

# 使用安捷倫 SampliQ QuEChERS EN 套組 以 LC/MS/MS 分析綠茶中的農藥殘留物

## 應用註解

食品安全

### 作者

Chen-Hao Zhai  
安捷倫科技（上海）有限公司  
英倫路 412 號  
上海市，200131  
中國

### 摘要

本應用說明介紹如何以迅速、方便、成本低廉、有效、耐用且安全的 (QuEChERS) EN 樣品製備方法，萃取並淨化 12 種代表各種農藥類別的綠茶農藥殘留物。原始的 EN 方法包括在水/乙腈緩衝系統中進行初步萃取，加入鹽類進行萃取/分離步驟，以及使用分散式固相萃取進行淨化步驟。而後將使用液相層析搭配電噴灑離子化串聯式質譜儀 (LC-ESI-MS/MS)，以正離子多重反應監控 (MRM) 模式運作，以判定綠茶萃取物是否存在目標農藥。本方法將進行回收率和再現性驗證（針對所有相關分析物）。本項應用的綠茶農藥定量限制 (LOQ) 為 5 ng/g，遠低於最大殘留量限制 (MRL)。回收率實驗的添加濃度為 10、50 及 250 ng/g。大部分的平均回收率介於 87% 至 108% 之間 (平均 93.5%)，RSD 低於 10% (平均 5.2%)。



**Agilent Technologies**

## 緒論

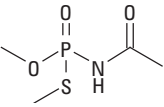
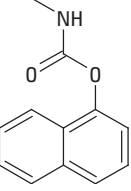
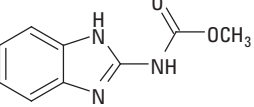
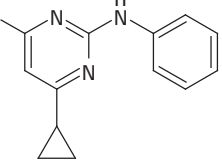
EN QuEChERS 方法已廣泛用於分析食品農藥殘留，特別是歐洲地區 [1-2]。本方法使用乙腈萃取，而後使用無水硫酸鎂 ( $MgSO_4$ )、氯化鈉 (NaCl) 及檸檬酸鹽緩衝液，利用鹽析原理讓樣品與水分離。淨化時採用分散式固態相萃取 (分散式 SPE)，結合 N-丙基乙二胺 (PSA) 由樣品基質移除有機酸，並使用無水硫酸鎂  $MgSO_4$  減少萃取物中的剩餘水份。本步驟可能添加其他成分 (需視食品基質而定)，例如石墨化炭黑 (GCB) 可移除色素及固醇，或加入 C18 移除脂質與蠟。

綠茶屬於具大量色素的樣本，其中含有大量的葉綠素。因此本應用選擇了適合大量色素物品的 EN 分散式 SPE 套組。此套組適用於 1-mL 的樣品體積，其中包含 25 mg 的 PSA 和 150 mg 的  $MgSO_4$ 。在每 ml 的 ACN 萃取物中，會加入 7.5 mg 的

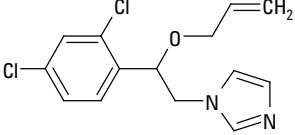
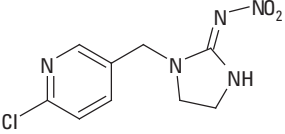
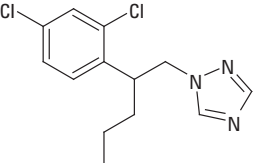
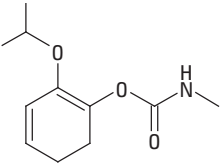
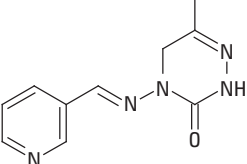
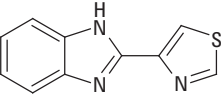
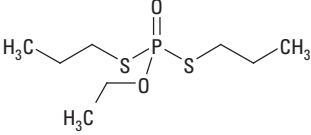
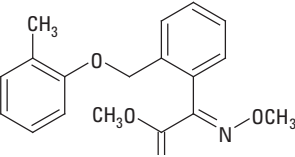
GCB。GCB 可吸收色素和固醇等平面分子，故能非常有效地淨化含有色素的基質 (例如綠茶)。淨化效率取決於使用的 GCB 量而定。使用越多 GCB，就能吸收更多平面分子，獲得更淨化的樣本基質。AOAC 法使用非常大量的 GCB (每毫升 ACN 萃取物添加 50 mg 的 GCB)，但 EN 法則大幅減少使用的 GCB (含「色素」農產品為每毫升 ACN 萃取物添加 2.5 mg 的 GCB，若為「大量色素」農產品，則在每毫升 ACN 萃取物添加 7.5 mg 的 GCB)。GCB 會對平面農藥殘留物的萃取造成影響。AOAC 法可以產生更乾淨的最終樣本基質，但將大量損失平面農藥殘留物。相反地，EN 法的平面殘留物損失非常有限 (甚至沒有)，獲得的樣本基質卻較為複雜。

本研究使用 12 種農藥，評估安捷倫 SampliQ EN 緩衝萃取套組 (p/n 5982-5650) 及適用於含有大量色素蔬果的 SampliQ QuEChERS EN 分散式 SPE 套組 (p/n 5982-5356) 效能。方法將進行回收率和再現性驗證。

表 1. 顯示這些綠茶中農藥的化學及規範資訊

名稱	類別	Log P	pKa	結構	蘋果的 MRL (ng/g)*
敵殺松 (Acephate)	有機磷 (Organophosphate)	-0.89	8.35		20
加保利 (Carbaryl)	氨基甲酸酯 (Carbamate)	2.36	10.4		50
貝芬替 (Carbendazim)	苯並咪唑 (Benzimidazole)	1.48	4.2		100
賽普洛 (Cyprodinil)	苯胺嘧啶 (Anilinopyrimidine)	4	4.44		500

(接續下頁)

名稱	類別	Log P	pKa	結構	蘋果的 MRL (ng/g)*
依滅列 (Imazalil)	咪唑 (Imidazole)	3.82	6.53		20
益達胺 (Imidacloprid)	新類尼古丁 (Neonicotinoid)	0.57	NA		1000
平克座 (Penconazole)	三氮唑 (Triazole)	3.72	1.51		50
安丹 (Propoxur)	氨基甲酸酯 (Carbamate)	0.14	NA		2000
派滅淨 (Pymetrozine)	吡啶 (Pyridine)	-0.19	4.06		600
腐絕 (Thiabendazole)	苯並咪唑 (Benzimidazole)	2.39	4.73 12.00		50
普伏松 (Ethoprophos)	有機磷 (Organophosphate)	2.99	NA		5
克收欣 (Kresoxim-methyl)	嗜球果傘素 (Strobilurin)	3.4	NA		50

## 實驗

### 試劑及化學物質

所有試劑與溶劑均為 HPLC 或分析等級。甲醇 (MeOH) 和乙腈 (ACN) 由 Honeywell(美國密西根州馬斯基根)供應。甲酸 (FA) 由 Fluka(德國施泰因海姆)供應。殺蟲劑標準品向 Sigma-Aldrich (美國密蘇里州聖路易市)購買。內部標準品(磷酸三苯酯, TPP) 由 Agilent Technologies Inc. (美國德拉瓦州威爾明頓廠房) 提供。

### 標準溶液

標準及內部標準品 (IS) 儲備溶液 (均為 2.0 mg/mL, 除了貝芬替為 0.5 mg/mL) 分配製別於 MeOH、含 0.1% FA 的 ACN 及 DMSO 之中製作, 並於 -20 °C 溫度下儲存。每日以 1:1 的 ACN/水 (含 0.1% FA) 重新配置 3 種 QC 添加溶液 (0.2、1 及 10 µg/mL)。以 1:1 的 ACN/水 (含 0.1% FA) 之中配製 2 µg/mL 的 TPP 溶液, 作為 IS 添加溶液。

### 設備與材料

安捷倫 1200 系列 HPLC (Agilent Technologies Inc., 美國加州)

安捷倫 6410 三重四極桿 MS 系統搭配電噴灑離子化法 (Agilent Technologies Inc., 美國加州)

安捷倫 SampliQ QuEChERS EN 緩衝萃取套組 (p/n 5982-5650) 及 SampliQ QuEChERS EN 分散式 SPE 套組, 適用於具有大量色素的蔬果 (p/n 5982-5356)(Agilent Technologies Inc., 美國德拉瓦州)

安捷倫陶瓷均質機, 50 mL 試管, p/n 5982-9313 (Agilent Technologies Inc., 美國德拉瓦州)

Eppendorf 微量離心機 (Brinkmann Instruments, 美國紐約州 Westbury)

飛鵝牌離心機 (安亭科學儀器, 中國上海)

### 儀器條件 HPLC 條件

管柱	安捷倫 Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 100 mm, 2.7 µm, (p/n 695775-902)	
流速	0.4 mL/min	
管柱溫度	30 °C	
注入量	10 µL	
移動相	A : 5 mM FA 加入水中 B : 5 mM FA 加入 ACN	
濃度梯度	時間 (分鐘)	%B
	0	5
	1	5
	3	50
	7	90
	8	90
	8.2	5
	9	5
分離後	2 分鐘	
總循環時間	11 分鐘	
<b>MS 條件</b>		
<b>正離子模式</b>		
氣體溫度	350 °C	
氣體流速	10 L/分鐘	
霧化器	40 psi	
毛細管	3500 V	
有關分析物的其他條件請參閱表 2。		

### 樣品製備

#### 樣本研磨

向 Teavana Corp 購買有機生長無農藥的綠茶。綠茶放置於乾淨塑膠袋中, 並於 -20 °C 溫度下冷凍隔夜。並不時按揉塑膠袋, 以確保綠茶維持分離狀態。隔天僅取出所需份量的冷凍綠茶並充分混合。若可能於研磨過程中加入乾冰。充分研磨樣品, 確保樣品均質化。經驗證, 最終樣品內已無可見茶葉。

#### 萃取/分散

將 2 g (±0.1g) 的均質樣品放置於 50-mL 的離心機試管。QC 樣品添加適當的 100 µL QC 添加溶液。將 100 µL 的 IS 添加溶液 (10 µg/mL 的 TPP) 添加至所有樣品 (空白控制組除外), 以便在樣品中產生 50 ng/g 的濃度。試管加蓋後迴旋振盪 1 分鐘。使用分注器在每個試管加入 8-mL 的水。試管加蓋後迴旋振盪 1 分鐘。

表 2. LC/MS/MS 分析 12 種農藥使用的儀器擷取資料

分析物	MRM 通道 (m/z)	裂解器 (V)	CE (V)	RT (分鐘)
毆殺松 (Acephate)	1) 184.0 > 143.0	60	3	1.66
	2) 184.0 > 95.1		21	
派滅淨 (Pymetrozine)	1) 218.1 > 105.1	125	21	1.95
	2) 218.1 > 78.1		50	
貝芬替 (Carbendazim)	1) 192.1 > 160.1	110	16	3.25
	2) 192.1 > 132.1		32	
腐絕 (Thiabendazole)	1) 202.0 > 175.1	145	26	3.37
	2) 202.0 > 131.1		38	
益達胺 (Imidacloprid)	1) 256.1 > 209.1	125	11	4.02
	2) 256.1 > 175.1		17	
依滅列 (Imazalil)	1) 297.1 > 159.0	110	23	4.40
	2) 297.1 > 69.1		17	
安丹 (Propoxur)	1) 210.2 > 111.1	70	11	4.81
	2) 210.2 > 93.1		23	
加保利 (Carbaryl)	1) 202.0 > 145.0	50	5	4.98
	2) 202.0 > 127.1		30	
賽普洛 (Cyprodinil)	1) 226.1 > 93.1	125	40	5.84
	2) 226.1 > 108.1		33	
普伏松 (Ethoprophos)	1) 243.1 > 130.9	125	19	5.98
	2) 243.1 > 173.0		11	
平克座 (Penconazole)	1) 284.0 > 70.1	120	15	6.20
	2) 284.0 > 159.0		37	
克收欣 (Kresoxim-methyl)	1) 314.1 > 222.1	90	11	6.62
	2) 314.1 > 235.1		11	
TPP (IS)	1) 327.1 > 77.1	160	49	6.80
	2) 327.1 > 152.1		49	

1) 定量轉變通道

2) 定性轉變通道

每個試管放入 2 個適用於 50 ml 試管的陶瓷均質機 (p/n 5982-9313)。將等量 10 mL 的 ACN 利用分注器加入每個試管。試管加蓋後手搖 1 分鐘。將安捷倫 SampliQ QuEChERS EN 萃取的鹽類包直接加入每個試管，其中包含 4 g 無水 MgSO<sub>4</sub>、1 g NaCl、1 g 三鈉檸檬酸鹽 (Na<sub>3</sub> Citrate) 及 0.5 g 二鈉檸檬酸鹽 (Na<sub>2</sub>H Citrate) 水合物。試管密封後用手劇烈搖晃 20 秒，確保溶劑在整體樣品中充分相互作用，並充分攪開結晶團塊。樣品試管於 4000 rpm 轉速離心 5 分鐘。

#### 分散式 SPE 淨化

將等量 6-mL 的上層 ACN 移轉至安捷倫 SampliQ QuEChERS EN 分散式 SPE 15 mL 試管 (p/n 5982-5356)。15 mL 試管包含 150 mg PSA、900 mg 無水 MgSO<sub>4</sub> 及 45 mg GCB。試管緊密加蓋後迴旋振盪 1 分鐘。試管使用標準離心機於 4000 rpm 轉速離心 5 分鐘。

取出 1-mL 萃取物移轉至 10 mL 試管，並於 40 °C 以下的氮氣進行乾燥。產生的殘留物利用 ACN/水 (1/9) 進行溶解，並定容為 1 mL。之後使用 0.45-μm 濾膜 (p/n 5185-5836) 過濾殘留物，並使用 LC/MS/MS 進行分析。

## 結果及討論

我們根據建議，在本項研究中使用適合大量色素產品的 EN 分散式 SPE 套組處理綠茶。採用 EN 法處理的最終樣品仍然呈現綠色，不過由於 LC/MS/MS 提供強大的選擇性，因此空白基質的 MRM 層析圖並未顯示目標分析物出現任何干擾波峰。圖 1 及圖 2 顯示空白基質 (添加 IS) 的 LC/MS/MS 層析圖，以及添加 50 ng/g 分析物的綠茶萃取物 LC/MS/MS 層析圖 (使用 EN 分散式 SPE 法處理)。

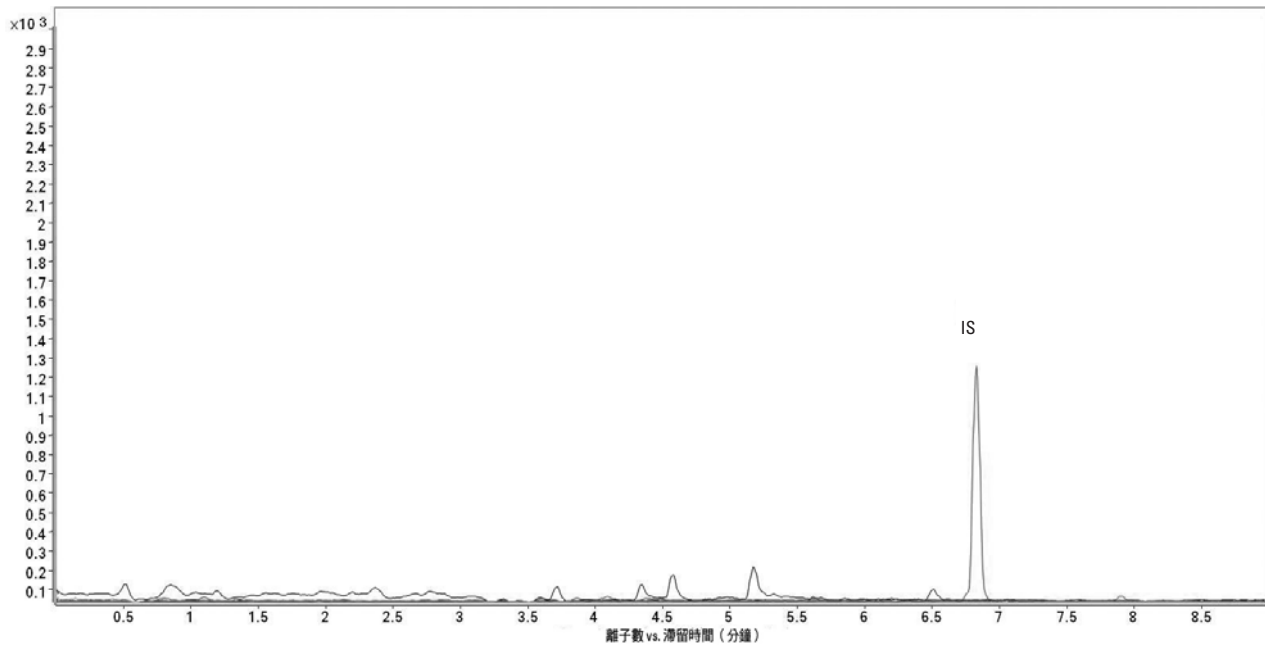


圖 1. 綠茶空白基質的 MRM 層析圖。波峰識別：IS：TPP

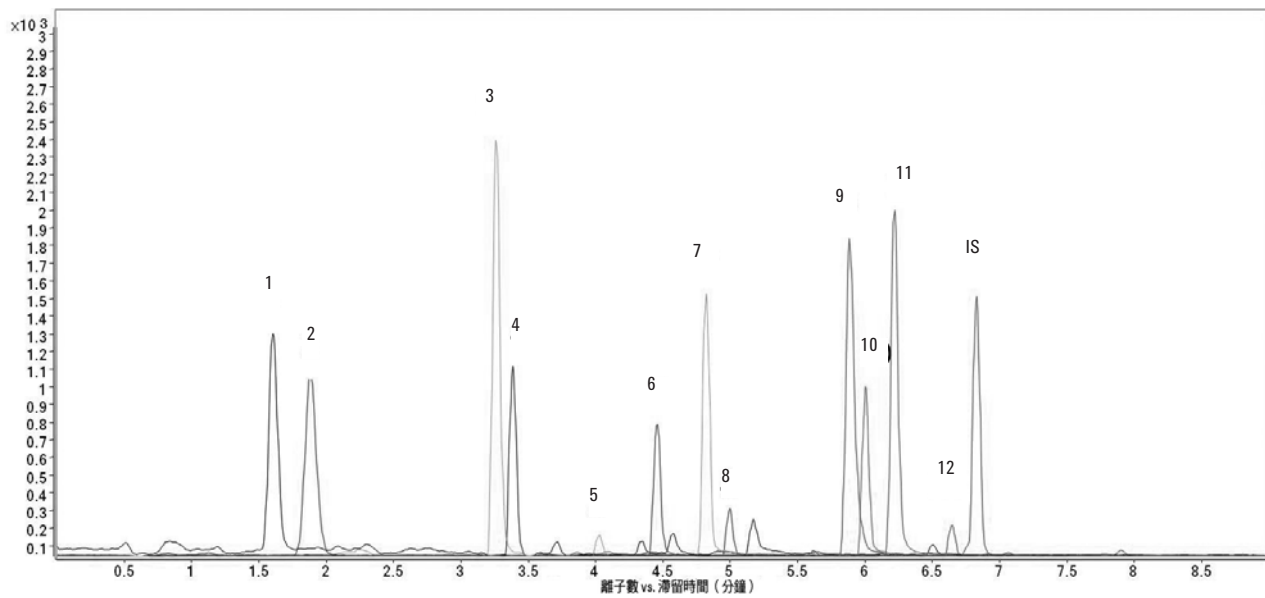


圖 2. 添加 50 ng/g 分析物的樣品 MRM 層析圖 (由 EN 法處理)。波峰識別：1. 毆殺松、2. 派滅淨、3. 貝芬替、4. 腐絕、5. 益達胺、6. 依滅列、7. 安丹、8. 加保利、9. 賽普洛、10. 普伏松、11. 平克座、12. 克收欣、IS：TPP

## 線性及定量限制 (LOQ)

所有測試農藥校正曲線的線性範圍為 5-500 ng/g。校正曲線於空白基質中添加分析物使濃度呈 5、10、50、250 及 500 ng/g，而 TPP 則是添加在 50 ng/g 作為內標準品。校正曲線由點由分析物相對濃度（分析物濃度/IS 濃度）對分析物相對反應（分析物波峰面積/IS 波峰面積）所描繪產生。針對所有農藥建立的 5 ng/g 定

量限制 LOQ (5 ng/g)，低於蔬果中這些農藥的 MRL。表 3 所示為線性迴歸公式和相關係數 (R<sup>2</sup>)。

## 回收率及再現性

回收率與再現性的評估方式，是於 10、50 和 250 ng/g 濃度於研磨樣本添加農藥標準品。相關 QC 樣品依據基質添加的校正曲線進行定量。每種濃度會重複執行 6 次分析。回收率和再現性（以 RSD 顯示）資料請參閱表 4 與圖 3。從結果可發現 11 種農藥展現了優異的回收率和精確度。派滅淨的回收率較低，但精準度良好。派滅淨屬於對 pH 值敏感的農藥，因此可能受到萃取程序 pH 值的影響 (pH 5 至 5.5)。貝芬替、腐絕與賽普洛，和派滅淨一樣屬於平面農藥，在 d-SPE 步驟使用少量 GCB 時，出現了回收率減少的情形。

表 3. 綠茶萃取物的農藥線性

名稱	迴歸公式	R <sup>2</sup>
毆殺松	Y = 2.0260x + 0.0347	0.9995
派滅淨	Y = 2.3741x - 0.0141	0.9999
貝芬替	Y = 2.9630x + 0.1685	0.9991
腐絕	Y = 1.5021x - 0.0034	0.9998
益達胺	Y = 0.0625x - 0.0002	0.9998
依滅列	Y = 0.9445x + 0.0190	0.9997
安丹	Y = 1.8301x + 0.0362	0.9998
加保利	Y = 0.3677x - 0.0014	0.9999
賽普洛	Y = 3.0000x + 0.0809	0.9991
普伏松	Y = 1.2764x + 0.0425	0.9986
平克座	Y = 2.7559x + 0.0259	0.9999
克收欣	Y = 0.1976x + 0.0119	0.9969

表 4. 綠茶添加後的農藥回收率及再現性 (使用 QuEChERS)

分析物	添加 10 ng/g 的 QC		添加 50 ng/g 的 QC		添加 250 ng/g 的 QC	
	回收率	RSD (n=6)	回收率	RSD (n=6)	回收率	RSD (n=6)
毆殺松 (Acephate)	80.5%	5.4%	91.7%	2.9%	88.9%	8.2%
派滅淨 (Pymetrozine)	43.1%	3.0%	42.2%	3.4%	43.4%	9.8%
貝芬替 (Carbendazim)	114.6%	11.6%	97.6%	2.0%	105.0%	6.2%
腐絕 (Thiabendazole)	98.1%	6.9%	90.4%	2.4%	81.7%	5.8%
益達胺 (Imidacloprid)	104.3%	11.7%	108.6%	2.5%	93.9%	7.9%
依滅列 (Imazalil)	97.5%	4.4%	87.8%	5.6%	92.4%	4.6%
安丹 (Propoxur)	98.1%	2.4%	110.2%	1.7%	107.8%	3.9%
加保利 (Carbaryl)	89.7%	11.4%	104.9%	3.3%	108.1%	5.2%
賽普洛 (Cyprodinil)	84.9%	2.1%	92.5%	3.7%	93.9%	5.5%
普伏松 (Ethoprophos)	103.4%	3.1%	111.2%	3.2%	104.9%	5.7%
平克座 (Penconazole)	108.7%	2.9%	94.3%	4.5%	89.8%	3.3%
克收欣 (Kresim-methyl)	105.7%	12.4%	96.4%	2.5%	99.2%	5.5%

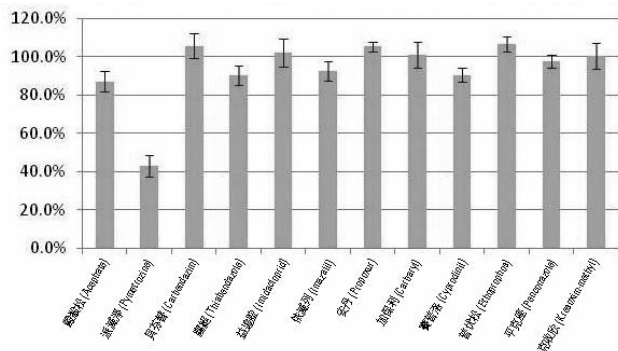


圖 3. 綠茶中 12 種農藥的回收率及精確度結果

## 結論

安捷倫 SampliQ QuEChERS EN 緩衝萃取套組與分散式 SPE 套組為大量色素的蔬果提供簡單、快速、有效的方法，並在研究中用來純化綠茶中的代表性的農藥。分散式 SPE 中的少量 GCB，並不影響萃取平面農藥。依據基質添加標準品的回收率與再現性，在多重類別和多重殘留物的綠茶農藥判定中，屬於可接受水準。

## 參考資料

1. 歐洲標準化委員會／技術委員會 (European Committee for Standardization/Technical Committee) CEN/TC 275 (2007)，植物來源的食品：利用分散式 SPE-QuEChERS 法以乙腈萃取／分離與淨化過後，使用 GC-MS 及／或 LC-MS/MS 判定農藥殘留物 (Foods of plant origin : Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and cleanup by dispersive SPE-QuEChERS method)。歐洲標準化委員會 (European Committee for Standardization)，布魯塞爾。
2. P. Paya、M. Anastassiades；〈使用迅速、方便、成本低廉、有效、耐用且安全的 (QuEChERS) 農藥多重殘留方法，結合氣相與液相層析及串聯式質譜儀進行偵測〉 (Analysis of Pesticide Residues Using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe Pesticide Multiresidue Method in Combination with Gas and Liquid Chromatography and Tandem Mass Spectrometric Detection)。《分析與生物分析期刊》(Anal Bioanal Chem.)，2007 年，389，1697-1714。

3. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/index.htm>
4. <http://www.m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/search.html>
5. <http://www.mrlDatabase.com/?selectvetdrug=0>

## 詳細資訊

有關本公司產品與服務的其他資訊，請造訪本公司的網站：  
[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)。

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

本文內容如有任何錯誤，或是因為提供、實行或使用本資料，造成附帶或衍生損害，安捷倫恕不負責。

本文件中的資訊、說明和規格可能隨時變更，恕不另行通知。

© 安捷倫科技公司，2010 年  
於美國印製  
2010 年 9 月 3 日  
5990-6400CHTW



**Agilent Technologies**