

PHÁT TRIỂN PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH TRỰC TIẾP PARAQUAT, DIQUAT VÀ CHLORMEQUAT TRONG ĐẤT BẰNG PHƯƠNG PHÁP UPLC-MS/MS

Đến tòa soạn 22-03-2021

Trần Lâm Thanh Thiện

Viện Hoá học, Viện Hàn lâm Khoa học & Công nghệ Việt Nam, Hà Nội

Viện Cơ học và Tin học ứng dụng, Viện Hàn lâm Khoa học & Công nghệ Việt Nam, Hồ Chí Minh

Lê Trường Giang, Đào Hải Yến

Viện Hoá học, Viện Hàn lâm Khoa học & Công nghệ Việt Nam, Hà Nội

SUMMARY

METHOD DEVELOPMENT FOR DIRECT DETERMINATION OF PARAQUAT, DIQUAT AND CHLORMEQUAT IN SOIL BY UPLC-MS/MS

In Vietnam, paraquat is one of the most popular herbicides intensively used in agriculture. However, in recent years, this compound has been prohibited in agricultural cultivation because of indiscriminate uses and negative effects on the environment and human health. Direct analysis of paraquat, diquat and chlormequat in environmental samples including arable land meets with difficulties because these substances have simple structures, high polarity and ability to form complexes with anions existing in sample matrix. In this study, we have developed a method to directly determine paraquat, diquat and chlormequat with the help of UPLC-MS/MS system coupled with a suitable sample preparation process. The method had wide linear range ($R^2 > 0.995$), high sensitivity (limits of detection from 0.30 $\mu\text{g/kg}$ to 0.50 $\mu\text{g/kg}$ and limits of quantification from 1.0 $\mu\text{g/kg}$ to 2.0 $\mu\text{g/kg}$), recoveries ranged from 96.5% to 109.4%, The highest RSD_r and RSD_{wr} were 6.9% and 10.9% ($< 25\%$), respectively. The study has successfully fabricated the method to directly analyze paraquat, diquat and chlormequat in arable land.

Keyword(s): paraquat, diquat, chlormequat, soil, UPLC-MS/MS.

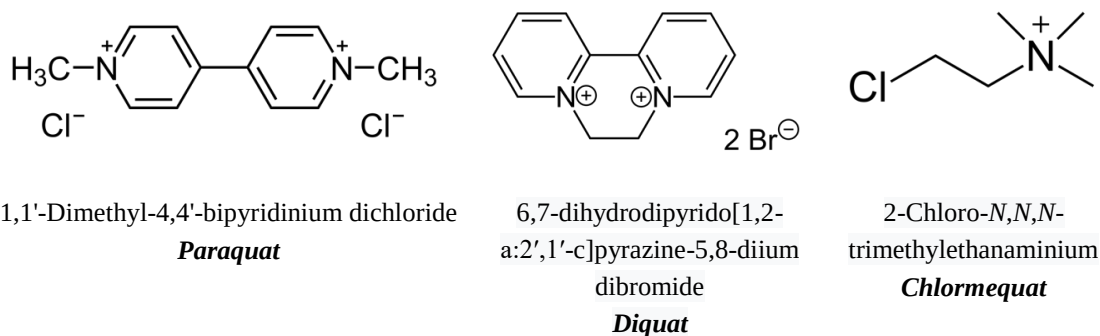
1. ĐẶT VẤN ĐỀ, GIỚI THIỆU

Paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium ion) là hoá chất có khả năng diệt cỏ không chọn lọc thuộc nhóm bipyridinium, được sử dụng rộng rãi nhất trong nông nghiệp do hoạt tính diệt cỏ mạnh mẽ, nhanh chóng, giết chết mô tươi của cỏ khi vừa tiếp xúc, có những đặc tính vật lý nổi bật như dễ tan trong nước, khả năng liên kết cao với một số anion trong môi trường đất.[1] Cơ chế diệt cỏ của paraquat dựa trên tác động trực tiếp đến hệ thống màng quang hợp (hệ thống quang I) nơi tạo ra các electron tự do để thúc đẩy quá trình quang hợp. Những electron này sẽ phản ứng với ion paraquat để

tạo ra gốc oxy tự do tạo thành superoxit Chính những superoxit này sẽ tấn công màng acid béo không bão hòa, gây phá hủy màng tế bào và mô thực vật.[2] Với cơ chế diệt cỏ tương tự như paraquat nhưng tác động đến nhiều vị trí hơn trên tế bào thực vật, diquat và chlormequat (1,1'-ethylene-2,2'- bipyridinium ion, 2-chloroethyltrimethylammonium) cũng là những thuốc diệt cỏ không chọn lọc thuộc nhóm bipyridinium được sử dụng rộng rãi bởi khả năng kiểm soát cỏ dại hiệu quả. Ngoài tác dụng diệt cỏ, khi được sử dụng ở nồng độ thấp diquat còn đóng vai trò như một chất điều hòa sinh trưởng của thực vật.[3-5]

Bên cạnh đó, việc sử dụng không kiểm soát các hoá chất diệt cỏ này gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến môi trường. Do cấu trúc đơn giản, khả năng phân cực cao nên khi phân tán vào môi trường, các hợp chất này dễ dàng di chuyển theo dòng nước cũng như thấm xuống tầng nước ngầm, gây hại nghiêm trọng đến sức khoẻ con người. Đa phần những hóa chất bảo vệ thực vật thường được xác định bằng phương pháp sắc ký khí (GC) hoặc sắc ký lỏng (HPLC) ghép nối với một đầu dò thích hợp.[6] Trong khi paraquat và diquat có thể được xác định bằng phương pháp LC kết nối với đầu dò UV,

PDA và MS thì chlormequat chỉ có thể xác định bằng phương pháp LC-MS do khả năng hấp thụ quang của hợp chất rất yếu.[7-9] Bên cạnh đó, do đặc điểm cấu trúc phân tử đơn giản, ít nhóm chức cùng với độ phân cực cao nên việc xác định trực tiếp các hợp chất này còn gặp nhiều khó khăn. Từ đó, các chất có khả năng ghép cặp với các hợp chất trên như heptafluorobutyric acid (HFBA), pentafluoropropionic acid (PFPA), trifluoroacetic acid (TFA)) được sử dụng để tăng khả năng lưu giữ các hợp chất này trên pha đảo C18.[10]



Hình 1. Công thức cấu tạo của các hợp chất phân tích

Tuy nhiên, phương pháp này gặp hạn chế như gây nhiễu bản hệ thống LC-MS, làm thay đổi độ chọn lọc của cột, gây ra hiện tượng “gia tăng đường nền” khi sử dụng trong thời gian dài và gây ra hiện tượng “nén ion”, dẫn đến độ nhạy thấp khi ghép nối với đầu dò MS.[11, 12] Do đó, các phương pháp xác định trực tiếp có khuynh hướng được sử dụng rộng rãi để định lượng paraquat, diquat và chlormequat trong các nền mẫu phức tạp. Đối với phương pháp xác định trực tiếp, sắc ký ưa nước là lựa chọn hàng đầu để phân tích các hợp chất phân cực, đặc biệt là cột Obelisc R được chọn chủ yếu để định lượng các chất cation.[13] Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu đã cho thấy rằng phân tích các hợp chất cation trên cột Obelisc R gặp các vấn đề như độ không ổn định của thời gian lưu, bất ổn về hình dạng của đỉnh sắc ký và độ tái lặp kém sau nhiều lần sử dụng.

Quá trình xử lý mẫu đóng vai trò quan trọng đối với kết quả phân tích. Hiện nay, đa số việc phân tích paraquat, diquat và chlormequat trong mẫu đất dựa vào quy trình tiêu chuẩn của EU.[13, 14] Tuy nhiên, các nghiên cứu cũng đã chứng minh được nền mẫu ảnh hưởng nghiêm

trọng đến kết quả phân tích của các hợp chất quaraquat, diquat và các nghiên cứu trên đều phải sử dụng đường chuẩn của nền mẫu và nội chuẩn để tính toán nhằm hiệu chỉnh những sai lệch gây ra từ nền mẫu.

Mục đích của nghiên cứu này chính là xây dựng phương pháp xác định trực tiếp paraquat, diquat, chlormequat có trong mẫu đất. Bằng việc sử dụng phương pháp chiết phân cực (Quick Polar Pesticides method – QuPPE) để ly trích chất phân tích ra khỏi nền mẫu kết hợp với vật liệu hấp phụ thích hợp để giảm thiểu ảnh hưởng của nền mẫu, dịch chiết sau khi xử lý được tiến hành phân tích sắc ký lỏng dựa trên cột sắc ký lỏng siêu hiệu năng cao CORTECS (1.6 µm, 100 x 2.1 mm) ghép nối đầu dò khối phổ. Bằng việc kết hợp của phương pháp QuPPE và UPLC, nghiên cứu đã xây dựng thành công quy trình phân tích trực tiếp paraquat, diquat và chlormequat trong mẫu đất theo tiêu chuẩn châu Âu SANTE/11813/2017 và SANCO/825/00.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thiết bị và hóa chất

Các chất chuẩn paraquat, diquat và chlormequat (độ tinh khiết $\geq 98\%$) được cung cấp bởi Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Mỹ). Các chất chuẩn được hòa tan trong dung môi methanol có hàm lượng 1000 mg/L và trữ trong lọ tối màu ở 4°C. Acetonitrile, methanol, formic acid, ammonium formate được cung cấp bởi hãng Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Đức). Các vật liệu chiết pha rắn như C18, PSA được cung cấp bởi hãng Agilent (Santa Clara, CA, Mỹ). Cột sắc kí CORTECS (1.6 μm , 100 x 2.1 mm) được sử dụng để phân tách các hợp chất phân tích được cung cấp bởi Waters (Milford, MA, Mỹ).

Trong nghiên cứu này, hệ thống UPLC được sử dụng bao gồm hệ thống bơm cao áp Ultimate 3000 UHPLC ghép nối với đầu dò khối phổ ba tứ cực Quantis (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Mỹ). Đầu dò khối phổ được hiệu chỉnh bằng dung dịch chuẩn Pierce LTQ Velos ESI Positive Ion được cung cấp bởi Thermo Fisher.

2.2. Thực nghiệm

2.2.1. Điều kiện khối phổ:

Tín hiệu được ghi nhận ở chế độ ion dương, với các thông số khối phổ như tốc độ dòng khí phun: 30 L/h, khí hỗ trợ: 15 L/h, điện thế phun: 1.6 kV, nhiệt độ ống mao quản: 300°C, tần số hiệu chỉnh ion: 50.0 V, nhiệt độ hóa hơi dung môi: 320°C. Chế độ bắn phá ion được sử dụng với tốc độ dòng khí Argon là 2 L/h. Thông số phân mảnh và thế bắn phá của các hợp chất được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Thông số bộ phân tích khối của đầu dò khối phổ

Tên hợp chất	Ion mẹ (m/z)	Ion con (m/z)	Thế bắn phá (V)	Ghi chú
Paraquat	186.3	170.9	19.6	Định lượng
	171.1	155.1	29.8	Định danh
Diquat	183.1	157.0	22.2	Định lượng
	183.1	167.9	28.9	Định danh
Chlormequat	122.1	58.1	25.2	Định lượng
	122.1	63.0	21.3	Định danh

2.2.2. Điều kiện sắc ký lỏng:

Về hệ thống UPLC, pha động bao gồm (A) dung môi acetonitrile và (B) dung dịch đệm ammonium formate/formic acid 100 mM (pH = 3.7). Chương trình dung môi được thiết lập như sau: Giữ 5% (B) trong 1 phút, sau đó tăng

đến 80% trong 1 phút, tiếp tục giữ tỉ lệ này trong 5 phút. Từ 80% (B) giảm xuống 5% (B) trong 1 phút và tiếp tục giữ nguyên tỉ lệ trong vòng 2 phút để chuẩn bị cho lần chạy tiếp theo. Thể tích tiêm là 10 μL và được đặt ở 8°C. Tốc độ dòng được sử dụng là 0.5 mL/phút.

2.2.3. Quy trình xử lý mẫu

Cân chính xác 2 g mẫu đất sau khi được đồng nhất mẫu được chuyển vào ống ly tâm nhựa 50 mL. Sau đó, thêm 10 mL hỗn hợp dung môi với tỉ lệ MeOH:H₂O = 1:1 (v/v) có chứa 1% formic acid và tiến hành trộn đều mẫu trong 10 giây bằng hệ thống vortex, tiếp tục rung siêu âm ở 40°C trong vòng 15 phút với tần số 50 Hz. Sau khi được rung siêu âm, mẫu được vortex trong 10 giây, được để yên trong tối để trở về nhiệt độ phòng và được ly tâm ở tốc độ 9000 vòng/phút. Khi ly tâm, 6 mL dịch chiết phía trên được chuyển vào ống ly tâm nhựa 15 mL có chứa sẵn 150 mg PSA và 150 mg C18, sau đó mẫu được vortex trong 30 giây và được ly tâm trong 3 phút ở tốc độ 9000 vòng/phút. Dịch chiết được lọc qua màng lọc nylon 0.22 μm và được tiến hành phân tích HPLC.

2.3. Thẩm định phương pháp

Việc thẩm định phương pháp phân tích được đánh giá thông qua các thông số như khoảng tuyến tính, độ chính xác, độ tái lập, độ lặp lại, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng. Hiệu suất thu hồi của các hợp chất dao động từ 70% đến 120%. LOQ được xác định bằng cách đo 12 mẫu lặp lại được thêm chuẩn với hàm lượng lần lượt là 1.0, 2.0 và 5.0 $\mu\text{g/kg}$ và được thực hiện 3 ngày liên tiếp với 4 mẫu lặp cho một ngày với độ lặp lại (RSD_r) và độ tái lập (RSD_{wr}) nhỏ hơn 20%. LOD có giá trị bằng $1/3 \times \text{LOQ}$. Việc tính toán hiệu suất thu hồi của hợp chất dựa trên đường chuẩn dung môi. RSD_r được xác định như là độ lặp lại của 4 mẫu phân tích trong một ngày, trong khi RSD_{wr} được xác định là độ tái lập của 12 mẫu trong 3 ngày.

2.4. Hiệu ứng nền mẫu (ME)

Việc đánh giá hiệu ứng của nền mẫu được tiến hành dựa trên phương pháp thêm chuẩn trên nền mẫu đất đã được xử lý sơ bộ. Các chất chuẩn phân tích được thêm vào nền mẫu và tiến hành xử lý theo mục 2.2. Hiệu ứng của nền mẫu được đánh giá dựa trên việc so sánh hệ số góc của đường chuẩn chất phân tích trong nền

mẫu sao với hệ số góc của đường chuẩn chất phân tích trong dung môi. Hiệu ứng nền mẫu (ME) được tính theo phương trình sau:

$$ME(\%) = \frac{B}{A} \times 100$$

Trong đó, A là hệ số góc của đường chuẩn chất phân tích được pha trong dung môi, B là hệ số góc của đường chuẩn chất phân tích được thêm vào nền mẫu.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả UPLC-MS/MS

Nồng độ đậm của dung môi pha động ảnh hưởng trực tiếp đến hình dạng pík sắc ký của các hợp chất phân cực khi phân tích bằng sắc ký ưa nước. Bốn nồng độ đậm được lựa chọn để nghiên cứu là 50, 100, 150 và 200 mM HCOONH₄/HCOOH để theo dõi sự thay đổi về thời gian lưu (RT) và hình dạng pík sắc ký bao gồm bề rộng đáy (W) và hệ số kéo đuôi (F_{tailing}). Việc sử dụng đậm trong dung môi giúp ổn định dạng tồn tại của hợp chất, giúp chất di chuyển tập trung trong quá trình phân tích sắc ký. Tuy nhiên, hàm lượng đậm quá cao dẫn đến hiện tượng tăng áp suất trên cột, làm giảm tuổi thọ cột sau một thời gian sử dụng. Do đó, việc lựa chọn nồng độ đậm cần được đảm bảo để giảm thiểu tác động tiêu cực là tối đa nhưng vẫn mang lại hiệu quả sắc ký là cao nhất.

Khi nồng độ đậm thay đổi thì thời gian lưu, bề rộng đáy cũng như hệ số kéo đuôi của chất phân tích cũng thay đổi theo xu hướng chung như sau: khi nồng độ đậm tăng thì thời gian

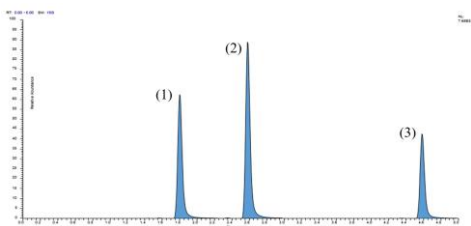
lưu tăng, bề rộng đáy và hệ số kéo đuôi giảm. Trong trường hợp của thời gian lưu, biến động lớn nhất thuộc về hai chất diquat và paraquat với sự tăng thời gian lưu từ nồng độ 50 mM đến 200 mM 0.5 phút, riêng với chlormequat sự tăng không đáng kể chỉ khoảng 0.2 phút. Sắc ký đồ của các hợp chất phân tích được trình bày trong hình 2.

3.2. Lựa chọn vật liệu chiết đa phân tán (d-SPE)

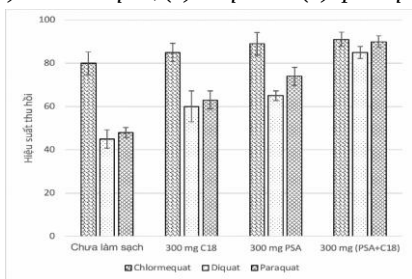
Có nhiều loại chất hấp phụ trong d-SPE được dùng để làm sạch nền mẫu như C18, PSA, GCB, Florisil, chitosan và graphene... Để có thể chọn ra chất hấp phụ phù hợp cần dựa vào nhiều yếu tố như đặc tính chất phân tích, thành phần nền mẫu, pH dung dịch,... bởi mỗi loại chất hấp phụ đều có những tính chất lý hóa khác nhau. Một chất hoặc hỗn hợp chất hấp phụ được xem là lý tưởng khi nó vừa có thể làm sạch nền một cách tốt nhất đồng thời không làm mất, tương tác hay thay đổi tính chất của chất phân tích. PSA là một chất trao đổi anion yếu dùng để loại bỏ acid béo, acid hữu cơ phân cực và ở một mức độ nào đó có thể loại đường, sắc tố còn C18 là một chất hấp phụ pha đảo, có khả năng giữ chất béo, lipid cũng như một số vitamin và khoáng chất. Từ những đặc tính trên có thể thấy hai loại chất hấp phụ này không có khả năng tương tác với chất phân tích và theo lý thuyết chúng tương đối thích hợp để loại một số tạp chất không mong muốn từ nền mẫu. Kết quả được thể hiện trong hình 3 và hình 4.

Bảng 2. Sự thay đổi RT, W và F_{tailing} của paraquat, diquat và chlormequat trong những nồng độ đậm pha động khác nhau

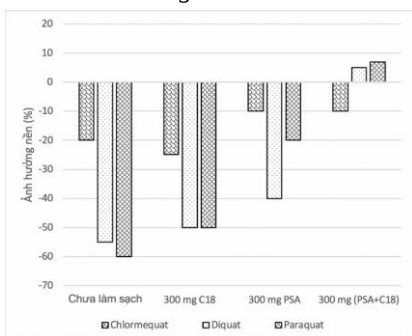
Nồng độ đậm (mM)	Thông số	Chlormequat	Diquat	Paraquat
50	T _R (phút)	1.81	2.60	4.60
	W (phút)	0.40	1.10	0.80
	F_{tailing}	1.62	5.50	5.66
100	T _R (phút)	1.81	2.60	4.60
	W (phút)	0.35	0.35	0.35
	F_{tailing}	1.17	1.15	1.75
150	T _R (phút)	2.17	2.83	4.85
	W (phút)	0.35	0.35	0.35
	F_{tailing}	1.17	1.50	1.75
200	T _R (phút)	2.15	3.01	5.00
	W (phút)	0.35	0.35	0.35
	F_{tailing}	1.17	1.50	1.40



Hình 2. Sắc kí đồ của các chất phân tích ở hàm lượng 50 µg/L
((1): chlormequat, (2): diquat và (3): paraquat)



Hình 3. Ảnh hưởng của vật liệu chiết tinh sạch đến hiệu suất thu hồi của các chất phân tích trong mẫu đất



Hình 4. Ảnh hưởng của nền mẫu đến hiệu suất thu hồi chất phân tích

Từ hình 3 và hình 4, có thể thấy được hiệu suất thu hồi của các hợp chất phân tích chịu ảnh hưởng trực tiếp của nền mẫu. Mẫu được chiết trực tiếp với dung môi không trải qua giai đoạn làm sạch dẫn đến hiệu suất thu hồi của chất phân tích thấp (paraquat và diquat lần lượt là 45% và 48%), đồng thời ảnh hưởng của nền mẫu đến kết quả phân tích là rất lớn (dao động từ 20% đến 60%). Tuy nhiên, hiệu suất thu hồi của các chất được cải thiện rõ rệt khi được tiến hành làm sạch dịch chiết. Khi sử dụng vật liệu C18, hiệu suất thu hồi của diquat và paraquat tăng từ 15 đến 20% so với trường hợp không được làm sạch và nền mẫu vẫn còn ảnh hưởng mạnh đến kết quả phân tích. Đối với PSA, hiệu suất thu hồi của các chất tăng rõ rệt, dao động từ 65% đến 74% đối với các chất phân tích. Tuy nhiên, nền mẫu vẫn còn ảnh hưởng mạnh đến hợp chất diquat (40%) và paraquat (20%). Khi tiến hành sử dụng đồng thời PSA và C18, hiệu suất thu hồi của các chất tăng đáng kể, dao động từ 85% đến 91% và hiệu ứng của nền mẫu đến kết quả phân tích cũng được giảm thiểu đáng kể. Do đó, trường hợp 300 mg (PSA+C18) được sử dụng làm vật liệu tinh sạch dịch chiết.

3.3. Thẩm định phương pháp

Các thí nghiệm để thẩm định phương pháp đã được thực hiện như đề cập ở mục 2.3 và kết quả được trình bày trong bảng 3 và bảng 4.

Bảng 3. Khoảng tuyến tính, hệ số tương quan, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), độ lặp lại (RSD_r) và độ tái lặp trong phòng thí nghiệm (RSD_{wr}) được đánh giá ở ba mức nồng độ khác nhau

Hợp chất	Khoảng tuyến tính (µg/L)	R ²	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	RSD _r (%)			RSD _{wr} (%)		
					1.0 µg/kg	2.0 µg/kg	5.0 µg/kg	1.0 µg/kg	2.0 µg/kg	5.0 µg/kg
Chlormequat	1 – 100	0.9991	0.30	1.0	6.2	3.7	3.8	11.3	14.1	9.2
Diquat	1 – 100	0.9979	0.50	2.0	5.3	4.0	3.1	23.1	11.0	8.3
Paraquat	1 – 100	0.9990	0.50	2.0	8.8	4.3	4.5	28.5	10.7	10.1

Bảng 4. Kết quả độ đúng cho 3 chất phân tích trong nền mẫu đất

Hàm lượng	5 µg/kg			50 µg/kg			100 µg/kg		
	H(%)	RSD _r (%)	RSD _{wr} (%)	H(%)	RSD _r (%)	RSD _{wr} (%)	H(%)	RSD _r (%)	RSD _{wr} (%)
Chlormequat	104.2	6.9	10.2	96.5	4.5	10.2	109.4	3.1	10.9
Diquat	99.4	4.9	6.4	106.2	3.1	7.1	98.7	3.2	9.3
Paraquat	104.4	6.0	3.6	99.4	2.2	6.7	96.9	3.8	7.1

Khoảng tuyến tính của các hợp chất phân tích được thiết lập với hàm lượng từ 1 µg/L – 100 µg/L, với các giá trị R^2 dao động từ 0.9979 – 0.9990 (bảng 3). LOD và LOQ của các hợp chất dao động lần lượt là 0.3 µg/kg đến 0.5 µg/kg và từ 1.0 µg/kg đến 2.0 µg/kg. Hiệu suất thu hồi của các chất paraquat, diquat và chlormequat dao động từ 96.5% đến 109.4%, RSD_r và RSD_{wr} cao nhất lần lượt là 6.9% và 10.9%. Tất cả các giá trị hiệu suất thu hồi, RSD_r và RSD_{wr} nằm trong giới hạn cho phép của các tiêu chuẩn trên thế giới. Từ các dữ liệu thu được đã chứng minh được rằng phương pháp được phát triển trong nghiên cứu này phù hợp để xác định các hóa chất diệt cỏ phân cực như paraquat, diquat và chlormequat trong mẫu đất.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã thành công trong việc phát triển phương pháp xác định trực tiếp paraquat, diquat và chlormequat trong mẫu đất bằng cách sử dụng sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép nối đầu dò khối phổ. Thông qua các nghiên cứu về tối ưu hóa nồng độ đệm cho pha động, vật liệu tĩnh sạch dịch chiết, phương pháp xây dựng trong nghiên cứu đạt được hiệu suất thu hồi cao, cũng như giảm thiểu đáng kể ảnh hưởng của nền mẫu đến kết quả phân tích. Giới hạn định lượng và giới hạn phát hiện của phương pháp lần lượt là 2.0 µg/kg và 0.5 µg/kg. Bằng việc sử dụng kết hợp C18 và PSA trong giai đoạn tinh sạch, hiệu suất thu hồi dao động từ 96.5% đến 109.4%, RSD_r và RSD_{wr} đều < 25%. Phương pháp phân tích này phù hợp để xác định hàm lượng của các hoá chất diệt cỏ trong đất. Thành công của nghiên cứu góp phần vào khả năng kiểm soát hóa chất bảo vệ thực vật phân cực trong đất, từ đó có cái nhìn tổng quát về tình trạng ô nhiễm hóa chất bảo vệ thực vật trong đất canh tác.

LỜI CẢM ƠN: Nghiên cứu này được hỗ trợ từ dự án TĐNDTP.03/19-21

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Zou, T., P. He, J. Cao, Z. Li. Determination of paraquat in vegetables using HPLC-MS-MS, *Journal of chromatographic science*, **2014**, 53.
2. O'Malley, M., Chapter 28 - The Regulatory Evaluation of the Skin Effects of Pesticides, in *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology (Third Edition)*, R. Krieger, Editor. 2010, Academic Press: New York. p. 701-787.
3. Kamrin, M.A., *Pesticide Profiles: Toxicity, Environmental Impact, and Fate*. 1997: CRC Press.
4. Castro, R., E. Moyano, M.T. Galceran. Determination of quaternary ammonium

- pesticides by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, *J Chromatogr A*, **2001**, 914(1-2), 111-21.
5. Zhao, Y., K. Lazou, M. Schelfaut, L. De Reu, P. Sandra. Determination of chlormequat residues in pears and pear concentrates by benchtop LC-ESI-MS, *Chromatographia*, **2000**, 51(9), 531-535.
6. Stachniuk, A., E. Fornal. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Analysis of Pesticide Residues in Food, *Food Analytical Methods*, **2016**, 9(6), 1654-1665.
7. de Almeida, R.M., M. Yonamine. Gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of the herbicides paraquat and diquat in plasma and urine samples, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **2007**, 853(1-2), 260-4.
8. Rial-Otero, R., B. Cancho-Grande, C. Perez-Lamela, J. Simal-Gándara, M. Arias-Estévez. Simultaneous determination of the herbicides diquat and paraquat in water, *J Chromatogr Sci*, **2006**, 44(9), 539-42.
9. Lautié, J.P., V. Stankovic, G. Sinoquet. Determination of chlormequat in pears by high-performance thin layer chromatography and high-performance liquid chromatography with conductimetric detection, <http://dx.doi.org/10.1051/analisis:2000109>, **2000**, 28).
10. Aramendia, M.A., V. Borau, F. Lafont, A. Marinas, J.M. Marinas, J.M. Moreno, J.M. Porras, F.J. Urbano. Determination of diquat and paraquat in olive oil by ion-pair liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (MRM), *Food Chemistry*, **2006**, 97(1), 181-188.
11. Oulkar, D., R. Shinde, Z. Khan, K. Banerjee. High throughput residue analysis of paraquat and diquat involving hydrophilic interaction liquid chromatographic separation and mass spectrometric determination, *Food Additives & Contaminants: Part A*, **2019**, 1-11.
12. Young, M.S., K.M. Jenkins. Oasis® WCX: A novel mixed-mode SPE sorbent for LC-MS determination of paraquat and other quaternary ammonium compounds, *LC GC Europe*, **2004**, 17), 51-52.
13. Pizzutti, I.R., G.M. Vela, A. de Kok, J.M. Scholten, J.V. Dias, C.D. Cardoso, G. Concenço, R. Vivian. Determination of paraquat and diquat: LC-MS method optimization and validation, *Food Chem*, **2016**, 209), 248-55.
14. Kaczyński, P. Clean-up and matrix effect in LC-MS/MS analysis of food of plant origin for high polar herbicides, *Food Chemistry*, **2017**, 230), 524-531.