

MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DO HERBICIDA GLIFOSATO: BREVE REVISÃO

Ozelito Possidônio de Amarante Júnior* e Teresa Cristina Rodrigues dos Santos

Departamento de Tecnologia Química, Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses, s/n, 65080-040 São Luís - MA

Natilene Mesquita Brito e Maria Lúcia Ribeiro

Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Rua Prof. Francisco Degni, s/n, 14800-900 Araraquara - SP

Recebido em 24/4/01; aceito em 24/9/01

METHODS OF EXTRACTION AND DETERMINATION OF THE HERBICIDE GLYPHOSATE: COMPACT REVISION. This paper supplies a compact revision about the main extraction, clean-up and pre-concentration methods of the herbicide glyphosate for water and soil samples, as well as methods for its determination and quantification.

Keywords: glyphosate; extraction; determination.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento acelerado da agricultura tem levado ao aumento da necessidade do uso de pesticidas. Nos últimos anos, várias alternativas foram criadas no sentido de reduzir esta necessidade. Entretanto, algumas mudanças, tais como o advento de alimentos transgênicos, resistentes a algumas pragas, não resultaram na diminuição do uso de herbicidas, uma vez que não impedem o desenvolvimento de ervas daninhas no campo. Dentre os vários tipos de herbicidas, destacam-se aqueles de amplo espectro de ação, como é o caso dos não-seletivos. O glifosato [N-(fosfonometil)glicina] é classificado como herbicida não-seletivo, sistêmico e pós-emergente, citado como o mais vendido em todo o mundo, em diferentes formulações, produzidas por distintas companhias de pesticidas^{1,2}. As estruturas do glifosato e de seu principal produto de degradação, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), são apresentadas na Figura 1.

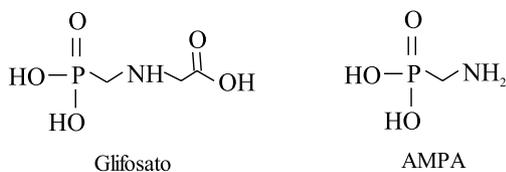


Figura 1. Estruturas dos compostos

Tamanho sucesso nas vendas do glifosato se deve à elevada eficiência na eliminação de ervas daninhas, com a vantagem adicional de ser de baixa toxicidade aos que o manipulam, à comunidade e ao ambiente. Apesar do herbicida ser citado como pouco tóxico, há evidências de efeitos deletérios em seres humanos devido à toxicidade ambiental, causando danos indiretos e também levando à resistência de algumas espécies de ervas que se adaptam após o uso prolongado do herbicida¹.

Em função da ampla utilização do glifosato em todo o mundo, o desenvolvimento de métodos de extração e análise que permitam a detecção e quantificação do herbicida em amostras naturais são de suma importância. O objetivo deste trabalho é, portanto, discutir os

principais métodos para extração e análise do glifosato encontrados na literatura bem como para seu produto de degradação.

MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E PRÉ-CONCENTRAÇÃO

Os métodos de extração de glifosato e AMPA em amostras de solo e água são apresentados na Tabela 1.

Extração em amostras de solo

Devido à elevada polaridade do glifosato e sua tendência em formar espécies iônicas, a maioria dos procedimentos de extração do herbicida se baseiam em reações ácido-base, onde o composto, inicialmente ligado a espécies iônicas do solo através do grupo fosfato, passa, então, a interagir com os íons da solução². Dessa forma, nos processos de extração são utilizadas, basicamente, soluções de bases fortes (por exemplo, KOH, NaOH), sais de bases fortes (como KH_2PO_4), bases fracas (tais como trietilamina, NH_4OH) ou ácidos fracos, seguindo-se, na maioria das vezes, de etapas de retenção/eluição em resinas de troca iônica.

A eficiência no processo de extração do glifosato e AMPA está diretamente relacionada com o tipo de solo. Em geral, melhores recuperações são observadas para solos orgânicos, enquanto que para solos argilosos e minerais, devido à elevada competitividade pelos sítios iônicos do solo, a eficiência no processo de extração fica relativamente comprometida, resultando em menores recuperações³.

Vários procedimentos⁴ de extração para glifosato em amostras de solo foram testados, acompanhando a recuperação para solos tratados com substâncias radiomarcadas em intervalos de 14 dias (glifosato-¹⁴C). Dos procedimentos testados, três apresentaram recuperações superiores a 73%: (i) extração com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹; (ii) com solução de H_3PO_4 0,35 mol L⁻¹ e (iii) com solução de NH_4OH 0,5 mol L⁻¹.

Em outro estudo⁵, foi feita extração com solução de KOH 0,6 mol L⁻¹, resultando em recuperações entre 88-109% e 73-103% para glifosato e AMPA, respectivamente. Após a extração alcalina, o sobrenadante foi levado a pH entre 5,0 e 8,0 com solução de HCl. Friestad e Broenstad⁶ utilizaram, igualmente, solução de KOH, realizando duas etapas de extração, seguidas de purificação com resina de troca aniônica na forma OH. A eluição foi feita com HCl 1 mol L⁻¹ e as recuperações obtidas foram superiores a 60%. Esta extração pode ser feita, ainda, com mistura de NH_4OH 0,25 mol L⁻¹ e KH_2PO_4 0,1

*e-mail: ozelito@terra.com.br

Tabela 1. Extração de glifosato e AMPA em amostras de água e solo

Amostra	Extração	Purificação	Recuperação	Ref.	
Solo	NH ₄ OH 0, 5 mol L ⁻¹	Resina de troca aniônica seguida de resina de troca catiônica	79% (glifosato) 68,5% (AMPA)	3	
	NaOH 0,1 mol L ⁻¹ H ₃ PO ₄ 0,35 mol L ⁻¹ NH ₄ OH 0,5 mol L ⁻¹		73% (glifosato)	4	
	KOH 0,6 mol L ⁻¹ (neutralizando o sobrenadante com HCl)		88-109% (glifosato) 73-103% (AMPA)	5	
	KOH 1 mol L ⁻¹	Resina de troca aniônica (OH ⁻)	> 60% (glifosato e AMPA)	6	
	NH ₄ OH 0,25 mol L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ 0,1 mol L ⁻¹	Resina de troca catiônica (H ⁺)	90-100% (glifosato) 89-103% (AMPA)	7	
	Trietilamina 0,1 mol L ⁻¹	Resina de troca aniônica (Cl ⁻) seguida de troca catiônica (H ⁺)	88-104% (glifosato)	8	
	Trietilamina 0,1 mol L ⁻¹	Resina Dowex 1-X8		9	
	KOH 0,2 mol L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ FMOC-Cl 0,01 mol L ⁻¹			10	
	Água	Triclorometano (extração dos interferentes e descarte da fase orgânica)	Resina de troca catiônica (Fe ³⁺) seguida de troca aniônica (Cl ⁻)	80,9% (glifosato) 79,2% (AMPA)	12
		Diclorometano (extração de interferentes)	Resina de troca aniônica (AG 1-X8)	98,3% (glifosato) 86,3% (AMPA)	13
Diclorometano (extração de interferentes)		Resina de troca aniônica (OH ⁻)	~85% (glifosato)	14	
Hipoclorito de aminas em hexano, seguido de extração em NaOH				15	
Extração em Fase Sólida (EFS)		Resina de troca catiônica (Fe ³⁺) seguida de troca aniônica (Cl ⁻)	> 95% (glifosato)	16	
EFS		Resina de troca aniônica (OH ⁻)	67-81% (glifosato)	6	
Diclorometano/2-propanol (após derivação, purificação e acidificação)				17	
EFS (após derivação)			> 94% (glifosato e AMPA)	18	
EFS		Resinas de troca catiônica e aniônica		21	
EFS		Resina de troca aniônica	67-100% (glifosato)	22	

mol L⁻¹, seguida de uma etapa de purificação com coluna contendo resina catiônica na forma H⁺. Foram obtidas recuperações entre 90-100% para o herbicida e 89-103% para seu metabólito⁷.

Thompson e colaboradores³ realizaram extração com NH₄OH 0,5 mol L⁻¹, seguida de purificação em duas etapas: a primeira utilizando resina de troca aniônica, eluída com NH₄HCO₃ 1 mol L⁻¹, em que o bicarbonato foi removido por repetidas evaporações e redissoluções com água deionizada; a segunda etapa, efetuada em coluna com resina de troca catiônica, eluída com água, depois de evaporada e redissolvida em solução de KH₂PO₄ com 4% de metanol (pH 1,9). Foram obtidas recuperações em torno de 79 e 68,5% para glifosato e AMPA, respectivamente, para solos orgânicos, enquanto que em solos minerais obtiveram-se recuperações de 73 e 57% para estes compostos.

Glifosato foi também extraído de quatro tipos distintos de solos, utilizando solução de trietilamina 0,1 mol L⁻¹, seguida de purifica-

ção com resina de troca aniônica, na forma Cl⁻, e resina catiônica, na forma H⁺. Observou-se recuperações entre 88 e 104% para extrações realizadas logo após a fortificação do solo⁸. No entanto, para extrações feitas 13 h após a fortificação com o herbicida, considerável decréscimo nas recuperações foi observado. Deste estudo, pode-se concluir que a trietilamina é eficiente para a extração do herbicida solúvel ou fracamente ligado, não sendo eficaz quando o glifosato está fortemente adsorvido pelos constituintes do solo. Em outro estudo utilizando trietilamina⁹, foi realizada etapa de purificação com resina Dowex 1-X8 (50 a 100 mesh) e eluição com solução de HCl 0,1 mol L⁻¹, obtendo-se resultados similares.

Miles e Moye¹⁰ apresentaram diferentes formas de extração do herbicida, de acordo com a característica do solo. Para solos argilosos e com altos teores de matéria orgânica, foi utilizada solução de KOH 0,2 mol L⁻¹ (extrações por 15 min). Para solos com baixos teores de argila e matéria orgânica, foi usada uma solução de KH₂PO₄

0,1 mol L⁻¹. Ambos os métodos de extração são seguidos de centrifugação, filtração, derivação com clorofornato de 9-fluorenil-metoxicarbonil (FMOC-Cl) 0,01 mol L⁻¹ em acetona, em meio tamponado com borato (pH 9) e extração com acetato de etila ou éter.

Extração em amostras de água

Extrações de glifosato e seu principal metabólito em amostras de água são feitas, em geral, utilizando-se resinas de troca iônica ou, ainda, com prévia derivação e transformação em compostos apolares que podem ser, em função do agente derivatizante, mais facilmente extraídos. Em alguns estudos, em amostras de águas filtradas, é feito apenas o ajuste de pH, seguido de evaporação.

Milles e colaboradores¹¹ trabalharam com amostras de água filtradas em papel Whatman n° 1 (qualitativo), com adição de tampão fosfato (KH₂PO₄ 0,1 mol L⁻¹), em seguida concentrando as amostras diretamente em evaporador rotatório e procedendo nova filtração em filtro 0,2 µm. Foram obtidas recuperações entre 80 e 100%, para AMPA, e 76 a 111%, para glifosato.

Uma prática comum é efetuar a prévia extração dos possíveis interferentes, extraindo com solventes orgânicos. Cowell e colaboradores¹² utilizaram extração com triclorometano, purificando a fase aquosa em resina, na forma Fe³⁺. A eluição foi feita com HCl 6 mol L⁻¹, seguida de tratamento com resina de troca aniônica, eluição com HCl, evaporação até *secura*, retomando em água. Foram obtidas recuperações de 80,9% para glifosato e 79,2% para AMPA.

Wigfield e Lanouette¹³ utilizaram partição, usando diclorometano, eliminando os compostos orgânicos de baixa polaridade pelo descarte da fase orgânica. A fase aquosa, contendo glifosato e AMPA, foi tratada com resina de troca aniônica AG 1-X8, eluída com citrato de potássio. Efetuada uma segunda extração em diclorometano, e descartando-se a fase orgânica, foi possível obter recuperações de 98,3% para glifosato e 86,3% para AMPA. No entanto, Abdullah e colaboradores¹⁴, realizando procedimento semelhante, obtiveram recuperações em torno de 85%. No caso, a fase aquosa, após extração dos interferentes apolares com diclorometano, foi purificada por passagem através de cartucho contendo 2 mL de resina, na forma OH⁻, lavagem com água e eluição com tampão citrato, pH 5.

Mistura de hexano e benzeno (2:3), na presença de solução de MgCl₂ 1 mol L⁻¹ foi usada na extração e análise de diclorvos, inseticida organofosforado, sendo aproveitada a fase aquosa para a determinação de glifosato, extraído com mistura de hipoclorito de aminas primárias de cadeia normal, com 10 a 12 carbonos (0,1 mol L⁻¹) em hexano¹⁵. Neste procedimento, uma nova etapa de extração foi realizada com NaOH 1 mol L⁻¹, a fase aquosa sendo evaporada até *secura*, em presença de peróxido de hidrogênio a 30%, e redissolvida em água.

Outros procedimentos de extração¹⁶ são baseados apenas na purificação com resina de troca iônica, sendo a amostra filtrada e tratada com resina de troca catiônica, na forma Fe³⁺, lavada com água e HCl 6 mol L⁻¹, eluída com esta mesma solução ácida. O uso de resina catiônica dispensa a acidificação da amostra devido às propriedades zwitteriônicas do glifosato, que o mantém na forma catiônica mesmo em pH de águas naturais. O eluato, tratado com resina de troca aniônica, na forma Cl⁻, lavada em pequeno volume de HCl 6 mol L⁻¹, foi eluído com a mesma solução ácida. Após evaporação até *secura*, o resíduo foi redissolvido em água. Recuperações superiores a 95% foram obtidas.

Tratamento mais simples foi dado por Friestad e Broenstad⁶, que utilizaram apenas uma etapa de purificação em coluna de troca aniônica, na forma OH⁻, lavada com KOH e água, e eluída com HCl 1 mol L⁻¹. O eluato foi tratado com carvão ativado, obtendo recuperações de 67 a 81%.

Entre os métodos que fazem prévia derivação do glifosato, cita-se o de Gauch e colaboradores¹⁷ no qual foi utilizada água potável com tampão borato 0,5 mol L⁻¹, derivando com FMOC-Cl em acetona e à temperatura ambiente, purificando os derivados com extração dos interferentes em diclorometano/2-propanol (3:1). A fase aquosa foi acidificada com ácido sulfúrico, e nova extração com solventes orgânicos foi realizada, descartando a fase aquosa. A solução orgânica contendo o derivado do glifosato foi seca por passagem em coluna de sulfato de sódio anidro, tendo seu pH corrigido com solução de amônia 25%, evaporação a 60 °C, lavagem do resíduo com diclorometano e redissolução em solução aquosa de metanol 50%.

Vreeken e colaboradores¹⁸, utilizando o mesmo procedimento de derivação prévia com FMOC-Cl, em meio tamponado com tampão borato, a 37 °C, acrescentaram uma etapa automatizada de extração em fase sólida (EFS), usando adsorvente polimérico (PLRP-S). Recuperações obtidas para glifosato e AMPA foram superiores a 94%.

Avramov e Vasileu¹⁹ evaporaram amostras de água até a *secura*, em atmosfera de N₂ a 70 °C, dissolvendo o resíduo em água e filtrando a solução resultante. Em seguida, glifosato foi derivado com cloreto de dansila na presença de NaHCO₃ e acetona. A derivação foi feita sob abrigo de luz e à temperatura ambiente. Oppenhuizen e Cowell²⁰ filtraram amostras de água em fibra de vidro (1 µm), evaporaram até a *secura* e redissolveram em solução de tampão fosfato 0,005 mol L⁻¹ (pH 2,1) e EDTA 0,03 mol L⁻¹. A mistura foi posteriormente filtrada em membrana 0,45 mm e diretamente analisada por cromatografia líquida com derivação em pós-coluna, resultando em recuperações superiores a 82%.

Procedimentos associando o tratamento com resinas de troca iônica e a derivação também têm sido desenvolvidos. Börjesson e Torstensson²¹, trataram amostras de água acidificadas com resina catiônica e, em seguida, resina aniônica, efetuando derivação com ácido trifluoroacético anidro (TFAA) e trifluoroetanol (TFE), retomando com acetato de etila, para posterior análise por cromatografia gasosa.

Sem e Baddoo²², procederam a análise com água desaeurada em banho de ultra-som, ajustando para pH 10 com solução de NaOH. A amostra filtrada foi passada em resina de troca aniônica e eluída com ácido sulfúrico 2 mol L⁻¹, em seguida, feita a derivação utilizando iodeto de potássio, ácido sulfâmico e ácido acético. Recuperações entre 67-100% foram obtidas.

MÉTODOS DE ANÁLISE

A molécula do glifosato apresenta elevada polaridade e ausência de cromóforo. Por estes motivos, a determinação do glifosato por cromatografia necessita de adaptações que permitam sua detecção. Tais adaptações incluem, basicamente, reações de derivação ou, ainda, alteração de alguma propriedade física que possa ser relacionada à quantidade de glifosato na amostra. Embora em algumas análises as alterações da estrutura da molécula do herbicida sejam feitas ainda durante as etapas de extração, na maioria das vezes, os procedimentos de derivação são feitos durante a análise propriamente dita, em etapas que antecedem a separação cromatográfica ou em reação pós-coluna.

Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A alta polaridade da molécula do glifosato e do seu metabólito tem levado ao desenvolvimento de muitos métodos de análise baseados em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), de modo que a maioria das investigações relatadas na literatura para este herbicida se referem a esta técnica analítica. A dificuldade desta análise se refere à forma de detecção dos compostos, visto que ambos

não possuem grupos cromóforos que possam ser detectados diretamente por detectores colorimétricos ou de UV, acima de 200 nm. Faz-se necessário, portanto, o uso de reações de derivação, geralmente em pós-coluna, a fim de se obter um derivado que responda a estes detectores. Pode-se também, após derivação, utilizar detectores de fluorescência²³. A Tabela 2 apresenta os métodos de determinação do Glifosato e seu produto de degradação por CLAE.

Determinação por cromatografia líquida usando detecção por UV

Em 1983, Burns²⁴ publicou trabalho de determinação de glifosato por cromatografia líquida e detecção direta por UV, realizando um estudo colaborativo, no qual 20 laboratórios analisaram três pares de amostras combinadas, contendo alto teor do herbicida (41 a 96%). As amostras foram dissolvidas na fase móvel, tampão fosfato pH 1,9, contendo 4% de metanol, em um fluxo de 2,3 mL/min. Foi utilizada uma coluna de Partisil-10 SAX. A detecção foi realizada em 195 nm, com coeficientes de variação de 0,88 a 1,7%. Morlier e Tomkins²⁵, utilizando o mesmo método em formulados do herbicida, obtiveram resultados similares. No entanto, segundo Morovjan e colaboradores²⁶, é possível obter limites de detecção de 10 µg/L utilizando coluna Dionex PAX-500 e fase móvel de tampão fosfato pH 3,15 e acetonitrila.

A sensibilidade do método pode ainda ser melhorada com uma etapa de derivação, obtendo-se um derivado que absorva em comprimento de onda maior. Powell e colaboradores²⁷ derivaram o herbicida com metanol/fenil-isotiocianato/trietilamina/água (7:1:1:1), utilizando para a separação cromatográfica uma coluna recheada com material de C18 (4 µm) e eluindo com gradiente de acetonitrila em tampão acetato de sódio (pH 6,45) e acetonitrila/água/metanol. O comprimento de onda usado na detecção foi 254 nm, resultando em adequada linearidade entre 0,05 e 10 nmol do herbicida. As recuperações obtidas foram superiores a 77%.

Huber e Calabrese²⁸ derivaram o glifosato presente em amostras aquosas com FMOC-Cl, extraíndo os derivados com acetato de etila, evaporando até a secura e, em seguida, retomando com trietoximetano, sob aquecimento. A análise cromatográfica foi feita em coluna recheada com C18 (5 µm) e a eluição com ácido trifluoroacético. A detecção foi realizada em comprimento de onda de 264 nm.

Determinação por cromatografia líquida com detecção colorimétrica

Para determinação colorimétrica é necessária a derivação obtendo-se, assim, compostos coloridos. Uma alternativa é derivá-lo com 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno na presença de etanol e NaBH₄. Os derivados são extraídos com acetato de etila, evaporados até secura, dissolvidos em água e depois separados em cartucho C18. Neste caso, a eluição foi feita com mistura de brometo de tetraetilamônio 0,02 mol L⁻¹ e tampão fosfato de sódio pH 3,2. A detecção foi realizada em 405 nm, obtendo-se limite de detecção de 0,05 µg/g²⁹.

Thompson e colaboradores³ procederam a derivação em pós-coluna com ninhidrina, a 100 °C e detecção em 570 nm. Os limites de detecção obtidos foram em torno de 0,03 µg/g para glifosato e 0,01 µg/g para AMPA. No entanto, melhor sensibilidade para glifosato poderia, ainda, ser obtida se fosse utilizada temperatura mais elevada durante a reação em pós-coluna. A separação cromatográfica foi feita em coluna catiônica, a 50 °C, eluindo com tampão fosfato em pH 1,9, contendo 4% de metanol.

Observou-se, no entanto, que as recuperações obtidas no método de derivação com ninhidrina variavam de acordo com o tipo de solo em estudo. Contrariamente ao citado na literatura, em solos orgânicos, geralmente, as recuperações para glifosato foram superio-

res às obtidas em solos minerais. Concentrações de glifosato e AMPA entre 0,5-30 ng/mL e 0,125-7,5 ng/L puderam ser determinadas.

Determinação por cromatografia líquida com detector de fluorescência

Certamente a determinação por fluorescência é o método de detecção mais aplicado na análise cromatográfica de glifosato devido à maior sensibilidade e seletividade deste tipo de detecção, se comparada com a detecção por absorção no UV-VIS. Desta forma, glifosato e seu produto de degradação podem ser devidamente transformados em compostos fluorescentes através de reações de derivação específicas. Dentre os reagentes mais utilizados estão o *o*-fitalaldeído (OPA), o FMOC-Cl e o cloreto de *p*-toluenosulfonila.

A derivação com OPA é bastante citada na literatura. Neste caso, glifosato é previamente oxidado a glicina, em meio alcalino e em temperaturas superiores a 40°C. Para formação de um composto fluorescente mais estável, a reação é feita em presença de mercaptoetanol⁴.

Tuinstra e Kienhuis³⁰ utilizaram reação em pós-coluna, oxidando o glifosato com hipoclorito em pH 9,1, reagindo, em seguida, com OPA e 2-mercaptoetanol em metanol (pH 9,2). A separação cromatográfica de glifosato e AMPA foi realizada em coluna Ionosphere A, eluídos com KH₂PO₄ em pH 2,1, sendo medidos em 400 nm, com excitação em 360 nm. Recuperações em torno de 80% foram obtidas. Em outro estudo¹² a coluna cromatográfica foi substituída por coluna catiônica, operada a 50 °C, eluída com KH₂PO₄ (pH 1,9) em metanol, usando as mesmas reações em pós-coluna, porém utilizando excitação em 340 nm e emissão em 455 nm. Recuperações similares às anteriormente citadas foram obtidas para glifosato e AMPA, com limite de detecção de 0,05 a 5 µg/g. Abdullah e colaboradores¹⁴ obtiveram recuperações pouco superiores (85%) substituindo a coluna por uma de fase reversa, eluindo com tampão KH₂PO₄ em pH 2,1. A detecção foi realizada nos mesmos comprimentos de onda já citados.

Reupert e Fuchs³¹ obtiveram recuperações superiores a 95% por substituição da coluna por uma específica para glifosato, baseada em troca catiônica, na forma de K⁺, operada a 55 °C, e também eluída com tampão fosfato (pH 2,05). A oxidação prévia foi feita com hipoclorito de sódio em pH 11,9 em temperatura de 40 °C e a derivação ocorreu com OPA e NN-dimetil-2-mercaptoetilamina em pH 10,6 e à temperatura ambiente. O limite de detecção citado foi de 0,5 µg/L, com excitação em 340 nm e medida de fluorescência em 440 nm.

Outra derivação¹⁹ pode ser feita com cloreto de dansila em reação por 4 h, sob abrigo da luz e temperatura ambiente, utilizando tampão carbonato 0,05 mol L⁻¹. A determinação, feita com λ_{exc} = 340 nm e λ_{em} = 550 nm, apresentou limites de detecção de 20 ng para glifosato e 2 ng para AMPA. O método apresentou boa linearidade entre 0,2 e 1 µg e entre 0,02 e 0,5 µg para o herbicida e seu produto de degradação, respectivamente.

A etapa de derivação do glifosato pode ser efetuada de forma direta em amostras de solo com FMOC-Cl em acetona por 20 min¹⁰. Os derivados obtidos foram posteriormente extraídos em acetato de etila ou éter, realizando separação cromatográfica em coluna de NH₂ e eluindo com tampão KH₂PO₄ (pH 6) e acetonitrila. A detecção foi realizada com λ_{exc} = 270 nm e λ_{em} = 315 nm. Ainda utilizando FMOC-Cl como reagente de derivação, procedendo a reação por 30 min, Sancho e colaboradores⁵ testaram três separações cromatográficas. A primeira foi realizada com coluna C18, eluindo com acetonitrila/tampão fosfato pH 6,3; a segunda foi feita em coluna de menor comprimento, porém com mesmo material, eluindo com acetonitrila/tampão fosfato pH 5,7 e a terceira separação foi feita com coluna NH₂, eluída com acetonitrila/tampão fosfato pH 5,7. A detecção foi reali-

Tabela 2. Determinação de glifosato e AMPA por CLAE

Amostra	Derivação	Coluna e eluição	Detecção	Ref.
Formulados		FM: tampão fosfato (pH 1,9) Coluna: Partisil-10 SAX	UV (195 nm)	24
		FM: tampão fosfato (pH 1,9) Coluna: Partisil-10 SAX	UV (195 nm)	25
Soluções padrão		FM: tampão fosfato (pH 3,15) e acetonitrila Coluna: Dionex PAX-500	UV (195 nm)	26
	Metanol/fenilisocianato/trietilamina/ água (7:1:1:1)	FM: gradiente de acetonitrila em em tampão acetato e acetonitrila/água/metanol Coluna: C18	UV (254 nm)	27
Água	FMOCl	FM: ácido trifluoroacético Coluna: C18	UV (264 nm)	28
Solo	1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno/ etanol/NaBH ₄	FM: brometo de tetraetilamônio e tampão fosfato (pH 3,2) Coluna: C18	VIS (405 nm)	29
	ninhidrina	FM: tampão fosfato (pH 1,9) Coluna: catiônica	VIS (570 nm)	3
Vegetais	Hipoclorito, OPA, mercaptoetanol (pós-coluna)	FM: KH ₂ PO ₄ (pH 2,1) Coluna: Ionosphere A	Fluorescência $\lambda_{exc} = 360$ nm $\lambda_{em} = 400$ nm	30
Água	Hipoclorito, OPA, mercaptoetanol (pós-coluna)	FM: KH ₂ PO ₄ (pH 1,9) Coluna: catiônica	Fluorescência $\lambda_{exc} = 340$ nm $\lambda_{em} = 455$ nm	12
	Hipoclorito, OPA, mercaptoetanol (pós-coluna)	FM: KH ₂ PO ₄ (pH 2,1) Coluna: C18	Fluorescência $\lambda_{exc} = 340$ nm $\lambda_{em} = 455$ nm	14
	Hipoclorito, OPA, N,N-dimetil-2- mercaptoetilamina (pós-coluna)	FM: KH ₂ PO ₄ (pH 2,05) Coluna: específica para glifosato (troca catiônica, K ⁺)	Fluorescência $\lambda_{exc} = 340$ nm $\lambda_{em} = 440$ nm	31
	Cloreto de dansila		Fluorescência $\lambda_{exc} = 340$ nm $\lambda_{em} = 550$ nm	19
Solo	FMOCl	FM: KH ₂ PO ₄ (pH 6) e acetonitrila Coluna: NH ₂	Fluorescência $\lambda_{exc} = 270$ nm $\lambda_{em} = 315$ nm	10
	FMOCl (pós-coluna)	FM: KH ₂ PO ₄ (pH 6,3) e acetonitrila - Coluna: C18 FM: KH ₂ PO ₄ (pH 5,7) e acetonitrila - Coluna: C18 FM: KH ₂ PO ₄ (pH 6,3) e acetonitrila - Coluna: NH ₂	Fluorescência $\lambda_{exc} = 340$ nm $\lambda_{em} = 440$ nm	5
Soluções padrão	<i>p</i> -tolueno-sulfonila	FM: KH ₂ PO ₄ (pH 2,3) e acetonitrila Coluna: C18	Fluorescência $\lambda_{em} = 240$ nm	32
	Alumínio e morina (pós-coluna)	FM: solução de nitrato de sódio - Coluna: PRP-X100 FM: solução de ácido nítrico - Coluna: PRP-X400	Fluorescência	33
Água	FMOCl	Coluna: C18	EM/EM	18
		FM: solução de Na ₂ CO ₃ e NaHCO ₃ (pH 10,30; isocrática) ou de Na ₂ CO ₃ e NaHCO ₃ (pH 10,30) (eluente A) e os mesmos sais em pH 10,08 (gradiente) Coluna: troca aniônica	EM	34
	Ru(tris-(2,2'-bipiridil)) ₃ ²⁺ (pós-coluna)	FM: solução de ácido nítrico (pH 2,5) - Coluna: troca catiônica	Quimiluminescência	35
	Ru(tris-(2,2'-bipiridil)) ₃ ²⁺ (pós-coluna)	FM: tampão fosfato (pH 9) - Coluna: troca aniônica FM: solução de Ru(tris-(2,2'- bipiridil)) ₃ ²⁺ em acetonitrila/tampão fosfato- Coluna: troca aniônica		
	Iodeto de potássio, ácido sulfâmico e ácido acético (pós-coluna)	FM: solução de ácido sulfúrico Coluna: troca aniônica	Quimiluminescência	22

zada com $\lambda_{exc} = 340$ nm e $\lambda_{em} = 440$ nm, apresentando recuperações de 88 a 109% para glifosato e 73 a 103% para AMPA.

Kawai e colaboradores³² utilizaram *p*-tolueno-sulfonila em acetonitrila e tampão fosfato (pH 11) para derivação prévia do glifosato, a 50 °C por 5 min, seguida de análise cromatográfica em coluna C18, eluída com tampão fosfato em pH 2,3 e acetonitrila. A detecção do composto fluorescente foi feita em 240 nm.

Outra alternativa de análise do glifosato foi feita a partir de composto fluorescente formado entre alumínio e morina, testando a separação com duas colunas cromatográficas, PRP-X100, eluída com nitrato de sódio, e PRP-X400, eluída com ácido nítrico³³. A reação de derivação foi feita em pós-coluna, em meio de tampão acetato, em 80% de etanol, operada a 55 °C. A detecção foi efetuada por fluorescência, sendo obtido limite de detecção de 14 ng.

Determinação por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

Segundo Bauer e colaboradores³⁴, a determinação cromatográfica de glifosato com detecção por espectrometria de massas (EM) sem derivação não é suficientemente eficiente. Vreeken e colaboradores¹⁸ realizaram derivação com FMOC-Cl, seguido de separação cromatográfica utilizando coluna C18. Foi utilizado CLAE/EM/EM com ionização por “eletrospray”, monitorando-se três fragmentos para o herbicida e seu produto de degradação, melhorando a seletividade do método. Bauer e colaboradores³⁴, substituíram a coluna C18 por uma de troca aniônica, testando duas eluições: a primeira isocrática com mistura de carbonato e bicarbonato de sódio em pH 10,30 e outra em gradiente de eluição onde o eluente ‘A’ era a mistura já citada e o eluente ‘B’ uma mistura dos mesmos sais, em pH 10,08. O uso de gradiente de eluição resultou em melhores cromatogramas, aumentando a sensibilidade do método. Glifosato e AMPA foram determinados por fragmentos característicos, *m/z* 168 e *m/z* 110, respectivamente.

Determinação por cromatografia líquida com quimiluminescência

A análise por cromatografia líquida usando detecção por quimiluminescência foi testada em três metodologias: a primeira utilizando coluna de troca catiônica, eluída com ácido nítrico em pH 2,5 acoplada a uma pós-coluna com adição de Ru(tris-(2,2'-bipiridil))₃²⁺; a segunda com coluna de troca aniônica, eluída com tampão fosfato em pH 9, acoplada a pós-coluna com adição de Ru(tris-(2,2'-bipiridil))₃²⁺ em tampão fosfato; e a terceira metodologia utilizando a mesma coluna de troca aniônica citada anteriormente, mas eluída com Ru(tris-(2,2'-bipiridil))₃²⁺ em acetonitrila/tampão fosfato em pH 9,8 (1:9), sem necessidade de pós-coluna³⁵. Todas as três metodologias utilizaram detecção por quimiluminescência, usando cela de 2,5 µL, com eletrodo de trabalho de carbono mantido a 1,25 V e eletrodo de referência de Ag/AgCl. Obteve-se limite de detecção de 0,01 µmol L⁻¹.

Sem e Baddoo²² utilizaram coluna cromatográfica de troca aniônica, eluída com ácido sulfúrico, e pós-coluna mergulhada em água a 70 °C, reagindo-se com iodeto de potássio, ácido sulfâmico e ácido acético. O monóxido de nitrogênio gerado foi arrastado por Hélio para a cela, obtendo-se recuperações de 67 a 100%.

Análise por cromatografia em camada delgada (CCD)

Embora pouco aplicável a amostras ambientais devido à baixa sensibilidade, Bunyatyan e Gevorgyan³⁶ determinaram glifosato quantitativamente por cromatografia em camada delgada (CCD), usando placas de Fxiona 50-X8 (forma Na⁺), operadas a 50 °C e

utilizando solução de Ba₂B₄O₇ como fase móvel. A detecção foi realizada com ninhidrina 1% em acetona e acetato de cádmio em solução aquosa de anidrido acético em meio ácido (5:1). Segundo os autores, a relação entre a área da mancha e a concentração foi linear de 0,5 a 30 µg e 0,1 a 20 µg de glifosato e AMPA, respectivamente. Foram usados extratos aquosos das amostras, com limites de detecção de 0,05 mg/Kg para amostras de água e solo.

Análise por cromatografia gasosa (CG)

A técnica de cromatografia gasosa é a segunda mais amplamente empregada para determinação de glifosato. Para a determinação do herbicida por CG, faz-se necessária uma prévia derivação para obtenção de composto volátil, porém, esta técnica apresenta a vantagem da ótima sensibilidade. Os métodos de análise deste herbicida e seu produto de degradação por CG são mostrados na Tabela 3.

Determinação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

Tsunoda³⁷ determinou glifosato por CG após derivação com N-metil-N-(t-butildimetilsilil)trifluoroacetamida em DMF, obtendo-se, assim, um composto volátil. A análise cromatográfica foi realizada em coluna DB-1, com gradiente de temperatura de 100 a 300 °C, a 8 °C/min, utilizando He a 1 mL/min como gás de arraste. A detecção foi realizada por EM utilizando ionização por impacto de elétrons (IE) ou com ionização química (IQ) com isobutano como gás reagente. Dois fragmentos característicos foram utilizados para quantificação. No estudo foram obtidos limites de detecção de 10 ng, para IE, e 20 ng, para IQ, de glifosato em soluções padrão.

Metodologia similar para derivação de glifosato e AMPA foi feita com reação a 100 °C, por 10 min e 60 min, respectivamente³⁸. No entanto, utilizaram outro tipo de coluna, de menor comprimento, operada a 200 °C para glifosato e 170 °C para AMPA, com nitrogênio como gás de arraste. Para a detecção combinaram FC e EM, o que garantiu boa sensibilidade e seletividade do método. Alferness e Iwata⁷, entretanto, realizaram derivação com heptafluorobutanol e TFAA, seguida da análise cromatográfica. A programação de temperatura foi de 90 até 290 °C a 30 °C/min, usando He como gás de arraste. A detecção foi feita por EM, selecionando dois íons característicos para glifosato e AMPA. Recuperações de 90 a 100% e 89 a 103% foram obtidas para o herbicida e seu produto de degradação, respectivamente, com limite de detecção de 0,01 mg/Kg.

Outra reação de derivação foi feita com TFAA e TFE²¹. Amostras de água previamente tratadas em colunas de troca iônica, foram concentradas e retomadas com os reagentes de derivação. A reação foi feita por 1 h a 100 °C. Após evaporação e redissolução em acetato de etila, os extratos contendo os derivados de glifosato e AMPA foram analisados por CG/EM, ambos identificados por três íons característicos. Boa linearidade foi obtida para o pesticida e seu metabólito (0,1 a 2,5 mg/L), embora baixos limites de detecção e quantificação tenham sido obtidos (0,05 e 0,1 mg/L). As recuperações variaram de 58 a 91% para glifosato em solo, com coeficientes de variação de 23%.

Determinação por cromatografia gasosa com detecção por fotometria em chama

Tsuji e colaboradores³⁹ puderam determinar glifosato em grãos, utilizando CG após derivação com trimetilortoacetato a 80 °C por 1,5 h. Antes da análise propriamente dita, foi necessária uma etapa de purificação. A análise cromatográfica foi feita com programação de temperatura de 50 °C até 250 °C, utilizando hélio como gás de

Tabela 3. Determinação de glifosato e AMPA por CG

Amostra	Derivação	Condições analíticas	Deteção	Ref.
Soluções padrão	N-metil-N-(t-butildimetilsilil)-trifluoroacetamida	Coluna: DB-1 Temp.: 100-300°C (8°C/min) Gás de arraste: He	EM usando IE ou IQ	37
Soluções padrão	N-metil-N-(t-butildimetilsilil)-trifluoroacetamida	Temp.: 170-200°C Gás de arraste: N ₂	FC e EM	38
Solo	Heptafluorobutanol e TFAA	Temp.: 90-290°C (30°C/min) Gás de arraste: He	EM	7
Água	TFAA e TFE		EM	21
Vegetais	trimetilortoacetato	Temp.: 50-250°C Gás de arraste: He	FC	39
Soluções padrão	Trifluoroetanol e pentafluoropropanol	Temp.: 150°C Gás de arraste: N ₂	FC (modo P) e DCE	40
Água Solo Raízes	Cloroformiato de isopropila e diazometano	Temp.: 170-270°C (10°C/min) Gás de arraste: N ₂	FC	41
Vegetais	Anidrido trifluoroacético e diazometano	Temp.: 110-175°C (10°C/min)	FC	42
Solo	Anidrido trifluoroacético e TFE		DCE	8
Água potável	Anidrido trifluoroacético e TFE		DNP	43
Água Solo	N-isobutoxicarbonilmetilester	Temp.: 170-270°C (10°C/min) Gás de arraste: N ₂	FC/EM	44
Sangue	Pirólise (Cr-Na ₂ CO ₃)	Coluna com 50% de PEG 20M Temp.: 50°C Gás de arraste: N ₂	DIC	45

arraste e deteção por FC. Recuperações superiores a 70% foram observadas. Os limites de deteção foram de 0,02 mg/Kg.

A derivação com TFE ou pentafluoropropanol e anidrido trifluoroacético ou heptafluorobutírico apresentaram boa sensibilidade⁴⁰. Após a derivação, a separação e análise foram feitas em coluna cromatográfica operada a 150 °C, com nitrogênio como gás de arraste, a 27,6 mL/min. Utilizaram como detectores o fotométrico de chama (no modo P) ou o de captura de elétrons, DCE.

Melhor sensibilidade foi, ainda, obtida por Kataoka e colaboradores⁴¹ que derivaram o glifosato com cloroformiato de isopropila e diazometano, analisando por CG, com programação de temperatura de 170 até 270 °C a 10 °C/min, usando nitrogênio como gás de arraste a 10 mL/min e obtendo limites de deteção de 8 a 20 pg.

Seiber e colaboradores⁴² utilizaram derivação com anidrido trifluoroacético e diazometano, com prévia separação por cromatografia líquida e eluição em gradiente de t-butilmetilester e tetrahydrofurano e deteção a 220 nm. Após a separação por CLAE, foi feita a análise por CG, utilizando coluna específica, operada com programação de temperatura de 110 °C até 175 °C, a 10 °C/min e deteção por FC. Recuperações de 87% foram obtidas para alimentos fortificados em concentrações variando de 0,1 a 0,25 µg/g de glifosato.

A prévia derivação com anidrido trifluoroacético e trifluoroetanol também foi feita para análise por CG utilizando DCE⁸. Foram obtidas recuperações de 88 a 104% para o herbicida. Ainda com os mesmos reagentes sendo usados na derivação, a análise por CG usando detector de nitrogênio e fósforo (DNP) forneceu recuperações de 75% para glifosato e 80% para AMPA com limite de deteção em torno de 0,01 µg/g⁴³.

Realizando derivação com N-isobutoxicarbonilmetilester, seguida de análise cromatográfica, Kataoka e colaboradores⁴⁴ utilizaram a

deteção por fotometria em chama, confirmando as estruturas por espectrometria de massas. A análise apresentou relação linear para concentrações entre 5 e 200 ng e recuperações de 96,2 a 100,3%, para amostras de água, e 81,7 a 99,1% para amostras de solo. Limites de deteção de 10 e 15 pg para glifosato e AMPA, respectivamente, foram obtidos.

A pirólise a 590 °C, durante intervalo de 4 s, após adição de Cr-Na₂CO₃ (2:1), foi inicialmente feita, seguida por análise cromatográfica em coluna com 10% de PEG 20M, operada a 50 °C, com nitrogênio como gás de arraste e deteção por ionização em chama (DIC), obtendo recuperações de 98 a 102%⁴⁵.

Outras técnicas

Métodos baseados em outras técnicas, além das cromatográficas, vêm sendo desenvolvidos para a determinação de glifosato e seu metabólito, embora ainda sejam pouco utilizados. Estas técnicas incluem ressonância magnética nuclear de fósforo 31 (RMN ³¹P), pouco convencional, espectrofotometria, polarografia e eletroforese.

Determinação por RMN ³¹P

Amostras dissolvidas em D₂O (0,5 mL) foram analisadas por ressonância magnética nuclear de ³¹P, em frequência de 81 MHz, obtendo-se o espectro em 1 min. As recuperações não foram reportadas⁴⁶.

Determinação por espectrofotometria

Segundo Dong e colaboradores⁴⁷, é possível determinar glifosato em águas residuárias, utilizando método espectrofotométrico. Amos-

tras são diluídas com água destilada, seguida de reações com EDTA dissódico, nitrito de sódio e ácido sulfúrico, e depois com iodeto de potássio e amido, toda a reação ocorrendo a 15 °C. A absorvância foi medida em 550 nm, com linearidade entre 0,375 e 4,5 mg/L e recuperações de 95 a 104%. É importante ressaltar que é necessário um sistema com temperatura controlada, pois a reação do iodo com amido produz composto colorido, que têm diminuição de absorvância com o aumento de temperatura. Zhemchuzhin e Gorobets⁴⁸ também descrevem um método espectrofotométrico, neste caso, usando reação com água de bromo na presença de tampão acetato para formação de brometo do herbicida, e depois tampão pirofosfato, solução de álcooldehidrogenase e NAD⁺, em etanol aquoso a 50%. A determinação foi realizada a 340 nm, observando-se a diminuição da atividade enzimática.

Determinação por polarografia

Tanto amostras de solo quanto de água, após extração, purificação e pré-concentração, foram analisadas por polarografia para determinação de glifosato, tratando-se a amostra acidificada com carvão ativado, seguida de nitração de uma alíquota da amostra⁶. Um volume da amostra que não sofreu nitração foi colocada na célula polarográfica, sofrendo remoção do oxigênio por passagem de N₂. A medida foi iniciada depois de estabilizada a corrente inicial em -0,5 V, variando-se 2 mV/s na direção negativa, com pulso em amplitude de 100 mV e tempo de gota de 2 s. O procedimento foi repetido com a amostra que sofreu a nitração. As recuperações foram de 63 a 89% para solo e 67 a 81% para água, tendo como limite de detecção 0,5 a 1,0 µg/g.

Determinação por eletroforese

Amostras de soro sanguíneo foram desproteinizadas com ácido tricloroacético, centrifugadas e derivadas com cloreto de *p*-tolueno-sulfonila na presença de tampão fosfato (pH 11), sendo analisadas por eletroforese em coluna capilar de sílica fundida (72 cm x 50 µm) operada a 35 °C e 30 kV. Foi utilizado tampão borato (pH de 8,7 a 9,6) contendo 10% de metanol e detecção a 240 nm. A calibração mostrou linearidade para valores de 0,5 a 100 mg/L de glifosato e AMPA⁴⁹.

Alferness e Iwata⁷ desenvolveram um método de eletroforese com uma coluna capilar (64,5 cm x 50 µm) operada a 25 °C, com eletrólito de hidrogenofato de potássio ajustado a pH 7,5 e 0,5 mmol L⁻¹ de brometo de tetradeciltrimetilamônio, aplicando 27,6 kV e detectando a 240 nm. Este método foi aplicado a amostras de solo, água, tecidos animais e vegetais. Para água foram obtidas as recuperações de 95-97% (0,2 µg L⁻¹), 99-112% (10 µg L⁻¹), 99-105% (100 µg L⁻¹), enquanto que para solo obtiveram recuperações de 84 a 97% para amostras com níveis de fortificação de 0,05 a 0,50 mg/kg.

CONCLUSÕES

O glifosato apresenta características muito específicas, o que dificulta seu monitoramento em solo e água, sua determinação é de grande relevância devido à sua ampla utilização. A extração em amostras de solo tem sido realizada principalmente com reações ácido-base, sendo extremamente afetada pelas propriedades e composição do solo. Bases fracas orgânicas, como trietilamina, são eficazes apenas para extração do composto livre, não sendo capaz de extrair o composto adsorvido. Solos com maior teor de matéria orgânica apresentaram melhores recuperações, enquanto os minerais e argilosos apresentam recuperações inferiores devido à interação com os sítios iônicos do solo. Em amostras de água, podem ser efetuadas extrações em fase sólida (EFS) usando-se resinas de troca iônica, sendo

possível realizar a análise por simples filtração e evaporação da amostra. Uma outra metodologia é a derivação, onde se obtém compostos apolares que podem ser extraídos com solventes orgânicos. Esta derivação pode diminuir a recuperação do composto, uma vez que envolve o uso de maior número de etapas. Os estudos realizados para estes compostos, em geral, não avaliam a eficácia do processo de extração, apresentando recuperações relacionadas ao processo analítico completo, desde a extração até a detecção. Deste modo, torna-se difícil comparar as recuperações no sentido de avaliar qual o melhor procedimento de extração para o herbicida e seu produto de degradação.

A técnica mais utilizada para a determinação de glifosato é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), necessitando, entretanto de derivação para produção de compostos que interajam com radiação eletromagnética, aplicando-se, assim, detecção colorimétrica, por UV ou detecção fluorimétrica. Comparando com outros métodos de detecção, a determinação por absorção no UV-VIS apresenta como vantagens a simplicidade, bem como menores coeficientes de variação, recuperações e limites de detecção adequados.

A cromatografia gasosa (CG) apresenta a vantagem de possuir elevada sensibilidade, porém, exige derivação para obtenção de compostos voláteis. Pode-se, ainda, adicionar a especificidade da espectrometria de massas às técnicas cromatográficas, tanto líquida quanto gasosa.

Outras técnicas têm sido aplicadas na análise do herbicida, o que favorece o seu estudo. Entre elas, destacam-se a polarografia, a eletroforese capilar, a espectrofotometria e a ressonância magnética nuclear, evidenciando a possibilidade de determinação por outras técnicas menos convencionais para a análise de resíduos de pesticidas, podendo ser adequadamente aplicadas como alternativas de análise do composto em amostras ambientais.

REFERÊNCIAS

1. <http://www.gn.apc.org/pesticidetrust/aifacts/glyphosa.htm>, acessada em Fevereiro 2000.
2. Carlisle, S. M.; Trevors, J.T.; *Water, Air, Soil Pollut.* **1988**, *39*, 409.
3. Thompson, D.G.; Cowell, J.E.; Daniels, R. J.; Staznik, B.; MacDonald, L. M.; *J. AOAC Int.* **1989**, *72*, 355.
4. Aubin, A. J.; Smith, A. E.; *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 1163.
5. Sancho, J. V.; Hidalgo, C.; Hernandez, F. Lopez, F. J.; Hogendoorn, E. A.; Dijkman, E.; *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **1996**, *62*, 53.
6. Friestad, H. O.; Broenstad, J. O.; *J. AOAC Int.* **1985**, *68*, 76.
7. Alferness, P. L.; Iwata, Y.; *J. Agric. Food. Chem.* **1994**, *42*, 2751.
8. Eberbach, P. L.; Douglas, L. A.; *J. Agric. Food. Chem.* **1991**, *39*, 1776.
9. Lundgren, L. N.; *J. Agric. Food. Chem.* **1986**, *34*, 353.
10. Miles, C.J.; Moye, H. A.; *J. Agric. Food. Chem.* **1988**, *36*, 486.
11. Miles, C. J.; Wallace, L. R.; Moye, H. A.; *J. AOAC Int.* **1986**, *69*, 458.
12. Cowell, J. E.; Kunstman, J. L.; Nord, P. L.; Steinmetz, J. R.; Wilson, G. R.; *J. Agric. Food. Chem.* **1986**, *34*, 955.
13. Wigfield, Y. Y.; Lanouette, M.; *Anal. Chim. Acta* **1990**, *233*, 311.
14. Abdullah, M. P.; Daud, J.; Hong, K. S.; Yew, C. H.; *J. Chromatogr. A* **1995**, *697*, 363.
15. Shevchuck, I. A.; Dubchenko, Yug.; Grudneva, G. E.; *Zh. Anal. Khim.* **1987**, *42*, 328.
16. Reupert, R.; Fuchs, S.; *Git. Fachz. Lab.* **1997**, *41*, 468.
17. Gauch, R.; Leuenberger, U.; Mueller, U.; *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1989**, *188*, 36.
18. Vreeken, R. J.; Speksmijder, P.; Bodeldijk-Pastorava, I.; Noij, Th, H. M.; *J. Chromatogr. A* **1998**, *794*, 187.
19. Avramov, Y. U. B.; Vasileu, K. R.; *Zh. Anal. Khim.* **1992**, *47*, 388.
20. Oppenhuizen, M. E.; Cowell, J. E.; *J. AOAC Int.* **1991**, *74*, 317.
21. Börjesson, E.; Torstensson, L.; *J. Chromatogr. A* **2000**, *886*, 207.
22. Sem, N. P.; Baddoo, P. A.; *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **1996**, *63*, 107.
23. Miles, C. J.; Leong, G.; *CL-CG North Am.* **1992**, *10*, 452.
24. Burns, A. J.; *J. AOAC Int.* **1983**, *66*, 1214.
25. Morlier, L. W.; Tomkins, D. F.; *J. AOAC Int.* **1997**, *80*, 464.
26. Morovjan, G.; Fekete, J.; Repasi, J.; *J. Liq. Chromatogr.* **1995**, *18*, 3219.
27. Powell, H. A.; Kerby, N. W.; Rowell, P.; *J. Chromatogr.* **1990**, *502*, 201.

28. Huber Iii, J. W.; Calabrese, K. L.; *CL-Mag.* **1985**, 3, 888.
29. Lundgren, L. N.; *J. Agric. Food. Chem.* **1986**, 34, 353.
30. Tuinstra, L. G. M. T.; Kienhuis, P. G. M.; *Chromatographia* **1987**, 24, 696.
31. Reupert, R.; Fuchs, S.; *Git. Fachz. Lab.* **1997**, 41, 468.
32. Kawai, S.; Uno, B.; Tomita, M. J.; *J. Chromatogr.* **1991**, 540, 411.
33. Loudahl, M.J.; Pietrzyk, D. J.; *J. Chromatogr.* **1992**, 602, 197.
34. Bauer, K. H.; Knepper, T. P.; *J. Chromatogr. A* **1999**, 837, 117.
35. Ridlen, J.S.; Klopff, G.J.; Nieman, T. A.; *Anal. Chim. Acta* **1997**, 341, 195.
36. Bunyatyan, Y. U. A.; Gevorgyan, A.; *A. Gig. Sanit.* **1984**, 5, 43.
37. Tsunoda, N.; *J. Chromatogr.* **1993**, 637, 167.
38. Moyle, H. A.; Deyrup, C. L.; *J. Agric. Food. Chem.* **1984**, 32, 192.
39. Tsuji, M.; Akiyama, Y.; Yano, M.; *Anal. Sci.* **1997**, 13, 283.
40. Deyrup, C. L.; Chang, S. M.; Weintraub, R. A.; Moye, H. A.; *J. Agric. Food. Chem.* **1985**, 33, 944.
41. Kataoka, H.; Ryu, S.; Sakiyama, N. Makita, M.; *J. Chromatogr. A* **1996**, 726, 253.
42. Seiber, J. N.; Mcchesney, M. M.; Kon, R.; Leavitt, R.A.; *J. Agric. Food. Chem.* **1984**, 32, 678.
43. Roy, D. N.; Konor, S. K.; *J. Agric. Food. Chem.* **1989**, 37, 441.
44. Kataoka, H.; Horii, K.; Makita, M.; *Biosci. Biotech. Biochem.* **1991**, 55, 195.
45. Hilda, M.; Mitsui, T.; Fujimura, Y.; *Bunseki. Kagaku.* **1989**, 38, 87.
46. Dickson, S. J.; Meinhold, R. H.; Beer, I. D.; Koelmeyer, T.D.; *J. Anal. Toxicol.* **1988**, 12, 284.
47. Dong, W. H.; Chen, X. C.; Lang, Z. M.; Fan, Y. X.; Liu, J.; *Lihua. Jianshan., Huaxue. Fence.* **1997**, 33, 347.
48. Zhemchuzhin, S. G.; Gorobets, R. P.; *Zh. Anal. Khim.* **1989**, 44, 741.
49. Tomita, M.; Okuyama, T.; Watanabe, S.; Uno, B.; Kawai, S.; *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* **1991**, 1-2, 324.