

水中巴拉刈和二刈檢測方法—液相層析串聯式質譜儀法

中華民國 111 年 11 月 24 日環署授檢字第 1117108361 號公告

自公告日生效

NIEA W663.50B

一、方法概要

樣品流經固相萃取管匣後，續以溶劑流洗及抽乾固相萃取管匣，再以酸性混合沖提液沖提待測物，沖提液收集過濾定容後，以液相層析串聯式質譜儀 (Liquid chromatograph tandem mass spectrometer, LC/MS/MS) 檢測樣品中巴拉刈 (Paraquat) 及二刈 (Diquat)。

二、適用範圍

本方法適用於飲用水、飲用水水源、地面水體、地下水（體）、廢（污）水、放流水中巴拉刈及二刈之檢測，如表一所示。

三、干擾

- (一) 本方法的干擾可能來自於溶劑、試劑、塑膠器皿及樣品處理過程中所使用的器具之污染，干擾物質可能會導致層析圖基線之漂移，可以使用空白樣品測試有無干擾情形。
- (二) 由於巴拉刈與二刈的離子性，易與玻璃表面進行交互作用（註 1），故採用聚丙烯 (Polypropylene, PP)、聚乙烯 (Polyethylene, PE) 或聚甲基戊稀 (Polymethylpentene, PMP) 等塑膠材質，或使用玻璃器皿必須先去活化（如 Silanization，註 2）。

四、設備與材料

- (一) 採樣瓶：500 mL 塑膠材質，並附螺旋瓶蓋。使用前需先用試劑水及甲醇清洗並乾燥之。使用透明採樣瓶，可用鋁箔紙包於瓶外，以避免照光。
- (二) 塑膠定量瓶：25 mL 或其他適當體積。
- (三) 硼矽玻璃定量瓶：5 mL、100 mL、1000 mL 或其他適當體積。
- (四) 塑膠離心管：15 mL、50 mL 或其他適當體積。
- (五) 分析天平：可精稱至 0.1 mg。

(六) 液相層析串聯式質譜儀

- 1.液相層析儀。
- 2.串聯式質譜儀。
- 3.數據處理系統：能顯示待測物的滯留時間及尖峰面積之定性及定量系統。
- 4.層析管柱：
 - (1)Atlantis Premier BEH Z-HILIC 管柱，2.5 μm (粒徑)，2.1 mm (內徑) \times 100 mm (長度) 或同級品。
 - (2)InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z 管柱，2.7 μm (粒徑)，2.1 mm (內徑) \times 100 mm (長度) 或同級品。

(七) 萃取裝置

- 1.固相萃尿管匣：
 - (1)Oasis[®] MAX Cartridges 150 mg 或同級品。
 - (2)Oasis[®] WCX Cartridges 150 mg 或同級品。
- 2.固相萃尿管匣串接接頭(Adapter)。
- 3.固相萃取裝置：20 孔萃取裝置或同級品。
- 4.真空幫浦：可調整真空度，可達真空壓力 10 mmHg 以下。
- 5.針頭式過濾膜：孔徑 0.22 μm 或以下，Nylon 材質。
- 6.塑膠針筒及針頭：5 mL 或其他適當體積。

(八) pH 試紙或 pH 計：可測量 pH 值範圍 1 至 14。pH 試紙解析度可達 0.5 pH。

(九) 濾紙：孔徑 1 μm 、4 μm 或其他適合孔徑，建議直徑為 47 mm。因待測物屬四級銨鹽(陽離子)，為避免待測物被濾紙吸附，前處理過程中不可使用材質為聚偏二氟乙烯(Polyvinylidene difluoride, PVDF)及聚四氟乙烯(Polytetrafluoroethylene, PTFE)之濾紙。

- (十) 樣品瓶：瓶身、瓶蓋為塑膠材質，2 mL 以上。
- (十一) 上機樣品瓶：瓶身、瓶蓋為塑膠材質，0.5 mL 以上。
- (十二) 低溫離心機：可容納 15 mL 塑膠離心管、離心力可達 $900 \times g$ 以上 ($\times g$ 為離心力，註 3)，具冷卻系統。
- (十三) 冷藏設施：溫度可控制於 $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。
- (十四) 冷凍設施：溫度可達 -20°C 以下。

五、試劑

- (一) 試劑水：不含待測物之去離子水或市售蒸餾水。
- (二) 甲醇(Methanol)、異丙醇(Isopropanol)、乙腈(Acetonitrile)、甲酸(Formic acid)：LC 級或 LC/MS 級。
- (三) 甲酸銨(Ammonium formate)：LC/MS 級。
- (四) 濃氨水(Ammonium hydroxide)：濃度約 28 %，試藥級。
- (五) 硫代硫酸鈉：顆粒狀，試藥級。
- (六) 稀氨水溶液，約 2.5 % (v/v)：使用前配製，取 10 mL 濃氨水加入 90 mL 試劑水中，混合均勻。
- (七) 甲酸水溶液，約 2 % (v/v)：使用前配製，取 2 mL 甲酸加入 98 mL 試劑水中，混合均勻。
- (八) 鹼性試劑水：試劑水中滴加稀氨水溶液調製 pH 7 至 pH 8。
- (九) 酸性混合沖提液，20 % 甲酸 40 % 異丙醇 40 % 乙腈溶液(v/v)：使用前配製，取 20 mL 甲酸、40 mL 異丙醇及 40 mL 乙腈混合均勻。
- (十) 移動相 A：取約 3.15 g 甲酸銨溶於試劑水中，續添加試劑水至 1000 mL，混合均勻經濾膜過濾後，再添加甲酸直至 pH 值範圍於 3.0 至 3.5 之間。
- (十一) 移動相 B：乙腈，LC/MS 級。

(十二) 標準溶液：可用高純度標準品配製或市售可追溯濃度證明文件之溶液。(註4)

1. 儲備標準溶液：稱取約 2 mg (精稱至 0.1 mg) 各待測物標準品，以甲醇或適當溶劑完全溶解並定容至 25 mL，轉移至樣品瓶；或購買市售可追溯濃度證明文件之標準溶液，溶液可能封裝於玻璃安瓿(瓶)(Ampoule)，開封後須轉移保存於樣品瓶中 -20 °C 以下避光儲存。
2. 工作標準溶液：將儲備標準溶液以試劑水稀釋配製成工作標準溶液(建議配製濃度為 2 mg/L)，配製完成保存於樣品瓶中 4 °C ± 2 °C 避光儲存，以此溶液使用於檢量線標準溶液之配製。

(十三) 內標準品溶液：可用高純度標準品配製或市售可追溯濃度證明文件之溶液，建議之內標準品如表二。

1. 儲備內標準品溶液：稱取約 2 mg (精稱至 0.1 mg) 內標準品，以甲醇或適當溶劑完全溶解並定容至 25 mL，轉移至樣品瓶；或購買市售可追溯濃度證明文件之標準溶液，溶液可能封裝於玻璃安瓿(瓶)(Ampoule)，開封後須轉移保存於樣品瓶中 -20 °C 以下避光儲存。
2. 工作內標準品溶液：將儲備內標準品溶液以試劑水稀釋配製成工作內標準品溶液(建議配製濃度為 2 mg/L)，保存於樣品瓶中，於 4 °C ± 2 °C 避光儲存。以此溶液使用於檢量線標準溶液之配製。

六、採樣與保存

(一) 採樣方法可參考本署公告之「飲用水水質採樣方法(NIEA W101.5)」、「監測井地下水採樣方法(NIEA W103.5)」、「河川、湖泊及水庫水質採樣方法(NIEA W104.5)」、「事業放流水採樣方法(NIEA W109.5)」等相關水質樣品採樣方法(註5)。

(二) 樣品須冷藏於 4 °C ± 2 °C，且須注意分析物會對光產生敏感，尤其是二刈。分析物之穩定性經測試後與基質有關。所有樣品須在 7 天內完成萃取，萃取液須在 21 天內完成分析。

(三) 含餘氯水樣每公升須加入 100 mg 硫代硫酸鈉。

七、步驟

(一) 本方法係為效能基準(Performance-based)分析方法，分析人員可依使用的固相萃取管匣、前處理程序、液相層析儀、層析管柱及串聯式質譜儀廠牌的不同，適當修改本方法之檢測程序，惟修改後之方法其執行檢測所有步驟及程序所得結果，應符合本方法品質管制規範。

(二) 液相層析串聯式質譜儀參考條件如下（註6）：

1.層析管柱：

(1)Atlantis Premier BEH Z-HILIC 管柱， 2.5 μm （粒徑）， 2.1 mm（內徑） \times 100 mm（長度）或同級品。

(2)InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z 管柱， 2.7 μm （粒徑）， 2.1 mm（內徑） \times 100 mm（長度）或同級品。

2.初始移動相：A : B = 3 % : 97 %

(1)移動相 A：甲酸銨水溶液（ pH 3.0 至 pH 3.5 ）

(2)移動相 B：乙腈

3.移動相梯度：

時間(min)	移動相A (%)	移動相B (%)
0.0	3	97
1.0	3	97
5.0	15	85
7.0	60	40
9.0	60	40
10.0	3	97
15.0	3	97

4.流率：0.25 mL/min。

5.樣品注入量：5 μL 。

6.管柱溫度：32 °C。

7.正電荷模式串聯式質譜儀條件（電噴灑法）：

(1)離子噴灑電壓(Ion spray voltage)：5.5 kV。

(2)氣簾氣體(Curtain gas)：25 psi。

(3)碰撞氣體(Collision gas)：medium。

(4)霧化氣體(Ion source gas 1)：55 psi。

(5)加熱氣體(Ion source gas 2)：58 psi。

(6)加熱溫度(Temperature)：650 °C。

8.質譜參數如表三。

(三) 檢量線製備

1.檢量線製備：以酸性混合沖提液配製至少 5 種不同濃度之待測物標準品檢量線溶液，最低濃度應與 3 倍方法偵測極限相當，建議濃度範圍為 0.5 µg/L 至 30 µg/L，內標準品濃度建議為 20 µg/L，可依個別待測物感度適當調整之，其中各待測物建議對應之內標準品如表二。採用線性迴歸法(Linear regression)製作檢量線，以化合物濃度與內標準品濃度比值為 X 軸，化合物感應面積與內標準品感應面積比值為 Y 軸，可使用 1/x 加權進行校正，以提高低濃度數值之準確性，其線性相關係數(Correlation coefficient, r)，必須大於或等於 0.995。

2.檢量線確認：檢量線製備完成後，應以第二來源標準品（若無第二來源標準品且無不同批號標準品時，至少應使用另一獨立配製之標準品）配製接近檢量線中點濃度，進行檢量線確認，所測得濃度之相對誤差值不得超過 ±20 %。

(四) 樣品前處理

1.樣品若含有微粒或懸浮物時，可將樣品倒入塑膠離心管中，以約 900 ×g 離心（溫度控制 4 °C ± 2 °C）約 15 分鐘，或通過濾紙以真空抽引過濾（註 7），取上層澄清液或濾液進行固相萃取。

- 2.自前述步驟取適量體積樣品（建議取 10 mL），每個樣品建議添加 2 mg/L 工作內標準品溶液 50 μ L，配製之樣品內標準品濃度為 10 μ g/L。
- 3.取 10 mL 或適量體積試劑水製備查核樣品，加入濃度為 2 mg/L 之工作標準溶液 10 μ L 及濃度為 2 mg/L 之工作內標準品溶液 50 μ L。
- 4.取 10 mL 或適量體積樣品製備添加樣品，加入濃度為 2 mg/L 之工作標準溶液 10 μ L 及濃度為 2 mg/L 之工作內標準品溶液 50 μ L。
- 5.所有樣品視情況滴加稀氨水或甲酸水溶液調整水樣 pH 值範圍 7 至 8。
- 6.經前處理後待上機樣品中內標準品濃度須與檢量線內標準品濃度一致。
- 7.固相萃取：
 - (1)利用固相萃尿管匣串接接頭串接上層 MAX（註 8）及下層 WCX 固相萃尿管匣，以 7 mL 甲醇沖提一次後，再以 7 mL 鹼性試劑水沖提一次。
 - (2)樣品以約每秒 1 滴之流率流經固相萃尿管匣組，通過固相萃尿管匣組樣品液不收集。
 - (3)完成樣品載入後，移除固相萃尿管匣組之上層 MAX，續以 5 mL 鹼性試劑水清洗 WCX 固相萃尿管匣，控制流率約每秒 1 滴。完成後續以 5 mL 甲醇清洗 WCX 固相萃尿管匣，控制流率約每秒 1 滴，完成後抽乾固相萃尿管匣約 0.5 分鐘。
 - (4)WCX 固相萃尿管匣加入 5 mL 酸性混合沖提液於管匣，以約每秒 1 滴流率沖提管匣，使用塑膠離心管收集定容至 5 mL。沖提液經由針頭式過濾膜過濾，將沖提液移入上機樣品瓶待上機。

（五）定性與定量

- 1.使用液相層析串聯質譜系統之多重反應監測模式(Multiple reaction monitoring mode, MRM)，前驅物／產物離子對如表三所示。對每一種待測物監測其前驅物／產物離子對兩對，以其中訊號強度較高的前驅物／產物離子對作為定量依據，另一前驅物／產物離子對作為

定性的依據。多重反應監測模式下前驅物／產物離子對層析圖如圖一及圖二所示。

- 2.待測物之滯留時間須落在當天檢量線確認標準品、檢量線查核標準品或添加樣品待測物之滯留時間 $\pm 2.5\%$ 範圍之內。
- 3.待測物之兩監測前驅物／產物離子對（積分面積或高度）的離子比率(Ion ratio)須落在可接受的離子比率範圍之內（如表四所示），其離子比率須以檢量線查核分析或品管樣品的前驅物／產物離子對的比率為基準計算之。
- 4.當樣品待測物濃度超過檢量線時，應重新取較少樣品量或重新以試劑水合理稀釋樣品後，經前處理再上機分析。

八、結果處理

$$C_w = (C \times V \times D) / M$$

其中

C_w ：水樣濃度($\mu\text{g/L}$)

C ：由檢量線求得之待測物檢出濃度($\mu\text{g/L}$)

V ：定容體積(mL)

M ：樣品取樣體積(mL)

D ：稀釋倍數

九、品質管制

- (一) 檢量線查核：每批次或每 12 小時執行檢量線查核，完成樣品分析後應再執行檢量線之查核，所測得濃度之相對誤差值應在 $\pm 20\%$ 以內。
- (二) 空白樣品分析：每批次或每 10 個樣品，應執行空白樣品分析，空白樣品分析值應小於 2 倍方法偵測極限。

- (三) 重複樣品分析：每批次或每 10 個樣品，應執行重複樣品分析其相對差異百分比應在 20 % 以內。
- (四) 查核樣品分析：每批次或每 10 個樣品，應執行查核樣品分析，其回收率範圍 70 % 至 130 % 。
- (五) 添加樣品分析：每批次或每 10 個樣品，應執行添加樣品分析，其回收率範圍 60 % 至 140 % 。

十、精密度與準確度

單一實驗室查核及添加樣品分析之精密度與準確度如表五。

十一、參考資料

- (一) M. Anastassiades; A.-K. Wachtler; D. I. Kolberg; E. Eichhorn; H. Marks; A. Benkenstein; S. Zechmann; D. Mack; C. Wildgrube; A. Barth; I. Sigalov; S. Görlich; D. Dörk; G. Cerchia. Quick Method for the Analysis of Highly Polar Pesticides in Food Involving Extraction with Acidified Methanol and LC- or IC-MS/MS Measurement (QuPpe-Po-Method) – Version 12 EU Reference Laboratory for Residues of Pesticides Single Residue Methods (EURL – SRM), 2021.
- (二) Yusuke Suzuki; Tsuyoshi Kaneko; Koichi Saito. The internal standard diquat-d4 causes errors in diquat analysis by LC–MS/MS. *Forensic Toxicology*, 36: 458–466, 2018.
- (三) Chunyan Hao; Xiaoming Zhao; David Morse; Paul Yang; Vince Taguchi; Franca Morra. Optimized liquid chromatography tandem mass spectrometry approach for the determination of diquat and paraquat herbicides. *ELSEVIER. Journal of Chromatography A*, 1304: 169–176, 2013.

註 1：巴拉刈及二刈與玻璃表面的相互作用通常於非質子溶劑情況較明顯，例如：乙腈。若溶劑增加水含量或酸度通常會減少這種相互作用。這種相互作用導致的損失百分比通常在低濃度下較高。

註 2：去活化為玻璃瓶藉由矽烷化劑與玻璃表面的活性基團發生反應，最大程度消除了硼矽酸鹽玻璃表面上的活性部位，因此玻璃表面吸附電荷分析物較低，能防止分析物吸附於玻璃瓶表面上。

註 3：離心力×g 與離心機轉速之關係，如下列公式。

$$\text{離心力}(\times g) = 1.118 \times (\text{rpm})^2 \times R \times 10^{-5}$$

式中 rpm 為離心機每分鐘轉速、R 為離心機轉子半徑以公分(cm)表示。

- 註 4：標準品一般為含有鹵素（溴、氯）陰離子之鹽類，故稱取標準品後，需校正為實際巴拉刈、二刈的質量。以二溴二刈 (Diquat dibromide) 為例，其分子式為 $C_{12}H_{12}N_2 \cdot 2Br$ 之分子量為 344.05 g/mol。二刈重量(g)=二溴二刈鹽類稱取重量(g)*[184($C_{12}H_{12}N_2$ 分子量)/344.05($C_{12}H_{12}N_2 \cdot 2Br$ 分子量)]。
- 註 5：本文引用之所有公告方法名稱及編碼，以行政院環境保護署最新公告者為準。
- 註 6：在 LC/MS/MS 中如管柱材質種類、管柱的長度、內徑、層析的流速、移動相及添加劑的選擇，都可能影響分析效果及儀器感度。而電噴灑法游離效率又和待測物、溶劑及流速的關係密切，所以需考量移動相本身的電導率及介電常數，以減少離子抑制的情況，以達到 MS/MS 分析效率的最佳化。
- 註 7：若自行判斷水樣清澈，可以省略離心或過濾步驟，接續樣品前處理。
- 註 8：若水質樣品基質干擾不顯著，且可符合本方法品質管制規範，則固相萃取管匣組之 MAX 可移除不使用，餘樣品前處理程序不變。

表一 化合物中英文名稱及簡稱

中文名稱	英文名稱	CAS No.	簡稱
巴拉刈	Paraquat	4685-14-7	PQ
二刈	Diquat	2764-72-9	DQ

表二 建議對應之內標準品表

待測物名稱	內標準品
Paraquat	Paraquat-d ₈
Diquat	Diquat-d ₈

表三 前驅物／產物離子對質譜參數

待測物名稱	前驅物離子 (m/z)	產物離子 (m/z)	去簇電壓 DP (V)	碰撞能量 CE (V)
Paraquat	93	171	60	17
	93	77	60	31
Diquat	92	84.5	65	21
	92	157	65	17
Paraquat-d ₈	97	179	60	18
Diquat-d ₈	96	88.5	80	22

註：部分離子為雙電荷離子。質譜參數DP：Declustering potential及 CE：Collision energy，可依實際需要適當調整之。本方法使用儀器：液相層析儀 (Agilent 1290 Infinity II)；串聯式質譜儀 (SCIEX QTRAP 5500)。

表四 LC/MS/MS 前驅物／產物離子對之離子強度比率(Ion ratio)規範

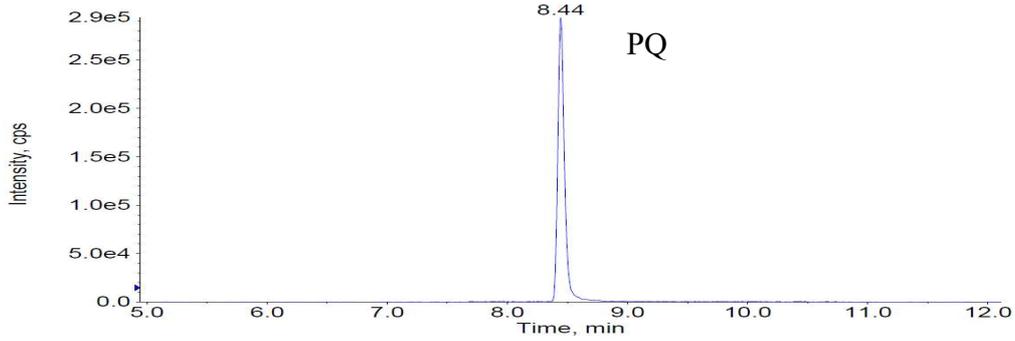
相對強度 (% of Base peak)	兩離子對比率的最大允許誤差(%)
>50	± 20
>20 to 50	± 25
>10 to 20	± 30
≤10	± 50

表五 單一實驗室查核及添加樣品分析之精密度與準確度

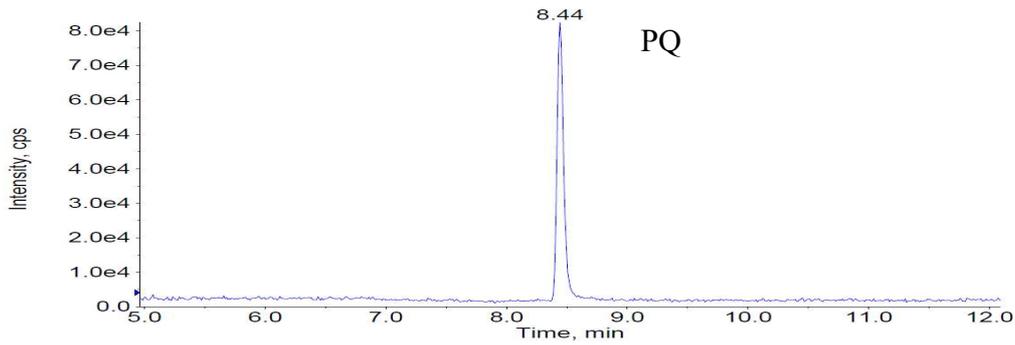
待測物名稱	查核樣品		添加樣品	
	平均 (n=6) 回收率(%)	標準偏差 (%)	平均 (n=9) 回收率(%)	標準偏差 (%)
Paraquat	97.2	6.3	101.6	2.3
Diquat	95.9	6.3	100.2	3.5

註：配製查核樣品與添加樣品濃度為 2 µg/L。內標準品濃度 10 µg/L。

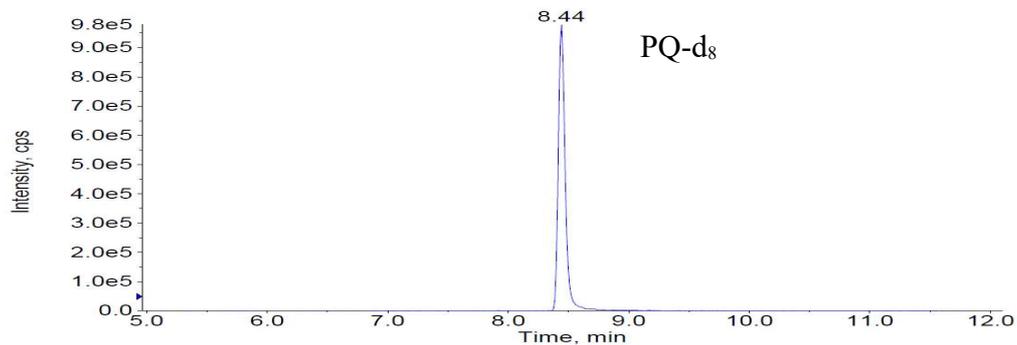
Paraquat 定量MRM：93→171



Paraquat 定性 MRM：93→77



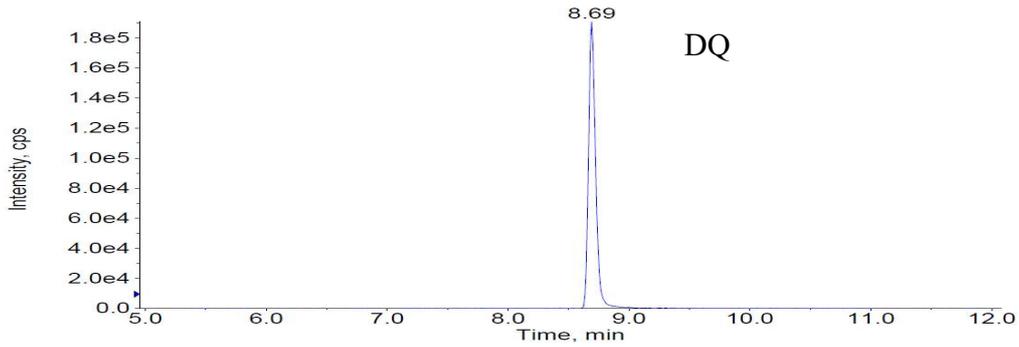
Paraquat-d₈ MRM：97→179



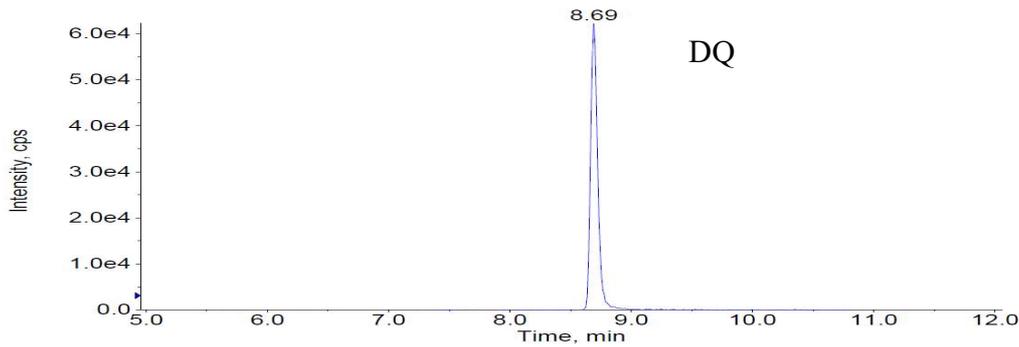
註：本層析圖使用Atlantis Premier BEH Z-HILIC管柱，2.5 μm（粒徑），2.1 mm（內徑）× 100 mm（長度），滯留時間(RT)供參考。

圖一、巴拉刈(Paraquat)及內標準品多重反應監測模式(MRM)前驅物／產物離子對之層析圖。

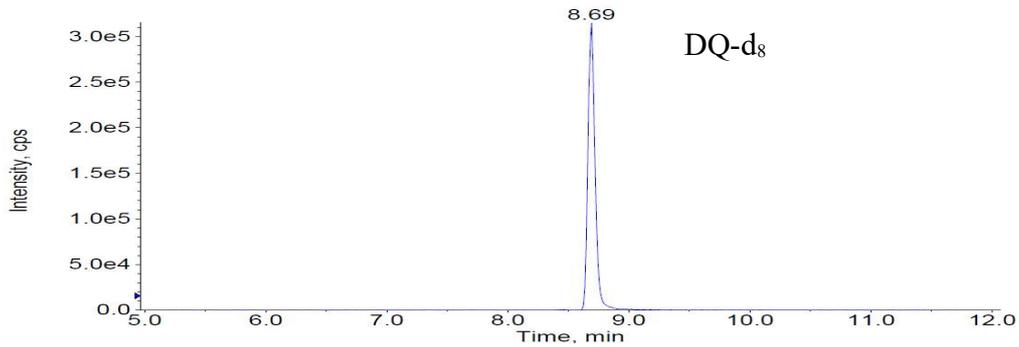
Diquat 定量 MRM : 92→84.5



Diquat 定性 MRM : 92→157



Diquat-d₈ MRM : 96→88.5



註：本層析圖使用Atlantis Premier BEH Z-HILIC管柱，2.5 μm（粒徑），2.1 mm（內徑）× 100 mm（長度），滯留時間(RT)供參考。

圖二、二刈(Diquat)及內標準品多重反應監測模式(MRM)前驅物／產物離子對之層析圖。