

# PŘÍPRAVA VZORKU PRO STANOVENÍ REZIDUÍ PESTICIDŮ V POTRAVINÁCH

JANA HAJŠLOVÁ<sup>a</sup>, VLADIMÍR KOCOUREK<sup>a</sup>,  
JAN POUSTKA<sup>a</sup> a PETR CUHRA<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Ústav chemie a analýzy potravin, Vysoká škola chemicko-technologická, 166 28 Praha 6, e-mail: jana.hajslova@vscht.cz,

<sup>b</sup>Česká zemědělská a potravinářská inspekce, Pobřežní 10, 186 00 Praha 8

Došlo dne 1.IX.1998

## Obsah

1. Úvod
2. Multireziduální metody pro stanovení pesticidů
  - 2.1. Izolace reziduí
  - 2.2. Odstranění koextraktů
3. Experimentální optimalizace gelové permeační chromatografie
4. Závěr

## 1. Úvod

Rezidua pesticidů představují významnou skupinu chemických kontaminantů, které mohou negativně ovlivnit hygienicko-toxikologickou jakost potravin. Je samozřejmé, že sledování těchto škodlivin je nedílnou součástí ochrany konzumentů před nežádoucí dietární expozicí. Aktualizovaná legislativa ČR resp. prováděcí vyhláška<sup>1</sup> k novému Zákonu o potravinách<sup>2</sup> stanovuje v rámci harmonizace s obdobnými předpisy v EU maximální limity reziduí (MLR) pro desítky pesticidů, z nichž mnohé dosud v ČR sledovány nebyly.

Obecně volba relevantní analytické metody s pracovními charakteristikami (mez detekce a stanovitelnosti, selektivita či specifická, rozsah a linearita, přesnost, robustnost) nezbytnými pro řešení příslušného úkolu se odvíjí od následujících aspektů:

Účel analýzy

- kontrola hygienické nezávadnosti (koncentrace reziduí na úrovni hygienických limitů)

- monitoring (sledování typických, požadových koncentrací)
- orientační screening (vyčlenění „negativních“ vzorků, často přímo v terénu)
- výzkum (např. mechanismy degradace, změny při technologickém či kulinárním zpracování)

Povaha rezidua (cílového analytu)

- mateřská sloučenina
- metabolit/degradační produkt (někdy může být toxičtější než mateřská sloučenina)

Znalost „historie“ vzorku

- použité pesticidní přípravky jsou známy
- k dispozici nejsou žádné informace o předsklizňové či posklizňové aplikaci pesticidů

Pokroky v oblasti instrumentace<sup>3,4</sup> (směrování k miniaturizaci, automatizaci, uplatnění netradičních detekčních a konfirmačních principů...) současně s neustále se rozšiřujícím spektrem pesticidních sloučenin a snižujícími se hodnotami hygienických limitů vyvolávají potřebu další optimalizace stávajících a zavádění nových analytických postupů. Předpokladem naplnění tohoto cíle je ovšem komplexní znalost jak vlastností sledovaných sloučenin a složení matric ve kterých se nacházejí, tak i poznání předností i limitujících faktorů jednotlivých technik, které jsou v reziduální analýze aplikovány.

Výše zmíněné aspekty jsou jednou z výzkumných priorit Ústavu chemie a analýzy potravin VŠCHT a jsou řešeny v rámci několika mezinárodních projektů. Tato práce přináší stručný přehled základních informací o problematice sledování pesticidů v biologických matricích, navíc na konkrétním příkladě ilustruje aplikaci teoretických východisek při optimalizaci čistícího kroku, který, jak bude dále zmíněno, zásadně podmiňuje kvalitu získaných výsledků.

## 2. Multireziduální metody pro stanovení pesticidů

Jedním z nejsložitějších zadání je vyšetření vzorku s neznámou historií na přítomnost „všech“ resp. co nejvyššího množství potenciálních reziduí. V úvahu totiž teoreticky připadá stanovení více jak stovky tzv. „moderních“ pesti-

cidů, jejichž použití v zemědělské praxi je registrováno. Současně, zejména u potravin živočišného původu, nelze vyloučit výskyt „klasických“ organochlorových pesticidů a některých jejich metabolitů (látky ze skupiny DDT, hexachlorbenzen, aldrin, dieldrin atd.), které, přestože jejich použití bylo prakticky celosvětově zakázáno, perzistují v životním prostředí a kumulují se v potravních řetězcích. V praxi se často v této situaci využívají tzv. multireziduální metody umožňující současné stanovení velkého množství analytů. Protože pesticidní sloučeniny se vyznačují širokým spektrem fyzikálně chemických vlastností<sup>5</sup> (molekulová hmotnost, polarita, těkavost a další bezprostředně podmiňují jejich „analytické“ chování), nelze pochopitelně pomocí jediného vyšetření dosáhnout optimální přesnosti stanovení pro všechny analyty. Multireziduální postup nabízí vždy kompromis, který zohledňuje též aspekty ekonomické (spotřeba materiálů a chemikálií, časová průsaznost) a celkovou robustnost stanovení.

V literatuře je samozřejmě popsána řada multireziduálních metod<sup>6-16</sup>, každá z nich však pokrývá jen část možných kombinací analyt/matrice. Až na malé výjimky, se používané postupy skládají ze tří základních kroků (pro některé pesticidy je nutné navíc zařadit derivatizaci s cílem zlepšení chromatografických vlastností a často i detektability):

- izolace analytů z matrice,
- odstranění přirozených komponent vzorku koizolovaných spolu s analyty,
- vlastní identifikace a následná kvantifikace analytů.

Zatímco problematikou optimalizace posledního uvedeného kroku (jednoznačně dominantní technikou je zde plynová chromatografie, GLC, v případě velmi polárních či termolabilních pesticidů se využívá vysokoúčinná kapalínová chromatografie, HPLC) byla věnována řada publikací<sup>17-19</sup>; studium otázek přípravy vzorku (zejména optimalizace purifikace primárních extraktů) stále zůstává poněkud stranou pozornosti. Z hlediska dlouhodobého zajištění přesnosti generovaných dat v daném GLC systému, nelze v žádném případě očekávat, že selektivní detekční techniky, jakou je např. hmotnostní spektrometrie, umožní analyzovat jen částečně přečištěné vzorky či přímo čistící krok vypustit. Zásadním problémem, vyplývajícím z přítomnosti netěkavých nečistot je nejenom postupný pokles rozlišení chromatografické kolony, ale i existence matričních efektů<sup>20-22</sup>, které mohou výrazně zkusit správnost výsledků. Nadhodnocení náleží reziduí, pokud se kalibrace provádí pomocí standardů pesticidů rozpuštěných v čistém rozpouštědle, může dosáhnout i několika stovek procent (zdánlivá hodnota výtěžnosti).

Pro úplnost je nutné dodat, že vedle multireziduálních metod existují i speciální (často velmi selektivní) postupy pro jednotlivé pesticidy nebo pro jejich skupiny, které nelze běžnými multireziduálními metodami stanovit. Typickým příkladem jsou fungicidy ze skupiny dithiokarbamatů, které se nepřímo stanovují jako sirouhlík (vzniká při jejich rozkladu v kyselém prostředí). Vedle instrumentálních metod nachází stále častěji využití pro stanovení specifických kontaminantů i metody imunochemické.

## 2.1. Izolace reziduí

Nejběžnějším způsobem izolace reziduí pesticidů je jejich extrakce (někdy po hydrolytickém uvolnění vázaných forem reziduí) organickým rozpouštědlem či jejich směsí (v homogenizátoru, na třepačce či v ultrazvukové lázni). Jejich volba závisí především na obsahu vlhkosti a lipidů ve vzorku; významná je ovšem i polarita rezidua. Při vyšších obsazích vody a nižších koncentracích lipidů (uzanční hranice je 5 %) se uplatňují polární, s vodou mísitelná rozpouštědla s ne příliš vysokými body varu. Jde především o aceton, methanol a acetonitril. Rezidua jsou v takovém případě převedena v následném kroku do nepolárního rozpouštědla (reextrakce). Při tomto postupu dochází k eliminaci nejvíce hydrofilních koextraktů obsažených v primárním extraktu (zůstávají ve vodné fázi). Pokud se k extrakci přímo použijí méně polární rozpouštědla, jako je např. ethylacetát (vzorek se nejprve dehydratuje přidávkem bezvodého síranu sodného), lze zmíněný relativně zdlouhavý reextrakční krok vypustit.

Alternativním způsobem izolace reziduí z pevných i kapalných matric je superkritická fluidní extrakce (SFE)<sup>23-26</sup>. Předností této techniky je nejenom možnost plně automatizace, ale především dosažení vyšší selektivity izolace analytů („čistší“ extrakty) ve srovnání s tradičními extrakčními technikami. Při využití vhodných sorbentů v jmači analytů (trap) je možné získaný extrakt přímo analyzovat bez dalšího přečištění. Průběh extrakce je výrazně ovlivněn obsahem vody ve vzorku, tento se kontroluje přidávkem vhodných desikačních materiálů (např. Hydromatrix). Vedle nejčastěji používaného oxidu uhličitého (mimo příznivých hodnot kritických veličin je jeho předností snadná dostupnost a neškodnost pro životní prostředí) nachází též uplatnění oxid dusný. Extrakční schopnost nadkritické tekutiny se v případě, že nelze docílit účinnou izolaci polárnějších analytů úpravami tlaku resp. hustoty, docíljuje přidávkem modifikátorů, nejčastěji methanolu. Z hlediska rutinní pra-

xe je použití SFE stále ještě ojedinělé, nejvíce se osvědčilo pro analýzu vzorků s nízkým obsahem vody.

Automatizaci a celkově zefektivnění extrakčního kroku nabízí též na trh nedávno zavedená technika extrakce akcelerované mikrovlnami (ASE)<sup>27</sup>. Slibnou izolační technikou se jeví i dialýza přes polymerní membrány<sup>28</sup>.

## 2.2. Odstranění koextraktů

Hlavními koextrakty izolovanými z biotických matic jsou různé typy pigmentů (chlorofyly, karotenoidy, anthokyany...), lipidické sloučeniny (triacylglyceroly, fosfolipidy, vosky...), složky silic, různé pryskyřice a další do organických rozpouštědel extrahovatelné látky.

Frakcionace resp. oddělení těchto látek od analytů se velmi často provádí pomocí adsorpční chromatografie na silikagelu, Florisilu či oxidu hlinitém; buď ve sloupcovém, uspořádání nebo formou extrakce na tuhou fázi (SPE)<sup>29</sup>. Předpokladem úspěšné separace analytů od koextraktů je jejich rozdílná polarita. Z praktického hlediska nevýhodou těchto sorbentů je jednorázové použití čistící kolony.

Alternativní, dnes široce využívaná technika - gelová permeační chromatografie (GPC)<sup>30-34</sup>, vychází z odlišného principu. Frakcionace komponent vzorku na hydrofobním gelu probíhá na základě rozdílů v efektivním molekulovém objemu. Praktické experimenty však potvrzují, že v řadě případů není eluční objem pouze funkcí této veličiny, ale uplatňují se i další fyzikální interakce. Hodnota celkového distribučního koeficientu  $K_T$  je pak vyjádřena vztahem:

$$K_T = K_{SEC} + K_{AD} + K_P \quad (1)$$

kde  $K_{SEC}$  je distribuční konstanta pro vylučovací chromatografii,  $K_{AD}$  je distribuční koeficient adsorpčního mechanismu,  $K_P$  distribuční koeficient dělicího mechanismu.

Podle Shepherd<sup>35</sup> lze chování složek systému analyt - mobilní fáze - gel charakterizovat pomocí tzv. rozpustnostního parametru  $\delta$ , který je pro složku i definován takto:

$$\delta_i = (\Delta E_i / V_{m,i})^{1/2} \quad (2)$$

kde  $\delta_i$  - rozpustnostní parametr,  $\Delta E_i$  - energie vypařování a  $V_{m,i}$  - molární objem látky.

Při zohlednění dalších interakcí, které v systému mohou nastat, lze totální rozpustnostní parametr  $\delta_t$  definovat takto:

$$\delta_t^2 = \delta_d^2 + \delta_o^2 + 2 \delta_{ind} \delta_o + 2 \delta_a \delta_b \quad (3)$$

kde jednotlivé symboly vyjadřují interakce typu:  $\delta_d$  - disperzní,  $\delta_o$  - permanentní dipól,  $\delta_{ind}$  - indukovaný dipól,  $\delta_a$  - proton-donor,  $\delta_b$  - proton-akceptor.

Jednotlivé rozpustnostní parametry jsou pro některá významná rozpouštědla pro ilustraci shrnuta v tabulce I.

Rozpustnostní parametr  $\delta_s$  pro směs rozpouštědel s malou hodnotou směšovacího lze vyjádřit vztahem:

$$\delta_s = \sum_i \Phi_i \cdot \delta_{i,f} \quad (4)$$

Tabulka I  
Rozpustnostní parametry vybraných rozpouštědel a chromatografických materiálů

Rozpouštědlo/ sorbent (gel)	$\delta$	$\delta_o^a$	$\delta_{ind}^a$	$\delta_a^a$	$\delta_b^a$	$\delta_t^{a,b}$
Hexan	7,3	-	-	-	-	7,3
Diethylether	6,7	2,4	0,5	-	3,0	7,3
Cyclohexan	8,2	-	-	-	-	8,2
Ethylacetát	7,7	← 2,6 →		← 3,5 →		8,8
	7,0	4,0	1,0	-	2,7	8,5
Toluene	8,9	-	-	-	0,6	8,9
Tetrahydrofuran	8,2	← 2,8 →		← 3,9 →		9,5
	7,6	3,5	0,8	-	3,7	8,7
Benzen	9,2	-	-	-	-	9,2
Chloroform	8,7	← 1,5 →		← 2,8 →		9,3
	8,1	3,0	0,5	6,5	0,5	9,3
Aceton	6,8	5,1	1,5	-	3,0	9,4
Dichloromethan	8,9	← 3,1 →		← 3,0 →		9,9
Dioxan	7,8	5,2	1,0	-	4,6	9,9
Propan-2-ol	7,7	← 3,0 →		← 0,8 →		11,5
Propan-1-ol	7,8	← 3,3 →		← 8,5 →		12,0
Acetonitril	8,4	6,1	2,1	-	5,2	11,5
	6,5	8,2	2,8	-	3,8	12,5
Ethanol	6,8	3,4	0,5	6,9	6,9	12,5
	7,4	← 0,6 →		← 10,9 →		14,5
Methanol	6,2	4,9	0,8	8,3	8,3	14,4
	-	-	-	-	-	-
Voda	-					cca 23 <sup>c</sup>
Polystyren						9,1-9,4
Sephadex LH-20						cca 12 <sup>d</sup>
Polyakrylamide						>15 <sup>d</sup>
Celulosa						145-165

<sup>a</sup> Hodnota v jednotkách  $(4,19 \cdot 10^6 \text{ J} \cdot \text{m}^{-3})^{1/2}$ , <sup>b</sup> vypočteno ze vztahu (3), <sup>c</sup> celková hodnota vypočtená z dat pro vypařování, <sup>d</sup> odhad

kde  $\Phi_i$  je zlomek vyjadřující zastoupení daného rozpouštědla ve směsi.

Spojením teorie rozpustnostních parametrů s pojetím aktivitních koeficientů v kapalinové chromatografii lze v závislosti na hodnotách rozpustnostních parametrů  $\delta_s$  stacionární fáze (v tomto případě gelu) a mobilní fáze  $\delta_m$  predikovat kapacitní poměr pro distribuci analytu mezi tyto fáze na základě vztahu:

$$\ln K_i = (V_{m,i}/RT)(\delta_m + 6s - 2 \delta_i)(\delta_m - \delta_s) + \ln (n_s/n_m) \quad (5)$$

kde  $n_s$  je látkové množství stacionární a  $n_m$  látkové množství mobilní fáze.

Je zřejmé, že čistě vylučovací mechanismus nastane v systému, kdy  $\delta_m = \delta_s$ .

Popsány byly i další způsoby přečistění vzorků (např. „sweep co-distillation“, mineralizace koncentrovanou kyselínou sírovou atd.), ale tyto jsou ve srovnání s adsorpční chromatografií a GPC používány jen ojediněle.

### 3. Experimentální optimalizace gelové permeační chromatografie

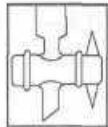
V rámci mezinárodní studie zaměřené na validaci extrakčního kroku metody 12393 navrhované CEN (Euro-

pean Committee for Standardization) pro analýzu reziduí pesticidů v ovoci, zelenině a cereáliích jsme se zabývali optimalizací přečistění primárního extraktu. Zvoleny byly tři modelové matrice lišící se typem hlavních koextraktů reprezentovaných: ve špenátu chlorofylovými barvivy, v mrkvi karotenoidy a v případě jablek kutikulárními vosky. Schéma realizovaných experimentů je na obrázku 1. Do studie byly zahrnuty pesticidy, jejichž rezidua jsou v potravinách nejčastěji nalézána: acephat, brompropylat, captan, carbaryl, chlorfenvinphos, chlorpropham, chlorpyrifos, chlorpyrifos-Me, chlorothalonil, cyhalotrin, diazinon, dichlorvos, dicofol, dimethoate,  $\alpha$ -endosulfan,  $\beta$ -endosulfan, endosulfan sulfát, ethion, etrimfos, fenitrothion, fenvalerat, folpet, imazalil, lindan, malathion, methamidophos, methidathion, methiocarb, mevinphos, omethoat, parathion, parathion-Me, pirimicarb, phosalon, pirimiphos-Me, procymidon, propham, thiabendazol, tolclofos-Me, tolylfluanid, vinclozolin (zdroj: dr. Ehrenstorfer, SRN).

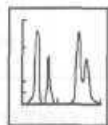
Hlavním cílem studie bylo porovnání parametrů „klasického“ měkkého gelu BioBeads SX-3 s rigidním PI gelem (oba typy gelů jsou styren-divinylbenzenové kopolymery). Srovnávány byly eluční profily koextraktů a skupiny pesticidů při dvou typech mobilních fází. Testována byla též kapacita obou kolon. Obrázek 2 ilustruje nejvýznamnější výstupy našich experimentů. Při použití chloroformu jako mobilní fáze lze předpokládat, viz vztah (5), že hlavním separačním mechanismem bude vylučování resp. chromatografie na základě molekulové hmotnosti, hodnota roz-



**EXTRAKCE:** vzorek + ethylacetát + síran sodný (1:4:2)  $\Rightarrow$  (*Ultra Turrax*)  
 $\Rightarrow$  filtrace, převedení do mobilní fáze pro GPC,  
 cílená kontaminace alikvótního podílu vzorku pesticidy (hladiny reziduí vztažené na matici: 0,05-0,4 mg.kg<sup>-1</sup>)

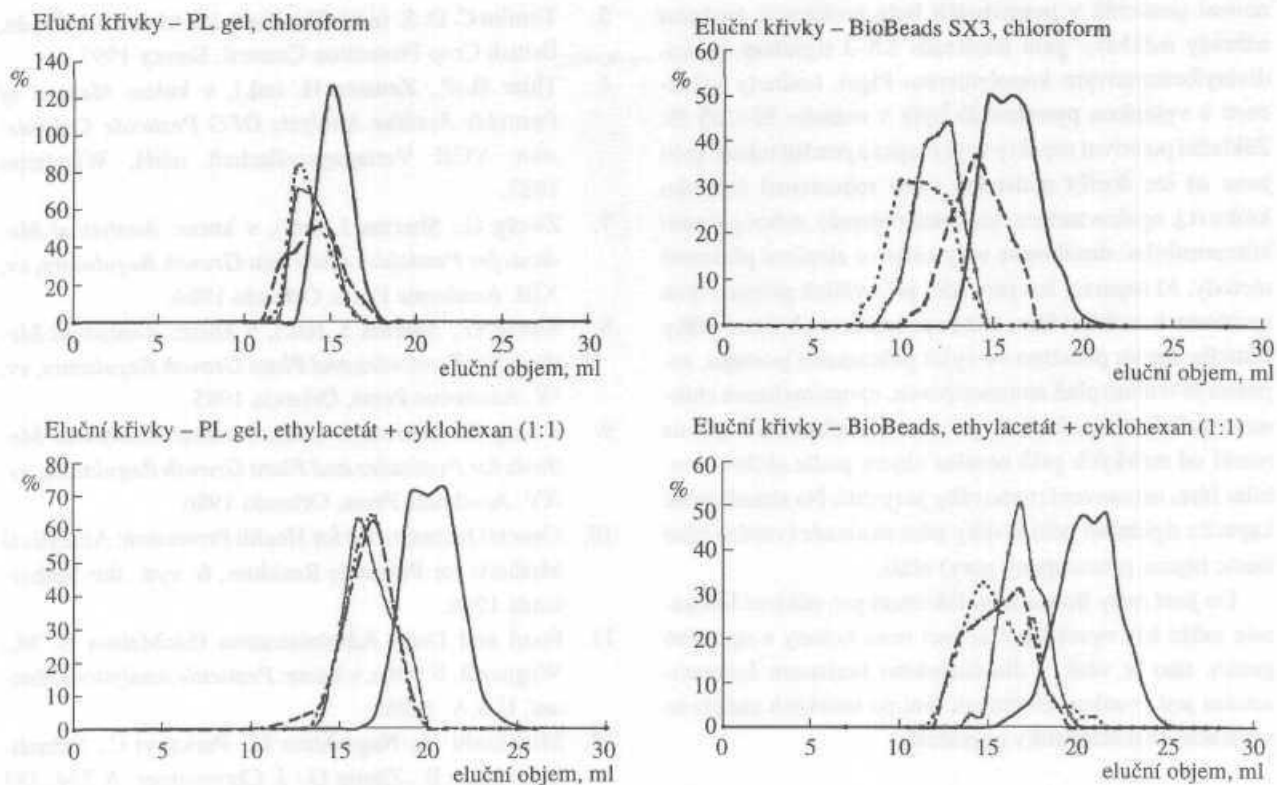


**ČISTĚNÍ:** automatizovaná GPC (ASPEC XL, Gilson, France)  
 kolony: a) BioBeads SX-3 (20-50  $\mu$ m, 500 mm x 10 mm)  
 b) PI gel (10  $\mu$ m; 600 mm x 7,5 mm - PI Laboratories, U.K.)  
 mobilní fáze (0,6-1 ml.min<sup>-1</sup>): a) chloroform  
 b) cyklohexan-ethylacetát (1:1, v/v)



**KVANTIFIKACE:** automatizovaná GLC/ECD/NPD (HP 6890/autosampler ALS 7673)  
 kolona: DB - 5 MS (60 m x 0,25 mm, 0,25  $\mu$ m)  
 splitless nástřik, teplotní program

Obr. 1. Schéma multireziduální metody použité v rámci studie



Obr. 2. Eluční křivky sledovaných složek v různých GPC systémech vyjádřené v % dané složky vnesené na kolonu (celkově nastříknuto: ekvivalent 2 g původní matrice na kolonu BioBeads SX-3 a 0,5 g pro PL gel; ———pesticidy, ———špenát, ———jablka, ———mrkev

pustnostního parametru tohoto rozpouštědla je totiž blízká odhadu pro polystyren, viz tabulka I. Je zřejmé, že chování jednotlivých složek (typy interakcí) v hodnocených systémech je poněkud odlišné, ze záznamů získaných pro BioBeads SX-3 lze usoudit, že vylučovací limit tohoto gelu je v chloroformu nižší než u PL gelu (u měkkých gelů je na rozdíl od rigidních velikost pórů dána stupněm nabotnutí, pro BioBeads SX-3 je maximální v benzenu). Jednotlivé typy koextraktů se potom rozdělí v souladu se svými průměrnými molekulovými hmotnostmi. Čistící efekt dosažený na PL gelu nebyl v tomto systému (chloroform) uspokojivý, zatímco na BioBeads SX-3 bylo možné dosáhnout dobrého přečistění extraktů špenátu a mrkve pro většinu pesticidů s výjimkou relativně vysokomolekulárních pyrethroidů - cyhalothrinu a fenvalerátu, které se eluují mezi prvními. S přihlédnutím k důvodům uvedeným v kapitole 2.2., byla dále zvolena mobilní fáze cyklohexan - ethylacetát (1:1, v/v) s nižší hodnotou rozpustnostního parametru (dle vztahu (6)  $\delta = 8,5$ ), s cílem vyvolat i další typy interakcí a docílit tak požadované separace složek vzorku (chloroform byl z mobilní fáze cíleně eliminován kvůli své

toxicitě). Na obrázku 2 je dokumentován zřetelný posun elučních objemů oproti experimentům s chloroformem, což lze přičíst především předpokládaným sorpčním jevům. Eluční zóna pesticidů na PL gelu se v této mobilní fázi zřetelně rozšířila, nicméně, oddělení koextraktů v tomto systému se zlepšilo a v případě zahájení sběru „pesticidní frakce“ od 17 ml byly získané vzorky účinně přečistěny, na chromatogramech (GLC/ECD či GLC/NPD) nebyly přítomny píky interferující s analyty. V případě kolony s BioBeads SX-3 bylo v systému cyklohexan - ethylacetát (1:1, v/v) docíleno lepšího oddělení jablečných vosků, které v systému s chloroformem byly významně koeluovány s pesticidy, jistého zhoršení naopak doznalo oddělení chlorofylů, které v tomto systému poněkud chvostují a více tak pronikají do pesticidní frakce.

#### 4. Závěr

V rámci optimalizace multireziduální metody resp. při přečistění primárních ethylacetátových extraktů pro sta-

novení pesticidů v potravinách byla prokázána možnost náhrady měkkého gelu BioBeads SX-3 rigidním styren-divinylbenzenovým kopolymerem Plgel, hodnoty výtěžnosti s výjimkou pyrethroidů byly v rozsahu 85-105 %. Základní pozitivní aspekty vyplývající z použití tohoto gelu jsou: a) lze docílit podstatně vyšší robustnosti čistícího kroku (t.j. opakovatelnost elučních objemů), neboť gel není kompresibilní; dosáhne se tedy celkové zlepšení přesnosti metody, b) separaci lze provádět při vyšších průtokových rychlostech mobilní fáze, což se promítá ve zkrácení délky čistícího kroku potažmo ve vyšší průsaznosti postupu, zejména je-li tento plně automatizován, c) optimalizace chromatografických podmínek je velmi flexibilní, Pl gel na rozdíl od měkkých gelů nemění objem podle složení mobilní fáze, ustanovení rovnováhy je rychlé. Na straně druhé kapacita rigidního gelu je díky jeho struktuře (vnitřní části částic nejsou prostoupeny póry) nižší.

Do jisté míry limitujícím faktorem pro některé laboratoře může být vysoká pořizovací cena kolony s rigidním gelem, tato je však v dlouhodobém horizontu kompenzována její vysokou životností (ani po stovkách analýz se separační charakteristiky nezměnily).

*Tato práce byla vypracována v rámci programu EU: Standards, Measurement and Testing (SMT4 CT 95-2030) podpořeného MŠMT v rámci smlouvy OK 191. Poděkování patří též firmě SIPOCH spol. s r.o. za technickou pomoc při zavedení automatizované GPC.*

## LITERATURA

1. Vyhláška Ministerstva zdravotnictví ČR č. 298/1997 Sb., kterou se stanoví chemické požadavky na zdravotní nezávadnost jednotlivých druhů potravin a potravinových surovin, podmínky jejich použití, jejich označování na obalech, požadavky na čistotu a identitu přídatných látek a potravních doplňků a mikrobiologické požadavky na potravní doplňky a látky přídatné.
2. Zákon č. 110/1997 Sb. o potravinách a tabákových výrobcích.
3. Seiber J. N., v knize: *Pesticide Residues and Food Safety: a Harvest of Viewpoints* (Tweedy B. G., Dishburger L. G., Ballantine J., McCarthy J. Murphy, ed.), ACS Symposium Series 446, str. 125. American Chemical Society, Washington 1991.
4. Cairns T., Sherma J., v knize: *Emerging Strategies for Pesticide Analysis*. CRC Press, Boca Raton 1992.
5. Tomlin C. D. S. (ed.): *The Pesticide Manual*, 11<sup>th</sup> edn, British Crop Protection Council, Surrey 1997.
6. Thier H.-P., Zeumer H. (ed.), v knize: *Manual of Pesticide Residue Analysis DFG Pesticide Commission*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim 1987.
7. Zweig G., Sherma J. (ed.), v knize: *Analytical Methods for Pesticides and Plant Growth Regulators*, sv. XIII. Academic Press, Orlando 1984.
8. Zweig G., Sherma J. (ed.), v knize: *Analytical Methods for Pesticides and Plant Growth Regulators*, sv. IV. Academic Press, Orlando 1985.
9. Zweig G., Sherma J. (ed.), v knize: *Analytical Methods for Pesticides and Plant Growth Regulators*, sv. XV. Academic Press, Orlando 1986.
10. General Inspectorate for Health Protection: *Analytical Methods for Pesticide Residues*, 6. vyd., the Netherlands 1996.
11. Food and Drug Administration (McMahon B. M., Wagner R. F., ed.), v knize: *Pesticide Analytical Manual*, U.S.A. 1996.
12. Motohashi N., Nagashima H., Parkanyi C., Subrahmanyam B., Zhang G.: *J. Chromatogr. A* 754, 333 (1996).
13. Andersson A., Palsheden H.: *Fresenius J. Anal. Chem.* 339, 365 (1991).
14. Luke M. A., Froberg J. E., Doose G. M., Masamoto H. T.: *J. AOAC* 64, 1187 (1981).
15. Liao W., Joe T., Cusick W. G.: *J. AOAC* 74, 554 (1991).
16. Lee S. M., Papatkakis M. L., Feng H. C., Hunter G. F., Carr J. E.: *Fresenius J. Anal. Chem.* 339, 376 (1991).
17. Johnson P. D., Rimmer D. A., Brown R. H.: *J. Chromatogr. A* 765, 3 (1997).
18. Newsome W. H.: *J. AOAC Int.* 78, 4 (1995).
19. Fillion J., Hindle R., Lacroix M., Selwyn J.: *J. AOAC Int.* 78, 1252 (1995).
20. Erney D. R., Gillespie A. M., Gilvydis D. M.: *J. Chromatogr.* 638, 57 (1993).
21. Hajšlová J., Holadová K., Kocourek V., Poustka V., Godula M.: *J. Chromatogr. A* 800, 283 (1998).
22. Erney D. R., Pawlowski T. M., Poole C. F.: *J. Chromatogr.* 20, 375 (1997).
23. Khan S. U.: *J. Agric. Food Chem.* 43, 1718 (1995).
24. Snyder J. L., Grob R. L., McNally M. E., Oostdyk T. S.: *Anal. Chem.* 64, 1940 (1992).
25. Lehotay S. J., Eller K. I.: *J. AOAC Int.* 78, 821 (1995).

26. Lehotay S. L., Aharonson N., Pfeil E., Ibrahim M. A.: J. AOAC Int. 78, 831 (1995).
27. Lopez-Avila V., Young R., Teplitzky L.: J. AOAC Int. 79, 142(1996).
28. Kadenczki L., Arpad Z., Gardi I., Ambrush A., Gyorfi L., Reese G., Ebing W.: J. AOAC Int. 75, 53 (1992).
29. Tekel J., Hatrík Š.: J. Chromatogr. A 754, 397 (1996).
30. Sannino A., Mambriani P., Bandini M., Bolzoni L.: J. AOAC Int. 78, 1502(1995).
31. Johnson P. D., Rimmer D. A., Brown R. H.: J. Chromatogr. A 765, 3 (1997).
32. Steinwandter H.: Fresenius Z. Anal. Chem. 331, 499 (1988).
33. Puig D., Barcelo D.: J. Chromatogr. A 673, 55(1994).
34. Vreuls J. J., Swen R. J. J., Goudriaan V. P., Kerkhoff M. A. T., Jongenotter G. A., Brinkman U. A Th.: J. Chromatogr. A 750, 275 (1996).
35. Shepherd M. J.: v knize: *Size Exclusion and Gel Chromatography: Theory, Methodology and Application to the Clean-up of Food Samples for Contaminant Analysis* (Gilbert J., ed.). MAFF, London 1984.

**J. Hajšlová<sup>a</sup>, V. Kocourek<sup>a</sup>, J. Poustka<sup>a</sup>, and P. Cuhra<sup>b</sup>** (*<sup>a</sup>Department of Food Chemistry and Analysis, Institute of Chemical Technology, <sup>b</sup>Czech Food and Agriculture Inspection, Prague*): **Sample Handling in Analysis of Pesticide Residues in Foodstuffs**

To get a good precision of data generated determination of pesticide residues in foodstuffs, an efficient clean-up of primary extracts has to be carried out. In our experiments, automated (ASPEC XL, Gilson, France) gel permeation chromatography was used for purification of ethyl acetate extracts of spinach, carrots and apples which were spiked by 42 pesticides (0.05-0.4 mg.kg<sup>-1</sup>) currently detected in respective crops. The advantages of rigid Pl gel over soft BioBeads SX-3 were demonstrated. In system consisting of a Pl gel column (10 mm, 600 x 0.75 mm) with ethyl acetate-cyclohexane (1:1, v/v) as a mobile phase, good efficiency and high repeatability of clean-up step were obtained, the recoveries of pesticides ranging from 70 to 105 %.