

AGNIESZKA JĘDRZEJCZUK, KATARZYNA GÓRALCZYK, KATARZYNA CZAJA, PAWEŁ STRUCIŃSKI, JAN K. LUDWICKI

WYSOKOSPRAWNA CHROMATOGRAFIA CIECZOWA – JEJ
ZASTOSOWANIE W ANALIZIE POZOSTAŁOŚCI PESTYCYDÓW

HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY – APPLICATION IN
PESTICIDES RESIDUE ANALYSIS

Zakład Toksykologii Środowiskowej
Państwowy Zakład Higieny
00–791 Warszawa, ul. Chocimska 24
Kierownik: prof. dr hab. J.K. Ludwicki

Przedstawiono chromatografię cieczową jako jedną z podstawowych technik chromatograficznych w analizie śladowych ilości związków organicznych, głównie pestycydów.

WSTĘP

Środowisko człowieka, niezależnie od szerokości geograficznej jest zanieczyszczone niemożliwą do oszacowania liczbą związków chemicznych. Substancje te są zarówno pochodzenia naturalnego jak i antropogenicznego. Mogą one bezpośrednio lub pośrednio wpływać na kondycję zdrowotną człowieka. Wśród egzogennych czynników wpływających na ogólny stan zdrowia człowieka należy wymienić m.in. chemiczne środki ochrony roślin. Głównym źródłem narażenia człowieka na te związki jest żywność. Stąd istnieje potrzeba stałego śledzenia ich poziomów w żywności i pozostałych elementach środowiska, a więc dysponowania odpowiednimi technikami i metodami analitycznymi, które umożliwiają wykrywanie tych związków nawet w śladowych ilościach.

Najczęściej wykorzystywaną techniką analityczną umożliwiającą identyfikację i oznaczanie organicznych substancji szkodliwych jest chromatografia. Po raz pierwszy została zastosowana przez *Cwieta* w 1906 roku do analizy ekstraktów roślinnych, współcześnie ma wiele specyficznych modyfikacji. Jedną z nich jest wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC), która opracowana została w latach 60-tych przez *Horvatha*. Jej pełne możliwości zaczęto wykorzystywać w latach 70-tych, kiedy to skonstruowano odpowiednie pompy i wprowadzono doskonalsze wypełnienia kolumn.

Zgodnie z obwieszczeniem Ministra Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej w sprawie wykazu środków ochrony roślin dopuszczonych do obrotu i stosowania obecnie w Polsce dopuszczonych jest 975 preparatów pestycydowych. Zawierają one 336 substancji czynnych, z których 71 (21%) oznaczanych jest przy użyciu techniki HPLC. Wśród nich wyróżnia się: 33 herbicydy, 21 fungicydów i 17 insektycydów [34, 46].

PODSTAWOWE ZASADY WYKORZYSTYWANE W HPLC

Istotą chromatografii jest podział składników analizowanej mieszaniny (próbki) między dwie nie mieszające się ze sobą fazy: stacjonarną i ruchomą. Fazą stacjonarną jest w chromatografii cieczowej ciało stałe bądź ciecz.

Substancje zawarte w próbce wędrują wraz z fazą ruchomą przez kolumnę, a prędkość ich przemieszczania jest funkcją podziału w stanie równowagi. Wolniej poruszają się substancje, które wykazują większe powinowactwo do fazy stacjonarnej niż te posiadające większe powinowactwo do fazy ruchomej. Chromatograficzne rozdzielenie wynika zatem z różnic w szybkości migracji, które są rezultatem podziału składników między dwie fazy. Rozdzielić więc można tylko związki posiadające różne stałe podziału (K_x) [5, 19, 25, 42, 47],

$$K_x = C_s/C_r,$$

gdzie:

K_x – stała podziału składnika x między fazę stacjonarną i ruchomą,

C_s – stężenie składnika w fazie stacjonarnej,

C_r – stężenie składnika w fazie ruchomej.

Głównym terminem używanym w analizie chromatograficznej jest retencja. Oznacza ona stosunek ilości substancji w fazie stacjonarnej do ilości substancji w fazie ruchomej. Parametry retencyjne najczęściej wykorzystywane w chromatografii przedstawiono w tabeli I.

Wybór warunków rozdziału

Faza ruchoma (eluent) powinna być tak dobrana aby była jednocześnie rozpuszczalnikiem dla próbki. Jeśli okaże się to niemożliwe, to należy wybrać taki rozpuszczalnik, który miesza się z fazą ruchomą i ma zbliżoną do niej moc elucyjną.

Jeśli zajdzie konieczność zastosowania rozpuszczalnika o dużo większej mocy elucyjnej niż faza ruchoma, objętość dozowanej próbki powinna być na tyle mała aby nie wpływała na retencję ani szerokość pików. Szybkość migracji w dużym stopniu zależy od mocy elucyjnej fazy ruchomej, szczególnie w przypadku związków o małej retencji, tak więc głównie w ich przypadku objętość próbki jest bardzo ważna. Przy wyborze faz najważniejsze jest zapewnienie odpowiedniego oddziaływania między fazą stacjonarną a składnikami próbki. Faza ruchoma, jeśli jest właściwie dobrana, powinna zapewniać odpowiednią selektywność rozdzielania i właściwy czas analizy. Stopień rozdzielania jest ilościowo opisywany przez współczynnik R_s ,

$$R_s = (v_{r1} - v_{r2}) / \frac{1}{2}(w_1 + w_2) = \frac{1}{4} \times k_2(k_2 + 1) \times (\alpha - 1) / \alpha \times \sqrt{N},$$

gdzie:

v_r – objętość retencji,

w – szerokość pików,

k – współczynnik retencji,

N – liczba pól teoretycznych; $N = 16(v_r/w)^2$,

α – retencja względna (współczynnik selektywności).

Powyższe równanie nosi nazwę wzoru *Purnella* i jest podstawowym wzorem dotyczącym optymalizacji procesu rozdziału w chromatografii cieczowej. Wynika z niego,

Tabela I. Parametry retencyjne najczęściej stosowane w analizie chromatograficznej [5, 19, 32, 35, 42]
Retention parameters most commonly used in chromatographic analysis

Parametry retencyjne wykorzystywane w chromatografii:			
GLC		HPLC	
Nazwa	Definicja	Nazwa	Definicja
Całkowity czas retencji (t_r)	Czas jaki upłynął od momentu wprowadzenia substancji na kolumnę do chwili zarejestrowania maksimum pików tej substancji	Objętość retencji (v_r)	Objętość fazy ruchomej jaka przepłynęła przez kolumnę od chwili wprowadzenia substancji do pojawienia się maksimum pików
Martwy czas retencji (t_m)	Czas, w ciągu którego substancja nie oddziałuje z wypełnieniem kolumny	Objętość martwa (v_m)	Objętość substancji nie zatrzymywana przez kolumnę
Zredukowany czas retencji (t_r')	Czas przebywania substancji w kolumnie związany tylko z oddziaływaniem z wypełnieniem	Zredukowana objętość retencji (v_n)	Różnica między objętością retencji a objętością martwą
Współczynnik retencji (k)	Stosunek podziału substancji chromatografowanej między fazę ruchomą i nieruchomą	Współczynnik retencji (k)	Stosunek podziału substancji chromatografowanej między fazę ruchomą i nieruchomą

że współczynnik selektywności α musi być większy od jedności. Współczynnik R_s jest równy jedności dla dwóch całkowicie rozdzielonych sąsiednich pików. Dobierając siłę elucyjną fazy ruchomej (wartość współczynnika k) należy pamiętać, że wzrost wartości k w zakresie 0–10 powoduje znaczny wzrost wartości R_s – wpłynie to na zmniejszenie czułości detekcji gdyż stężenie w maksimum pików maleje wprost proporcjonalnie do v_r .

Dla $k < 10$ czułość detekcji jest największa, ale szerokość i wysokość pików będą zależały również od czynników pozakolumnowych. W przypadku $k > 10$ rośnie czas analizy, a stopień rozdzielania już się nie polepsza. Wartości k powinny znaleźć się w przedziale 0,5–10. Efektywność rozdzielania rośnie wraz ze wzrostem współczynnika α .

W celu uzyskania optymalnych wartości k i α najczęściej stosuje się wieloskładnikowe fazy ruchome. Przy wyborze faz należy jednak uwzględnić rodzaj i skład rozdzielanej mieszaniny, rodzaj zastosowanego wypełnienia kolumny i rodzaj detektora [25, 31, 32, 35, 40, 44].

Gdy proces chromatograficzny odbywa się na adsorbentach polarnych, siłę elucji wyznacza polarność i polaryzowalność cząsteczek eluentu. Im większa jest polarność

rozpuszczalnika tym większa siła elucji. Jeśli użyte adsorbenty są niepolarne, siła elucji zależy od niespecyficycznych sił *Van der Waalsa* i zwiększa się ze wzrostem rozmiarów niepolarnych fragmentów cząsteczek rozpuszczalników. Wielkością opisującą miarę mocy elucyjnej rozpuszczalników są indeksy polarności (P') wprowadzone przez *Snydera*. Uwzględniają one oddziaływania cząsteczek rozpuszczalnika między sobą oraz, co ważne, oddziaływania z cząsteczkami o innych właściwościach np. cząsteczkami rozdzielanych związków [5].

Warunki elucji można też ustalić korzystając ze stałej *Hildenbranda*, która opisuje wypadkową oddziaływań dyspersyjnych, dipolowych i specyficznych. W tabeli II przedstawiono wartości indeksów polarności i stałej *Hildenbranda* dla wybranych rozpuszczalników.

Tabela II. Parametry mocy elucyjnej niektórych rozpuszczalników wykorzystywanych w chromatografii cieczowej [5]

Eluotropic strength parameters of some solvents used in liquid chromatography

Rozpuszczalnik	δ	P'
Heksan	7,2	0,0
Eter dietylowy	7,6	2,9
Czterochlorek węgla	8,7	1,7
Toluen	8,9	2,3
Octan etylu	9,1	4,3
Benzen	9,2	3,0
Chloroform	9,2	4,4
Aceton	9,8	5,4
Dichlorometan	9,9	3,4
1-Butanol	11,3	3,9
Acetonitryl	11,9	6,2
Etanol	12,9	5,2
Metanol	14,3	6,6
Glikol etylenowy	16,3	5,4
Woda	23,3	9,0

δ – parametr rozpuszczalności *Hildebranda*

P' – indeksy polarności

Szeregi rozpuszczalników uporządkowanych według mocy elucyjnej nazywa się szeregami eluotropowymi. Ułatwiają one dokonanie wyboru właściwego rozpuszczalnika do danego procesu chromatograficznego. W przypadku stosowania polarnej fazy stacjonarnej szereg, w którym rozpuszczalniki ułożone są według rosnącej mocy eluowania to: n-pentan, n-heksan, cykloheksan, tetrachlorek węgla, toluen, benzen, eter dietylowy, chloroform, dichlorometan, tetrahydrofuran, dichloroetan, aceton, octan etylu, acetonitryl, pirydyna, etanol, metanol, woda, kwas octowy. Natomiast, w przypadku niepolarniej fazy stacjonarnej moc elucji jest odwrotna i szereg, w którym rozpuszczalniki ułożone są zgodnie z wzrastającą mocą elucyjną jest następujący: woda, metanol,

etanol, aceton, propanol, eter dietylowy, butanol, octan etylu, n- heksan, benzen [5, 15, 18, 42, 47].

Drugą, obok polarności, ważną cechą rozpuszczalników jest ich lepkość. Od niej zależy wielkość ciśnienia jakie jest potrzebne do wywołania wymaganego przepływu fazy ruchomej przez kolumnę. Uwzględniając fakt, że ciśnienie jest liniową funkcją lepkości, należy stosować eluenty o małej lepkości. Wybierając rozpuszczalnik powinno się też pamiętać, że musi on być dobrany w zależności od zastosowanego detektora.

Podsumowując, faza ruchoma do chromatografii cieczowej powinna [5, 34, 42, 47]:

- wykazywać zdolność rozpuszczania próbek,
- posiadać wysoki stopień czystości i znany skład,
- nie reagować z wypełnieniem kolumny,
- być pozbawiona mechanicznych zanieczyszczeń (powodują wzrost ciśnienia w układzie),
- charakteryzować się trwałością w czasie przechowywania,
- mieć niską lepkość,
- nie zakłócać pracy detektora.

Proces elucji

Elucję w czasie rozwijania chromatogramu można prowadzić w sposób izokratyczny lub gradientowy. O elucji izokratycznej mówi się wtedy, gdy stosuje się pojedynczy eluent lub mieszaninę, której skład w trakcie analizy jest stały. Można ją stosować gdy współczynnik pojemnościowy rozdzielanych związków mieści się w przedziale między 1 a 10. W przypadku gdy zastosowanie elucji izokratycznej nie daje dobrego rozdzielania pików należy przeprowadzić elucję gradientową. Polega ona na zmianie składu fazy ruchomej w trakcie procesu rozdzielania, co powoduje wzrost siły elucyjnej fazy ruchomej. Zmiana składu eluentu może być prowadzona liniowo lub skokowo. Początkowy skład fazy ruchomej ma wpływ głównie na czas analizy choć użycie zbyt silnego rozpuszczalnika na początku elucji może spowodować utratę rozdzielczości. Dobrze jest zatem zacząć od słabego rozpuszczalnika i dopiero po pewnym czasie przejść do elucji gradientowej [5, 18, 22, 23, 25, 31, 32, 42, 44, 47].

Kolumny chromatograficzne

Kolumna jest tą częścią chromatografu cieczowego, w której zachodzi właściwy proces rozdziału. Najczęściej stosowane są kolumny o długości 25 cm i średnicy nie przekraczającej 6 mm. Wybór tego typu parametrów uzależniony jest od wielkości analizowanej próbki. Kolumny o małych średnicach można stosować do wykrywania niższych stężeń badanych substancji. Ich wadą jest to, że nie można zbierać rozdzielanych substancji w celu identyfikacji innymi niż chromatografia metodami. Obecnie w literaturze coraz więcej miejsca poświęca się kolumnom o średnicy wewnętrznej 2,0 mm tzw. *narrow-bore columns* [6, 28, 38], kolumnom kapilarnym pakowanym [14, 28, 45] i kolumnom z chemicznie modyfikowanymi ściankami [35]. Pakowanie kolumn dłuższych niż 25 cm jest dość trudne i wpływa na ich niską sprawność [32, 35, 47].

Oprócz kolumny właściwej bardzo często stosuje się tzw. przedkolumnę. Zawiera ona to samo wypełnienie i ma tę samą średnicę co kolumna właściwa, ale jej długość jest znacznie mniejsza, rzędu 1 do 5 cm. Jest ona umieszczona przed właściwą kolumną,

a jej zadaniem jest zatrzymywanie zanieczyszczeń mechanicznych występujących w próbce, zatrzymywanie substancji nierozpuszczalnych w fazie ruchomej i trudno eluujących się w danych warunkach [5, 18, 25, 42].

Obecnie najczęściej stosowanymi układami są tak zwane układy faz odwróconych, w których faza stacjonarna jest mniej polarna niż faza ruchoma [5, 42, 47].

Schemat postępowania

Faza ruchoma tłoczona jest pompą do kolumny chromatograficznej, która często umieszczana jest w termostacie. Praca w temperaturze wyższej od pokojowej jest korzystna gdyż zmniejsza lepkość fazy ruchomej. Próbka jest wprowadzana do strumienia eluentu przez dozownik. Rozdział chromatograficzny następuje w kolumnie, a rozdzielone substancje docierają do detektora gdzie są wykrywane. Sygnał z detektora jest wzmacniany i zapisywany w postaci piku chromatograficznego. Rozdzielone składniki mogą być zbierane są w kolektorze frakcji [5, 18, 25, 31, 32, 35, 42, 47].

Detektory stosowane w HPLC można podzielić na takie, w których mierzone są właściwości charakterystyczne dla analitu i te w których następuje różnicowy pomiar właściwości wspólnej dla analitu i fazy ruchomej. Najczęściej używane są trzy typy detektorów: adsorpcji promieniowania w zakresie ultrafioletu i światła widzialnego (UV-VIS), fluorymetryczny (FL) i konduktometryczny [5, 42, 47]. W tabeli III przedstawiono pełne charakterystyki najczęściej stosowanych w HPLC detektorów.

HPLC W ANALIZIE PESTYCYDÓW

Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) jako instrumentalna technika analizy śladowych poziomów zanieczyszczeń środowiska pozostawała dość długo w cieniu chromatografii gazowej (GLC). Jednak w wielu przypadkach HPLC przeważa nad GLC, czego przykładem może być zdolność oznaczania związków labilnych termicznie czy o niskiej lotności. Duża różnorodność wypełnień kolumn i rozpuszczalników wykorzystywanych w chromatografii cieczowej sprawia, że potencjalnie technika ta może być stosowana do oznaczania większości składników występujących w żywności, w tym także pestycydów.

Pestycydy są grupą związków chemicznych pochodzenia syntetycznego, a także choć rzadziej naturalnego które są stosowane w ochronie roślin uprawnych oraz w walce z pasożytami człowieka i zwierząt hodowlanych. Poza niezaprzeczalnymi korzyściami, jakie przyniosło stosowanie pestycydów okazało się, że ich obecność w środowisku, często wiele lat po zaprzestaniu stosowania, przynosi również skutki ujemne [1, 16, 43].

Dzięki rozwojowi metod analitycznych wykazano, że człowiek i wszystkie organizmy narażone są na śladowe poziomy tych ksenobiotyków, których toksykologiczne skutki odległego działania są często trudne do przewidzenia. Konieczne zatem stało się badanie pozostałości pestycydów w żywności [16] i używkach [17] oraz tkankach ludzkich [8, 9, 29] czy zwierzęcych [11, 37].

Technikami analitycznymi najczęściej stosowanymi do oznaczania pozostałości pestycydów są chromatografia gazowa i wysokosprawna chromatografia cieczowa. Zastosowanie poszczególnych technik chromatograficznych do oznaczania pestycydów należących do różnych grup chemicznych przedstawiono w tabeli IV.

Tabela III.

Tabela IV. Proponowane techniki analityczne do oznaczania pozostałości pestycydów należących do różnych grup chemicznych
Some analytical techniques in determination of residues of pesticides belonging to different chemical groups

Pestycydy		Technika chromatograficzna – detektor	Piśmiennictwo
Klasa	Grupa chemiczna		
Insektycydy	Chloroorganiczne	GLC-ECD	4, 7, 10, 24, 30, 36
	Fosfoorganiczne	GLC-FPD	4, 7, 10
	Syntetyczne pyretroidy	HPLC-UV GLC-ECD	4, 27, 39
	Karbaminiany	HPLC-UV HPLC-FL	4, 7, 10, 13, 33, 36
Herbicydy	Pochodne fenylomocznika	HPLC-UV	4, 41
	Triazyny	HPLC-UV	4, 21
Fungicydy	Pochodne benzimidazolu	HPLC-UV HPLC-FL	2, 3, 4, 10, 12, 24
	Ditiokarbaminiany	Trudno oznaczalne metodami chromatograficznymi	10, 24, 26

Jak wynika z danych przedstawionych w tabeli IV dla wielu grup pestycydów HPLC jest metodą z wyboru, tym bardziej, że wiele spośród pestycydów, których pozostałości oznaczano metodami chromatografii gazowej, zostało wycofanych ze stosowania (pestycydy chloroorganiczne) lub też są stopniowo zastępowane (jak np. insektycydy fosforoorganiczne) innymi o mniejszej toksyczności dla ssaków.

Oznaczanie syntetycznych pyretroidów jest możliwe zarówno techniką chromatografii gazowej, z zastosowaniem kolumn kapilarnych, jak i chromatografii cieczowej (HPLC). Wynika to z różnorodności struktury tych związków. W wielu przypadkach HPLC okazuje się przydatniejsze, szczególnie jeśli chodzi o rozdział izomerów. Pyretroidy posiadają bowiem asymetryczny atom węgla w grupie estrowej cząsteczki co jest przyczyną istnienia diastereoizomerów, które często mają różną aktywność insektobójczą i różną trwałość. Metody analityczne muszą zatem umożliwiać również rozdział izomerów, a taką możliwość gwarantuje HPLC. Dzięki temu, że pyretroidy wykazują silną absorpcję UV czułość metod HPLC jest zbliżona, a nawet nieco lepsza w porównaniu z GLC [1, 31, 43].

Karbaminiany są estrami kwasu karbaminowego, a wiele z tych związków charakteryzuje się dużą labilnością termiczną. Cecha ta uniemożliwia bezpośrednią analizę techniką chromatografii gazowej. Oznaczenia metodami GLC możliwe są tylko po wcześniejszym przeprowadzeniu karbaminianów w pochodne, co nie tylko wprowadza do procedury analitycznej dodatkową zmienną, ale zabiera czas i uniemożliwia opracowanie metody *multiresidue*. Natomiast zastosowanie HPLC eliminuje powyższe trudności. Wykorzystując tę technikę do oznaczania karbaminianów z wyboru stosowane

są detektory typu UV-VIS i fluorymetryczny, czułość tego drugiego jest jednak znacznie większa.

Herbicydy fenylomocznikowe, z grupy triazyn i benzimidazole mogą co prawda być oznaczane metodami GLC, ale konieczne jest wówczas przeprowadzenie ich w pochodne, ponieważ tak jak karbaminiany, związki te są nietrwałe termicznie. Oznaczanie ich odbywa się więc głównie techniką HPLC, która umożliwia bezpośrednią analizę badanych substancji.

Ditiokarbaminiany są grupą związków stosowanych jako fungicydy, które pod względem chemicznym są kompleksami metali. Najczęściej stosowanymi metodami analitycznymi do oznaczania ich pozostałości jest polarografia i spektrofotometria. Chromatografia cieczowa, która z całą pewnością umożliwiłaby oznaczanie znacznie niższych poziomów stężeń ditiokarbaminianów jest rzadko stosowana, ze względu na trudności związane z doбором optymalnych warunków chromatograficznych [31, 43].

PODSUMOWANIE

Wysokosprawna chromatografia cieczowa jako technika analityczna zyskuje coraz szersze zastosowanie w analizie pozostałości pestycydów. Obecnie jest drugą, obok chromatografii gazowej, techniką umożliwiającą oznaczanie ilości śladowych związków organicznych w próbkach środowiskowych, w tym w żywności. W niektórych przypadkach, dotyczy to związków labilnych termicznie, jest to jedyna technika analityczna umożliwiająca oznaczanie niskich stężeń tych związków.

A. Jędrzejczuk, K. Góralczyk, K. Czaja, P. Struciński, J.K. Ludwicki

HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY – APPLICATION IN PESTICIDES RESIDUE ANALYSIS

Summary

Chromatographic techniques allow separation and quantitation of trace levels of organic compounds in different matrices. Chromatography is widely used in many scientific areas, including food safety.

Currently, high performance liquid chromatography (HPLC) and related techniques have become the dominant analytical separation tools in such areas as pharmaceutical, chemical and food industries and environmental monitoring. Contrary to gas chromatography (GC), HPLC allows to determine low-volatile and thermolabile compounds. A variety of packings and bonded phases as well as eluents and their combinations make this technique very useful in analysis of food contaminants, including pesticide residues.

Plant protection products, called commonly pesticides, contain biologically active substances having wide mode of action, used in crop protection and in many other areas. Unfortunately, besides advantages related to their use, it should be taken into account that they are also toxic for humans and environment. As general population is exposed to pesticides mainly through the food, it is necessary to monitor concentrations of these compounds using sensitive techniques for ppm or even ppb levels. This article discusses the advantages of HPLC technique for the residues analysis of some active substances of plant protection products.

PIŚMIENNICTWO

1. *Alloway B.J., Ayres D.C.*: Chemiczne podstawy zanieczyszczeń środowiska. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1999.

2. Arenas R.V., Johnson N.A.: Liquid Chromatographic Fluorescence Method for Multiresidue Determination of Thiabendazole and 5-hydroxythiabendazole in Milk. *J. AOAC Int.* 1995, 78, 642–646.
3. Arenas R.V., Johnson N.A.: Liquid Chromatographic Fluorescence Method for the Determination of Thiabendazole Residues in Green Bananas and Banana Pulp. *J. AOAC Int.* 1994, 77, 710–713.
4. Baker P.G., Macrae R. (Eds.): Determination of pesticide residue, HPLC in food analysis. Academic Press 1988.
5. Bartulewicz J., Gawłowski J., Bartulewicz E.: Zastosowanie chromatografii gazowej i cieczowej do analizy zanieczyszczeń środowiska. Państwowa Inspekcja Ochrony Środowiska, Biblioteka Monitoringu Środowiska, Warszawa 1997.
6. Bielenkij B.G., Gaukina E.S.: Kapilarnaja zidkostnaja chromatografija. Leningrad 1987.
7. Cook J., Beckett M.P., Reliford B., Haumock W., Engel M.: Multiresidue Analysis of Pesticides in Fresh Fruits and Vegetables using Procedures Developed by the Florida Department of Agriculture and Consumer Services. *J. AOAC Int.* 1999, 82, 1419–1435.
8. Czaja K.: Ocena narażenia dzieci na polichlorowane węglowodory aromatyczne pobierane z mlekiem matki. Praca doktorska, PZH, Warszawa 1995.
9. Czaja K., Ludwicki J.K., Robson M.G., Góralczyk K., Struciński P., Buckley B.: Concentration of persistent organochlorine compounds in the placenta and milk of the some women. W: Persistent, Bioaccumulative, and Toxic Chemicals I. Fate and Exposure ACS Symposium 772, Eds.: R.L. Lipnick, J.L.M. Hermens, K.C. Jones, D.C.G. Muir. American Chemical Society, Washington, DC, 2000, 284–291.
10. Dejonckheere W., Stenbraut W., Drieghe S., Verstraeten R., Braeckman H.: Monitoring of Pesticide Residues in Fresh Vegetables, Fruits, and Other Selected Food Items in Belgium, 1991–1993. *J. AOAC Int.* 1996, 79, 97–102.
11. Falandysz J., Centkowska D.: Pestycydy polichlorowane i polichlorowane bifenyle w tkance tłuszczowej zwierząt rzeźnych z rejonu polski północnej, 1985. *Bromat. Chem. Toksykol.* 1989, 22, 176.
12. Fernández-Alba A.R., Tejedor A., Agüera A., Contreas M., Garrido J.: Determination of Imidacloprid and Benzimidazole Residues in Fruits and Vegetables by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry after Ethyl Acetate Multiresidue Extraction. *J. AOAC Int.* 2000, 83, 748–755.
13. Filion J., Hindle R., Lacroix M., Selwyn J.: Multiresidue Determination of Pesticides in Fruit and Vegetables by Gas Chromatography-Mass-Selective Detection and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *J. AOAC Int.* 1995, 78, 1252–1260.
14. Ghijs M., Sandra P.: *J. Microcol. Separ.* 1991, 3, 443–455.
15. Glajch J.L., Kirkland J.J., Squire K.M., Minor J.M.: Optimization of solvent strength and selectivity for reversed-phase liquid chromatography using an interactive mixture-design statistical technique. *J. Chromatogr.* 1980, 199, 57–79.
16. Góralczyk K., Ludwicki J.K., Czaja K., Struciński P.: Monitoring pozostałości pestycydów w żywności w Polsce. *Roczn. PZH* 1998, 49, 331–339.
17. Góralczyk K., Wawrzyńczak D., Ludwicki J.K.: Pozostałości pestycydów chloroorganicznych w herbacie. *Roczn. PZH* 2000, 51, 129–134.
18. Hadden N., Baumann F., MacDonald F., Munk M., Stevenson R., Gere D., Zamaroni F., Majors R.: Basic Liquid Chromatography. Varian Aerograph 1971.
19. Hamilton R.J., Sewell P.A.: Wysokosprawna chromatografia cieczowa. PWN, Warszawa 1982.
20. Hiemstra M., Tooneu A., De Kok A.: Determination of Benzoylphenylurea Insecticides in Pome Fruit and Fruiting Vegetables by Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Residue Data Obtained in the Dutch National Monitoring Program. *J. AOAC Int.* 1999, 82, 1198–1205.

21. *Holland D.C., Munns R.K., Roybal J.E., Hurlbut J.A., Long A.R.*: Liquid Chromatographic Determination of Simazine, Atrazine, and Propazine Residues in Catfish. *J. AOAC Int.* 1995, 78, 1064–1071.
22. *Horvat C.* (Ed.): High-performance liquid chromatography, Academic Press, Oxford 1990.
23. *Jandera P., Churacek J.*: Gradient Elution in Liquid Chromatography XI. Influence of the Adjustable Parameters on the Chromatographic Behaviour of Sample Compounds. *J. Chromatogr.* 1980, 192, 1–18.
24. *Juhler R.K., Lauridsen M.G., Christensen M.R., Hilbert G.*: Pesticide Residues in Selected Food Commodities: Results from the Danish National Pesticide Monitoring Program 1995–1996. *J. AOAC Int.* 1999, 82, 337–354.
25. *Kirkland J.J.* (Red.): Współczesna chromatografia cieczowa. PWN, Warszawa 1976.
26. Kryteria Zdrowotne Środowiska. Tom 78. Pestycydy ditiokarbaminianowe, etylenotiomocznik i propylenotiomocznik. Wprowadzenie ogólne. Instytut Medycyny Pracy, Łódź 1994.
27. *Køppen B.*: Liquid Chromatographic Determination of Pyrethroids as Active Ingredients in Pesticide Formulations. *J. AOAC Int.* 1994, 77, 810–814.
28. *Lodkowski R., Kruszyńska E., Suprynowicz Z., Buszewski B.*: Narrow Bore HPLC Columns with Chemically Bonded Phase on Porous Glass. *Chem. Anal.* 1994, 39, 543–554.
29. *Ludwicki J.K., Góralczyk K.*: Organochlorine pesticides and PCBs in human adipose tissues in Poland. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1994, 52, 400–403.
30. *Ludwicki J.K., Góralczyk K., Czaja K., Struciński P.*: Oznaczanie pozostałości insektycydów chloroorganicznych i polichlorowanych bifenyli w środkach spożywczych metodą chromatografii gazowej. Wyd. Metod. PZH, Warszawa 1996.
31. *Macrae R.* (Ed.): HPLC in food analysis. Academic Press, Cambridge 1988.
32. *Meger V.* (Ed.): Practical High Performance Liquid Chromatography. J. Wiley & Sons, New York 1994.
33. *Minelli E.V., Angioni A., Melis M., Pirisi M., Carbas P.*: Determination of Carbamate Insecticides in Apples, Pears, and Lettuce by LC with UV Detector. *J. AOAC Int.* 1997, 80, 1315–1319.
34. Monitor Polski. Dziennik Urzędowy Rzeczypospolitej Polskiej. Warszawa 9 czerwca 2000. Nr 16, poz. 357. Obwieszczenie Ministra Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej z dnia 9 maja 2000 r. w sprawie wykazu środków ochrony roślin dopuszczonych do obrotu i stosowania.
35. *Namieśnik J., Jamrógiewicz Z.* (Red.): Fizykochemiczne metody kontroli zanieczyszczeń środowiska. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 1998.
36. *Neidert E., Trotman R.B., Saschenbrecher P.W.*: Levels and incidences of pesticide residue in selected agricultural food commodities available in Canada. *J. AOAC Int.* 1994, 77, 18–24.
37. *Niewiadowska A., Juskiewicz T., Semeniuk S.*: Skazenie polichlorowanymi bifenylami (PCB) zwierząt i ludzi w Polsce. Materiały z konferencji naukowej „Toksykologia Środowiskowa”. Białowieża 1991, 36–37.
38. *Nowotny M., Ishii D.*: Microcolumn Separations, Columns, Instrumentation and Ancillary Techniques. Elsevier, Amsterdam 1985.
39. *Pang G.-F., Chao Y.-Z., Liu X.-S., Fan C.-L.*: Multiresidue Liquid Chromatographic Method for Simultaneous Determination of Pyrethroid Insecticides in Fruits and Vegetables. *J. AOAC Int.* 1995, 78, 1474–1480.
40. *Paris N. A.*: Instrumental liquid chromatography. Elsevier, Amsterdam 1976.
41. *Sannino A.*: Determination of Phenylurea Herbicide Residues in Vegetables by Liquid Chromatography after Gel Permeation Chromatography and Florisil Cartridge Cleanup. *J. AOAC Int.* 1998, 81, 1048–1053.
42. *Scott R.P.W.*: Liquid Chromatography for the Analyst. Merck Dekker, Inc., New York 1994.
43. *Seńczuk W.* (Red.): Toksykologia. PZWL, Warszawa 1990.

44. *Snyder L.R., Kirkland J.J.*: Introduction to Modern Liquid Chromatography. New York, *J. Wiley & Sons*, 1994.
45. *Suprynowicz Z.* (Red.): Współczesne kierunki chromatografii. Wydawnictwo UMCS, Lublin 1986.
46. The Pesticide Manual. 12th Edition 2000–2001.
47. *Witkiewicz Z.*: Podstawy chromatografii. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 1995.

Otrzymano: 2000.12.17