

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
วิธีการวิเคราะห์

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มเอสเอ็ม (Minimal Salt Medium, MSM)

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มเอสเอ็มชนิดเหลวมีรายการสารเคมีและวิธีการเตรียม ดังนี้

สารเคมี

1) $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	14.678	กรัม
2) KH_2PO_4	3	กรัม
3) NaCl	0.5	กรัม
4) NH_4Cl	2	กรัม
5) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.513	กรัม

วิธีการ

ละลายสารเคมีข้างต้นด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น (Phosphate buffer) 10 mM และปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1 ลิตร นำไปกำจัดเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นระยะเวลา 15 นาที รอให้เย็นจึงเติมสารโพธิ์โนฟอสที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยวิธีการกรองผ่านกระดาษกรองที่มีขนาดรูพรุน $0.20\ \mu\text{m}$

หมายเหตุ : การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มเอสเอ็มชนิดแข็งมีวุ้นเป็นส่วนผสม ร้อยละ 1.5 และยีสต์สกัดร้อยละ 0.1 ใช้สารโพธิ์โนฟอสเกรดการคำนวณในอาหาร 60 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. การเตรียมอาหารเอ็นเอ (Nutrient Agar, NA)

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็นเอมีอุปกรณ์และวิธีการเตรียม ดังนี้

สารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NA	28	กรัม
-------------------------	----	------

วิธีการ

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1 ลิตร นำไปกำจัดเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ก2

การเพาะเชื้อด้วยเทคนิคการเกลี่ยเชื้อ (Spread plate technique)

การเพาะเชื้อด้วยเทคนิคการเกลี่ยเชื้อ (Spread plate technique)

1. การเพาะเชื้อด้วยเทคนิคการเกลี่ยเชื้อ (Spread plate technique)

การเพาะเชื้อด้วยเทคนิคการเกลี่ยเชื้อ (spread plate) เป็นวิธีการเพาะเชื้อเพื่อนับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ วิธีนี้ผู้วิเคราะห์จะสามารถสังเกตลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ได้ง่าย ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

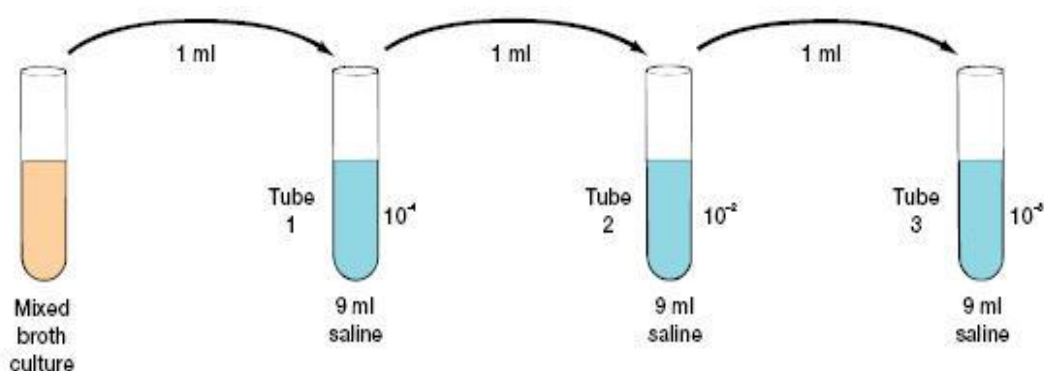
1.1 การเจือจางแบบ 10 serial dilutions

1.1 ปิเปต 1 มล. ชัสเพนชันของเชื้อตั้งต้นด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ มาใส่หลอดที่มีน้ำเจือจางปลอดเชื้อ ปริมาตร 9 มล. เขย่าให้เข้ากัน จะได้เป็นชัสเพนชันของเชื้อที่ระดับความเจือจาง 10^{-1}

1.2 ปิเปตชัสเพนชันของเชื้อที่ได้ (10^{-1}) 1 มล. ใส่หลอดที่มีน้ำเจือจางปลอดเชื้อ ปริมาตร 9 มล. เขย่าให้เข้ากัน จะได้เป็นชัสเพนชันของเชื้อที่ระดับความเจือจาง 10^{-2}

1.3 ปิเปตชัสเพนชันของเชื้อที่ได้ (10^{-2}) 1 มล. ใส่หลอดที่มีน้ำเจือจางปลอดเชื้อ ปริมาตร 9 มล. เขย่าให้เข้ากัน จะได้เป็นชัสเพนชันของเชื้อที่ระดับความเจือจาง 10^{-3} โดยขั้นตอนการเจือจางตัวอย่างแสดงไว้ในภาพที่ ก2-1

1.4 นำไปใช้ต่อในขั้นตอนที่ 2 เรื่องการเพาะเลี้ยงแบบเกลี่ยเชื้อ



ภาพที่ ก2-1 ขั้นตอนการทำ Serial dilution

1.2 การเพาะเชื้อแบบ Spread Plate มีขั้นตอนดังนี้

2.1 ระบุชื่อชุดตัวอย่าง วันที่ทำการทดลองที่ด้านล่างของจานเพาะเชื้อ

2.2 ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 0.1 มล. ลงที่ตำแหน่งตรงกลางจานเพาะเชื้อ แสดงไว้ในภาพที่ ก2-2 (a)

2.3 จุ่มแท่งแก้วรูปตัวแอล (spreader) ในแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 แล้วเอียงแท่งแก้วรูปตัวแอลแตะขอบปีกเกอร์เพื่อแยกแอลกอฮอล์ส่วนเกินออก แสดงไว้ในภาพที่ ก2-2 (b)

2.4 นำแท่งแก้วเกลี่ยรูปตัวแอลไปเผาไฟจนแอลกอฮอล์ไหม้หมด และปล่อยให้เย็น

แสดงไว้ในภาพที่ ก2-2 (c)

2.5 นำแท่งแก้วเกลี่ยรูปตัวแอลเกลี่ยเชื้อให้ทั่วจานเพาะเชื้อและระมัดระวังไม่ให้มือสัมผัสกับขอบด้านในของจานเพาะเชื้อ แสดงไว้ในภาพที่ ก2-2 (d)

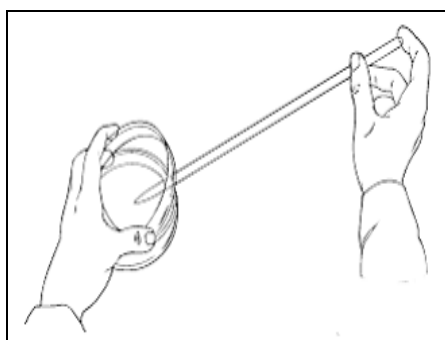
2.6 จุ่มแท่งแก้วเกลี่ยรูปตัวแอลในแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 และกำจัด

แอลกอฮอล์

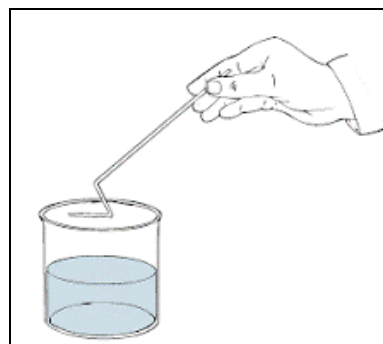
ส่วนเกินโดยให้แท่งแก้วแตะขอบปีกเกอร์ นำเผาไฟจนแอลกอฮอล์ไหม้หมด ปล่อยให้เย็นและนำไปเกลี่ยเชื้อแบคทีเรียจานเพาะเชื้อที่เหลือ ขั้นตอนการเกลี่ยเชื้อแสดงดังภาพที่ ก2-2

2.7 กลับจานเพาะเชื้อให้ด้านที่มีอาหารเพาะเชื้ออยู่ด้านบน แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ

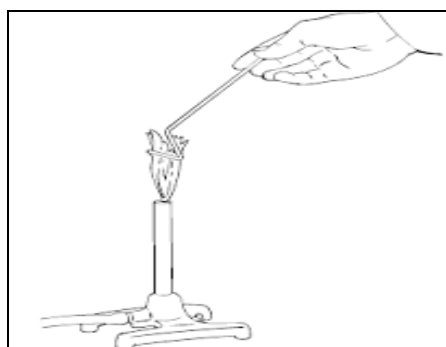
2.8 สังเกตลักษณะของโคโลนีที่ปรากฏและนับจำนวนโคโลนี



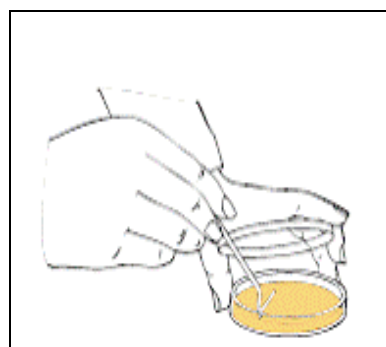
(b)



(a)



(c)



(d)

ภาพที่ ก2-2 ขั้นตอนเพาะเชื้อด้วยเทคนิคการเกลี่ยเชื้อ

ภาคผนวก ก3

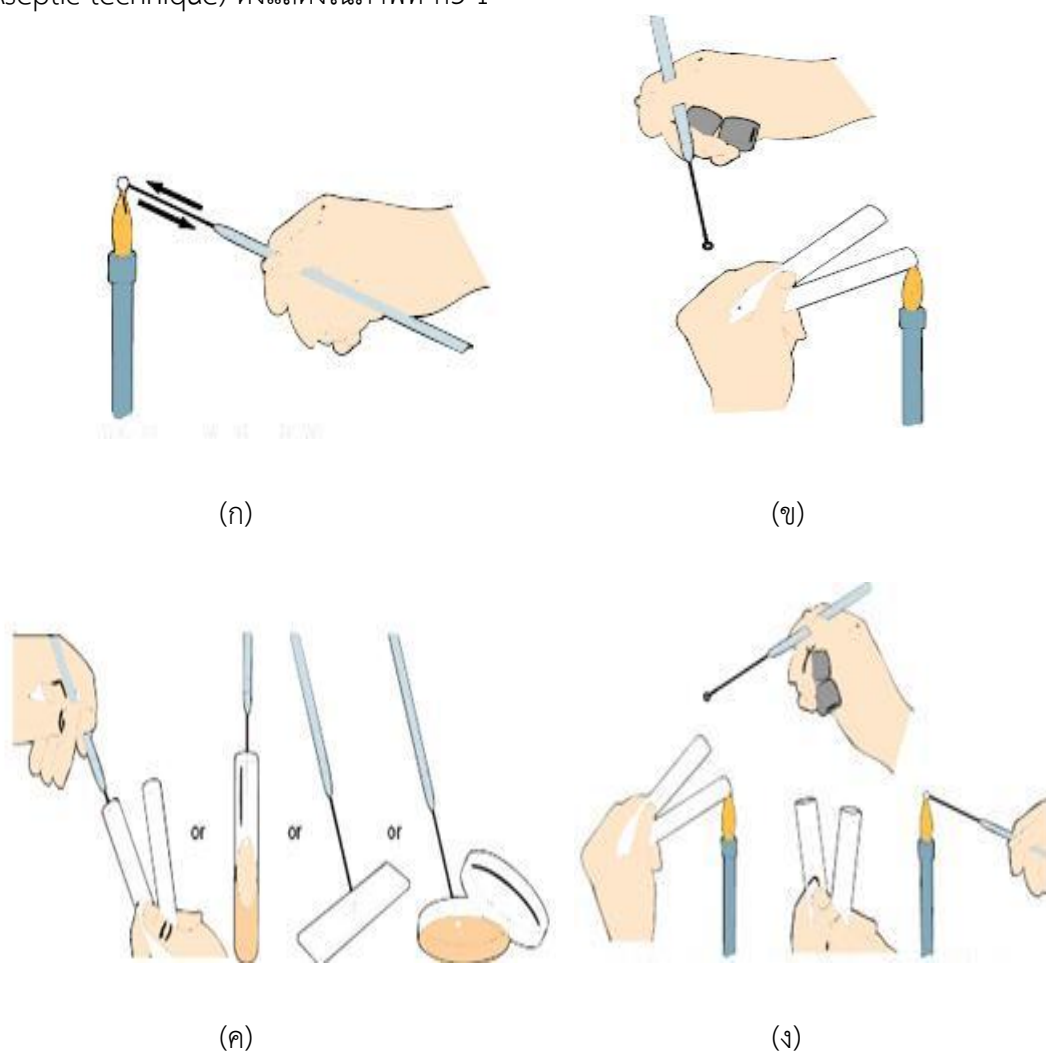
การทำเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคการเขี่ยเชื้อ (Steak plate technique)

การทำให้เชื้อบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Streak plate

1. การทำให้เชื้อบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Streak plate

หลักการของการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture medium) คือ จะต้องแยกเชื้อให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ (single colony) จากนั้นจึงนำเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวที่แยกได้ไปศึกษารูปร่างลักษณะ และคุณสมบัติต่างๆ เพื่อให้ทราบว่าเป็นเชื้อชนิดใด โดยมีรายละเอียดดังนี้

1.1 ใช้ลูปเขี่ยเชื้อ (Loop) เขี่ยเอาเชื้อออกจากหลอดที่มีเชื้อด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic technique) ดังแสดงในภาพที่ ก3-1



ภาพที่ ก3-1 การถ่ายเชื้อด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

1.2 ทำการ Streak เชื้อที่อยู่ปลาย loop ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้เตรียมไว้แล้ว ด้วยความระมัดระวัง ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1.2.1 เปิดฝาจานเพาะเชื้อให้มีช่องว่างเพียงพอที่จะสอด loop เข้าไปได้ง่าย ดังแสดงในภาพที่ ก3-2 (ก) แล้วสอด Loop ที่มีเชื้อแบคทีเรียอยู่ทำการ streak ที่พื้นที่หมายเลข 1 โดยในระหว่างการ streak จะต้องไม่ทำให้ผิวของอาหารแตก

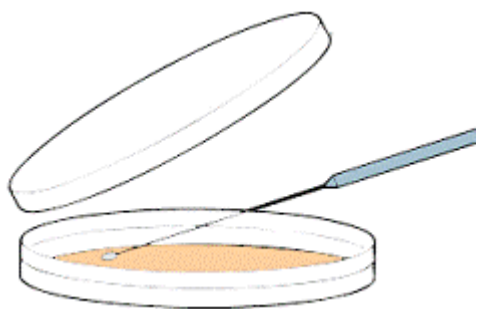
1.2.2 เมื่อ streak ที่บริเวณพื้นที่หมายเลข 1 แล้วให้นำ Loop ออกมาฆ่าเชื้อโดยการเผาไฟ จากนั้นทำให้ loop เย็นลงโดยการแตะที่ขอบของอาหารเลี้ยงเชื้อใกล้ๆ กับบริเวณหมายเลข 1

1.2.3 หมุนจานเพาะเชื้อให้อยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสมสำหรับการ streak บริเวณพื้นที่หมายเลข 2 แล้วทำการ cross streak โดยจุดเริ่มต้นจะอยู่ที่บริเวณพื้นที่หมายเลข 1 แล้วทำการ Streak ที่บริเวณพื้นที่หมายเลข 2 ดังภาพที่ ก3-2 (ข)

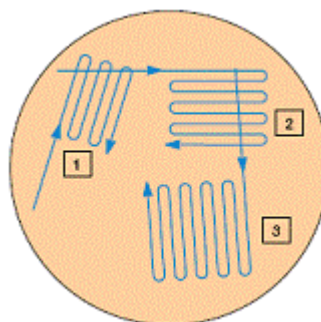
1.2.4 เมื่อ streak ที่บริเวณพื้นที่หมายเลข 2 แล้วให้นำ Loop ออกมาฆ่าเชื้อโดยการเผาไฟ หลังจากนั้นทำให้ loop เย็นลงโดยการแตะที่ขอบของอาหารเลี้ยงเชื้อใกล้ๆ กับบริเวณหมายเลข 2

1.2.5 หมุนจานเพาะเชื้อให้อยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสมสำหรับการ streak บริเวณพื้นที่หมายเลข 3 แล้วทำการ cross streak โดยจุดเริ่มต้นจะอยู่ที่บริเวณพื้นที่หมายเลข 2 แล้วทำการ Streak ที่บริเวณพื้นที่หมายเลข 3 ดังภาพที่ ก3-2 (ข) ถ้าหากจำเป็นสามารถทำการ streak ที่บริเวณพื้นที่หมายเลข 4 ได้

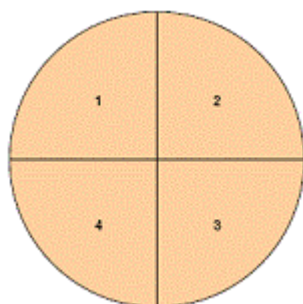
1.2.6 กลับจานเพาะเชื้อแล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วสังเกตการณ์เจริญของเชื้อ



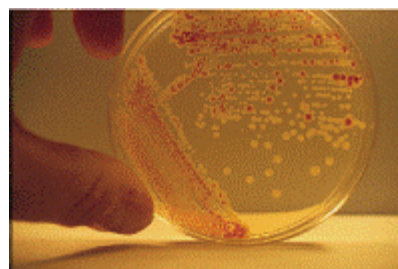
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

ภาพที่ ก3-2 ขั้นตอนการทำเชื้อบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Streak plate

ภาคผนวก ก4
การระบุสายพันธุ์แบบที่เรีย

การระบุสายพันธุ์แบคทีเรีย

The isolates were identified by 16S ribosomal Ribonucleic acid (16S rRNA) sequence analysis. In brief, each bacterial culture was grown overnight. The genomic DNA from each culture was extracted using a standard boiling method. The 16S rRNA gene fragment was amplified from the genomic DNA by the polymerase chain reaction (PCR) using the bacterium-specific primers: a 63f-forward primer (5'CAGGCCTAACACATGCAAGTC3') and a 1387r-reverse primer (5'GGGCGGWTGTACAAGGC3'). A 25- μ l PCR reaction mixture was prepared according to the manufacturer's protocol (Fermentas, USA). The 16S rRNA amplification was performed in a thermal cycler (Perkin Elmer model-2400, USA) with the following conditions: 94°C (3 min), followed by 30 cycles of 95°C (1 min), 55°C (1 min) and 72°C (1.5 min), with a final extension of 72°C (5 min). The PRC product (ca. 1,300 bps) was then cloned into pGEM-T Easy vector (Promega, USA) and transformed into competent *Escherichia coli* DH5a cells. The plasmid DNA was then isolated using the QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen, Netherlands) and sequenced. The partial 16S rRNA gene sequence of the isolates was analyzed using the nucleotide BLAST (BLASTN) algorithm of the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

ภาคผนวก ก5
การข้อมสีแกรม

การย้อมสีแกรม

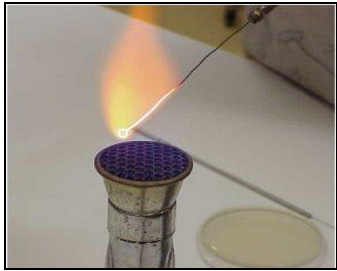
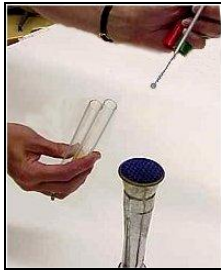
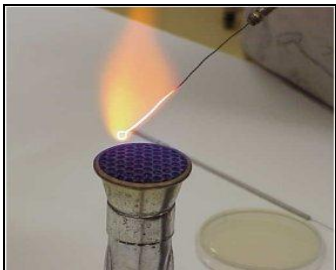
การย้อมสีแกรมจะต้องประกอบด้วยขั้นตอนการเตรียมสไลด์ตัวอย่างและขั้นตอนการย้อมสีแกรม ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. การเตรียมสไลด์ก่อนการย้อมสี มีขั้นตอนดังนี้

- 1) เตรียมอุปกรณ์ต่างๆ ดังนี้ หลอดเก็บเชื้อที่จะทำการศึกษา แผ่นสไลด์ ห่วงเขี่ยเชื้อ ตะเกียงแอลกอฮอล์ และปากกาเขียนแผ่นใส
 - 2) ใช้ปากกาเขียนแผ่นใสเขียนวงกลมบนสไลด์ เพื่อกำหนดขอบเขตที่จะนำเชื้อมาป้ายลงบนสไลด์ จากนั้นกลับแผ่นสไลด์ที่ขีดไว้ด้วยปากกาให้อยู่ด้านล่าง
 - 3) เผลาห้วงเขี่ยเชื้อด้วยตะเกียงจนร้อนแดง เพื่อฆ่าเชื้อจากนั้นรอให้เย็น ประมาณ 10 วินาที ระวังอย่าให้ปลายห้วงเขี่ยเชื้อกระทบกับสิ่งอื่นรอบๆ
 - 4) ใช้มือซ้ายถือหลอดเชื้อตัวอย่าง ใช้มือขวาดึงสำล่ออกจากหลอดเก็บเชื้อโดยระวังไม่ให้มือสัมผัสกับปากหลอดด้านใน เผลาบริเวณรอบปากหลอดและรีบปิดสำลีสั่งในหลอดตามเดิม
 - 5) นำห้วงเขี่ยที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เขี่ยเชื้อออกจากหลอดเก็บเชื้อ แล้วเผลापากหลอดและรีบปิดสำลีสั่งในหลอดตามเดิม
 - 6) เกลี่ยเชื้อ (Smear) ** ลงบนสไลด์ในวงกลมที่เขียนไว้ ถ้าเชื้อมีความหนาแน่นสูงให้เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อเพิ่มอีก 1 หยด และเกลี่ยเชื้อให้กระจายมากที่สุด
 - 7) เผลาห้วงเขี่ยเชื้อจนร้อนแดง เพื่อเก็บไว้ใช้ในครั้งต่อไป
- นำสไลด์ไปผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง เพื่อเป็นการทำให้เชื้อติดแน่นกับแผ่นสไลด์ ป้องกันไม่ให้เชื้อหลุดจากแผ่นสไลด์ในระหว่างขั้นตอนการย้อม วิธีนี้เรียกว่า Heat fixed การทำเช่นนี้ทำให้เกิดการตกตะกอน (Coagulation) ของโปรตีนทำให้เซลล์ติดแผ่นสไลด์ การเตรียมสไลด์ก่อนย้อมสีมีลักษณะดังภาพที่ ก5-1

** การทำ Smear มี 2 วิธี คือ

1. ถ้าแบคทีเรียเลี้ยงอยู่ในอาหารเหลว ให้ใช้ห้วงเขี่ยเชื้อ (loop) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว (โดยการนำไปเผลาไฟจนร้อนแดงแล้วปล่อยให้เย็น) จุ่มลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วยกห้วงเขี่ยเชื้อขึ้นตรงๆ จะเห็นว่าแผ่นฟิล์มบางๆ นำไปป้ายลงบนแผ่นสไลด์ที่เตรียมไว้ เกลี่ยเชื้อให้เป็นวงกลมกระจายบนสไลด์
2. ถ้าแบคทีเรียเลี้ยงอยู่ในอาหารแข็ง (agar) ให้หยดน้ำกลั่นปราศจากเชื้อลงบนสไลด์ 1 หยดเล็กๆ (อาจใช้ห้วงเขี่ยเชื้อแตะมา 1 ครั้ง) แล้วจึงนำห้วงเขี่ยเชื้อที่ฆ่าเชื้อไปแตะแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงเล็กน้อย นำมาป้ายบนหยดน้ำแล้วเกลี่ยเชื้อให้เป็นแผ่นกระจายเป็นวงกลมบนสไลด์ ทั้งให้แห้ง รอยเกลี่ยที่ดีจะต้องบางมีเชื้อแผ่กระจายสม่ำเสมอ

 1. เผาห่วงเชิยเชื้อเพื่อฆ่าเชื้อ	 2. เผาปากหลอดทดลองเพื่อฆ่าเชื้อ แล้วจุ่มห่วงเชิยเชื้อลงในหลอด จากนั้นเผาปากหลอดอีกครั้ง
 3. เกลี่ยเชื้อลงในวงกลมที่วาดไว้	 4. เผาห่วงเชิยเชื้อเพื่อฆ่าเชื้ออีกครั้ง

ภาพที่ ก5-1 การเตรียมสไลด์ตัวอย่างก่อนการย้อมสีแกรม

2. การย้อมสีแกรม (Gram's differential staining) มีขั้นตอนดังนี้

1) นำสไลด์ตัวอย่างวางลงบนตะแกรงสำหรับย้อมสี โดยด้านที่ Smear อยู่ด้านบนหยดสี Crystal Violet ลงบนสไลด์ให้ทั่ว จับเวลา 1 นาที

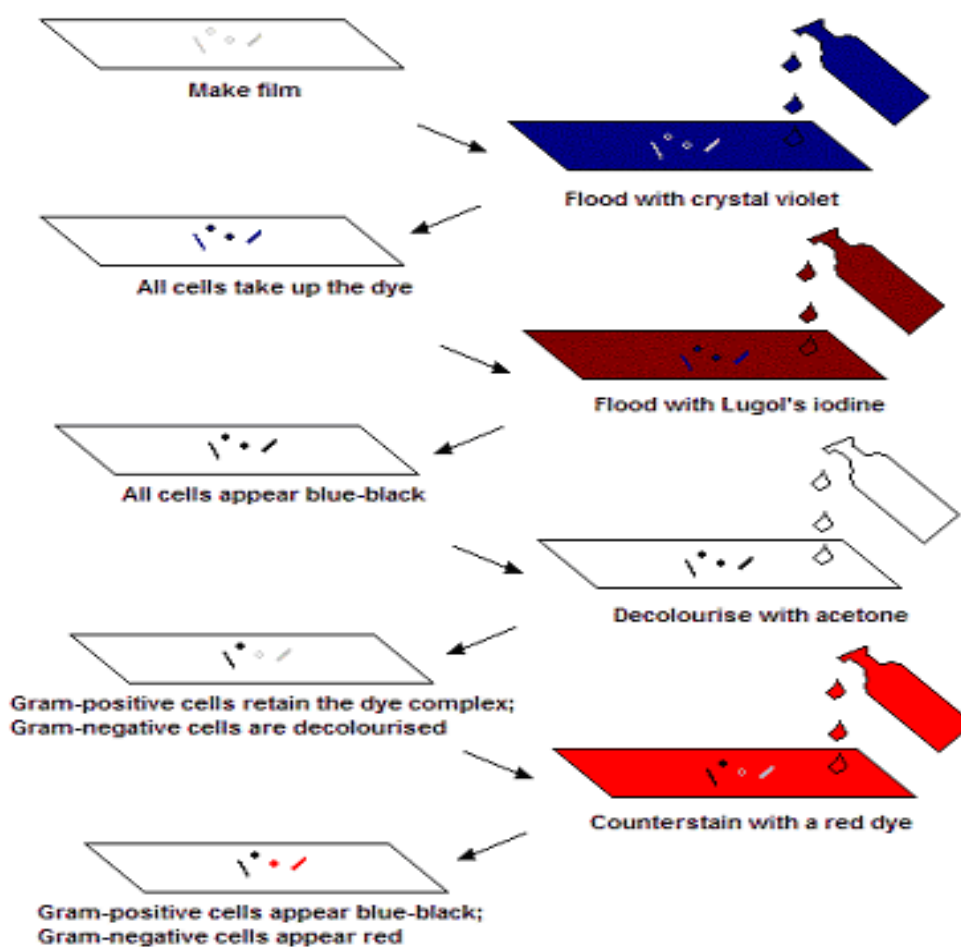
2) ล้างสีออกจากสไลด์ด้วยน้ำกลั่นหรือเปิดให้น้ำไหลผ่านสไลด์เบาๆ หรือใช้น้ำจากขวดฉีดล้างก็ได้ ห้ามเทสีออกก่อนใช้น้ำล้างเพราะ Crystal Violet จะตกตะกอนและแห้งบนสไลด์อย่างรวดเร็ว

3) ซับน้ำที่ล้างออกจากสไลด์เบาๆ จากนั้นหยด Gram's iodine ลงบนสไลด์จนทั่วทั้งไว้บนสไลด์เป็นเวลา 1 นาที Gram's iodine จะทำให้ติดกับเซลล์ได้ดีขึ้นโดยจะไปลดการละลายของสีออกจากผนังเซลล์

4) ล้างออกด้วยน้ำเช่นเดียวกับข้อ 2)

5) ล้างสีออกจากแผ่นสไลด์โดยหยด 95% เอทิลแอลกอฮอล์ผ่านสไลด์ โดยถือสไลด์ด้วยปากคิบให้สไลด์เอียงเป็นมุมล้างจนสีไม่ถูกล้างออกมาอีก ในขั้นนี้สีที่ย้อมแกรมลบจะถูกชะล้างออกจากเซลล์ส่วนในกรณีของแกรมบวกสีจะยังติดกับผนังเซลล์อยู่ และไม่ถูกล้างออกด้วย แอลกอฮอล์ (ขั้นตอนนี้ใช้เวลาไม่เกิน 10 วินาที)

- 6) ล้างออกด้วยน้ำอย่างรวดเร็ว
- 7) ย้อมสีอีกครั้งด้วยสีที่สอง Safranin (Counter stain) ใช้เวลาในการย้อม 1 นาที
- 8) ล้างสีออกด้วยน้ำตามวิธีในข้อ 2)
- 9) ทิ้งสไลด์ให้แห้งโดยผึ่งไว้ให้แห้งเอง หรือใช้กระดาษซับเบาๆ สไลด์ควรจะแห้งสนิทก่อนการนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบแสง แสดงขั้นตอนการย้อมสีแกรมดังภาพที่ ก5-2



ภาพที่ ก5-2 ขั้นตอนการย้อมสีแกรม

ภาคผนวก ก6
วิธีการวิเคราะห์สารออร์แกนโนฟอสฟอรัส

วิธีการวิเคราะห์สารออร์แกนโนฟอสฟอรัส

1. วิธีการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงออร์แกนโนฟอสฟอรัส

วิธีการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงออร์แกนโนฟอสฟอรัสอ้างอิงจาก QuEChERS (รายละเอียดดังในข้อ 2.) แต่มีการพัฒนาให้เหมาะสมกับตัวอย่างและเครื่องมือโดยมีรายละเอียด ดังนี้

1.1 วิธีวิเคราะห์

1.1.1 การเก็บและรักษาตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างด้วยอุปกรณ์ที่กันแสง ควรเก็บรักษาตัวอย่างโดยการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เก็บในที่มืด

1.1.2 การเตรียมตัวอย่าง

ตวงน้ำตัวอย่างปริมาตร 10 ml เติมสารละลายอะซิโตไนไตรล์(acetonitrile) ผสมกรดอะซิติก (acetic acid) ร้อยละ 0.1 10 ml ลงในตัวอย่างข้างต้นแล้วทำการเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารโซเดียมคลอไรด์ 1 g แมกนีเซียมซัลเฟต-7-ไฮเดรต 4 g เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เก็บตัวอย่างที่ผ่านการสกัด 1 ml เติมสารดูดซับของแข็ง SPE เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เก็บตัวอย่าง 0.5 ml นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography-Mass spectrometry, GCMS) วิธีการสกัดเป็นไปตามวิธี QuEChERS ประสิทธิภาพการสกัดร้อยละ 80

1.1.3 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

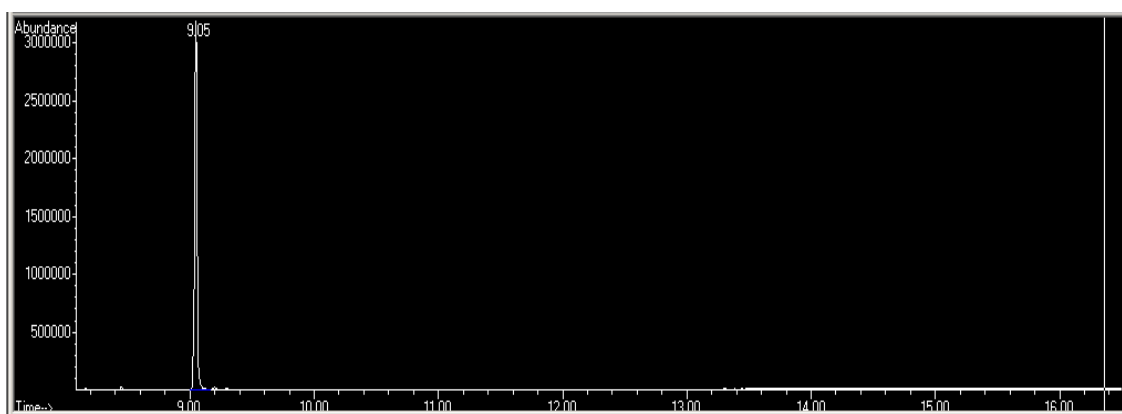
วิเคราะห์ด้วยเครื่องจีซีซึ่งมีอุปกรณ์ตรวจจับแบบแมสซีเล็กทีฟ (mass selective detector) (รุ่น 6890N, Agilent Technologies, สหรัฐอเมริกา) โดยเครื่องจีซีที่ใช้มีคอลัมน์โครมาโตกราฟีชนิด DB-5 ขนาด 30 m × 0.25 mm และความหนาแผ่นฟิล์ม (film thickness) 0.25 µm ระบบฉีดตัวอย่างแบบสปลิตเลส (splitless mode) ตั้งค่าอุณหภูมิระบบฉีดตัวอย่าง (injection temperature) ที่ 250 องศาเซลเซียส ปริมาตรตัวอย่างที่ฉีดแต่ละครั้ง (injection volume) เท่ากับ 1.0 ไมโครลิตร ตั้งค่าอุณหภูมิที่เตาอบ (oven temperature) เริ่มต้นที่ 90 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิเป็นดังโปรแกรมอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น (temperature gradient program) ที่แสดงในตารางที่ ก6-1 การวิเคราะห์ใช้แก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สนำพา (carrier gas) ปรับอัตราการไหลที่ 2.0 ไมโครลิตรต่อนาที สารออกที่ 9.07 นาที

ตารางที่ ก6-1 โปรแกรมอุณหภูมิที่ใช้วิเคราะห์สารออร์แกนโนฟอสฟอรัส

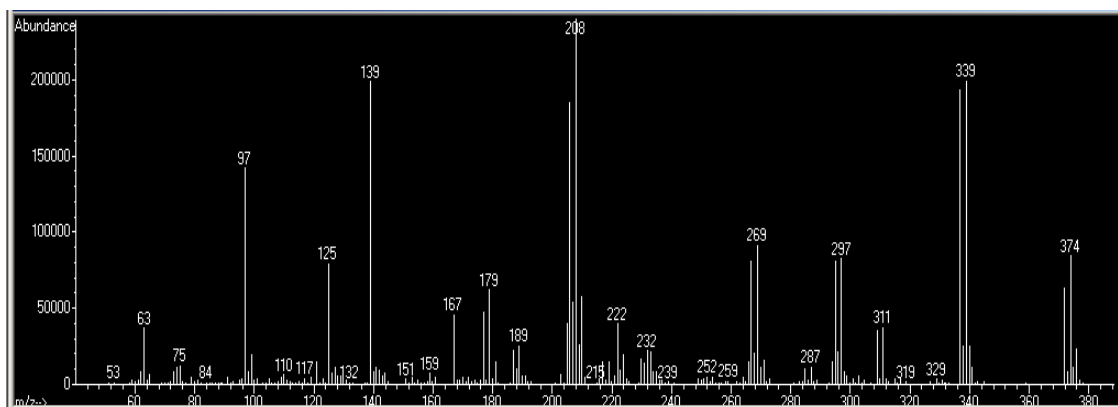
ลำดับที่	ขั้นตอน	อัตราการเพิ่มขึ้นของ อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	อุณหภูมิสุดท้าย ($^{\circ}\text{C}$)	ระยะเวลา (Hold) (min)
1	เริ่มต้น	-	90	0.00
2	การเพิ่มครั้งที่ 1	20	220	1.00
3	การเพิ่มครั้งที่ 2	10	280	3.00
4	หลังการเพิ่ม	-	300	3.50
รวม				20

1.1.4 โครมาโตแกรมสารมาตรฐานกลุ่มออร์แกนโนฟอสฟอรัส

ผลจากการวิเคราะห์สารมาตรฐานสามารถแสดงในรูปแบบโครมาโตแกรมของสารโพธิ์โนฟอสดังภาพ ก6-1 และ ก6-2 จะพบว่าสารโพธิ์โนฟอสปรากฏ ณ เวลา 9.05 นาที



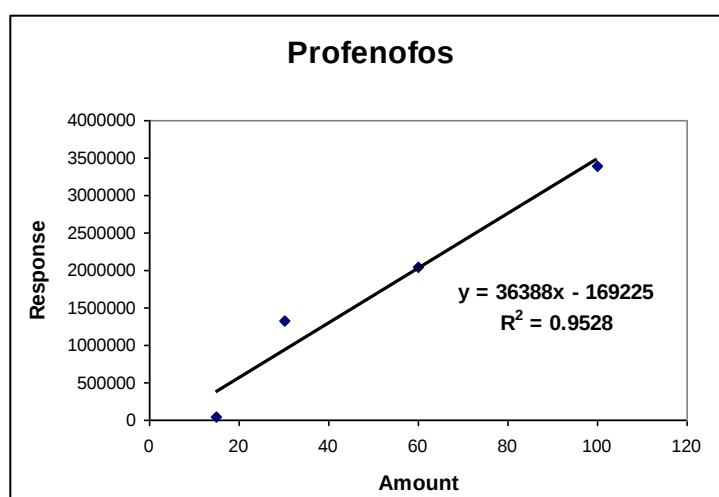
ภาพที่ ก6-1 ลักษณะโครมาโตแกรมของสารโพธิ์โนฟอส



ภาพที่ ก6-2 ไอออนแมสของสารโพรฟีโนฟอส

1.2 การทำกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่มีส่วนผสมของสารกำจัดแมลงที่เราต้องการวิเคราะห์ ดังเช่นในงานวิจัยนี้ใช้สารโพรฟีโนฟอสมาตรฐาน (ของบริษัท Restek Catalog 560935 ความเข้มข้น 100 µg/mL ละลายใน Ethyl Acetate) การเตรียมชุดความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกระทำโดยการนำสารโพรฟีโนฟอสมาตรฐานละลายในอะซิโตนไตรล์จำนวน 4 ความเข้มข้น นำไปวิเคราะห์ ปริมาณความเข้มข้นสารด้วยเครื่อง GC-MS และนำผลการวิเคราะห์มาสร้างกราฟมาตรฐาน ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารโพรฟีโนฟอสและพื้นที่ใต้กราฟ จะได้กราฟมาตรฐานของ สารโพรฟีโนฟอสลักษณะดังภาพที่ ก6-3



ภาพที่ ก6-3 ลักษณะกราฟมาตรฐานสารโพรฟีโนฟอส

1.3 การควบคุมคุณภาพในขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์

การควบคุมคุณภาพในขั้นตอนการวิเคราะห์สามารถทำได้โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างในช่วงความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ) โดยมีค่าเท่ากับ 2 mg/l สำหรับสารโพรพิโนฟอส โดยในการทำกราฟมาตรฐานต้องมีค่า R^2 มากกว่า 0.95 นอกจากนี้ยังได้มีการตรวจสอบประสิทธิภาพขั้นตอนการสกัด โดยการเตรียมน้ำตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของสารโพรพิโนฟอส 20 ส่วนในล้านส่วน ทำการสกัดตามวิธี QuEChERS จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography-Mass spectrometry, GCMS) วัดความเข้มข้นของสารโพรพิโนฟอสได้ 17 - 22 ส่วนในล้านส่วน จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าขั้นตอนการสกัดมีประสิทธิภาพกว่าร้อยละ 80

2. วิธีวิเคราะห์สารกำจัดแมลงออร์แกนโนฟอสฟอรัสตามวิธี QuEChERS

วิธีวิเคราะห์สารกำจัดแมลงออร์แกนโนฟอสฟอรัสตามวิธี QuEChERS มีวิธีการดังนี้

QuEChERS

A Mini-Multiresidue Method for the Analysis of Pesticide Residues in Low-Fat Products

1. Aim and Scope

This manuscript describes a method for the analysis of pesticide residues in produce with a low fat content, such as fruits, vegetables, cereals as well as processed products including dried fruit.

2. Short Description

The homogeneous and representative subsample is extracted in frozen condition with the help of acetonitrile. After addition of magnesium sulfate, sodium chloride and buffering citrate salts (pH 5-5.5), the mixture is shaken intensively and centrifuged for phase separation. An aliquot of the organic phase is cleaned-up by dispersive SPE employing bulk sorbents (e.g. PSA, GCB) as well as MgSO_4 for the removal of residual water. PSA treated extracts are acidified by adding a small amount of formic acid, to improve the storage stability of certain base-sensitive pesticides. The final extract can be directly employed for GC- and LC-based determinative analysis. Quantification is performed using an internal standard, which is added to the extract after the initial addition of acetonitrile. Samples with a low water content (<80%) require the addition of water before the initial extraction to get a total of ca. 10 mL water. When dealing with samples containing <25% water (e.g. cereals, dried fruit, honey, spices) the size of the analytical sample may have to be reduced (e.g. 1-5 g) depending on the load of matrix-co-extractives expected in the final extracts. A brief overview of the method is shown in the flowchart at the end of this document.

3. Devices and Consumables

- Sample processing equipment: e.g. Stephan UM 5 universal
- Automatic pipettes (e.g. for 10-10 μ L, 200-1000 μ L and 1-10 mL)
- 50 mL Teflon® centrifuge tubes with screw caps (e.g. Oak-ridge from Nalgene 3114-0050) or disposable 50 mL centrifuge tubes (e.g. 114x28 mm, PP, Sarstedt article-no. 62.548.004)
- 10 mL PP-single use centrifuge tubes with screw caps (e.g. greiner bio one article-no. 163270 or Simport/Canada, catalogue no. T550-10AT)
- 10 mL solvent-dispenser for acetonitrile
- Centrifuges for 50 mL and 10 mL centrifuge tubes
- Powder funnels, to fit for the centrifuge tubes
- 1.5 mL vials for GC-autosampler
- plastic cups (stackable) for the storage of the pre-weighed salt mixture (e.g. flame photometer cups 25 mL art. no. 10-00172 from a) GML-Alfaplast (>1000 pieces) or from b) JURO-LABS, D-91239 Henfenfeld (> 100 pieces)
- Sample divider, to automatically portion the salts (e.g. from Retsch/Haan, PT 100 or Fritsch/Idar-Oberstein, Laborette 27). The solids needed for „dispersive SPE“ can be portionated using for example the “Repro” high precision sample divider from “Bürkle” using the 10 mL PP tubes from Simport:

4. Chemicals

- Acetonitrile, pesticide residue grade
 - NaCl p.a.
 - Disodium hydrogencitrate sesquihydrate (e.g. Aldrich 359084 or Fluka 71635)
 - Trisodium citrate dihydrate (e.g. Sigma S4641 or Riedel-de Haen 32320)
 - Sodium hydroxide p.a., whereof a 5N-solution (0.2 g/1 mL water) is prepared
 - Bondesil-PSA 40 μ m (Varian article no. 12213023/10 g or 12213024/100 g)
 - GCB-sorbent, (e.g. Supelco, Supelclean Envi-Carb SPE bulk packing, article no. 57210U). Alternatively isolate material from packed cartridges
 - Magnesium sulphate anhydrous coarsely grained (e.g. FLUKA 63135)
 - Magnesium sulphate anhydrous fine powder (e.g. MERCK 1.06067)
- Note: Phthalates can be removed in a muffle furnace by heating to 550 °C (e.g. overnight)
- Formic acid conc. (>95%ig), prepare a 5 % solution (vol/vol) in acetonitrile
 - Pesticide Standards e. g. from Riedel de Haen, Dr. Ehrenstorfer, promochem
 - Internal and quality control (QC) standards see Table 1

Table 1: Potential internal standards (ISTDs) or quality control (QC) standards.

Name of the compound	Log P (octanol- water)	Chlorine atoms	Exemplary conc. [µg/mL] ¹	GC				LC	
				ECD	NPD	MSD EI (+)	MSD CI (-)	MS/MS ESI (+)	MS/MS ESI (-)
Potential Internal Standards									
PCB 8	5.09	2	50	+++	-	++	+++	-	-
PCB 18	5.55	3	50	+++	-	++	+++	-	-
PCB 28	5.62	3	50	+++	-	++	+++	-	-
PCB 52	6.09	4	50	+++	-	++	+++	-	-
Triphenyl phosphate	4.59	-	20	-	+++	+++	-	+++	-
Tris-(1,3-Dichlorisopropyl)-phosphate	3.65	6	50	+++	+++	+++	+++	+++	+
Triphenylmethane	5.37	-	10	-	-	+++	-	-	-
Bis-nitrophenyl urea (Nicarbazin)	3.76	-	10	-	-	-	-	-	+++
Potential Quality Control Standards									
PCB 138	6.83	6	50	+++	-	++	+++	-	-
PCB 153	7.75	6	50	+++	-	++	+++	-	-
Anthracene (or its d10 analogue)	4.45	-	100	-	-	++	-	-	-

¹concentrations exemplary, use acetonitrile as solvent

¹concentrations exemplary, use acetonitrile as solvent**Annotations 1:**

The use of more than one internal and quality control standards is recommended to enable recognition of errors due to mispipetting or discrimination during partitioning or cleanup.

In this method the internal standard (ISTD) is employed at an early stage of the analytical procedure (comparable to a surrogate standard). To avoid overestimations of results it is important that the compound used as ISTD does not experience any significant losses during the procedure (e.g. higher than 5%). When analyzing fruit and vegetable samples this criterion is generally met by all compounds listed in the table above.

In the case of samples with higher fat content, however, the situation is different. Since the solubility of fat in the acetonitrile layer is very limited, excessive sample fat will form an additional layer into which analytes may partition and get lost. The extent of losses depends on the amount of lipids in the sample as well as on the polarity of the analytes with the most non-polar ones showing the highest losses. In the presence of elevated fat amounts (e.g. > 0,3 g fat/ 10 mL acetonitrile) it is thus recommended to employ the internal standard at the end of the procedure (to an aliquot of the final extract) assuming the volume of the organic phase as being exactly 10 mL. It should be furthermore noted that the recoveries of pesticides having very low polarity (e.g. hexachlorobenzene and DDT) will drop below 70% at fat contents greater than 0,5 g/ 10 mL acetonitrile. PCB 138 or 153 may be used as surrogate QC standards to indicate or rule out any significant losses of pesticides. As long as one of those two compounds shows recoveries greater than 70% it is to be expected that this will also be the case even for the most non-polar pesticides.

*Losses of certain compounds (of low polarity and planar structure) may also occur during „Dispersive SPE“ when employing GCB sorbent for chlorophyll rich samples (see 6.3). Some of the potential ISTDs listed above may also be affected. This can be avoided by **employing the ISTD at the end of the procedure**, assuming the volume of the organic phase as being exactly 10 mL. **Anthracene**, which shows a very strong affinity towards GCB **may be used as surrogate QC standard**. Anthracene recoveries greater than 70% will indicate that no unacceptable losses of pesticides with very high affinity towards GCB (such as hexachlorobenzene, chlorothalonil, thiabendazole) have occurred.*

For the preparation of calibration solutions a dilution of the ISTD solutions is necessary according to the amount of extract used (see 6.3).

5. Safety annotations

When using dry ice, solvents, solids and standards the corresponding safety direction sheets and the safety information on the vessels have to be taken into account.

6. Procedure

6.1. Sample processing

Subsampling of the laboratory samples is performed following the existing regulations, directives or guidelines. In the case of fruits and vegetables, cryogenic milling (e.g. using dry ice) is highly recommended to increase homogeneity and thus reduce sub-sampling variation and to reduce the size of the sample particles and thus assist the extraction of residues. Cutting the samples coarsely (e.g. 3x3 cm) with a knife and putting them into the freezer (e.g. -18°C overnight) prior to cryogenic milling reduces the amount of dry ice required and facilitates processing.

Annotations 2:

- Generally, comminution at room temperature may lead to major losses for several sensitive pesticides but also result in an insufficient degree of comminution thus impeding the extractability of residues enclosed in remaining particles. Furthermore, the degree of homogeneity achieved is generally not as good as in cryogenic processing leading to greater sub-sampling variations. If the necessary degree of comminution cannot be achieved with the means available in the laboratory, the use of larger sample amounts for analysis (scaling up) and/or the use of Ultra-Turrax during the first extraction step may help to overcome these problems (see below).
- Samples with a **water content between 25 and 80 %** (e.g. bananas) require the addition of water to achieve a total of 10 g water (when 10 g sample is employed). Products with a **water content < 25 %** (e.g. flour, dried fruits, honey, spices), the sample amount may have to be reduced and water has to be added as shown in the table below. The added water should be at a low temperature (e.g. <4°C) to compensate the heat development caused by the addition of the salts.
Homogenous samples (e.g. flower) can be weighed directly into the extraction tube followed by the addition of the necessary amount of water. To avoid a degradation of sensitive pesticides, the temperature during the extraction should be kept as low as possible. When dealing with **inhomogeneous samples which are difficult to comminute** (e.g. dried fruits) **water can be added before processing to assist comminution**. In this case a larger amount of the produce (e.g. 500 g) is weighed and the appropriate amount of water is added (for dried fruits for example 750 g). The mixture is then comminuted (preferably with the help of dry ice). Cold water should be used here as well, to reduce the required amount of dry ice. An aliquot of the resulting homogenate is used for further sample preparation as described below.

Table 2: Water addition for several sample types

Sample type	Weigh	Water	Annotation
Cereals	5 g	10 g	
Dried fruits	5 g	7.5 g	Water can be added during comminution step. 12.5 g homogenate is used for analysis
Fruits and vegetables > 80 % water content	10 g	-	
Fruits and vegetables 25-80 % water content	10 g	X g	X = 10 g – water amount in 10 g sample
Honey	5 g	10 g	
Spices	2 g	10 g	

6.2. Extraction/Partitioning

10.0 g $\pm$ 0.1 g of the comminuted homogenous and frozen sample are weighed into a 50 mL centrifuge tube, 10 mL acetonitrile and the ISTD solution (e.g. 100 μ L of an ISTD-mixture, containing one or several of the compounds listed in table 1 in the concentrations given) are added and the tube is closed and shaken vigorously by hand for 1 minute.

Annotations 3:

- *If the sample's degree of comminution is insufficient, the extraction can be assisted by a dispenser (e.g. **Ultra-Turrax**). The dispersing element is immersed into the sample/acetonitrile mixture and comminution is performed for about 2 min. at high speed. If the ISTD solution has been already added, no rinsing of the dispersing element is necessary. Nevertheless, the blender has still to be cleaned thoroughly before being used for the next sample to avoid cross-contamination. When using the disposable 50 mL centrifuge tubes (see devices and consumables) the common 19 mm dispersing elements can be used. The Teflon tubes however have smaller openings requiring dispersing elements of smaller diameters (e.g. 10 mm).*
- *The described extraction step is scalable as desired, as long as the amounts of solvent and salts used remain in the same proportion (see below). It should be kept in mind, however, that the smaller the amount of sample employed the higher the sub-sampling variability will be. During validation each laboratory should investigate the typical sub-sampling variabilities achieved when employing the available comminution devices, using representative samples containing incurred residues.*
- *For **recovery studies** e.g. 10 g sample is fortified using 100 μ L of a pesticide solution in acetonitrile or acetone. A short vibration using a Vortex mixer may help to disperse solvent and pesticides well throughout the sample. Fortification using larger volumes of standard solution (e.g. > 500 μ L) should be avoided. If this is not possible, a volume compensation should be performed in the blank samples used to prepare matrix matched calibration solutions, to avoid differences in the matrix concentration of the final extract.*
- ***Blank extracts** for the preparation of calibration solutions: The use of matrix matched calibration solutions is necessary to minimize errors associated with matrix induced enhancement or suppression effects during GC- and LC-determination. The blank matrix should be similar to the matrix of the samples to be analyzed and should not contain any detectable residues of the analytes of interest). The blank sample is treated the same way as any other sample, but no ISTD is added during extraction and cleanup. (The preparation of calibration solutions is described below.*

After that add a mixture of:

- 4 g $\pm$ 0.2 g Magnesium sulphate anhydrous,
- 1 g $\pm$ 0.05 g Sodium chloride,
- 1 g $\pm$ 0.05 g Trisodium citrate dihydrate and
- 0.5 g $\pm$ 0.03 g Disodium hydrogencitrate sesquihydrate

It's easier to prepare the necessary number of portions of salts before starting the extraction procedure. The tube is closed and immediately shaken vigorously by hand for 1 minute (see annotations on how to prevent the formation of lumps) and centrifuged (e.g. 5 min. 3000 U/min).

Pesticides with acidic groups (e.g. phenoxyacetic acids) interact with amino-sorbents such as PSA. Thus, if such pesticides are within the scope of analysis, their determinative analysis (preferably via LC-MS/MS neg.) should be performed directly from the raw extract after centrifugation but prior to cleanup. For this, an aliquot of the raw extract is filled into a vial (e.g. 200 μ L into a vial with micro-inlay).

Annotations 4:

- The preparation of the salt mixtures can be extremely facilitated using a sample divider (see 3. Devices and Consumables). As an alternative the use of portioning spoons is helpful, although not as precise as the divider.
- By adding the citrate buffering salts most samples obtain pH-values between 5 and 5.5. This pH range is a compromise, at which both, the quantitative extraction of sour herbicides and the protection of alkali labile (e.g. captan, folpet, tolylfluanid) and acid labile (e.g. pymetrozine, dioxacarb) compounds is sufficiently achieved. **For acid rich samples (with pH<3) the pH-value achieved after the addition of buffering salt is normally below 5. To protect acid labile compounds the pH-value can be elevated by adding 5N NaOH: for lemons, limes and currants 600 μ L, for raspberry 200 μ L NaOH solution is needed.**
- In the presence of water, magnesium sulphate tends to form lumps, which can harden rapidly. This can be avoided, if **immediately** after the addition of the salt mixture the centrifuge tube is shaken vigorously for a few seconds. The 1 minute extraction of the entire batch can be performed in parallel after the salts have been added to all the samples.

6.3. Dispersive SPE:

An aliquot of the extract is transferred into a PP-single use centrifugation tube which contains 25 mg PSA and 150 mg magnesium sulphate **per mL** extract (e.g.: for 8 mL extract 200 mg PSA and 1.2 g magnesium sulphate are needed). The tube is shaken vigorously for 30 s and centrifuged (e.g. for 5 min. 3000 U/min).

Annotations 5:

- **Co-extracted fat and waxes** may negatively affect the ruggedness of the GC analysis. The co-extracted fats or waxes can be separated from the extracts to a large extent by putting them in the freezer (more than 1 hour, e.g. overnight). Both is possible, **freezing out** of the raw extract or the final extract after cleanup and acidification. After a short centrifugation, the required amount of the still cold extract is withdrawn. This procedure is for example applicable for **cereals and citrus fruits treated with waxes**. It has been shown that pesticides and the proposed Internal and QC standards are not affected by this step.
Fats can be also effectively removed using **C18 or C8 silica based reversed-phase sorbents** (25 or 50 mg/mL extract respectively) together with PSA and magnesium sulfate in the dispersive SPE step.
- For samples, with a **high content of carotinoides** (e.g. red sweet pepper, carrots) or **chlorophyll** (e.g. spinach, lamb's lettuce, rucola, curly kale, wine leaves und Lactuca varieties except iceberg lettuce), dispersive SPE is performed using a combination of PSA and GCB (**Graphitized Carbon Black**). The cleanup time (shaking) is extended from 30 s to 2 min. It has to be taken into account, that some planar pesticides have a great affinity to the planar structure of GCB. But recovery studies showed, that no noteworthy losses occur, if the extract after dispersive SPE with GCB still maintains some visible amount of chlorophyll or carotinoides. The following amounts of GCB/mL extract can be used (exemplary): a) 2.5 mg for carrots, romana lettuce, head lettuce and the like, or b) 7,5 mg for red sweet pepper, spinach, lamb's lettuce, rucola and the like. Please refer to "Annotations 1" for information as regards the use of internal and QC standards.
- To simplify the procedure it is helpful to prepare a pre-mixture of pulverized (!) $MgSO_4$ and GCB ($MgSO_4$ to GCB: 60:1 in case a) and 20:1 in case b)). The amount of the magnesium sulphate/GCB mixture and PSA to be employed will depend on the volume of raw extract (e.g. 1 mL spinach extract will require $157.5 \approx 160$ mg of the 20:1 mixture and 25 mg PSA).

After centrifugation the cleaned extract is transferred into a screw cap vial and pH is quickly adjusted to ca. 5 by adding a 5 % formic acid solution in acetonitrile (vol/vol) (pro mL extract ca. 10 μ L).

The pH-adjusted extract is filled into vials for gas- and liquid chromatography and is used for further analysis.

Annotations 6:

- Following contact with PSA the pH of the extracts increases reaching measured values of above 8, thus compromising the stability of base sensitive pesticides (e.g. captan, folpet, dichlofluanid, tolylfluanid, pyridate, methiocarb sulfon, chlorothalonil). If the extracts are acidified quickly to pH 5 the degradation of such compounds is reduced significantly so that storage over several days is possible. At this pH acid-labile pesticides (e.g. py-metrozine, dioxacarb, thiodicarb) are also sufficiently stable over several days. Only some very sensitive **sulfonyl urea herbicides**, **carbosulfan** and **benfuracarb** aren't protected sufficiently at pH 5. However, these compounds are stable at the pH of the non-acidified extract (after dispersive SPE) over several days. If these compounds are within the scope of analysis **an aliquot of the non-acidified extract** is used for measurement. If the measurement can be performed quickly, the extract at pH 5 can be used as well. Carbosulfan and benfuracarb (both having individual MRLs) are degraded to carbofuran within the samples as well as in the extracts at pH 5. Thus, merely if carbofuran is present in the acidified extract an additional run of the alkaline aliquot is needed. Normally no residues of sulfonyl ureas are to be expected, because the compounds are very instable and very low doses are used to achieve a sufficient impact in agriculture.
- The final extract has a concentration of ca. 1 g/mL. If GC systems with normal split/splitless injectors are used (injection vol. 1 µL) the limits of detection and determination achieved are in many cases not low enough. **The use of GC-inlets that allow injection of larger volumes (23 µL) and offer the possibility of solvent venting** (e.g. PTV = Programmed Temperature Vaporizer) are thus highly recommended. The solvent venting protects NPD detectors which can be additionally protected by delaying the hydrogen flow into the NPD during the first minutes of a run.
- If large volume injection cannot be performed and the desired detection limits of the compounds of interest cannot be achieved, the **concentration of the extracts** and, if necessary, a solvent exchange may be considered. If GC/MSD is employed a concentration of the extracts by a factor of four should be sufficient. To achieve this e.g. 4 mL of the acidified extract (pH 5) are transferred into a test tube and reduced to ca. 1 mL at 40 °C using a slight nitrogen flow. **Solvent exchange** is an option if GC performance using acetonitril is not satisfactory or if NPD is employed (without PTV-injector). For this, an extract aliquot is evaporated to almost dryness at 40 °C using a slight nitrogen flow (some droplets of a keeper e.g. dodecane can help to reduce losses of the most volatile compounds) and resolved in 1 mL of an appropriate solvent. The blank extract (needed for the preparation of calibration solutions) should be treated the same way.

6.4. Preparation of calibration solutions

To prepare calibration solutions a blank matrix containing no detectable residues of the analytes of interest is necessary. The blank is treated as any other sample, but no ISTD is added. To compensate matrix induced effects during chromatography to a large extent, it is best to choose a matrix of the same sample type (e.g. apple for apple samples, carrots for carrot samples and so on).

An aliquot of the blank extract is fortified with the desired amount of a pesticide or a pesticide mixture and a known amount of ISTD solution is added at approximately the same concentration as in the sample extracts. Pipetting ISTD solution in the very same way as in the sample preparation (same pipette, same volume) will help to minimize systematic errors. This means that a dilution of the ISTD is necessary. For example 1 mL of the blank extract is fortified with 1/10 of the amount of ISTD added to the samples. To reduce matrix induced effects during GC, sample and calibration solutions should have the same concentration of co-extracted matrix components. To ensure this a volume compensation may be necessary. In the case of MRL violations the quantifications is performed as described in 6.5.

6.5. Calibration following the procedure of standard additions

In case of suspected violative residues, or for compounds which are known to cause severe problems during GC (e.g. strong matrix induced effects), the procedure of standard addition is performed for quantification, where several aliquots of the extract are fortified with increasing amounts of the analyte of interest. This procedure requires a knowledge of the approximate concentration of the analyte in question in the sample.

The standard solutions should be miscible with the sample extract solution. Also, all vials should have the same end volume and the same solvent composition.

Pipette scheme 1:

Additions	Vial 1	Vial 2	Vial 3	Vial 4
Sample extract	1000 µl (1 g sample)	1000 µl (1 g sample)	1000 µl (1 g sample)	1000 µl (1 g sample)
ISTD	Already included	Already included	Already included	Already included
Thiabendazole standard solution, (2 µg/mL)	-	100 µL (0.4 µg)	200 µL (0.8 µg)	300 µL (1.2 µg)
Solvent	300 µL	200 µL	100 µL	-
Final volume	1300 µL	1300 µL	1300 µL	1300 µL

(exemplary for an expected thiabendazole concentration of 0.8 mg/kg – or 0.8 µg thiabendazole/1 g sample)

The analyte concentration in the sample is calculated using the area proportions analyte to ISTD as shown in Fig. 1 by calculating the linear regression. It is important to check that the generated standard addition curve is linear since any curvature can influence the slope and thus the result.

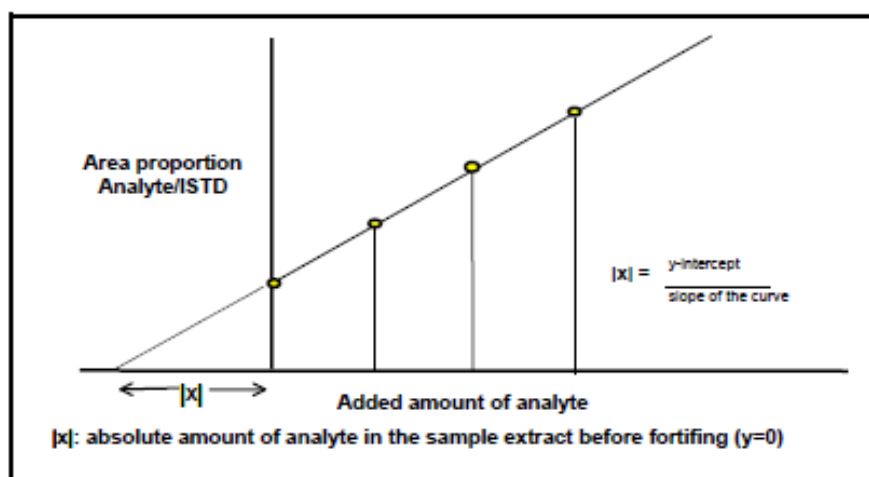


Fig. 1: Internal calibration using the procedure of standard additions, schematically

7. Reference

M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Stajnbaher, F. J. Schenck
Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce, J. AOAC Int., **86** (2003) 412-431

8. Procedure schematical (for 10 g sample)

