

新前處理技術－QuEChERS 之簡介

New Sample Preparation Method－QuEChERS

李仁傑、王培成、李茂榮

Ren-Jye Lee, Pei-Cheng Wang, Maw-Rong Lee

QuEChERS 為近年來所發展出新樣品前處理技術，利用液液微萃取以及固相吸附劑淨化兩個步驟完成萃取過程，可用於固態或液態樣品。若為固態樣品，則先將樣品粉碎達到均質的效果，再以乙腈進行液相液相微萃取，經由以吸附劑為無水硫酸鎂和一級二級胺之分散式固相萃取法達到淨化萃取之目的，最後進行儀器分析。整個過程主要以劇烈搖晃及離心等方式減少前處理所費時間，具有溶劑使用量少、價格便宜、所花費時間較短及操作簡單等優勢。目前已廣泛地應用於蔬果中多重農藥殘留之檢測，逐漸擴展至環境、食品以及生物分析等領域。本文將介紹其萃取過程，並介紹該技術於環境分析、食品安全以及生物樣品分析方面的應用。

QuEChERS, an acronym for Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe, is a new sample preparation method proposed in recent year. It can be used for solid and liquid samples analyses. After liquid extraction with acetonitrile, some of the extract was further purified by anhydrous $MgSO_4$ and primary secondary amine (PSA) sorbents. The cleanup solution was analyzed via proper instrument. This method was first applied in the analysis of multi-residue pesticides. It is also applied to extract trace analytes in environmental, food, and biological matrices. This paper will introduce the extraction procedure. The applications in the environmental analysis, food safety and biological analysis are also reviewed.

一、前言

分析技術開發的主要目的是提供一個分析方法或技術，解決各領域所面臨的問題⁽¹⁾。一個完整的分析方法通常包含採樣、樣品前處理、儀器檢測以及數據處理等部分，而樣品前處理是其中最耗時也是影響分析結果最重要的環節，欲完成樣品前處理步驟所花費的時間，通常佔整體分析時間的 60% 以上，由此可知其重要性⁽²⁾。而分離與鑑定為分析化學中兩大重要步驟，樣品前處理技術將直接影響這兩個步驟之成敗⁽³⁾。

對複雜基質中微量成分之檢測分析而言，首先須克服的問題是先去除或減少基質中複雜物種之干擾，將分析物從基質中分離出，方能得到可信度高的分析結果。另一方面，若能同時濃縮分析物，提高分析物濃度，方能鑑定出微量待測物種。目前常用檢測儀器之靈敏度難以達到 pg/mL (或是 pg/g) 甚至更低的濃度。對於含量極少但對人體傷害極大的微量毒性物質而言，單靠儀器直接分析而得到準確度高的分析結果實有困難，除了儀器靈敏度的考量外，基質干擾效應 (matrix effect) 也是重要影響因素之一。

另外，一般檢測儀器尤其是靈敏度高之儀器其價格十分昂貴，且維護不易，實非一般實驗室能負荷。因此，對於建立微量物種之分析方法而言，從樣品前處理技術改善以增進分析物種之檢測靈敏度與鑑定能力，實為一可行方法。

理想的樣品前處理技術應具有溶劑使用量少、操作簡便、價格便宜、萃取效率高、具選擇性、易和其他分析方法搭配及具廣泛應用性，並同時可進行分析物之萃取與濃縮且適合現場採樣及分析等特性⁽¹⁾，若同時能縮短樣品處理時間則更佳。目前常用的樣品前處理技術有液相液相萃取法 (liquid-liquid extraction, LLE)、固相萃取法 (solid-phase extraction, SPE)、超臨界流體萃取法 (supercritical fluid extraction, SFE)、固相微萃取法 (solid-phase microextraction, SPME)、液相微萃取法 (liquid-phase microextraction, LPME) 等，這些前處理方式多為萃取各種基質中有害之小分子化合物，雖各有其優缺點，大多仍無法完全達到樣品前處理之特性，因此前處理方法開發仍持續發展中。現今複雜基質所用的前處理方法大多採兩種以上傳統前處理方式連結而成的方式，或是結合微波 (microwave)、超音波 (ultrasonic) 或溶液加壓等額外儀器所提供的能量進行萃取之前處理方法，如此更能提高樣品前處理所欲達到快速分離和淨化及濃縮之目的。

一般前處理方法於複雜基質中微量成分之萃取時，如蔬果或是生化樣品，由於樣品本身複雜性高，常需使用多個步驟的處理方能得到良好的萃取效果，如此可能造成待測物於萃取過程中的損失，除偵測靈敏度變差外，也提高前處理時的成本；而多個步驟的處理方式較費時，也可能造成低準確性及低精密度的實驗結果，因此尋求一更理想的前處理方法實為刻不容緩的工作。本文將簡單介紹新的萃取方法—QuEChERS，為 Quick、Easy、Cheap、Effective、Rugged 和 Safe 等六個英文字組合而成，讀音為 "catchers"。此前處理方式具有快速、簡單、便宜及安全等優點，因此文中將先簡單介紹其來源及萃取過程，並介紹目前應用領域，以提供對此前處理技術有興趣者參考。

二、來源及萃取過程

QuEChERS 最早為 2002 年 6 月由美國農業部門 Anastassiades 等人於 European Pesticide Residues Workshop (EPRW) 會議中首先提出此前處理技術⁽⁴⁾。於 2003 年 Anastassiades 等人將此技術發表於 AOAC 期刊上，主要為解決蔬果中多重農藥殘留檢測的問題，並可同時檢測不同極性或種類之農藥⁽⁵⁾。由其發表之文章中可知，此萃取方式主要可分為三大步驟：(1) 將固體樣品均質，利用均質器將樣品細小化。(2) 乙腈進行液液微萃取 (liquid-liquid microextraction)。採用此溶劑的原因為其易藉由鹽析效應與水分離⁽⁵⁾。而此處所謂的液液微萃取主要是因為樣品均質化後樣品顆粒變為細小，如此與溶劑之間的接觸表面積變大，藉此提高萃取效率。(3) 淨化乙腈溶液中之共萃物 (co-extracted matrix)。主要將乙腈萃取液加入含有硫酸鎂 (MgSO₄) 及一級二級胺 (primary secondary amine, PSA) 等固相吸附劑之離心試管中，藉由手上下搖晃或是劇烈混合器 (vortex mixer) 搖晃等方式，利用吸附劑除去雜質，並給予一名稱為分散式固相萃取法 (dispersive solid-phase extraction, DSPE)。由其萃取過程中可知，此萃取過程為液液微萃取法加上固相萃取法之淨化所結合而成的新萃取方式，並藉由搖晃及離心等簡單的實驗手法達到萃取之目的。其前處理之萃取方法及流程圖則如圖 1 及圖 2 所示。

2005 年 Lehotay 等人針對 QuEChERS 技術提出改善方法。其使用的方式為加入 1% 醋酸於乙腈中，並加入無水醋酸鈉取代氯化鈉進行液液萃取步驟，以醋酸緩衝溶液控制整體萃取環境之 pH 值，如此更能改善食品中特定農藥萃取回收率效果不佳的問題⁽⁶⁾，更擴展其應用於複雜基質中不同種類多重農藥殘留之檢測。2007 年美國分析化學家協會 (Association of Analytical Communities, AOAC) 公告以此前處理技術結合氣相層析質譜儀、液相層析串聯質譜儀於食品中多重農藥殘留檢測之依據⁽⁷⁾。Anastassiades 等人改良 QuEChERS 技術，於原乙腈萃取溶液中加入檸檬酸緩衝鹽類控制 pH 值，使其能處理更複雜的基質樣品⁽⁸⁾。此

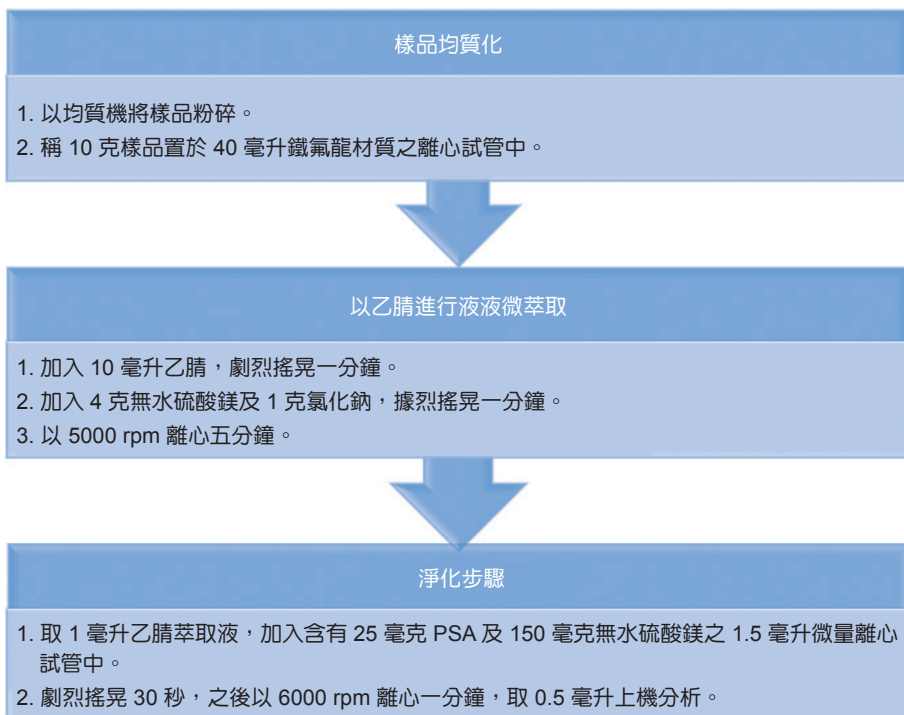


圖 1. 一般 QuEChERS 萃取方法。

方式受到歐洲標準化委員會 (European Committee for Standardization, CEN) 採用，於 2007 年公告以 QuEChERS 前處理技術應用於植物來源食品中多重農藥殘留檢測方法規範：EN 15662⁽⁹⁾。目前此前處理技術已經成為農產品中多重農藥殘留檢測之重要方法。

三、以共萃物評估基質干擾的影響

由 QuEChERS 前處理步驟中可知此前處理方式主要為液液萃取法與固相萃取法結合而成的前處理方法。Anastassiades 等人曾以共萃物萃取量評估萃取溶劑與吸附劑淨化效果的影響⁽⁵⁾。而共萃物萃取量是以重量分析法方式進行評估。經液液萃取之

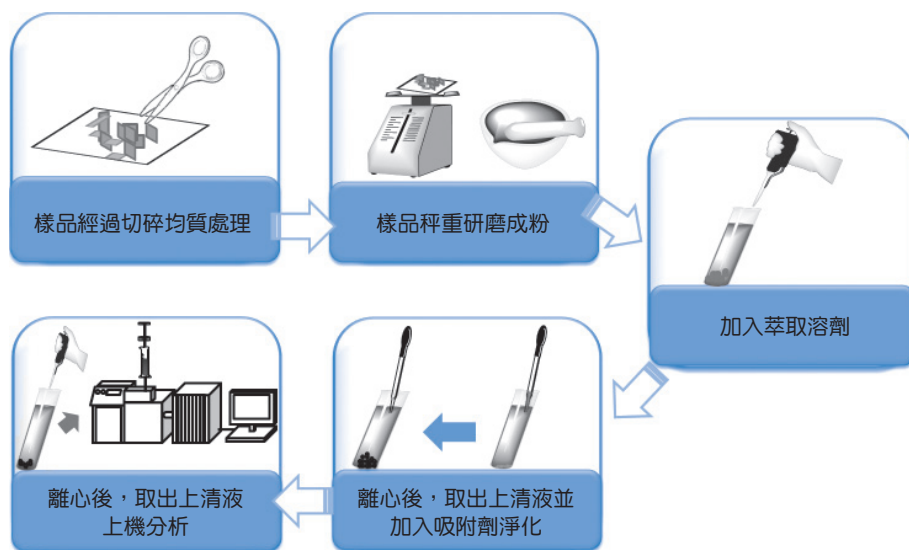


圖 2. QuEChERS 前處理方法之流程圖。

萃取液置於已稱重之試管中，將溶劑吹乾後稱量於試管中殘留物之總重量，扣除試管重量後可得共萃物之萃取量^(5, 10)。

經比較常用於萃取蔬果中殘留農藥的溶劑：乙酸乙酯 (ethyl acetate, EtAc)、乙腈 (acetonitrile, MeCN)、丙酮 (acetone) 以及乙腈與丙酮 (1:1) 之混合溶液，未經淨化前經乙酸乙酯萃取後所得到的共萃物最少，其結果如圖 3 中實心長條圖所示。然而經過一級二級胺淨化後，實驗結果顯示乙腈萃取液中之共萃物重量最少，如圖 3 中空心長條圖所示。若進一步經氣相層析質譜儀分析後顯示乙腈萃取液中得到之層析峰訊號由 130 個減少為 101 個，而乙酸乙酯萃取液則由 150 個減少至 128 個。因此使用乙腈乃為最佳之萃取溶劑，而此萃取溶劑也十分適合以液相層析質譜儀進行分析。

至於吸附劑移除乙腈萃取液中共萃物的比例所使用吸附劑種類有含 cyanide (CN) 官能基、polymer、C18 (octadecylsilyl, ODS)、強陰離子交換 (strong anion exchange, SAX)、活性炭 (graphite carbon black, GCB)、氧化鋁 N (alumina neutral)、含 NH₂ 官能基、一級二級胺及一級二級胺與活性炭 1:1 混合等材質。在比較蔬果混合樣品、三種動物如小牛、豬及雞之肝臟混合樣品和油脂較多之碎牛肉等三種基質，後五種材質所移除之共萃物重量最多，其移除量範圍為 30% 至 80% 之間。其中一級二級胺與活性炭 1:1 混合材質移除之共萃物最多，移除比例約為 80%，一級二級胺和含 NH₂ 官能基等材質之吸附劑則次之。

四、與固相萃取法之比較

QuEChERS 步驟中之分散性固相萃取法主要目的為淨化，換句話說即是吸附存在於溶液之中的雜質，其所用之固相吸附劑和固相萃取法所使用固相吸附劑相同。目前以 QuEChERS 商業化產品中常見的固相吸附劑有 C18、活性炭以及一級二級胺等三種，其中 C18 為常見逆相 (reverse phase) 材質之固相吸附劑，活性炭則以吸附機制為主之固相吸附劑，而一級二級胺則為弱陰離子交換 (weak anion exchange, WAX) 材質之固相吸附劑。

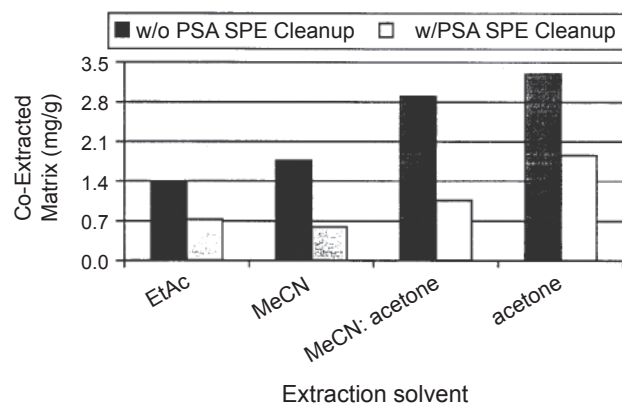


圖 3. 比較不同萃取液萃取多種蔬果混合之樣品，不經 (w/o) 一級二級胺吸附劑淨化以及經淨化 (w/) 後所得之共萃物重量 (mg/g)⁽⁵⁾。

傳統固相萃取法所使用的萃取方式為將液體流過固相吸附劑，藉由固相吸附待測物或雜質等兩種方式而達到萃取之目的，一般常見的固相萃取法多為前者。此種萃取方式因需保持液體流速在低流速狀態下，一般為小於 1 mL/min 方能有較佳的萃取效果，如此造成分析時間變長。後者雖較少使用，若採取吸附雜質而使待測物流過固相的萃取方式，因其液體流速可較快，所花費之萃取時間可相對縮短。

分散式固相萃取法則將固相吸附劑藉由劇烈搖晃方式使其分散於整個萃取液中，若所選取之固相吸附劑並不吸附待測物，此過程將以吸附雜質為主，如此便能大幅提高儀器分析時之訊號雜訊比 (signal-to-noise ratio, S/N)，降低雜質對待測物之影響，也可減少樣品前處理時間。Stubbings 及 Bigwood 曾比較固相萃取管柱與分散式固相萃取法淨化結果的差異，最後仍採用分散式固相萃取法作為淨化方法⁽¹¹⁾。而 Wilkowska 及 Biziuk 對於傳統固相萃取法與分散式固相萃取法進行比較，認為分散式固相萃取法之優點較多，唯一缺點為僅能進行淨化⁽¹²⁾。

分散式固相萃取法與基質固相萃取法 (matrix solid-phase dispersion, MSPD) 相似⁽¹⁰⁾。基質固相萃取法主要將固相吸附劑添加於固體基質中一起研磨，將所有物質一起倒入固相萃取管中，再以沖提液沖提出待測物的萃取方式。與傳統固相萃取法相

比，基質固相萃取法可省去活化 (condition) 管柱的步驟，而樣品充填 (sample loading) 方式也與傳統固相萃取法不同。為達到良好的分散效果，基質固相萃取法所使用固相吸附劑重量通常為五百毫克以上，甚至與傳統固相萃取法之固相吸附劑重量相同。而分散式固相萃取法所用之固相吸附劑其重量通常低於五十毫克，由此可知分散式固相萃取法之花費較為便宜。另一個優點為分散式固相萃取法主要去除萃取液中之不純物，其固相分散效果較佳，較能得到好的實驗結果。

至於 C18、活性碳及一級二級胺等三種材質使用於淨化時機，若萃取液較為澄清則使用一級二級胺為主要淨化材質，可移除不同種類的糖 (sugars)，但此材質會吸附含酸基 (COOH) 化合物^(13, 14)；若含有較高比例的油脂可考慮添加 C18 材質去除油脂；若萃取液有顏色的話可考慮添加少量活性碳以達到最佳淨化效果，須注意的是使用活性碳也因吸附含苯環結構的化合物而造成回收率降低。實際上該如何使用吸附劑仍須以實驗結果為主要判斷依據，以上介紹僅提供參考。

五、應用

目前 QuEChERS 前處理技術大多結合氣相、液相層析質譜／串聯質譜技儀進行檢測，主要是利用質譜術之高靈敏及高選擇之特性，能夠提供良好的分析結果以及代測物之定性分析。由於具有操作簡單、快速等優點，逐漸受到重視，因此本文將以此技術應用於生化、環境、食品分析等方面作一簡單介紹。

1. 生化分析

QuEChERS 前處理技術目前已有應用於生物組織樣品的實例。其中 Fagerquist 等人以 80% 乙腈水溶液搭配 C18 吸附劑成功地萃取 30 件牛腎臟組織中盤尼西林 G 和盤尼西林 V 等 10 種 β -lactam 抗生素，其中 9 種化合物回收率超過 70%，偵測能力可低於偵測容許值 10 ng/g 以下⁽¹⁵⁾。Plossl 等人以純乙腈溶劑萃取後搭配 PSA、NH₂ 以及 PPL 三種吸附劑淨化方式應用於豬全血中 40 種醫用藥

物之分析，回收率範圍為 87.1% 到 103.7% 之間，偵測極限範圍為 5.6 至 17.2 ng/mL⁽¹⁶⁾。Stubbings 等人也以此方法應用於雞肉中 41 種動物用藥殘留偵測。所得 41 種動物用藥分析結果之偵測極限 CC α 為 0.27–444 μ g/g，並符合歐盟 2002/657/EC 規範的要求⁽¹⁷⁾。由此可知此前處理方式已成功地應用於生物樣品分析。

2. 環境分析

農藥經噴灑後常殘留於土壤或水樣之中造成環境汙染，對於此一問題之前處理及微量分析方法之開發乃一重要課題。目前已有多篇文獻將 QuEChERS 前處理技術應用於環境水樣與土壤中有機磷、有機氯等農藥分析。Martin 等人利用 QuEChERS 技術結合快速升溫之氣相層析儀搭配微量電子捕捉偵測器 (μ -ECD) 分析土壤樣品中四種三鹵甲烷類化合物，回收率在 65 至 94% 之間，偵測極限範圍為 6 至 659 ng/kg，並分析經確認濃度之土壤標準參考物質後可得到良好的分析結果，也成功地應用於真實樣品中⁽¹⁸⁾。Padilla-Sanchez 等人利用 QuEChERS 技術結合氣相層析串聯質譜儀分析農用土壤樣品中氯酚類 (chlorophenols)、烷基酚類 (alkylphenols)、硝基酚類 (nitrophenols) 及甲基酚類 (cresols) 等四類化合物，並與加壓溶液萃取法、超音波振盪萃取法及索氏萃取法進行比較，其中以 QuEChERS 能萃取出所有待測物，其回收率均在 84% 以上，為四種萃取法中最佳萃取方法；另添加 10 μ g/kg 濃度於土壤中，其回收率在 69%–103% 之間，偵測極限範圍為 0.1–50 μ g/kg，並成功地應用此方法於 15 種真實土壤樣品中，偵測到微量 2,4,6-三氯酚及 4-tert-辛烷酚 (octylphenol, OP)，而分析所得之層析圖如圖 4 所示⁽¹⁹⁾。

3. 食品分析

食品為人類生活中不可或缺之能量來源。近年來三聚氰胺添加於奶粉中及今年所發生的塑化劑添加於食品中等事件所造成的恐慌，使得食品安全越來越受到重視。目前此方法除已應用於蔬果中農藥殘留檢測外，另有越來越多文獻針對此技術應用於

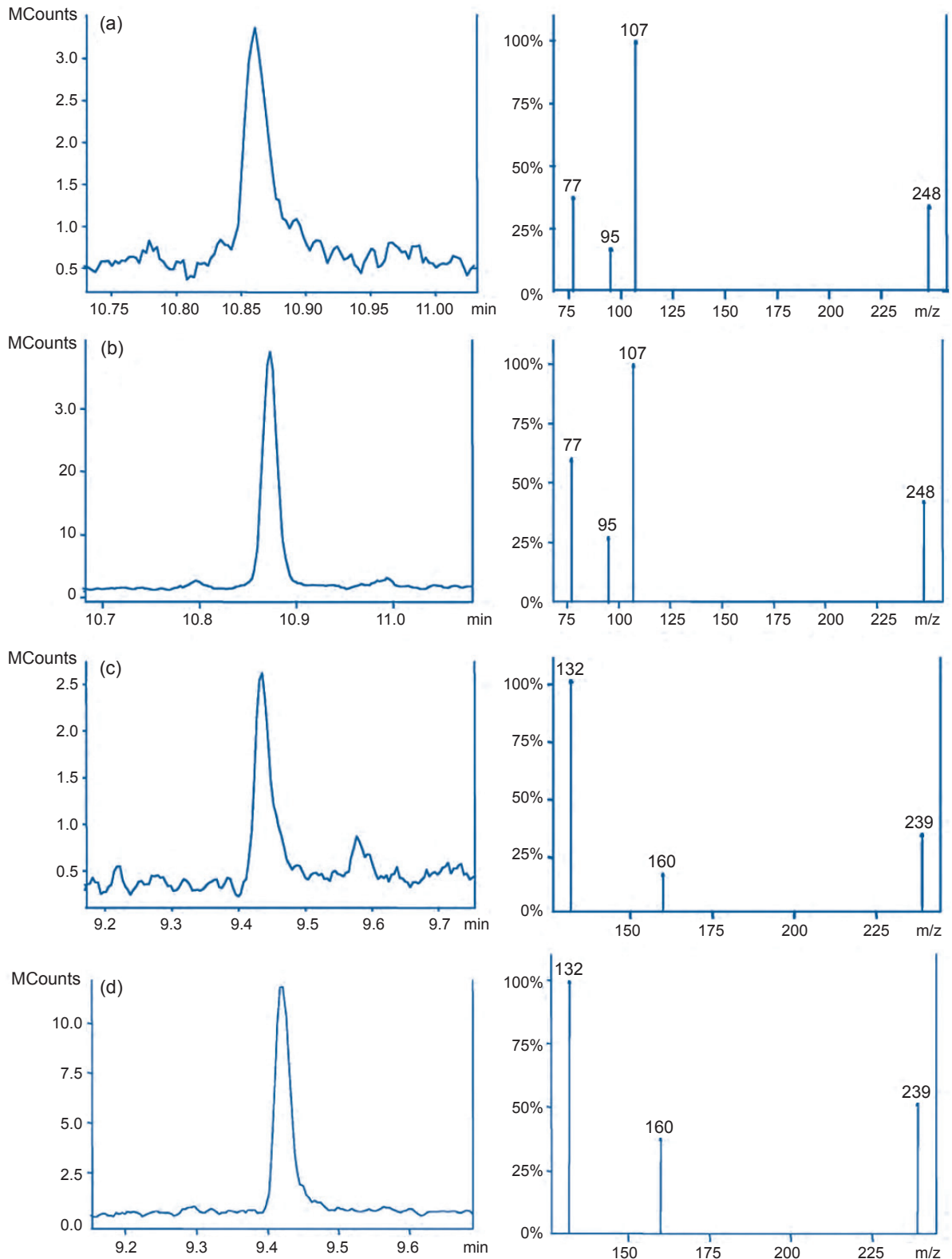


圖 4. 經 QuEChERS 萃取後以氣相層析串聯質譜儀分析所得之層析圖及相對之子代離子質譜圖⁽¹⁹⁾。(a) 真實土壤樣品中 4-tert-辛烷酚之訊號，(b) 添加 20 $\mu\text{g/L}$ 4-tert-辛烷酚標準品於空白土壤，(c) 真實土壤樣品中 2,4,6-三氯酚之訊號，(d) 添加 20 $\mu\text{g/L}$ 2,4,6-三氯酚標準品於空白土壤。

其他食品或農產品中各種添加物或農藥殘留等進行分析。Dagnac 等人於生牛乳中開發 QuEChERS 技術結合液相層析串聯質譜儀針對多重農藥殘留進行分析。以石墨碳 (graphitized non-porous carbon) 與 C18 作為吸附劑進行淨化步驟，46 種農藥之偵測極限範圍為 6.4 至 360 ng/L 之間，且可有效地降低離子抑制效應⁽²⁰⁾。Koesukwiwat 等人也針對米類食品中苯氧醋酸 (phenoxy acid) 類殘留藥物進行分析。並運用 C18 與氧化鋁 N 作為淨化吸附劑，有效淨化基質中雜質，其偵測極限範圍為 0.0005 – 0.01 mg/kg⁽²¹⁾。

六、未來展望

由於具有簡單、便宜、快速、花費低廉等優點，QuEChERS 前處理技術已逐漸受到重視。除了應用於蔬果中多重農藥殘留之檢測外，尚可應用在食品中殘留農藥之檢測、水和土壤中農藥殘留之檢測及動物組織中抗生素及動物用藥之檢測等。對於未來的展望，於生物基質樣品方面，由於所能取得的樣品量較少，可先藉由乙腈溶劑稀釋後再淨化方式檢測其所含之毒性物質、代謝物或分解產物之結構鑑定。近來液相層析質譜術的蓬勃發展，其中電灑游離法 (electrospray, ESI) 常被用來當作分析大分子或極性小分子化合物之游離化方法，而大氣質譜術 (ambient mass spectrometry) 也常搭配電灑游離法進行快速分析。但電灑游離法易受基質效應 (matrix effect) 干擾而造成分析困難⁽²²⁾。此前處理技術之淨化效果可減少電灑法之基質干擾問題外，也可搭配大氣質譜術建立準確性高及快速的分析方法^(14, 23)。另藉由自動化方式，使前處理技術與儀器分析一氣呵成，可節省更多的人力。未來更可尋求適當的固相材質如奈米材質以去除溶液中更多的雜質，提高分析結果之可信度。

參考文獻

1. 李茂榮, 陳崇宇, 李祖光, *The Chinese Chem. Soc.*, **63**, 329 (2005).
2. J. S. Fritz, *Analytical Solid-phase extraction*, John Wiley & Sons Inc. (1999).
3. 黃寶慧, 李茂榮, *The Chinese Chem. Soc.*, **56**, 319 (1998).
4. M. Anastassiades, S. J. Lehotay, and D. Stajnbaher, *European*

Pesticide Residues Workshop, EPRW Rom (2002).

5. M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Stajnbaher, and F. J. Schenck, *J. AOAC intl.*, **86**, 412 (2003).
6. S. J. Lehotay, K. Maštovská, and A. R. Lightfield, *J. AOAC intl.*, **88**, 615 (2005).
7. AOAC Official Method 2007.01, Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate.
8. P. Payá, M. Anastassiades, D. Mack, I. Sigalova, B. Tasdelen, J. Oliva, and A. Barba, *Anal. Bioanal. Chem.*, **389**, 1697 (2007).
9. EN 15662 Version 2007-10-24, Foods of Plant Origin-Determination of Pesticide Residues Using GC-MS and/or LC-MS/MS Following Acetonitrile Extraction/Partitioning and Clean-up by Dispersive SPE - QuEChERS method.
10. A. Posyniak, J. Zmudzki, and K. Mitrowska, *J. Chromatogr. A*, **1087**, 259 (2005).
11. G. Stubbings and T. Bigwood, *Anal. Chim. Acta*, **637**, 68 (2009).
12. A. Wilkowska and M. Biziuk, *Food Chem.*, **125**, 803 (2011).
13. X. Z. Dong, L. X. Zhao, G. S. Guo, and J. M. Lin, *Anal. Letters*, **42**, 29 (2009).
14. C. Díeza, W. A. Traag, P. Zommer, P. Marinero, and J. Atienza, *J. Chromatogr. A*, **1131**, 11 (2006).
15. C. K. Fagerquist, A. R. Lightfield, and S. J. Lehotay, *Anal. Chem.*, **77**, 1473 (2005).
16. F. Plössl, M. Giera, and F. Bracher, *J. Chromatogr. A*, **1135**, 19 (2006).
17. G. Stubbings and T. Bigwood, *Anal. Chim. Acta*, **637**, 68 (2009).
18. S. H. Martin, C. G. Pinto, J. L. P. Pavón, and B. M. Cordero, *J. Chromatogr. A*, **1217**, 4883 (2010).
19. J. A. Padilla-Sanchez, P. P. Bolaños, R. R. Gonzalez, A. G. Frenich, and J. L. M. Vidal, *J. Chromatogr. A*, **1217**, 5724 (2010).
20. T. Dagnac, M. G. Chao, P. Pulleiro, C. G. Jares, and M. Llompert, *J. Chromatogr. A*, **1216**, 3702 (2009).
21. U. Koesukwiwat, K. Sanguankaew, and N. Leepipatpiboon, *Anal. Chim. Acta*, **626**, 10 (2008).
22. B. K. Matuszewski, M. L. Constanzer, and C. M. Chavez-Eng, *Anal. Chem.*, **75**, 3019 (2003).
23. J. S. Wiley, J. F. García-Reyes, J. D. Harper, N. A. Charipar, Z. Ouyang, and R. G. Cooks, *Analyst*, **135**, 971 (2010).



李仁傑先生為國立中興大學分析化學博士，現任國立中興大學貴重儀器中心之博士後研究員。

Ren-Jye Lee received his Ph.D. in analytical chemistry from National Chung Hsing University. He is currently a postdoctoral fellow in the Department of Chemistry at National Chung Hsing University.



王培成先生現為國立中興大學分析化學博士班學生。

Pei-Cheng Wang is a Ph.D. student in the Department of Chemistry at National Chung Hsing University.



李茂榮先生為美國佛羅里達大學分析化學碩士，現任國立中興大學化學系特聘教授兼環安中心主任。

Maw-Rong Lee received his M.S. in analytical chemistry from the University of Florida, USA. He is currently a distinguished professor in the Department of Chemistry and director of the Center for Environmental Protection & Occupational Safety and Health at National Chung Hsing University.