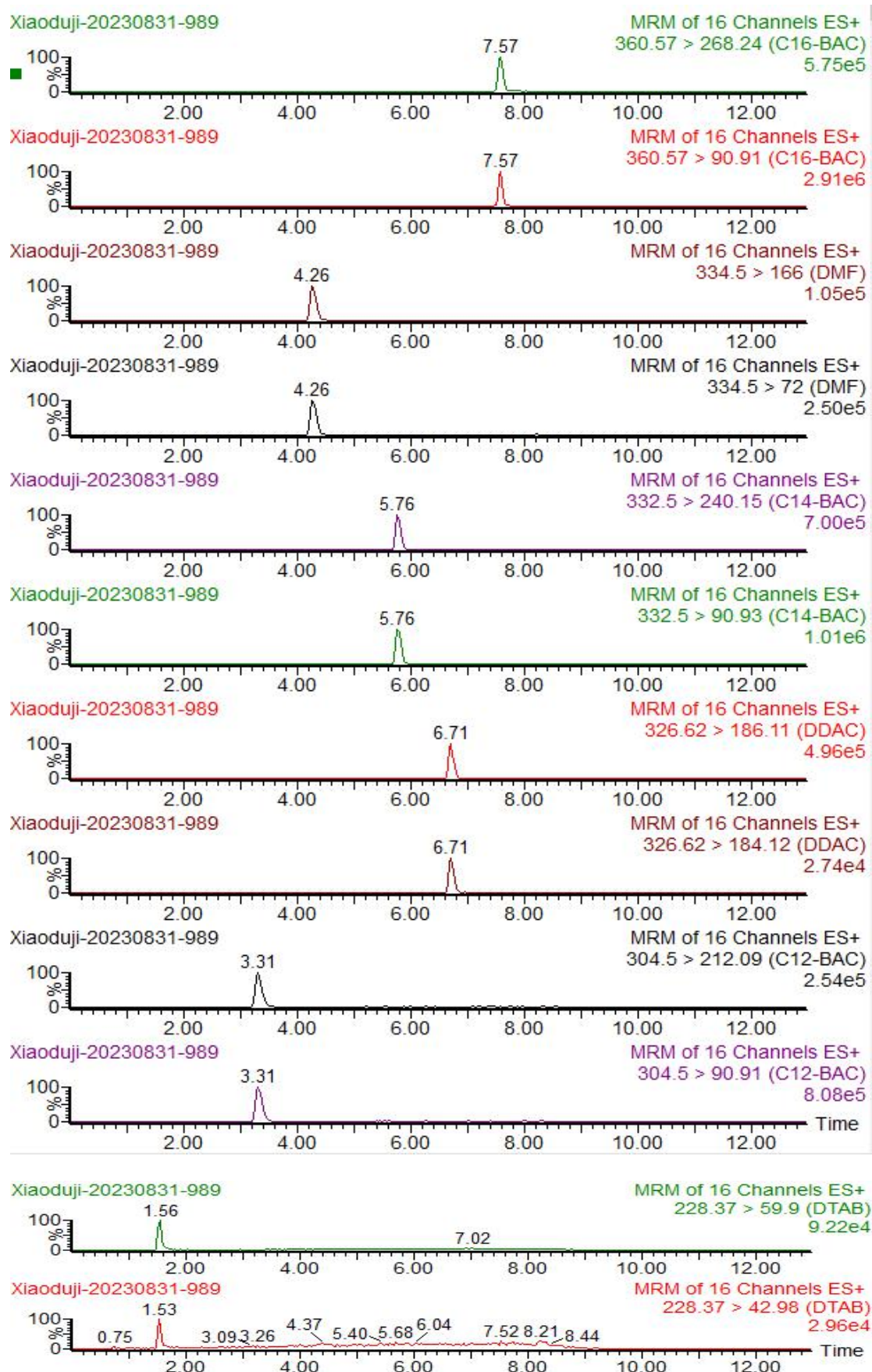
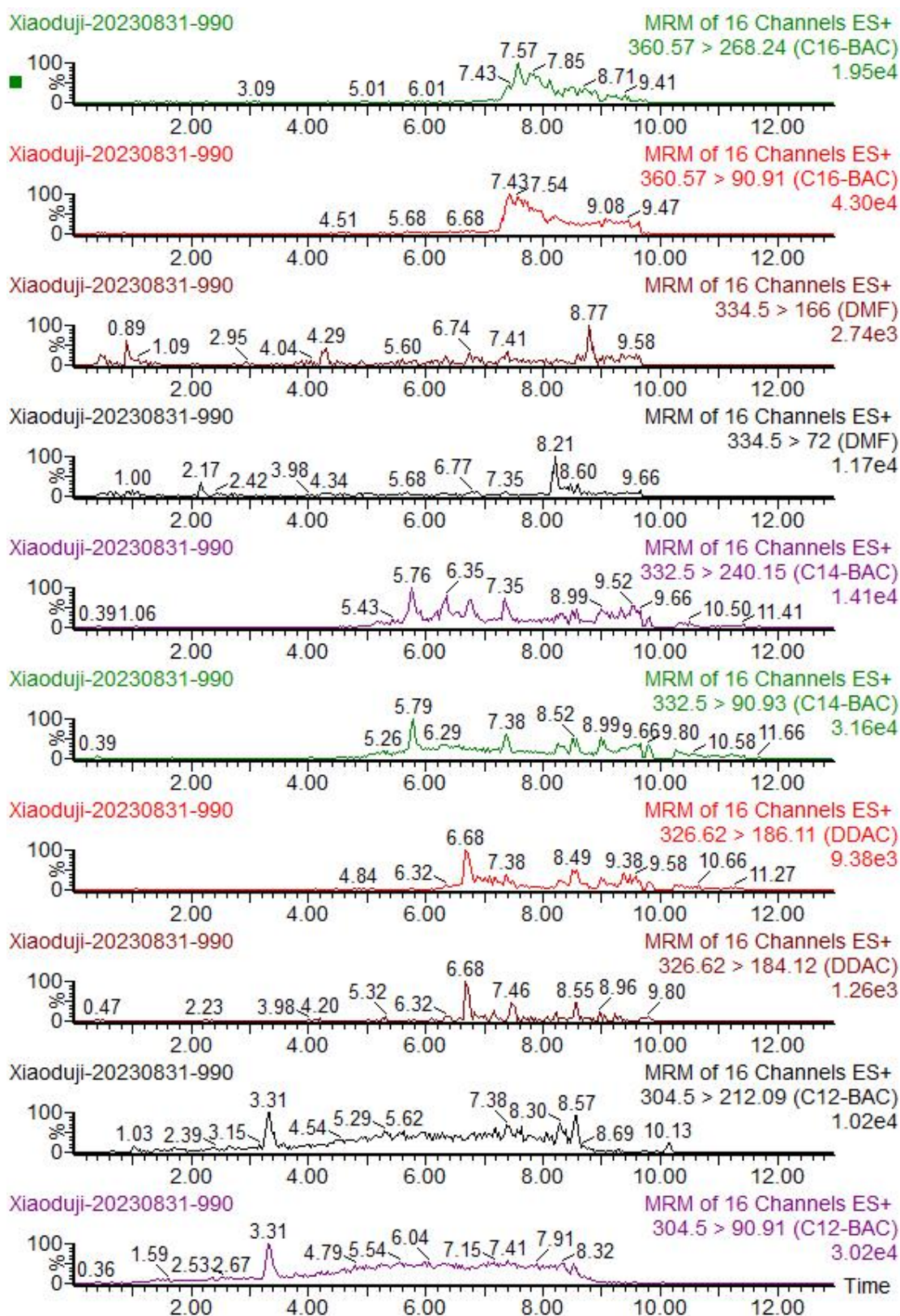


图 A.8 羊肉基质匹配标准溶液特征离子色谱图 (2 μ g/L)



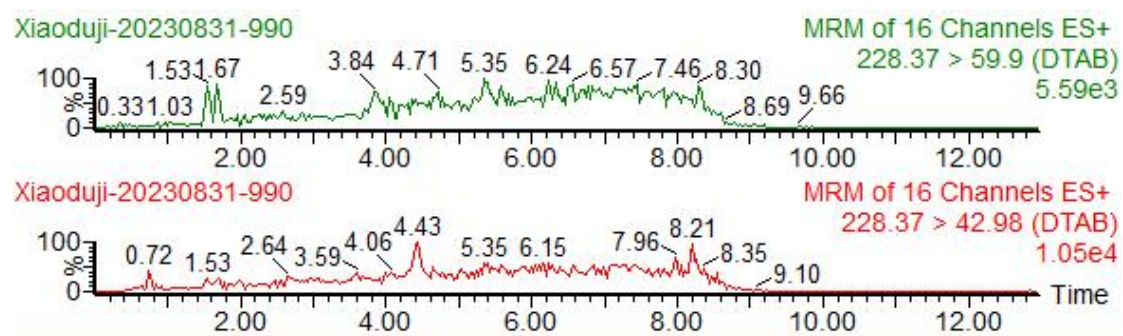
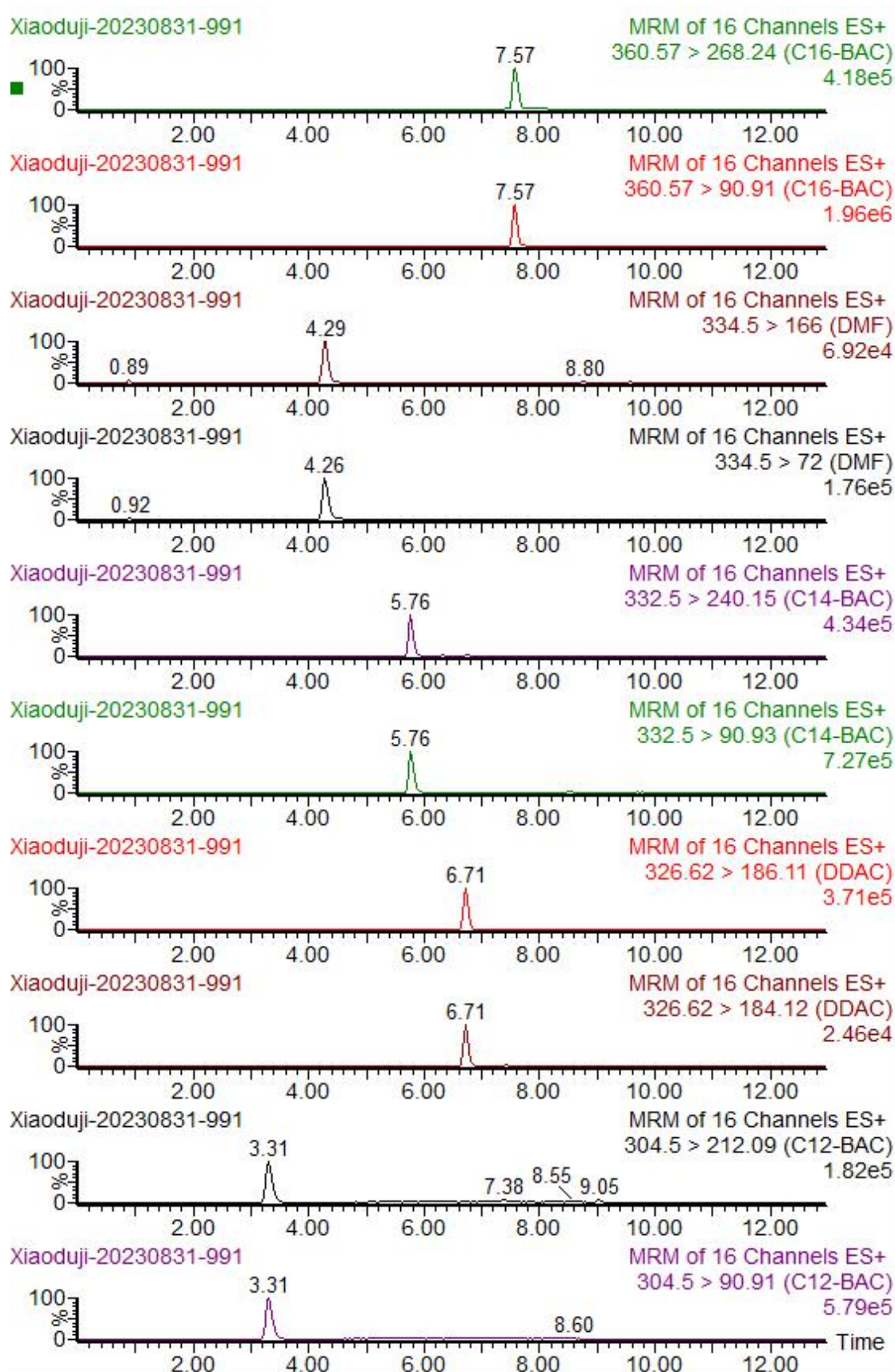


图 A.9 羊肉空白样品特征离子色谱图



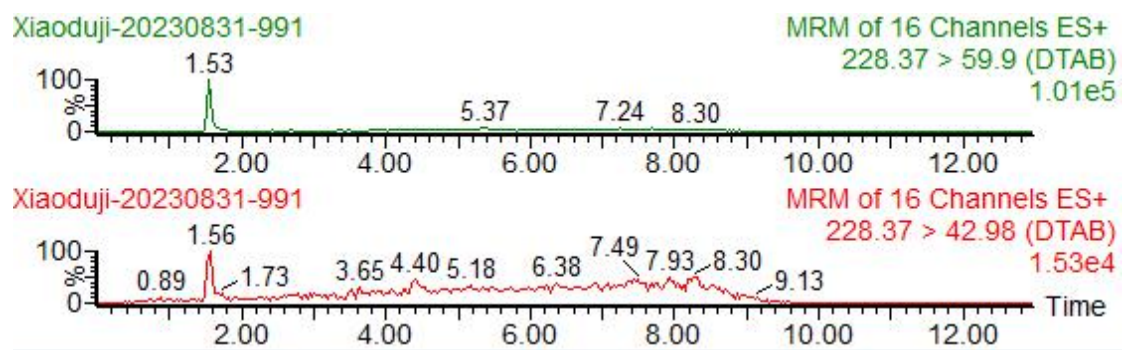
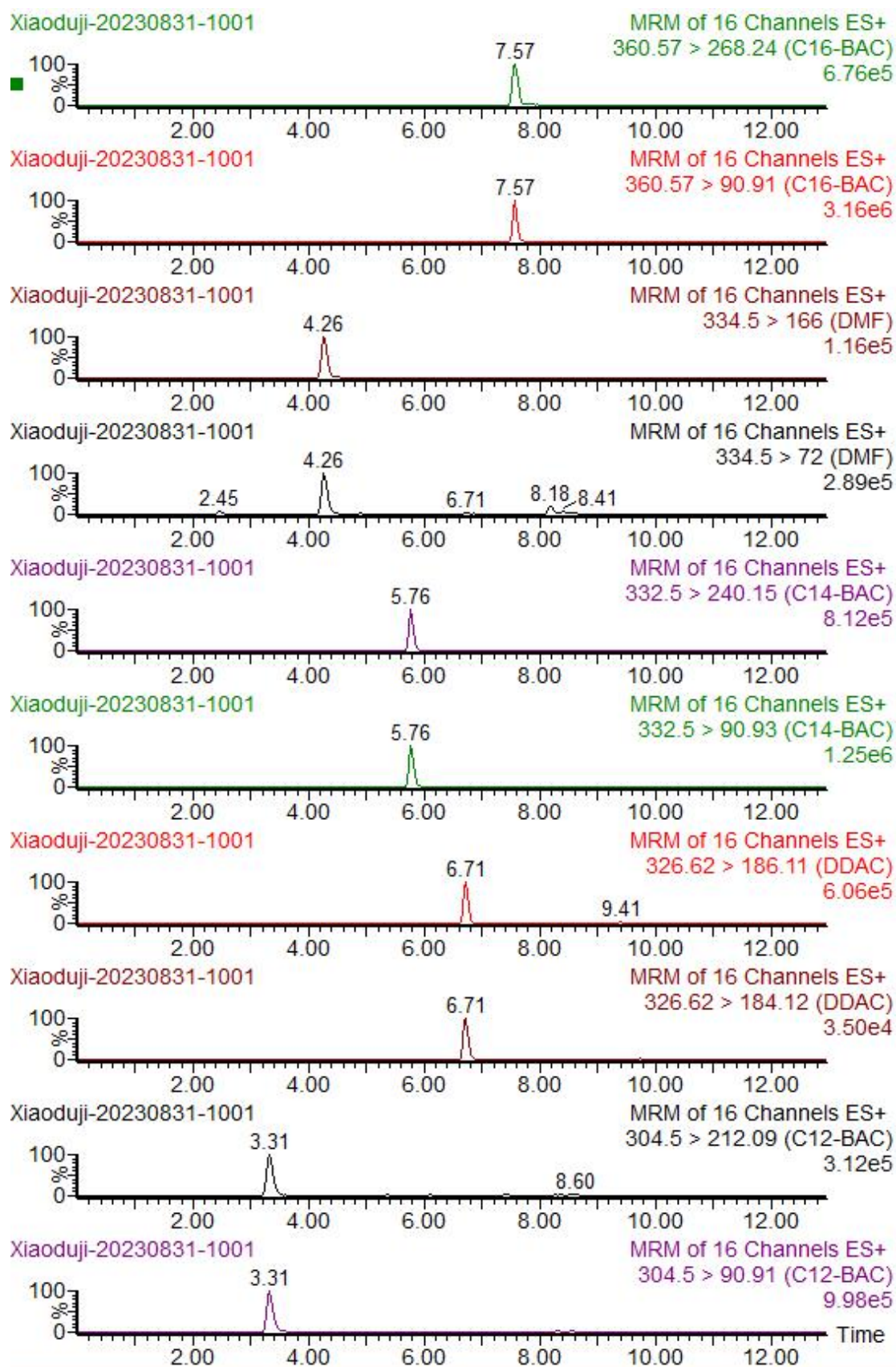


图 A.10 羊肉添加样品特征离子色谱图 (2 μ g/kg)



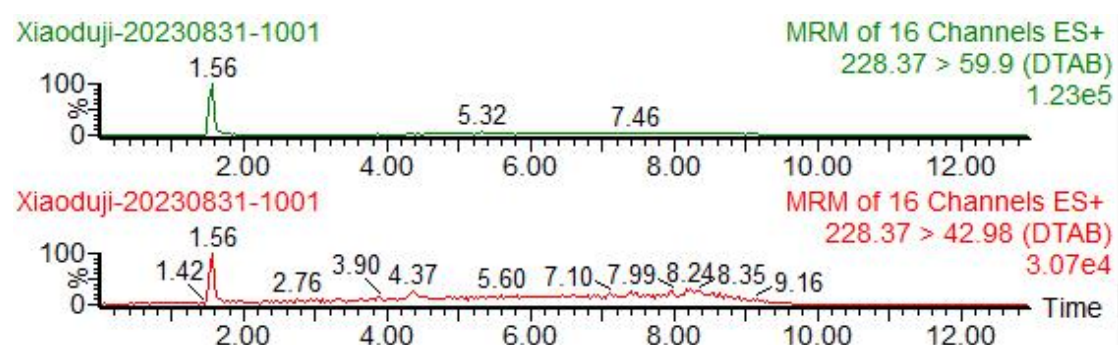
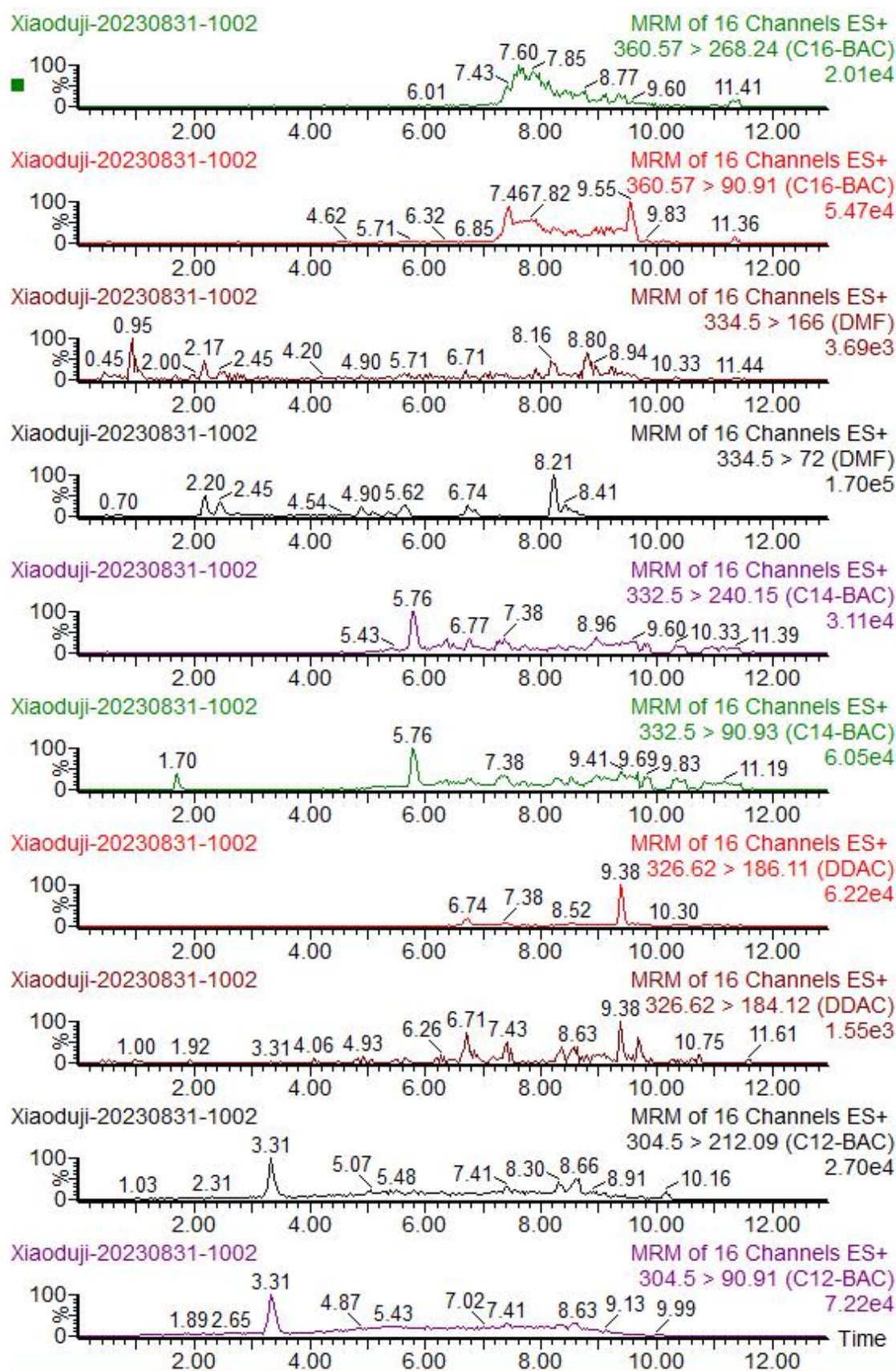


图 A.11 鸡肉基质匹配标准溶液特征离子色谱图 (2 μ g/L)



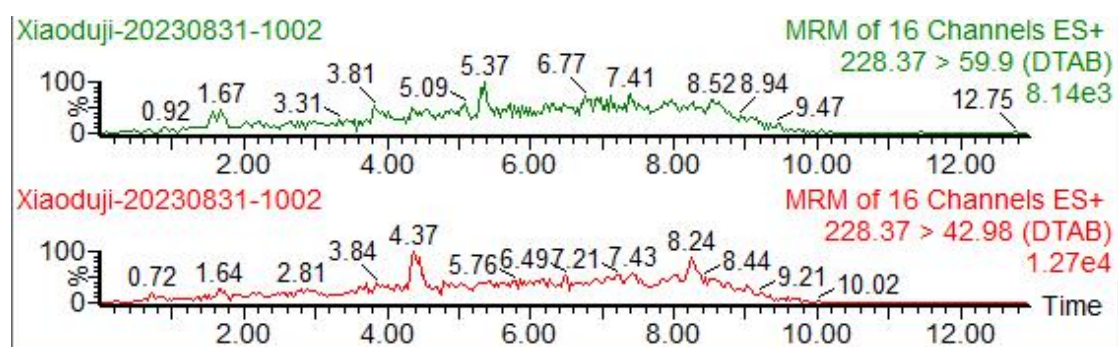
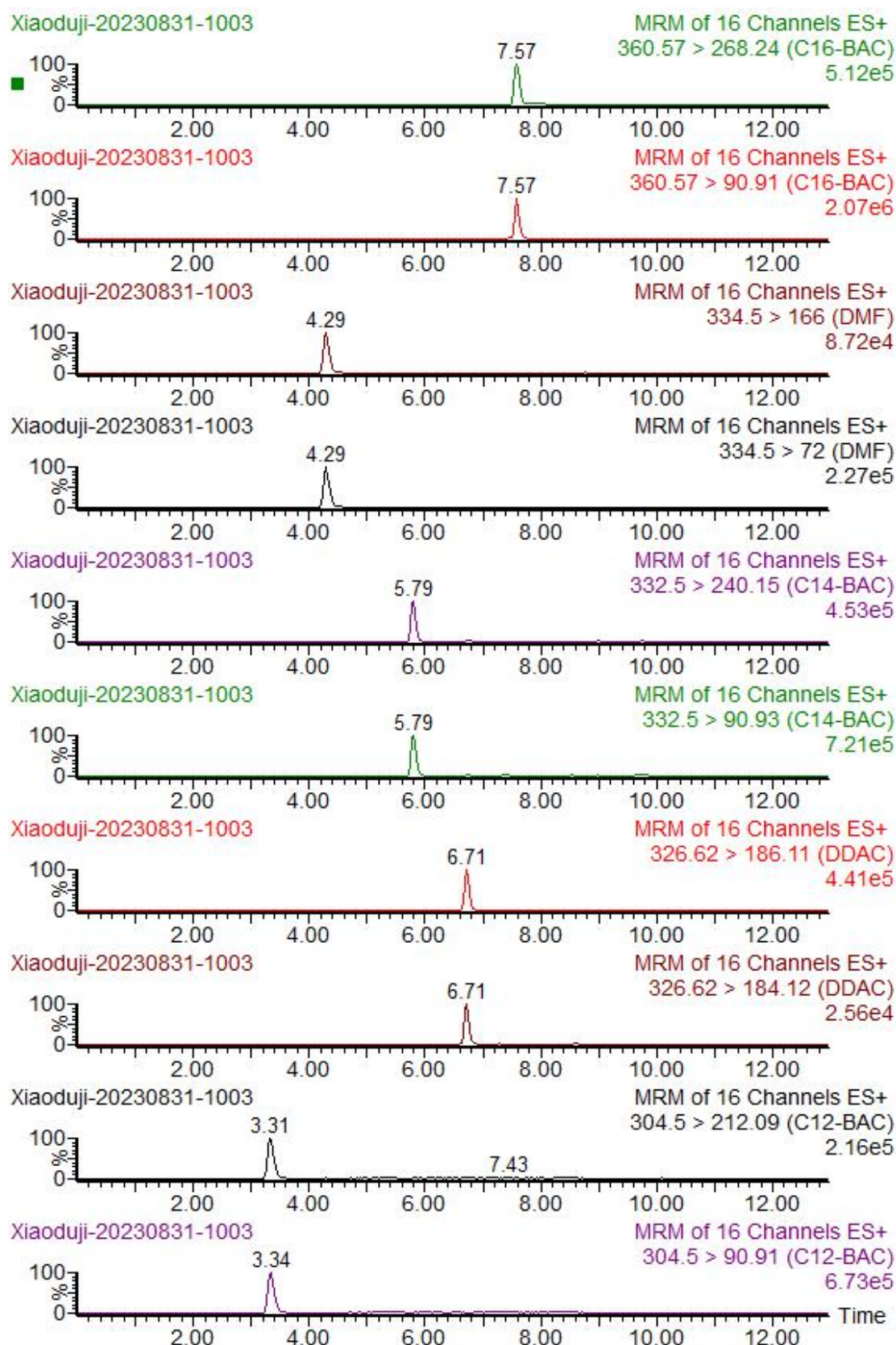


图 A.12 鸡肉空白样品特征离子色谱图



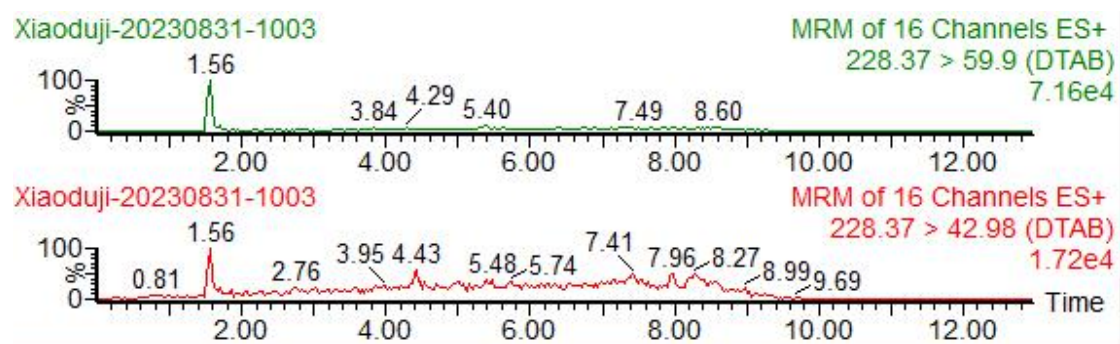


图 A.13 鸡肉添加样品特征离子色谱图 (2 μ g/kg)