

Utilización de columnas capilares en la determinación de insecticidas organofosforados

S. Navarro García, A. Barba, M. A. Cámara y S. Navarro
Departamento de Química Agrícola, Geología y Edafología
Universidad de Murcia

Recibido: 18-5-87
Aceptado: 16-10-87

Use of capillary columns in the determination of organophosphorus insecticides

Summary. The determination of 21 organophosphorus insecticides of wide range of action on different cultures, is studied by gas capillary chromatography using standard samples and specific detector for phosphorus compounds (NPD). Two columns of medium low polarity are used: one of them, capillary (SE-54) and the other, semicapillary (SPB-5), the last as complement and alternative of the first. It is pretended to find an adequate chromatographic method to determinate organophosphorus insecticides at the residue level.

Key-words: Gas chromatography, capillary columns, organophosphorus insecticides.

INTRODUCCIÓN

El gran número de plaguicidas que actualmente se emplean en agricultura (1), hace imprescindible la realización de controles analíticos que permitan determinar los residuos que puedan encontrarse en los productos agrícolas destinados a la alimentación; residuos que en algunos casos pueden llegar a superar los límites máximos permitidos, con los consiguientes riesgos para la salud humana (2, 3, 4).

La utilización de los insecticidas organofosforados se ha incrementado grandemente en los últimos años, sobre todo a partir de la prohibición de los organoclorados. Los tratamientos fitosanitarios a base de estos productos son muy variados al disponer de una amplia gama de compuestos con similar cometido (5, 6, 7), y por tanto las cantidades utilizadas y sus características condicionan la presencia de sus residuos.

La necesidad de determinaciones rápidas y fiables de los residuos presentes en los alimentos y la imposibilidad de aplicar tantos métodos individuales como contaminantes

puedan encontrarse en ellos, hace necesario el análisis múltiple de diversos plaguicidas a partir de la misma muestra.

Durante muchos años el método más eficaz para la identificación y cuantificación de los insecticidas organofosforados, ha sido la cromatografía gaseosa utilizando columnas empaquetadas con diversas fases líquidas (8, 9, 10, 11, 12, 13, 14). Sin embargo el uso de estas columnas convencionales, en la determinación de multiresiduos, requiere repeticiones de la misma muestra en fases y condiciones diferentes, lo que trae como consecuencia un notable retraso en la consecución de resultados.

En la última década el empleo de columnas capilares, inicialmente propuestas por Golay (15, 16) y posteriormente desarrolladas por Halasz y Horvarth (17, 18), ha supuesto un significativo avance en la resolución cromatográfica de mezclas al presentar un notable aumento de su eficacia en función de su mayor longitud (19, 20, 21, 22, 23).

En el trabajo que presentamos, se exponen las posibilidades que ofrecen dos tipos de columnas capilares y las

TABLA 1
Insecticidas organofosforados estudiados. Estructura básica y grado de utilización para diferentes cultivos

Insecticida	Estructura	Grado de utilización (*)			
		Cítricos	Frutales	Hortícolas	Cereales
1. Metanomidofos	S-amidofosfotioato	+	+++	+++	-
2. Acefato	S-amidofosfotioato	-	+++	+	-
3. Ometoato	O-fosfotioato	++	-	-	-
4. Monocrotofos	Ortofosfato	+	-	-	-
5. Tiometon	Fosfoditioato	+	+	-	-
6. Dimetoato	Fosfoditioato	+++	+	+	+
7. Diazinón	O-fosfotioato	+	+	-	+
8. Metil paratión	O-fosfotioato	-	+	-	-
9. Metil pirimifos	O-fosfotioato	++	-	-	+++
10. Fenitrotión	O-fosfotioato	+	+++	+	+
11. Malatión	Fosfoditioato	+	+	+	+
12. Clorpirifos	O-fosfotioato	++	+	++	+
13. Clorfenvinfos E	Ortofosfato	++	+	++	-
14. Clorfenvinfos	Ortofosfato	++	+	++	-
15. Mecarbam	Fosfoditioato	+++	++	+	-
16. Quinalfos	O-fosfotioato	++	+	-	-
17. Metidatión	Fosfoditioato	+++	+++	-	-
18. Profenofos	O-fosfotioato	-	-	+++	-
19. Etión	Fosfotioato	++	++	-	-
20. Triazofos	O-fosfotioato	-	-	+++	-
21. Carbofenitión	Fosfoditioato	+	-	-	-

* Utilización: Amplia +++, Media ++, Poca +, Ninguna -.

condiciones de trabajo apropiadas para el análisis de 21 insecticidas organofosforados por cromatografía de gases y detector termiónico alcalino específico de fósforo.

PARTE EXPERIMENTAL

INSECTICIDAS ESTUDIADOS. SELECCIÓN

Los insecticidas que se han seleccionado para su estudio se exponen en la tabla 1. El criterio seguido para su elección, se ha basado en su grado de utilización en los últimos años según datos recogidos de la Subdirección General de Sanidad Vegetal (Dirección Territorial del M.A.P.A. de Murcia) y a través de la información obtenida de las principales casas comerciales suministradoras de los mismos.

DISOLUCIONES PATRÓN UTILIZADAS. CONCENTRACIONES

De cada uno de los insecticidas anteriormente citados se prepararon las necesarias disoluciones patrón empleando como disolvente una mezcla de isooctano-tolueno 1:1 (tabla 2). Todos los productos utilizados fueron calidad «estándar analítico» suministrados por las centrales de las propias firmas comerciales que los fabrican; el resto de los reactivos y disolventes empleados fueron calidad «análisis de residuos» de la firma Merck.

TABLA 2
Disoluciones patrón utilizadas

Insecticida	Concentración: mg/l	
	Individuales	Mezcla
1. Metamidofos	3'50	0'14
2. Acefato	2'00	0'30
3. Ometoato	3'54	0'34
4. Monocrotofos	3'25	0'42
5. Tiometon	3'20	0'17
6. Dimetoato	3'64	0'14
7. Diazinón	3'10	0'09
8. Metil paratión	2'03	0'20
9. Metil pirimifos	2'90	0'26
10. Fenitrotión	3'31	0'33
11. Malatión	2'70	0'27
12. Clorpirifos	2'14	0'19
13. Clorfenvinfos E	3'15	0'15
14. Clorfenvinfos Z	2'00	0'20
15. Mecarbam	2'33	0'18
16. Quinalfos	2'50	0'27
17. Metidatión	3'96	0'23
18. Profenofos	4'90	0'20
19. Etión	2'47	0'12
20. Triazofos	4'24	0'38
21. Carbofenotión	2'53	0'25

TABLA 3
Condiciones cromatográficas de trabajo en las columnas utilizadas

	WCOT	WBC
Flujos:		
a) Gas portador: Nitrógeno	0'60 ml/m	10 ml/m
b) Gases detector Aire	160 ml/m	160 ml/m
Hidrógeno	2 ml/m	2 ml/m
Modo de inyección	Splitless 30''	Convencional
Volumen de inyección	1 µl	1 µl
Temperatura de inyección	250 °C	250 °C
Temperatura detector	300 °C	300 °C
	1' a 90 °C	1' a 120 °C
	30 °C/m hasta 200 °C	15 °C/m hasta 200 °C
	2' a 200 °C	3' a 200 °C
Programa de temperatura	1 °C/m hasta 220 °C	5 °C/m hasta 245 °C
	20 °C/m hasta 280 °C	1,7' a 245 °C
	10,7' a 280 °C	Enfriamiento a 120 °C
	Enfriamiento a 90 °C	
Duración cromatograma	40'	20'

Las disoluciones individuales se utilizaron para identificar cada uno de los insecticidas en las dos columnas ensayadas, así como para obtener posteriormente las rectas, ecuaciones de regresión, coeficientes de correlación y linealidad de respuesta del detector.

La disolución mezcla se utilizó para la identificación conjunta de los 21 insecticidas seleccionados; en ésta, las concentraciones de cada insecticida se fijaron para obtener respuestas de deflexión de escala comprendidas entre un 50-60%.

EQUIPO CROMATOGRÁFICO Y CONDICIONES OPERATORIAS

Instrumentación. Se ha empleado un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer Sigma 2.000 dotado con dos inyectores de regulación de flujo automático e inyector para columnas capilares, capaz de funcionar con o sin división de flujo a la entrada de la columna (split/splitless). El sistema va equipado con detector termoiónico alcalino de perla de rubidio específico de nitrógeno-fósforo. El cromatógrafo lleva asimismo incorporado un inyector automático Perkin-Elmer AS-2.000 con capacidad para 100 viales.

Columnas utilizadas. Se han utilizado dos columnas. Una capilar WCOT de sílice fundida con 5% de fenil, 95% metil silicona (SE-54) de 50 m de longitud, 0'25 mm de DI y 0'25 µ de película. Y otra, semicapilar WBC de vidrio con terminales de sílice fundida con 5% de fenil, 95% metil silicona (SPB-5) de 30 m de longitud, 0'75 mm de DI y 1 µ de película.

Cromatografía. Condiciones operatorias. Las condiciones de trabajo utilizadas para cada una de las columnas se exponen en la tabla 3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las figuras 1 y 2 se presentan cromatogramas obtenidos en cada una de las columnas utilizadas, empleando el carbamato pirimicarb como patrón interno y como disolvente la mezcla isooctano-tolueno 1:1, por cuanto se com-

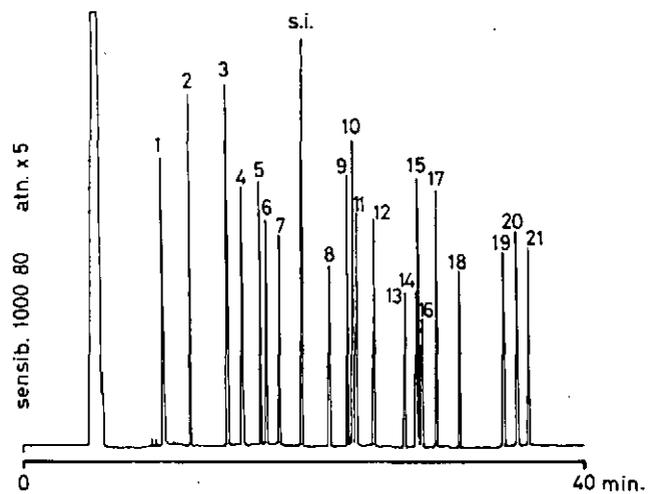


FIGURA 1. Cromatograma patrón de los 21 insecticidas estudiados. Columna WCOT (1. Metamidofos; 2. Acefato; 3. Ometoato; 4. Monocrotofos; 5. Tiometón; 6. Dimetoato; 7. Diazinón; 8. Metil paratión; 9. Metil pirimifos; 10. Fenitrotión; 11. Malatión; 12. Clorpirifos; 13. Clorfenvinfos E; 14. Clorfenvinfos Z; 15. Mecarbam; 16. Quinalfos; 17. Metidatión; 18. Profenofos; 19. Etión; 20. Triazofos; 21. Carbofenotión). S1: Pirimicarb.



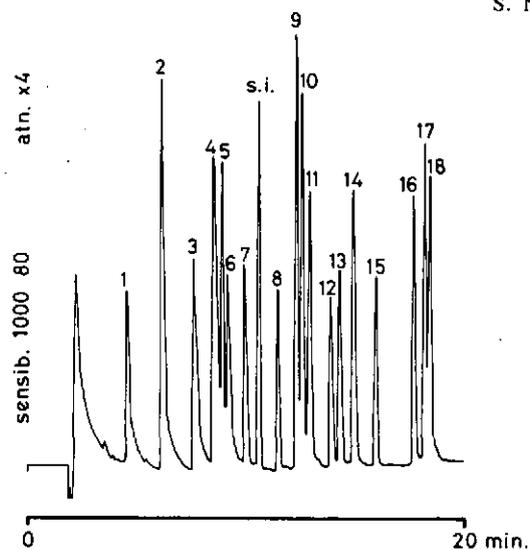


FIGURA 2. Cromatograma patrón de los 21 insecticidas estudiados. Columna WBC (1. Metamidofos; 2. Acefato; 3. Ometoato; 4. Monocrotofos; 5. Tiometón; 6. Dimetoato; 7. Diazinón; 8. Metil paratión; 9. Metil pirimifos + Fenitrotión; 10. Malatión; 11. Clorpirifos; 12. Clorfenvinfos E; 13. Clorfenvinfos Z + Mecarbam + Quinalfos; 14. Metidatión; 15. Profenofos; 16. Etión; 17. Triazofos; 18. Carbofenotión). SI: Pirimicarb.

probó que proporciona la mayor eficacia y mejor desarrollo de los ensayados (acetona, éter, etc...).

Los tiempos de retención absolutos y relativos correspondientes a los distintos insecticidas se exponen asimismo en las tablas 4 y 5.

Como se puede comprobar, al utilizar la columna WCOT, se consigue resolver la mezcla de los 21 insecticidas y con ello identificarlos correctamente en un tiempo total de 37'5 minutos en las condiciones establecidas.

Al emplear la columna semicapilar WBC, los compuestos metil pirimifos-fenitrotión y clorfenvinfos Z-mecarbam-quinalfos, aparecen agrupados con tiempos de retención absolutos de 10'47 y 12'46 minutos respectivamente. El resto presenta una separación adecuada para su identificación, con una duración del análisis de 17 minutos.

La reproducibilidad de los tiempos de retención obtenidos en ambos casos, garantiza de forma satisfactoria la validez y aplicabilidad del método de identificación expuesto para el análisis de multiresiduos de los insecticidas organofosforados considerados.

La cuantificación de los distintos insecticidas se ha realizado en función de las medidas directas de las áreas de los picos obtenidos en los cromatogramas mediante un integrador-registrador (Perkin-Elmer, modelo Sigma 15) aco-

TABLA 4

Reproducibilidad del tiempo de retención absoluto (t_r) y relativo (t'_r) a monocrotofos, pirimicarb y clorpirifos, para los insecticidas estudiados en columna capilar de sílice fundida (WCOT)*

Insecticida	t_r	DS	CV%	t'_r Monoc.	t'_r Pirim.	t'_r Clorp.
1. Metamidofos	10'54	0'031	0'29	0'63	0'49	0'40
2. Acefato	12'63	0'035	0'27	0'76	0'59	0'48
3. Ometoato	15'36	0'035	0'23	0'92	0'72	0'59
4. Monocrotofos	16'54	0'032	0'19	1'00	0'78	0'63
5. Tiometon	17'81	0'029	0'16	1'07	0'84	0'68
6. Dimetoato	18'25	0'042	0'23	1'10	0'86	0'70
7. Diazinón	19'18	0'037	0'19	1'16	0'90	0'73
SI. Pirimicarb	21'18	0'041	0'19	1'28	1'00	0'80
8. M. Paratión	22'93	0'044	0'19	1'38	1'08	0'87
9. M. Pirimifos	24'34	0'042	0'17	1'47	1'14	0'93
10. Fenitrotión	24'69	0'044	0'18	1'49	1'16	0'94
11. Malatión	24'97	0'042	0'17	1'51	1'17	0'95
12. Clorpirifos	26'24	0'047	0'18	1'58	1'23	1'00
13. Clorfenv, E	28'33	0'040	0'14	1'71	1'33	1'08
14. Clorfenv, Z	29'11	0'041	0'14	1'76	1'37	1'11
15. Mecarbam	29'16	0'034	0'12	1'76	1'37	1'11
16. Quinalfos	29'50	0'037	0'12	1'78	1'39	1'12
17. Metidatión	30'53	0'038	0'13	1'84	1'44	1'16
18. Profenofos	32'22	0'064	0'20	1'94	1'52	1'23
19. Etión	35'38	0'046	0'13	2'13	1'67	1'35
20. Triazofos	36'35	0'049	0'13	2'19	1'71	1'39
21. Carbofenotión	37'23	0'052	0'14	2'25	1'75	1'42
Media DS		0'041±0'008				
Media CV%			0'18±0'05			

* Valor medio de 15 muestras inyectadas.

TABLA 5
 Reproductividad del tiempo de retención absoluto (t_r) y relativo (t'_r) a monocrotofos, pirimicarb y clorpirifos, para los insecticidas estudiados en columna semicapilar de vidrio (WBC)*

Insecticida	t_r	DS	CV%	t'_r Monoc.	t'_r Pirim.	t'_r Clorp.
1. Metamidofos	3'60	0'016	0'44	0'50	0'39	0'32
2. Acefato	5'21	0'009	0'04	0'72	0'57	0'47
3. Ometoato	6'55	0'007	0'10	0'90	0'71	0'59
4. Monocrotofos	7'26	0'006	0'09	1'00	0'79	0'65
5. Tiometón	7'58	0'008	0'10	1'04	0'83	0'68
6. Dimetoato	7'74	0'008	0'11	1'07	0'85	0'70
7. Diazinón	8'44	0'008	0'10	1'16	0'92	0'76
Sl. Pirimicarb	9'10	0'011	0'12	1'25	1'00	0'81
8. M. Paratión	9'68	0'010	0'10	1'33	1'06	0'87
9. M. Pirimifos	10'47	0'010	0'10	1'44	1'15	0'94
10. Fenitrotión	10'47	0'010	0'10	1'44	1'15	0'94
11. Malatión	10'79	0'012	0'11	1'49	1'18	0'97
12. Clorpirifos	11'11	0'012	0'10	1'53	1'22	1'00
13. Clorfenv, E	12'08	0'012	0'10	1'66	1'32	1'09
14. Clorfenv, Z	12'46	0'014	0'11	1'72	1'36	1'12
15. Mecarbam	12'46	0'014	0'11	1'72	1'36	1'12
16. Quinalfos	12'46	0'014	0'11	1'72	1'36	1'12
17. Metidatión	13'00	0'015	0'11	1'79	1'42	1'17
18. Profenofos	14'07	0'013	0'09	1'94	1'54	1'27
19. Etión	15'85	0'014	0'09	2'18	1'74	1'43
20. Triazofos	16'34	0'014	0'08	2'25	1'79	1'47
21. Carbofenotión	16'52	0'014	0'09	2'28	1'81	1'49
Media DS		0'011±0'003				
Media CV%		0'11±0'07				

* Valor medio de 15 muestras inyectadas.

plado al cromatógrafo. El método utilizado ha sido el de patrón interno, empleando al igual que en la identificación, el carbamato pirimicarb como referencia.

La linealidad de respuesta del detector para cada uno de los insecticidas en ambas columnas, se ha comprobado en un rango de concentración comprendido entre 0'1 y 4 ng. Los valores de los coeficientes de correlación lineal obtenidos en la columna capilar WCOT (comprendidos entre 0'9998 para malatión y clorfenvinfos, y 0'9754 para monocrotofos) y con la semicapilar WBC (entre 0'9997 para malatión y 0'9678 para dimetoato), evidencian la correcta linealidad existente entre cantidad de muestra y respuesta del detector.

La reproducibilidad en la cuantificación cuando se utilizan columnas capilares y detector termoiónico alcalino, es un problema resaltado en la bibliografía (20). De una parte el detector NPD, específico para compuestos de fósforo es reconocido por ser menos estable que el de captura electrónica o el fotométrico de llama. En estos detectores la respuesta es más constante, mientras que en el NPD, es máxima en condiciones óptimas pero va decreciendo con el uso y análisis continuados, influyendo en este hecho tanto la situación en que se encuentre la columna, como el tiempo de trabajo de la perla. En cambio posee ciertas

ventajas sobre el fotométrico de llama, como son el ser lineal en un amplio rango de concentraciones y el estar dotado de una sensibilidad mucho mayor para la detección de pequeñas cantidades de compuestos fosforados.

Por otra parte y además de la influencia del detector, hay que valorar la importancia de la técnica de inyección cuando se trabaja con columnas capilares. Normalmente, los extractos procedentes de muestras vegetales en las que se quiere conocer la concentración de los compuestos fosforados están bastante diluidos, por lo que una inyección de muestra con división de flujo (split), reduce aún más la cantidad de compuesto que se introduce en la columna y que por tanto es detectada. Por este motivo, parece más conveniente cuando se utilizan muestras diluidas, aplicar una técnica en la cual no haya división de flujo (splitless). Esta técnica basada en los trabajos de Grob (24, 25, 26), permite introducir en la columna la totalidad de la muestra inyectada y eliminar sólo restos de disolvente cuando la válvula de split es abierta a un determinado tiempo; con ello se consigue que el disolvente no enmascare los picos de los primeros componentes que aparecen en el cromatograma (efecto disolvente). Este proceso lleva a la consecución de resultados válidos en la cuantificación de los extractos vegetales, pero en la práctica se com-

prueba que no siempre se introduce la totalidad de la cantidad inyectada debido a los coeficientes de variabilidad obtenidos.

En nuestro caso, la reproducibilidad hallada en la cuantificación de muestras iguales con la columna capilar WCOT (4-13% de C.V.) cuando se trabaja con la técnica de inyección sin división de flujo (splitless), es algo inferior a la conseguida con la columna semicapilar WBC (3-10% de C.V.), y a los valores habitualmente señalados para columnas convencionales. Estas columnas semicapilares, aunque presentan una eficacia algo menor que las primeras, poseen por contra algunas ventajas tales como tener una capacidad de carga 100 veces superior a las WCOT y además poder trabajar con inyectores convencionales.

Para el cálculo de los límites de detección de los insecticidas estudiados hemos aceptado la definición de «cantidad mínima de una sustancia que una vez inyectada se detecta con cierto grado de exactitud». El área medida en el cromatograma para esta cantidad, debe ser superior a las variaciones del ruido de fondo del propio aparato.

Existen varios criterios en cuanto a la relación que debe existir entre la respuesta y el ruido de fondo. Uno de los definidos para altura mínima de un pico en el análisis de una muestra, consiste en fijar esta última en el 5% de la escala del registrador. Esta altura mínima, es función de las interferencias en la línea base (27), por lo cual hay que tener en cuenta que el análisis no podrá ser considerado válido si existen demasiadas interferencias en el cromatograma.

TABLA 6

Límites de detección de los insecticidas en las columnas utilizadas (valores en ng)

Insecticida	WCOT	WBC
1. Metamidofos	0'0006	0'0105
2. Acefato	0'0014	0'0100
3. Ometoato	0'0016	0'0215
4. Monocrotofos	0'0017	0'0254
5. Tiometón	0'0013	0'0097
6. Dimetoato	0'0014	0'0136
7. Diazinón	0'0016	0'0058
8. M. Paratión	0'0042	0'0153
9. M. Pirimifos	0'0027	0'0113
10. Fenitrotión	0'0026	0'0112
11. Malatión	0'0030	0'0112
12. Clorpirifos	0'0024	0'0098
13. Clorfenv, E	0'0029	0'0127
14. Clorfenv, Z	0'0036	0'0147
15. Mecarbam	0'0031	0'0138
16. Quinalfos	0'0040	0'0232
17. Metidatión	0'0034	0'0117
18. Profenofos	0'0025	0'0140
19. Etión	0'0016	0'0062
20. Triazofos	0'0038	0'0229
21. Carbofenotión	0'0030	0'0200

El cálculo se ha realizado considerando como altura mínima del pico, aquella que es triple del ruido de fondo. Con este criterio, en la tabla 6 se exponen los límites de detección obtenidos en cada una de las columnas.

Ante todo lo expuesto, y dados los valores de reproducibilidad obtenidos en la identificación y cuantificación de los 21 insecticidas seleccionados, así como los límites de detección conseguidos en el rango de picogramos, se puede concluir afirmando que la utilización de la columna capilar de sílice fundida SE-54 y la semicapilar SPB-5 como complementaria, en las condiciones analíticas señaladas, es la adecuada para la determinación de estos compuestos organofosforados a nivel de residuos.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 WORTHING, C. R.: *The pesticide manual*. British Crop Protection Council. Londres (1984).
- 2 MATSUMARA, F.: *Toxicology of Insecticides*. Ed. Plenum Press. Londres (1976).
- 3 TOURNAYRE, J. C.: *Phytoma*. 346, 5 (1983).
- 4 GREEN, M. B.: *Los plaguicidas ¿beneficiosos o perjudiciales?* Ed. Academia. León (1984).
- 5 FEST, C. y SCHMIDT, K. J.: *The Chemistry of Organophosphorus Pesticides*. Ed. Springer-Verlag. Berlín (1973).
- 6 ETO, M.: *Organophosphorus Pesticides: Organic and Biological Chemistry*. Ed. CRC Press. Cleveland, Ohio (USA) (1974).
- 7 CREMLYN, R.: *Plaguicidas modernos y su acción bioquímica*. Ed. Limusa, S. A. Méjico (1984).
- 8 BOWMAN, M. C. y BEROZA, M.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 50, 1.228 (1967).
- 9 BOWMAN, M. C., BEROZA, M. y HILL, K. R.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 54, 346 (1971).
- 10 BURCHFIELD, H. P. y STORRS, E.: *J. Chromatogr. Sci.* 13, 202 (1975).
- 11 SASS, S. y PARKER, G. A.: *J. Chromatogr.* 189, 331 (1980).
- 12 CARSON, L. J.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 64, 714 (1981).
- 13 HOLLAND, P. T. y McGHIE, J.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 66, 1.002 (1983).
- 14 PRINSLOO, S. M. y DE BEER, P. R.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 68, 1.100 (1985).
- 15 GOLAY, M. J. E.: *Theory of Chromatography in Open and Coated Tubular Columns with Round and Rectangular Cross Sections*. Ed. D. H. Desty. Londres (1958).
- 16 GOLAY, M. J. E.: *Brief Report on Gas Chromatographic Theory*. Ed. R. P. W. Scott. Londres (1960).
- 17 HALASZ, I. y HORVATH, C.: *Anal. Chem.* 35, 499 (1963).
- 18 HORVATH, C.; ETTRE, L. S. y PURCELL, J. E.: *Laboratory*. 6, 75 (1974).
- 19 WORDS, K.: *J. High Resolution Chromatogr. Comunications*. 4, 346 (1981).
- 20 RIPLEY, B. D. y BRAUN, H. E.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 66, 91 (1983).
- 21 STAN, H. J. y GOEBEL, H.: *J. Chromatogr.* 268, 55 (1983).
- 22 GOEBEL, H. y STAN, H. J.: *J. Chromatogr.* 279, 523 (1983).

- 23 FEHRINGER, N. V. y WALTERS, S. M.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 66, 91 (1984).
- 24 GROB, K. y GROB, G.: *Chromatographia*. 5, 3 (1972).
- 25 HARTIGAN, M. J.; GIORDANO, B. y ETTRE, L. S.: *Chromatographia Newslett.* 5, 24, (1977).
- 26 GROB, K. y GROB, K. Jr.: *J. High Resolution Chromatogr.* 1, 57 (1978).
- 27 F.D.A.: *Pesticide analytical manual. Methods wich Detect Multiple Residues.* U.S.D. Helalth. Education and Welfare. F.D.A. Whashington (USA) (1975).