

الفصل السابع والعشرون

- الاختبارات التأكيدية

- * مقدمة .
- * طرق اختبارات التأکید التقليدية .
- * كروماتوجرافى الالواح المغطاة .
- * الكروماتوجرافى السائل ذو الضغط العالى .
- * الكروماتوجرافى الغازى .

- الطرق البولاروجرافية « الاستقطاب » والطرق المرتبطة بها .

- * مقدمة .
- * ظروف التقدير البولاروجرافى والقولتامترى .
- * الطرق البولاروجرافية الغير مباشرة .
- * الاجهزة والمذيبات .
- * مشاكل الفصل والمعاملات المسبقة للقياسية .
- * الفصل والتقدير بالكروماتوجرافى .
 - ١ - التحليل الكروماتوجرافى .
 - ٢ - التحليل الكروماتوجرافى بالورق .
 - ٣ - التحليل الكروماتوجرافى باعمدة الادمصاص .
 - ٤ - التحليل الكروماتوجرافى عن طريق تبادل الايونات .
 - ٥ - التحليل الكروماتوجرافى الغازى .
 - ٦ - المذيب .
 - ٧ - نظام المذيبات .
 - ٨ - الصورة او الوسط الثابت

- ٩ - الصورة المتحركة .
- ١٠ - الكروماتوجرافى المعكوس .
- ١١ - عملية الفصل الكروماتوجرافى .
- ١٢ - كابينة الفصل .
- ١٣ - خط حدود المذيب .
- ١٤ - قيمة معدل الانسياب .
- ١٥ - HRF value
- ١٦ - Rst Value
- ١٧ - التدرج .
- ١٨ - الكشف .
- ١٩ - الكروماتوجرافى المرشد .
- ٢٠ - كروماتوجرام الشرائح .
- ٢١ - كروماتوجرام الخطوط او المناطق .
- ٢٢ - فترة الاتزان بالتشبع .
- ٢٣ - فترة الفصل الكروماتوجرافى .
- ٢٤ - المواد القياسية .

الاختبارات التأكيدية

Confirmatory tests

* مقدمة Introduction :

تلعب الاختبارات التأكيدية دورا هاما في تحليل والكشف عن مخلفات المبيدات . فى الوقت الحالى يوجد القليل من طرق التحليل متاحة وهى قادرة لوحدها على تعريف مخلفات المبيدات فى كميات صغيرة جداً . الطرق المرتبطة بالطرق الاسبكتروفوتومترية ذات المقدرة على الفصل العالى بناء على الكتلة يحقق هذه الفترة الخاصة بالكشف والتأكيد على المخلفات ولكن بسبب التكلفة العالية والطبيعة المعقدة وظروف التشغيل الخاصة لم نجد هذه الطريقة مجالا واسعا وشيوعا فى تحليل المبيدات على مستوى المخلفات ولكنه يستخدم كاختبار تأكيدى بعد التحليل باى طريقة اخرى .

الهدف من الاختبار التأكيدى هو تأكيد النتيجة التى تحصل عليها الباحث فى التحليل الاولى لكنه يجرى تحت ظروف مختلفة تجريبيا عما اجريت فى التحليل الاولى وهذا الاختلاف قد يكون فى وسيلة القياس ومثال ذلك لو ان المبيد حلل بطريقة الامتصاص فى الاشعة فوق البنفسجية يمكن التأكيد باستخدام التحليل بالاشعة تحت الحمراء او الاسبكتروفوتومتري ذو الرنين النووى المغناطيسى . تستخدم المواصفات الطبيعية لتأكيد نتائج تحليل المخلفات خاصة مع الكروماتوجرافى الغازى حيث ان التغيير فى وقت الاحتجاز للمبيدات مع اختلاف الاوساط الثابتة يمكن الاعتماد عليه كاختبار تأكيدى . اختبارات التقسيم الحيوى يمكن ان تستخدم لتأكيد نتائج الكروماتوجرافى او اى وسيلة اخرى . كذلك يمكن استغلال التحويل الكيمى فى المركب للحصول على مركب معروف كاختبار تأكيدى وهذه قد تجرى على نطاق صغير او كبير وهى تتميز بالبساطة والسرعة وقد تكون طويلة وكثيرة الخطوات ولكنها تحتاج لجواهر كشافة خاصة واجهزة معينة .

كلما زاد عدد الاختبارات كلما تأكدت نتائج التحليل للمركبات المجهولة بدرجة افضل كثيرا من اجراء التحليل باختبار واحد مع ضرورة الاخذ فى الاعتبار ان بعض طرق التأكيد اكثر نفعا وصلاحيه من غيرها وعلى سبيل المثال يعتبر بعض الباحث ان التأكيد بالكروماتوجرافى الغازى للمبيدات بناء على فترات الاحتجاز وعلاقتها بالاوساط الثابتة ذات درجات القطبية المختلفة من الطرق الغير جيدة الفقيرة . نفس الكلام يقال على كروماتوجرافى اللوح المغطاة حيث تستخدم نظم مذيبات مختلفة لتأكيد وجود المبيد . قيمة الاختبار التأكيدى تحدد بنوع التأكيد الذى تحقق مع المركب او مثال ذلك ان الاختبار الذى يعتمد على الامتصاص بالاشعة فوق البنفسجية على ٢٥٤ نانوجرام ذو استخدام قليل فى تأكيد التحليل بسبب ان العديد من المركبات تمتص فى هذه المنطقة . بعبارة اخرى يجب ان تكون اختبار التأكيد متخصص للحصول على معلومات مفيدة عن المركب المجهول ويجب ان يكون اختبار التأكيد مماثل فى حساسيته لنفس طريقة التحليل القياسية . كما يجب ان تكون الطريقة قادرة على الكشف عن المواد المجهولة فى الوسط المعقد من خلال

تجنب المواد المجهولة في الوسط المعقد من خلال تجنب المواد المتداخلة من خلفية التحليل وعن غيره من المبيدات . يجب ان يكون التحليل بسيطاً وسريعاً .

معظم طرق التأكيد تتضمن بعض خطوات الكروماتوجرافى وغالباً يستخدم الكروماتوجرافى الغازى وكروماتوجرافى الألواح المغطاة وبعدها الكروماتوجرافى فائق المقدرة ذو الضغط العالى . لقد اختلفت تقريباً طرق التحليل القياسى التقليدية فى الكشف عن اثار مخلفات المبيدات فى العينات المحتوية عليها . من اكثر الطرق شيوعاً مع الكروماتوجرافى هو تحويل المركب المجهول لمركب آخر يمكن تقديره بنفس طريقة الكروماتوجرافى التى استعمل فى الطريقة الأساسية . وميزة هذا التكنيك عدم الحاجة الى اجهزة مكلفة لاختبارات التأكيد علاوة على ان تفاعلات التحول عالية التخصص فى تعريف المركبات المجهولة .

* طرق اختبارات التأكيد التقليدية Classical confirmatory tests :

منذ اختراع الكروماتوجرافى الغازى قبل ٢٠ عاماً مضت قلت وانحسرت طرق تحليل المبيدات التقليدية بالطريقة المثيلة فى الاهمية . ترتبط هذه الطرق بالتكنيكات الاسبكتروفوتومترية التى تستخدم فيها الاشعة فوق البنفسجية والضوء المرئى والامتصاص فى الاشعة تحت الحمراء للمبيد نفسه او لأحد مشتقاته فى القياس وبينها علاقة بالتركيزات . الطرق اللونية (الامتصاص المرئى) للمشتق المناسب من الوسائل العادية لتحليل المبيدات بالطريقة الكيميائية المثيلة بينما تستخدم الاشعة تحت الحمراء لأغراض التأكيد بتعريف المجموعات الفعالة . الطرق اللونية لمستحضرات المبيدات مازالت تظهر فى المراجع وهذه تفيد فى تقدير نوعية المستحضرات مع العلم بان المادة الفعالة فى المستحضر معروفة والمطلوب فقط من الاختبار هو تحديد التركيز (المراجع ارقام ١ ، ٢ ، ٣ - ٦) وهناك مراجع كثيرة عن الجواهر الكشافة لاطهار المبيدات (المراجع - ٧) .

* كروماتوجرافى الألواح المغطاة Thin layer chromatography :

تستخدم طريقة TLC بشكل كبير لتأكيد النتائج التى تحصل عليها من الكروماتوجرافى الغازى او أى طرق اخرى حيث يعتمد التأكيد على قيمة الانسياب RF وهذه القيم تستخدم ايضا للمقارنة بين كفاءة وصلاحيه المذيبات المختلفة والاعتماد على هذه القيم لوحدها قد يتسبب فى اخطاء شنيعة . ان الاختبارات التأكيدية الكيميائية مع TLC تعطى معلومات مفيدة فى تعريف المبيد حيث يمكن اجراء التفاعل قبل TLC حيث يجرى اختبار تحويل المركب الاصلى وبعد ذلك يستخدم الـ TLC للتأكد من المركب الناتج . فى المقابل يمكن اجراء اختبار التأكيد مع الـ TLC عندما يكون المركب ما زال على طبقة الجيل باستخدام ثلاثة جواهر كشافة مختلفة وفى هذه الحالة ترتبط قيم RF مع المبيد . لقد سبق وصف هذه الطرق بالتفصيل من قبل .

تفاعلات الرش لاطهار بقع تواجد المبيد المفصول على الـ TLC تماثل ما يحدث مع تفاعلات المحاليل باستثناء انها تجرى على طبقات ادمصاصية . حيث ان معظم المبيدات عديمة

اللون خاصة في حالة التركيزات البسيطة المستخدمة في الـ TLC تستخدم محاليل او جواهر كاشافة للرش ليس للتأكيد فقط ولكن لاطهار البقع . يمكن معاودة رش نفس البقع بمواد اخرى للتأكيد بناء على تداخل قيم الـ Rf وتحدث استجابات موجبة أو سالبة لجواهر كاشافة معينة كما تتكون الوان مختلفة وحساسة هذه الجواهر الكاشافة في حدود ميكروجرامات قليلة وهي مناسبة تماما للكشف عن المستحضرات وتحديد الجودة ولكنها لا تصلح مع المخلفات . الجدول التالي يوضح العديد من الجواهر الكاشافة التي تستخدم للكشف عن المبيدات المفصولة بالـ TLC (التفاصيل موجودة في المراجع ٥١ - ٥٣) .

لقد شاع استخدام طريقة دمج TLC مع الانزيم للترقية بين المبيدات وكذلك لتأكيد نتائج التقدير الاخرى . قد سبق الكلام عنها بالتفصيل وهي ثلاثم جدا انواع المبيدات التي تؤثر على النظم الانزيمية مثل المبيدات الفوسفورية والكريامات والحساسة في حدود نانوجرامات . يستخدم مخلوط الانزيم مع الوسيط على الطبقات رشا بنفس الطريقة المستخدمة مع الجواهر الكاشافة والكيميائية .

تكوين المشتقات الكيميائية للتأكيد على نوعية المبيد في التحليل للمستحضرات او المخلفات قبل اجراء عملية الـ TLC لم تلق شيوعا . تتميز هذه الطريقة انه يمكن التحكم اكثر في ظروف التفاعل كما انها اوسع من محاليل الرش على طبقات الادمصاص TLC كما ان هذه الطريقة « التفاعلات ما قبل TLC » تتضمن تكوين مشتقات ملونة او فلوريسينية مع تجنب عدم انتظام الخلفية في حالة الرش . لسنا في حاجة للقول ان قيم الانسياب RF للمركب المتحول تختلف عن قيم المركب الاصل مما يمكن استغلاله في التأكيد . كما يمكن استخدام جواهر كاشافة اخرى تعطى الوان مختلفة عن الاصل . استخدم الباحث Ishikawa وآخرون عام ١٩٧١ مشتقات ٤ ينتروبنزين ديازو الموجودة في الشق الفينولي لبعض المبيدات الحشرية الكارباماتية للتقدير في حبوب الازر حيث جرى تحليل مائي للمركبات في البداية والفينولات الناتجة تتحول الى مشتقات ملونة للفصل والتقدير . لقد اجرى Yip and Howard عام ١٩٦٦ عملية مثثلة لمبيدات حشائش منها مجموعة داى نيتروفينول للفصل بعد ذلك بالـ TLC باستخدام الكروماتوجرافى المعكوس . يتم اظهار المشتقات بالرش بمخلوط من كلوريد القصديروز مع بارا - داى ميثيل امينو بنزالدهيد كما في الجدول (١) . مشتقات الميثيل اكثر حساسية يمكن الكشف عنها في حدود صغيرة للغاية .

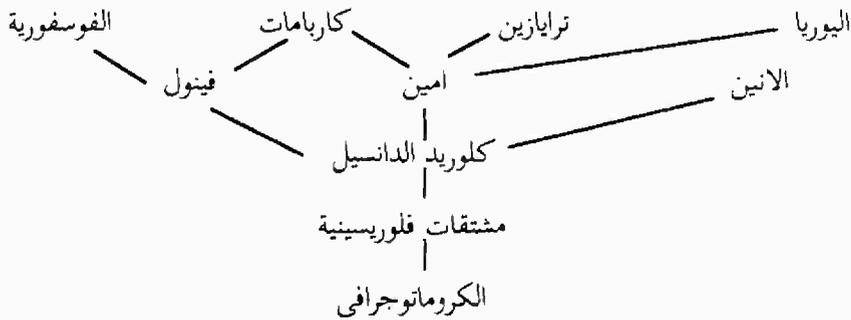
جدول (١) : الجواهر الكشافة لرش المبيدات المفصولة على الألواح المغطاء

Pesticide	Spray reagent	Reference
Organochlorine insecticides	AgNo ₃ , 2-phenoxuethanol	8
	AgNo ₃ in layer	9
	Diphenylamine, zinc chloride	10
	Rhodamine-B	11
	0-Toluidine	12
	Iodine vapor	13
Organochlorine herbicides	AgNo ₃ , 2-phenoxuethanol	8
	Chromotropic acid	14
Organophosphates	Tetrabromophenolphthalein.	
	AgNo ₃ , citric acid	8
	4-(p-Nitrobenzyl) pyridine, tetraethylenepentamine	8, 15
	Bromine, AgNo ₃	16
	2, 6-Dibromobenzoquinine-4-chloroimide	17-19
	Ammonium molybdate, perchloric acid	18, 20
	Rhodamine B	21
	Flavones	22
	1,2-Dichloro-4, 5-dicyanobenzoquinone	23
	Congo red	24
	Fluorescein	24
	PdCl ₂	24
	Metal ion, chelating agent	25, 26
	4-Picoline, p-dinitrobenzene	27
AgNO ₃ , Platinat	28	
Benzylcyanide, triton B	29	
Methyl yellow	30	
Carbamates	KOH, p-nitrobenzenediazonium fluoborate	31
	Bromine, fluorescein	31
	Rhjadamine-B, ultraviolet	31

Pesticide	Spray reagent	Reference
	Pentacryptol yellow	31
	p-dimethylaminobenzaldehyde	32
	AgNo3, 1-naphthol	32
	Bratton-Marshall	33
	k2MnO3, ultraviolet	34
	Diphenylpicrylhydrazyl	35
	vanillin, sulfuric acid	35
	Ninhydrin	36
	Flavones	37
Triazines	Chlorination, Tobludine, KI	38
	AgNO3	39
	Brilliant green, bromine	40
Dinitrophenols	Stannous chloride, p- dimethylaminobenzaldehyde	41
	KOH, ultraviolet	42
	Bratton-marshall	43
Uracils	Brilliant green	44, 45
Dithiocarbamates	CuCl ₂ , hydroxylamine	46
	Sodium azide	47
Pyrethrins	Anisaldehyde, H ₂ SO ₄	48
	SbCl ₃	
Methylenedioxyphenyl synergists	Chromotropic acid, H ₂ SO ₄	49
	Furfural, H ₂ SO ₄	49
	SbCl ₃	50
	Phosphomolybdic acid	50
	2, 4-Dinitrophenylhydrazine	50
	KI, starch	50
	AgNo3, KOH	50

استخدمت المشتقات الفلوريسينية لتقدير المبيدات بالك TLC (المرجع ٥٥) قد ثبت كفاءة العديد من الجواهر الكشافة تصلح للكشف عن الكميات الدقيقة من المبيدات . استخدم مادة دانسيل كلوريد (٥ - داي ميثيل امينوفثالين - ١ - سلفونيل كلوريد) للكشف عن نواتج التحليل القلوية للكاربامات (مرجع ٥٦) واليوريا (٥٧) وبعض المبيدات الفوسفورية (٥٨) والهيدروكسي بيفينيل (٥٩) في العينات المحتوية على ١ ، ٠ جزء في المليون او اقل . كما اختبر هذا الجواهر الكشاف للتأكد من مبيدات الحشائش الترايازين بعد التحلل المائي بيالحامض في المواد الغذائية .

توضح الخريطة (١) تكوين مشتقات الدانسيل للعديد من المبيدات .

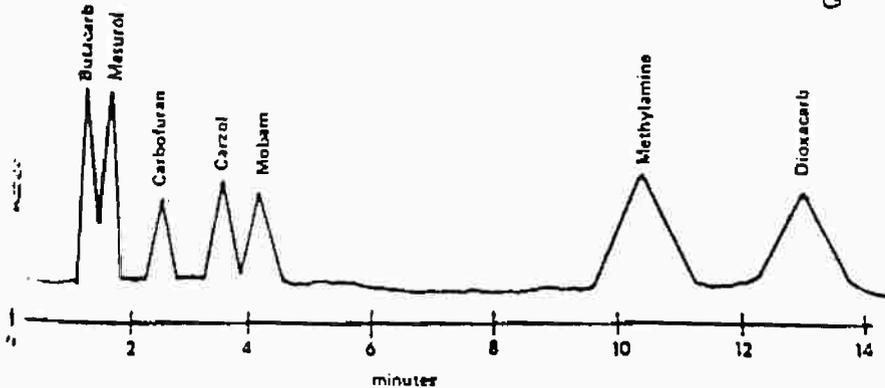


شكل (١) : تكوين مشتقات الدانسيل .

* الكروماتوجرافى السائل ذو الضغط العالى

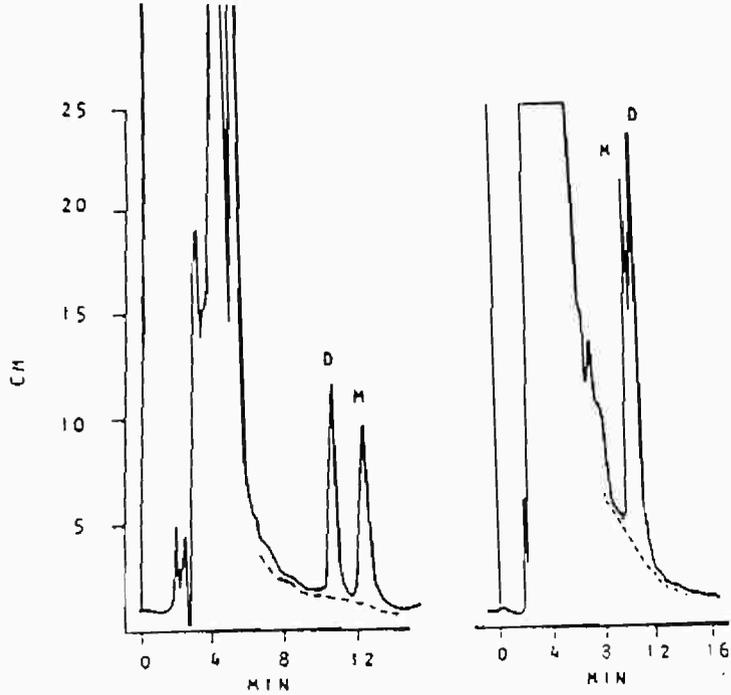
High pressure liquid chromatography

العديد من التفاعلات التى تستخدم لتكوين المشتقات قبل الفصل بالك TLC يمكن ان تستخدم مباشرة للتحليل بالكروماتوجرافى السائل ذو الضغط العالى HPLC . هناك العديد من التفاعلات ونظم الكشف بهذه الطريقة لمشتقات العديد من المركبات (٥٥ ، ٥٧) والمبيدات . استخدم طريقة الدنسلة الفلورومترية للكشف عن مركبات الكاربامات بالك HPLC كما فى الشكل التالى :



يمكن تقدير البينوميل بتكوين مشتق MBC بواسطة التحليل المائي الحامضي (٧٩) وحساسية الطريقة في حدود ٠,٠٥ - ٠,١ جزء في المليون في مختلف المحاصيل والاراضي .
التأكيد على مركبات البوريا كمييدات حشائش بواسطة المثلة methylation في المواد الغذائية (٨٠) وحساسية في حدود ٠,٠٥ جزء في المليون .

الشكل (٤) يوضح الكشف التأكيدي للمونيرون والديورون في الذرة ... هناك تفاعلات التحويل مثل الاستلة والاختزال ... الخ .



* الكروماتوجرافي الغازي Gas chromatography :

من أكثر الطرق شيوعا في تحليل المبيدات على صورة المستحضرات او المخلفات . هذا الاسلوب مهم جدا في الاختبارات التأكيدي وهو من أكثر اختبارات التأکید للمبيدات الكلورينية خاصة الـ د د ت ومشتقاته بعملية فقد الكلورة بالقلوي "dehydrochlorination" مثل الصوديوم أو بوتاسيوم بتوكسيد .. كما في الجدول التالي :

جدول (٢) : الإختيارات التأكيدية للمبيدات الكلورينية العضوية

Pesticide class	Reagent or reaction type ^a	Reference
General	CrCl ₂ reduction (26)	104
	KOH dehydrochlorination (46)	84, 105
Hexachlorobenzene (HCB)	Base/alcohol	100-103, 106
	KOH hydrolysis/diazomethane	101
BHC isomers	NaOMe/MeOH or GC alkaline precolumn	102
	Comparisons of 8 methods (D)	107
Cyclodiene insecticides	10 various reactions (D)	108
	BCi _{3/2} -chloroethanol (D/E)	109
	UV irradiation (D/E./H)	110-113
	H ₂ SO ₄ or 60% KOH (E/M)	114
	t-BuOK/t-BuOH or CrCl ₂ (E/M)	91, 92, 115, 116
	Acid or base-Al ₂ O ₃ micro column (C/E/H/T/M)	117-122
	Base-catalyzed intramolecular cyclization (T)	123
Silylation/acetylation (T/M)	124	
Mirex	UV dechlorination	125
Kepone	KOH/esterification	126
	LiAlH ₄ /PCl ₅	127
PCBs	SbCl ₅ perchlorination	128-130
Chlorobiphenyls and PCP	Acetylation and butylation	131
DDT	Reduction and /or oxidation	132, 133

^aFigures in parentheses indicate the number of pesticides studied, whereas letters indicate the particular pesticide (s) confirmed: C = chlor-danes, D = dieldrin, E = endrin, H = heptachlor, T = Thiodan (endosulfan), and M = metabolites.

(Source : From Ref. (82), courtesy W. P. Cochrane and the Journal of Chromatographic Science.)

هناك طرق عديدة للمبيدات الفوسفورية العضوية من اهمها اجراء التحلل المائى على ان يكون متبوعا بتحويل فى مجموعات الفوسفات او الالكيل او الاريل . مشتقات مجموعة الفوسفات تتضمن الالكلة مع الداى ايزوميثان او الداى ايزو ايثان والتحليل المائى يجرى تحت ظروف قاعدية ثم يتبع بالتنظيف والفصل لمجموعة الفوسفات بعملية الالكلة وتحويلها الى الالكيل ايشر . هذه الطريقة حساسة فى الكشف عن مخلفات المبيدات فى العديد من المواد الغذائية .

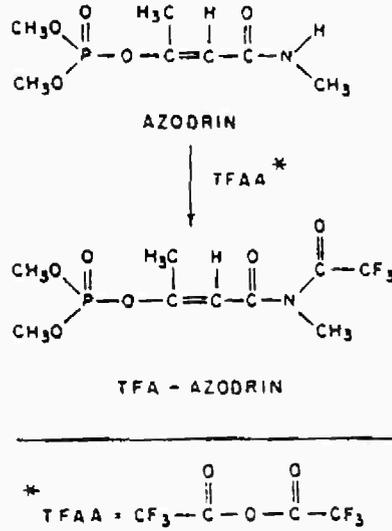
الاختبارات التأكيدية للمبيدات الفوسفورية التى تشمل مشتقات التحلل الفينولى اكثر تخصصا عن نظيرها من مشتقات مجموعة الفوسفور ، نشير الى ان اى مجموعة فينول تتكون من الانهيار البيئى او تمثيل العينة يمكن التخلص منها فى البداية ثم تحلل وحدها ومن ثم لا تتداخل مع الاختبارات التأكيدية للمركب الاصلى . تفاعلات الاشتقاق لمجموعات الفينول تتضمن تكوين الاسترات أو الايشيرات . الاسترة بمركب التراى فلورواسيتيك انهيدريد (TFAA) او هيتافلورويوثيريل انهيدريد (HFBA) وغيرها من الجواهر الكشافة تعطى استجابة كبيرة لاصطياد الالكترونات (المراجع ١٣٨ - ١٤٠) .

التأكد من خلال المعاملة المباشرة للمبيدات الفوسفورية (المركبات الصلبة) ذات ميزات عديدة حيث تجنب خطورة التحلل المائى والاستخلاص مما يوفر الوقت ويقلل من عدد العينات . الاختبار التاكيدى من خلال الأكسدة للمركبات الفوسفورية المحتوية على التركيب فو = كب وتحويلها الى فو = أ بواسطة هيبوكلوريت الصوديوم حساسة للكشف عن مركبات الباراثيون والملاثيون والميشيل براثيون والفنيتروثيون والرونيل والديازينون فى حدود تركيزات من ٠,٢٥ وحتى ٠,٥ جزء فى المليون فى بعض الخضضر والفاكهة (١٤٤) باستخدام الكشاف الضوئى باللهب (FPD) . المركبات الفوسفورية المحتوية على مجموعة النيترو يمكن التأكد منها بالاختزال الى مشتقات الامينو بواسطة المواد المختزلة مثل كلوريد الكروم او كلوريد المخارصين او الزنك مع حامض الايدوكلوريك . يتم الكشف عن المشتقات تحت نفس الظروف الكروماتوجرافية ولكن على فترات احتجاز قليلة بالمقارنة بالمركبات الصلبة (١٤٥) ولكن بسبب فقد النيترو تصبح المشتقات اقل حساسية لكشاف صائد الالكترونات . على سبيل المثال فان الامينو براثيون اقل بمقدار ٤٠٠ مرة فى الحساسية من الباراثيون نفسه للكشاف ECD .

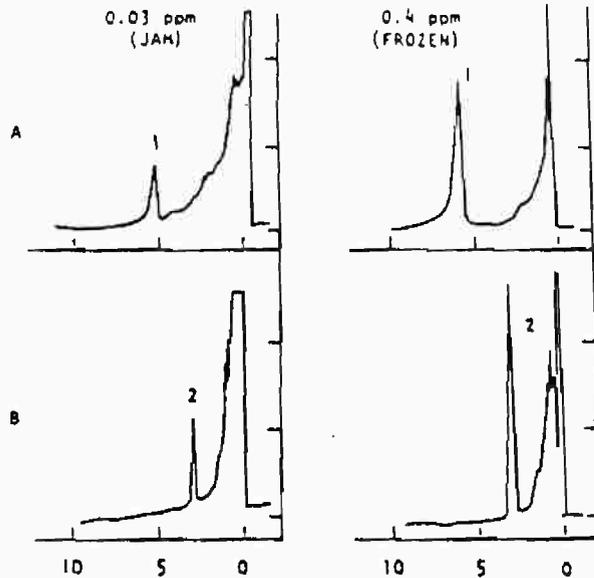
المركبات الفوسفاتية المحتوية على مجموعة امينو اولية او ثانوية يمكن تأكيد الكشف عنها مباشرة بالاستلة الفلورية الثلاثية "TFA - Trifluoroacetylation" وبهذه الطريقة يمكن تأكيد وجود مركب الازودين عند مستويات من ٥ - ١٠ جزء فى البليسون فى الفراولة باستخدام كشاف "FPD" .

الشكل (٨) يوضح التفاعل والشكل (٩) يوضح مثال لتأكيد وجود المادة الفعالة و مونوكروتوفوس فى الفراولة .

الكلة المبيدات الفوسفورية المحتوية على مجاميع (ن يد -) استخدمت مع العديد من المركبات للكشف عنها مثل الكروفومات والدايمثوات والمونيتور وباير ٩٣٨٢٠ . حيث ان هذا التفاعل يجرى



شكل (٨) : تأكيد الأزودرين
بتفاعل TFAA



شكل (٩) : كروماتوجرام الأزودرين في الفراولة (المربى والمجمدة) . A = أزودرين
بعد تفاعل TFAA

REFERENCES قائمة المراجع

1. W. Horwitz, Ed.. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D. C., 1975.
2. F. A. Gunther and R. C. Blinn. analysis of Insecticides and Acaricides. Interscience, New York, 1955.
3. S. Williams and J. W. Cook, Anal, Chem, 39, 142R (1967).
4. S. Williams and J. W. Cook, Anal, Chem, 37, 130R (1965).
5. W. E. Westlake, Anal. Chem. 35, 105R (1963).
6. W. E. Westlake, Anal. Chem. 33, 88R (1961).
7. F. Feigl. Spot Tests in Organic Analysis. Elsevier, Amsterdam, 1966.
8. R. E. Duggan, Pesticide Analytical manual, Vol. 1. U.S. Food and Drug Administration, Washington, D. C., 1969. 4.
9. W. A. Moats, J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 49, 795 (1966).
10. L. J. Faucheux, J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 48, 955 (1965).
11. W. Ebing, J. Chromatogr. 44, 81 d(1969).
12. K. Visweswariak and M. Jayaram, J. Chromatogr. 62, 479 (1971).
13. K. Suzuki, K. Mujashita, and T. kashiwa, Bull. Agric. Chem. Insp. Sta. 10, 24 (1970).
14. C. Meinard, J. Chromatogr. 61, 173 (1971).
15. R. R. Watts, J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 48, 1161 (1965).
16. B. Y. Giang and H. F. Beckman, J. Agric. Food Chem. 17, 63 (1969).
17. J. J. Menn. W. R. Erwin, and H. T. Gordon, J. Agric. Food Chem. 5, 601 (1957).
18. J. Stenerson, J. Chromatogr. 38, 538 (1968).
19. J. Stenerson, J. Chromatogr. 54, 77 (1971).
20. F. Jangnickel, J. Chromatogr. 31, 617 (1967).
21. W. Ebing. J. Chromatogr. 40, 180 (1970).
22. R. W. Frei, V. Mallet, and C. Pothier, J. Chromatogr. 59, 135 (1971).

23. P. E. Beliveau and R. W. Frei, *Chromatographia* 4, 189 (1971).
24. K. Nagasawa and H. Yoshidome, *J. Chromatogr.* 39, 2828 (1969).
25. P. E. Beliveau, V. Mallet, and R. W. Frei, *J. Chromatogr.* 48, 478 (1970).
26. T. F. Bidleman, B. Nowlan, and R. W. Frei, *Anal. Chem. Acta* 60, 13 (1972).
27. M. T. H. Ragab, *Anal. Lett.* 1, 973 (1968).
28. H. Beitz and M. Ehrt, *Z. Chem.* 8, 387 (1968).
29. W. Ebing, *Chimia* 29, 132 (1967).
30. M. T. H. Ragab, *Lab. Pract.* 20, 489 (1971).
31. K. Nagasawa; H. Hoshidome, and F. Kamata, *J. Chromatogr.* 52, 453 (1970).
32. M. A. Eldib, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 53, 756 (1970).
33. J. H. Onley and G. Yip, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 52, 526 (1965).
34. M. Look and L. R. White, *J. Chromatogr.* 50, 145 (1970).
35. J. M. Finocchiaro and W. R. Benson, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 50, 888 (1967).
36. S. E. Katz, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 50, 911 (1967).
37. V. Mallet and R. W. Frei, *J. Chromatogr.* 54, 251 (1971).
38. S. Kondela, *J. Chromatogr.* 53, 589 (1970).
39. R. Delley, K. Friedrich, B. Karlhuber, G. Szekely, and K. Stammback, *Z. anal. Chem.* 228, 23 (1967).
40. D. C. Abbott, J. A. bunting, and J. thomson, *Analyst* 90, 357 (1965).
41. G. Yip and S. F. Howard, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 49, 1166 (1966).
42. D. R. Clifford, D. M. Fieldgate, and D. A. Watkins, *J. Chromatogr.* 43, 110 (1969).
43. A. Guardigli, W. Chow, and M. S. lefar, *J. Agric. Food Chem.* 19, 1181 (1971).
44. F. G. Von Stryk and G. F. Zajacz, *J. Chromatogr.* 41, 125 (1969).

45. D. C. Abbott, K. W. Blake, K. R. Tarrant, and J. Thomson, *J. Chromatogr.* 30, 136 (1967).
46. J. W. Hylin, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1, 76 (1966).
47. M. S. Vekshtein and M. A. Klisenko, *Vop. Pitan* 29, 56 (1970).
48. E. Stahl and J. Pfeifle, *Naturwissen*, 52, 620 (1965).
49. M. Beroza, *J. Agric. Food Chem.* 11, 51 (1963).
50. E. Stahl, *Arch. Pharm.* 293, 531 (1960).
51. J. Sherma, *Analytical Methods for Pesticides and Plant Growth Regulators*, Vol. 7 (G. Zweig, Ed.). Academic Press, London, 1973, p. 3.
52. J. M. Carasco-Dorrien, *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.* 10, 357 (1970).
53. R. R. Watts, *RES. Rev.* 18, 105 (1967).
54. K. Ishikawa, Y. Yusa, Y. Asano, and K. Akasaki, *Jap. Analyst* 20, 461 (1971).
55. J. F. Lawrence and R. W. Frei, *J. Chromatogr.* 98, 253 (1974).
56. R. W. Frei and J. F. Lawrence, *J. Chromatogr.* 67, 87 (1972).
57. J. F. Lawrence and G. W. Laver, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 57, 1022 (1974).
58. J. F. Lawrence, C. Renault, and R. W. Frei, *J. Chromatogr.* 121, 343 (1976).
59. M. Frei-Hausler, R. W. Frei, and O. Hutzinger, *J. Chromatogr.* 79, 209 (1973).
60. J. F. Lawrence and G. W. Laver, *J. Chromatogr.* 100, 174 (1974).
61. J. F. Lawrence and R. W. Frei, *Anal. Chem.* 44, 2046 (1972).
62. R. W. Frei and J. F. Lawrence, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 55, 1259 (1972).
63. D. J. Pietrzyk and E. P. Chan, *Anal. Chem.* 42, 37 (1970).
64. O. N. Devgan, S. K. Gupta, and M. M. Bokadia, *J. Indian Chem. Soc.* 42, 395 (1965).
65. T. Nakai, H. Demura, and M. Koyama, *J. Chromatogr.* 66, 87 (1972).

66. E. Sawicki and R. A. Carnes, *Mikrochim. Acta* 1967, 148 (1967).
67. M. Guyer and E. Sawicki, *Anal. Chim Acta* 49, 182 (1970).
68. T. Sekine, K. Ando, M. Machida, and Y. Kanoaka, *Anal. Biochem.* 48, 557 (1972).
69. T. Amano, *Yakugaku Zasshi (J. Pharm. Soc. Jap.)* 86, 1 (1966).
70. C. P. Ivanov and Y. Vladovaska-Yukhnovska, *Biochem. Biophys. Acta* 194, 345 (1969).
71. Z. Deyl, *J. Chromatogr.* 48, 231 (1970).
72. dL. Edvinsson, R. Hakanson, A. L. Romberg, and F. Sundler, *J. Chromatogr.* 67, 81 d(1972).
73. L. Edvinsson, R. Hakanson, and F. Sundler, *Anal. Biochem.* 46, 473 (1972).
74. M. Wiegele, S. L. De Bernardo, J. P. Tenggi, and W. Leimgruber, *J. Amer. Chem. Soc.* 94, 5927 (1972).
75. J. F. Lawrence and R. W. Frei, *Chemical Derivatization in Liquid Chromatography*. Elsevier, Amsterdam, 1976.
76. R. W. Frei, J. F. Lawrence, J. Hope, and R. M. Cassidy, *J. Chromatogr. Sci.* 12, 40 (1974).
77. J. F. Lawrence, C. Renault, and R. W. Frei, *J. Chromatogr.* 121, 343 (1976).
78. J. F. Lawrence and R. Leduc, *J. Chromatogr.* 152, 507 (1978).
79. J. J. Kirkland, R. F. Holt, and H. L. Pease, *J. Agric. Food Chem.* 17, 267 (1969).
80. J. F. Lawrence, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 59, 1066 (1976).
81. W. P. Cochrane and A. S. Y. Chau, *Adv. Chem. Ser.* 104, 2 (1971).
82. W. P. Cochrane, *J. Chromatogr. Sci.* 13, 245 (1975).
83. C. E. Mendoza, P. J. Wales, H. A. McLeod, and W. P. McKinley, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 51, 1095 (1968).
84. R. T. Krzuse, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 55, 1042 (1972).
85. A. S. Y. Chau and W. P. Cochrane, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 5, 133 (1970).

86. F. Gunther and R. C. Blinn. *J. Agric. Food Chem.* 5, 517 (1957).
87. A. S. Y. Chau and W. P. Cochrane, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 52, 1220 (1969).
88. C. W. Bird, R. C. Cookson, and E. Crundwell, *J. Chem. Soc.* 1961, 4809 (1961).
89. W. W. Weincke and J. A. Burke, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 52, 1277 (1969).
90. A. S. Y. Chau and W. P. Cochrane, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 5, 435 (1970).
91. J. H. Hammence, P. S. Hall, and D. J. Caverley, *Analyst* 90, 649 (1965).
92. K. Noren, *Analyst* 93, 39 (1968).
93. A. S. Y. Chau and W. P. Cochrane, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 52, 1092 (1969).
94. W. P. Cochrane and A. S. Y. Chau, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 51, 1267 (1968).
95. W. W. Sans, *J. Agric. Food Chem.* 15, 192 (1967).
96. J. Singh, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 4, 77 (1969).
97. W. P. Cochrane and A. S. Y. Chau, *Chem. Ind. (London)* 1968, 1696 (1968).
98. W. P. Cochrane, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 52, 1100 (1969).
99. W. P. Cochrane, M. Forbes, and A. S. Y. Chau, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 53, 769 (1970).
100. B. E. Baker, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 10, 279 d (1973).
101. M. Holdrinet, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 57, 580 (1974).
102. W. P. Cochrane and R. B. Maybury, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 56, 1324 (1974).
103. G. B. Collins, D. C. Holmes, and M. Wallen, *J. Chromatogr.* 69, 198 (1972).
104. W. P. Cochrane and M. A. Forbes, *Methods in Residue Analysis* vol. 4 (A. S. Tahori, Ed.). Gordon and Breach, London, 1971, p. 385.

105. S. J. V. Young and J. A. burke, *Bul. Environ. Contam. Toxicol.* 7, 160 (1972).
106. I. S. Taylor and F. P. Kecnan, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 53, 1293 (1970).
107. R. B. Maybury and W. P. Cochrane, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 56, 36 (1973).
108. K. E. Elgar, *Advan. Chem. Ser.* 104, 151 (1971).
109. D. W. Woodham, C. D. Loftis, and C. W. collier, *J. Agric. food chem.* 20, 163 (1973).
110. P. Lombardo, K. H. Pomerantz, and I. G. Ergy, *J. Agric. Food Chem.* 20, 1288 (1972).
111. K. A. Banks and D. D. bills, *J. Chromatogr.* 33, 450 (1968).
112. W. M. Kaufman, D. D. bills, and E. J. Hannan, *J. Agric. Food Chem.* 20, 628 (1972).
113. D. E. Glotfelty, *Anal. chem.* 44, 1250 (19k72).
114. R. G. Nash, M. L. Beall, Jr., and W. G. harris, *J. Environ. Quality* 1, 391 (1972).
115. A. S. Y. Chau and W. P. Cochrane, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 54 (1971).
116. A. S. Y. Chau, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 55, 519 (1972).
117. A. S. Y. Chau, *Bull. environ. Contam. Toxicol.* 8, 169 (1972).
118. A. S. Y. Chau and K. Terry, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 55, 1228 (1972).
119. A. S. Y. chau, *J. Assoc. Offic. anal. Chem.* 55, 1232 (1972).
120. A. S. Y. chau and K. Terry, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 57, 394 (1974).
121. A. S. Y. Chau, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 57, 584 (1974).
122. A. S. Y. Chau and M. Lanouette, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 55, 1058 (1972).
123. P. A. Grevé and S. L. Wit, *J. Argic. Food Chem.* 19, 372 (1971).

124. T. E. Archer, I. K. Nazer, and D. G. Crosby, *J. Agric. Food Chem.* 20, 954 (1972).
125. E. G. Alley, B. R. Layton, and J. P. Minyard, Jr., *J. Agric. Food Chem.* 22, 727 (1974).
126. K. V. Scherer, Jr., R. S. Lunt, III, and G. A. Ungefug, *Tetrahedron Lett.*, 1199 (1965).
127. W. L. Dilling, H. P. Broending, and E. T. McBee, *Tetrahedron* 23, 1211 (1967).
128. O. W. Berg, P. L. Diosady, and G. A. V. Rees, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 7, 338 (1972).
129. J. A. Armour, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 56, 987 (1973).
130. J. N. Huckins, J. E. Swanjson, and D. L. Stalling, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 57, 416 (1974).
131. V. Zitko, O. Hutzinger, and P. M. K. Choi, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 12, 649 (1974).
132. J. R. W. Miles, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 55, 1039 (1972).
133. R. Gothe, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 11, 451 (1974).
134. L. E. St. John and D. J. Lisk, *J. Agric. Food Chem.* 16, 48 (1968).
135. J. Askew, J. H. Ruzicka, and B. B. Wheals, *J. Chromatogr.* 41, 180 (1969).
136. M. T. dShafik and H. F. Enos, *J. Agric. Food Chem.* 17, 1186 (1969).
137. M. T. Shafik, D. Bradway, and H. F. Enos, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 6, 55 (1971).
138. F. H. Kawahara, *Environ. Sci. Technol.* 5, 235 (1971).
139. L. G. Johnson, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 56, 1503 (1973).
140. N. K. McCallum and R. J. Armstrong, *J. Chromatogr.* 78, 303 (1973).
141. I. C. Cohen, J. Norcup, J. H. Ruzicka, and B. B. Wheals, *J. Chromatogr.* 49, 215 (1970).
142. J. N. Seiber, D. G. Crosby, H. Foudam and C. J. Soderquist, *J. Chromatogr.* 73, 89 (1972).

143. J. A. coburn and A. S. Y. Chau, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 57, 1272 (1974).
144. J. Singh and M. R. Lapointe, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 57, 1285 (1974).
145. M. A. Forbes, B. P. Wilson, R. Greenhalgh, and W. P. cochrane, *Bull. environ. Contam. toxicol.* 13, 141 (1975).
146. J. F. Lawrence and H. A. McLeod, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 59, 639 (1976).
147. R. Greenhalgh and J. Kovacicova, *J. Agric. Food chem.* 23, 325 (1975).
148. J. F. Lawrence, unpublished results.
149. J. F. Lawrence and F. Iverson, *J. Chromatogr.* 103, 341 (1975).
150. G. Yip, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 54, 343 d(1971).
151. C. E. McKone and R. J. Hance, *J. Chromatogr.* 69, 393 (1972).
152. H. P. thier, *Deutsche Lebens., Rundsch.* 68, 397 (1972).
153. H. P. Thier, *Angew. chem.* 86, 244 (1974).
154. A. S. Y. chau and K. Terry. *J. Assoc. Offic. anal. Chem.* 59, 633 (1976).
155. W. P. cochrane and R. Greenhalgh, 166th National Meeting of the American Chemical Society, Chicago, 1973.
156. J. F. Lawrence, *J. Agric. Food Chem.* 22, 936 (1974).
157. E. D. Magallona, *Res. Rev.* 56, 1 (1975).
158. I. H. williams, *Res. Rev.* 38, 1 (1971).
159. W. H. Gutenmann and D. J. Lisk, *J. Agric. Food Chem.* 13, 48 (1965).
160. C. H. Van Middlelem, T. L. Norwood, and R. E. Waites, *J. Gas Chromatogr.* 3, 310 (1965).
161. C. W. Stanley, J. S. Thornton, and D. B. Katague, *J. Agric. Food Chem.* 20, 1265 (1972).
162. C. W. Stanley and J.. S. Thornton, *J. Agric. Food Chem.* 20, 1269 (1972)

163. M. C. Bowman and M. Beroza, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 50, 926 (1967).
164. C. A. Bache and D. J. Lisk, *J. Gas Chromatogr.* 6, 301 (1968).
165. J. A. Coburn, B. D. Ripley, and A. S. Y. Chau, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 59, 188 (1976).
166. A. H. Blogg and J. L. Rawls, *Amer. Lab.* 17 (Dec. 1972).
167. E. R. Holden, W. M. Jones, and M. Beroza, *J. Agric. Food Chem.* 17, 56 (1969).
168. E. R. Holden, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 56, 713 (1973).
169. D. G. Crosby and J. B. Bowers, *J. Agric. Food Chem.* 16, 839 (1968).
170. R. L. Tilden and C. H. van Middelam, *J. Agric. Food Chem.* 18, 154 (1970).
171. A. C. Moffat and E. C. Horning, *Anal. Lett.* 3, 205 (1970).
172. H. Ehrsson and H. Brotell, *Acta Pharm. Suecica* 8, 591 (1971).
173. S. C. Lau and R. L. Marxmiller, *J. Agric. Food Chem.* 18, 413 (1970).
174. J. N. Seiber, *J. Agric. Food Chem.* 20, 443 (1972).
175. L. Wong and F. M. Fisher, *J. Agric. Food Chem.* 23, 315 (1975).
176. J. J. Ryan and J. F. Lawrence, *J. Chromatogr.* 135, 117 (1977).
177. J. F. Lawrence, *J. Chromatogr.* 123, 287 (1967).
178. J. F. Lawrence and J. J. Ryan, *J. Chromatogr.* 130, 97 (1977).
179. J. F. Lawrence, D. Lewis, and H. A. McLeod, *J. Chromatogr.* 138, 143 (1977).
180. L. Fishbein and W. L. Zielinski, Jr., *J. Chromatogr.* 20, 9 (1965).
181. J. F. Lawrence, *J. Agric. Food Chem.* 24, 1236 (1976).
182. F. S. Tanaka and R. G. Wien, *J. Chromatogr.* 87, 85 (1973).
183. J. F. Lawrence and G. W. Laver, *J. Agric. Food Chem.* 23, 1106 (1975).
184. J. F. Lawrence, D. Lewis, and H. A. McLeod, *J. Agric. Food Chem.* 25, 1359 (1977).