

SÚČASNÉ METÓDY A NOVÉ TRENDY V IZOLÁCII REZÍDUIÍ PESTICÍDOV Z BEZTUKOVÝCH POTRAVIN

MICHAL KIRCHNER a EVA MATISOVÁ

*Katedra analytickej chémie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU, Radlinského 9, Bratislava 812 37
matisova@chtf.stuba.sk*

Došlo 12.6.03, prepracované 28.9.03, prijaté 17.10.03.

Kľúčové slová: reziduá pesticídov, beztukové potraviny, izolačné a čistiace techniky

Obsah

1. Úvod
2. Izolačné techniky
 - 2.1. Extrakcia kvapalina-kvapalina
 - 2.2. Superkritická fluidná extrakcia
 - 2.3. Urýchlená rozpúšťadlová extrakcia
 - 2.4. Disperzia matrice na tuhej fáze
3. Čistiace techniky
 - 3.1. Extrakcia tuhou fázou
 - 3.2. Gélová permeačná chromatografia
 - 3.3. Mikroextrakcia tuhou fázou a sorpčná extrakcia na miešadielkach
 - 3.4. Priame zavedenie vzorky
4. Záver

1. Úvod

Používanie pesticídov v modernom poľnohospodárstve je bežná prax zabezpečujúca ochranu rastlín, úrody, zvyšovanie výnosnosti poľnohospodárskej pôdy a kvality poľnohospodárskych produktov. Na druhej strane sú známe nepriaznivé účinky pesticídov na životné prostredie, živočíchy a človeka, čo vyústilo do potreby sledovania ich používania a kontroly rezíduí pesticídov a ich metabolitov v poľnohospodárskych produktoch.

Zložitosť problematiky analýzy rezíduí pesticídov vyplýva z rôznorodosti ich fyzikálno-chemických vlastností, stopovej až ultrastopovej koncentrácie a z rôznorodosti potravinových matric. V minulosti bolo publikovaných mnoho metód na stanovenie rezíduí pesticídov a niektoré z nich sú zavedené v normách (napr. Slovenská technická norma, ktorá je totožná s európskou normou STN EN 12393 – *Beztukové potraviny, Multireziduálne metódy na stanovenie rezíduí pesticídov plynovou chroma-*

tografiou alebo STN EN 1528 – *Tukové potraviny, Stanovenie pesticídov a polychlórovaných bifenyllov (PCB)*). Maximálne reziduálne limity definované jednotlivými štátmi a medzinárodnými organizáciami sa postupne sprísňujú, napr. MRL (maximálny reziduálny limit, maximal residual limit) v detskej výžive bol Európskou úniou dočasne určený na hranici 0,01 mg.kg⁻¹. Táto koncentrácia je z hľadiska súčasných používaných metód veľmi nízka a je potrebné prehodnotiť analytické metódy na prípravu vzorky a stanovenie rezíduí pesticídov v rôznych matriciach. Postupom času pribudli aj environmentálne a hygienické požiadavky na analytické metódy spočívajúce predovšetkým v znižovaní spotreby rozpúšťadiel a eliminácii chlórovaných rozpúšťadiel. Pribudli aj ekonomické požiadavky znižovania ceny analýzy a potreba zvyšovania počtu spracovaných vzoriek v kontrolných laboratóriách. Staršie analytické postupy však týmto požiadavkám nevyhovujú, čo spolu s dostupnosťou nových materiálov a prístrojov vedie k neustálemu vývoju nových metód stanovenia rezíduí pesticídov v potravinách.

Tento článok si kladie za cieľ poskytnúť čitateľovi prehľad o moderných metódach úpravy vzorky v analýze rezíduí pesticídov publikovaných v posledných rokoch predovšetkým v ovocných a zeleninových matriciach.

2. Izolačné techniky

Základom úspešnej analytickej metódy stanovenia rezíduí pesticídov je selektívna izolačná technika schopná izolácie s výťažnosťou rezíduí pesticídov blížiacou sa 100 % a zároveň minimálnym množstvom koextrahovaných látok z matrice. Pri uvážení širokého rozpätia polarít pesticídov a komplexnosti matric je logická potreba kompromisu. V nasledujúcich kapitolách je zhodnotený súčasný stav izolačných techník a ich kombinácie s čistiacimi postupmi.

2.1. Extrakcia kvapalina-kvapalina

V multireziduálnych metódach (MRM) na izoláciu rezíduí pesticídov z matric ovocia a zeleniny (ktoré sa líšia obsahom vody, cukrov, tukov a iných látok) je potrebné použiť rozpúšťadlo schopné vyextrahovať pesticídy širokého rozpätia polarít¹. Najbežnejšie používané rozpúšťadlá sú acetón, acetonitril a etylacetát. Všetky spomenuté rozpúšťadlá sú miešateľné s vodou, takže extrakčným činidlom je ich zmes s vodou, čo uľahčuje ich penetráciu do

Z dôvodu absencie slovenských názvov niektorých pesticídov sú v publikácii všetky pesticídy nazvané anglicky.

bunkových štruktúr a zvyšuje účinnosť extrakcie. Zvyčajne sa extrakcia reziduí pesticídov uskutočňuje za rozrušenia matrice vzorky vo vysokorýchlostnom homogenizátore (napr. Ultra Turrax) v prítomnosti rozpúšťadla, prípadne trepaním alebo použitím ultrazvuku. V niektorých prípadoch sa na zvýšenie výťažnosti extrakcie alebo zlepšenie stability pesticídov v roztokoch osvedčila úprava matrice prídavkom tlmivého roztoku na pH 4,5 (cit.²⁻⁴).

Acetónová extrakcia je základom Lukeovej metódy⁵. Stan jej modifikáciu validoval pre viac ako 400 pesticídov⁶. Acetón má určité výhody nad ostatnými rozpúšťadlami, je netoxický, neobmedzene miešateľný s vodou, dá sa ľahko prečistiť a je lacný. Avšak jeho použitím sa vyextrahuje zo vzorky aj veľké množstvo koextraktantov⁴. Ďalšou nevýhodou je potreba následnej reextrakcie (liquid-liquid partitioning) do nepolárneho rozpúšťadla, ktorým býva toxický dichlórmetán⁵, zmes etylacetátu s cyklohexánom^{7,8}, alebo hexán⁹. Reextrakciu sa však reextrahujú aj tuky a vosky a získaný extrakt je potrebné ďalej prečistiť. Následnú reextrakciu eliminovali niektorí autori priamou extrakciou zmesou acetón-dichlórmetán¹⁰, acetón-hexán^{11,12} alebo acetón-dichlórmetán-hexán^{2,3}. Modifikáciou reextrakcie v oddeľovacom lieviku je použitie klasickej kolónovej kvapalinovej chromatografie so sorbentom kremelinou. Pesticídy sa elujú z kolóny dichlórmetánom, prípadne jeho zmesou s iným nepolárnym rozpúšťadlom¹³.

V prípade extrakcie acetonitrilom sa voda zo zmesi oddelí jednoduchým vysolením (NaCl, MgSO₄)^{4,14-16}. Acetonitril zo vzorky nevyextrahuje lipofilné látky ako tuky a vosky, takže získaný extrakt je relatívne čistý¹. Na druhej strane nevýhodou acetonitrilu je jeho toxicita a cena.

Etylacetátová extrakcia v prítomnosti bezvodého síranu sodného je považovaná za menej prácnu a poskytuje porovnateľné výťažnosti reziduí ako acetónová extrakcia^{17,18}. Etylacetát je len obmedzene miešateľný s vodou a preto nie je potrebná žiadna reextrakcia do nepolárneho rozpúšťadla. Voda prítomná v matrici sa jednoducho viaže bezvodým síranom sodným, ktorý sa s matricou mieša v pomere 1:1. Obana^{19,20} úspešne použil na viazanie vody zo vzorky polymér akrylovej kyseliny Aquapearl A3 a metódu overil pre 110 pesticídov s výťažnosťou viac ako 80 %. Etylacetát však pre svoju nízku polaritu vyextrahuje aj relatívne veľké množstvo tukov a voskov²¹, na druhej strane je však kompatibilný s mobilnou fázou používanou v gélovej permeačnej chromatografii (GPC) (zmes etylacetát-cyklohexán), čo zjednodušuje čistiaci proces.

2.2. Superkritická fluidná extrakcia

Superkritická fluidná extrakcia (Supercritical Fluid Extraction – SFE) je zaujímavou alternatívou k rozpúšťadlovým extrakciám. Jedinečné vlastnosti superkritickej tekutiny (na rozhraní plynu a kvapaliny) uľahčujú jej difúziu do matrice vzorky a umožňujú rýchlu extrakciu²². Pre

svoje veľké výhody sa najčastejšie ako superkritická tekutina používa CO₂ (pomerne nízke superkritické podmienky teploty a tlaku, cena, čistota, nehorľavosť, netoxickosť, inertnosť).

Vo vývoji metódy SFE je potrebné optimalizovať nasledujúce parametre: prídavok dehydratačného činidla, tlak a teplotu v extrakčnej komôrke, typ a množstvo modifikátora, statický a dynamický čas extrakcie, prietok superkritickej tekutiny, druh zachytávača analytov a desorpčné činidlo. Priebeh SFE je veľmi ovplyvňovaný obsahom vody²³ a svojou povahou metóda nie je vhodná na priamu extrakciu „mokrych“ vzoriek²⁴, preto je potrebné matricu ovocia a zeleniny lyofilizovať²⁵, alebo jednoduchšie upraviť dehydratačným činidlom. Bežne sa na tento účel používajú: Hydromatrix²⁶, Extrelut²⁷, bezvodý síran sodný²⁵ a Celite, alebo ich zmesi^{24,28,29}. Vhodnosť použitia vybraného dehydratačného materiálu je však potrebné overiť, pretože môže zachytávať niektoré pesticídy³⁰. Voľba hustoty superkritickej tekutiny ovplyvňuje tlakom a teplotou určuje selektivitu extrakcie. Avšak na účinnú extrakciu širokého spektra pesticídov a rozrušenie väzby s matricou je potrebné zvoliť dostatočne tvrdé podmienky, čo na druhej strane zvyšuje množstvo koextrahovaných interferujúcich súčastí matrice. Krátky statický čas extrakcie môže zvýšiť výťažnosť problematických analytov a dynamický čas je vlastne mierou množstva extrakčnej superkritickej tekutiny, ktorá prejde cez vzorku. Výťažnosti polárnych pesticídov (napr. acephate, omethoate, vamidothion)²⁹ sa zvyšujú použitím polárnych modifikátorov superkritickej tekutiny, ako metanol, acetonitril^{26,27}, dichlórmetán²⁶, acetón²⁴ (čo významne znižuje selektivitu extrakcie), alebo dvojstupňovou extrakciou²⁹. Superkritická tekutina preteká z extrakčnej komôrky cez restriktor, v ktorom sa znižuje tlak a skupenstvo sa mení na plynné, za restriktorom nasleduje zachytávač, ktorého úlohou je zachytiť analyty. Ako zachytávač sa môže použiť prázdna vialka, rozpúšťadlo alebo rúrka naplnená tuhým materiálom (sklené guličky), alebo sorbentom. Lehotay a Valverde-García²⁸ skúmali využitie rôznych sorbentov a rozpúšťadiel ako zachytávačov a desorpčných činidiel. Najvýhodnejšia kombinácia je oktadecylsilánový (C18) zachytávač a acetón, ktorý dokázal analyty desorbovať objemom menším ako 1 ml. Použitie rozpúšťadla ako zachytávača je problematickejšie, pretože prúdiaci plyn cez rozpúšťadlo prebubláva a sústavne ho odparuje, čím nastáva aj čiastočná strata prechádzajúcich pesticídov.

Najväčšou výhodou SFE je možnosť vysokej selektivity extrakcie, získaný extrakt je relatívne čistý a navyše je aj zakonzentrovaný. SFE používa len malé množstvá organických rozpúšťadiel a je plne automatizovaná.

Napriek nesporným výhodám je SFE len sporadicky používaná v skúšobných laboratóriách na extrakciu reziduí pesticídov²⁴. Tento stav je spôsobený predovšetkým pomerne vysokou zaobstarávacou cenou nevyhnutnej inštrumentácie, potrebou optimalizácie veľkého počtu parametrov pre každú matricu (účinnosť extrakcie je mimoriadne závislá na vlastnostiach matrice a polarite pesticídov) a navyše extrakčné podmienky zistené optimalizáciou

Tabuľka I

Prehľad optimalizovaných parametrov superkritickej fluidnej extrakcie (SFE) pre skúmané matrice a analyty

Pesticídy	Matrice	Vysušovacie činidlo	Tlak, teplota prietok CO ₂ doba extrakcie	Zachytávač rozpúšťadlo	Lit.
92 pesticídov OCP ^a , OPP ^b , ONP ^c	jablká	celite a Na ₂ SO ₄	189 bar, 40 °C 2,5 ml.min ⁻¹ 10 min	C18 ^d hexán-acetón,	29
Fenpyroximate	jablká	hydromatrix	100 bar, 90 °C 2 ml.min ⁻¹ 15 min	100 ml acetonitril	31
Carbendazime, benomyl, thiophate methyl, 2,4-D ^e	citrusy, jablká, šalát, mango, pa- paya, šampióny, jahody	–	329 atm, 50 °C 0,4 ml.min ⁻¹ 25 min	C18 cyklohexán-etylacetát	32
10 chlóracetanilidov pyriminobac-methyl	jahody, japonská red'kovka, špenát, sója, kukurica, hnedá ryža	celite a arasorb S310	300 kg.cm ⁻² , 40 °C 4,9 ml.min ⁻¹ 40 min	Bon Elut SAX ^f + PSA ^g acetón-hexán	24
11 OCP a OPP	jahody	lyofilizácia alebo Na ₂ SO ₄	0,86 g.ml ⁻¹ 3 ml.min ⁻¹	sklené guľičky 0 °C hexán	25
56 pesticídov	pomaranče, batáty, zelená fazuľka	MgSO ₄ a hydro- matrix	350 bar, 50 °C 2 ml.min ⁻¹ 20,3 min	C18 acetón	28
58 pesticídov	rajčiny	celulóza CF-1	350 bar, 50 °C 2 ml.min ⁻¹ 20,3 min	C18 acetonitril	30
71 pesticídov	jablká	MgSO ₄ a hydro- matrix	320 bar, 50 °C methanol	C18 acetonitril	33
Carbofuran, atrazine, metolachlor, chlorpyrifos	detská výživa	hydromatrix	2205 psi, 70 °C 1 ml.min ⁻¹ 60 min	–	26

^aOCP – organochlórované pesticídy, ^bOPP – organofosforové pesticídy, ^cONP – organodusíkové pesticídy, ^dC18 – oktadecylsilánový sorbent, ^e2,4-D – (2,4-dichlorfenoxy) octová kyselina, ^fSAX – silný menič aniónov, ^gPSA – primárny a sekundárny amín

obohatených (spikovaných) vzoriek sú často nedostatočné na izoláciu pesticídov z reálnych vzoriek (pesticídy sú v reálnych vzorkách viazané silnejšie)²². V tabuľke I je sumarizovaný prehľad optimalizovaných pracovných podmienok SFE pre rôzne matrice.

2.3. Urýchlená rozpúšťadlová extrakcia

Urýchlená rozpúšťadlová extrakcia (Accelerated Solvent Extraction – ASE alebo Pressurized Liquid Extraction – PLE) je založená na extrakcii rozpúšťadlom pri zvýšených teplotách (asi do 200 °C na urýchlenie extrakcie) a

vysokých tlakoch (do 20 MPa na udržanie rozpúšťadla v kvapalnom stave). Výhodou ASE je krátky čas extrakcie, dostatočnú výťažnosť možno dosiahnuť do 10 min, možnosť automatizácie a významné zníženie potrebného množstva rozpúšťadla^{34–36}. Na druhej strane obstarávacia cena inštrumentácie je vysoká a získaný extrakt obsahuje vysoké množstvo koextrahovaných látok a je potrebné ho intenzívne prečistiť^{27,36,37}, čo zrejme obmedzí rozšírenie tejto techniky v multireziduálnych metódach analýzy pesticídov v potravinách. Prehľad parametrov ASE a skúmaných kombinácií matrice/analyt z publikovaných prác je uvedený v tabuľke II.

Tabuľka II
Metódy izolácie pesticídov metódou ASE

Pesticídy	Matrice	Sušiacie čínidlo	Extrahovadlo tlak teplota	Čistenie extraktu	Separácia/ detektor	LOD ^a [mg.kg ⁻¹] výťažnosť (konc. hladina)	Lit.
Chlórbenzény, DDX ^b	jahody, jablká, rajčiny, kaleráb, šalát	celulóza	voda-acetón 90:10 (v/v) 10 MPa 120 °C	centri- fugácia, SBSE ^c SPME ^d	GC ^e MS ^f -SIM ^g	0,0005 až 0,005	34
N-Metyl- karbamáty	banány, citrusy, zelená fazuľka, brokolica, melón, mrkva	extrelut	acetonitril 1,74 MPa 100 °C	vysolenie, kolónová LC ^h	HPLC ⁱ fluorescenčná (pokolónová derivatizácia)	> 85 % 5 mg.kg ⁻¹	35
19 OPP	grapefruit, brokolica	extrelut	cyklohexán- acetón 2,1 MPa 100 °C	reextrakcia hexánom, GPC	GC ^e FPD ^j	> 84 % 0,1 mg.kg ⁻¹	36
Chlorpyrifos, malathion, 3 DDX ^b	detská výživa, broko- lica, mrkva, zelená fazuľka, syr	extrelut, Na ₂ SO ₄ , piesok	acetonitril 1,74 MPa 80 °C	SPE GCB ^k	GC ^e MS ^f	> 95 % 0,005 mg.kg ⁻¹	27

^aLOD – medza detekcie, ^bDDX – 1,1-dichlór-2,2-bis(4-chlórphenyl)etán, ^cSBSE – miešadielková sorpčná extrakcia, ^dSPME – mikroextrakcia tuhou fázou, ^eGC – plynová chromatografia, ^fMS – hmotnostná spektrometria, ^gSIM – selektívne monitorovanie iónov, ^hLC – kvapalinová chromatografia, ⁱHPLC – vysoko účinná kvapalinová chromatografia, ^jFPD – plameňovo fotometrický detektor, ^kSPE GCB extrakcia tuhou fázou s použitím grafitizovaného uhlíka, ostatné skratky ako v tab. I

2.4. Disperzia matrice na tuhej fáze

Disperzia matrice na tuhej fáze (Matrix Solid Phase Disperzion – MSPD) je novšia izolačná technika publikovaná v roku 1989 Barkerom³⁸. Rozmixovaná vzorka sa v sklenej alebo achátovej trecej miske jemne rozťiera so sorbentom (približne 1–5 min), matrica sa rozruší a disperguje sa na povrchu sorbentu, čím sa získa sypká zmes. Následne sa zmes naplní do prázdnej kolónky, sformuje sa chromatografický stĺpec a analyty sa elujú rozpúšťadlom. Takáto zmes má jedinečné chromatografické vlastnosti zabezpečené komplexnosťou interakcií v sústave analyt – sorbent – matrica – elučné činidlo³⁹.

Na izoláciu rezíduí pesticídov z ovocných a zeleninových matric sa skúmali rôzne sorbenty a najlepšie výsledky boli dosiahnuté použitím SPE sorbentov C8, C18 (cit.^{40–43}) a adsorbentu Florisil⁴⁴ (kremičitan horečnatý). Barker³⁹ odporúča pomer vzorka : sorbent = 1:4, avšak mnohí autori pracujú s pomerom 1:1 (napr. 0,5 g vzorky a 0,5 g sorbentu). Pesticídy sa elujú relatívne malým objemom rozpúšťadla (10–15 ml), najčastejšie sa používa etylacetát^{41,42} alebo dichlórmetán^{40,43,44}. Získaný extrakt je zvyčajne dostatočne čistý a stačí ho zahustiť na objem približne 0,5 ml (cit.^{40–43}).

MSPD je jednoduchá technika spájajúca izoláciu a čistenie v jednom kroku, používa malý objem organického rozpúšťadla a je nenáročná na inštrumentáciu. Dosiahnuté medze detekcie a stanovenia sú na veľmi dobrej úrovni. Avšak pri izolácii pesticídov širokého spektra polarít môžu nastať problémy s výťažnosťou najnepolárnejších, alebo najpolárnejších látok, čo sa dá odstrániť použitím viacerých rozpúšťadiel³⁹. Prehľad niektorých publikovaných MSPD metód je uvedený v tabuľke III.

3. Čistiace techniky

Použitím ktorejkoľvek extrakčnej techniky sa z matrice vyextrahuje rôzne množstvo látok, ktoré rušia stanovenie analytov tým, že spôsobujú interferencie s analytmi alebo znečisťujú a opotrebovávajú analytickú inštrumentáciu, čo zvyšuje náklady na jej údržbu^{48,49}. V prípade chromatografických metód sú to látky elujúce z kolóny aj v rovnakom čase ako analyty. Použitím selektívnych detektorov (NPD, ECD) môžu poskytovať signál zdanlivo prislúchajúci analytu⁴⁹. Tento jav sa dá eliminovať použitím selektívnejšieho detektora ako napr. tandemový MS/MS (cit.^{49–52}), pulzný plameňovo-fotometrický detektor^{53,54}

Tabuľka III

Metódy izolácie pesticídov technikou MSPD^a z ovocných a zeleninových matric

Pesticídy	Matrica hmotnosť	Sorbent /hmotnosť elučné činidlo/objem	Separácia detektor	LOD/ <i>LOQ</i> ^b [mg.kg ⁻¹]	Lit.
Dichloran, flutriafol, 2-phenyl-phenol, prochloraz, tolclofos methyl	pomaranče, citróny, banány, paprika, cibuľa 0,5 g	C8 0,5 g dichlórmetán 10 ml	HPLC MS-APCI ^c	0,01–0,10	43
Bitertanol, carbendazime, fenthion, flusilazole, hexythiazox, imidacloprid, methidathion, methiocarb, pyriproxyphen, trichlorfon	pomaranče 0,5 g	C8 0,5 g dichlórmetán 10 ml	HPLC MS-APCI ^c	0,008–0,30	45
10 OPP, permethrin	pomaranče, jablká, hrušky, hrozno 25 mg	C8 25 mg etylacetát 100 µl	GC MS-SIM	0,004–0,09	42
12 OPP	citrusy 0,5 g	C18 0,5 g etylacetát 10 ml	GC MS-SIM	0,05–0,10	41
13 fungicídov a insekticídov	jablká, pomaranče, hrušky, rajčiny, šalát, paprika 0,5 g	C18 0,5 g dichlórmetán-metanol 80:20 (v/v)	GC MS-SIM GC ECD ^d	0,01–0,05 0,02–0,2	46
Benfuracarb, diflubenzuron, flufenoxuron, hexaflumoron, hexythiazox	citrusy 0,5 g	C8 0,5g dichlórmetán 15 ml	HPLC UV ^e	0,15–0,25	40
Chlorfenvinvos, chlorpyrifos, fenarimol, iprodione, procymidone, propiconazole, tetradifon, triadimefon, vinclozolin	artičoky, zelená fazuľka, šalát, rajčiny 5 g	florisil 10 g + 8 g piesok dichlórmetán 100 ml	GC MS-SIM	0,007–0,04	38

^aMSPD – disperzia matrice na tuhej fáze, ^b*LOQ* – medza stanovenia, ^cAPCI – ionizácia pri atmosferickom tlaku, ^dECD – detektor elektrónového záchytu, ^eUV – absorpčný detektor v ultrafialovej oblasti, ostatné skratky ako v tabuľke I

– PFPD alebo viacrozmerného separačného systému, v poslednom čase predovšetkým úplná dvojrozmerná GCXGC (cit.⁵⁵) (comprehensive two-dimensional gas chromatography). Problémom je veľmi vysoká nadobúdacia cena takýchto zariadení, ale aj potreba vysoko odborne vzdelaného personálu. V plynovej chromatografii vyextrahované vysokomolekulové neprchavé látky (tuky, vosky, živice, pigmenty, sacharidy a iné) znečisťujú priestor dávkovacej komôrky, znehodnocujú chromatografickú kolónu a spôsobujú matricové efekty zvyšovania odozvy analytov.

Je dôležité poznamenať, že čistiaci proces nesmie významnou mierou prispievať k stratám už izolovaných rezíduí a celková výťažnosť izolačnej a prečisťovacej metódy by mala byť vyššia ako 80 %. Väčšina publikovaných metód spĺňa toto kritérium, avšak celkové porovnanie výťažností jednotlivých metód je obtiažne, pretože výťažnosti pesticídov sú úzko spojené s ich fyzikálnochemickými vlastnosťami.

Všetky uvedené faktory implikujú potrebu čistenia extraktov reálnych vzoriek za účelom zvyšovania správ-

nosti analytických výsledkov, znižovania medzí detekcie a stanovenia a v neposlednom rade aj predlžovania životnosti analytickej inštrumentácie. V nasledujúcom texte sú zhrnuté prečisťovacie techniky používané v multi-reziduálnych metódach stanovenia rezíduí pesticídov.

3.1.1. Extrakcia tuhou fázou

Princíp extrakcie tuhou fázou (Solid Phase Extraction – SPE) vychádza z kvapalinovej chromatografie, funkčné skupiny sorbentu a rozpúšťadla vytvárajú interakcie so súčasťami roztoku a selektívne zadržiavajú analyty, alebo koextraktanty, alebo oboje. Následne sa eluujú analyty a nečistoty zostávajú v kolónke, alebo sa najskôr odstránia nečistoty a potom sa vyeluujú analyty. Jednoduchosť, nenáročnosť, nižšia spotreba rozpúšťadiel, možnosť automatizácie a používanie jednorázových kolóniek robia SPE veľmi populárnou.

Historicky najstaršie, ale stále používané, sú adsorbenty Florisil, silikagél a menej alumina (oxid hlinitý).

Najčastejšie sa na prečisťovanie extraktov používa Florisil^{9,13,55,57,58}, z extraktov odstraňuje polárne koextraktanty a tuky. Nepolárne a málo polárne pesticídy sa takmer kvantitatívne eluujú nepolárnym rozpúšťadlom a získané extrakty sú dostatočne čisté¹. Pang a spol.⁹ použili na elúciu pyretroidov 6% roztok dietyléteru v hexáne a Morelli-Cardoso a spol.⁵⁸ použili na elúciu organochlórovaných pesticídov 10% éter v hexáne. Problémy súvisiace s použitím Florisilu sú spojené hlavne s jeho správnou deaktiváciou vodou. Pri prílišnej deaktivácii nenastáva dostatočné prečistenie a pri nedostatočnej deaktivácii nastáva zase silnejšia retencia pesticídov. Pri prečistení organochlórovaných pesticídov sa ukázala ako optimálna 4 % deaktivácia Florisilu vodou.

Silikagél je menej efektívny na odstránenie koextrahovaných súčastí matrice ako Florisil alebo alumina¹. Používa sa hlavne na frakcionáciu skupín pesticídov podľa polarít, ale aj na oddelenie chlórovaných pesticídov a polychlórovaných bifenyllov, čo je však pri súčasnej separačnej účinnosti kapilárnych kolón vo vysokorozlišovacej GC (cit.⁶) (HRGC – High Resolution Gas Chromatography) a použitím vysokoselektívnych detektorov⁵⁹ nepotrebné.

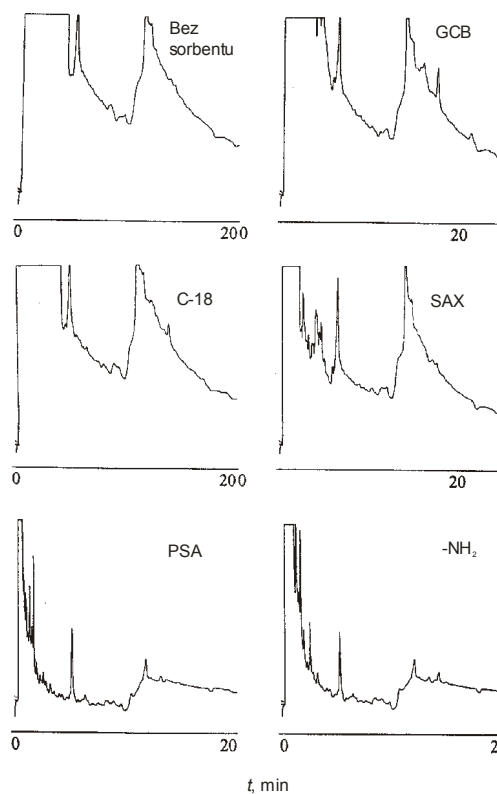
Alumina je odporúčaná predovšetkým na prečisťovanie extraktov zo vzoriek s vysokým obsahom tukov. Alumina rozkladá niektoré organofosforové pesticídy a polárne pesticídy z nej nie je možné kvantitatívne vylučovať¹.

Novšími materiálmi v SPE sú rôzne typy uhlíkových sorbentov^{60,61}. Na prečisťovanie extraktov pesticídov z ovocných a zeleninových matric sa používajú predovšetkým sorbenty na báze grafitizovaného uhlíka^{16,19,20,49,51,62–64}, ale sú publikované aj metódy s aktívnym uhlíkom⁶⁵, membránami z aktívneho uhlíka⁶⁶ a dreveným uhlím¹⁴. Na elúciu pesticídov je potrebné použiť organické rozpúšťadlo s prídavkom toluénu (25–30 %). Z extraktov účinne odstraňujú predovšetkým rastlinné pigmenty^{12,19,20,49,62,66}. Ako však ukázali posledné výskumy, uhlíkové sorbenty neodstraňujú takmer žiadne látky chromatograficky interferujúce s pesticídmi⁴⁹ a ani významne neredukujú injektorové matricové efekty v GC (cit.⁶³). Navyše grafitizovaný uhlík vykazuje silnú afinitu k pesticídov s planárnou štruktúrou a elektrón-donornými vlastnosťami (benzénovými kruhmi bez objemnejších substituentov, napr. folpet, hexachlórbenzén, quintozen, chlorbensid, nitrofen, desethylatrazin), čo vedie k ich významným stratám počas čistiacieho kroku⁶⁶.

Ako alternatíva ku kvapalinovej reextrakcii pri acetónovej extrakcii boli použité zmesné sorbenty, (C18 – okta-decylsilánový, CN – kyanopropylový sorbent). Na efektívne zachytenie pesticídov širokého spektra polarít na zmesnom sorbente C18 a CN je potrebné získaný acetónový extrakt zriediť vodou (tak aby sa získal pomer acetón : voda 3:7 (v/v)) a použiť vysolovanie. Pesticídy je následne možné eluovať z kolónky 20 ml etylacetátu⁶⁷. V dvoch podobných semiautomatizovaných metódach stanovenia organochlórovaných fungicídov a insekticídov v rastlinnom materiáli⁶⁵ a v ovocí¹² použili autori odparenie petro-

léterového alebo hexánového extraktu v skúmavke s vodou a získaný vodný roztok podrobili čisteniu na miniaturizovanej kolónke naplnenej C18 sorbentom. Na elúciu pesticídov použili v oboch prípadoch 150 µl etylacetátu. Nepolárne koextraktanty je možné odstrániť z extraktov v acetonitrile jednoduchým presatím extraktu cez C18 kolónku^{16, 57}. Pri stanovení karbamátov bol na prečistenie metanolického extraktu použitý C18 sorbent a pesticídy bolo potrebné eluovať acetonitrilom⁶⁸.

V posledných rokoch prešlo výrazným vývojom použitie SPE sorbentov s chemicky viazanými stacionárnymi fázami ako aminopropyl (-NH₂), primárny a sekundárny amín (PSA) a silný menič aniónov (Strong Anion Exchanger – SAX). Schenck a spol.⁴⁹ skúmali účinnosť prečisťovania acetónového a acetonitrilového extraktu pesticídov z ovocia a zeleniny na rôznych sorbentoch (GCB, C18, SAX, NH₂ a PSA). Na obr. 1 sú uvedené chromatogramy získané analýzou surového extraktu zo zelenej papriky a extraktov prečistených rôznymi sorbentami. Vizualne najúčinnnejšie prečistenie bolo viditeľné pri GCB sorbente, odstránené boli rastlinné pigmenty, avšak GCB neodstránil



Obr. 1. GC/ECD chromatogram pred a po SPE prečistení slepého extraktu z papriky na rôznych sorbentoch; extrakcia bola vykonaná acetonitrilom, GCB – Graphitized Carbon Black – grafitizovaný uhlík⁴⁹, SAX – silný anion, PSA – primárny a sekundárny amín

z extraktu interferujúce látky. S ohľadom na elimináciu interferujúcich píkov s píkmi organofosforových pesticídov v extrakte z kapusty bolo najúčinnšie prečistenie na sérii sorbentov C18, GCB a SAX, avšak približne rovnaký výsledok bol dosiahnutý aj použitím samotného sorbentu PSA. V inej práci skúmali Schenck a Lehotay⁶³ použitie rôznych sorbentov na elimináciu injektorových matricových efektov pri analýze organofosforových pesticídov, na čo bola najúčinnšia séria kolóniek s GCB, SAX a PSA sorbentami. Používanie troch rôznych kolóniek je však neekonomické a dobré výsledky sa dajú dosiahnuť použitím GCB a PSA (alebo NH₂), ako aj len samotného sorbentu PSA (cit.⁶³).

Veľmi zaujímavý spôsob využitia sorbentov SPE na odstránenie koextraktantov použili vo svojej práci Anastassiades a spoluautori⁴, sorbent PSA (25 mg) a bezvodý síran horečnatý dispergovali priamo v surovom extrakte (1 ml) trepaním a následne ho oddelili centrifugáciou. Tento prístup nazvali disperzná extrakcia tuhou fázou (Dispersive Solid Phase Extraction). Je to veľmi jednoduchá a mimoriadne ekonomická alternatíva ku klasickej SPE pre pesticídy širokého spektra polarít⁴.

Možnosť kombinácie jednotlivých efektov prečistenia extraktov dosahovaných rôznymi sorbentami vedie k častému používaniu sérii viacerých SPE fáz, čomu významne napomáha existencia jednorázových kolóniek, ktoré sa dajú jednoducho spájať adaptérmi.

3.2. Gélová permeačná chromatografia

Gélová permeačná chromatografia je najuniverzálnejšie použiteľná čistiacia metóda v analýze reziduí pesticídov vo všetkých typoch matric. Princípom GPC je retencia látok na základe veľkosti ich molekúl a nie na základe ich polarít. Tento fakt umožňuje izoláciu látok s úzkym rozsahom molekulových hmotností (pesticídy približne 200–400 g.mol⁻¹), ale rôznych fyzikálnochemických vlastností, čo sa využíva na oddelenie vyextrahovaných pesticídov od koextrahovaných látok s väčšou molekulovou hmotnosťou (napr. tuky 600–1500 g.mol⁻¹).

Na tento účel sa používa styren-divinylbenzénový kopolymérny gél BioBeads SX-3 alebo efektívnejšie gél PL (cit.²³) (styren-divinylbenzénový kopolymérny gél vyrábaný firmou PL Laboratories, UK). Ako mobilná fáza sa v minulosti používala zmes dichlórmetán : cyklohexán (30:70)^{25,69}, v súčasnosti sa však používa ekologickejšia mobilná fáza etylacetát : cyklohexán (1:1) (cit.²³). Miniaturizácia GPC znížila spotrebu mobilnej fázy na 1 ml.min⁻¹ pri vnútornom priemere kolóny okolo 8 mm oproti pôvodným 5 ml.min⁻¹ pri vnútornom priemere kolóny 2,5 cm. Prečistenie jednej vzorky trvá približne 40 min, pričom sa spotrebuje približne 40 ml rozpúšťadla a odoberá sa frakcia s elučným časom 16 až 30 min (čo je však pre každú kolónu potrebné individuálne overiť). Niektoré pesticídy s veľkými molekulami (napr. pyretroidy) sa nemusia dostatočne separovať od širokých elučných pásov koextraktantov, čím sa znižuje ich výťažnosť. GPC taktiež nie je

schopná oddeliť nízkomolekulové látky, ktoré môžu interferovať s analytmi v chromatograme.

3.3. Mikroextrakcia tuhou fázou a sorpčná extrakcia na miešadielkach

Mikroextrakcia tuhou fázou (Solid Phase MicroExtraction – SPME) je jednoduchá jedнокroková predseparačná a obohacovacia metóda založená na sorpcii analytov z roztoku alebo z „headspace“ na kremenné vlákno pokryté filmom stacionárnej fázy⁷⁰. Po sorpcii sa vlákno preniesie do injektora GC bez deliča, alebo do špeciálneho dávkovacieho zariadenia pre HPLC. V injektore nastane desorpcia látok, transport do chromatografickej kolóny a separácia. Komerčne sú dostupné SPME vlákna s rôznymi stacionárnymi fázami (PDMS – poly(dimetylsiloxán), PDMS-DVB – poly(dimetylsiloxán)-divinylbenzén, CW-DVB – Carbowax-divinylbenzén, PA – polyakrylát a iné) líšiacimi sa svojou polaritou a hrúbkou filmu. SPME je rovnovážna metóda a látky sa na vlákno sorbujú podľa rozdeľovacieho koeficienta látok medzi stacionárnou fázou vlákna a roztokom alebo „headspace“. Pre prípad poly(dimetylsiloxánového) vlákna sa rozdeľovacie koeficienty pre systém vlákno/vodný roztok dajú aproximovať rozdeľovacími koeficientmi systému oktanol/voda. Opisom matematického modelu SPME, ako aj jej aplikáciami sa zaoberá viacero publikácií^{70–72}.

Na izoláciu reziduí pesticídov z matrice sa používa extrakcia vodou, prípadne vodným roztokom polárneho organického rozpúšťadla, a to mixovaním^{73–75}, ASE^{76–78} alebo MAE⁷⁹ (Microwave Assisted Extraction – extrakcia podporená mikrovlnným žiarením). Po extrakcii je potrebné oddelenie tuhých zvyškov matrice filtrovaním alebo centrifugáciou. Časť získaného supernatantu sa preniesie do vialky a analyty sa sorbujú na vlákno SPME počas určeného sorpčného času (zvyčajne 20–60 min) za definovaného miešania roztoku. Na extrakciu pesticídov sa najčastejšie používa PDMS a PDMS-DVB vlákno.

K výhodám SPME patrí veľká citlivosť, jednoduchosť, rýchlosť, finančná nenáročnosť, nepoužíva žiadne rozpúšťadlá a je úplne automatizovateľná. Nevýhodou SPME je, že množstvo vyextrahovaného pesticídu veľmi výrazne závisí od rozdeľovacej konštanty pre daný systém, ako aj od zloženia matrice. SPME je vhodná na semikvantitatívne stanovenie predovšetkým menej polárnych pesticídov^{73,74}.

Miešadielková sorpčná extrakcia (Stir Bar Sorptive Extraction – SBSE) je nová predseparačná a obohacovacia metóda založená na rovnakom princípe ako SPME. Vrstva PDMS je nanosená na sklenenom miešadielku (dĺžka 1 cm), ktorým sa zároveň roztok aj mieša. V porovnaní s SPME vykazuje predovšetkým lepšie medzi detekcie a stanovenia v dôsledku podstatne väčšieho objemu PDMS využívaného na sorpciu analytov⁷⁷. Avšak rovnako ako SPME v analýze pesticídov je vhodná predovšetkým na izoláciu menej polárnych reziduí. SBSE bola použitá napr. na stanovenie organochlórovaných pesticídov a chlórbenzénov v jahodách.

Medza detekcie 1,1-dichlór-2,2-bis(4-chlórphenyl)eténu (DDE) a 1,1,1-trichlór-2,2-bis(4-chlórphenyl)etánu (DDT) bola pre SBSE 2 a 5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, zatiaľ čo pre SPME bola 40 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ pri použití ASE (cit.^{76–78}).

3.4. Priame zavedenie vzorky

DSI (Direct Sample Introduction) je metóda založená na termálnej extrakcii. Malá časť surového extraktu (do 40 μl)^{81,82} sa umiestni do mikrovialky, ktorá sa pomocou špeciálneho zariadenia vloží do injektora GC s programovateľnou teplotou. Pri nižšej teplote sa odparí prítomná voda, alebo rozpúšťadlo, po uzatvorení deliaceho ventilu sa prudko zvýši teplota, rezíduá pesticídov sa termálne vyextrahujú z matrice a prúdom nosného plynu sa prenesú do kolóny. Neprchavé zvyšky matrice zostanú v jednorázovej mikrovialke. Najväčšou prednosťou DSI je mimoriadna jednoduchosť a rýchlosť postupu. Nevýhodou je potreba použiť vysokoselektívne detekčné systémy (pre prítomnosť interferujúcich látok podobnej prchavosti ako analyty). Tandemovým MS/MS v spojení s DSI boli dosiahnuté medze detekcie v rozmedzí 0,03–27 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ pri analýze surového extraktu zodpovedajúcemu 5,5 mg zmesi jablák, fazuľky a mrkvy⁸¹.

4. Záver

Množstvo publikovaných prác zaoberajúcich sa úpravou vzorky na stanovenie rezidií pesticídov je veľké a vedeckovýskumný rozvoj spolu s vývojom nových zariadení a materiálov prináša nové možnosti implementácie rôznych nových princípov a metód, ktoré sa snažia eliminovať nedostatky starších metód. Vývoj a registrácia nových pesticídov a zákaz používania starších prípravkov navyše vyžaduje opakovanie validácie už zaužívaných metód.

Napriek vývoju novších izolačných metód kvapalínovej extrakcie sa naďalej využívajú v praxi predovšetkým pre nízke nároky na inštrumentáciu a v porovnaní s inštrumentálnymi izolačnými metódami aj veľmi dobrými hodnotami výťažností.

V oblasti čistiacich metód sú klasické reextrakcie do nepolárnych chlórovaných rozpúšťadiel vytlačané používaním gélovej permeačnej chromatografie alebo ešte novšou metódou extrakciou tuhou fázou. SPE s použitím aminopropylového sorbentu, alebo sorbentu s primárnym a sekundárnym amínom, vykazuje podľa najnovších výskumov najefektívnejšie prečistenie extraktov z ovocných a zeleninových matric. Navyše využitie disperznej extrakcie tuhou fázou⁴ v kombinácii s centrifugáciou na odstránenie tuhých podielov z extraktov výrazne znižuje cenu analýzy. Možnosťou súčasného spracovania viacerých vzoriek sa významne zvyšuje aj kapacita skúšobného laboratória. Na efektívne využívanie rýchlej a jednoduchej metódy úpravy vzorky je potrebné využívať aj rýchlu separačnú metódu – rýchlu kapilárnu plynovú

chromatografiu⁸³, čím sa dosiahne významné skrátenie celkovej doby analýzy.

Súčasťou riešenia projektu 1/9126/02 (VEGA MŠ SR) a NATO projektu SFP No. 977983 je aj táto publikácia.

LITERATÚRA

1. Tekeľ J., Hatrík Š.: *J. Chromatogr.*, A 754, 397 (1996).
2. Lacassie E., Dreyfuss M.-F., Daguet J. L., Vignaud M., Maquet P., Lachatre G.: *J. Chromatogr.*, A 805, 319 (1998).
3. Lacassie E., Dreyfuss M.-F., Daguet J. L., Vignaud M., Maquet P., Lachatre G.: *J. Chromatogr.*, A 830, 135 (1999).
4. Anastassiades M., Lehotay S. L., Štajnbaher D., Schenk F. J.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* 86, 412 (2003).
5. Luke M., Froberg J. E., Masamoto H. T.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 58, 1020 (1975).
6. Stan H.-J.: *J. Chromatogr.*, A 892, 347 (2000).
7. Koinecke A., Kreuzig R., Bahadir M., Noltig H. G.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 349, 301 (1994).
8. Specht W., Pelz S., Gilsbach W.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 353, 183 (1995).
9. Pang G.-F., Cao Y.-Z., Fan C.-L., Zhang J.-J., Li X.-M.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* 82, 186 (1999).
10. Oliva J., Barba A., Vela N., Melendreras F., Navarro S.: *J. Chromatogr.*, A 882, 213 (2000).
11. Navickiene S., Polese L., Minelli E. V., Ribeiro M. L.: *Chromatographia* 49, 212 (1999).
12. Columé A., Cárdenas S., Gallego M., Valcárcel M.: *J. Chromatogr.*, A 882, 193 (2000).
13. Di Muccio A., Barbini D. A., Generali T., Pelosi P., Ausili A., Vergori F., Camoni I.: *J. Chromatogr.*, A 765, 39 (1997).
14. Fillion J., Hindle R., Lacroix M., Selwyn J.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* 87, 1252 (1995).
15. Cook J., Beckett M. P., Reliford B., Hammock W., Engel M.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* 82, 1419 (1999).
16. Fillion J., Sauvé F., Selwyn J.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* 83, 698 (2000).
17. van der Hoff G. R., van Zoonen P.: *J. Chromatogr.*, A 843, 301 (1999).
18. van Zoonen P. (ed.): *Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs*, 6. vydání, The Inspectorate for Health, Welfare and Sport, Drukkerij T. O. Offset B. V., Maastricht 1996.
19. Obana H., Akutsu K., Okihashi M., Kakimoto S., Hori S.: *Analyst* 124, 1159 (1999).
20. Obana H., Akutsu K., Okihashi M., Hori S.: *Analyst* 126, 1529 (2001).
21. Lehotay S. J., Lightfield A. R., Harman-Fetcho J. A., Donoghue D. A.: *J. Agric. Food Chem.* 49, 4589 (2001).
22. Camel V.: *Analisis* 26, 99 (1998).

23. Hajšlová J.: Chem. Listy 92, 777 (1998).
24. Yoshii K., Okada M., Tsumura Y., Nakamura Y., Ishimitsu S., Tonogai Y.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int. 82, 1239 (1999).
25. Nerín C., Batlle R., Cacho J.: J. Chromatogr., A 795, 117 (1998).
26. Chuang J. C., Pollard M. A., Misita M., Van Emon J. M.: Anal. Chim. Acta 399, 135 (1999).
27. Chuang J. C., Hart K., Chang J. S., Boman L. E., Van Emon J. M., Reed A. W.: Anal. Chim. Acta 444, 87 (2001).
28. Lehotay S. J., Valverde-García A.: J. Chromatogr., A 765, 69 (1997).
29. Stefani R., Buzzi M., Grazi R.: J. Chromatogr., A 782, 123 (1997).
30. Lehotay S. J., Lee C.-H.: J. Chromatogr., A 785, 313 (1997).
31. Halvorsen B. L., Thomsen C., Greibrokk T., Lundanes E.: J. Chromatogr., A 880, 121 (2000).
32. Anastassiades M., Schwack W.: J. Chromatogr., A 825, 45 (1998).
33. Eller K., Lehotay S. J.: Analyst 122, 429 (1997).
34. Wennrich L., Popp P., Breuste J.: Chromatographia 53, S380 (2001).
35. Okihashi M., Obana H., Hori S.: Analyst 123, 711 (1998).
36. Obana H., Kikuchi K., Okihashi M., Hori S.: Analyst 122, 217 (1997).
37. Eskilsson C. S., Bjöklund E.: J. Chromatogr., A 902, 227 (2000).
38. Barker S. A., Long A. R., Short C R.: J. Chromatogr., A 475, 353 (1989).
39. Barker S. A.: J. Chromatogr., A 885, 115 (2000).
40. Valenzuela A. I., Lorenzini R., Redondo M. J., Font G.: J. Chromatogr., A 839, 101 (1999).
41. Torres C., Picó Y., Marín R., Manes J.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int. 80, 1122 (1997).
42. Kristenson E. M., Haverkate E. G. J., Slooten C. J., Ramos L., Vreuls R. J. J., Brinkman U. A. T.: J. Chromatogr., A 917, 277 (2001).
43. Blasco C., Picó Y., Manes J., Font G.: J. Chromatogr., A 947, 227 (2002).
44. Viana E., Moltó J. C., Font G.: J. Chromatogr., A 754, 437 (1996).
45. Blasco C., Font G., Picó Y.: J. Chromatogr., A 970, 201 (2002).
46. Torres C. M., Picó Y., Manes J.: J. Chromatogr., A 778, 127 (1997).
47. Lehotay S. J.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int. 83, 680 (2000).
48. Hajšlová J., v kniže: *Environmental Contaminants in Food* (Moffat C. F., Whittle K. J. ed.), kap 7. CRC Press, Sheffield 1999.
49. Schenck F. J., Lehotay S. J., Vega V.: J. Sep. Sci. 25, 883 (2002).
50. Sheridan R. S., Meola J. R.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int. 82, 982 (1999).
51. Gamón M., Lleó C., Ten A.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int. 84, 1209 (2001).
52. Martínéz Vidal J. L., Arrebola F. J., Mateu-Sánchez M.: J. Chromatogr., A 959, 203 (2002).
53. Podhorniak L. V., Negron J. F., Griffith Jr. F. D.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int. 84, 873 (2001).
54. Amirav A., Jing H.: J. Chromatogr., A 814, 133 (1998).
55. Dallüge J., van Rijn M., Beens J., Vreuls R. J. J., Brinkman U. A. T.: J. Chromatogr., A 965, 207 (2002).
56. Niessner G., Buchberger W., Eckerstorfer R.: J. Chromatogr., A 846, 341 (1999).
57. Cook J., Beckett M. P., Reliford B., Hammock W., Engel M.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int. 82, 1419 (1999).
58. Morelli-Cardoso M. H. W., Cardozo R. T. M., Mello J. L., Abrantes S., Menezes K. M. P.: J. High Resolut. Chromatogr. 22, 619 (1999).
59. Stan H.-J., Linkerhäger M.: J. Chromatogr., A 750, 369 (1996).
60. Matisová E., Škrabáková S.: J. Chromatogr., A 707, 145 (1995).
61. Hennion M.-C.: J. Chromatogr., A 885, 73 (2000).
62. Schenck F. J., Howard-King V.: Bull. Environ. Contam. Toxicol. 63, 277 (1999).
63. Schenck F. J., Lehotay S. J.: J. Chromatogr., A 868, 51 (2000).
64. Barwick V. J., Ellison S. L. R., Lacey S. J., Mussell C. R., Lucking C. L.: J. Sci. Food Agric. 79, 1190 (1999).
65. Columé A., Cardenas S., Gallego M., Valcarcel M.: J. Chromatogr., A 849, 235 (1999).
66. Sojo L. E., Brocke A., Fillion J., Price S. M.: J. Chromatogr., A 788, 141 (1998).
67. Nordmeyer K., Thier H.-P.: Z. Lebensm.-Unters. Forsch., A 208, 259 (1999).
68. Delgado M. J. S., Barroso S. R., Fernandez-Tostado G. T., Polo-Diez L.M.: J. Chromatogr., A 921, 287 (2001).
69. Engebretson J., Hall G., Hengel M., Shibamoto T.: J. Agric. Food Chem. 49, 2198 (2001).
70. Sedláková J., Matisová E., Slezáčková M.: Chem. Listy 92, 633 (1998).
71. Urruty L., Montury M.: J. Chromatogr. Sci. 37, 277 (1999).
72. Valor I., Pérez M., Cortrada C., Apraiz D., Moltó J. C., Font G.: J. Sep. Sci. 24, 39 (2001).
73. Simplício A. L., Boas L. V.: J. Chromatogr., A 833, 35 (1999).
74. Chen W., Poon K.-F., Lam M. H. W.: Environ. Sci. Technol. 32, 3816 (1998).
75. Hu R., Hennion B., Urruty L., Montury M.: Food Addit. Contam. 16, 111 (1999).
76. Wennrich L., Breuste J., Popp P., Koller G.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int. 84, 317 (2001).
77. Wennrich L., Popp P., Koller G., Breuste J.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int. 84, 1194 (2001).
78. Wennrich L., Popp B., Breuste J.: Chromatographia

- 83, 380 (2001).
79. Falqui-Cao C., Wang Z., Urruty L., Pommier J.-J., Montury M.: *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5092 (2001).
 80. Baltusen E., Sandra P., David F., Cramers C.: *J. Microcolumn Sep.* **11**, 737 (1999).
 81. Lehotay S. J.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* **83**, 680 (2000).
 82. Jing H., Amirav A.: *Anal. Chem.* **69**, 1426 (1997).
 83. Matisová E., Dömötörövá M.: *J. Chromatogr., A* **1000**, 199 (2003).

M. Kirchner and E. Matisová (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak Technical University, Bratislava*): **Present**

Methods and New Trends in Isolation of Pesticide Residues in Non-Fatty Foods

The review deals with isolation and pretreatment steps in pesticide residue analysis in fruit and vegetable matrices. The basic principles and an overview of practical applications is given for classic solvent and modern instrumental extraction procedures, such as liquid extraction, supercritical fluid extraction, accelerated solvent extraction and solid phase matrix dispersion. The review is also focused on comparison of advantages and limitations of different pretreatment steps such as liquid-liquid re-extractions, solid phase extraction, gel permeation chromatography, solid phase microextraction, stir bar sorptive extraction and direct sample introduction.