

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**Departamento de Química Analítica**



**DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE  
CONTAMINANTES ORGÁNICOS EN MIEL Y ZUMOS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**  
**PRESENTADA POR**

**María Beatriz Albero Romano**

Bajo la dirección de los doctores  
José Luís Tadeo Lluch  
Consuelo Sánchez-Brunete Palop

**Madrid, 2009**

• ISBN: 978-84-692-2771-8

© María Beatriz Albero Romano, 2008

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



## DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS EN MIEL Y ZUMOS



M<sup>a</sup> BEATRIZ ALBERO ROMANO  
MADRID, 2008

## ÍNDICE

---

---

# ÍNDICE

<b>OBJETIVOS</b> .....	3
------------------------	---

## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

### A. EL USO DE PESTICIDAS EN LA AGRICULTURA Y LA CONTAMINACIÓN DE LOS ALIMENTOS

1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. TIPOS DE PESTICIDAS Y MECANISMOS DE ACCIÓN.....	11
2.1. HERBICIDAS.....	12
2.2. INSECTICIDAS.....	16
2.3. FUNGICIDAS.....	21
2.4. OTROS PESTICIDAS.....	22
3. OTROS CONTAMINANTES ORGÁNICOS.....	22
4. DISTRIBUCIÓN Y PERSISTENCIA DE PESTICIDAS EN LOS ALIMENTOS.....	26
5. BIBLIOGRAFÍA.....	30

### B. MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN ALIMENTOS

1. INTRODUCCIÓN.....	35
2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.....	36
2.1. METODOS CLÁSICOS.....	36
2.2. EXTRACCIÓN CON LÍQUIDOS PRESURIZADOS.....	39
2.3. EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS.....	40
2.4. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS.....	42
2.5. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.....	43
2.6. DISPERSIÓN DE LA MATRIZ EN FASE SÓLIDA.....	45
2.7. MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.....	47

2.8. EXTRACCIÓN MEDIANTE BARRA DE AGITACIÓN .....	50
2.9. TÉCNICA QUECHERS.....	51
2.10. COMPARACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN .....	52
3. MÉTODOS DE PURIFICACIÓN .....	54
4. DETERMINACIÓN ANALÍTICA .....	56
4.1. CROMATOGRAFÍA DE GASES .....	56
4.2. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS.....	58
4.3. OTRAS TÉCNICAS ANALÍTICAS .....	59
5. BIBLIOGRAFÍA.....	60

## II. PARTE EXPERIMENTAL

### CAPÍTULO I

#### DESARROLLO DE MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS Y OTROS CONTAMINANTES ORGÁNICOS EN LA MIEL

1. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PESTICIDAS EN LA MIEL MEDIANTE DISPERSIÓN DE LA MATRIZ EN FASE SÓLIDA Y CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECCIÓN POR CAPTURA DE ELECTRONES .....	75
2. DETERMINACIÓN DE INSECTICIDAS EN LA MIEL MEDIANTE DISPERSIÓN DE LA MATRIZ EN FASE SÓLIDA Y CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECCIÓN DE NITRÓGENO-FÓSFORO Y CONFIRMACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS .....	89
3. DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN LA MIEL MEDIANTE DISPERSIÓN DE LA MATRIZ EN FASE SÓLIDA Y CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS .....	99
4. ANÁLISIS DE PESTICIDAS EN LA MIEL MEDIANTE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS .....	111

---

**CAPÍTULO II****DESARROLLO DE MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN ZUMOS DE FRUTAS Y HORTALIZAS**

1. DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS EN ZUMOS DE FRUTAS MEDIANTE DISPERSIÓN DE LA MATRIZ EN FASE SÓLIDA Y CROMATOGRAFÍA DE GASES .....	127
2. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE HERBICIDAS EN ZUMOS MEDIANTE DISPERSIÓN DE LA MATRIZ EN FASE SÓLIDA Y CROMATOGRAFÍA DE GASES.....	139
3. DETERMINACIÓN DE TIABENDAZOL EN ZUMO Y CORTEZA DE NARANJA POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS CON DETECCIÓN POR FLUORESCENCIA Y CONFIRMACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRIA DE MASAS TRAS LA EXTRACCIÓN MEDIANTE DISPERSIÓN DE LA MATRIZ EN FASE SÓLIDA .....	151
4. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PESTICIDAS EN ZUMOS MEDIANTE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRIA DE MASAS .....	163
<b>III. DISCUSIÓN INTEGRADORA.....</b>	<b>177</b>
<b>IV. CONCLUSIONES .....</b>	<b>187</b>
<b>V. ANEXO – GLOSARIO DE TÉRMINOS.....</b>	<b>195</b>

**OBJETIVOS**

---

## OBJETIVOS

La agricultura moderna depende, en gran medida, de la utilización de pesticidas para controlar las plagas, las enfermedades y las malas hierbas que pueden ocasionar pérdidas en la calidad de las cosechas y disminuir su producción. El amplio uso de los pesticidas, unido a su persistencia y distribución medioambiental, origina la contaminación de las aguas, del suelo y de los alimentos. Además, el carácter lipofílico de muchos pesticidas puede provocar su acumulación en los seres humanos, al consumir los alimentos contaminados. En los últimos años, la contaminación de los alimentos y del medio ambiente por los pesticidas se ha convertido en objeto de gran interés y preocupación social debido a los posibles efectos adversos de una exposición prolongada a estos compuestos. Los pesticidas son sustancias tóxicas, por lo que diversos organismos nacionales e internacionales han establecido límites máximos de concentración en los alimentos y el agua con el fin de proteger la salud humana.

La demanda de la sociedad de una mayor seguridad en el uso de los pesticidas hace necesario desarrollar y mejorar la metodología analítica para poder determinar los residuos de estos compuestos a niveles de traza, tanto en muestras ambientales como en los alimentos, siendo la ingestión de estos últimos la principal vía de exposición de los consumidores a los pesticidas. Por consiguiente, los métodos analíticos deben tener una elevada sensibilidad y selectividad, particularmente en el análisis multiresiduo, donde un número elevado de pesticidas tiene que ser determinado simultáneamente.

La preparación de las muestras, que es una etapa muy importante del método analítico, se lleva a cabo mediante la extracción de los analitos de la matriz y la posterior limpieza de los extractos. La metodología clásica de extracción emplea, en general, grandes cantidades de disolventes y de material de vidrio en un proceso que suele ser muy laborioso. El desarrollo de nuevas técnicas de extracción que permitan miniaturizar todo el proceso de preparación de la muestra

y utilizar un bajo consumo de disolventes es de gran interés para la consecución de métodos analíticos rápidos y de alta fiabilidad, siendo a su vez más respetuosos con el medio ambiente al disminuir su impacto ambiental.

Los principales objetivos de este trabajo, agrupados según el tipo de matriz estudiado, son los siguientes:

1. El desarrollo de metodología analítica para la determinación en la miel de los residuos de pesticidas y otros contaminantes orgánicos, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, basada en el empleo de la dispersión de matriz en fase sólida y en la determinación cromatográfica empleando detectores selectivos de nitrógeno-fósforo y captura de electrones, así como la espectrometría de masas.

2. El desarrollo de métodos analíticos que permitan la determinación en zumos de frutas y hortalizas de los residuos de distintos grupos de pesticidas utilizando diferentes técnicas de extracción y de determinación por cromatografía de gases, así como el análisis del fungicida tiabendazol por cromatografía de líquidos.

## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

---

**A. EL USO DE PESTICIDAS EN LA AGRICULTURA Y LA  
CONTAMINACIÓN DE LOS ALIMENTOS**

---

## **1. INTRODUCCIÓN**

Los alimentos que comemos son el fruto de una naturaleza manipulada por el hombre con la finalidad de obtener el mejor rendimiento posible. Ello obliga al uso de una gran variedad de productos químicos que pueden aparecer en los alimentos y son ajenos a su naturaleza. Otras sustancias extrañas llegan a los cultivos, la pesca y los forrajes de forma accidental, a través de aguas contaminadas por vertidos industriales, humos y cenizas de fábricas, restos de combustibles dispersos en el agua, etc., introduciéndose de esta manera en nuestra dieta.

Dependiendo de la dosis en que los consumamos, estos agentes contaminantes pueden ser inocuos o por el contrario causar en nuestro organismo intoxicaciones agudas, que ocurren rara vez, o crónicas, provocadas por una acumulación continuada de pequeñas dosis, capaz de producir alteraciones a largo plazo.

En el caso de los contaminantes más habituales, la ciencia ha fijado las dosis diarias que no producen efectos en el organismo humano, tomando como referencia las cantidades toleradas por animales sujetos a estudio. Estas concentraciones se emplean para establecer los límites máximos permitidos de residuos químicos en los alimentos que comemos.

El estudio de la contaminación química de los alimentos ha crecido considerablemente en los últimos años convirtiéndose en una parte fundamental para el mantenimiento de la seguridad alimentaria en todo el mundo. Los principales grupos de contaminantes químicos que pueden encontrarse en los alimentos son los contaminantes orgánicos y los metales pesados.

Los contaminantes orgánicos que más frecuentemente se detectan en los alimentos se pueden dividir en cuatro categorías.

PESTICIDAS. Los herbicidas, insecticidas y fungicidas son los productos fitosanitarios más utilizados a la hora de controlar las plagas y enfermedades de los cultivos.

MEDICAMENTOS DE USO VETERINARIO. Entre los medicamentos más empleados en los animales de granja se encuentran los agentes antimicrobianos para prevenir enfermedades causadas por bacterias y hongos, aquellos usados contra parásitos de la piel, los antihelmínticos y los agentes anabolizantes, como las hormonas que promueven el crecimiento.

COMPUESTOS QUÍMICOS PERSISTENTES EN EL MEDIO AMBIENTE. Los policlorobifenilos (PCBs), los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) y las policlorodibenzo-*p*-dioxinas (PCDD) son los compuestos más estudiados en este grupo de contaminantes orgánicos. La contaminación de los alimentos por este tipo de compuestos se origina principalmente por deposición atmosférica o por el uso de lodos de depuradora en suelos agrícolas.

TOXINAS NATURALES. Sustancias producidas por la contaminación microbiana de los alimentos o las materias primas empleadas en su producción.

## **2. PESTICIDAS: TIPOS Y MECANISMOS DE ACCIÓN**

La Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) definen el término pesticida, denominado también plaguicida, como cualquier sustancia o mezcla de ellas utilizada para prevenir o controlar cualquier especie de planta o animal indeseable, incluyendo las sustancias destinadas a utilizarse como reguladores de crecimiento de las plantas, o como defoliantes o desecantes, durante la producción, almacenaje, transporte, comercialización o procesado de los alimentos para el hombre o los animales.

Los pesticidas se pueden clasificar, entre otros, según las siguientes características:

- El tipo de organismo que se desea controlar: insecticida, acaricida, herbicida, fungicida, rodenticida, etc.
- El grupo químico del principio activo: compuestos organoclorados, compuestos organofosforados, carbamatos, triazinas, derivados del ácido fenoxiacético, etc.
- Su persistencia en el medio ambiente: persistentes, poco persistentes o no persistentes
- Su toxicidad aguda: Según la toxicidad oral aguda en ratones y ratas expresada como DL<sub>50</sub> (dosis requerida para matar al 50 % de la población objeto de estudio), organismos como la OMS y la Agencia para la Protección del Medio Ambiente (EPA) han clasificado a los pesticidas en cuatro categorías: muy tóxico, moderadamente tóxico, poco tóxico y mínimamente tóxico.

Los principales grupos de pesticidas utilizados en la agricultura se describen a continuación.

## 2.1. HERBICIDAS

Los herbicidas son compuestos químicos cuya finalidad es combatir las malas hierbas que entorpecen el desarrollo de los cultivos. Los daños producidos por las malas hierbas pueden ser debidos a que éstas compiten por los nutrientes lo que puede llevar a un bajo rendimiento del cultivo, a que dificultan las labores agrícolas y también a que pueden ser focos de enfermedades que pasen luego a los cultivos. En los países industrializados los herbicidas se aplican sobre el 85-100% de todos los cultivos principales, habiendo reemplazado a la escarda manual utilizada en la agricultura tradicional, debido al elevado coste de la mano de obra.

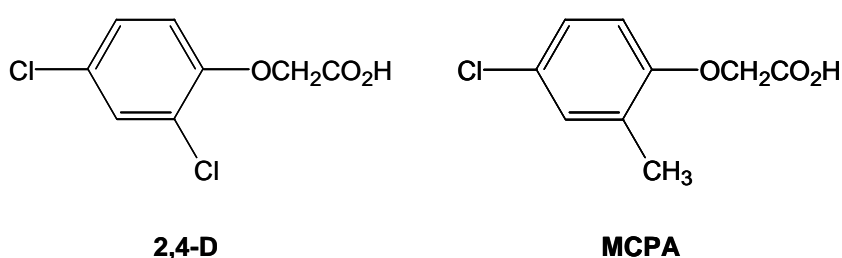
Los herbicidas, dependiendo de su estructura química, actúan sobre el metabolismo de las plantas de diversas formas. Los fenoxiácidos, como el 2,4-D, interfieren en el sistema enzimático de las plantas provocando alteraciones metabólicas, mientras que los carbamatos y las cloroacetamidas afectan a la división celular. En cambio, las triazinas y los derivados de la urea actúan sobre los cloroplastos y, por tanto, en el proceso de la fotosíntesis.

Los herbicidas pueden ser clasificados de distintas maneras. Según su acción sobre las plantas, los herbicidas pueden ser totales, si destruyen toda la vegetación sin discriminar, o selectivos, que son aquellos que solamente atacan a las malas hierbas sin afectar a los cultivos. Estos compuestos se pueden aplicar antes de sembrar, denominándose de presembrado o después de la siembra cuando el cultivo no ha emergido (herbicida de preemergencia) o cuando éste ya se ha desarrollado, en cuyo caso se trata de un herbicida de postemergencia. Los herbicidas selectivos son los más empleados pero hay que tener en cuenta una serie de factores a la hora de su uso como son su incorporación y transporte en la planta, su persistencia y su rapidez de acción.

Otra forma de clasificar estos compuestos es según su estructura química, existiendo más de diez grupos distintos de herbicidas. A continuación se describen los principales grupos de herbicidas empleados.

### 2.1.1. Fenoxiácidos

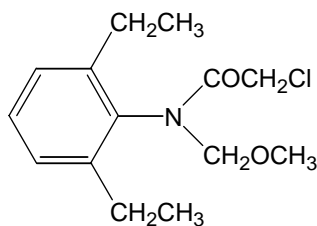
Estos herbicidas se introdujeron a mediados de los años cuarenta con el descubrimiento en 1942 del 2,4-D derivado del ácido fenoxiacético y son los más extensamente usados a nivel mundial. Este tipo de plaguicidas presenta una fuerte actividad herbicida por lo que se pueden emplear a dosis muy bajas con una gran selectividad. En la Figura 1 se muestran dos de los compuestos más importantes de este grupo.



**Figura 1.** Estructura química del 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) y del MCPA (ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético).

### 2.1.2. Cloroacetamidas

Las cloroacetamidas son acetamidas halogenadas en el carbono  $\alpha$  y con sustituyentes orgánicos sobre el átomo de nitrógeno que poseen actividad herbicida y se emplean en tratamientos de preemergencia. Este tipo de herbicidas de aplicación al suelo controlan gramíneas anuales en germinación y algunas malezas de hoja ancha al ser inhibidores de la división celular. En la Figura 2 se recoge la estructura química del alacloro, cloroacetamida que ha sido utilizada frecuentemente en mezclas con otros herbicidas.



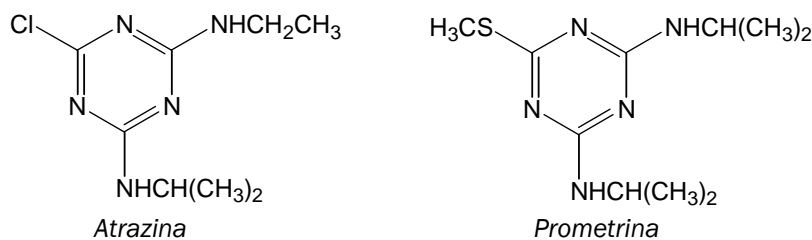
**Figura 2.** Estructura química del alacloro

### 2.1.3. Triazinas

Las triazinas constituyen una de las familias más antiguas de herbicidas empleados en la agricultura, en especial la atrazina y la simazina. La atrazina es el herbicida más utilizado en el cultivo de maíz en EE.UU. pero desde 2006 está prohibida en la Unión Europea por los efectos adversos en la salud humana. La estructura general de las triazinas es:



Entre las triazinas, están aquellas que poseen cloro como uno de sus sustituyentes, como es el caso de la atrazina, y las que no poseen este radical halogenado, como la prometrina. En la Figura 3 se muestran las estructuras químicas de estos compuestos.

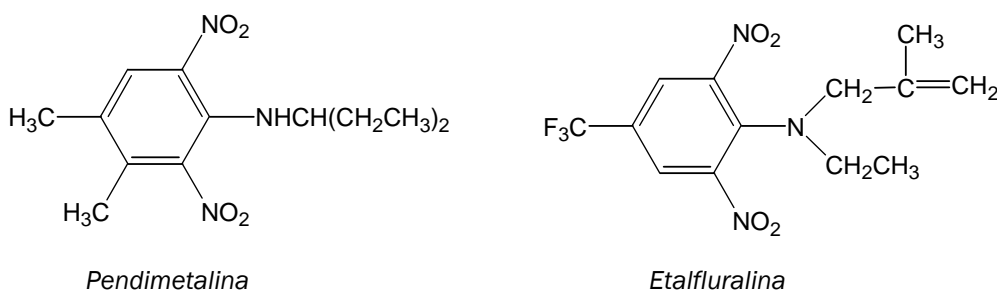


**Figura 3.** Estructura química de la atrazina y la prometrina

### 2.1.4. Dinitroanilinas

Son algunos de los herbicidas más intensamente usados en la agricultura y se emplean frecuentemente incorporados al suelo, como herbicidas selectivos de preemergencia en muchos cultivos. Tienen una solubilidad en agua muy baja, lo

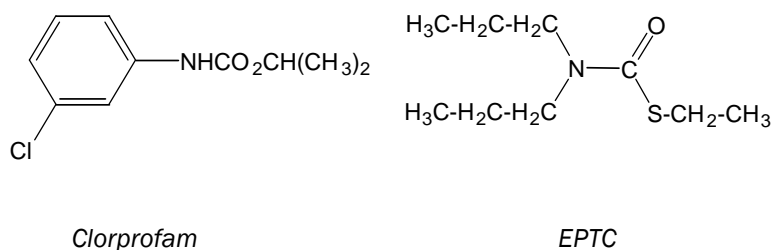
que reduce al mínimo la lixiviación. En la Figura 4 se muestran las estructuras de dos compuestos pertenecientes a esta familia de herbicidas.



**Figura 4.** Estructura química de la pendimetalina y la etalfluralina

### 2.1.5. Carbamatos

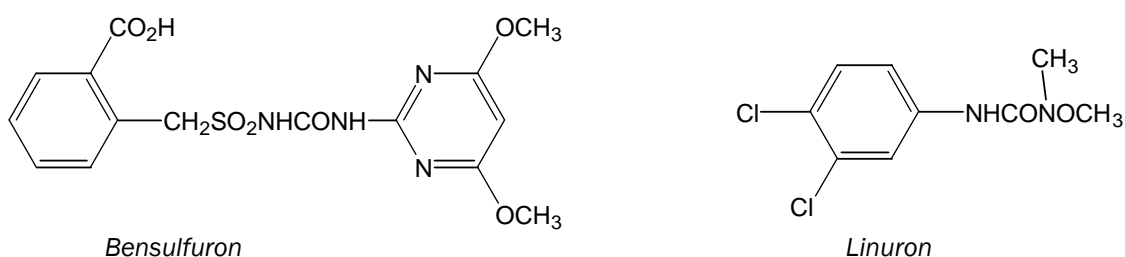
Los carbamatos son derivados del ácido carbámico, de fórmula molecular  $\text{NH}_2\text{-COOH}$ . La mayoría de los carbamatos se emplean como insecticidas, sin embargo, varios N-fenilcarbamatos son herbicidas selectivos de preemergencia, aunque algunos también son efectivos para uso en postemergencia. Dentro del grupo de los carbamatos se encuentran los tiocarbamatos y los ditiocarbamatos, en los que se ha sustituido el oxígeno por azufre. En la Figura 5 se presentan las estructuras químicas del clorprofam (N-fenilcarbamato) y del EPTC, dipropiltiocarbamato de S-etilo (tiocarbamato).



**Figura 5.** Estructura química del clorprofam y del EPTC.

### 2.1.6. Ureas

Los derivados de la urea,  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ , muestran una actividad herbicida muy marcada. En esta familia de herbicidas se pueden distinguir dos grupos distintos de compuestos, las fenilureas, como el linuron y el diuron, y las sulfonilureas, entre las que se encuentran el bensulfuron y el metsulfuron. Las fenilureas se descubrieron primero y se han utilizado ampliamente, pero en la actualidad se emplean más las sulfonilureas por presentar una actividad herbicida muy superior a la de las fenilureas, por lo que se necesitan dosis mucho más bajas y, por tanto, dan lugar a unos niveles de residuos más bajos. En la Figura 6 se muestran las estructuras químicas de compuestos de las dos clases de ureas mencionadas.



**Figura 6.** Estructura química del bensulfuron (sulfonilurea) y el linuron (fenilurea)

## 2.2. INSECTICIDAS

Los insecticidas son sustancias ampliamente utilizadas en el medio agrícola para controlar y erradicar las plagas de los cultivos, por lo que permiten mejorar la producción agrícola y proteger los productos almacenados, siendo considerados como uno de los principales factores del incremento de la productividad de los cultivos en el siglo XX. Los insecticidas se emplean para erradicar los insectos en cualquiera de sus etapas de desarrollo, tanto los huevos, las larvas como los adultos. En la clasificación de los insecticidas según su estructura química se pueden destacar cuatro grandes familias de compuestos: los insecticidas organoclorados, los carbamatos, los piretroides y los organofosforados.

### 2.2.1 Insecticidas Organoclorados

Estos productos constituyen un grupo de compuestos de importancia histórica, desarrollados poco antes y durante la segunda Guerra Mundial. Cuando Müller descubrió las propiedades del DDT, se inició una revolución en el campo de los plaguicidas, desencadenando la incorporación de productos derivados de la síntesis orgánica a la lucha contra plagas y enfermedades (Barberá, 1989). No obstante, la mayoría de estos compuestos están actualmente prohibidos en países industrializados debido a su elevada persistencia en el medio ambiente, a tener una marcada capacidad de biomagnificación, y a ser posibles carcinogénicos. Aunque todavía se emplean en países en vías de desarrollo para luchar contra el mosquito *Anopheles*, transmisor de la malaria.

Dentro de los insecticidas organoclorados se pueden distinguir fundamentalmente tres familias: la del DDT y análogos, la del hexaclorociclohexano (HCH), también conocido como lindano, y la de los ciclodienos clorados. En la Figura 7, se muestran las estructuras químicas de compuestos representativos de cada una de las familias mencionadas anteriormente.

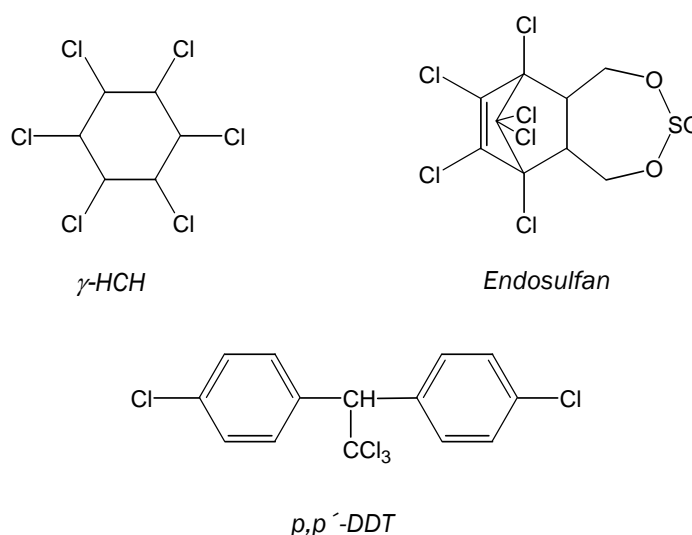
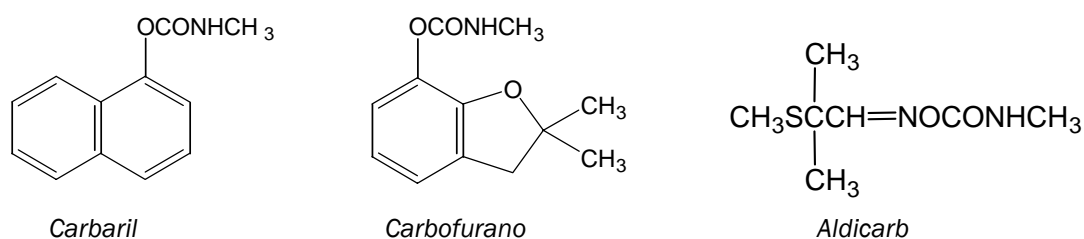


Figura 7. Estructura química del  $\gamma$ -HCH, del endosulfan y del *p,p'*-DDT.

### 2.2.2. Carbamatos

Este grupo presenta un gran interés en el campo de los plaguicidas por su gran actividad biológica. Los carbamatos son inhibidores de la acetilcolinesterasa, enzima responsable de la inactivación del neurotransmisor acetilcolina alterando por consiguiente la transmisión del impulso nervioso. Todos estos productos derivan del ácido carbámico, de fórmula HO-CO-NH<sub>2</sub>. Podemos distinguir tres grandes familias de compuestos: los *aryl-N-metilcarbamatos*, los *carbamatos heterocíclicos* y las *oximas*. En la Figura 8 se muestran las estructuras químicas de insecticidas carbámicos de cada familia.



**Figura 8.** Estructura química del carbaril (*aryl-N-metilcarbamato*), del carbofurano (*carbamato heterocíclico*) y del aldicarb (*oxima*).

### 2.2.3. Piretroides

El pelitre ha sido uno de los derivados vegetales más empleado como insecticida, especialmente en aplicaciones domésticas, pero su utilización en agricultura ha sido más bien escasa por carecer de la requerida estabilidad.

La investigación realizada sobre los constituyentes del pelitre (las denominadas *piretrinas*, en general) en el transcurso de los últimos veinte años ha conducido al desarrollo de una serie de nuevos productos, a los que se ha denominado de forma genérica *piretroides*.

Las características más favorables de estos compuestos son las de ser fácilmente degradables en el suelo y no presentar efectos tóxicos notables sobre la

salud humana. En general son moléculas bastante estables en la atmósfera y a la exposición solar (Pramauro, 1990). En la Figura 9 se recoge la estructura química del acrinatrin.

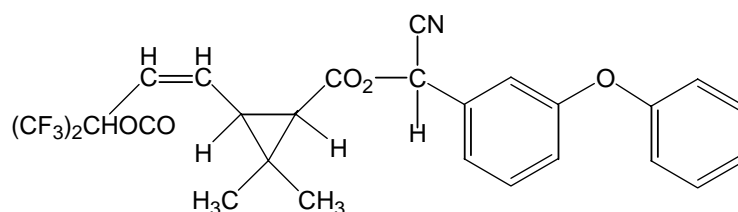
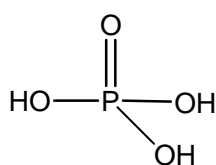


Figura 9. Estructura química del acrinatrin (piretroide sintético).

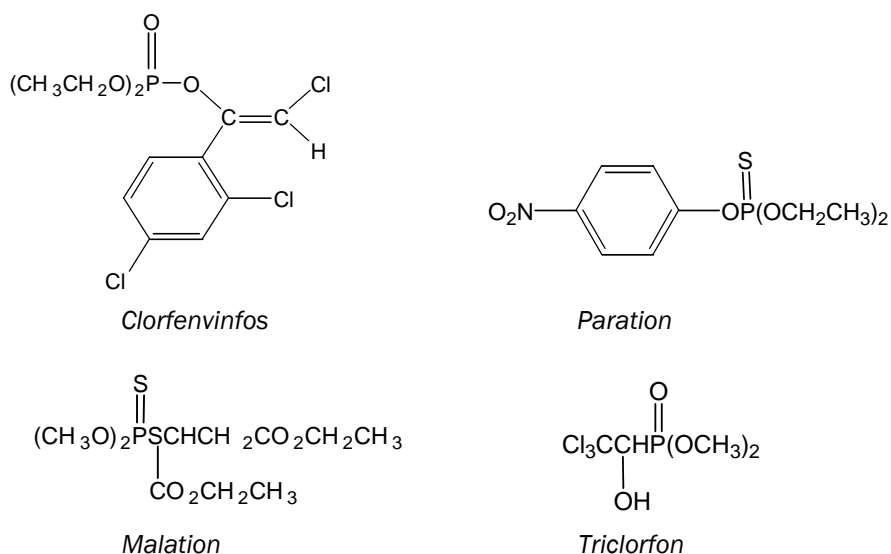
#### 2.2.4. Insecticidas organofosforados

Los derivados fosforados ocupan hoy en día un lugar preponderante entre los plaguicidas más conocidos y utilizados, ya que constituyen un grupo con una elevada eficacia insecticida. Su actividad fue descubierta por el químico alemán Gerhard Schrader durante la segunda Guerra Mundial. Junto a su toxicidad para los mamíferos pronto se descubrió su actividad como insecticidas.

Los pesticidas organofosforados pueden considerarse como derivados del ácido fosfórico, expresado por su fórmula desarrollada:



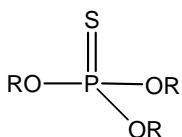
Según se reemplacen los distintos sustituyentes, se van construyendo los distintos tipos de insecticidas organofosforados, que son: *ortofosfatos*, *tiofosfatos*, *tiolfosfatos*, *ditiofosfatos*, *fosfonatos* y *pirofosforamidas*. En la Figura 10 se muestran las estructuras químicas de insecticidas organofosforados pertenecientes a algunas de las familias anteriormente mencionadas.



**Figura 10.** Estructura química de los insecticidas clorfenvinfos (ortofosfato), paration (tiofosfato), malation (ditiofosfato) y triclorfon (fosfonato).

Este grupo de insecticidas está constituido por compuestos solubles en agua, en general, y fácilmente hidrolizables, por lo que presentan una baja persistencia en el medio ambiente, normalmente no superior a unas semanas. Debido a ello, se utilizan bastante a menudo para combatir insectos adultos, parásitos de plantas y animales, y en parte para tratamientos preliminares de semillas y de terrenos antes de la siembra (Metcalf, 1971, Pramauro, 1990 y Primo Yúfera y Carrasco Dorrién, 1990).

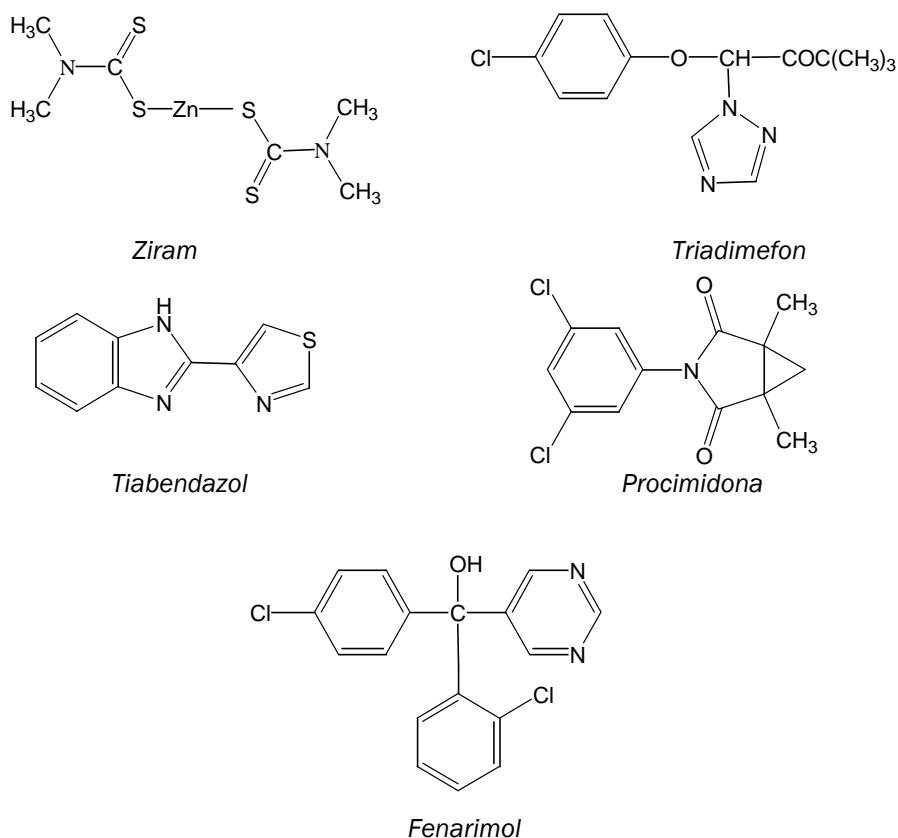
Los tiofosfatos constituyen un grupo importante en esta familia, presentando la siguiente estructura química:



La presencia de un átomo de azufre ligado al fósforo (en lugar del oxígeno) confiere a estas moléculas una mayor estabilidad química, por lo que se hidrolizan mucho menos y pueden ser utilizados en medio acuoso.

## 2.3. FUNGICIDAS

Los fungicidas se utilizan extensamente en el control de enfermedades producidas por hongos en semillas, plantas y frutos. Se aplican tanto en el campo como para la protección durante el almacenamiento, el transporte y la comercialización. Los fungicidas se pueden clasificar en dos grandes grupos: inorgánicos y orgánicos. Los primeros son, principalmente, el azufre, los polisulfuros y algunas sales de cobre. Los fungicidas orgánicos se empezaron a desarrollar en 1934, siendo en general, más efectivos y menos nocivos que los inorgánicos. Los fungicidas orgánicos presentan unas estructuras químicas muy heterogéneas. Entre estos compuestos se encuentran los tiocarbamatos, los azoles, los benzimidazoles y las dicarboximidias aunque existen más clases de fungicidas. En la Figura 11 se muestran las estructuras químicas de algunos representantes de estas clases de fungicidas.



**Figura 11.** Estructura química de los fungicidas ziram (tiocarbamato), triadimefon (azol), tiabendazol (benzimidazol), procimidona (dicarboximida) y fenarimol (pirimidinil carbinol).

Los mecanismos de acción de los fungicidas son muy diversos. Los fungicidas selectivos deben actuar sobre los sistemas enzimáticos del hongo patógeno y no sobre los de las plantas huésped. Hay fungicidas que inhiben los procesos enzimáticos relacionados con el metabolismo energético o las enzimas pépticas del hongo, mientras otro tipo de fungicidas, como es el caso de los benzimidazoles, inhiben la síntesis de ácidos nucleicos.

## **2.4. OTROS PESTICIDAS**

Además de los pesticidas que se acaban de describir para controlar insectos, hongos y malas hierbas, existe una gran diversidad de compuestos para hacer frente a otras plagas como son los ácaros y los roedores, entre otros.

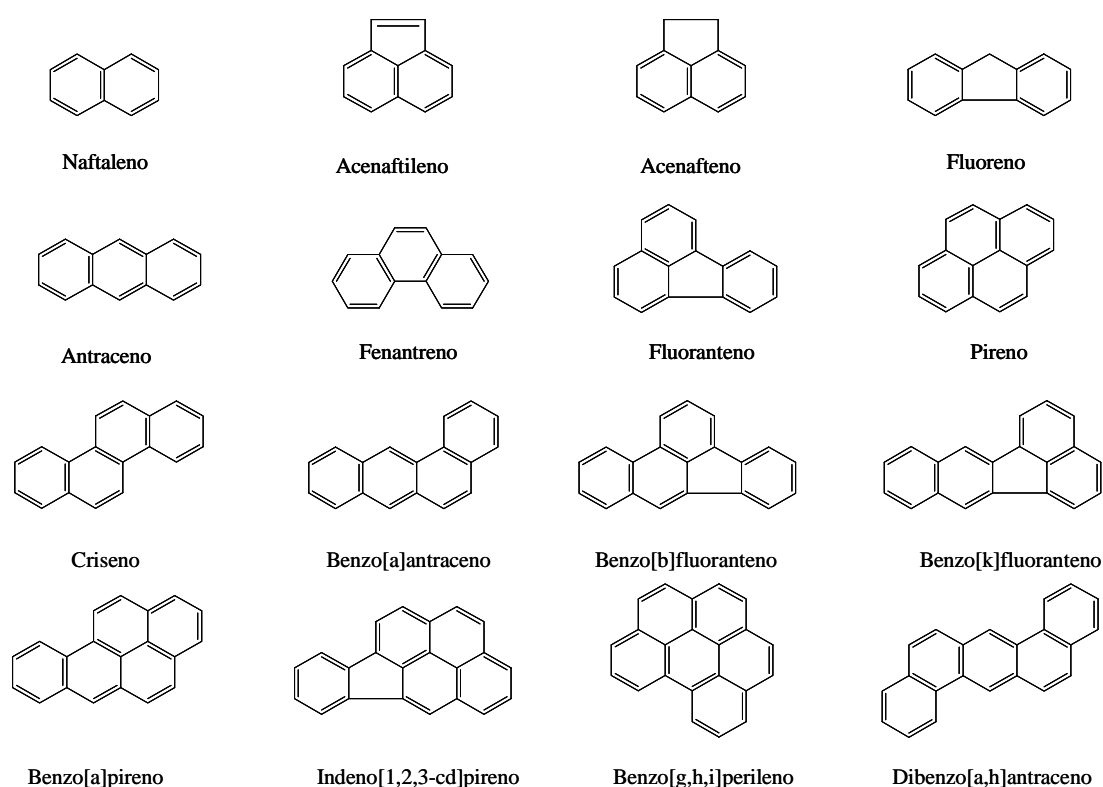
Los acaricidas se pueden dividir en dos grandes grupos, aquellos que tienen además, acción sobre insectos como ocurre con algunos compuestos organofosforados y los carbamatos, o los que actúan exclusivamente como acaricidas.

Los rodenticidas son otro tipo de pesticidas que se han usado para combatir ratas y roedores en general. Por lo general estos compuestos actúan como productos antivitamina K, inhibiendo la producción de la protrombina y la trombina y por tanto son anticoagulantes. Como rodenticidas se emplean actualmente los derivados de la cumarina, como son la warfarina y la bromodiolona, o derivados de la indandiona, como la clorofacinona.

## **3. OTROS CONTAMINANTES ORGÁNICOS**

Como se ha indicado anteriormente, además de los pesticidas existen otros contaminantes orgánicos que se detectan frecuentemente en el medioambiente y los alimentos.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) son un grupo de compuestos orgánicos que contienen dos o más anillos aromáticos fusionados. En la Figura 12 se muestran las estructuras químicas de los 16 PAHs que la US-EPA (Agencia para la protección del Medio Ambiente de los Estados Unidos) incluyó en su lista de contaminantes prioritarios. Por lo general, estos compuestos se forman por la combustión incompleta de materiales orgánicos a través de procesos naturales o antropogénicos tales como los incendios forestales, las calefacciones, los vehículos, las incineradoras, la producción de alquitrán y asfalto, así como algunas técnicas utilizadas en el procesamiento de alimentos como el ahumado o el tostado, e incluso en algunos métodos empleados para el cocinado de los alimentos. Debido a la existencia de una gran variedad de fuentes de estos compuestos, los PAHs han sido detectados en todos los compartimentos medioambientales así como en los alimentos. Muchos de estos compuestos despiertan la preocupación en la salud pública ya que son conocidos su posible carácter carcinogénico y mutagénico.



**Figura 12.** Estructura química de los hidrocarburos policíclicos aromáticos objeto de estudio en la parte experimental

La mayoría de los PAHs no tienen un uso comercial aunque algunos, como el naftaleno, el antraceno y el fenantreno, se emplean como materias primas en la fabricación de tintes, celuloide, lubricantes, plásticos e insecticidas. Las cantidades usadas en la industria son pequeñas por lo que se considera que la fuente de la mayoría de residuos de PAHs detectados en el medio ambiente es la combustión incompleta de materia orgánica.

Entre las distintas rutas de la exposición humana a los PAHs, los alimentos son una de las principales vías de exposición a estos compuestos. De acuerdo con Menzie y col. (1992), se ha estimado que la ingesta diaria de PAHs carcinogénicos está alrededor de los 3  $\mu\text{g}/\text{día}$  que es unas veinte veces mayor que la exposición por la vía inhalatoria (0,13  $\mu\text{g}/\text{día}$ ) y quinientas veces mayor que a través del agua (0,006  $\mu\text{g}/\text{día}$ ). Por consiguiente, es muy importante desarrollar métodos analíticos sencillos y precisos que permitan detectar estos compuestos.

Los PAHs son compuestos apolares muy hidrofóbicos, es decir, presentan una alta solubilidad en disolventes orgánicos y son muy poco solubles en agua. La aparición de residuos de PAHs en los alimentos está muy influenciada por estas características físico-químicas. Así, estos compuestos no tienden a acumularse en alimentos con un alto contenido acuoso. En el caso de hortalizas con una gran superficie foliar, como es el caso de la espinaca y la lechuga, la presencia de PAHs se debe a la deposición de partículas transportadas por el aire, siendo su concentración mayor en la superficie de la planta que en los tejidos internos (Tamakawa, 2004). Los tratamientos térmicos de los alimentos, como es la fritura o el asado, o procesos como el ahumado y el desecado son las principales fuentes de contaminación por PAHs en los alimentos (Wang y col., 1999, Mottier y col., 2000 y Stumpe-Vīksna y col. 2008). Los aceites vegetales y las grasas son otra fuente importante de estos compuestos en la dieta debido al secado de las semillas empleando gases de combustión (Moret y Conte, 2002).

El Comité científico de la alimentación humana (CCAH) dictaminó en el 2002 que algunos PAHs son cancerígenos genotóxicos. El benzo(a)pireno (BaP) puede utilizarse como marcador de la presencia y efecto de los PAHs cancerígenos en los

alimentos. A fin de proteger la salud pública la Unión Europea (UE), en el Reglamento (CE) N° 208/2005 de la Comisión, ha fijado niveles máximos de BaP para ciertos alimentos como aceites y grasas destinados al consumo humano (2 µg/kg peso fresco), carnes y pescados (2-10 µg/kg peso fresco) y en productos alimenticios destinados a lactantes y niños de corta edad (1 µg/kg peso fresco)

Las policlorodibenzo-*p*-dioxinas (PCDD ) y los policlorodibenzofuranos (PCDF) se forman siempre que se da una combustión de materia orgánica clorada o en presencia de cloro; por ejemplo, son productos que se pueden formar en incineradoras de residuos domésticos e industriales. Una fuente significativa de estos compuestos son los polímeros de cloruro de polivinilo (PVC) obtenidos por la polimerización de monómeros de cloruro de vinilo. Este tipo de compuestos es objeto de análisis desde hace mucho tiempo, dada la posibilidad de que los residuos de cloruro de vinilo (cancerígeno reconocido) pudiesen migrar a los alimentos. Su utilización se ha prohibido en múltiples países debido a los problemas derivados de la liberación potencial de los monómeros, así como de la producción de PCDD y PCDF que se da cuando se incineran.

Los policlorobifenilos (PCBs) son sustancias que se han empleado como aislantes líquidos en los equipos eléctricos, como fluidos hidráulicos, y como aditivos en plásticos. Durante décadas, la estabilidad extrema, la baja inflamabilidad y la baja conductividad de los PCBs les hicieron el aislante líquido normal en los transformadores, y dado que éstos son un componente esencial de las redes de distribución de electricidad, la contaminación por PCBs es omnipresente. En los países industrializados, se fabricaron PCBs entre los años veinte y finales de los setenta, y todavía se usan en muchos países en desarrollo.

Los contaminantes orgánicos emergentes son aquellos previamente desconocidos o no reconocidos como tales, cuya presencia en el medio ambiente no es necesariamente nueva pero sí la preocupación por las posibles consecuencias de la misma. El estudio de estos compuestos se ha convertido en una línea prioritaria de investigación para la OMS, la EPA y la UE. Debido a la alta producción y consumo, en general, de estos productos hay una continua

introducción de éstos en el medio ambiente por lo que no necesitan tener una persistencia elevada para ocasionar efectos negativos.

Dentro de este tipo de contaminantes hay grupos de compuestos muy distintos como es el caso de los retardantes de llama, entre los que se encuentran los polibromodifeniléteres (PBDEs), los productos farmacéuticos, como son los antibióticos y los analgésicos, y los productos para el cuidado personal, que engloban a las fragancias (almizcles sintéticos), los agentes para la protección solar, los repelentes de insectos y los antisépticos.

#### **4. DISTRIBUCIÓN Y PERSISTENCIA DE LOS PESTICIDAS EN LOS ALIMENTOS**

La lucha química contra las plagas, las enfermedades y las malas hierbas de los cultivos ha conseguido obtener buenos rendimientos de las cosechas, fundamentalmente mediante la aplicación de los pesticidas orgánicos de síntesis, por lo que su empleo en la actualidad está generalizado.

La continua necesidad de producir más alimentos, junto con la disminución de determinadas prácticas culturales que requieren una gran cantidad de mano de obra, ha hecho aumentar su demanda, por lo que la utilización de los pesticidas agrícolas, entendidos como agentes químicos para proteger los cultivos, es en el momento actual importante y necesaria. Sin esta defensa es indudable que se produciría una disminución drástica de los rendimientos. La FAO ha calculado que, en EE.UU., se reduciría el rendimiento de las cosechas y del ganado en un 30-40 % y aumentaría el precio de los productos agrícolas en un 50-70 % (Green, 1984).

No obstante, el uso de pesticidas no está exento de riesgos, ya que estos compuestos se seleccionan por su toxicidad frente a determinados organismos y, al existir cierta homogeneidad entre las diferentes formas de vida, pueden ser tóxicos

para organismos no-diana y también para los seres humanos si llegaran a estar expuestos a dichos productos.

El uso frecuente de los pesticidas, que se lleva a cabo en la actualidad, produce inevitablemente la contaminación del medio ambiente y de las cosechas a las que se aplica. La movilidad de los pesticidas a través del aire o del agua y su acumulación o transformación en el medio donde se aplican ha provocado que se alcancen, en ciertos casos, niveles elevados en alimentos y en el agua, principales vías de llegada al consumidor. Además, en general, estos compuestos son lipófilos y no se metabolizan rápidamente por lo que se acumulan en el organismo, lo cual facilita el fenómeno de biomagnificación, bioacumulación producida a través de la cadena trófica (Briggs, 1981, Jury y col., 1987 y Spear, 1991). Todos estos riesgos deben ser evaluados antes de poder autorizar el uso de un determinado pesticida en un cultivo.

Evaluar el impacto de un pesticida en la cadena alimenticia es un proceso complejo ya que un herbicida, en teoría aplicado sólo a un cultivo, puede acabar en función de su persistencia en distintos compartimentos ambientales como el agua, y de ahí pasar a la distribución de agua corriente y afectar a diferentes organismos, como a los insectos, a las abejas productoras de miel, al ganado y a otros cultivos.

Estos hechos han desencadenado una preocupación social que está originando el uso de menores dosis de aplicación y la utilización de sustancias menos tóxicas, menos persistentes y más compatibles con el medio ambiente. La demanda de la sociedad de una mayor seguridad en el uso de los productos fitosanitarios requiere el desarrollo y mejora de la metodología analítica para garantizar la detección de estos compuestos, a niveles muy bajos, en las distintas matrices ambientales y alimentarias.

En muchos países existe legislación para controlar los límites máximos de residuos (LMRs) de pesticidas en alimentos para los seres humanos y los animales. En el caso de países donde no existe una normativa que regule estos niveles, se emplean los valores establecidos por la Comisión Codex Alimentarius. El Codex

Alimentarius (o Código Alimentario) es un programa mixto de FAO/OMS, que tiene por objeto proteger la salud de los consumidores, garantizar prácticas equitativas en el comercio de alimentos y promover la coordinación del conjunto de trabajos sobre normas alimentarias emprendidos por organizaciones gubernamentales e internacionales.

En la UE, el 16 de marzo de 2005, fue publicado el Reglamento 396/2005 que pretende la armonización a nivel comunitario de los LMR aplicables en alimentos y piensos de origen vegetal y animal. Un aspecto novedoso de este reglamento es que se establece un LMR por defecto de 0,01 mg/kg para los productos que no tengan fijado un LMR específico. Otra novedad es la inclusión de la miel y las infusiones, no contempladas anteriormente, en la lista de productos y partes de productos que van a usarse como alimentos o piensos.

El LMR se fija para un pesticida y en un determinado alimento y se expresa en mg de sustancia por kg de alimento. El cálculo de los LMR se basa en el NOEL (Nivel sin Efecto Observable) que se determina a partir de estudios toxicológicos sobre animales de experimentación. Se le suministra una misma sustancia en un determinado nivel de concentración durante un periodo muy prolongado y se estima la concentración máxima administrada sin que se presenten efectos observables sobre el funcionamiento de sus actividades biológicas. Luego, para extrapolarlo al ser humano, se aplican factores de seguridad sobre el NOEL y se obtiene el parámetro IDA (Ingesta Diaria Admisible) que es la cantidad de sustancia que se puede ingerir diariamente durante toda la vida sin manifestar efectos tóxicos. Además de este parámetro, los toxicólogos establecen para pesticidas que pueden causar efectos agudos, la dosis de referencia aguda (ArfD, *acute reference dose*) que es una estimación de la cantidad de pesticida en los alimentos que se puede ingerir en un periodo de 24 horas o menos sin que se aprecien riesgos en la salud del consumidor.

Los LMR se establecen para residuos en la materia prima completa. Así, en los programas de vigilancia de seguridad alimentaria se determinan los residuos de pesticidas en los alimentos frescos. Aun así, en la UE se llevan a cabo estudios para

evaluar los niveles de residuos de pesticidas en alimentos transformados. Por lo general, el número de muestras de alimentos transformados en los que se detectan residuos de pesticidas es mucho menor que de alimentos frescos. Una explicación a este fenómeno, es que la manipulación de los alimentos ya sea por lavado, pelado o cocinado reduce los niveles de pesticidas (Granby y col., 2008).

Los estudios de dieta total son uno de los métodos más viables para evaluar la exposición a los contaminantes y otras sustancias químicas, así como la valoración nutricional de la dieta. Para realizarlos es preciso conocer tanto el “consumo real” de alimentos como los datos de su composición nutricional y concentraciones de los contaminantes y otras sustancias químicas que pueden estar presentes en los mismos, tal y como se consumen.

La dieta alimenticia es muy variable según el grupo de población estudiado y las costumbres del país donde habita. Un grupo de población que ha recibido un interés creciente en los últimos años en los países desarrollados es la población infantil, debido a que, por una parte, los niños no han completado aún su desarrollo y por lo tanto sus mecanismos de defensa no están completamente desarrollados y, por otra, a que su exposición a los productos químicos por unidad de peso corporal es mayor.

En el presente trabajo se ha estudiado la determinación de pesticidas en zumos de frutas y en la miel por ocupar un lugar destacado en la alimentación infantil. Además, en estos productos por ser alimentos considerados naturales y saludables, debe cuidarse especialmente que estén libres de contaminantes.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

Barberá, C. Pesticidas Agrícolas. Cuarta edición revisada y ampliada. Ed. Omega, S.A. (1989).

Briggs, G.G. Theoretical and experimental relationships between soils adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. *J. Agric. Food Chem.* 29, 1050 (1981).

Granby, K., Petersen, A., Hermann, S.S. y Poulse, M.E. "Levels of pesticides in food and food safety aspects" en *Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples*. Editado por J.L. Tadeo. CRC Press, (2008).

Green, M.B. Los plaguicidas: ¿Beneficiosos o perjudiciales? Ed. Academia León. (1984).

Jury, W.A., Focht, D.D., y Farmer, W.J. Evaluation of pesticide groundwater pollution potential from standard indexes of soil-chemical adsorption and biodegradation. *J. Environ. Qual.* 16, 422 (1987).

Menzie, C.A., Potocki, B.B., y Santodonato, J. Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environ. Sci. Technol.* 26, 1278 (1992).

Metcalf, R.L. *Chemistry and Biology of Pesticides*. En: White-Stevens, R. Pesticides in the Environment. Vol. I, Part I. (In Two Parts). Marcel Dekker, Inc., New York. (1971).

Moret, S. y Conte, L.S. A rapid method for polycyclic aromatic hydrocarbon determination in vegetable oils. *J. Sep. Sci.* 25, 96 (2002).

Mottier, P., Parisod, V. y Turesky, R.J. Quantitative determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in barbecued meat sausages by gas chromatography coupled to mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 1160 (2000).

Pramauro, E. Los pesticidas y el Medio Ambiente. Servei Publicacions. *Universitat de València*. (1990).

Primo Yúfera, E. y Carrasco Dorrién, J.M. Química Agrícola II. Plaguicidas y Fitorreguladores. *Ed. Alhambra*. (1990).

Spear, R. Recognized and possible exposure to pesticides. En: Hayes, W.J. (Jr.) y Laws, E.R. (Jr.). *Handbook of Pesticide Toxicology*. Vol. 1. Academic Press, Inc. (1991).

Stumpe-Vīksna, I., Bartkevics, V., Kukare, A. y Morozovs A. Polycyclic aromatic hydrocarbons in meat smoked with different types of wood. *Food Chem.*, 110, 794 (2008).

Tamakawa, K. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) en *Pesticide, veterinary and other residues in food*. Editado por D.H. Watson. *Woodhead Publishing Limited*. (2004).

Wang, G., Lee, A.S., Lewis, M., Kamath, B. y Archer, R.K. Accelerated solvent extraction and gas chromatography/mass spectrometry for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food samples. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1062 (1999).

## **B. MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN ALIMENTOS**

---

## 1. INTRODUCCIÓN

Uno de los medios más comunes para proteger los productos agrícolas de los efectos de los organismos nocivos consiste en el uso de pesticidas. Sin embargo, su uso puede tener como consecuencia la presencia de residuos en los productos tratados, en los animales alimentados con dichos productos y en los alimentos producidos por los animales o expuestos a dichas sustancias, como por ejemplo la miel. Con el fin de proteger la salud pública de los consumidores es necesario velar para que tales residuos no estén presentes en niveles que supongan un riesgo inaceptable para los seres humanos y los animales. Los LMR deben establecerse en el nivel más bajo que pueda alcanzarse según las buenas prácticas agrícolas para cada pesticida con vistas a proteger a grupos vulnerables como los niños. A medida que se van conociendo los efectos acumulativos y sinérgicos de estos compuestos sobre la salud humana, se van revisando los LMR para reducir el riesgo de los consumidores.

El análisis de residuos y contaminantes en los alimentos supone la determinación de sustancias que se encuentran en cantidades muy pequeñas (del orden de  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) en matrices muy complejas. Es preciso por tanto realizar en primer lugar una extracción cuantitativa de la sustancia y posteriormente purificar y/o concentrar el extracto obtenido antes de proceder a su detección y cuantificación.

A la hora de desarrollar un método analítico, que comprenda el conjunto sucesivo de las fases indicadas de extracción, purificación y determinación, es preciso considerar todos aquellos factores que pueden influir en la validez del resultado.

En el caso del análisis de alimentos, los métodos clásicos para preparar las muestras son laboriosos, suponen un gasto de grandes cantidades de disolventes, y suelen necesitar varias etapas de purificación antes de la determinación. Los métodos modernos de preparación de muestras se han desarrollado para superar

estos inconvenientes, permitiendo el análisis de un mayor número de muestras, aspecto muy importante en la vigilancia de la seguridad alimentaria.

## 2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

La extracción es la primera etapa de la preparación de la muestra, una vez conseguida ésta de manera homogénea y representativa. El objetivo de esta etapa del método analítico es aislar el analito de la matriz de la forma más completa posible evitando la presencia de interferencias. Por tanto, hay que evaluar la naturaleza no sólo del analito sino también de la matriz, para que esta etapa sea lo más eficiente posible.

A continuación, se describen las técnicas empleadas para extraer pesticidas de muestras de alimentos tanto de origen vegetal como de origen animal.

### 2.1. MÉTODOS CLÁSICOS

Los métodos convencionales para extraer pesticidas de los alimentos se han basado principalmente en el uso de disolventes orgánicos. La extracción líquido-líquido (LLE, *liquid-liquid extraction*) se basa en el reparto del analito entre dos líquidos inmiscibles. La eficiencia del proceso depende de varios factores como son la afinidad del analito por el disolvente y el número de extracciones sucesivas que se lleven a cabo. El uso de mezclas de disolventes, la adición de sales o el cambio del pH pueden mejorar el rendimiento de la extracción.

En el caso de la miel, debido a su elevada viscosidad, la muestra se diluye previamente en agua o mezclas de agua y un disolvente miscible como la acetona o el metanol para luego extraerlos con distintos disolventes inmiscibles con el agua o mezclas de ellos de acuerdo con la polaridad de los pesticidas. Esta técnica se ha empleado utilizando hexano como disolvente en la determinación de clorpirifos en zumo de manzana (Bolles y col., 1999) y en la determinación de fenitrotion en mosto y vino (Dagher y col, 1999) con buenos resultados.

En el caso de muestras sólidas se lleva a cabo la extracción sólido-líquido en la que los analitos se transfieren desde la matriz al disolvente seleccionado. La eficiencia de la extracción depende de tres factores relacionados entre sí como son la solubilidad, la transferencia de masa y el efecto de la matriz. La solubilidad de un analito depende del tipo de disolvente y está influenciada por la temperatura y la presión. Por otro lado, la transferencia de masa depende del coeficiente de difusión y el tamaño de partícula de la matriz y se ve favorecida por el uso de disolventes de baja viscosidad, la agitación, temperatura y presión elevadas y un tamaño de partícula pequeño.

La extracción sólido-líquido se puede realizar de distintas formas dependiendo de la fortaleza de las interacciones entre los analitos y la matriz. La extracción con agitación, la extracción Soxhlet y la extracción asistida por ultrasonidos son los procedimientos de extracción sólido-líquido más utilizados para la determinación de pesticidas en alimentos.

La extracción con agitación se lleva a cabo sumergiendo la muestra en un disolvente orgánico y agitando la mezcla para se produzca la transferencia del analito de la matriz al disolvente para a continuación filtrar o centrifugar la solución. El proceso se repite dos o más veces, combinando los extractos obtenidos al final. Este método es adecuado cuando el analito es muy soluble en el disolvente y la muestra es bastante porosa.

En el caso de analitos fuertemente retenidos en la matriz, es necesario someter a la muestra a una temperatura elevada (extracción Soxhlet) o a la radiación ultrasónica para mejorar la cinética del proceso extractivo. La extracción Soxhlet ha sido el método más utilizado para aislar analitos de una volatilidad baja o media y térmicamente estable de una muestra hasta el desarrollo de las nuevas técnicas de extracción, aunque se sigue usando ya que es un método oficial. Es muy común el análisis de alimentos empleando esta técnica porque no requiere una posterior filtración, la temperatura a la que se realiza la extracción es mayor que la temperatura ambiente y la muestra entra en contacto con disolvente limpio

repetidamente por lo que se favorece la transferencia y la solubilidad de los analitos.

Finalmente, la extracción asistida por radiación de ultrasonidos o sonicación, utiliza las vibraciones ultrasónicas para asegurar el contacto íntimo entre la muestra y el disolvente. La sonicación permite extraer pesticidas termolábiles ya que se lleva a cabo a temperatura ambiente y es rápida sin embargo la eficiencia de la extracción no es tan elevada como en otras técnicas extractivas y puede llevar a la degradación de algunos compuestos.

En la Tabla 1 se muestran algunos métodos para la determinación de pesticidas en alimentos basados en técnicas clásicas, descritos anteriormente, que se siguen utilizando en la actualidad.

**Tabla 1.** *Métodos para la determinación de pesticidas en alimentos usando técnicas clásicas*

Alimento	Compuesto	Disolvente	Técnica	Referencia
Miel	Organoclorados	Eter-AcEt <sup>a</sup> (8:2)	LLE	Tahboub, 2006
Miel	Fluvalinato, malation y coumafos	Diclorometano	LLE	Menkissoglu, 2000
Miel	Simazina y atrazina	Benceno-H <sub>2</sub> O (1:1)	Ultrasonidos	Rezic, 2005
Frutas y hortalizas	Multiclase	Metanol	Ultrasonidos	Ferrer, 2005
Carne	Organoclorados y organofosforados	AcEt <sup>a</sup>	Soxhlet	Garrido Frenich, 2006
Legumbres	Fenitrotion	Diclorometano	Soxhlet	Diagne, 2002

---

<sup>a</sup> AcEt: Acetato de etilo

Estos métodos clásicos son fáciles de utilizar y no requieren un equipamiento especial. Sin embargo, tienen varias desventajas debido al uso de grandes cantidades de material de vidrio y de elevados volúmenes de disolventes orgánicos tóxicos. Por otra parte, el material de vidrio empleado tiene que estar

libre de residuos de plaguicidas, por lo que es necesario utilizar reactivos de limpieza altamente oxidantes, lo cual a su vez puede causar la contaminación del medio ambiente. Además, los extractos orgánicos obtenidos tienen que ser concentrados y sometidos a procesos de purificación con el fin de obtener los bajos límites de detección requeridos. Todos estos hechos hacen que los métodos clásicos sean laboriosos y difíciles de automatizar.

Existe un gran interés en el desarrollo de nuevas técnicas de extracción para la preparación de las muestras y su posterior análisis que sean limpias, rápidas, selectivas, y cuya automatización sea posible. A continuación se describen estas nuevas técnicas de extracción utilizadas en la preparación de muestras para el análisis de residuos de pesticidas.

## 2.2. EXTRACCIÓN CON LÍQUIDOS PRESURIZADOS

La técnica conocida como extracción con líquidos presurizados (PLE, *pressurized liquid extraction*) o por su nombre comercial como extracción acelerada con disolventes (ASE, *accelerated solvent extraction*) se emplea desde 1995 y consiste en la extracción de los analitos con un disolvente en caliente y presurizado. Las temperaturas elevadas permiten acelerar la cinética del proceso extractivo mientras que las altas presiones evitan que el disolvente alcance su punto de ebullición, lo que permite una rápida y segura extracción de los analitos de interés. La muestra se coloca en un recipiente que se sella, se llena de disolvente y se calienta, lo que provoca un aumento de la presión en la celda. Al final de la extracción, el extracto se expulsa de la celda con nitrógeno y se transfiere automáticamente a un vial. Esta técnica permite el uso de disolventes de distinta polaridad y utiliza un intervalo de presiones de 5 a 200 atmósferas, a fin de mantener el disolvente en estado líquido a temperaturas de hasta 200 °C, empleadas para acelerar dicho proceso de extracción (Ahmed, 2001). Con esta técnica se consigue un menor consumo de disolventes, que puede llegar a ser un 95 % menor que el empleado en otros métodos de extracción. Además del analito

hay que tener en cuenta las propiedades físicas de la muestra ya que tienen una gran influencia en la extracción.

Por lo general, la muestra debe estar triturada y tener el menor contenido de agua posible. Cuanto menor sea el tamaño de partícula, mayor será la superficie de contacto con el disolvente de extracción. Por otro lado, la presencia de humedad puede restar efectividad al proceso extractivo sobre todo en el caso de disolventes inmiscibles con el agua. Por este motivo, se suele añadir al disolvente un agente desecante, como el sulfato sódico o magnésico anhidro, para absorber el agua.

La PLE se ha empleado para aislar contaminantes en alimentos con un alto contenido lipídico, como es el caso de los pesticidas organoclorados en hígado de bacalao y filetes de pescado (Weichbrodt y col., 2000), aunque también se ha usado esta técnica en el análisis de pesticidas en frutas y hortalizas (Wenrich y col., 2001, Richter y col., 2001 y Adou y col., 2001), debido a la rapidez y automatización de la extracción, pero requiere la adquisición de un equipo de elevado coste.

### **2.3. EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS**

La extracción con fluidos supercríticos (SFE, *supercritical fluid extraction*) es una técnica que se empezó a desarrollar en la década de los 80 y que se ha sido muy empleada en la industria agroalimentaria para la obtención de aromas y sabores de especias y hierbas aromáticas, de café y té sin cafeína, de bebidas sin alcohol, de productos animales sin colesterol y de aceites de semillas. También se ha empleado en el análisis de pesticidas, aunque en menor proporción. Los fluidos supercríticos tienen densidades similares a las de los líquidos pero con coeficientes de difusión mayores y viscosidades más bajas, similares a la de los gases, por lo que la extracción es más rápida que con líquidos orgánicos (Ahmed, 2001). El poder disolvente de un fluido supercrítico puede modificarse por los cambios de la presión y, en menor proporción, por la temperatura. Por el contrario, el poder disolvente de un líquido orgánico es prácticamente constante e independiente de las condiciones. El dióxido de carbono ha sido el fluido de elección en la mayoría de

los estudios ya que es un disolvente adecuado para analitos no polares. Para compuestos más polares es necesaria la introducción de modificadores, como el metanol o el agua, para aumentar la polaridad del CO<sub>2</sub> y mejorar la extracción de estos compuestos.

En la extracción con fluidos supercríticos, las muestras se colocan en una celda de extracción y se bombea el fluido correspondiente hasta alcanzar la presión y la temperatura deseadas (mayores que su punto crítico). Después de la extracción, el fluido se despresuriza y se recoge el extracto limpio en una trampa adsorbente o en un disolvente para su análisis. Las muestras deben ser previamente desecadas, para evitar la posible obstrucción de la válvula restrictora por la formación de hielo, lo que se puede llevar a cabo mediante la liofilización de las muestras o bien añadiendo un agente desecante. Lehotay y Garcia-Valverde (1997) emplearon el sulfato magnésico mezclado con Hydromatrix con muy buenos resultados para más de cincuenta pesticidas de distintos tipos, aunque también se han utilizado otros agentes desecantes como el sulfato sódico anhidro y la Celita en la determinación de pesticidas polares en manzanas (Stefani y col, 1997).

La técnica SFE presenta una serie de ventajas entre ellas la posibilidad de obtener extractos concentrados y puros al vaporizarse el fluido supercrítico a presión atmosférica.

La SFE se ha utilizado para la determinación de pesticidas y otros contaminantes orgánicos en frutas y hortalizas (Kaihara y col., 2000 y Lehotay y Eller, 1995) pero también se ha empleado en alimentos de origen animal como la miel (Atienza y col., 1993), los huevos (Fiddler y col., 1999) y la carne (Argauer y col., 1995). Sin embargo, esta técnica no es tan utilizada como otras por el número de variables a optimizar y por carecer de un método universal que funcione con todos los analitos y matrices. En el 2004, Zougagh y colaboradores publicaron una revisión crítica sobre la escasa implementación de la SFE en los laboratorios de análisis de rutina y concluyeron que las causas eran entre otras: la falta de métodos de extracción universal, la dificultad para extraer analitos polares y la

ineficiencia de la purificación, pero a su vez los autores proponen formas de superar las limitaciones de la técnica indicando el potencial de la SFE.

#### 2.4. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS

En los últimos años la extracción asistida por microondas (MAE, *microwave assisted extraction*) ha aparecido como una clara alternativa a la extracción Soxhlet ya que permite un calentamiento más rápido y eficiente de la muestra. La muestra se extrae aplicando energía de microondas en un disolvente adecuado. Este tipo de radiación permite el calentamiento selectivo de la muestra según el disolvente utilizado. Esta técnica de extracción depende de la matriz y limita los disolventes que se pueden emplear, ya que conviene que éstos no sean transparentes a la radiación de microondas y que tengan un elevado momento dipolar, sin olvidar la solubilidad de los analitos en los mismos. En general, cuanto mayor sea el momento dipolar del disolvente, mayor será su capacidad de extracción. Así, el hexano, cuyo momento dipolar es prácticamente nulo, es transparente a la radiación de microondas y apenas se calienta cuando se usa dicha radiación. En cambio, la acetona tiene un momento dipolar más alto y se calentará en pocos segundos, aunque algunos compuestos orgánicos presentan una mejor solubilidad en hexano. Por este motivo, la mayoría de los métodos desarrollados para la MAE emplean mezclas de hexano y acetona como disolvente extractante. Aun así, el agua se ha usado en extracción por MAE de triazinas en suelos siendo tan eficiente como los disolventes orgánicos pero más barata, segura y ecológica que éstos (Shen, G., y Lee H.K, 2003).

Las muestras junto con el disolvente de extracción se irradian con las microondas durante cortos periodos de tiempo y como consecuencia se produce un aumento de la temperatura que favorece la transferencia de los compuestos retenidos en la matriz al disolvente. Esta técnica extractiva es rápida, ya que los tiempos de irradiación son muy cortos y, además, se pueden extraer varias muestras simultáneamente. Sin embargo, presenta algunos inconvenientes tales como la dificultad de ser automatizada o acoplada a las técnicas de análisis, así

como la necesidad de centrifugar o filtrar la muestra después del proceso de extracción.

Los parámetros a tener en cuenta a la hora de optimizar un método basado en la extracción MAE son la composición del agente extractante y su volumen, la temperatura y el tiempo de extracción, así como la naturaleza de la matriz. La temperatura juega un papel muy importante en el proceso, ya que un aumento de la temperatura se refleja en una mayor capacidad del disolvente para solubilizar los analitos, pero hay que tener cuidado con la posible degradación de los mismos.

La extracción de pesticidas en frutas y hortalizas basada en la MAE ha dado buenos resultados. Así, por ejemplo, empleando acetona-hexano (1:1) se han podido determinar pesticidas organoclorados y organofosforados en legumbres (Diagne y col., 2002), en naranjas (Bouaid y col., 2000) y vegetales (Barriada-Pereira y col., 2005). En el caso del fungicida carbendazima, éste se ha determinado en vegetales usando acetona en la extracción (Singh y col., 2004 y 2007). Por otro lado, se ha empleado acetonitrilo-agua (95:5) para determinar dieciséis pesticidas organoclorados en semillas de sésamo con recuperaciones superiores al 80% (Papadakis y col., 2006).

## 2.5. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

Los pesticidas son, en general, compuestos de baja polaridad que frecuentemente tienen que ser extraídos de una matriz acuosa o con un alto contenido en agua. En la extracción en fase sólida (SPE, *solid phase extraction*) la muestra se pasa por un cartucho o una columna empaquetada con un adsorbente en el cual quedan retenidos los pesticidas. Una elución subsiguiente con un disolvente orgánico permite obtener los plaguicidas en un extracto orgánico concentrado, que normalmente es bastante limpio y puede ser analizado por cromatografía de gases o cromatografía líquida. Los adsorbentes más usados son las alquilsílicas (C<sub>8</sub> y C<sub>18</sub>) y, recientemente, una fase polimérica (Oasis HLB), formada por un copolímero de vinil benceno y de vinil pirrolidona, se ha utilizado

con buenos resultados (Carabias Martínez y col., 2004). Además, también se han empleado tierra de diatomeas o columnas de intercambio catiónico para los compuestos iónicos.

Normalmente, la SPE consta de cuatro etapas: acondicionamiento, adición de la muestra, lavado y elución. En el acondicionamiento se solvata la fase sólida para que se facilite la carga de la muestra y en el lavado se eliminan las interferencias. En la elución se emplea un disolvente con fuerza eluyente que permita obtener el analito en un volumen de extracción pequeño para su posterior análisis cromatográfico. A veces el extracto se evapora para concentrar el analito o para redisolverlo en un disolvente compatible con la técnica cromatográfica seleccionada.

Una de las ventajas de esta técnica de extracción es que es posible automatizarla e incluso acoplarla a sistemas de cromatografía líquida. El acoplamiento directo de la SPE con la cromatografía de gases es más complicado, porque es necesario eliminar cualquier rastro de agua. Sin embargo, el uso de un inyector de grandes volúmenes (LVI, *large-volume injection*) y la vaporización con temperatura programada (PTV, *programmable temperature vaporization*) mediante una columna de sílice desactivada entre el inyector y la columna cromatográfica permite que se puedan acoplar.

La técnica de SPE se puede emplear como un proceso que permita la extracción y la purificación simultánea, aunque también se puede aplicar como una etapa de purificación posterior a la extracción del analito por otros procedimientos, como por ejemplo la extracción líquido-líquido.

En los últimos años se han desarrollado una gran cantidad de métodos basados en SPE para determinar pesticidas en distintos tipos de alimentos, que han sido evaluados en diversos trabajos de revisión bibliográfica. Entre éstos, cabe citar la revisión de los diferentes métodos publicados para pesticidas en miel (Rial-Otero y col., 2007), en bebidas (Tadeo y col., 2004), en comida para bebés

(Hercegova y col., 2007) y en varios tipos de alimentos (Lambropoulou y Albanis, 2007).

## 2.6. DISPERSIÓN DE LA MATRIZ EN FASE SÓLIDA

La dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD, *matrix solid-phase dispersión*) es una técnica alternativa a la extracción en fase sólida descrita en el apartado anterior, desarrollada por Steven Barker y colaboradores en 1989. En un principio, este procedimiento se había aplicado sobre todo en la preparación, extracción y fraccionamiento de muestras biológicas sólidas, semisólidas o altamente viscosas (Barker, 2007).

La dispersión de la matriz en fase sólida se basa en mezclar la muestra con un soporte sólido abrasivo en un mortero empleando una maza. En este proceso se lleva a cabo la disrupción de la muestra a la vez que se crea una nueva fase de carácter único. Según Barker, los soportes sólidos empleados deben ser aquellos obtenidos de la modificación química de la superficie de la sílice, como es el caso del C<sub>18</sub> y C<sub>8</sub>, aunque muchos autores emplean en la MSPD otros materiales abrasivos. Entre estos últimos se encuentran la sílice y el sulfato sódico anhidro que actúan a su vez como agentes desecantes lo que permite obtener un material finamente dividido y bastante seco. Una característica interesante de esta técnica es que permite extraer analitos de muestras sólidas, semisólidas y líquidas. En el caso de muestras líquidas como la leche y otras más viscosas como la sangre, la mezcla con el soporte sólido se puede llevar a cabo directamente en la columna empleando una espátula o utensilio similar (Barker, 2000).

Una vez que se completa la dispersión de la matriz en la fase sólida, el nuevo material se transfiere a una columna, en cuyo interior hay una frita para retener la muestra. Existen dos posibilidades en la etapa de elución, una en la que los analitos son retenidos en la columna y las interferencias se eliminan en una etapa inicial de lavado para a continuación eluir los analitos con un disolvente

adecuado, o aquella en la que las sustancias que interfieren quedan retenidas en la columna y los analitos se eluyen directamente.

Finalmente, se puede realizar una limpieza posterior del extracto obtenido o analizarlo directamente. Algunas veces, la columna de MSPD se acopla con una columna de SPE o, en aplicaciones recientes, se ha empaquetado un adsorbente de SPE en la parte inferior de la columna de MSPD para eliminar los componentes de la matriz que puedan interferir en el análisis.

Esta técnica presenta una serie de ventajas frente a los métodos clásicos:

- El procedimiento analítico se simplifica y reduce drásticamente
- La posibilidad de formación de emulsiones se elimina
- El consumo de disolventes se reduce considerablemente
- La eficiencia de la extracción aumenta ya que toda la muestra está expuesta al extractante.

Existen varios factores que influyen en la extracción mediante MSPD. Así, un tamaño de partículas muy pequeño alarga el proceso de elución y hace necesario aplicar un vacío excesivo para conseguir un flujo adecuado. La cantidad de adsorbente en relación a la cantidad de muestra es otro parámetro que hay que tener en cuenta. Por lo general, se aplica una proporción muestra: adsorbente de 1:4 aunque ésta depende de la aplicación y se tiene que optimizar durante el desarrollo del método analítico. El tipo de disolvente y el volumen del eluyente son otros de los parámetros que influyen en la eficiencia del proceso de extracción mediante esta técnica.

Aunque en un principio esta técnica de extracción parece muy similar a la SPE, existen claras diferencias entre ambas. En la MSPD se consigue una completa disrupción y dispersión de la muestra en partículas de pequeño tamaño, proporcionando una superficie mejorada para la posterior extracción de la muestra, mientras que en SPE la disrupción de la muestra debe llevarse a cabo en un paso previo, ya que la muestra debe ser líquida para que se pueda aplicar la extracción en fase sólida. La muestra suele quedar retenida en la parte superior de la columna

cuando se realiza la SPE; por el contrario, en MSPD la muestra se dispersa por toda la columna. Finalmente, las interacciones físicas y químicas de los componentes del sistema son mayores en MSPD.

La técnica MSPD ha dado muy buenos resultados en la extracción de distintos tipos de pesticidas en frutas y hortalizas, para ello se han empleado diferentes adsorbentes como C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>, alúmina, Florisil, tierra de diatomeas y arena (Torres y col., 1997, Navarro y col., 2002 y Bogialli y col., 2004)

Kristenson y col. (2001) miniaturizaron esta técnica para determinar diez pesticidas en fruta. Para ello, mezclaron 25 mg de fruta con 25 mg de C<sub>8</sub> y eluyeron con 100 µl de acetato de etilo obteniendo recuperaciones superiores al 83% con límites de detección muy inferiores a los LMR.

Schenck y Wagner (1995) emplearon MSPD para determinar pesticidas organoclorados y organofosforados en muestras de leche y lo compararon con el método oficial multiresiduos para la determinación de pesticidas en leche de la AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*). Los resultados eran comparables pero el consumo de disolventes orgánicos era un 90% menor en el método MSPD lo que supone una gran ventaja frente a los métodos clásicos.

## 2.7. MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

La microextracción en fase sólida (SPME, *solid-phase microextraction*) es una técnica desarrollada por Pawliszyn que no utiliza disolventes para extraer los analitos y que está basada en el reparto de los analitos entre la matriz y una fibra de sílice fundida cubierta con una fase sólida, donde se retienen los analitos debido a su mayor afinidad por ella. La SPME se puede aplicar al análisis de matrices líquidas y gaseosas, y los pesticidas se pueden extraer por inmersión directa (DI, *direct immersion*) en líquidos o mediante el análisis del espacio de cabeza (HS, *headspace*).

Son varios los factores que pueden afectar a la extracción del pesticida mediante SPME, tales como el tipo y el espesor de la fibra, la temperatura, el tiempo de adsorción, el pH, el efecto de la matriz y la adición de sal. Los adsorbentes polares como el poliacrilato (PA) se emplean para extraer compuestos polares como los fenoles, mientras que el polidimetilsiloxano (PDMS) es el adsorbente adecuado para compuestos apolares como los hidrocarburos. La selectividad y la duración del proceso de extracción de los analitos vienen determinadas por el espesor de la fibra, ya que la cantidad de analito extraído es directamente proporcional al volumen de la fibra. La temperatura es un factor importante ya que favorece la volatilización de los pesticidas y su concentración en el espacio de cabeza, aunque, a temperatura alta, se puede producir la desorción de los analitos de la fibra disminuyendo la eficacia. Temperaturas en el intervalo de 50-90°C son las que se utilizan normalmente en HS-SPME. En general, un tiempo de exposición largo, superior a 60 minutos, es necesario para alcanzar la concentración de equilibrio de los pesticidas en la fibra. Sin embargo, si el tiempo de agitación y de adsorción se mantiene constante, la cantidad retenida por adsorción es proporcional a la concentración inicial en la matriz y el tiempo de muestreo se puede reducir a valores de alrededor de 20-30 minutos, con resultados razonables de reproducibilidad y de sensibilidad.

La influencia del pH en el análisis de pesticidas mediante SPME en alimentos y muestras ambientales es generalmente limitada, porque los valores encontrados en esas matrices son generalmente próximos al pH neutro. Por otra parte, el efecto de la matriz es un factor importante en SPME. Las partículas sin disolver o los compuestos de baja volatilidad pueden interferir en el análisis cromatográfico o saturando la fibra. El efecto de la matriz se encuentra a menudo en análisis mediante inmersión en la muestra líquida y este problema se soluciona generalmente por la dilución de las muestras en proporciones variables, de una a cien veces. En estos casos, para los pesticidas con cierta presión de vapor, el análisis mediante la técnica de espacio de cabeza (HS) es una buena alternativa para evitar el efecto de la matriz. En HS-SPME de muestras líquidas, la adición de sal es una práctica normal para aumentar la concentración de los pesticidas en la fase gaseosa, al disminuir la solubilidad de los pesticidas en la matriz líquida. Sin

embargo, la adición de sal no se emplea a menudo en el análisis de pesticidas por inmersión directa, debido a la reducción de las recuperaciones encontradas, que se puede explicar probablemente por la formación de una capa de sal alrededor de la fibra.

La otra etapa importante en SPME es la desorción de los analitos de la fibra. La determinación de los analitos extraídos por SPME se realiza generalmente mediante desorción térmica y análisis por cromatografía de gases, aunque también puede realizarse por desorción con disolvente y determinación por cromatografía líquida. En el caso de la cromatografía gaseosa, la desorción ocurre en el puerto de inyección, a una temperatura elegida de acuerdo con la temperatura máxima recomendada para la fibra usada y los compuestos analizados. Las temperaturas próximas a la temperatura máxima recomendada pueden acortar la vida de la fibra y aumentar el sangrado de la fase estacionaria.

Se han desarrollado una gran variedad de métodos SPME para el análisis de pesticidas en diferentes alimentos. La mayoría de estos métodos se han utilizado en muestras líquidas, como los zumos de frutas (Simplicio y col., 1999), el vino (Beltran y col., 2000) y la miel previamente diluida en agua o una solución tampón (Jiménez y col., 1998 y Campillo y col., 2006). En el caso de muestras sólidas, como las zanahorias, cebollas y patatas, Berrada y colaboradores (2004) desarrollaron un método SPME para determinar fenilureas utilizando una fibra de PA, a partir de zumos de dichas hortalizas.

Diversas variantes de la técnica de SPME se han desarrollado recientemente. La SPME en tubo es una técnica basada en la retención de los analitos en un tubo capilar internamente recubierto con una fase estacionaria. Se realizan varios ciclos de succión / eyección del líquido para conseguir la retención en la fase estacionaria de los analitos, que se extraen posteriormente con un disolvente adecuado para el análisis por HPLC (Kataoka y col., 2000).

## 2.8. EXTRACCIÓN MEDIANTE BARRA DE AGITACIÓN

En 1999, Baltussen y colaboradores desarrollaron una técnica cuyo mecanismo de extracción es muy parecido al del la SPME, denominada extracción mediante barra de agitación (SBSE, *stir bar sorptive extraction*) (Baltussen y col., 1999). Ésta consiste en el uso de una barra de agitación recubierta con una fase sólida, por lo general PDMS, que se introduce en las muestras acuosas. Después de 30 a 240 minutos que dura la extracción, en la que los analitos han quedado adsorbidos en el PDMS, la desorción puede ser térmica para el análisis por cromatografía de gases o empleando disolventes orgánicos para utilizar la cromatografía líquida. El PDMS es una fase no polar por lo que es preferible que los analitos no tengan una alta polaridad, como es el caso de los compuestos fenólicos, ya que las recuperaciones no son buenas. Para mejorar la extracción de estos compuestos polares se ha desarrollado la SBSE con derivatización *in situ*, que no solo mejora el proceso de extracción sino también el análisis por cromatografía de gases al disminuir la polaridad del analito (Kawaguchi M. y col., 2006)

Esta técnica se ha empleado asimismo para el análisis de compuestos volátiles en aguas (Pérez-Carrera E. y col., 2007) y en fluidos biológicos como la orina o el plasma. Aunque también se ha utilizado para la determinación de pesticidas en frutas y hortalizas (Sandra P. y col., 2003), en bebidas (Sandra P. y col., 2001, Bicchi C. y col., 2003) y en la miel (Blasco C. y col., 2004). Se indica en los trabajos citados que los límites de detección obtenidos con esta técnica son más bajos que los de SPME, debido a la cantidad más alta de fase sólida (50-250 veces mayor) que cubre la barra en comparación con la usada en las fibras. Sin embargo, hay que tener en cuenta que es necesaria una retención selectiva de los analitos frente a los componentes de la matriz para alcanzar límites de cuantificación (LOQ, *limit of quantification*) mejores.

## 2.9. TÉCNICA QuEChERS

En 2003, Anastassaides y colaboradores desarrollaron un método nuevo para determinar residuos de pesticidas en frutas y hortalizas al que denominaron QuEChERS que son las siglas de *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*, es decir, rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro. Este nuevo método de preparar las muestras surgió de la necesidad de desarrollar métodos multiresiduos rápidos y económicos pero que proporcionaron resultados de gran calidad y fiabilidad.

Esta técnica consiste en una extracción de una pequeña cantidad de muestra representativa y homogénea (10–15 g) con un disolvente miscible con el agua, como el acetonitrilo o la acetona, seguida de la adición de sales como el cloruro sódico o el sulfato magnésico. La adición de éstas induce la separación de las dos fases y que el analito migre de la fase acuosa a la fase orgánica consiguiéndose recuperaciones muy altas incluso con pesticidas polares y solubles en agua. Además de estas sales, se suele añadir agentes que regulen el pH como el citrato para estabilizar pesticidas de carácter básico y patrones internos como el trifenilfosfato para minimizar todos los posibles errores que se pueden generar durante el método QuEChERS. Después de agitar la muestra, ésta se centrifuga y una alícuota de la fase orgánica se somete a un proceso de purificación empleando la extracción en fase sólida dispersiva. En este caso, se añade una pequeña cantidad de adsorbente SPE, generalmente de PSA (amina primaria y secundaria) al extracto que se agita y se centrifuga, en lugar de pasar el extracto por un cartucho relleno con el adsorbente previamente acondicionado. La PSA es un adsorbente de intercambio aniónico débil que elimina ácidos grasos, azúcares y otros componentes de la matriz que pueden formar puentes de hidrógeno (Lambropoulou y Albanis, 2007). El sobrenadante se puede analizar directamente o se puede concentrar para reconstituirlo en un disolvente adecuado para su análisis. Como cualquier otra técnica de preparación de muestras, se debe llevar a cabo la optimización del método ya que existen parámetros como el tipo de muestra, la naturaleza del disolvente y de las sales y el pH que influyen en la eficiencia de la extracción.

Esta técnica ha permitido determinar un elevado número de pesticidas pertenecientes a diferentes familias químicas en alimentos de origen vegetal tales como uvas (Banerjee y col., 2008), hortalizas (Nguyen y col., 2008), zumos de fruta (Romero-Gonzalez y col., 2008) y comida para bebés a base de manzana (Cajka y col. 2008).

## 2.10. COMPARACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN

La elección del método adecuado para el análisis de residuos depende de una serie de factores a tener en cuenta. La naturaleza de la matriz y las características de los analitos determinan la técnica de extracción adecuada para preparar extractos aptos para su análisis instrumental, ya que no existe un método universal aplicable para todo tipo de muestras. En la Tabla 2 se muestran las ventajas e inconvenientes de las técnicas de extracción descritas en esta memoria.

**Tabla 2.** Ventajas e inconvenientes de las distintas técnicas de extracción

Técnica de extracción	Ventajas	Inconvenientes
Extracción con agitación	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Simple</li> <li>▪ Bajo coste</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Alto consumo de disolventes</li> <li>▪ Requiere una filtración posterior</li> <li>▪ Posible formación de emulsiones</li> </ul>
Extracción Soxhlet	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Fácil manejo</li> <li>▪ Bajo coste</li> <li>▪ No requiere filtración</li> <li>▪ No depende de la matriz</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Proceso lento (6 -48h)</li> <li>▪ Alto consumo de disolventes y agua para refrigerar</li> </ul>
Extracción con ultrasonidos	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Bajo coste</li> <li>▪ Rápida</li> <li>▪ No depende de la matriz</li> <li>▪ Cantidad de muestra elevada (2-30 g)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Alto consumo de disolventes</li> <li>▪ Requiere una filtración posterior</li> <li>▪ La extracción no es tan eficiente</li> </ul>
Extracción con líquidos presurizados (PLE)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Extracción rápida</li> <li>▪ Bajo consumo de disolventes</li> <li>▪ No es necesario filtrar posteriormente</li> <li>▪ Sistema automatizado</li> <li>▪ Se puede acoplar a LC-MS</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Las extracciones son más completas pero menos selectivas</li> <li>▪ El equipo tiene un precio elevado</li> </ul>

Técnica de extracción	Ventajas	Inconvenientes
Extracción con fluidos supercríticos (SFE)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Extracción rápida</li> <li>▪ Bajo consumo de disolventes</li> <li>▪ Selectiva</li> <li>▪ Automatizable y extracción simultánea</li> <li>▪ Se puede acoplar con GC y SFC</li> <li>▪ El extracto puede estar concentrado y puro al eliminarse el CO<sub>2</sub> al terminar</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ No adecuada para compuestos orgánicos polares</li> <li>▪ Problemas con muestras con alto contenido de agua</li> <li>▪ El equipo tiene un precio elevado</li> </ul>
Extracción asistida por microondas (MAE)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Extracción rápida</li> <li>▪ Bajo consumo de disolventes</li> <li>▪ Extracción simultánea de varias muestras</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ El disolvente debe absorber la energía de microondas (salvo si la matriz contiene agua)</li> <li>▪ Es necesaria una posterior filtración o separación</li> <li>▪ Degradación de compuestos térmicamente lábiles</li> <li>▪ Poca selectividad en la extracción</li> </ul>
Extracción en fase sólida (SPE)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Extracción rápida</li> <li>▪ Extracción de compuestos volátiles y no volátiles</li> <li>▪ Bajo consumo de disolventes</li> <li>▪ Gran variedad de adsorbentes</li> <li>▪ Eliminación de la formación de emulsiones</li> <li>▪ Automatizable</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Tratamiento de grandes volúmenes a veces no es posible.</li> <li>▪ El material del cartucho puede generar interferencias y adsorber el analito</li> <li>▪ El empaquetado del adsorbente debe ser uniforme para evitar una eficiencia baja</li> </ul>
Dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Bajo consumo de disolventes</li> <li>▪ Extracción rápida</li> <li>▪ Eliminación de la formación de emulsiones</li> <li>▪ Alta sensibilidad</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ No es adecuada para muestras secas</li> <li>▪ La cantidad de muestra está limitada</li> </ul>
Microextracción en fase sólida (SPME)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Extracción rápida</li> <li>▪ Consumo de disolvente mínimo o nulo</li> <li>▪ Automatizable</li> <li>▪ Bajo coste (la fibra se puede usar aprox. 100 veces)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Problemas con la reproducibilidad</li> </ul>
Extracción mediante barra de agitación (SBSE)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Extracción rápida</li> <li>▪ Mayor sensibilidad y precisión que SPME</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ La desorción no se puede hacer directamente en el inyector sin una unidad de desorción especial.</li> </ul>

Técnica de extracción	Ventajas	Inconvenientes
Técnica QuEChERS	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Extracción rápida</li> <li>▪ Bajo consumo de disolventes</li> <li>▪ Bajo coste</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Transferencia manual de la barra a la unidad de desorción</li> <li>▪ Poca selectividad en la extracción</li> <li>▪ Posible formación de emulsiones</li> <li>▪ Extractos poco concentrados</li> <li>▪ Extracción manual</li> </ul>

### 3. METODOS DE PURIFICACIÓN

Una dificultad inherente a la mayoría de las técnicas de extracción es que éstas no son específicas produciéndose la co-extracción de componentes de la matriz que son solubles en el disolvente de extracción. Un ejemplo es la extracción de lípidos durante la extracción con fluidos supercríticos de compuestos no polares en muestras de origen animal o vegetal. La presencia de interferencias debidas a la matriz en los extractos de las muestras puede conllevar multitud de problemas, tales como la formación de emulsiones, la turbidez de la muestra, la contaminación del equipo y, lo más importante, el enmascaramiento de la señal analítica del compuesto diana, lo que supone un incremento del límite de detección del método analítico.

Una etapa de limpieza muy exhaustiva puede ser una fuente de error, ya que se puede perder parte del analito durante la misma al intentar conseguir un extracto lo más limpio posible. En algunos casos, la extracción y la purificación se pueden llevar a cabo simultáneamente, lo que simplifica todo el proceso de preparación de la muestra antes de su análisis instrumental.

Con frecuencia, los compuestos co-extraídos son eliminados en un proceso de purificación posterior a la extracción que por lo general se lleva a cabo mediante extracción líquido-líquido o SPE, aunque ésta última está desplazando a la primera, ya que es menos tediosa y se ahorra gran cantidad de disolvente. La SPE se puede llevar a cabo con distintas clases de adsorbentes, que pueden ser polares,

apolares, de intercambio iónico, de afinidad y polímeros de impresión molecular entre otros.

Los adsorbentes polares como la sílice, la alúmina y el Florisil se han empleado en la purificación de extractos de pesticidas de distintas matrices. Por lo general, el analito en un disolvente apolar se carga sobre el adsorbente. Se lleva a cabo una fase de lavado con el mismo disolvente para eliminar las interferencias más hidrofóbicas para a continuación eluir el analito con un disolvente con mayor fuerza elutrópica.

Los adsorbentes apolares son apropiados para la purificación de pesticidas en disolventes polares, como el agua, siendo los más utilizados las alquil-sílicas, tales como octadecil ( $C_{18}$ ), octil ( $C_8$ ), etil ( $C_2$ ), fenil y ciclohexil, en las cuales los grupos alquilo están unidos covalentemente a los grupos silanol. Por lo general, estos adsorbentes se emplean en cartuchos o en discos donde quedan retenidos los analitos para su posterior elución con un disolvente orgánico adecuado, como por ejemplo metanol, acetonitrilo o acetato de etilo.

El carbón activo fue uno de los primeros adsorbentes empleados para extraer compuestos orgánicos de polaridad media o baja de muestras de agua. Sin embargo, se dejó de emplear por la adsorción irreversible y la baja recuperación de algunos compuestos. El uso de adsorbentes de carbón en la extracción SPE se impulsó con la utilización del carbón grafitizado, que se empleó en la extracción de pesticidas como los organoclorados, las triazinas y los fenoxiácidos. El interés por este adsorbente creció cuando se demostró su capacidad de aislar moléculas polares altamente solubles en agua. Otro adsorbente empleado es el carbón grafitico poroso formado por láminas de grafito. La superficie plana de éste le permite extraer compuestos como los PCBs, PCDF y PCDD (Hennion, 2000).

Los adsorbentes poliméricos porosos son generalmente copolímeros de estireno y divinilbenceno cada vez más utilizados por su eficiencia y su estabilidad en un intervalo amplio de pH. Un ejemplo de este tipo de adsorbente es el Oasis HLB que es un copolímero macroporoso formado a partir de un monómero lipofílico

como es el divinilbenceno y la N-vinilpirrolodona de carácter hidrofílico lo que permite purificar extractos tanto de sustancias orgánicas polares como de apolares (Huck y Bonn, 2000).

Los adsorbentes de intercambio iónico se emplean para pesticidas iónicos o fácilmente ionizables. La carga sobre el adsorbente se lleva a cabo a un pH en el cual el analito está en su forma iónica mientras que la elución se lleva a cabo a un pH distinto, empleando para ello soluciones tampón.

Los adsorbentes de afinidad se basan en el uso de anticuerpos inmovilizados en un soporte adecuado y permiten una purificación selectiva de los extractos de pesticidas de distintas matrices. Este tipo de adsorbentes presenta una serie de inconvenientes como son que los anticuerpos son difíciles de obtener y por tanto son caros, y que hay muy pocos anticuerpos comercializados para los pesticidas existentes.

Otro tipo de adsorbentes selectivos son los que se basan en la obtención de polímeros de impresión molecular (MIP, *molecularly imprinted polymers*). En la preparación de estos polímeros se emplea el compuesto que se desea determinar que induce a crear sitios de reconocimiento específico en el polímero durante la fase de polimerización a partir de una mezcla de monómeros. Una vez obtenido el polímero, se extrae el compuesto que se ha empleado como modelo y, por tanto, se consigue un polímero con huecos selectivos al compuesto que se empleó en la creación del polímero (Cámara y col., 2002). El uso de este tipo de polímeros ha dado buenos resultados para la purificación de herbicidas derivados de la urea en extractos de hortalizas (Tamayo y col., 2005), entre otras aplicaciones.

## 4. DETERMINACIÓN ANALÍTICA

### 4.1. CROMATOGRAFÍA DE GASES

La cromatografía de gases (GC, *gas chromatography*) es una técnica ampliamente empleada en el análisis de residuos de pesticidas, en particular para

compuestos volátiles. Inicialmente, se emplearon columnas empaquetadas con fases estacionarias como las metil siliconas, metil-fenil siliconas y fluoropropil siliconas. En los últimos años, predomina claramente la utilización de columnas capilares, ya que presentan una mayor sensibilidad y resolución que las empaquetadas y, por tanto, permiten conseguir mejores límites de detección.

Durante el desarrollo de la cromatografía de gases se han utilizado diferentes detectores en el análisis de trazas de pesticidas. El detector de captura de electrones (ECD, *electron capture detector*) es muy sensible a los compuestos que contienen grupos funcionales electronegativos tales como halógenos, grupos nitro, dobles enlaces y quinonas; en cambio no es sensible a grupos funcionales como aminas y alcoholes. El detector de nitrógeno-fósforo (NPD, *nitrogen-phosphorus detector*), también conocido como detector termoiónico (TID, *thermoionic ionization detector*), se emplea en el análisis de pesticidas que posean átomos de nitrógeno o fósforo, como es el caso de las triazinas y de los insecticidas organofosforados.

En los últimos años, la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS, *gas chromatography-mass spectrometry*) se ha implantado en la determinación de pesticidas. Tanto es así, que en la Unión Europea es un requisito que la espectrometría de masas sea la técnica empleada para la confirmación de residuos de pesticidas en alimentos de origen animal en los laboratorios autorizados para el control oficial de residuos, según la Decisión de la Comisión 2002/657/CE. Con esta técnica se puede detectar la masa característica de un compuesto y seleccionando dicha masa, puede detectarse selectivamente ese compuesto de interés en una matriz compleja. De esta manera se pueden determinar e identificar residuos de pesticidas a niveles de concentración muy bajos. La adquisición de datos se puede llevar a cabo de dos modos distintos, cuando se trabaja en el modo de barrido (scan), se detecta un intervalo de masas, mientras que si se trabaja en el modo SIM (*selected ion monitoring*) solamente se consideran las masas características de los compuestos de interés, lo que incrementa la sensibilidad entre 5 y 100 veces cuando se trabaja de este modo, ya que aumenta el tiempo de medida. Las partes fundamentales de un espectrómetro

de masas son la fuente de ionización que genera los iones en fase gaseosa y el analizador de masas donde estos iones se separan en función de su relación masa/carga. Existen tres tipos de fuentes de ionización: el impacto electrónico (EI, *electron impact*), la ionización química positiva y la ionización química negativa, siendo la primera la más utilizada ya que se genera un gran número de fragmentos característicos y existen bases de datos, que se pueden consultar, con los espectros de masas de multitud de compuestos.

En la actualidad también se está empleando la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas en tándem (GC/MS-MS), donde se acopla un espectrómetro de masas a otro, una técnica mucho más sensible y selectiva que la anterior. En el primer espectrómetro, equipado con una fuente de ionización que dé lugar a poca fragmentación, como es la ionización química, se aíslan los iones moleculares o los iones moleculares protonados de los distintos componentes de una mezcla. En el segundo espectrómetro estos iones son fragmentados para dar una serie de espectros de masa, uno por cada uno de los iones moleculares obtenidos en el primer espectrómetro, consiguiendo de esta manera una selectividad y sensibilidad elevadas.

#### 4.2. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS

La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, *high performance liquid chromatography*) es una técnica que se emplea para el análisis de pesticidas polares o térmicamente lábiles que no pueden analizarse directamente por cromatografía de gases. La preparación de derivados térmicamente estables para el análisis por GC supone un incremento en el tiempo de análisis y puede originar pérdidas de los pesticidas objeto de estudio, por lo que la cromatografía de líquidos es una alternativa para este tipo de compuestos. La mayoría de los métodos HPLC desarrollados para el análisis de pesticidas son de fase inversa, con columnas rellenas de una fase estacionaria apolar como la C<sub>8</sub> o C<sub>18</sub>, mientras que la fase móvil es relativamente polar. El detector más utilizado en HPLC es el ultravioleta de longitud de onda fija (UV) o variable (detector de diodos en fila, DAD). El detector de

fluorescencia (FLD) también se emplea en el análisis de pesticidas, pero estos deben tener algún grupo fluoróforo o es necesario generar un derivado fluorescente. El detector UV, aunque se puede utilizar para la mayoría de los pesticidas, presenta el inconveniente de su baja sensibilidad y selectividad, por lo que cada vez es más habitual la detección por espectrometría de masas. La cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas (HPLC-MS) presenta la ventaja de analizar los pesticidas sin la necesidad de derivatizar los compuestos para aumentar su sensibilidad, a la vez que se obtiene información estructural que permite su identificación. Al igual que en GC-MS, se utiliza el modo SIM y MS-MS para aumentar la sensibilidad y la selectividad.

La cromatografía de líquidos a temperaturas elevadas empleando agua pura como fase móvil es una variante de la cromatografía de líquidos que ha ganado popularidad en los últimos años (Hartonen y Riekkola, 2008). A diferencia de la cromatografía de líquidos convencional, el incremento de la fuerza eluyente se debe al aumento de temperatura de la fase móvil en vez de por la presencia de disolventes orgánicos. La ausencia de disolventes orgánicos la convierte en una técnica más ecológica y la elución a temperaturas elevadas mejora la selectividad y la eficiencia siendo mucho más rápida, aunque puede presentar el inconveniente de la degradación de los analitos a temperaturas elevadas.

#### **4.3. OTRAS TÉCNICAS ANALÍTICAS**

La cromatografía de gases y de líquidos son las técnicas principalmente empleadas en la determinación de residuos de pesticidas. Sin embargo, otras técnicas como la cromatografía en capa fina, la electroforesis capilar y las técnicas de inmunoensayo se utilizan también en la determinación de pesticidas, aunque en menor proporción.

## 5. BIBLIOGRAFIA

Adou, K., Bontoyan, W.R. y Sweeney, P.J. Multiresidue method for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables by accelerated solvent extraction and capillary gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4153 (2001).

Ahmed, F.E. Analyses of pesticides and their metabolites in food and drinks. *Trends Anal. Chem.* 20, 649 (2001).

Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stanjnbahe, D. y Schenck, F.J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.* 86, 412 (2003).

Argauer, R.J., Eller, K.I., Ibrahim, M.A. y Brown, R.T. Determining propoxur and other carbamates in meat using HPLC fluorescence and gas chromatography/ion trap mass spectrometry after supercritical fluid extraction. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2774 (1995).

Atienza, J., Jiménez, J.J., Bernal, J.L. y Martín, M.T. Supercritical fluid extraction of fluvalinate residues in honey. Determination by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 655, 95 (1993).

Baltussen, E., Sandra, P., David, F., y Cramers, C. Stir bar sorptive extraction(SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles. *J. Microcolumn Sep* 11, 737 (1999).

Banerjee, K., Oulkar, D.S., Dasgupta, S., Patil, S.B., Patil, S.H., Savant, R., y Adsule, P.G. Validation and uncertainty analysis of a multi-residue method for pesticides in grapes using ethyl acetate extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1173, 98 (2008).

Barker, S.A. Matrix solid-phase dispersion. *J. Chromatogr. A.* 885, 115 (2000).

Barker, S.A. Matrix solid-phase dispersion (MSPD). *J. Biochem. Biophys. Methods* 70, 151 (2007).

Barriada-Pereira, M., González-Castro, M.J., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Prada-Rodríguez, D. y Fernández-Fernández, E. Determination of organochlorine pesticides in horticultural samples by microwave assisted extraction followed by GC-ECD. *Int. J. Environ. An. Ch.* 85, 325 (2005).

Beltran, J., Lopez, F.J., y Hernandez, P. Solid-phase microextraction in pesticide residue analysis. *J. Chromatogr. A*, 885, 389 (2000).

Berrada, H., Font, G., y Molto, J.C. Application of solid-phase microextraction for determining phenylurea herbicides and their homologous anilines from vegetables. *J. Chromatogr. A*, 1042, 9 (2004).

Bicchi, C., Cordero, C., Lori, C., Rubiolo, P., Sandra, P., Yariwake, J.H. y Zuin, V.G. SBSE-GC-ECD/FPD in the analysis of pesticide residues in *Passiflora alata* Dryander herbal teas. *J. Agric. Food Chem.* 51, 27 (2003).

Blasco, C., Fernández, M., Picó, Y., y Font, G. Comparison of solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction for determining six organophosphorus insecticides in honey by liquid chromatography-mass spectrometry *J. Chromatogr. A* 1030, 77 (2004).

Bogialli, S., Curini, R., Di Corcia, A., Nazzari, M., y Tamburro, D. A simple and rapid assay for analyzing residues of carbamate insecticides in vegetables and fruits: hot water extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 52, 665 (2004).

Bolles, H.G., Dixon-White, H.E., Peterson, R.K., Tomerlin, J.R., Day Jr, E.W. y Oliver, G.R. U.S. market basket study to determine residues of the insecticide chlorpyrifos. *J Agric. Food Chem.* 47, 1817 (1999).

Bouaid, A., Martín Esteban, A., Fernández, P. y Cámara, C. Microwave assisted extraction method for the determination of atrazine and four organophosphorus pesticides in oranges by gas chromatography. *Fresenius J. Anal. Chem.* 367, 291 (2000).

Cajka, T., Hajlova, J., Lacina, O., Mastovska, K. y Lehotay, S.J. Rapid analysis of multiple pesticide residues in fruit-based baby food using programmed temperature vaporiser injection-low-pressure gas chromatography-high-resolution time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1186, 281 (2008).

Cámara, C., Fernández, P., Martín-Esteban, A., Pérez-Conde, C. y Vidal, M. Toma y tratamiento de muestras. *Ed. Síntesis*, Madrid (2002).

Campillo, N., Peñalver, R., Aguinaga, N. y Hernandez-Cordoba, M. Solid-phase microextraction and gas chromatography with atomic emission detection for multiresidue determination of pesticides in honey. *Anal. Chim. Acta*. 562, 9 (2006).

Carabias Martínez, R., Rodríguez Gonzalo, E., Herrero Hernández, E. y Hernández Méndez, J. Simultaneous determination of phenyl- and sulfonylurea herbicides in water by solid-phase extraction and liquid chromatography with UV diode array or mass spectrometric detection. *Anal. Chim. Acta*. 517, 71 (2004).

Dagher, S.M., Hawi, Z.K., y Kawar, N.S. Comparison of gas chromatography and immunoassay methods in quantifying fenitrothion residues in grape juice processed into alcoholic drinks. *J. Environ. Sci. Health B34*, 849 (1999).

Diagne, R.G., Foster, G.D., y Khan, S.U. Comparison of Soxhlet and microwave-assisted extractions for the determination of fenitrothion residues in beans. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3204 (2002).

Ferrer, I., Garcia-Reyes, J.F., Mezcuca, M., Thurman, E.M. y Fernandez-Alba, A.R. Multi-residue pesticide analysis in fruits and vegetables by liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. 1082, 81 (2005).

Fiddler, W., Pensabene, J. W. , Gates, R.A. y Donoghue, D.J. Supercritical fluid extraction of organochlorine pesticides in eggs. *J. Agric. Food Chem.* 47, 206 (1999).

Garrido Frenich, A., Martinez Vidal, J.L., Cruz Sicilia, A.D., Gonzalez Rodriguez, M.J. y Plaza Bolanos, P. Multiresidue analysis of organochlorine and organophosphorus

pesticides in muscle of chicken, pork and lamb by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* 558, 42 (2006).

Gomes Zuin, V., Schellin, M., Montero, L., Yariwake, J.H., Augusto, F., y Popp, P. Comparison of stir bar sorptive extraction and membrane-assisted solvent extraction as enrichment techniques for the determination of pesticide and benzo[a]pyrene residues in Brazilian sugarcane juice. *J. Chromatogr. A.* 1114, 180 (2006).

Hartonen, K., y Riekkola, M.L. Liquid chromatography at elevated temperatures with pure water as the mobile phase. *Trends Anal. Chem.* 27, 1 (2008).

Hennion, M.C. Graphitized carbons for solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A.* 885, 73 (2000).

Hercegova, A., Domotorova, M., y Matisova, E. Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination. *J. Chromatogr. A.* 1153, 54 (2007).

Huck, C.W. y Bonn, G.K. Recent developments in polymer-based sorbents for solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A.* 885, 51 (2000).

Jimenez, J.J., Bernal, J.L., del Nozal, M.J., Martin, M.T. y Mayorga, A.L. Solid-phase microextraction applied to the analysis of pesticide residues in honey using gas chromatography with electron-capture detection. *J. Chromatogr. A.* 829, 269 (1998).

Kaihara, A., Yoshii, K., Tsumura, Y., Nakamura, Y., Ishimitsu, S. y Tonogai, Y. Multiresidue analysis of pesticides in fresh fruits and vegetables by supercritical fluid extraction and HPLC. *J. Health Sci.* 46, 336 (2000).

Kataoka, H., Lord, H.L. y Pawliszyn, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *J. Chromatogr. A.* 880, 35 (2000).

Kawaguchi, M., Ito, R., Saito, K., y Nakazawa, H., Novel stir bar sorptive extraction methods for environmental and biomedical analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40, 500 (2006).

Kristenson, E.M., Haverkate, E.G.J., Slooten C.J., Ramos, L., Vreuls R.J.J. y Brinkman, U.A.Th. Miniaturized automated matrix solid-phase dispersion extraction of pesticides in fruit followed by gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *J. Chromatogr A*, 917, 277 (2001).

Lambropoulou, D.A. y Albanis, T.A. Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography-mass spectrometry-based techniques: a review. *Anal. Bioanal. Chem.*, 389, 1663 (2007).

Lehotay, S.J. y Eller, K. Development of a method of analysis for 46 pesticides in fruits and vegetables by supercritical fluid extraction and gas chromatography/ion trap mass spectrometry. *J AOAC Int.* 78, 821 (1995).

Lehotay, S.J. y García-Valverde, A. Evaluation of different solid-phase traps for automated collection and clean-up in the analysis of multiple pesticides in fruits and vegetables after supercritical fluid extraction. *J. Chromatogr. A.* 765, 69 (1997).

Menkissoglu-Spiroudi, U., Diamantidis, G.C., Georgiou, V.E. y Thrasyvoulou, A.T. Determination of malathion, coumaphos, and fluvalinate residues in honey by gas chromatography with nitrogen-phosphorus or electron capture detectors. *J AOAC Int.* 83, 178 (2000).

Navarro, M., Pico, Y., Marin, R. y Manes, J. Application of matrix solid-phase dispersion to the determination of a new generation of fungicides in fruits and vegetables. *J. Chromatogr. A.* 968, 201 (2002).

Nguyen, T.D., Yu, J.E., Lee, D.M., y Lee G.H. A multiresidue method for the determination of 107 pesticides in cabbage and radish using QuEChERS sample preparation method and gas chromatography mass spectrometry. *Food Chem.* 110, 207 (2008).

Papadakis, E.N., Vryzas, Z., y Papadopoulou-Mourkidou, E. Rapid method for the determination of 16 organochlorine pesticides in sesame seeds by microwave-assisted extraction and analysis of extracts by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1127, 6 (2006).

Pérez-Carrera, E., León, V.M., Gómez Parra , A. y González-Mazo, E. Simultaneous determination of pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in seawater and interstitial marine water samples, using stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1170, 82 (2007).

Rezic, I., Horvat A.J.M., Babic, S. y Kastelan-Macan, M. Determination of pesticides in honey by ultrasonic solvent extraction and thin-layer chromatography. *Ultrason. Sonochem.* 12, 447 (2005).

Rial-Otero, R., Gaspar, E.M, Moura, I., y Capelo, J.L. Chromatographic-based methods for pesticide determination in honey: An overview. *Talanta*, 71, 503 (2007).

Richter, B.E., Hoeffler, F. y Linkerhaegner, M. Determining organophosphorus pesticides in foods using accelerated solvent extraction with large sample sizes. *LC-GC*, 19, 408 (2001).

Romero-González, R., Garrido Frenich, A., y Martínez Vidal, J.L. Multiresidue method for fast determination of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta*, 76, 211 (2008).

Sandra, P., Tienpont, B., Vercammen, J., Tredoux, A., Sandra, T. y David, F. Stir bar sorptive extraction applied to the determination dicarboximide fungicides in wine. *J. Chromatogr. A.* 928, 117 (2001).

Sandra, P., Tienpont, B. y David, F., Multi-residue screening of pesticides in vegetables, fruits and baby food by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1000, 299 (2003).

Schenck, F.J. y Wagner, R. Screening procedure for organochlorine and organophosphorus pesticide residues in milk using matrix solid phase dispersion (MSPD) extraction and gas chromatographic determination. *Food Addit. Contam.* 12, 535 (1995).

Shen, G. y Lee, H.K. Determination of triazines in soil by microwave-assisted extraction followed by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 985, 167 (2003).

Simplicio, A.L. y Boas, L.V. Validation of a solid-phase microextraction method for the determination of organophosphorus pesticides in fruits and fruit juice. *J. Chromatogr. A*, 833, 35 (1999).

Singh, S.B., Foster, G.D. y Khan, S.U. Microwave-assisted extraction for the simultaneous determination of thiamethoxam, imidacloprid, and carbendazim residues in fresh and cooked vegetable samples, *J. Agric. Food Chem.*, 52, 105 (2004).

Singh, S.B., Foster, G.D. y Khan, S.U. Determination of thiophanate methyl and carbendazim residues in vegetable samples using microwave-assisted extraction. *J. Chromatogr. A*, 1148, 152 (2007).

Stefani, R., Buzzi, M., y Grazi, R. Supercritical fluid extraction of pesticide residues in fortified apple matrices. *J. Chromatogr. A*, 782, 123 (1997).

Tadeo, J.L., Sánchez-Brunete, C., Albero, B. y González, L. Analysis of pesticide residues in juice and beverages. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 34, 164 (2004).

Tahboub, Y.R., Zaater, M.F. y Barri, T.A. Simultaneous identification and quantitation of selected organochlorine pesticide residues in honey by full-scan gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* 558, 62 (2006).

Tamayo, F.G., Casillas, J.L. y Martín-Esteban, A. Clean up of phenylurea herbicides in plant extracts using molecularly imprinted polymers. *Anal. Bional. Chem.*, 381, 1234 (2005).

Torres, C.M., Pico, Y., Marin R., y Manes J. Evaluation of organophosphorus pesticide residues in citrus fruits from the Valencian Community. *J AOAC Int.* 80, 1122 (1997).

Weichbrodt, M., Vetter, W. y Lucas, B. Microwaved-assisted extraction and accelerated solvent extraction with ethyl acetate-cyclohexane before determination of organochlorines in fish tissue by gas chromatography with electron-capture detection. *J. AOAC Int.* 83, 1334 (2000).

Wennrich, L., Popp, P., Koeller, G. y Breuste, J. Determination of organochlorine pesticides and chlorobenzenes in strawberries by using accelerated solvent extraction combined with sorptive enrichment and gas chromatography/mass spectrometry. *J. AOAC Int.* 84, 1194 (2001).

Zougagh, M., Valcárcel, M. y Ríos, A. Supercritical fluid extraction: a critical review of its analytical usefulness. *Trends Anal. Chem.* 23, 399 (2004).

## II. PARTE EXPERIMENTAL

---

# CAPÍTULO I

DESARROLLO DE MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA LA  
DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS Y OTROS CONTAMINANTES  
ORGÁNICOS EN LA MIEL

---

## **DESARROLLO DE MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS Y OTROS CONTAMINANTES ORGÁNICOS EN LA MIEL**

En la actualidad el control de pesticidas, medicamentos y otros contaminantes orgánicos en la miel es un tema de importancia para la salud debido al incremento observado en la detección de estos compuestos en los últimos años. Esta contaminación se ha postulado como causa de una pérdida considerable de la población mundial de abejas, desde 1995, llegando a reducirse las colonias a la mitad en algunos casos. Muchos científicos relacionan la mortalidad de las abejas con la presencia de pesticidas en el polen, la colmena, las propias abejas y la miel. De acuerdo con la regulación de la Unión Europea, la miel como un producto natural debería estar libre de contaminantes químicos y ha establecido límites máximos de residuos (LMR) en la miel para tres acaricidas: amitraz, cumafos y cimiazol.

La miel es una matriz muy difícil de manipular debido a su alto contenido en azúcares, principalmente fructosa y glucosa, por lo que el pretratamiento de la muestra es esencial para obtener resultados fiables. En los últimos años se han propuesto metodologías diferentes con el objetivo de reducir la manipulación de la muestra y los residuos tóxicos generados.

Los objetivos de este capítulo han sido el desarrollo de métodos analíticos que permitan la detección, cuantificación e identificación de residuos de pesticidas y otros contaminantes orgánicos en la miel.

En los dos primeros trabajos se presentan dos métodos basados en MSPD para determinar pesticidas empleando la cromatografía de gases con detectores selectivos, como son el de captura de electrones y el detector de nitrógeno – fósforo, mientras que en el siguiente trabajo se muestra un método analítico que permite determinar y confirmar la presencia de residuos de hidrocarburos aromáticos policíclicos. Finalmente, se presenta un trabajo donde es posible la

determinación de forma simultánea de más de cincuenta pesticidas empleando un método basado en la extracción en fase sólida seguida de su análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas.

## 1. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PESTICIDAS EN LA MIEL MEDIANTE LA DISPERSIÓN DE LA MATRIZ EN FASE SÓLIDA Y CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECCIÓN POR CAPTURA DE ELECTRONES

El objetivo de este trabajo ha sido el desarrollo de un método analítico que permita determinar residuos de pesticidas pertenecientes a distintas clases en muestras de miel. La preparación de las muestras para su posterior análisis cromatográfico se ha llevado a cabo empleando la dispersión de la matriz en fase sólida, ya que permite la extracción y purificación de los extractos simultáneamente, lo que supone un ahorro de tiempo y de disolventes.

Entre los pesticidas seleccionados se encuentran el bromopropilato, el cumafos y el fluvalinato, que son acaricidas empleados comúnmente para evitar o controlar el ataque de *Varroa jacobsoni*. La plaga de este ácaro constituye una de las mayores amenazas de las explotaciones apícolas.

La miel es una matriz muy compleja compuesta en su mayoría de monosacáridos, agua, aminoácidos, pigmentos y ceras, lo que dificulta su manipulación. Por este motivo, en la puesta a punto de este método se hicieron una serie de ensayos previos, en los que se probaron disolventes de distinta polaridad, calentando previamente la miel en un baño de agua a unos 45 °C. Los mejores resultados se obtuvieron empleando metanol para disolver completamente la miel.

Una vez elegido el disolvente, se hicieron ensayos con dos adsorbentes, Florisil y alúmina, empleando disolventes de distinta polaridad que permitieran obtener buenas recuperaciones y extractos limpios sin la necesidad de llevar a cabo una posterior purificación de los mismos. Se ensayaron los disolventes hexano, acetato de etilo, acetona y mezclas de los mismos, y los mejores resultados se obtuvieron empleando hexano - acetato de etilo (9:1, v/v), ya que el acetato de etilo aumenta la polaridad del disolvente de extracción lo que favorece la recuperación de los pesticidas más polares. En los extractos se observaba la

aparición de dos fases debido al contenido en agua en la miel, por lo que, el adsorbente elegido, Florisil, se mezcló con sulfato sódico anhidro en una proporción 2,5: 1.

Para mejorar la recuperación de los pesticidas, se estudió el efecto de la sonicación empleando un baño de ultrasonidos a temperatura ambiente y se observó una clara mejoría cuando la extracción era asistida con la sonicación.

El método desarrollado es sencillo y rápido ya que la extracción y la purificación se hacen a la vez permitiendo determinar quince pesticidas en la miel con buenos resultados.

NOTA: Las figuras del trabajo se presentan a continuación del artículo debido a la mala calidad de la impresión.

**DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PESTICIDAS EN LA MIEL MEDIANTE DISPERSIÓN DE LA MATRIZ EN FASE SÓLIDA Y CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECCIÓN POR CAPTURA DE ELECTRONES**

B. Albero, C. Sánchez-Brunete y J.L. Tadeo. "Multiresidue determination of pesticides in honey by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography with electron-capture detection", *Journal of AOAC International* 2001, 84(4), 1165-71.

**Contribución**

Póster. "Analysis of pesticides in honey by MSPD and GC-MS", *7<sup>th</sup> International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Hyphenated Chromatographic Analyzers*, 6-8 Febrero 2002, Brujas, Bélgica.

## RESIDUES AND TRACE ELEMENTS

# Multiresidue Determination of Pesticides in Honey by Matrix Solid-Phase Dispersion and Gas Chromatography with Electron-Capture Detection

BEATRIZ ALBERO, CONSUELO SÁNCHEZ-BRUNETE, and JOSÉ L. TADEO

Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Department of Uso Sostenible del Medio Natural, Apdo. 8111, 28080 Madrid, Spain

**A multiresidue method was developed for the determination of 15 pesticides (organochlorines, organophosphorus compounds, pyrethroids, and other acaricides) in various commercial honeys (eucalyptus, lavender, orange, rosemary, and multifloral). The analytical procedure is based on the matrix solid-phase dispersion of honey in a mixture of Florisil and anhydrous sodium sulfate; the mixture is placed in small plastic columns and extracted with hexane–ethyl acetate (90 + 10, v/v). The pesticide residues are determined by capillary gas chromatography with electron-capture detection. Recoveries with the method at concentrations between 0.15 and 1.5  $\mu\text{g/g}$  ranged from 80 to 113%, and relative standard deviations were <10% for all the pesticides studied. The pesticide detection limits were within the range 0.5–5  $\mu\text{g/kg}$  for organochlorines, around 3  $\mu\text{g/kg}$  for the chlorinated organophosphorus pesticides studied, near 15  $\mu\text{g/kg}$  for fluvalinate, and about 3  $\mu\text{g/kg}$  for the other pyrethroids.**

A great number of acaricides, such as amitraz, bromopropylate, coumaphos, and fluvalinate, have been used to prevent and control *Varroa jacobsoni*, a parasitic mite that causes serious damage to apiculture. Fluvalinate has been one of the most widely used acaricides in beehives because of its low toxicity to honeybees, an LD<sub>50</sub> (topical) of 18  $\mu\text{g}$  a.i./bee, and its relatively low mammalian toxicity with an LD<sub>50</sub> of >3000 mg/kg for rats (1). The chemical treatment to control varroaosis inside beehives has resulted in the contamination of hive products. Furthermore, bees may collect pollens contaminated with pesticides used to control pests in cultivated fields, and these residues may appear in honey.

The conventional methods available for the determination of pesticides in honey generally involve a liquid–liquid extraction of the sample, previously dissolved in water or a water–acetonitrile mixture. Various organic solvents of low po-

larity, alone or in mixtures with other more polar solvents, are used in the extraction procedure. The organic solvents most often used are dichloromethane (2), hexane–acetone (3), hexane (4–9), and petroleum ether (10). The extraction is usually followed by a cleanup step using chromatography on Florisil or octadecyl-bonded silica columns or cartridges. Solid-phase extraction (11–13) has received increasing attention in recent years because of its quickness and economy. Recently, a method was proposed (14) for the determination of pesticides in 1 multifloral honey, using a Florisil packed column that is subsequently eluted with *n*-hexane–dichloromethane (1 + 1, v/v), thus combining extraction and cleanup in the same step. In this method, standards have to be prepared in blank honey extracts to avoid very high recoveries due to matrix effect. Moreover, the extraction solvent, dichloromethane, is toxic and difficult to work with, especially if gas chromatography with electron-capture detection (GC/ECD) is used to analyze the sample extracts.

Matrix solid-phase dispersion (MSPD) is an extraction and cleanup technique that has been developed in recent years to avoid the general drawbacks of liquid–liquid extraction, such as the use of great amounts of toxic organic solvents. This technique is based on dispersion of the sample on an adsorbent, generally Florisil or C<sub>18</sub> (octadecylsilyl-derivatized silica), and it has been used for pesticide residue analysis of food (15–19). Pesticide residues in honey are commonly determined by GC/ECD (2–5, 9–12) or GC with nitrogen–phosphorus detection (2, 3, 6, 7, 14). Liquid chromatography (8) has also been used mainly when pesticides are thermally unstable or not volatile.

The aim of the present work was to develop an alternative MSPD method based on the dispersion of honey samples in Florisil, using a low polarity organic solvent to extract pesticides from different kinds of honey. Materials such as waxes and pigments are retained on the surface of the adsorbent; therefore, a further cleanup step is not necessary and the extract can be analyzed directly. The pesticides are determined by capillary GC/ECD.

**Table 1. Recovery (%)<sup>a</sup> of pesticides from honey fortified at the 0.75 µg/g level**

Compound	Multifloral		Orange		Rosemary		Eucalyptus		Lavender		Average <sup>d</sup>	
	A <sup>b</sup>	B <sup>c</sup>	A	B	A	B	A	B	A	B	X <sub>A</sub>	X <sub>B</sub>
Lindane	95.8 ± 2.2	85.7 ± 13.7	101.4 ± 2.7	89.8 ± 8.4	96.3 ± 4.2	83.3 ± 3.3	94.2 ± 0.6	97.4 ± 0.5	93.9 ± 1.0	92.1 ± 13.9	96.3 ± 3.0	89.7 ± 5.5
Heptachlor	100.6 ± 2.5	83.4 ± 9.1	96.9 ± 0.9	80.9 ± 0.2	98.8 ± 4.0	75.0 ± 6.0	96.0 ± 3.7	79.3 ± 0.8	99.2 ± 0.8	83.4 ± 7.0	98.3 ± 1.8	80.4 ± 3.5
Chlorpyrifos	104.9 ± 3.2	80.6 ± 10.7	96.0 ± 1.0	83.2 ± 1.5	96.1 ± 4.2	79.3 ± 5.1	98.3 ± 2.5	78.9 ± 0.8	102.4 ± 3.4	84.4 ± 10.2	99.5 ± 4.0	81.3 ± 2.4
Aldrin	100.8 ± 2.0	89.0 ± 8.8	106.9 ± 9.6	93.2 ± 0.4	99.8 ± 2.8	89.3 ± 2.3	100.7 ± 2.5	89.8 ± 1.0	99.3 ± 3.8	92.7 ± 9.1	101.5 ± 3.1	90.8 ± 2.0
Chlorfenvinphos	91.7 ± 1.7	84.9 ± 20.3	90.9 ± 0.4	72.2 ± 10.6	90.4 ± 1.9	64.2 ± 3.6	91.9 ± 2.6	48.5 ± 8.1	90.0 ± 5.2	81.0 ± 4.9	91.0 ± 0.8	70.2 ± 14.5
α-Endosulfan	93.0 ± 2.1	74.6 ± 8.6	88.0 ± 1.1	75.7 ± 1.3	93.5 ± 4.1	73.1 ± 3.0	92.4 ± 1.1	71.5 ± 0.9	92.6 ± 0.8	76.6 ± 8.6	91.9 ± 2.2	74.3 ± 2.1
Dieldrin	104.4 ± 3.0	88.5 ± 11.7	102.1 ± 1.1	92.7 ± 1.2	103.2 ± 3.2	88.4 ± 2.5	103.5 ± 3.3	88.6 ± 1.2	102.7 ± 4.6	92.3 ± 11.0	103.2 ± 0.8	90.1 ± 2.2
β-Endosulfan	91.1 ± 2.1	72.2 ± 11.7	95.6 ± 5.9	73.8 ± 4.4	95.8 ± 2.7	72.5 ± 4.2	91.3 ± 2.3	70.2 ± 1.9	92.7 ± 0.2	75.6 ± 11.2	93.3 ± 2.3	72.8 ± 2.0
<i>p,p'</i> -DDT <sup>e</sup>	103.0 ± 3.7	93.8 ± 13.2	102.0 ± 1.8	96.6 ± 0.8	107.0 ± 4.9	93.3 ± 5.5	101.1 ± 1.2	91.3 ± 2.3	100.2 ± 2.5	99.0 ± 12.4	102.7 ± 2.6	94.8 ± 3.0
Endosulfan sulfate	97.6 ± 2.4	59.9 ± 15.1	84.8 ± 3.5	65.1 ± 13.0	94.3 ± 8.7	69.0 ± 6.4	95.4 ± 9.4	65.2 ± 3.7	95.7 ± 4.5	64.8 ± 13.6	93.6 ± 5.0	64.8 ± 3.3
Bromopropylate	115.6 ± 4.3	89.4 ± 15.3	100.2 ± 5.8	89.2 ± 4.7	107.9 ± 5.2	85.3 ± 5.6	109.0 ± 3.9	85.5 ± 3.5	113.3 ± 4.5	92.8 ± 13.7	109.2 ± 5.9	88.4 ± 3.1
Tetradifon	104.9 ± 4.2	83.5 ± 12.6	96.5 ± 1.3	87.7 ± 3.7	101.3 ± 4.3	84.2 ± 1.8	99.8 ± 4.6	83.9 ± 2.4	102.8 ± 3.4	88.6 ± 9.8	101.1 ± 3.2	85.6 ± 2.4
Cyhalothrin	93.5 ± 4.7	62.0 ± 8.7	94.4 ± 5.7	60.8 ± 7.7	92.2 ± 5.7	63.6 ± 1.0	81.3 ± 8.6	60.8 ± 7.4	89.3 ± 1.7	67.4 ± 1.0	90.1 ± 5.3	62.9 ± 2.8
Acrinathrin	87.3 ± 4.2	61.1 ± 3.7	89.8 ± 3.2	61.6 ± 1.5	87.3 ± 4.8	62.4 ± 0.6	82.3 ± 6.6	61.8 ± 9.4	83.6 ± 1.0	65.4 ± 1.5	86.1 ± 3.1	62.5 ± 1.7
Fluvalinate I <sup>f</sup>	98.1 ± 8.5	69.6 ± 16.0	90.3 ± 3.5	66.8 ± 1.8	88.5 ± 1.0	59.2 ± 0.8	89.4 ± 3.7	62.1 ± 2.0	94.3 ± 5.7	69.7 ± 9.8	92.1 ± 4.0	65.5 ± 4.7
Fluvalinate II <sup>f</sup>	93.2 ± 8.4	64.6 ± 15.1	87.1 ± 3.9	60.6 ± 1.3	79.0 ± 2.4	54.2 ± 0.5	83.9 ± 4.0	56.3 ± 2.3	89.3 ± 0.5	63.9 ± 9.5	86.5 ± 5.4	59.9 ± 4.6

<sup>a</sup> Recovery ± standard deviation, % (*n* = 5).<sup>b</sup> A = with sonication.<sup>c</sup> B = without sonication.<sup>d</sup> X<sub>A</sub> = average recovery with sonication; X<sub>B</sub> = average recovery without sonication.<sup>e</sup> Fortification level was 1.5 µg/g.<sup>f</sup> Fortification level was 3.75 µg/g.

**Table 2. Recovery (%)<sup>a</sup> of pesticides from honey samples fortified at 3 levels**

Fortification level, µg/g	Pesticide								
	Lindane	Heptachlor	Chlorpyrifos	Aldrin	Chlorfenvinphos	α-Endosulfan	Dieldrin	β-Endosulfan	<i>p,p'</i> -DDT <sup>b</sup>
	Lavender								
1.5	99.2 ± 1.7	92.8 ± 1.1	98.0 ± 1.2	99.4 ± 0.5	91.5 ± 4.0	94.2 ± 0.1	96.5 ± 0.1	98.3 ± 1.9	98.2 ± 2.3
0.75	93.9 ± 1.0	99.2 ± 0.8	102.4 ± 3.4	99.3 ± 3.8	90.0 ± 5.2	92.6 ± 0.8	102.7 ± 4.6	92.7 ± 0.2	100.2 ± 2.5
0.15	97.7 ± 0.1	101.7 ± 0.8	99.1 ± 1.0	99.8 ± 1.7	91.0 ± 2.8	99.2 ± 1.6	98.2 ± 4.5	102.5 ± 1.5	97.7 ± 2.5
	Eucalyptus								
1.5	97.5 ± 0.7	108.3 ± 1.4	96.6 ± 6.2	94.7 ± 0.6	91.0 ± 9.5	93.6 ± 3.9	99.9 ± 5.3	95.1 ± 0.8	100.9 ± 2.0
0.75	94.2 ± 0.6	96.0 ± 3.7	98.3 ± 2.5	100.7 ± 2.5	91.9 ± 2.6	92.4 ± 1.1	103.5 ± 3.3	91.3 ± 2.3	101.1 ± 1.2
0.15	104.7 ± 0.4	98.5 ± 2.9	97.1 ± 2.3	98.8 ± 3.2	101.4 ± 2.5	92.2 ± 6.6	103.2 ± 1.0	101.9 ± 4.0	101.5 ± 1.4
	Rosemary								
1.5	92.2 ± 3.2	88.9 ± 1.3	96.2 ± 2.0	98.2 ± 1.8	94.2 ± 3.9	96.8 ± 1.1	99.4 ± 2.4	98.5 ± 2.6	102.2 ± 7.5
0.75	96.3 ± 4.2	98.8 ± 4.0	96.1 ± 4.2	99.8 ± 2.8	90.4 ± 1.9	93.5 ± 4.1	103.2 ± 3.2	95.8 ± 2.7	107.0 ± 4.9
0.15	96.9 ± 2.5	99.1 ± 1.8	98.8 ± 2.7	95.9 ± 0.4	87.2 ± 7.0	91.6 ± 4.8	103.3 ± 1.3	96.4 ± 6.2	98.5 ± 3.6
	Orange								
1.5	98.7 ± 1.0	89.7 ± 2.9	93.6 ± 2.2	97.5 ± 2.6	96.7 ± 7.8	97.7 ± 1.0	100.3 ± 0.9	96.4 ± 2.7	106.7 ± 4.2
0.75	101.4 ± 2.7	96.9 ± 0.9	96.0 ± 1.0	106.9 ± 9.6	90.9 ± 0.4	88.0 ± 1.1	102.1 ± 1.1	95.6 ± 5.9	102.0 ± 1.8
0.15	94.8 ± 1.5	96.7 ± 7.3	97.2 ± 6.9	93.9 ± 6.1	90.8 ± 8.7	88.2 ± 1.1	97.8 ± 2.6	96.3 ± 2.0	98.8 ± 0.5
	Multifloral								
1.5	97.5 ± 0.6	84.1 ± 5.3	87.7 ± 5.7	94.4 ± 2.1	90.3 ± 0.2	97.2 ± 1.9	96.4 ± 3.8	94.9 ± 0.6	101.6 ± 1.7
0.75	95.8 ± 2.2	100.6 ± 2.5	104.9 ± 3.2	100.8 ± 2.0	91.7 ± 1.7	93.0 ± 2.1	104.4 ± 3.0	91.1 ± 2.1	103.0 ± 3.7
0.15	90.6 ± 1.6	102.5 ± 8.8	100.1 ± 4.7	96.8 ± 1.2	99.8 ± 2.3	90.4 ± 9.5	100.8 ± 2.6	100.3 ± 5.1	93.6 ± 4.7
Average	96.8 ± 3.5	96.9 ± 6.0	97.5 ± 3.9	98.5 ± 3.3	92.6 ± 3.9	93.4 ± 3.3	100.8 ± 2.7	96.5 ± 3.5	100.9 ± 3.4
	Pesticide								
Fortification level, µg/g	Endosulfan sulfate	Bromopropylate	Tetradifon	Cyhalothrin	Acrinathrin	Fluvalinate I <sup>c</sup>	Fluvalinate II <sup>c</sup>		
	Lavender								
1.5	92.7 ± 2.8	109.9 ± 2.6	100.0 ± 2.4	84.8 ± 6.3	87.8 ± 0.7	95.9 ± 4.1	89.0 ± 3.8		
0.75	95.7 ± 4.5	113.3 ± 4.5	102.8 ± 3.4	89.3 ± 1.7	83.6 ± 1.0	94.3 ± 5.7	89.3 ± 0.5		
0.15	98.0 ± 1.9	100.0 ± 1.8	97.6 ± 2.4	88.6 ± 0.9	81.7 ± 3.4	101.3 ± 2.6	103.3 ± 6.0		
	Eucalyptus								
1.5	88.7 ± 4.9	106.1 ± 6.3	97.9 ± 5.1	82.1 ± 8.4	89.6 ± 9.2	93.1 ± 8.2	91.2 ± 9.8		
0.75	95.4 ± 9.4	109.0 ± 3.9	99.8 ± 4.6	81.3 ± 8.6	82.3 ± 6.6	89.4 ± 3.7	83.9 ± 4.0		
0.15	98.4 ± 0.2	94.2 ± 1.7	92.4 ± 1.9	94.1 ± 0.4	90.1 ± 5.7	92.1 ± 1.1	98.1 ± 0.9		
	Rosemary								
1.5	89.1 ± 7.0	108.7 ± 4.2	101.5 ± 1.6	81.5 ± 0.3	84.6 ± 0.2	101.3 ± 4.9	93.2 ± 4.5		
0.75	94.3 ± 8.7	107.9 ± 5.2	101.3 ± 4.3	92.2 ± 5.7	87.3 ± 4.8	88.5 ± 1.0	80.0 ± 1.8		
0.15	97.0 ± 0.2	98.8 ± 2.7	95.4 ± 0.3	96.0 ± 0.1	87.5 ± 2.0	80.1 ± 6.1	80.6 ± 6.3		
	Orange								
1.5	89.9 ± 3.5	107.8 ± 2.4	90.9 ± 7.2	80.7 ± 1.0	88.4 ± 1.2	92.9 ± 4.1	86.7 ± 1.9		
0.75	84.8 ± 3.5	100.2 ± 5.8	96.5 ± 1.3	94.4 ± 5.7	89.8 ± 3.2	90.3 ± 3.5	87.1 ± 3.9		
0.15	92.9 ± 0.2	92.8 ± 0.1	95.7 ± 0.0	96.0 ± 2.2	94.4 ± 2.2	87.9 ± 1.8	82.4 ± 2.9		

Table 2. (continued)

Fortification level, $\mu\text{g/g}$	Pesticide						
	Endosulfan sulfate	Bromopropylate	Tetradifon	Cyhalothrin	Acrinathrin	Fluvalinate I <sup>a</sup>	Fluvalinate II <sup>a</sup>
	Multifloral						
1.5	81.4 $\pm$ 5.5	98.0 $\pm$ 7.4	87.6 $\pm$ 7.2	85.3 $\pm$ 0.5	95.3 $\pm$ 0.6	81.0 $\pm$ 8.2	84.4 $\pm$ 0.6
0.75	97.6 $\pm$ 2.4	108.4 $\pm$ 5.4	104.9 $\pm$ 4.2	93.5 $\pm$ 4.7	87.3 $\pm$ 4.2	98.1 $\pm$ 8.5	93.2 $\pm$ 8.4
0.15	97.8 $\pm$ 9.0	95.9 $\pm$ 4.0	94.7 $\pm$ 2.6	97.4 $\pm$ 1.0	98.0 $\pm$ 1.2	107.3 $\pm$ 9.2	106.0 $\pm$ 9.4
Average	92.9 $\pm$ 5.2	103.4 $\pm$ 6.5	97.3 $\pm$ 4.7	89.1 $\pm$ 6.1	88.5 $\pm$ 4.7	92.9 $\pm$ 7.3	89.9 $\pm$ 7.8

<sup>a</sup> Recovery  $\pm$  standard deviation, % ( $n = 5$  at each fortification level for each honey sample).

<sup>b</sup> Spiking levels: 3, 1.5, and 0.3  $\mu\text{g/g}$ .

<sup>c</sup> Spiking levels: 7.5, 3.75, and 0.75  $\mu\text{g/g}$ .

## METHOD

### Reagents

(a) *Solvents*.—Residue analysis grade methanol, hexane, and ethyl acetate (Panreac, Barcelona, Spain).

(b) *Anhydrous sodium sulfate*.—Reagent grade (Merck, Darmstadt, Germany).

(c) *Florisil (60–100 mesh)*.—Research grade (Serva, Heidelberg, Germany). Condition by heating at 140°C for 24 h before use.

(d) *Standard stock solutions*.—Pesticide standards (99% minimum purity) were obtained from commercial sources and pesticide manufacturers: lindane, heptachlor, aldrin, dieldrin, chlorpyrifos, chlorfenvinphos,  $\alpha$ -endosulfan,  $\beta$ -endosulfan, *p,p'*-DDT, bromopropylate, tetradifon, and fluvalinate from Reidel de Häen (Seelze, Germany); acrinathrin from Roussel Uclaf (Romainville, France); cyhalothrin from Zeltia Agraria (Madrid, Spain); and endosulfan sulfate from Agrevo Ibérica (Valencia, Spain). Dissolve 50 mg of each pesticide in 100 mL ethyl acetate to obtain a concentration of 0.5 mg/mL. Store at 4°C.

(e) *Standard working solutions*.—Prepare a set of standard mixtures for fortification of honey samples. Transfer 0.5 mL of each pesticide standard stock solution (2.5 mL for fluvalinate and 1.0 mL for *p,p'*-DDT) to a 250 mL volumetric flask, and dilute to volume with methanol to obtain a concentration of 1.0  $\mu\text{g/mL}$  (2.0  $\mu\text{g/mL}$  for *p,p'*-DDT and 5.0  $\mu\text{g/mL}$  for fluvalinate). Transfer 10 and 50 mL aliquots of each working solution to 100 mL volumetric flasks, and dilute with methanol to obtain concentrations of 0.1 and 0.5  $\mu\text{g/mL}$ , respectively (0.2 and 1.0  $\mu\text{g/mL}$  for *p,p'*-DDT and 0.5 and 2.5  $\mu\text{g/mL}$  for fluvalinate). Prepare a set of calibration standard solutions. Transfer 10 mL aliquots (or 20 mL for the lowest level) of the standard working solutions to 100 mL volumetric flasks, adding 10 mL of a 0.5  $\mu\text{g/mL}$  solution of pentachlorobenzene as the internal standard, and dilute to volume with hexane–ethyl acetate (90 + 10, v/v).

### Apparatus

(a) *Extraction columns*.—Polypropylene columns (20 mL) with Whatman No. 1 filter paper circles of 2 cm diameter at the bottom end.

(b) *Ultrasonic water bath*.—Raypa (Barcelona, Spain).

(c) *Vacuum manifold*.—Supelco Visiprep (Bellefonte, PA).

(d) *GC system*.—Hewlett-Packard (Waldbronn, Germany) 5890 Series II gas chromatograph equipped with a Model HP 7673 automatic split-splitless injector, a Model HP 3365 integrator, and a <sup>63</sup>Ni electron-capture detector. A fused silica capillary column (HP-1), with crosslinked dimethylpolysiloxane as the nonpolar stationary phase (30 m  $\times$  0.25 mm id, 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness), supplied by Andaluza de Instrumentación (Sevilla, Spain), was used, with helium as the carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. The injection port and detector temperatures were 250 and 270°C, respectively. The oven temperature was kept at 80°C for 1 min, programmed at 8°C/min to 220°C, held at 220°C for 10 min, programmed at 10°C/min to 270°C, and held at 270°C for 15 min. A 2  $\mu\text{L}$  volume was injected splitless, with the valve closed for 1 min, in a double-taper glass liner with a nominal volume of 800  $\mu\text{L}$ .

### Sample Preparation and Sampling

Heat honey samples at 45°C in water bath to reduce viscosity and facilitate handling. Place 1 g honey in glass tube with screw stopper, and blend with 1.5 mL methanol or with 1.5 mL pesticide mixture in methanol. Homogenize, using vortex until complete dissolution is obtained.

### Sample Extraction and Cleanup

Fill polypropylene columns with mixture of 2.5 g Florisil and 1.0 g anhydrous sodium sulfate. Transfer 1.5 mL of each honey solution in methanol to column. Place columns in tube rack, and close columns with 1-way stopcocks. Extract honey samples with 5 mL hexane–ethyl acetate (90 + 10, v/v), and sonicate in ultrasonic water bath at room temperature for 15 min. Adjust water level to solvent level inside columns. After sonication place columns on vacuum mani-

fold. Collect eluates in graduated glass tubes. Repeat this step with another 5 mL hexane–ethyl acetate (90 + 10, v/v). Dilute total extract to 10 mL with same solvent. For the lowest spiking level, concentrate extract to 5 mL with gentle stream of air. Add pentachlorobenzene as an internal standard at a concentration of 0.05  $\mu\text{g/mL}$ . Analyze extract by GC/ECD.

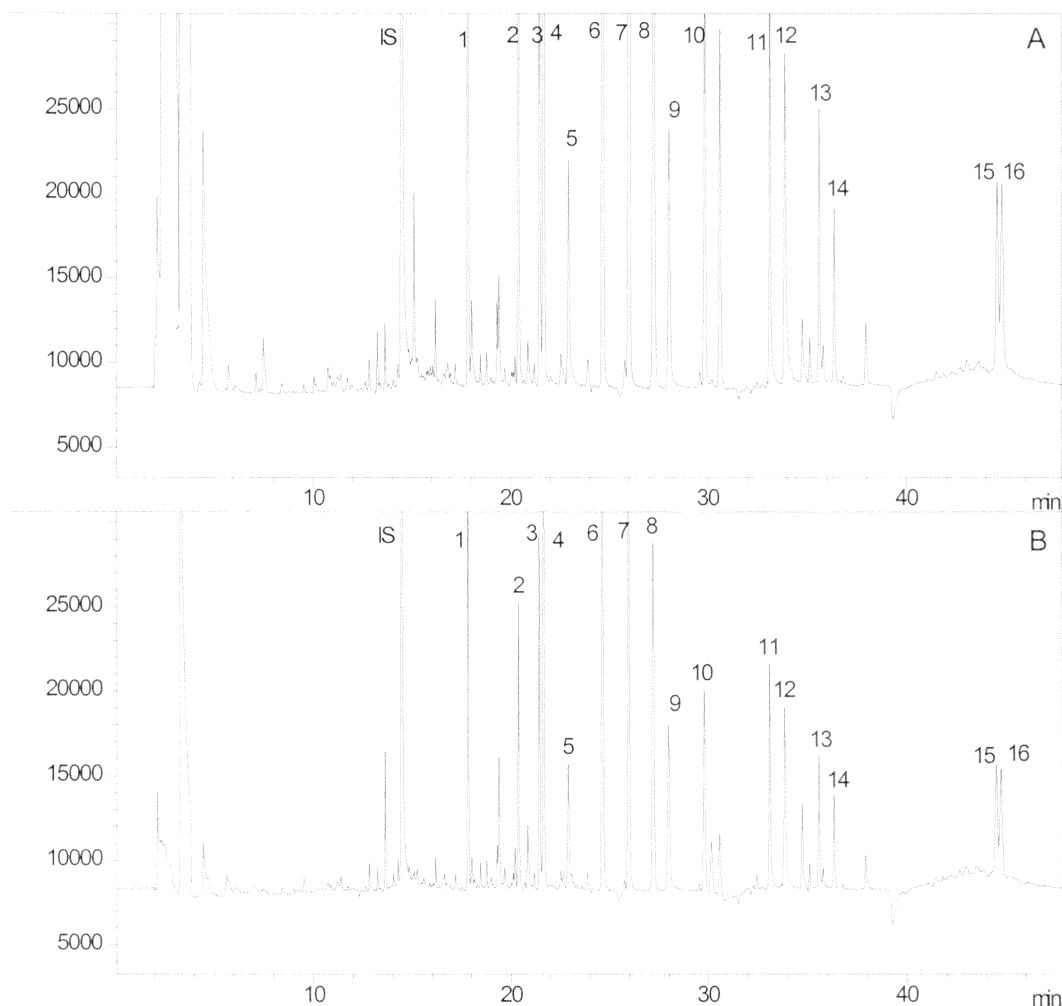
## Results and Discussion

The pesticides studied can be separated with good resolution in 48 min, with the chromatographic program described above. Fluvalinate is the last pesticide eluted from the column and is separated into its tautomers. The ECD response for all the pesticides studied was linear in the concentration range assayed (0.04–0.2  $\mu\text{g/mL}$  for *p,p'*-DDT, 0.1–0.5  $\mu\text{g/mL}$  for fluvalinate, and 0.02–0.1  $\mu\text{g/mL}$  for the other 13 pesticides). Correlation coefficients were  $>0.99$  for all 15 pesticides.

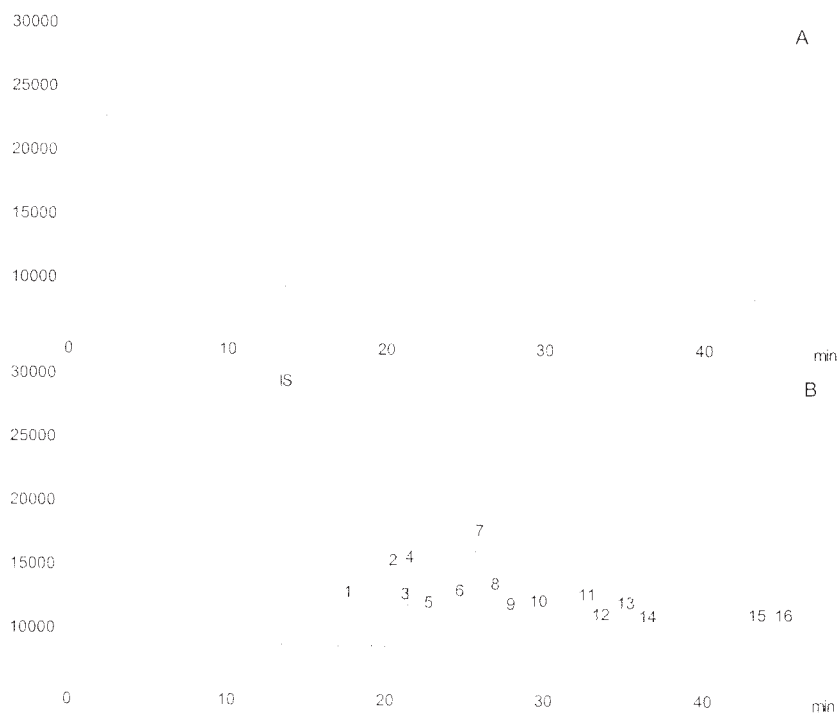
Several types of honey (eucalyptus, lavender, orange, rosemary, and multifloral) were obtained from different Spanish re-

gions: orange honey was collected from the Mediterranean citrus region, eucalyptus honey was from Huelva and Extremadura, and the others were from Guadalajara. Honey is a very complex matrix, formed mainly by carbohydrates, water, amino acids, pigments, and waxes. Its high viscosity hinders manipulation without a previous heating process, which enables the homogenization of honey with the spiking solution. The variable water content in honey may affect the extraction step, and 2 phases may appear in the eluates collected when a solvent of low polarity is used. A mixture of Florisil and anhydrous sodium sulfate was used in the MSPD procedure to avoid the formation of 2 phases. Honey was spiked with methanol solutions because other less polar solvents, such as ethyl acetate, did not allow a good homogenization of the sample. In addition, methanol allows the honey matrix to be dispersed throughout the column before the pesticides are extracted with hexane–ethyl acetate.

Initially, hexane was used in the extraction step, but recoveries of some pesticides were very low, e.g.,  $<40\%$  for



**Figure 1.** Chromatograms obtained for (A) orange honey spiked with each pesticide at 0.75  $\mu\text{g/g}$  (except *p,p'*-DDT at 1.5  $\mu\text{g/g}$  and fluvalinate at 3.75  $\mu\text{g/g}$ ); and (B) rosemary honey spiked with each pesticide at 0.15  $\mu\text{g/g}$  (except *p,p'*-DDT at 0.3  $\mu\text{g/g}$  and fluvalinate at 0.75  $\mu\text{g/g}$ ). See Table 3 for peak identification.



**Figure 2.** Chromatograms obtained for multifloral honey extracts: (A) blank honey sample; and (B) honey sample fortified near the detection limits at the following levels:  $\alpha$ -endosulfan, 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; lindane, aldrin,  $\beta$ -endosulfan, and dieldrin, 1.25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; heptachlor, chlorpyrifos, tetradifon, endosulfan sulfate, chlorfenvinphos, bromopropylate, cyhalothrin, and acrinathrin, 2.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; *p,p'*-DDT, 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; and fluvalinate, 12.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . See Table 3 for peak identification.

**Table 3.** Retention times ( $t_R$ ) and detection limits (LOD) of the pesticides studied

Compound No.	Compound	Formula	$t_R$ , min	LOD, $\mu\text{g}/\text{kg}$
IS <sup>a</sup>	Pentachlorobenzene	C <sub>6</sub> HCl <sub>5</sub>	14.404	—
1	Lindane	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>6</sub>	17.752	1
2	Heptachlor	C <sub>10</sub> H <sub>5</sub> Cl <sub>7</sub>	20.294	2
3	Chlorpyrifos	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> PS	21.339	3
4	Aldrin	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub>	21.555	1
5	Chlorfenvinphos	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>4</sub> P	22.739	3
6	$\alpha$ -Endosulfan	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>6</sub> O <sub>3</sub> S	24.153	0.5
7	Dieldrin	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub> O	25.829	0.5
8	$\beta$ -Endosulfan	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>6</sub> O <sub>3</sub> S	27.060	1
9	<i>p,p'</i> -DDT	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>5</sub>	27.829	5
10	Endosulfan sulfate	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S	29.657	3
11	Bromopropylate	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> Br <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	32.992	3
12	Tetradifon	C <sub>12</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	33.745	3
13	Cyhalothrin	C <sub>23</sub> H <sub>19</sub> ClF <sub>3</sub> NO <sub>3</sub>	35.460	3
14	Acrinathrin	C <sub>26</sub> H <sub>21</sub> F <sub>6</sub> NO <sub>5</sub>	36.211	3
15	Fluvalinate I	C <sub>26</sub> H <sub>22</sub> ClF <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	44.295	15
16	Fluvalinate II	C <sub>26</sub> H <sub>22</sub> ClF <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	44.535	15

<sup>a</sup> IS = internal standard.

acrinathrin. Good recoveries were obtained when hexane–ethyl acetate (90 + 10, v/v) was used. Ethyl acetate increases the polarity of the extracting solvent, allowing good recoveries of the pesticides studied.

The effect of sonication in the extraction of pesticide residues was studied at 0.75 µg/g, and the results are shown in Table 1. Sonication clearly improved the recoveries of the pesticides. Recoveries without sonication were always lower, i.e., <70% for endosulfan sulfate and pyrethroid pesticides, than those obtained with sonication. The average recoveries obtained with sonication were >86% for acrinathrin and fluvalinate and >90% for the rest of the pesticides. Mean relative standard deviations for all of the pesticides studied were <6% at this fortification level. The possible influence of the column material on pesticide recoveries was also evaluated; similar results were obtained when glass columns instead of polypropylene columns were used (data not shown).

Table 2 shows the recovery results obtained with different types of honey. Samples were fortified at 1.5, 0.75, and 0.15 µg/g before extraction. Fluvalinate and *p,p'*-DDT were added at higher concentrations (7.5, 3.75, and 0.75 µg/g for fluvalinate and 3.0, 1.5, and 0.3 µg/g for *p,p'*-DDT) because of their lower sensitivity in GC/ECD. The recoveries of pesticides from the different types of honey at each fortification level ranged from 80 to 113% with relative standard deviations of <10%; the average recoveries for the fortification range assayed were >80%, with relative standard deviations of <8%.

Figure 1 shows representative chromatograms obtained by GC/ECD in analyses of honey fortified at 2 different levels. Interfering compounds such as waxes and pigments that might be coextracted with pesticides are retained in the surface of the Florisil; therefore, a further cleanup step is not necessary. Blank samples of each type of honey were analyzed to ensure the absence of any sort of interference in the analyses of the recovery samples. Figure 2A shows a typical chromatogram obtained for a blank honey sample, and Figure 2B shows a representative chromatogram obtained for a honey sample fortified at levels near the detection limits. The chromatographic peaks present in the chromatogram obtained for the blank honey sample do not match any of the pesticide peaks. The detection limits of the proposed method were determined by considering a value of  $\geq 3$  times the background noise obtained for a honey sample. Table 3 summarizes the detection limits obtained for the individual pesticides. Detection limits were on the order of micrograms per kilogram (ppb), which are similar to or lower than those obtained by conventional methods.

The proposed method was used to analyze 10 commercial honeys of different types from several Spanish regions; no residues of the pesticides studied were found in these samples.

## Conclusions

An MSPD multiresidue method was developed for the determination of 15 pesticides in honey by GC/ECD. The simultaneous extraction and cleanup procedure makes this method simple and rapid, and a good alternative to conventional liquid–liquid extraction methods. In addition, the use of a small volume (10 mL) of the extraction solvent (hexane–ethyl acetate) decreases considerably the risk of using toxic organic solvents, making this procedure safer. The MSPD method produced accurate and precise data that allow the low detection limits needed for monitoring programs.

## Acknowledgment

Financial aid from INIA (Project API 99-012) is acknowledged.

## References

- (1) Tomlin, C. (1994) *The Pesticide Manual*, Crop Protection Publications, Farnham, Surrey, UK
- (2) Al-Rifai, J., & Akeel, N. (1997) *J. Apic. Res.* **36**, 155–161
- (3) Jimenez, J.J., Bernal, J.L., & Atienza, J. (1996) *Chromatographia* **42**, 130–134
- (4) Formica, G. (1984) *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **67**, 896–898
- (5) Waliszewski, S.M., Pardio, V.T., Waliszewski, K.N., Ochoa, A., & Infanzon, P.M. (1998) *J. Sci. Food Agric.* **77**, 149–152
- (6) Garcia, M.A., Fernandez, M.I., & Melgar, M.J. (1995) *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **54**, 825–832
- (7) Garcia, M.A., Fernandez, M.I., Herrero, C., & Melgar, M.J. (1996) *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **56**, 881–887
- (8) Cabras, P., Martini, M.G., Floris, I., & Spanedda, L. (1994) *J. Apic. Res.* **33**, 83–86
- (9) Fernandez Muiño, M.A., & Simal, J. (1991) *Analyst* **116**, 269–271
- (10) Driss, M.R., Zafzouf, M., Sabbah, S., & Bouguerra, M.L. (1994) *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **57**, 63–71
- (11) Taccheo Barbina, M., De Paoli, M., & Valentino, A. (1990) *Pestic. Sci.* **28**, 197–202
- (12) De Paoli, M., & Taccheo Barbina, M. (1992) *Pestic. Sci.* **34**, 61–63
- (13) Fernandez Muiño, M.A., & Simal, J. (1993) *Analyst* **118**, 1519–1522
- (14) Jimenez, J.J., Bernal, J.L., del Nozal, M.J., Toribio, L., & Martin, M.T. (1998) *J. Chromatogr. A* **823**, 381–387
- (15) Lott, H.M., & Barker, S.A. (1993) *J. AOAC Int.* **76**, 67–72
- (16) Ling, Y.C., & Huang, I.P. (1995) *Chromatographia* **40**, 259–266
- (17) Ling, Y.C., & Huang, I.P. (1995) *J. Chromatogr. A* **695**, 75–82
- (18) Torres, C.M., Picó, Y., Redondo, M.J., & Mañes, J. (1996) *J. Chromatogr. A* **719**, 95–103
- (19) Schenck, F.J., & Wagner, R. (1995) *Food Addit. Contam.* **12**, 535–541

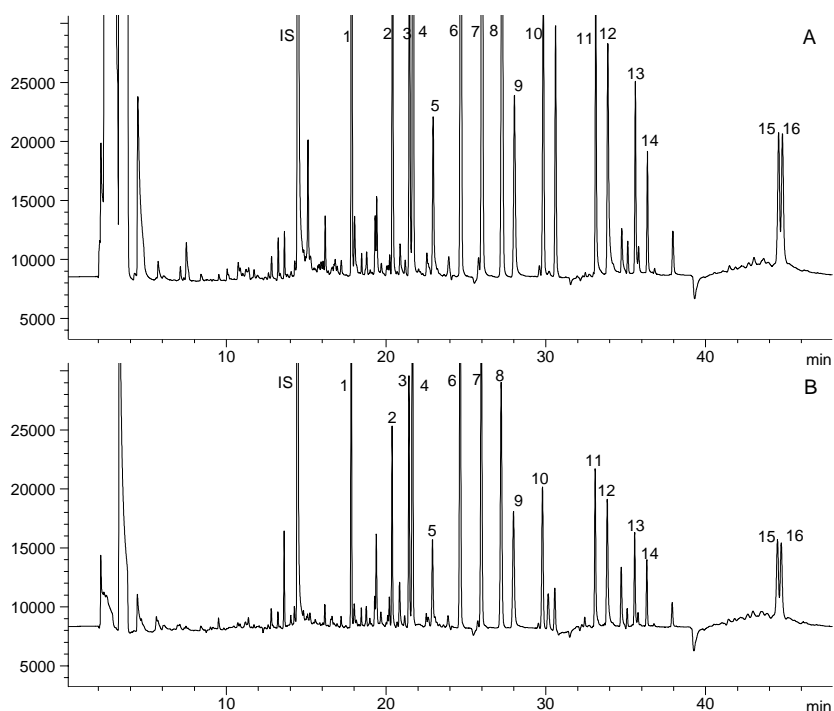


Figure 1. Chromatograms obtained for (A) orange honey spiked with each pesticide at 0.75 µg/g (except p,p'-DDT at 1.5 µg/g and fluralinate at 3.75 µg/g); and (B) rosemary honey spiked with each pesticide at 0.15 µg/g (except p,p'-DDT at 0.3 µg/g and fluralinate at 0.75 µg/g). See Table 3 for peak identification.

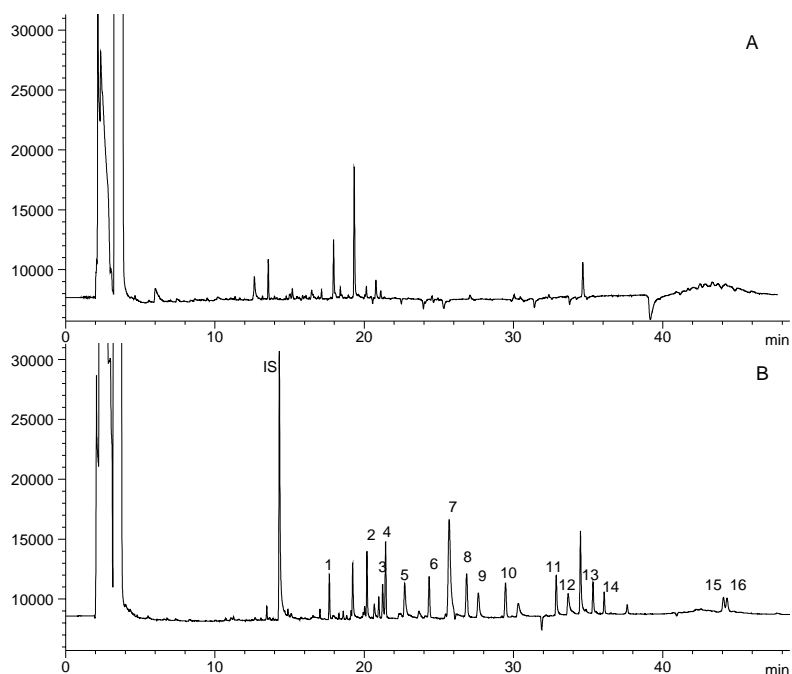


Figure 2. Chromatograms obtained for multifloral honey extracts: (A) blank honey sample; and (B) honey sample fortified near the detection limits at the following levels:  $\alpha$ -endosulfan, 0.5 µg/kg; lindane, aldrin,  $\beta$ -endosulfan, and dieldrin, 1.25 µg/kg; heptachlor, chlorpyrifos, tetradifon, endosulfan sulfate, chlorfenvinphos, bromopropylate, cyhalothrin, and acrinathrin, 2.5 µg/kg; p,p'-DDT, 5 µg/kg; and fluralinate, 12.5 µg/kg. See Table 3 for peak identification.

## **2. DETERMINACIÓN DE INSECTICIDAS EN LA MIEL MEDIANTE DISPERSIÓN DE LA MATRIZ EN FASE SÓLIDA Y CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECCIÓN DE NITRÓGENO-FÓSFORO Y CONFIRMACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

El objetivo de este trabajo ha sido el desarrollo de un método analítico que permitiera determinar doce insecticidas organofosforados junto con el pirimicarb y el amitraz, un acaricida utilizado para controlar plagas de las colmenas.

El método presentado en el trabajo anterior se usó como base para desarrollar el proceso más adecuado para determinar los compuestos objeto de estudio. La cantidad de muestra se aumentó para trabajar a niveles de concentración más bajos y poder así conseguir límites de cuantificación y detección inferiores a los conseguidos en el trabajo anterior.

Se optimizaron distintos parámetros del método, como el adsorbente y el material de las columnas. En este caso, las columnas de vidrio permitían obtener extractos sin compuestos provenientes del material y así se evitaban interferencias en el análisis cromatográfico.

Las recuperaciones fueron mayores del 80% para los insecticidas organofosforados, en cambio para los otros dos compuestos éstas estaban en torno al 60%. En el caso del amitraz, esto puede ser debido a la labilidad de este compuesto, que se degrada en la miel casi completamente después de 15 días cuando ésta se conserva a 20 °C. En cambio, la baja solubilidad del pirimicarb en disolventes orgánicos puede ser la causa de las bajas recuperaciones de este compuesto.

**DETERMINACIÓN DE INSECTICIDAS EN LA MIEL MEDIANTE DISPERSIÓN DE LA MATRIZ EN FASE SÓLIDA Y CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECCIÓN DE NITRÓGENO-FÓSFORO Y CONFIRMACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

C. Sánchez-Brunete, B. Albero, E. Miguel y J.L. Tadeo. "Determination of insecticides in honey by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection and mass spectrometric confirmation", *Journal of AOAC International* 2002, 85(1), 128-33.

# Determination of Insecticides in Honey by Matrix Solid-Phase Dispersion and Gas Chromatography with Nitrogen–Phosphorus Detection and Mass Spectrometric Confirmation

CONSUELO SÁNCHEZ-BRUNETE, BEATRIZ ALBERO, ESTER MIGUEL, and JOSÉ LUIS TADEO<sup>1</sup>

Department of Uso Sostenible del Medio Natural, INIA, Apdo 8111, 28080 Madrid, Spain

**A multiresidue method was developed for the determination of 12 organophosphorus insecticides (diazinon, parathion methyl, fenitrothion, pirimiphosmethyl, malathion, fenthion, chlorpyrifos, quinalphos, methidathion, ethion, azinphosmethyl, coumaphos), one carbamate (pirimicarb), and one amidine (amitraz) in unifloral and multifloral honeys. The analytical procedure was based on the matrix solid-phase dispersion of honey on a mixture of Florisil and anhydrous sodium sulfate in small glass columns and subsequent extraction with a low volume of hexane–ethyl acetate (90 + 10, v/v), assisted by sonication. The insecticide residues were determined by capillary chromatography with nitrogen–phosphorus detection and confirmed by mass spectrometry. Average recoveries at the 0.05–0.5 µg/g levels were >80% for organophosphorus insecticides and about 60% for the other insecticides, pirimicarb and amitraz, with relative standard deviations <10%. The detection limit for the different insecticides ranged between 6 and 15 µg/kg. The main advantages of the proposed method are that extraction and cleanup are performed in a single step with a low volume of organic solvent. The method is simple, rapid, and less laborious than conventional methods. Several Spanish honeys were analyzed with the proposed method and no residues of the studied insecticides were found.**

Pesticides in honey may have different sources. The wide use of these compounds in agriculture can indirectly contaminate honey through pollen or nectar collected by bees in nearby treated fields. In addition, various insecticides are directly used in beehives to control several pests and diseases. *Varroa jacobsoni*, the most serious dangerous pest of honey bees, is usually controlled by applying different acari-

cides or insecticides such as amitraz, coumaphos, and malathion, and these treatments cause the contamination of honey.

Conventional methods available for the determination of insecticides in honey consist of a liquid–liquid extraction with different solvents, generally low polar solvents like petroleum ether (1, 2) or hexane–acetone (3), after dilution of honey with water (4), acetonitrile–water (5, 6), or acetone–water (7) and subsequent cleanup of extracts, usually by column chromatography (6). Solid-phase extraction (SPE; 8–10) and supercritical fluid extraction (SFE; 11) have gained interest in recent years due to the rapidity of these procedures, although high matrix effects have been reported in SPE extraction, and the use of expensive equipment is required in SFE.

Conventional methods generally use large amounts of glassware and organic solvents. Matrix solid-phase dispersion (MSPD) is a new extraction and cleanup technique that requires less time and solvent than conventional methods, providing similar results. In general, polar compounds, such as pigments, are retained on the adsorbent and the extract can be directly analyzed. Residues of pesticides in honey are usually determined by gas chromatography (GC) with electron-capture detection (ECD; 12) or nitrogen–phosphorus detection (NPD; 8, 9), and their identity is confirmed by mass spectrometry (MS; 1).

In the present work, an alternative rapid method for the determination of insecticides in honey, based on MSPD on Florisil, is proposed. Residues were determined by GC–NPD and confirmed by MS. Twelve organophosphorus insecticides, one amidine, and one carbamate were studied.

## Experimental

### Reagents

(a) *Solvents*.—Ethyl acetate, hexane, and methanol, all residue analysis grade (Panreac, Barcelona, Spain).

(b) *Anhydrous sodium sulfate and neutral alumina*.—Reagent grade (Merck, Darmstadt, Germany).

(c) *Florisil (60–100 mesh)*.—Research grade (Serva, Heidelberg, Germany). The adsorbent was heated for 24 h at 140 °C before use.

(d) *Standard stock solutions*.—Pesticide standards (99% purity): diazinon, pirimicarb, parathion methyl, fenitrothion, pirimiphos methyl, malathion, fenthion, chlorpyrifos, quinalphos, methidathion, ethion, azinphos methyl, amitraz, and coumaphos were obtained from Reidel-de Haën (Seelze,

Received June 1, 2001. Accepted by JS August 14, 2001.

<sup>1</sup>Author to whom correspondence should be addressed; e-mail: tadeo@inia.es.

**Table 1. Retention times ( $t_r$ ) and calibration data of the studied pesticides determined by GC-NPD**

Compound	Pesticide	$t_r$ , min	Molecular formula	Calibration data	
				Correl. coeff. ( $r^2$ )	Equation
1	Diazinon	9.75	C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PS	0.998	$5.64 \cdot 10^6 + 1.64 \cdot 10^4$
2	Pirimicarb	10.15	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	1.000	$5.76 \cdot 10^6 - 3.98 \cdot 10^2$
3	Parathion methyl	10.67	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>5</sub> PS	0.998	$5.56 \cdot 10^6 - 1.06 \cdot 10^4$
4	Fenitrothion	11.40	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>5</sub> PS	0.998	$4.74 \cdot 10^6 - 1.56 \cdot 10^3$
5	Pirimiphos methyl	11.61	C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> PS	1.000	$6.06 \cdot 10^6 + 1.96 \cdot 10^3$
6	Malathion	11.76	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> O <sub>6</sub> PS	0.996	$4.65 \cdot 10^6 - 6.45 \cdot 10^3$
7	Fenthion	12.01	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> O <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	1.000	$1.38 \cdot 10^6 + 6.14 \cdot 10^3$
8	Chlorpyrifos	12.24	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> PS	0.996	$4.45 \cdot 10^6 - 4.21 \cdot 10^3$
9	Quinalphos	13.82	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PS	0.997	$5.57 \cdot 10^6 - 9.07 \cdot 10^3$
10	Methidathion	14.16	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> PS <sub>3</sub>	0.999	$4.93 \cdot 10^6 - 3.94 \cdot 10^3$
11	Ethion	17.61	C <sub>9</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub> P <sub>2</sub> S <sub>4</sub>	0.998	$8.01 \cdot 10^6 - 2.02 \cdot 10^4$
12	Azinphos methyl	20.46	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	0.996	$2.77 \cdot 10^6 - 1.04 \cdot 10^4$
13	Amitraz	21.32	C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub>	0.998	$2.71 \cdot 10^6 - 4.21 \cdot 10^3$
14	Coumaphos	22.27	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> ClO <sub>5</sub> PS	0.996	$3.61 \cdot 10^6 - 1.10 \cdot 10^4$

Germany). Stock solutions of each insecticide were prepared in ethyl acetate at 500 g/mL and stored at 4 C.

(e) *Standard working solutions.*—Prepare a set of standard mixtures for fortification of honey samples. Transfer 0.5 mL of each pesticide to a 250 mL volumetric flask and dilute with ethyl acetate for a concentration of 1 g/mL. Transfer 5, 10, and 50 mL working solution to 100 mL volumetric flasks and dilute with methanol for a concentration of 0.05, 0.1, and 0.5 g/mL, respectively. Prepare a set of calibration standard solutions. Transfer 5, 10, and 50 mL of the working solution to 100 mL volumetric flasks and dilute with hexane-ethyl acetate (9 + 1, v/v).

(f) *Samples.*—Various Spanish commercial honeys were purchased: 4 unifloral (eucalyptus, lavender, orange, and rosemary) and one multifloral. Orange honey was from the Mediterranean citrus region, eucalyptus honey from Huelva and Extremadura, and the rest from Guadalajara. Several citrus honeys were collected directly from the producers in Valencia.

#### Apparatus

(a) *Extraction columns.*—Polypropylene and glass columns (20 mL) with Whatman No. 1 filter paper circles of 2 cm diameter (Whatman, Maidstone, UK).

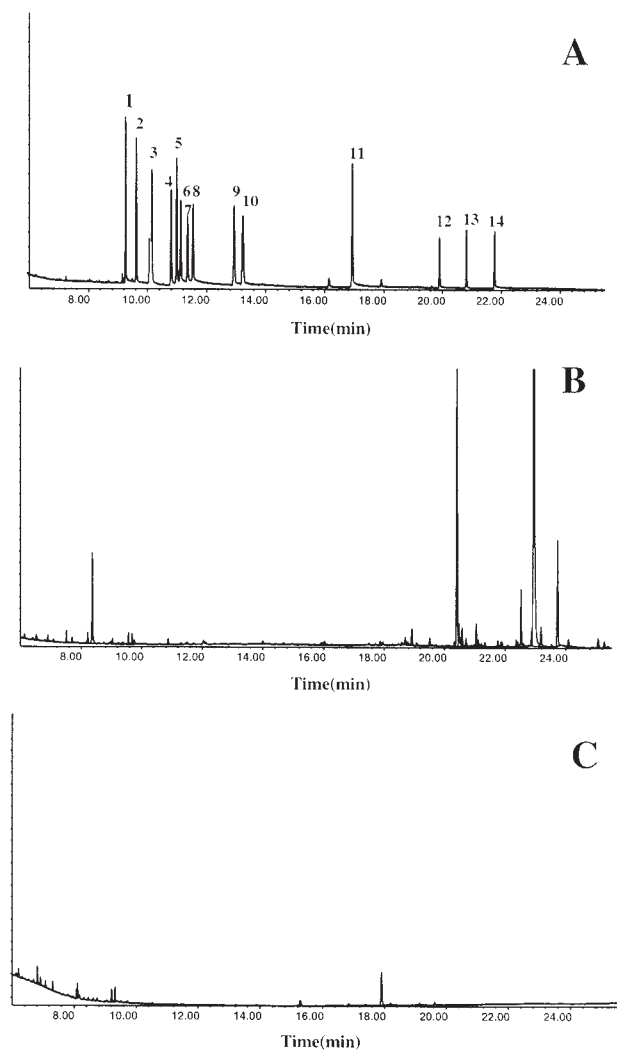
(b) *Ultrasonic water bath.*—Raypa (Barcelona, Spain). The generator of this ultrasonic bath has an output of 150 W and a frequency of 35 kHz.

(c) *Vacuum manifold.*—Supelco Visiprep vacuum manifold (Madrid, Spain).

(d) *Gas chromatograph.*—Hewlett-Packard 6890 (Waldbronn, Germany) equipped with automatic split-splitless injector Model HP 7683 and nitrogen-phosphorus detector. A fused silica

capillary column (HP-1), crosslinked dimethylpolysiloxane, as nonpolar stationary phase (30 m  $\times$  0.25 mm id) and 0.25  $\mu$ m film thickness, supplied by Agilent (Madrid, Spain), was used. The injection port and detector temperatures were 250 and 270 C, respectively, with helium as carrier gas at a flow-rate of 1 mL/min. The oven temperature was kept at 70 C for 1 min and then programmed at 20 C/min to 220 C, held for 7 min, and programmed at 10 C/min to 280 C, held 5 min, total time: 26.5 min. A 2  $\mu$ L volume was injected in the pulse splitless mode, with the valve closed for 1 min, in a double-taper glass liner with a nominal volume of 870  $\mu$ L. The constant flow rates of the hydrogen and air were 3.0 and 60.0 mL/min, respectively, with nitrogen as make-up gas.

GC/MS analysis was performed with a Hewlett-Packard 6890 gas chromatograph equipped with an automatic split-splitless injector model HP 7683 and a mass spectrometric detector (MSD) Model HP 5973. A fused silica capillary column (HP-5MS), diphenyl dimethylpolysiloxane as nonpolar stationary phase (30 m  $\times$  0.25 mm id) and 0.25  $\mu$ m film thickness, supplied by Agilent, was used, with helium as carrier gas at a flow-rate of 1 mL/min. The injection port and detector temperatures were 250 and 270°C, respectively. The oven temperature was held at 50°C for 4 min, programmed to 250°C at 25°C/min, and then held for 5 min. A 2  $\mu$ L volume was injected splitless, with the split valve closed for 1 min. Mass spectrometric parameters: electron-impact ionization with 70 eV energy; ion source temperature, 230°C; MS quad temperature, 150°C; mass range,  $m/z$  50–450; scan rate, 3.62 s per scan, 2 scans; EM voltage, 1000; solvent delay, 5 min.



**Figure 1. Chromatograms of (A) standard mixture solution (0.05  $\mu\text{g/mL}$ ); (B) blank extract of eucalyptus honey obtained with polypropylene column; (C) blank extract of eucalyptus honey obtained with glass column. Peak identification: 1 = diazinon, 2 = pirimicarb, 3 = parathion methyl, 4 = fenitrothion, 5 = pirimiphos methyl, 6 = malathion, 7 = fenthion, 8 = chlorpyrifos, 9 = quinalphos, 10 = methidathion, 11 = ethion, 12 = azinphos methyl, 13 = amitraz, 14 = coumaphos.**

#### Sample Extraction and Cleanup

This method was based on a previously published method (13), with some modifications. Samples of different commercial honeys were heated at 45°C in a water bath to reduce their viscosity before analysis. A 1.5 g amount of honey was placed in a glass tube, blended with 1.5 mL methanol or with a 1.5 mL mixture of the different insecticides for final concentrations in the range of 0.05–0.5 g/g. The mixture was shaken vigorously with a Vortex mixer until the honey was

dissolved. Contents of the tube were transferred to a glass column containing a 3.5 g mixture of Florisil and anhydrous sodium sulfate (2.5 + 1, w/w) at the bottom. Honey samples were extracted with 5 mL hexane–ethyl acetate (90 + 10, v/v) for 15 min in an ultrasonic water bath at room temperature. The water level in the ultrasonic bath was adjusted to equal the extraction solvent level inside the columns. Columns were supported upright in a tube rack and closed with screw-type valves. After extraction, the columns were placed in a rack on top of a multiport vacuum manifold, where the solvent was filtered and collected in graduated tubes. Honey samples were extracted again by sonication with another 5 mL hexane–ethyl acetate (90 + 10, v/v) for 15 min. The combined extracts, collected in 10 mL graduated tubes, were concentrated with a gentle stream of air to an appropriate volume before GC analysis.

#### Quantitation

Sample extracts were analyzed by GC–NPD. The concentration of each compound was determined by comparing the ratio of peak areas in the sample with that found for mixtures of insecticide standards of known concentration.

#### Results and Discussion

The proposed method was used to determine 14 insecticides in honey. Figure 1A shows a representative chromatogram obtained by GC–NPD analysis of a pesticide standard solution. The chromatographic program used allows good resolution of the pesticide mixture in about 22 min. Table 1 summarizes retention times and calibration data of the studied pesticides. The NPD response for all insecticides was linear in the range of concentrations studied (0.05–0.5 g/mL). Good correlation coefficients for these compounds were obtained, ranging from 0.996 to 1.000.

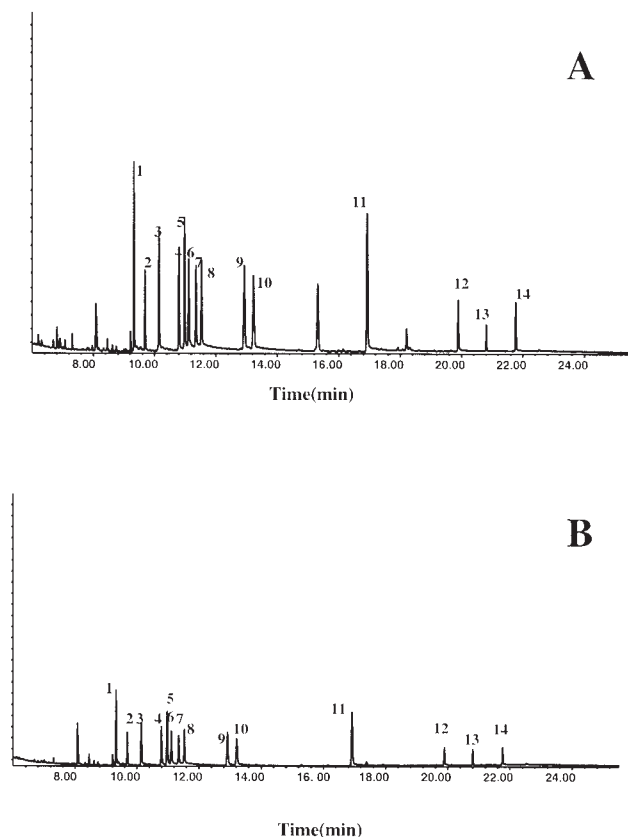
The proposed procedure is based on a previously published method for analysis of pesticides in honey by GC–ECD (13). Honey is a matrix that is difficult to work; it must be heated and diluted to facilitate its manipulation. Initially, plastic (polypropylene) columns were used in the analytical procedure, but several interfering peaks appeared in the chromatograms (Figure 1B). When plastic columns were prewashed with extracting solvent, the interfering peaks decreased, although some variability in the removal of those peaks still remained. Glass columns were then assayed, giving good blank extracts without interfering peaks (Figure 1C), therefore, glass columns were selected. The plastic columns were used in our previous work (13) without interference problems, probably due to the lower response of the interfering peaks in ECD.

Alumina and Florisil were assayed as solid supports for the MSPD procedure, with hexane–ethyl acetate (90 + 10, v/v) used for extraction. The use of alumina as the solid-phase produced very low recoveries for pirimicarb and coumaphos; recoveries for the rest of the compounds were lower than those obtained with Florisil. In addition, Florisil gave the cleanest chromatograms with the lowest base lines and was therefore selected for MSPD. Honey samples have a certain moisture

**Table 2. Recovery of pesticides from honey samples<sup>a</sup>**

Fortification level, g/g	Diazinon	Pirimicarb	Parathion methyl	Fenitrothion	Pirimyphos methyl	Malathion	Fenthion
Lavender							
0.5	101.6 ± 5.2	69.9 ± 5.4	85.5 ± 1.0	98.7 ± 3.4	99.9 ± 4.9	97.2 ± 2.5	100.7 ± 3.7
0.1	103.8 ± 2.8	69.7 ± 4.4	101.0 ± 3.7	97.3 ± 6.1	102.2 ± 5.0	101.3 ± 4.8	100.3 ± 5.1
0.05	100.5 ± 7.2	62.8 ± 5.5	90.9 ± 5.2	96.2 ± 8.3	97.0 ± 6.5	100.1 ± 8.1	97.0 ± 7.1
Eucalyptus							
0.5	94.1 ± 0.5	75.1 ± 3.7	94.0 ± 2.0	104.2 ± 1.3	96.8 ± 3.0	98.3 ± 3.9	105.1 ± 2.3
0.1	98.9 ± 2.6	55.2 ± 3.3	89.5 ± 6.7	97.8 ± 3.5	98.9 ± 3.1	100.3 ± 4.2	98.6 ± 5.2
0.05	94.2 ± 8.7	58.0 ± 4.8	89.3 ± 5.3	100.0 ± 2.8	94.2 ± 3.8	95.8 ± 4.3	90.3 ± 8.4
Rosemary							
0.5	103.2 ± 4.2	68.9 ± 3.3	84.5 ± 3.1	98.2 ± 0.8	98.9 ± 0.6	97.9 ± 1.1	102.0 ± 1.0
0.1	99.8 ± 3.4	55.6 ± 4.5	93.8 ± 1.9	93.9 ± 4.3	101.1 ± 6.0	91.6 ± 5.5	102.4 ± 6.3
0.05	94.7 ± 3.5	47.6 ± 4.2	93.1 ± 5.4	93.6 ± 4.8	92.5 ± 3.9	94.2 ± 4.0	95.1 ± 5.2
Orange							
0.5	111.5 ± 6.1	70.7 ± 2.5	93.6 ± 1.3	104.1 ± 4.2	105.5 ± 6.0	104.8 ± 7.2	110.3 ± 6.3
0.1	97.4 ± 2.8	54.4 ± 3.3	89.8 ± 4.8	92.7 ± 5.4	98.9 ± 7.1	90.5 ± 6.5	100.7 ± 4.9
0.05	98.7 ± 5.0	55.0 ± 4.9	81.6 ± 4.2	89.9 ± 3.9	91.8 ± 4.5	86.2 ± 6.3	90.8 ± 4.5
Multifloral							
0.5	105.3 ± 3.7	69.9 ± 4.1	89.4 ± 3.0	105.7 ± 5.2	101.6 ± 2.5	103.3 ± 3.8	106.3 ± 1.8
0.1	99.8 ± 2.9	61.4 ± 3.9	92.8 ± 2.3	90.9 ± 5.2	99.0 ± 3.8	92.8 ± 4.0	103.1 ± 5.2
0.05	91.6 ± 4.2	51.7 ± 3.9	83.0 ± 5.8	86.8 ± 4.3	86.9 ± 5.1	84.8 ± 6.3	90.8 ± 5.0
Average	99.7 ± 5.0	61.5 ± 8.1	90.2 ± 5.0	96.7 ± 5.5	97.7 ± 4.7	96.0 ± 5.8	99.6 ± 5.8
Fortification level, g/g	Chlorpyrifos	Quinalphos	Methodathion	Ethion	Azinphos methyl	Amitraz	Coumaphos
Lavender							
0.5	93.03 ± 4.1	100.2 ± 5.7	101.1 ± 4.9	95.8 ± 4.4	75.3 ± 2.4	63.7 ± 3.5	85.6 ± 5.5
0.1	102.8 ± 3.4	104.1 ± 3.9	103.8 ± 4.0	98.8 ± 1.7	92.1 ± 3.8	65.7 ± 6.9	89.6 ± 6.0
0.05	99.2 ± 7.0	99.2 ± 6.7	102.1 ± 8.0	101.4 ± 7.2	86.3 ± 8.3	43.0 ± 3.7	81.2 ± 5.2
Eucalyptus							
0.5	101.7 ± 2.5	99.3 ± 3.1	102.4 ± 4.9	101.1 ± 2.4	73.7 ± 5.5	72.2 ± 5.9	92.1 ± 2.0
0.1	99.2 ± 4.3	99.0 ± 2.7	99.5 ± 1.8	99.8 ± 4.2	100.3 ± 3.9	63.6 ± 4.2	78.0 ± 3.0
0.05	98.8 ± 4.8	94.1 ± 5.0	92.8 ± 6.5	98.4 ± 4.1	81.5 ± 3.9	44.1 ± 9.0	71.5 ± 3.8
Rosemary							
0.5	89.7 ± 2.0	98.6 ± 4.7	90.0 ± 2.4	102.7 ± 1.5	81.5 ± 1.6	63.3 ± 2.1	83.7 ± 2.7
0.1	108.0 ± 8.5	101.3 ± 7.4	91.2 ± 4.1	93.0 ± 6.1	84.2 ± 0.9	60.7 ± 4.0	75.8 ± 7.8
0.05	89.8 ± 9.7	96.6 ± 1.2	89.7 ± 10.0	99.2 ± 3.4	80.1 ± 6.0	60.3 ± 4.8	75.9 ± 1.6
Orange							
0.5	103.6 ± 7.5	109.1 ± 4.4	96.9 ± 3.8	107.8 ± 5.9	85.3 ± 6.8	64.1 ± 6.5	83.6 ± 2.7
0.1	93.8 ± 6.7	106.0 ± 9.8	84.5 ± 6.0	89.8 ± 3.4	85.9 ± 4.8	56.8 ± 6.1	78.4 ± 8.0
0.05	84.2 ± 9.0	91.5 ± 4.6	83.4 ± 5.1	96.9 ± 6.4	78.1 ± 8.4	47.6 ± 3.7	72.8 ± 4.0
Multifloral							
0.5	100.6 ± 1.8	106.1 ± 2.2	97.0 ± 2.8	101.4 ± 5.0	87.5 ± 7.9	57.1 ± 4.5	85.6 ± 4.2
0.1	91.9 ± 5.6	98.4 ± 4.3	99.0 ± 2.4	99.5 ± 3.6	103.1 ± 3.9	57.1 ± 6.3	91.4 ± 6.0
0.05	93.3 ± 6.1	89.8 ± 5.3	75.9 ± 4.9	93.9 ± 5.4	72.4 ± 6.1	41.2 ± 8.0	72.4 ± 3.9
Average	96.7 ± 6.4	99.6 ± 5.3	95.2 ± 7.5	98.6 ± 4.3	84.7 ± 9.9	58.2 ± 9.6	81.6 ± 7.2

<sup>a</sup> Recovery, % ± RSD, % (*n* = 4–6 at each fortification level for each honey sample).



**Figure 2.** Chromatograms of (A) eucalyptus honey spiked at 0.1 µg/g, and (B) rosemary honey spiked at 0.01 µg/g.

content. To remove this water content from the extract, a determined amount of anhydrous sodium sulfate was blended with the adsorbent. We obtained good results with a mixture of 1.0 g anhydrous sodium sulfate with 2.5 g Florisil.

Pesticides were extracted from honey with hexane–ethyl acetate (90 + 10, v/v), which is the same solvent used in our previous work. Average recoveries of the organophosphorus insecticides from various honeys (Table 2) following the described method varied from 81 to 100%, with relative standard deviations (RSDs) between 4 and 10%. Average recoveries for the other pesticides, amitraz and pirimicarb, were about 60%. The high water solubility of pirimicarb may explain the lower recovery of this compound, which is in agreement with results reported by others (8). On the other hand, amitraz shows the lowest stability in honey and in different solutions (14, 15), and this could explain its lower recovery. To improve the recovery of these compounds, a higher proportion of ethyl acetate in the extracting solvent was assayed. When a 70 + 30 mixture was used, recoveries of these compounds were higher, but the concentration of waxes also increased, making extracts dirtier and more difficult to analyze by GC. The hexane–ethyl acetate (90 + 10) mixture was then selected because it was previously used with good results for determi-

nation of pesticides in honey by GC–ECD; also, by using this mixture, the number of pesticides determined by the same extracting procedure can be increased. In addition, the recoveries and RSDs of organophosphorus insecticides were very good and, although recoveries of pirimicarb and amitraz were somewhat low, the reproducibility was good enough to allow their determination. Recoveries of organophosphorus insecticides by the proposed method are similar to those reported by other authors (8). Figure 2A shows a representative chromatogram of a sample of honey fortified at an intermediate level, obtained by GC–NPD.

The limit of detection (LOD) of the proposed method for the studied insecticides was calculated using the equation reported by Fong et al. (16):

$$\text{MDL} = t_{.99} s$$

where MDL is the method detection limit,  $s$  is the standard deviation of readings from the identically spiked matrix portions, and  $t_{.99}$  is the confidence interval about the mean, as determined by the Student's  $t$ -test from statistics tables.

Table 3 summarizes the LOD for the pesticides determined by GC–NPD. The MDL for pesticides ranged from 6 to 15 g/kg. These detection limits are of the same order as those reported by others (7, 9, 10). Figure 2B depicts a representative chromatogram of a honey sample fortified near the detection limit (0.01 g/g) of the studied insecticides.

The identity of insecticide residues was confirmed by GC/MS. Table 4 summarizes the pesticide retention times, together with the main ions obtained for each compound and their relative abundances. The main ions found in the mass spectra of these compounds are in agreement with those obtained previously by others (1, 17–19). The absence of coextracted interferences was confirmed by blank extracts

**Table 3.** MDLs of the studied pesticides<sup>a</sup>

Compound	Pesticide	g/kg
1	Diazinon	8
2	Pirimicarb	7
3	Parathion methyl	8
4	Fenitrothion	9
5	Pirimiphos methyl	6
6	Malathion	10
7	Fenthion	7
8	Chlorpyrifos	12
9	Quinalphos	7
10	Methodathion	15
11	Ethion	8
12	Azinphos methyl	10
13	Amitraz	10
14	Coumaphos	8

<sup>a</sup> Calculated at the lowest fortification level, 0.05 g/g.

**Table 4. Main ions and their relative abundance in mass spectra of the studied insecticides**

Compound	Pesticide	$t_r$ , min	$m/z$ , % Relative abundance
1	Diazinon	9.19	137(90)179(100)304 <sup>a</sup> (40)
2	Pirimicarb	9.73	166(100)238 <sup>a</sup> (20)
3	Parathion methyl	10.25	109(100)125(90)263 <sup>a</sup> (80)
4	Fenitrothion	10.94	109(100)260(60)277 <sup>a</sup> (85)
5	Pirimiphos methyl	11.01	276(90)290(100)305 <sup>a</sup> (60)
6	Malathion	11.26	93(80)125(100)173(90)
7	Fenthion	12.01	125(80)207(50)279 <sup>a</sup> (100)
8	Chlorpyrifos	12.63	197(100)258(90)314(30)
9	Quinalphos	13.2	146(100)298 <sup>a</sup> (30)
10	Methidathion	13.94	85(80)145(100)302 <sup>a</sup> (9)
11	Ethion	17.44	153(60)231(100)384 <sup>a</sup> (20)
12	Azinphos methyl	20.46	132(70)160(100)207(30)
13	Amitraz	21.32	122(100)132(90)162(80)298 <sup>a</sup> (45)
14	Coumaphos	22.27	210(40)226(55)362 <sup>a</sup> (100)

<sup>a</sup> Molecular ion.

analysis. All the compounds studied can be identified by their mass spectra, in the National Institute of Standards and Technology (NIST) library, at levels near 15 ppb per compound.

The developed MSPD method was applied to the determination of the studied pesticides in various Spanish honeys. No detectable insecticide residues were found in these samples.

## Conclusions

A rapid multiresidue method, based on MSPD, was developed for the determination of 14 insecticides in honey. With the proposed procedure, the extraction and cleanup of extracts can be performed in a single process, requiring only a low volume of organic solvents. Insecticide residues in honey were determined by capillary GC-NPD and confirmed by MS using selected-ion monitoring. The proposed method is a simple and rapid procedure for the determination of insecticides in honey with good reproducibility and low detection limits.

## Acknowledgment

Financial aid from INIA (Project API99-012) is acknowledged.

## References

- (1) Fernandez Muiño, M.A., & Simal Lozano, J. (1993) *Analyst* **118**, 1519–1522
- (2) Balayannis, P.G., & Santas, L.A. (1992) *J. Apic. Res.* **31**, 70–76
- (3) Jimenez, J.J., Bernal, J.L., & Atienza, J. (1996) *Chromatographia* **42**, 130–134
- (4) Menkissoglu-Spiroudi, U., Diamantidis, G.C., Georgiou, V.E., & Thrasyvoulou, A.T. (2000) *J. AOAC Int.* **83**, 178–182
- (5) Garcia, M.A., Fernandez, M.I., Herrero, C., & Melgar, M.J. (1996) *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **56**, 881–887
- (6) Garcia, M.A., Fernandez, M.I., & Melgar, M.J. (1995) *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **54**, 825–832
- (7) Al-Rifai, J., & Akeel, N. (1997) *J. Apic. Res.* **36**, 155–161
- (8) Jansson, C. (2000) *J. AOAC Int.* **83**, 714–719
- (9) Serpe, L., & Castellano, V. (1993) *Ind. Aliment.* **XXXII**, 512–516
- (10) Jimenez, J.J., Bernal, J.L., del Nozal, M.J., Toribio, L., & Martin, M.T. (1998) *J. Chromatogr. A* **823**, 381–387
- (11) Jones, A., & McCoy, C. (1997) *J. Agric. Food Chem.* **45**, 2143–2147
- (12) Driss, M.R., Zafzouf, M., Sabbah, S., & Bouguerra, M.L. (1994) *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **57**, 63–71
- (13) Albero, B., Sánchez-Brunete, C., & Tadeo, J.L. (2001) *J. AOAC Int.* **84**, 1165–1171
- (14) Bernal, J.L., del Nozal, M.J., & Jimenez, J.J. (1997) *J. Chromatogr. A* **765**, 109–114
- (15) Menkissoglu-Spiroudi, U., Tsigouri, A.D., Thrasyvoulou, A.T., & Diamantidis, G.C. (1999) *1st European Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the Environment*, University of Ioannina, Ioannina, Greece, 147–150
- (16) Fong, W.G., Moye, H.A., Seiber, J.N., & Toth, J.P. (1999) in *Pesticide Residues in Foods*, Vol. 151, J.D. Winefordner (Ed.), J. Wiley & Sons, New York, NY, pp 1–16
- (17) Torres, C.M., Picó, Y., & Mañes, J. (1995) *Chromatographia* **41**, 685–692
- (18) Aguera, A., Contreras, M., & Fernandez-Alba, A.R. (1993) *J. Chromatogr. A* **655**, 293–300
- (19) Sannino, A., Mambriani, P., Bandini, M., & Bolzoni, L. (1995) *J. AOAC Int.* **78**, 1502–1512

### **3. DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN LA MIEL MEDIANTE DISPERSIÓN DE LA MATRIZ EN FASE SÓLIDA Y CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

El objetivo de este trabajo ha sido desarrollar un método que permita llevar a cabo la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) en la miel. La extracción de los mismos se basó en el método desarrollado para el análisis de pesticidas en miel empleando la dispersión de la matriz en fase sólida que se ha presentado en este capítulo. De esta manera sería posible integrar la determinación de PAHs en un método multiresiduos que permitiera el análisis de pesticidas junto con otros contaminantes. Los hidrocarburos elegidos fueron los dieciséis que la US-EPA, agencia estadounidense para la protección del medio ambiente, incluyó en su lista de contaminantes prioritarios, ya que la mayoría de estos compuestos están clasificados como posibles carcinógenos para el ser humano.

La extracción de estos compuestos, debido a su naturaleza, se ha llevado generalmente a cabo empleando disolventes de baja polaridad. Se hicieron ensayos de recuperación empleando distintos disolventes como hexano, ciclohexano, acetonitrilo, diclorometano y hexano-acetato de etilo (9:1), que fue la mezcla de disolventes utilizada en la extracción de pesticidas en miel. Los mejores resultados se obtuvieron con ciclohexano y con la mezcla de hexano-acetato de etilo. A la vista de los buenos resultados obtenidos en los métodos para analizar pesticidas en miel, las muestras se sometieron a dos ciclos de sonicación.

Aunque se consideró que el proceso de extracción en estas condiciones era el óptimo, se hicieron pruebas con alúmina como adsorbente porque los compuestos de mayor peso molecular quedaban más retenidos en el Florisil y como consecuencia, su recuperación era menor. Finalmente, se optó por Florisil porque los resultados en general mostraban que los extractos eran más limpios.

El método desarrollado permite la extracción y la purificación de las muestras simultáneamente, por lo que es un procedimiento sencillo y rápido siendo

por tanto, una alternativa a los métodos clásicos de extracción. Además, se pueden cuantificar residuos de estos compuestos a niveles muy bajos gracias a los buenos límites de cuantificación logrados.

Se analizaron mieles de distinto origen botánico y geográfico y no se detectaron residuos a niveles por encima de sus límites de detección.

**DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN LA MIEL  
MEDIANTE DISPERSIÓN DE LA MATRIZ EN FASE SÓLIDA Y CROMATOGRAFÍA DE  
GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

B. Albero, C. Sánchez-Brunete y J.L. Tadeo. "Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in honey by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography/mass spectrometry", *Journal of AOAC International* 2003, 86(3), 576-82.

**Contribución**

Póster. "Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in honey by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography-mass spectrometry", **10<sup>as</sup>** *Jornadas de Análisis Instrumental*, 26-29 Noviembre 2002, Barcelona, España.

## RESIDUES AND TRACE ELEMENTS

# Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Honey by Matrix Solid-Phase Dispersion and Gas Chromatography/Mass Spectrometry

BEATRIZ ALBERO, CONSUELO SÁNCHEZ-BRUNETE, and JOSÉ L. TADEO<sup>1</sup>

Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Departamento de Medio Ambiente, Apdo. 8111, 28080 Madrid, Spain

**A multiresidue method was developed for the determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in unifloral and multifloral honeys. The analytical procedure is based on the matrix solid-phase dispersion of honey on a mixture of Florisil and anhydrous sodium sulfate in small glass columns and extraction with hexane–ethyl acetate (90 + 10, v/v) with assisted sonication. The PAH residues are determined by gas chromatography with mass spectrometric detection using selected-ion monitoring. Average recoveries for all the PAHs studied were in the range of almost 80 to 101%, with relative standard deviations of 6 to 15%. The limits of detection ranged from 0.04 to 2.9 µg/kg. The simultaneous extraction and cleanup of samples makes this method simple and rapid, with low consumption of organic solvents.**

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a group of organic compounds formed by  $\geq 2$  fused benzene rings, some of which are known or suspected carcinogens or mutagens that are widespread pollutants in the environment. These compounds are introduced in the environment from both natural sources (incomplete combustion of organic matter) and anthropogenic sources (oil spills, waste incineration, traffic, burning of fossil fuels, factory discharge, etc.). PAHs have been studied in numerous environmental matrixes such as water, soil, vegetables, and aquatic organisms.

Contamination of honey with PAHs may come from several sources, such as forest fires, stubble burning, location of beehives near industrial sites, or inadequate practices by beekeepers. In the atmosphere, PAHs are present in the vapor phase or as particles that can travel long distances and that can be deposited onto grains, fruits, and vegetables.

Although large amounts of PAHs are found in nature, the U.S. Environmental Protection Agency (EPA) has suggested a list of 16 as priority pollutants on the basis of their frequency and carcinogenicity. The list includes naphthalene (Naph),

acenaphthylene (Acyl), acenaphthene (Ace), fluorene (Fl), phenanthrene (Phen), anthracene (Anth), fluoranthene (F), pyrene (Py), benzo[a]anthracene (BaA), chrysene (Chr), benzo[b]fluoranthene (BbF), benzo[k]fluoranthene (BkF), benzo[a]pyrene (BaP), dibenzo[a,h]anthracene (DBaA), benzo[g,h,i]perylene (BghiP), and indeno[1,2,3-c,d]pyrene (IcdPy). Figure 1 shows the chemical structures of these compounds.

The extraction procedures most often used for the determination of PAHs in environmental and food samples have been liquid–liquid extraction (1) for water samples or solid-phase extraction (SPE; 2, 3) for water and beverages. Solid-phase microextraction (SPME; 4, 5), supercritical fluid extraction (SFE; 6–8), and microwave-assisted extraction (MAE; 9) have also been used recently for the determination of these compounds in food, especially food of animal origin. Before extraction by these procedures, Soxhlet extraction was used for complex samples (10, 11). Biological tissues, such as meat or marine animals, usually need a previous saponification step because of their lipid content. Generally, the extraction solvents used are acetonitrile (8), methylene chloride (9), cyclohexane (12), hexane (13), or mixtures of these compounds (3).

Matrix solid-phase dispersion (MSPD) is a simultaneous extraction and cleanup technique that requires less time and solvent than do conventional methods. This technique is based on dispersion of the sample on an adsorbent, usually Florisil or C<sub>18</sub>. Because compounds such as waxes and pigments are retained on the surface of the adsorbent, a further cleanup step is not necessary, and the extract can be analyzed directly.

PAHs are mainly determined by liquid chromatography with fluorescence detection (2, 3, 8, 11, 14) or by gas chromatography (GC) with mass spectrometric detection (6, 10, 12, 15). GC coupled with mass spectrometry (GC/MS) has the advantages of high selectivity and sensitivity that allow the determination of numerous PAHs in a single analysis. Synchronous spectrofluorimetric determination, based on the simultaneous variation of emission and excitation wavelengths, has been used mainly to determine PAHs in water samples (13, 16).

As far as we know, no analytical method for the determination of PAHs in honey has been published in the scientific literature. The aim of this work was to develop a method for the determination of PAHs in different kinds of honey, based on

Received July 15, 2002. Accepted by JS October 23, 2002.

<sup>1</sup> Author to whom correspondence should be addressed: e-mail: tadeo@inia.es.

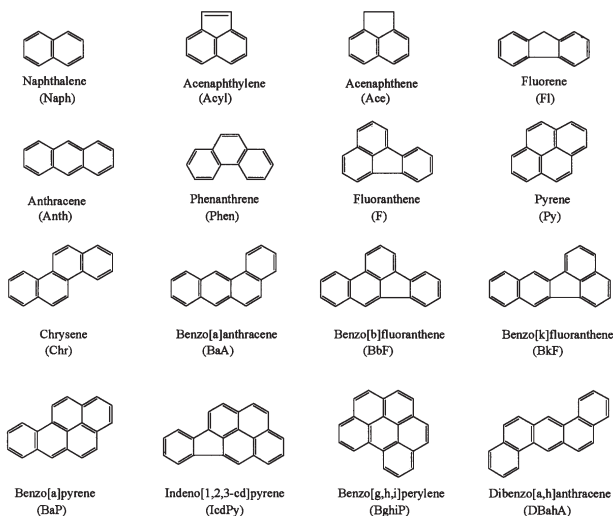


Figure 1. Chemical structures of the PAHs studied.

the MSPD of samples on Florisil. PAH residues were determined by GC/MS with selected-ion monitoring (SIM).

## METHOD

### Reagents

(a) *Solvents*.—Residue analysis grade methanol, hexane, and ethyl acetate (Scharlau, Barcelona, Spain); acetonitrile, cyclohexane, and methylene chloride (Panreac, Barcelona, Spain).

(b) *Anhydrous sodium sulfate*.—Reagent grade (Sigma-Aldrich, Steindhem, Germany).

(c) *Florisil (60–100 mesh)*.—Research grade (Fluka Chemie, Buchs, Switzerland). The adsorbent was heated for 24 h at 140°C before use.

(d) *Standard stock solutions*.—A standard solution of the 16 EPA-priority PAHs (each at 2000 µg/mL) in methylene chloride–benzene (50 + 50) was supplied by Sigma-Aldrich. The mixture was diluted with ethyl acetate to a concentration of 20 µg/mL for each PAH, and the final standard stock solution was stored at 4°C.

(e) *Standard working solutions*.—Prepare a set of standard mixtures for fortification of honey samples. Transfer 5 mL stock solution to a 25 mL volumetric flask, and dilute to volume with methanol to give a concentration of 4 µg/mL. Transfer 10 mL working solution to a 50 mL volumetric flask, and dilute to volume with methanol to give a concentration of 0.8 µg/mL. Transfer 5 and 0.5 mL of this last working solution to 20 mL volumetric flasks, and dilute to volume with methanol to give concentrations of 0.2 and 0.02 µg/mL, respectively.

(f) *Samples*.—Several Spanish honeys were purchased: 4 unifloral (eucalyptus, lavender, rosemary, and thyme) and 1 multifloral.

### Apparatus

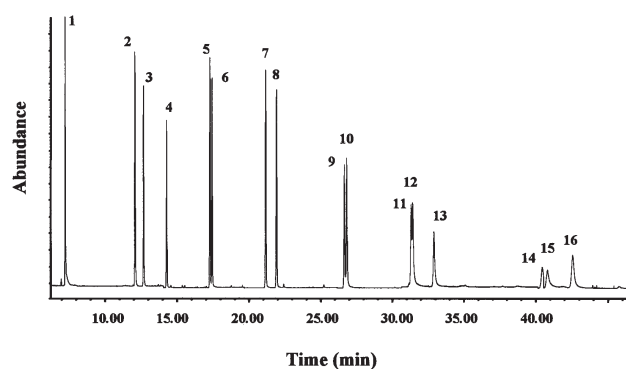
(a) *Extraction columns*.—Glass, 20 mL, with Whatman No. 1 filter paper circles of 2 cm id (Whatman, Maidstone, UK).

(b) *Ultrasonic water bath*.—Raypa (Barcelona, Spain).

Table 1. Main ions and their relative abundance in the mass spectra of the PAHs studied

Compound	PAH			
	Name	Abbreviation	t <sub>R</sub> , min	m/z (% relative abundance)
1	Naphthalene	Naph	7.08	127(13), 128 <sup>a</sup> (100), 129(11)
2	Acenaphthylene	AcyI	11.93	150(13), 151(16), 152 <sup>a</sup> (100), 153(12)
3	Acenaphthene	Ace	12.52	152(48), 153 <sup>a</sup> (100), 154(94)
4	Fluorene	Fl	14.12	163(14), 165(87), 166 <sup>a</sup> (100)
5	Phenanthrene	Phen	17.14	176(18), 178 <sup>a</sup> (100), 179(16)
6	Anthracene	Anth	17.28	176(18), 178 <sup>a</sup> (100), 179(15)
7	Fluoranthene	F	21.02	101(11), 200(21), 202 <sup>a</sup> (100)
8	Pyrene	Py	21.78	101(12), 200(21), 202 <sup>a</sup> (100)
9	Benzo[a]anthracene	BaA	26.52	226(25), 228 <sup>a</sup> (100), 229(20)
10	Chrysene	Chr	26.68	226(28), 228 <sup>a</sup> (100), 229(21)
11	Benzo[b]fluoranthene	BbF	31.18	126(13), 250(22), 252 <sup>a</sup> (100), 253(22)
12	Benzo[k]fluoranthene	BkF	31.29	126(15), 250(21), 252 <sup>a</sup> (100), 253(22)
13	Benzo[a]pyrene	BaP	32.78	126(11), 250(23), 252 <sup>a</sup> (100)
14	Indeno[1,2,3-c,d]pyrene	IcdPy	40.35	138(19), 276 <sup>a</sup> (100), 277(26)
15	Dibenzo[a,h]anthracene	DBahA	40.69	138(14), 276(31), 278 <sup>a</sup> (100), 279(26)
16	Benzo[g,h,i]perylene	BgHiP	42.43	138(18), 274(21), 276 <sup>a</sup> (100), 277(25)

<sup>a</sup> Quantitation ion.



**Figure 2.** Chromatogram obtained by GC/MS in the SIM mode for a standard mixture of PAHs at 0.01  $\mu\text{g/mL}$ . See Table 1 for peak identification.

(c) *Vacuum manifold*.—Supelco Visiprep (Madrid, Spain).

(d) *GC/MS system*.—Hewlett-Packard Model 6890 gas chromatograph (Waldbronn, Germany) equipped with a Hewlett-Packard Model HP 7683 automatic injector and a Hewlett-Packard 5973 series mass-selective detector. The mass spectrometer was operated in the electron-impact ionization mode (ionizing energy of 70 eV) scanning from  $m/z$  50 to 450 at 3.62 scan/s. The ion source and quadrupole temperatures were 230 and 150°C, respectively. A fused-silica capillary column (ZB-5MS), 30 m  $\times$  0.25 mm id, with 5% phenyl polysiloxane, 0.25 mm id, as the nonpolar stationary phase was supplied by Phenomenex (Torrance, CA). Operating con-

ditions were as follows: injector port temperature, 290°C; injection volume, 2  $\mu\text{L}$ , in pulsed splitless mode (pulsed pressure, 45 psi for 1.5 min); helium as the carrier gas at a flow rate of 1 mL/min; GC/MS interface temperature, 250°C; oven temperature program: 80°C for 0.5 min, from 80 to 230°C at 8°C/min, from 230 to 280°C at 5°C/min, and held at 280°C for 17 min; solvent delay, 6 min. The total analysis time was 46.25 min, and the equilibration time was 2 min.

SIM was used with 10 acquisition windows for MS analysis as follows: (1) from 0 to 11.0 min,  $m/z$  128, 129; (2) from 11.0 to 13.9 min,  $m/z$  152, 153; (3) from 13.9 to 16.9 min,  $m/z$  165, 166; (4) from 16.9 to 19.5 min,  $m/z$  178, 179; (5) from 19.5 to 26.0 min,  $m/z$  101, 202; (6) from 26.0 to 30.5 min,  $m/z$  226, 228, 229; (7) from 30.5 to 40.0 min,  $m/z$  250, 252; (8) from 40.0 to 40.5 min,  $m/z$  138, 276; (9) from 40.5 to 42.0 min,  $m/z$  138, 276, 278; and (10) from 42.0 to 46.2 min,  $m/z$  276, 277. The dwell time for the ions monitored was 100 ms.

#### Sample Extraction and Cleanup

This method is based on a previously published method for the determination of pesticide residues in honey (17, 18). Samples of different commercial honeys were heated at 45°C in a water bath to reduce their viscosity before handling. A 1.5 g portion of honey was placed in a glass tube with screw stopper and blended with 1.5 mL methanol or with 1.5 mL PAH mixture to produce a final concentration in the range of 0.02–0.8  $\mu\text{g/g}$ . The mixture was homogenized by using a Vortex mixer for complete dissolution; 2 mL of the resulting honey solution was transferred to a glass column filled with

**Table 2.** Effect of various extraction solvents on the recovery (%)<sup>a</sup> of PAHs from lavender honey fortified at 0.5  $\mu\text{g/g}$

Compound	Hexane	Cyclohexane	Methylene chloride	Hexane–ethyl acetate (90 + 10, v/v)
Naph	70.5 $\pm$ 19.0	92.0 $\pm$ 3.9	53.8 $\pm$ 5.3	85.3 $\pm$ 9.2
Acyl	70.8 $\pm$ 17.1	96.0 $\pm$ 3.7	65.8 $\pm$ 7.2	92.0 $\pm$ 7.5
Ace	70.0 $\pm$ 16.8	93.0 $\pm$ 3.9	63.3 $\pm$ 7.2	91.0 $\pm$ 6.4
Fl	74.8 $\pm$ 18.8	100.0 $\pm$ 4.4	70.5 $\pm$ 8.7	97.8 $\pm$ 7.3
Phen	72.5 $\pm$ 19.1	99.0 $\pm$ 5.9	74.0 $\pm$ 10.1	99.3 $\pm$ 8.5
Anth	65.3 $\pm$ 18.2	94.5 $\pm$ 8.2	65.5 $\pm$ 7.7	93.0 $\pm$ 8.8
F	64.0 $\pm$ 18.5	88.0 $\pm$ 3.6	60.8 $\pm$ 11.1	88.0 $\pm$ 6.7
Py	63.5 $\pm$ 18.6	87.0 $\pm$ 3.6	60.3 $\pm$ 10.8	87.3 $\pm$ 6.8
BaA	52.5 $\pm$ 19.9	81.7 $\pm$ 7.1	58.3 $\pm$ 15.7	84.8 $\pm$ 8.7
Chr	55.0 $\pm$ 20.0	83.7 $\pm$ 5.8	55.0 $\pm$ 14.9	86.5 $\pm$ 7.2
BbF	39.4 $\pm$ 18.7	71.7 $\pm$ 10.1	49.7 $\pm$ 15.4	77.7 $\pm$ 7.1
BkF	42.5 $\pm$ 19.7	71.7 $\pm$ 8.5	47.0 $\pm$ 15.2	78.2 $\pm$ 6.9
BaP	37.2 $\pm$ 20.1	75.7 $\pm$ 15.8	55.6 $\pm$ 18.8	89.5 $\pm$ 10.5
IcdPy	30.4 $\pm$ 16.9	63.8 $\pm$ 7.3	51.9 $\pm$ 22.9	96.1 $\pm$ 9.6
DBahA	20.4 $\pm$ 12.1	44.6 $\pm$ 15.9	40.0 $\pm$ 19.4	73.8 $\pm$ 8.8
BghiP	33.9 $\pm$ 17.2	69.0 $\pm$ 12.3	45.4 $\pm$ 18.9	81.1 $\pm$ 9.1

<sup>a</sup> Each value is recovery  $\pm$  relative standard deviation, % ( $n = 4$ ).

**Table 3. Recovery (%) of Naph, Acyl, Ace, Fl, Phen, Anth, F, Py, and BaA from honey samples<sup>a</sup>**

PAH added, µg/g	Naph	Acyl	Ace	Fl	Phen	Anth	F	Py	BaA
Lavender									
0.8	99.5 ± 14.8	94.9 ± 5.4	92.5 ± 4.3	98.9 ± 5.0	99.8 ± 5.5	98.0 ± 5.8	90.5 ± 6.0	89.9 ± 5.5	91.8 ± 8.3
0.2	79.3 ± 2.3	90.6 ± 3.5	89.3 ± 3.5	97.9 ± 3.4	102.4 ± 2.9	90.9 ± 3.8	91.9 ± 3.7	88.8 ± 3.8	87.9 ± 6.9
0.02	93.8 ± 12.4	87.5 ± 6.5	88.9 ± 5.7	92.3 ± 14.6	102.8 ± 10.9	96.0 ± 6.7	95.6 ± 7.7	91.6 ± 9.6	97.6 ± 14.7
Eucalyptus									
0.8	90.8 ± 15.2	91.7 ± 7.9	90.2 ± 8.4	96.3 ± 9.4	97.2 ± 8.2	96.2 ± 9.4	88.0 ± 6.3	87.5 ± 8.1	89.3 ± 7.8
0.2	79.4 ± 4.7	89.4 ± 5.9	88.6 ± 5.2	96.6 ± 6.2	101.6 ± 10.1	87.9 ± 7.6	89.9 ± 9.5	85.1 ± 8.1	92.6 ± 5.4
0.02	92.8 ± 10.1	83.0 ± 5.5	86.3 ± 5.1	98.5 ± 6.4	107.5 ± 4.5	85.6 ± 8.3	90.6 ± 9.7	88.8 ± 4.3	95.8 ± 8.6
Rosemary									
0.8	96.8 ± 9.9	103.0 ± 3.6	102.3 ± 4.7	108.9 ± 5.8	109.1 ± 5.6	105.1 ± 5.9	98.0 ± 4.6	98.0 ± 5.3	96.4 ± 7.2
0.2	86.8 ± 2.7	100.5 ± 3.2	98.8 ± 2.7	108.0 ± 3.0	107.0 ± 4.0	97.4 ± 3.4	102.1 ± 5.6	96.1 ± 4.0	92.0 ± 6.2
0.02	93.0 ± 15.8	93.3 ± 15.5	95.4 ± 18.6	95.9 ± 17.6	113.3 ± 18.4	99.7 ± 15.9	106.5 ± 18.9	99.0 ± 19.1	102.6 ± 18.8
Thyme									
0.8	92.0 ± 6.8	95.9 ± 5.3	93.9 ± 4.6	100.1 ± 4.8	100.4 ± 4.9	96.6 ± 5.0	89.3 ± 5.2	88.9 ± 5.4	83.1 ± 5.8
0.2	84.4 ± 5.6	94.9 ± 3.4	93.9 ± 3.2	101.9 ± 3.6	100.5 ± 4.1	92.6 ± 3.9	94.3 ± 3.7	89.5 ± 3.6	90.4 ± 5.9
0.02	84.4 ± 16.2	85.3 ± 12.0	81.0 ± 13.0	92.3 ± 15.3	100.3 ± 17.7	83.3 ± 15.6	93.2 ± 11.4	85.0 ± 5.3	82.1 ± 11.2
Multifloral									
0.8	93.1 ± 18.0	90.5 ± 7.2	89.1 ± 5.5	94.8 ± 5.1	95.1 ± 5.5	92.5 ± 6.3	85.8 ± 7.9	85.3 ± 6.7	89.2 ± 7.6
0.2	89.4 ± 3.0	105.8 ± 2.1	103.6 ± 1.5	94.8 ± 12.1	114.9 ± 4.4	104.4 ± 3.6	112.1 ± 6.0	106.4 ± 6.2	103.8 ± 10.9
0.02	100.0 ± 14.3	94.5 ± 9.3	93.3 ± 13.8	97.8 ± 15.9	115.9 ± 11.6	102.2 ± 12.6	117.5 ± 10.9	112.5 ± 15.8	115.2 ± 12.7
Average	89.4 ± 11.3	92.1 ± 7.4	94.2 ± 6.9	96.4 ± 8.6	101.1 ± 7.8	99.5 ± 7.5	95.4 ± 9.6	93.3 ± 8.6	92.1 ± 9.7

<sup>a</sup> Each value is recovery ± relative standard deviation, % (n = 4).

**Table 4. Recovery (%) of Chr, BbF, BkF, BaP, IcdPy, DBahA, and BghiP (DbahA, BghiP, and IcdPy) from honey samples<sup>a</sup>**

PAH added, $\mu\text{g/g}$	Chr	BbF	BkF	BaP	IcdPy	DBahA	BghiP
Lavender							
0.8	94.1 $\pm$ 7.7	86.4 $\pm$ 11.1	89.1 $\pm$ 9.9	97.0 $\pm$ 11.6	78.6 $\pm$ 13.6	72.1 $\pm$ 12.3	80.5 $\pm$ 10.1
0.2	88.6 $\pm$ 5.2	83.3 $\pm$ 9.4	82.8 $\pm$ 8.3	91.6 $\pm$ 10.7	78.0 $\pm$ 19.5	72.3 $\pm$ 19.0	80.5 $\pm$ 14.4
0.02	98.0 $\pm$ 8.5	96.0 $\pm$ 7.9	85.9 $\pm$ 13.4	99.0 $\pm$ 13.2	87.8 $\pm$ 13.1	73.5 $\pm$ 19.8	73.8 $\pm$ 11.4
Eucalyptus							
0.8	83.9 $\pm$ 15.4	77.1 $\pm$ 15.8	81.0 $\pm$ 16.0	86.9 $\pm$ 18.2	71.6 $\pm$ 3.4	66.2 $\pm$ 3.0	73.0 $\pm$ 4.9
0.2	83.1 $\pm$ 11.5	77.6 $\pm$ 15.3	77.0 $\pm$ 12.2	81.1 $\pm$ 16.3	74.2 $\pm$ 18.5	69.1 $\pm$ 18.3	71.1 $\pm$ 15.9
0.02	98.3 $\pm$ 6.8	86.9 $\pm$ 12.8	80.4 $\pm$ 11.4	98.2 $\pm$ 12.2	99.0 $\pm$ 13.1	65.5 $\pm$ 16.2	68.5 $\pm$ 8.9
Rosemary							
0.8	97.4 $\pm$ 7.5	89.5 $\pm$ 10.9	91.9 $\pm$ 9.4	98.1 $\pm$ 9.1	82.6 $\pm$ 16.4	72.7 $\pm$ 17.2	84.1 $\pm$ 13.3
0.2	94.4 $\pm$ 5.1	89.1 $\pm$ 7.1	88.9 $\pm$ 5.3	86.1 $\pm$ 5.8	76.9 $\pm$ 7.1	71.7 $\pm$ 6.1	83.7 $\pm$ 8.5
0.02	104.9 $\pm$ 18.5	101.6 $\pm$ 18.9	94.4 $\pm$ 15.0	104.6 $\pm$ 15.9	98.4 $\pm$ 19.0	86.1 $\pm$ 16.9	81.6 $\pm$ 10.5
Thyme							
0.8	83.8 $\pm$ 6.3	79.0 $\pm$ 5.6	80.0 $\pm$ 5.2	90.6 $\pm$ 12.6	86.3 $\pm$ 15.3	74.8 $\pm$ 19.5	74.8 $\pm$ 14.0
0.2	92.9 $\pm$ 5.9	89.6 $\pm$ 7.5	89.0 $\pm$ 5.7	97.8 $\pm$ 8.2	88.6 $\pm$ 10.4	86.1 $\pm$ 10.5	86.3 $\pm$ 10.0
0.02	93.3 $\pm$ 13.1	88.3 $\pm$ 15.1	81.0 $\pm$ 11.4	97.7 $\pm$ 17.2	85.2 $\pm$ 14.7	85.0 $\pm$ 9.3	72.3 $\pm$ 16.2
Multifloral							
0.8	88.2 $\pm$ 9.7	84.4 $\pm$ 10.0	82.3 $\pm$ 5.7	97.7 $\pm$ 6.8	88.9 $\pm$ 6.6	69.0 $\pm$ 4.6	87.6 $\pm$ 7.4
0.2	101.5 $\pm$ 7.5	108.3 $\pm$ 14.8	99.6 $\pm$ 9.6	105.7 $\pm$ 9.3	105.0 $\pm$ 8.3	89.4 $\pm$ 2.9	93.0 $\pm$ 5.9
0.02	98.0 $\pm$ 18.3	105.0 $\pm$ 9.3	109.0 $\pm$ 16.2	111.3 $\pm$ 10.0	105.3 $\pm$ 13.0	82.5 $\pm$ 4.9	91.0 $\pm$ 17.2
Average	91.7 $\pm$ 10.0	89.4 $\pm$ 13.8	87.4 $\pm$ 11.6	89.8 $\pm$ 13.1	88.4 $\pm$ 15.3	78.9 $\pm$ 13.9	78.2 $\pm$ 12.1

<sup>a</sup> Each value is recovery  $\pm$  relative standard deviation, % ( $n = 4$ ).

3.5 g Florisil–anhydrous sodium sulfate (2.5 + 1, w/w). The honey sample, dispersed throughout the column by the methanol used in the preparation of the sample was extracted with 5 mL hexane–ethyl acetate (90 + 10, v/v) for 15 min in an ultrasonic bath at room temperature. The water level of the bath was adjusted to the solvent level inside the column. The column was supported upright in a tube rack and closed with a 1-way stopcock. After sonication, the column was placed in a vacuum manifold, where the eluate was collected in a 10 mL graduated glass tube. This step was repeated with another 5 mL extraction solvent. For the highest spiking level, the combined eluates were diluted to 10 mL with the same solvent. For the other 2 spiking levels, the eluates were concentrated with a gentle stream of air to an appropriate volume (2 mL for the lowest level and 5 mL for the intermediate level) before GC analysis.

#### Quantitation

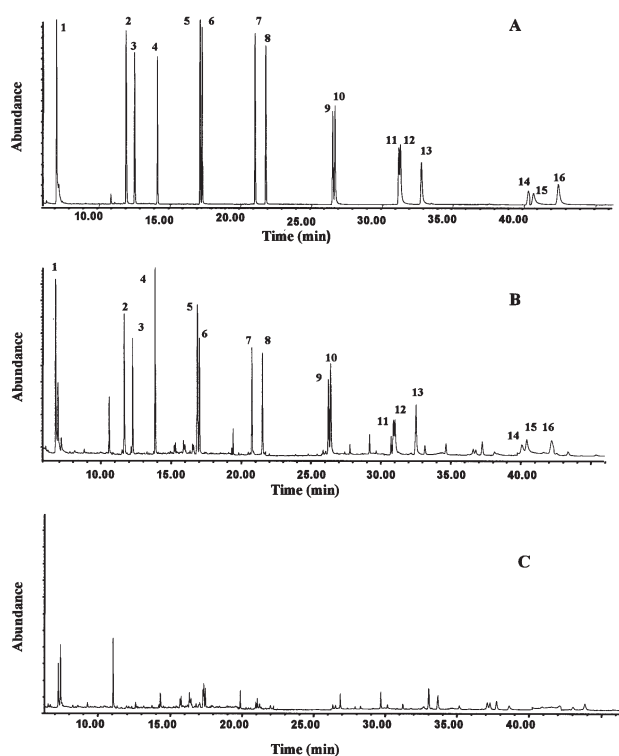
Samples were analyzed by GC/MS. The concentration of each compound was determined by comparing the ratios of

the peak areas obtained for the samples with those found for standard mixtures of known concentration.

#### Results and Discussion

PAHs are known to be light-sensitive. Therefore, to minimize the possible photodecomposition of the PAHs studied, working solutions (stored in foil-wrapped volumetric flasks) and fortified honey samples were prepared on the same day. Because these compounds tend to remain adsorbed on the walls of their containers, glass columns instead of propylene columns were used in the sample extraction procedure to reduce possible losses.

The chromatographic analysis of the honey samples is based on SIM. The mass spectra of PAHs have a characteristic fragmentation pattern and, as a result of their weak fragmentation, the molecular ion is the main and most abundant ion. Therefore, the other ions in the mass spectra of PAHs have low relative abundance, around 20%. Table 1 shows the main ions of each compound as well as their relative abundance. The identification of PAHs by GC/MS in the SIM mode is based on the main ion of the characteristic mass spectrum of each



**Figure 3.** Chromatograms obtained by GC/MS in the SIM mode for (A) thyme honey spiked at 0.2 µg/g; (B) lavender honey spiked at 0.02 µg/g; and (C) a blank lavender honey sample. See Table 1 for peak identification.

compound together with the relative abundance of the other ions selected for each PAH, and on the chromatographic retention time of the PAH. The weak fragmentation of PAHs enhances the sensitivity of the method when the molecular ion is used for quantitation. Figure 2 shows a chromatogram obtained in the SIM mode for a standard mixture of PAHs at 10 ppb. Initially, the scan mode was applied to a standard mixture to determine the retention time and the main ions of each PAH.

The proposed method was used to determine 16 PAHs in honey. PAHs in environmental or food samples were extracted with various organic solvents, generally of low polarity (9, 12, 13). Several extraction solvents were evaluated: acetonitrile, hexane, cyclohexane, and methylene chloride, together with hexane–ethyl acetate (90 + 10, v/v), which was used with good results in previous work on residue analysis of honey for pesticides (17, 18). Sonication-assisted extraction of residues was used in the proposed method because of the improvement in recoveries obtained with this technique in previous work. Table 2 shows the recovery results obtained with various solvents for lavender honey samples spiked at 0.5 µg/g. Recoveries with cyclohexane as the extraction solvent were acceptable for most of the PAHs. On the other hand, extraction with acetonitrile formed emulsions; the polarity of this solvent probably allowed the extraction of the methanol

used in the standard solutions to spike the honey samples, together with some water from the honey; thus, acetonitrile was discarded as the extraction solvent. The best results were obtained with hexane–ethyl acetate (90 + 10, v/v). The improvement in recovery was more noticeable for the PAHs with higher molecular weights, which gave values of around 30% with the other solvents; recoveries obtained with hexane–ethyl acetate (90 + 10, v/v) were > 70%.

Tables 3 and 4 show the recovery results obtained with different types of honey. Honey samples, previously analyzed to verify the lack of PAHs, were fortified at 0.8, 0.2, and 0.02 µg/g before extraction. The average recoveries obtained ranged from around 80 to 101%, with relative standard deviations between 6 and 15%. The recoveries of PAHs with higher molecular weights were on the lower end of the range obtained, probably because of the tendency of these compounds to remain adsorbed on Florisil (19).

Figure 3 shows representative chromatograms obtained for honey samples fortified at the intermediate and lowest levels and for a blank honey sample. The peaks in the chromatogram for the blank honey sample (Figure 3C) do not match any of the PAH peaks; therefore, compounds such as waxes and pigments do not interfere in the determination of the compounds studied.

Table 5 summarizes the calibration data, instrumental detection limits (IDLs), and limits of detection (LODs) for the PAHs studied. The responses of all the PAHs were linear for the concentration range studied, from 0.01 to 0.08 µg/mL, with good correlation coefficients that ranged from 0.996 to 1.000. The IDLs were determined by considering a value equal to or higher than 3 times the background noise obtained for a standard mixture solution of PAHs at 10 ppb. The LODs were determined by considering a value equal to or higher than 3 times the background noise obtained for a blank honey sample; they ranged from 0.04 to 2.90 µg/kg. The limit of quantitation (LOQ), supported by the recovery data presented, was 20 µg/kg for each compound. Nevertheless, a lower LOQ could be obtained for the PAHs studied on the basis of their LOD values.

The proposed method shows good results in comparison with those reported by other researchers for the determination of PAHs in various foods, mainly meat products. The average recoveries obtained with the present method are in the higher part of the range, and the LODs are in the lower part of the range of values previously published for those matrices (10, 11, 15).

The developed MSPD method was used to analyze various commercial Spanish honeys; no residues of the PAHs studied were found at levels above the LODs in these samples.

## Conclusions

An MSPD multiresidue method was developed for the determination of 16 PAHs in honey by GC/MS with SIM. The proposed method allows the extraction and cleanup of samples in a single step, which makes it simple and rapid. This procedure is a good alternative to conventional liquid–liquid

**Table 5. Calibration data, instrumental detection limit (IDL) values, and limit of detection (LOD) values for the PAHs studied**

Compound	PAH	Calibration data <sup>a</sup>		IDL, pg	LOD, µg/kg
		Correl. coeff. (r)	Equation		
1	Naph	1.000	$2.26 \cdot 10^8 \times - 4.12 \cdot 10^5$	0.3	0.2
2	Acyl	0.999	$2.02 \cdot 10^8 \times - 5.86 \cdot 10^5$	0.1	0.1
3	Ace	0.999	$1.76 \cdot 10^8 \times - 4.61 \cdot 10^5$	0.1	0.1
4	Fl	0.999	$1.35 \cdot 10^8 \times - 4.30 \cdot 10^5$	0.1	0.04
5	Phen	0.999	$1.82 \cdot 10^8 \times - 5.84 \cdot 10^5$	0.4	0.3
6	Anth	0.997	$1.71 \cdot 10^8 \times - 7.76 \cdot 10^5$	0.8	0.5
7	F	0.998	$1.79 \cdot 10^8 \times - 7.30 \cdot 10^5$	0.1	0.05
8	Py	0.998	$1.74 \cdot 10^8 \times - 7.28 \cdot 10^5$	0.2	0.2
9	BaA	0.996	$1.01 \cdot 10^8 \times - 4.06 \cdot 10^5$	1.2	0.8
10	Chr	0.997	$1.35 \cdot 10^8 \times - 7.08 \cdot 10^5$	0.9	0.6
11	BbF	0.999	$7.43 \cdot 10^7 \times - 3.55 \cdot 10^5$	0.8	0.5
12	BkF	0.997	$1.23 \cdot 10^8 \times - 7.68 \cdot 10^5$	1.9	1.3
13	BaP	0.999	$6.80 \cdot 10^7 \times - 2.76 \cdot 10^5$	1.7	1.1
14	IcdPy	1.000	$2.91 \cdot 10^7 \times - 1.66 \cdot 10^5$	2.8	1.9
15	DBahA	0.999	$4.53 \cdot 10^7 \times - 2.11 \cdot 10^5$	4.3	2.9
16	BghiP	0.999	$5.45 \cdot 10^7 \times - 1.08 \cdot 10^5$	1.6	1.1

<sup>a</sup> Concentration range: 0.01–0.08 µg/mL.

or Soxhlet extractions, and its low consumption of organic solvents decreases the risk of using toxic chemicals. Moreover, the described MSPD method allows the detection of PAHs at the low limits needed in monitoring programs.

### Acknowledgments

Financial aid from INIA (Project API 99-012) is acknowledged.

### References

- Nuñez, M.D., & Centrich, F. (1990) *Anal. Chim. Acta* **234**, 269–273
- Kayali-Sayadi, M.N., Rubio-Barroso, S., Cuesta-Jimenez, M.P., & Polo-Diez, L.M. (1999) *J. Liq. Chrom. Relat. Technol.* **22**, 615–627
- El Harrak, R., Calull, M., Marcé, R.M., & Borull, F. (1996) *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **64**, 47–57
- Djozan, Dj., & Assadi, Y. (1999) *Microchem. J.* **63**, 276–284
- Prosen, H., & Zupancic-Kralj, L. (1999) *Trends Anal. Chem.* **18**, 272–282
- Ali, M.Y., & Cole, R.B. (1998) *Anal. Chem.* **70**, 3242–3248
- Turrio-Baldassarri, L., Bayarri, S., Di Domenico, A., Iacovella, N., & La Rocca, C. (1999) *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **75**, 217–227
- Kayali-Sayadi, M.N., Rubio-Barroso, S., García-Iranzo, R., & Polo-Diez, L.M. (2000) *J. Liq. Chrom. Relat. Technol.* **23**, 1913–1925
- Budzinski, H., Baumard, P., Papineau, A., Wise, S., & Garrigues, P. (1996) *PAC J.* **9**, 225–232
- Chen, B.H., Wang, C.Y., & Chiu, C.P. (1996) *J. Agric. Food Chem.* **44**, 2244–2251
- Chen, B.H., & Lin, Y.S. (1997) *J. Agric. Food Chem.* **45**, 1394–1403
- Mottier, P., Parisod, V., & Turesky, R.J. (2000) *J. Agric. Food Chem.* **48**, 1160–1166
- López de Alda-Villaizan, M.J., García-Falcon, S., Lage-Yusty, M.A., & Simal-Lozano, J. (1995) *J. AOAC Int.* **78**, 402–406
- Thompson, D., Jolley, D., & Maher, W. (1993) *Microchem. J.* **47**, 351–362
- Wang, G., Lee, A.S., Lewis, A.S., Kamath, B., & Archer, R.K. (1999) *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1062–1066
- López de Alda-Villaizan, M.J., Simal-Lozano, J., & Lage-Yusty, M.A. (1995) *Talanta* **42**, 967–970
- Albero, B., Sánchez-Brunete, C., & Tadeo, J.L. (2001) *J. AOAC Int.* **84**, 1165–1171
- Sánchez-Brunete, C., Albero, B., Miguel, E., & Tadeo, J.L. (2002) *J. AOAC Int.* **85**, 128–133
- Baumard, P., Budzinski, H., & Garrigues, P. (1997) *Fresenius Z. Anal. Chem.* **359**, 502–509

#### **4. ANÁLISIS DE PESTICIDAS EN LA MIEL MEDIANTE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

El objetivo de este trabajo ha sido desarrollar un método que permita determinar simultáneamente cincuenta y un pesticidas pertenecientes a distintas clases de compuestos.

En los trabajos anteriores, la determinación de residuos de determinados pesticidas, o de otros contaminantes orgánicos como son los hidrocarburos aromáticos policíclicos, se había llevado a cabo empleando la dispersión de la matriz en una fase sólida como técnica de extracción. Inicialmente se aplicó este método para la determinación de los pesticidas objeto de estudio, sin embargo, los límites de detección obtenidos no eran lo suficientemente bajos, debido a la presencia de sustancias co-extraídas que interferían en la determinación de los pesticidas. Como consecuencia de este hecho, se planteó la necesidad de emplear otra técnica de extracción como es la extracción en fase sólida.

En el desarrollo del método se optimizaron varios parámetros como la cantidad de adsorbente y el disolvente de extracción. La cantidad de adsorbente, en este caso C<sub>18</sub>, no podía ser inferior a 1 g ya que se necesitaba un volumen de muestra adecuado para conseguir buenos límites de detección. La extracción se ensayó con distintos disolventes de baja polaridad como el hexano y mezclas de hexano con diclorometano y acetato de etilo. Se eligió la mezcla de hexano con acetato de etilo, ya que se obtuvieron extractos más limpios en comparación a los conseguidos utilizando la mezcla de hexano-diclorometano. Por otra parte, se observó que era necesario controlar el vacío durante la elución del extracto ya que su uso prolongado originaba la pérdida de los compuestos más volátiles, como es el caso de las dinitroanilinas.

Con este método se obtuvieron extractos muy limpios que no necesitaron una posterior purificación, evitándose así un incremento en el tiempo de análisis y las posibles pérdidas de analito debido a sucesivos procesos de purificación del extracto.

Los niveles de residuos de pesticidas se determinaron mediante cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas en el modo SIM. La cuantificación se realizó empleando patrones preparados enriqueciendo los extractos de una miel control, ya que se observó un efecto de la matriz en la determinación. El efecto matriz se manifiesta con un incremento de la respuesta cromatográfica de estos compuestos, que puede ser explicado por una mejora en la transferencia de los analitos desde el puerto de inyección a la columna.

El método desarrollado se aplicó al análisis de once mieles distintas de las cuales seis eran muestras comercializadas de mieles de distinto origen botánico (espliego, naranjo, tomillo, romero, eucalipto, y milflores) y cinco muestras eran mieles de cítricos obtenidas directamente del apicultor. El 64 % de las muestras contenían residuos de al menos uno de los pesticidas estudiados.

## ANÁLISIS DE PESTICIDAS EN LA MIEL MEDIANTE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS

B. Albero, C. Sánchez-Brunete y J.L. Tadeo. "Analysis of pesticides in honey by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry", *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004, 52(6), 5828-35.

### Contribución

Póster. "Multiresidue determination of pesticides in honey by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry", "25<sup>th</sup> International Symposium on Chromatography", 4-8 Octubre 2004, París, Francia

## Analysis of Pesticides in Honey by Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry

BEATRIZ ALBERO, CONSUELO SÁNCHEZ-BRUNETE, AND JOSÉ L. TADEO\*

Departamento de Medio Ambiente, INIA, Ctra de la Coruña Km 7, 28040 Madrid, Spain

An analytical method for the simultaneous determination of 51 pesticides in commercial honeys was developed. Honey (10 g) was dissolved in water/methanol (70:30; 10 mL) and transferred to a C<sub>18</sub> column (1 g) preconditioned with acetonitrile and water. Pesticides were subsequently eluted with a hexane/ethyl acetate mixture (50:50) and determined by gas chromatography with electron impact mass spectrometric detection in the selected ion monitoring mode (GC-MS-SIM). Spiked blank samples were used as standards to counteract the matrix effect observed in the chromatographic determination. Pesticides were confirmed by their retention times, their qualifier and target ions, and their qualifier/target abundance ratios. Recovery studies were performed at 0.1, 0.05, and 0.025  $\mu\text{g/g}$  fortification levels for each pesticide, and the recoveries obtained were >86% with relative standard deviations of <10%. Good resolution of the pesticide mixture was achieved in  $\sim 41$  min. The detection limits of the method ranged from 0.1 to 6.1  $\mu\text{g/kg}$  for the different pesticides studied. The developed method is linear over the range assayed, 25–200  $\mu\text{g/L}$ , with determination coefficients of >0.996. The proposed method was applied to the analysis of pesticides in honey samples, and low levels of a few pesticides (dichlofluanid, ethalfluralin, and triallate) were detected in some samples.

**KEYWORDS:** Multiresidue; honey; pesticides; gas chromatography–mass spectrometry; SPE

### INTRODUCTION

Pesticides are widely used in present agricultural practices, causing the contamination of the environment and foodstuffs. Pesticide residues in honey can originate from the contamination of plants where bees collect pollen and nectar or from the treatment of beehives to control some pests and diseases they suffer.

Various methods have been reported for the determination of pesticides in honey. Analysis of honey is difficult due to its complex composition and, particularly, the presence of waxes and pigments. The classical extraction technique used in the determination of pesticide residues in honey has been partitioning with organic solvents, often followed by subsequent cleanup procedures before gas chromatographic determination (1–4). The drawbacks of the traditional extraction methods, such as the use of large amounts of solvents and glassware and the high time consumption, can be reduced by using other extraction techniques developed recently. Supercritical fluid extraction (SFE) (5), solid-phase extraction (SPE) with the stationary phase packed in a cartridge or in disks (6–10), solid-phase microextraction (SPME) (11–13), and matrix solid-phase dispersion (MSPD) (14, 15) are different techniques that have been used with that aim in the analysis of pesticides. Analysis of extracts is generally performed by gas chromatography with different

selective detectors such as electron capture (ECD) for pyrethroids and organohalogen compounds (1, 15–17) or nitrogen–phosphorus (NPD) (14, 18) for organonitrogen and organophosphate pesticides. The determination of pesticide residues, particularly those thermally unstable, can be also carried out by high-performance liquid chromatography (HPLC) (10, 19), but generally the sensitivity achieved in this case is somewhat lower. Mass spectrometry coupled to gas (GC-MS) or liquid (HPLC-MS) chromatography is more often used at present for pesticide analysis in honey (5, 13, 20, 21), due to the possibility of confirming the identity of pesticide residues.

Multiresidue methods have been reported for the determination of pesticides in food (22, 23). Methods for multiresidue analysis of pesticides in honey are scarce in the scientific literature, and there is a need to develop analytical procedures allowing the reliable and rapid quantification and confirmation of as many pesticides as possible in a single determination in a cost-effective manner. Analytical methods published for the determination of pesticides in honey generally determine only compounds belonging to different chemical classes, mainly organochlorine (1, 8), organophosphorus (2, 20), or acaricide (24). To our knowledge, no multiresidue method has been reported until now for the analysis of more than 50 pesticides in honey in a single determination using GC-MS-SIM.

In previous studies, a MSPD method for the extraction of different pesticide classes (14, 15) or organic pollutants (25) from honey samples was used in our laboratory. Nevertheless, this method suffered from not obtaining good detection limits

\* Author to whom correspondence should be addressed (telephone 34 91-347-6821; fax 34 91-357-2293; e-mail tadeo@inia.es).

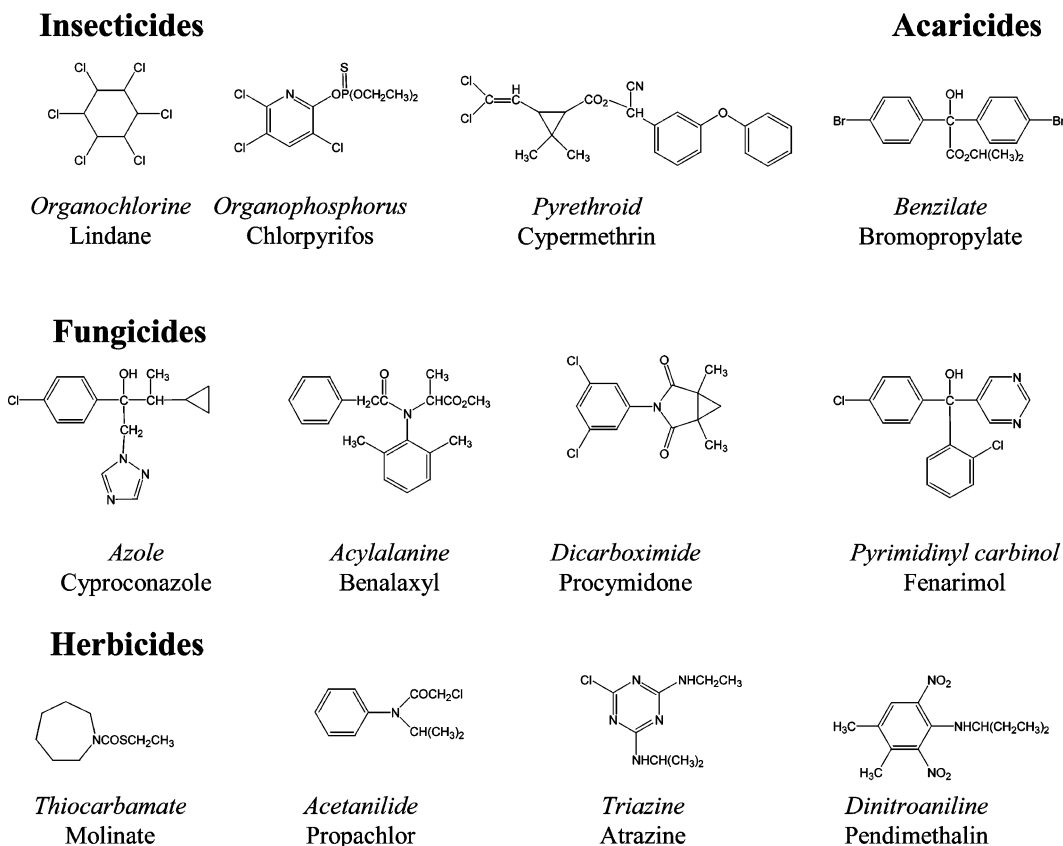


Figure 1. Chemical structures of representative compounds of the main pesticide groups studied.

Table 1. Retention Times ( $t_r$ ), Molecular Weights (MW), Target (T) and Qualifier Ions ( $Q_1$ ,  $Q_2$ ), and Abundance Ratios of Qualifier Ion/Target Ion ( $Q_1/T$ ,  $Q_2/T$ )<sup>a</sup>

	pesticide	$t_r$ (min)	MW	T	$Q_1$	$Q_2$	$Q_1/T$ (%)	$Q_2/T$ (%)		pesticide	$t_r$ (min)	MW	T	$Q_1$	$Q_2$	$Q_1/T$ (%)	$Q_2/T$ (%)
1	EPTC	7.93	189.3	128	189	86	24.2	65.8	28	butralin	22.85	295.3	266	267	295	100	58.9
2	molinate	10.81	187.3	126	187	83	21.5	14.5	29	pendimethalin	23.54	281.3	252	281	220	13.0	16.0
3	propachlor	12.30	211.7	120	176	93	38.2	31.0	30	chlorfenvinphos	23.97	359.6	267	323	295	54.1	19.8
4	ethalfuralin	13.33	333.3	276	316	292	76.2	46.3	31	procymidone	24.31	284.1	283	96	285	118.8	170
5	trifluralin	13.73	335.5	306	264	290	74.8	13.4	32	methidathion	24.60	302.3	145	85	125	83.8	16.4
6	simazine	15.19	201.7	201	186	173	73.3	29.4	33	endosulfan i	24.94	406.9	241	195	239	94.5	33.0
7	atrazine	15.46	215.7	200	215	173	57.4	22.4	34	profenophos	25.85	373.6	208	339	139	75.6	80.2
8	lindane	15.87	290.8	183	219	147	82.6	38.4	35	oxadiazon	26.21	345.2	175	258	344	51.9	18.5
9	terbuthylazine	16.18	229.7	214	229	173	28.2	37.6	36	cyproconazole	26.71	291.8	222	139		51.3	
10	diazinon	16.87	304.3	179	137	304	103.2	48.3	37	endosulfan II	27.00	406.9	195	237	241	83.7	36.4
11	chlorothalonil	17.35	265.9	266	264	270	100	10.8	38	ethion	27.59	384.5	231	153	384	67.5	11.7
12	triallate	17.46	304.7	86	268	128	39.6	21.2	39	ofurace	28.11	281.7	132	160	281	79.4	34.5
13	metribuzin	18.84	214.3	198	144	182	14.3	8.4	40	benalaxyl	28.26	325.4	148	206	91	25.9	
14	parathion-methyl	19.22	263.2	263	109	125	92.8	79.4	41	endosulfan sulfate	28.37	423.0	272	229	387	63.6	52.9
15	tolclofos-methyl	19.46	301.1	265	125	250	23.5	10.8	42	hexazinone	28.83	252.3	171	128	83	14.9	12.2
16	alachlor	19.66	269.8	160	188	146	88.4	91.2	43	nuarimol	28.92	314.7	235	203	314	78.1	53.5
17	prometryn	19.96	241.4	241	184	226	73.1	55.4	44	bromopropylate	29.95	428.1	341	183	343	42.4	49.4
18	terbutryn	20.63	241.4	226	241	185	48.7	73.8	45	tetradifon	30.66	356.1	159	229	111	58.2	50.3
19	fenitrothion	20.76	277.2	277	125	260	113.8	39.9	46	amitraz	31.25	293.4	121	162	293	78.8	73.2
20	pirimiphos-methyl	20.95	333.4	290	276	305	85.9	67.7	47	cyhalothrin	31.47	449.9	181	197	208	71.1	52.7
21	dichlofluanid	21.12	333.2	123	224	167	47.0	39.3	48	fenarimol	31.61	331.2	139	219	251	76.2	31.9
22	aldrin	21.34	364.9	263	293	221	38.1	19.8	49	acrinathrin	31.72	541.4	181	208	289	70.8	35.1
23	malathion	21.45	330.4	173	127	93	104.3	79.3	50	coumaphos	32.81	362.8	362	226	109	62.0	102.4
24	metolachlor	21.64	283.8	162	238	146	57.0	14.2	51	cypermethrin	34.25	416.3	181	163	209	98.9	63.9
25	fenthion	21.83	278.3	278	169	109	24.1	26.6	52	fluvalinate tau-I	36.27	502.9	250	181	252	19.4	33.8
26	chlorpyrifos	21.95	350.6	197	314	97	67.4	69.2	53	fluvalinate tau-II	36.42	502.9	250	181	252	20.1	33.1
27	triadimefon	22.12	293.8	208	181	128	27.6	51.6									

<sup>a</sup>  $Q/T$  (%) are the results of abundance values of the qualifier ion ( $Q_1$ ,  $Q_2$ ) divided by the abundance of the target ion (T)  $\times$  100.

when a large number of compounds were determined. With the aim of overcoming these problems, an alternative method was developed. This paper presents a rapid and sensitive method for the simultaneous quantification and confirmation of 51

pesticides in honey, based on solid-phase extraction and subsequent determination by GC-MS in the SIM mode. **Figure 1** depicts the chemical structures of representative compounds of the main pesticide groups studied. The developed method

Table 2. SIM Program Used To Analyze and Confirm Pesticides in Honey

group	time (min)	pesticide	m/z	dwell time (ms)	scan rate (cycles/s)
1	5.00	EPTC, molinate	128, 189, 86, 126, 187, 83	100	2.15
2	11.70	propachlor	120, 176, 93	100	4.26
3	12.70	ethalfuralin, trifluralin	276, 316, 292, 264, 306, 290	100	2.15
4	14.40	simazine, atrazine	201, 186, 173, 200, 215	100	2.15
5	15.70	lindane, terbuthylazine	183, 219, 147, 214, 229, 173	100	2.15
6	16.60	diazinon	179, 137, 304	100	2.86
7	17.15	chlorothalonil, triallate	266, 264, 270, 86, 268, 128	100	1.72
8	17.90	metribuzin	198, 144, 182	100	4.26
9	19.00	parathion methyl, tolclofos-methyl	263, 109, 125, 265, 250	100	2.15
10	19.59	alachlor, prometryn	160, 188, 146, 241, 184, 226	100	2.15
11	20.40	terbutryn, fenitrothion, pirimiphos-methyl, dichlofluanid	226, 241, 185, 277, 125, 260, 290, 276, 305, 123, 224, 167	50	1.90
12	21.26	aldrin, malathion	263, 293, 221, 127, 173, 93	100	2.15
13	21.59	metolachlor, fenthion, chlorpyrifos, triadimefon	162, 238, 146, 278, 169, 109, 197, 314, 97, 208, 181, 128	50	1.90
14	22.50	butralin, pendimethalin	266, 267, 295, 252, 281, 220	100	2.15
15	23.85	chlorfenvinphos, procymidone	267, 323, 295, 96, 283, 285	100	1.72
16	24.45	methidathion, endosulfan I	145, 85, 125, 195, 241, 239	100	2.15
17	25.40	profenophos, oxadiazon	208, 339, 139, 175, 258, 344	100	1.72
18	26.40	cyproconazole, endosulfan II	222, 139, 195, 237, 241	100	1.72
19	27.30	ethion	231, 153, 384	100	8.33
20	27.90	ofurace, benalaxyl, endosulfan sulfate	132, 160, 281, 91, 148, 206, 229, 272, 387	50	2.17
21	28.60	hexazinone (IS), <sup>a</sup> nuarimol	171, 128, 83, 203, 235, 314	100	1.72
22	29.50	bromopropylate, tetradifon	341, 183, 343, 111, 159, 229	100	1.72
23	31.10	amitraz, cyhalothrin, fenarimol, acrinathrin	121, 162, 293, 181, 197, 208, 139, 219, 251, 181, 289	50	2.17
24	32.50	coumaphos, cypermethrin	362, 226, 109, 163, 181, 209	100	2.15
25	36.00	fluvalinate tau-I, fluvalinate tau-II	250, 181, 252	100	4.26

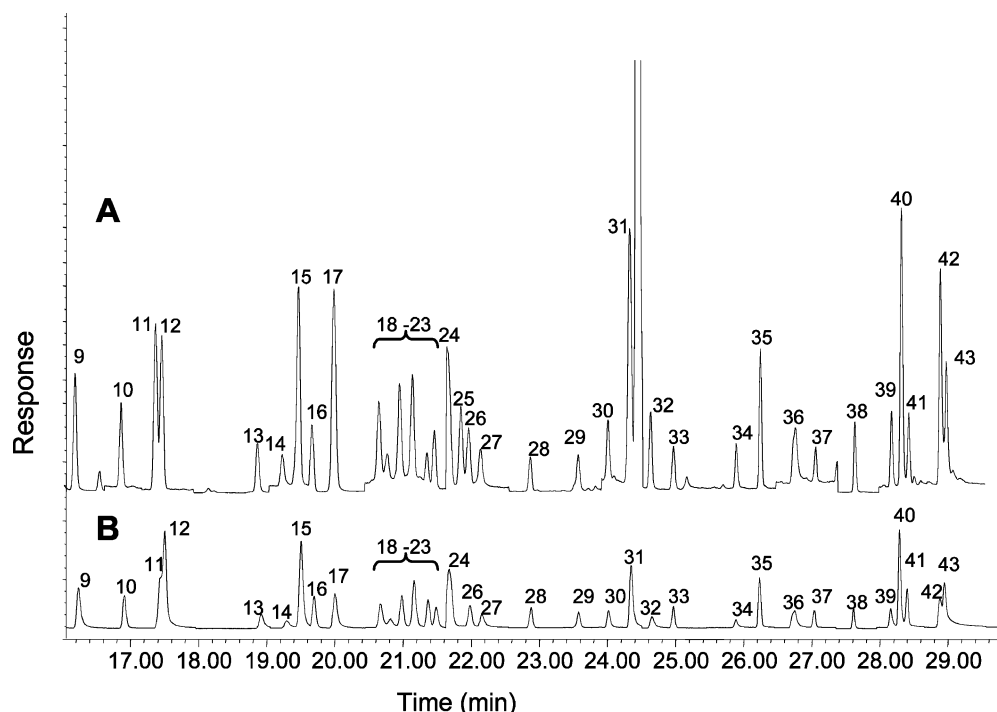
<sup>a</sup> Internal standard.

Figure 2. Matrix effect on the GC analysis of pesticides: (A) blank rosemary honey sample fortified at 0.05  $\mu\text{g/mL}$  and (B) standard mixture solution in ethyl acetate at 0.05  $\mu\text{g/mL}$ . See Table 1 for peak identification.

was applied to the analysis of pesticide residues in various types of Spanish honeys.

## MATERIALS AND METHODS

**Materials and Standards.** Pesticide standards were obtained from Reidel-de Haën (Seelze, Germany), and all compounds were of 99% purity. Ethyl acetate, hexane, methanol, acetonitrile, and dichlo-

romethane, of residue analysis grade, were purchased from Scharlab (Barcelona, Spain). A Milli-Q water purification system from Millipore (Bedford, MA) was used to provide ultrapure water. Silica Bondesil-C<sub>18</sub>, particle diameter of 40  $\mu\text{m}$ , was acquired from Scharlab, and anhydrous sodium sulfate, of reagent grade, was obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

Stock solutions (500  $\mu\text{g/mL}$ ) of each pesticide standard were prepared by dissolving 0.050 g of the pesticide in 100 mL of ethyl acetate. A

**Table 3.** Limits of Detection (LOD) and Quantification (LOQ), Calibration Data, and Repeatability of the Studied Pesticides

pesticide	LOD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LOQ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	calibration data		repeatability (RSD,%) <sup>a</sup>	
			equation	$r^2$	peak area	$t_R$ (min)
EPTC	0.5	1.7	$y = 3.31 \times 10^{-1}x - 2.36 \times 10^{-2}$	1.000	3.1	0.06
molinate	0.3	1.0	$y = 5.76 \times 10^{-1}x - 4.80 \times 10^{-2}$	1.000	4.6	0.06
propachlor	0.1	0.3	$y = 5.61 \times 10^{-1}x - 2.88 \times 10^{-2}$	1.000	2.8	0.05
ethalfuralin	0.3	1.0	$y = 7.12 \times 10^{-2}x - 5.55 \times 10^{-3}$	0.999	4.6	0.06
trifluralin	0.1	0.3	$y = 3.14 \times 10^{-1}x - 3.05 \times 10^{-2}$	0.999	5.1	0.05
simazine	0.3	1.0	$y = 2.43 \times 10^{-1}x - 2.03 \times 10^{-2}$	0.999	5.1	0.06
atrazine	0.5	1.7	$y = 3.40 \times 10^{-1}x - 2.88 \times 10^{-2}$	1.000	4.8	0.06
lindane	1.1	3.6	$y = 6.69 \times 10^{-1}x - 4.90 \times 10^{-3}$	1.000	4.2	0.003
terbutylazine	0.3	1.0	$y = 5.58 \times 10^{-1}x - 5.42 \times 10^{-2}$	0.999	4.9	0.05
diazinon	0.1	0.3	$y = 2.39 \times 10^{-1}x - 9.65 \times 10^{-3}$	1.000	5.1	0.04
chlorothalonil	0.3	1.0	$y = 5.82 \times 10^{-1}x - 5.41 \times 10^{-2}$	0.999	5.3	0.04
triallate	0.5	1.7	$y = 5.26 \times 10^{-1}x - 4.12 \times 10^{-2}$	0.999	5.2	0.04
metribuzin	0.3	1.0	$y = 4.90 \times 10^{-1}x - 5.39 \times 10^{-2}$	0.999	6.1	0.04
oarathion-methyl	0.1	0.3	$y = 9.50 \times 10^{-2}x - 8.93 \times 10^{-3}$	0.999	6.5	0.03
tolclofos-methyl	0.3	0.3	$y = 1.06x - 9.40 \times 10^{-2}$	0.999	5.8	0.03
alachlor	0.4	1.3	$y = 2.59 \times 10^{-1}x - 3.27 \times 10^{-2}$	1.000	4.8	0.04
prometryn	5.0	16.5	$y = 6.36 \times 10^{-1}x + 3.28 \times 10^{-1}$	1.000	6.0	0.03
terbutryn	0.3	1.0	$y = 4.60 \times 10^{-1}x - 4.43 \times 10^{-2}$	0.999	5.1	0.03
fenitrothion	0.2	0.7	$y = 1.02 \times 10^{-1}x - 9.99 \times 10^{-3}$	0.999	7.0	0.03
pirimiphos-methyl	1.5	5.0	$y = 3.02 \times 10^{-1}x - 2.91 \times 10^{-2}$	0.999	6.2	0.03
dichlofluanid	0.2	0.7	$y = 4.62 \times 10^{-1}x - 4.23 \times 10^{-2}$	0.999	6.3	0.03
aldrin	3.0	9.9	$y = 6.04 \times 10^{-1}x + 2.33 \times 10^{-1}$	1.000	5.2	0.02
malathion	0.3	1.0	$y = 3.15 \times 10^{-1}x - 2.89 \times 10^{-2}$	0.999	6.4	0.03
metolachlor	0.1	0.3	$y = 6.33 \times 10^{-1}x - 9.13 \times 10^{-2}$	1.000	5.9	0.01
fenthion	0.5	1.7	$y = 6.00 \times 10^{-1}x - 6.93 \times 10^{-2}$	0.999	5.4	0.03
chlorpyrifos	1.1	3.6	$y = 2.18 \times 10^{-1}x - 1.78 \times 10^{-2}$	0.999	6.3	0.02
triadimefon	0.1	0.3	$y = 2.55 \times 10^{-1}x - 2.16 \times 10^{-2}$	0.999	5.4	0.03
butralin	0.1	0.3	$y = 3.40 \times 10^{-1}x - 4.17 \times 10^{-2}$	0.998	7.0	0.02
pendimethalin	1.1	3.6	$y = 2.76 \times 10^{-1}x - 3.12 \times 10^{-2}$	0.998	7.3	0.02
chlorfenvinphos	1.8	5.9	$y = 3.38 \times 10^{-1}x - 2.83 \times 10^{-2}$	1.000	5.2	0.02
procymidone	5.4	17.8	$y = 3.07 \times 10^{-1}x - 2.54 \times 10^{-2}$	1.000	5.5	0.04
methidathion	1.4	4.6	$y = 6.42 \times 10^{-1}x - 4.81 \times 10^{-2}$	1.000	6.5	0.01
endosulfan I	6.1	20.1	$y = 5.94 \times 10^{-1}x + 3.90 \times 10^{-2}$	0.996	8.0	0.03
profenophos	0.2	0.7	$y = 1.54 \times 10^{-1}x - 1.22 \times 10^{-2}$	1.000	6.4	0.01
oxadiazon	0.1	0.3	$y = 3.53 \times 10^{-1}x - 2.76 \times 10^{-2}$	1.000	5.2	0.01
cyproconazole	0.2	0.7	$y = 5.69 \times 10^{-1}x - 5.08 \times 10^{-2}$	1.000	6.7	0.01
endosulfan II	1.2	4.0	$y = 6.33 \times 10^{-2}x - 3.43 \times 10^{-3}$	0.999	4.8	0.01
ethion	0.1	0.3	$y = 5.61 \times 10^{-1}x - 4.59 \times 10^{-2}$	0.999	6.0	0.01
ofurace	0.6	2.0	$y = 1.94 \times 10^{-1}x - 9.26 \times 10^{-3}$	0.999	8.0	0.01
benalaxyl	0.3	1.0	$y = 9.24 \times 10^{-1}x - 7.58 \times 10^{-2}$	1.000	5.6	0.01
endosulfan sulfate	0.4	1.3	$y = 1.49 \times 10^{-1}x - 1.19 \times 10^{-2}$	1.000	5.6	0.01
nuarimol	1.5	5.0	$y = 2.24 \times 10^{-1}x - 2.30 \times 10^{-2}$	0.999	5.5	0.01
bromopropylate	0.2	0.7	$y = 4.27 \times 10^{-1}x + 4.05 \times 10^{-2}$	0.999	6.2	0.01
tetradifon	1.6	5.3	$y = 2.15 \times 10^{-1}x - 1.96 \times 10^{-2}$	0.999	6.0	0.005
amitraz	3.3	10.9	$y = 3.05 \times 10^{-2}x + 4.01 \times 10^{-2}$	1.000	4.8	0.005
cyhalothrin	0.1	0.3	$y = 3.45 \times 10^{-1}x - 3.77 \times 10^{-2}$	0.999	7.0	0.004
fenarimol	0.9	3.0	$y = 2.17 \times 10^{-1}x - 1.75 \times 10^{-2}$	1.000	6.1	0.003
acrinathrin	0.3	1.0	$y = 2.59 \times 10^{-1}x - 3.27 \times 10^{-2}$	0.999	7.5	0.004
coumaphos	0.1	0.3	$y = 2.18 \times 10^{-1}x - 2.38 \times 10^{-2}$	0.999	6.0	0.01
cypermethrin	0.2	0.7	$y = 2.67 \times 10^{-1}x - 2.85 \times 10^{-2}$	0.999	5.4	0.01
fluvalinate tau-I	0.2	0.7	$y = 3.26 \times 10^{-1}x - 1.39 \times 10^{-2}$	0.999	6.7	0.01
fluvalinate tau-II	0.2	0.7	$y = 3.45 \times 10^{-1}x - 4.00 \times 10^{-2}$	0.999	6.5	0.01

<sup>a</sup> Relative standard deviations of retention times and peak areas ( $n = 10$ ).

pesticide intermediate standard solution (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was prepared by transferring 1 mL from each pesticide to a 100 mL volumetric flask and diluting to volume with ethyl acetate to obtain a concentration of 5  $\mu\text{g}/\text{L}$ . A set of calibration standard solutions of 4.0, 2.0, 1.0, and 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  was prepared by dilution. The solutions containing 2.0, 1.0, and 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of each pesticide were used to fortify honey samples. The internal standard was prepared by dissolving hexazinone in ethyl acetate to make a 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  solution. Stock standard and working solutions were stored at 4 °C and used for no longer than 3 months and 1 week, respectively.

**Apparatus. Extraction Equipment.** Polypropylene columns (5 mL) of 6 cm  $\times$  12 mm i.d. (Becton-Dickinson) with Teflon frits of 1 cm diameter and 20  $\mu\text{m}$  pore size (Varian) were used in the extraction step.

A 12-port vacuum manifold (Supelco Visiprep, Madrid, Spain) was employed to filter the extraction solvent.

**GC-MS Analysis.** GC-MS analysis was performed with an Agilent 6890 (Waldbronn, Germany) gas chromatograph equipped with an automatic split–splitless injector model HP 7683 and a mass spectrometric detector (MSD) model HP 5973. A fused silica capillary column (ZB-5MS), 5% phenyl polysiloxane as nonpolar stationary phase (30 m  $\times$  0.25 mm i.d.) and 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness, supplied by Phenomenex (Torrance, CA), was employed. Operating conditions were as follows: injector port temperature, 280 °C; helium as carrier gas at a flow rate of 1.0 mL/min; pulsed splitless mode (pulsed pressure = 310 kPa for 1.5 min). The column temperature was maintained at 70 °C for 2 min, then programmed at 25 °C/min to 150 °C, increased to 200 °C at a rate of 3 °C/min, followed by a final ramp to 280 °C at a rate of 8 °C/min, and held for 10 min. The total analysis time was 41.87 min and the equilibration time 2 min. A 2  $\mu\text{L}$  volume was injected splitless, with the split valve closed for 1 min.

**Table 4.** Recovery of the Studied Pesticides from Honey Samples<sup>a</sup> (Mean ± RSD, %)

compound	fortification levels			compound	fortification levels		
	0.1 µg/g	0.05 µg/g	0.025 µg/g		0.1 µg/g	0.05 µg/g	0.025 µg/g
EPTC	98.0 ± 2.7	98.1 ± 4.3	96.6 ± 4.3	triadimefon	96.4 ± 2.3	97.5 ± 3.3	98.7 ± 6.6
molinate	98.3 ± 2.4	99.1 ± 3.8	97.8 ± 4.5	butralin	95.8 ± 3.5	96.9 ± 4.7	97.4 ± 6.5
propachlor	99.0 ± 2.3	97.8 ± 5.4	98.9 ± 5.5	pendimethalin	95.3 ± 3.3	97.3 ± 3.8	96.4 ± 6.3
ethalfuralin	97.0 ± 2.1	97.9 ± 2.9	98.0 ± 5.4	chlorfenvinphos	95.0 ± 3.8	99.7 ± 8.6	98.9 ± 6.4
trifluralin	96.6 ± 2.8	96.9 ± 3.2	97.9 ± 5.0	procymidone	97.0 ± 2.8	99.8 ± 5.4	97.7 ± 3.8
simazine	93.2 ± 2.0	90.7 ± 3.2	89.4 ± 3.3	methidathion	97.3 ± 3.1	99.5 ± 4.5	97.6 ± 3.7
atrazine	98.1 ± 1.6	98.6 ± 2.9	97.4 ± 2.4	endosulfan I	100.5 ± 2.6	97.1 ± 8.6	100.9 ± 5.5
lindane	97.8 ± 2.3	98.5 ± 3.9	97.8 ± 3.4	profenophos	96.7 ± 4.1	98.5 ± 4.9	96.7 ± 4.9
terbutylazine	97.3 ± 2.0	98.7 ± 2.5	98.2 ± 2.4	oxadiazon	96.8 ± 3.5	98.3 ± 4.4	96.5 ± 4.7
diazinon	97.1 ± 2.0	98.0 ± 2.6	98.1 ± 2.8	cyproconazole	96.0 ± 4.0	98.0 ± 6.0	97.3 ± 3.5
chlorothalonil	97.6 ± 1.9	99.0 ± 3.2	98.2 ± 3.6	endosulfan II	97.2 ± 3.5	99.4 ± 5.9	98.9 ± 9.0
triallate	96.5 ± 4.4	98.7 ± 4.4	97.9 ± 4.6	ethion	96.7 ± 3.2	98.3 ± 5.5	97.9 ± 3.9
metribuzin	89.9 ± 2.4	87.2 ± 5.6	86.4 ± 4.2	ofurace	91.9 ± 4.3	89.2 ± 6.6	89.7 ± 9.2
parathion-methyl	97.5 ± 2.5	98.9 ± 4.8	100.2 ± 8.3	benalaxyl	96.7 ± 3.9	98.3 ± 4.9	96.2 ± 3.4
tolclofos-methyl	97.1 ± 2.9	98.3 ± 2.9	98.2 ± 3.0	endosulfan sulfate	96.9 ± 3.4	98.6 ± 5.3	97.4 ± 4.5
alachlor	95.7 ± 4.4	98.4 ± 3.6	96.8 ± 3.9	nuarimol	97.4 ± 4.4	97.8 ± 2.4	98.3 ± 2.7
prometryn	98.2 ± 4.6	97.3 ± 6.6	100.6 ± 5.6	bromopropylate	98.1 ± 5.1	98.1 ± 2.3	99.4 ± 3.7
terbutryn	90.3 ± 2.2	92.2 ± 3.4	90.6 ± 2.9	tetradifon	97.6 ± 4.3	100.1 ± 3.3	100.2 ± 6.9
fenitrothion	96.3 ± 3.0	98.3 ± 4.5	98.8 ± 7.2	amitraz	88.8 ± 5.1	96.8 ± 3.6	89.4 ± 5.8
pirimiphos-methyl	97.2 ± 2.8	96.7 ± 3.0	97.2 ± 4.0	cyhalothrin	94.4 ± 3.4	95.8 ± 3.7	97.5 ± 4.6
dichlofluanid	96.4 ± 3.7	98.1 ± 3.8	95.8 ± 4.5	fenarimol	96.9 ± 3.7	99.0 ± 3.6	96.3 ± 4.8
aldrin	96.4 ± 5.3	96.4 ± 4.2	95.9 ± 4.4	acrinathrin	93.7 ± 4.3	96.6 ± 4.3	95.2 ± 3.5
malathion	97.2 ± 2.2	97.8 ± 3.0	98.4 ± 3.5	coumaphos	98.8 ± 4.8	100.7 ± 4.7	99.8 ± 3.9
metolachlor	95.9 ± 2.7	98.2 ± 4.5	95.7 ± 5.2	cypermethrin	96.9 ± 3.8	98.4 ± 3.7	96.3 ± 3.2
fenthion	98.7 ± 2.8	100.8 ± 3.7	100.4 ± 5.5	fluvinate tau-I	98.3 ± 3.7	98.2 ± 5.9	98.8 ± 5.9
chlorpyrifos	96.5 ± 1.6	95.1 ± 5.7	98.0 ± 6.4	fluvinate tau-II	97.1 ± 4.9	98.0 ± 5.7	96.7 ± 4.0

<sup>a</sup> Results are the mean of three different honeys (orange, rosemary, and multiflora) (four replicates of each honey at each fortification level).

The mass spectrometric detector (MSD) was operated in electron impact ionization mode with an ionizing energy of 70 eV, scanning from  $m/z$  60 to 500 at 3.62 s per scan. The ion source temperature was 230 °C and the quadrupole temperature 150 °C. The electron multiplier voltage (EM voltage) was maintained 1000 V above autotune, and a solvent delay of 5 min was employed.

Analysis was performed with selected ion monitoring (SIM) using one target and two qualifier ions. The target and qualifier abundances were determined by injection of individual pesticide standards under the same chromatographic conditions using full scan with the mass/charge ratio ranging from  $m/z$  60 to 500. Quantification was based on the peak area ratio of the target ion divided by the peak area of the internal standard in samples versus those found in the calibration standard. Standards were prepared in blank matrix extracts, to counteract the matrix effect. **Table 1** lists the pesticides along with their retention times, the target and qualifier ions, and their qualifier to target abundance ratios. The SIM program used to determine and confirm pesticides in honey is indicated in **Table 2**. Pesticides were confirmed by their retention times, the identification of target and qualifier ions, and the determination of qualifier to target ratios. Retention times had to be within ±0.2 min of the expected time, and qualifier to target ratios had to be within a 20% range for positive confirmation.

**Sample Preparation. Honey Samples.** Various Spanish commercial honeys were purchased: five uniflora (orange, rosemary, lavender, eucalyptus, and thyme) and one multiflora. In addition, several citrus honeys were collected directly from the producers in Valencia. The honey samples were stored at 4 °C until analysis.

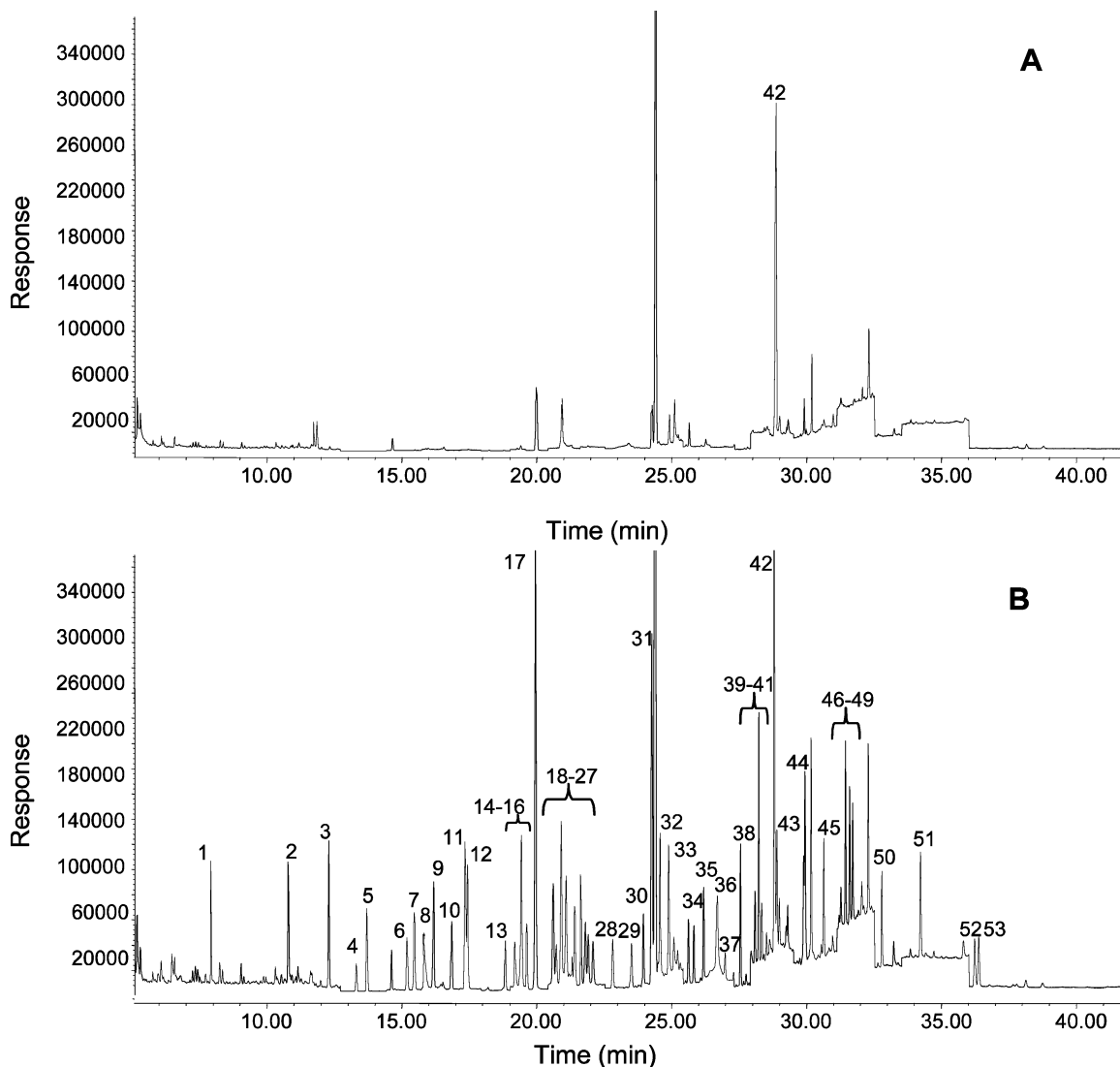
**Extraction Procedure.** A 10 g amount of honey was dissolved in 10 mL of water/methanol (70:30) in a Sovirell tube and fortified with 0.5 mL of the mixture of the different pesticides in ethyl acetate, to give final concentrations in the range of 0.025–0.1 µg/g. Half a milliliter of ethyl acetate was added instead to unfortified samples. One Teflon frit and 1 g of C<sub>18</sub> were placed at the end of each column and preconditioned by washing first with 3 mL of acetonitrile and then with 5 mL of water. The honey solutions were transferred to the column, and the Sovirell tube was washed with 5 mL of water/methanol (70:30), which was also transferred to the column. Pesticides retained in the solid phase were eluted twice with 5 mL of hexane/ethyl acetate (50:50). Columns were placed on a 12-port vacuum manifold, and solvent was filtered and collected in 10 mL graduated tubes. A 1.0 mL

volume of the internal standard solution (hexazinone, 1 µg/mL) was added to each sample, which was previously concentrated with a gentle stream of air to allow a final volume of 10 mL for higher recovery levels or 2 mL for the lowest recovery assay and real samples. A small amount of anhydrous sodium sulfate was added to dry the concentrated extracts, which were stored at 4 °C until analyzed by GC-MS. Chromatographic standards were prepared using blank sample extracts. These blank extracts were fortified with 0.5 mL of the pesticide standard solution and 1.0 mL of the internal standard solution (1 µg/mL).

## RESULTS AND DISCUSSION

**Gas Chromatographic Determination.** Pesticide residue levels were determined by GC-MS-SIM. When standards were prepared by spiking blank honey samples with known amounts of pesticides, higher peak areas were obtained for the same pesticide concentration. This can be explained by a matrix effect that improves transfer of analytes from the injection port to the column and enhances the chromatographic response of pesticides. **Figure 2** shows the chromatographic response enhancement when blank honey samples are fortified with standard solutions. This effect is clearly observed in triazine and organophosphorus pesticides, with a response increase from 2- to 7-fold. Fenthion only appears when fortified blank samples are injected. Thiocarbamate, dinitroaniline, and organochlorine pesticides are the compounds presenting a lower matrix effect, with an increase of ~80%. A matrix effect in the determination of pesticides in honey and other foodstuffs has been previously reported by other authors (5, 22, 26). Therefore, the quantification of pesticide residues was carried out using fortified blank samples with the addition of an internal standard. The chromatographic program used allows a good resolution of the pesticide mixture in ~41 min. The developed method provides adequately clean blank extracts for the determination of pesticide residues by the chromatographic method used.

**Method Validation. Linearity.** The linearity of the chromatographic method was determined using blank honey samples



**Figure 3.** GC-MS-SIM chromatograms of a (A) blank multifloral honey sample and (B) multifloral honey sample fortified at 0.05  $\mu\text{g/g}$ . See **Table 1** for peak identification.

fortified at levels of 25, 50, 100, and 200  $\mu\text{g/L}$  containing 100  $\mu\text{g/L}$  of the internal standard. The MS response for all pesticides was linear in the concentration range assayed with determination coefficients of  $>0.996$  for all compounds. **Table 3** summarizes the calibration data for the studied pesticides.

**Repeatability.** The repeatability of the chromatographic method was determined by performing the analysis of a sample spiked at 50  $\mu\text{g/L}$ . The sample was injected 10 times with automatic injection, and the relative standard deviation (RSD) values obtained for the retention times ranged from 0.06 to 0.003%, whereas for relative peak areas the values ranged from 2.8 to 8.0% (**Table 3**). Therefore, the repeatability achieved in these chromatographic conditions is very good. The repeatability of the complete analytical method was also determined by replicate analysis of a fortified sample during different days. The repeatability of the method, expressed as RSD, was  $<11\%$  for all compounds.

**Recovery.** Pesticides were extracted from honey by SPE using hexane/ethyl acetate (50:50) as elution solvent. This elution mixture showed the best results in comparison with other assayed solvents, such as hexane or hexane/dichloromethane (data not shown). **Table 4** shows the pesticide recovery results obtained with hexane/ethyl acetate (50:50). Honey was fortified at 0.1, 0.05, and 0.025  $\mu\text{g/g}$  before extraction by adding 0.5

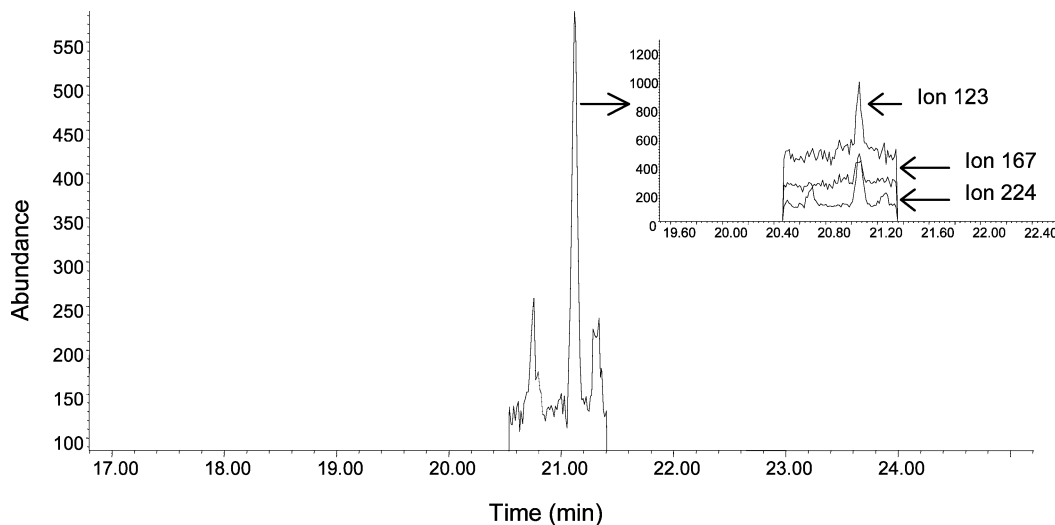
**Table 5.** Pesticide Levels (Micrograms per Kilogram) Found in Honey Samples<sup>a</sup>

honey sample	dichlofuanid	ethalfuralin	trallate
raw citrus 1	7.5	ND <sup>b</sup>	ND
raw citrus 2	9.2	ND	ND
raw citrus 3	10.8	ND	ND
raw citrus 4	5.8	ND	ND
raw citrus 5	6.6	ND	4.4
thyme	ND	ND	4.3
lavender	ND	NO <sup>c</sup>	ND

<sup>a</sup> A total of 11 honey samples were analyzed, and 7 samples (64%) were found to contain at least one of the pesticides determined. <sup>b</sup> Not detected. <sup>c</sup> Detected but not quantified (lower than LOQ).

mL of the appropriate working standard solution and 1 mL of the internal standard (1  $\mu\text{g/mL}$ ), prior to the analysis by GC-MS-SIM. Four sample replicates spiked at each fortification level were assayed. **Figure 3** shows representative chromatograms of a blank and a fortified honey sample.

Similar results were observed for the various kinds of honeys analyzed and, therefore, the average values obtained for the different honeys at each fortification level are summarized in **Table 4**. The recovery obtained for all pesticides ranged from 86 to 101%. The precision of the method, expressed as the RSDs



**Figure 4.** GC-MS-SIM chromatogram of a raw citrus honey. Dichlofluanid was determined at  $9.2 \mu\text{g}/\text{kg}$  and confirmed by the selected ions (123, 167, and 224).

of analyte recoveries, is good,  $<10\%$ . The ions used for quantification are shown in **Table 1**. The obtained values are similar to the recoveries reported by other authors using SPE (8, 26) or SFE (5) for the analysis of pesticides in honey.

**Detection and Quantification Limits.** Honey blank samples were used to determine the detection and quantification limits. The limits of detection (LOD) and the limits of quantification (LOQ) were established by considering values 3 and 10 times the background noise of the blank samples, respectively. **Table 3** summarizes the LODs and LOQs obtained for the individual pesticides in honey. Prometryn, endosulfan I, and procymidone presented higher LODs due to the higher background noise around their retention times. The range of LODs achieved is, in general, lower than those obtained by other authors (4, 8, 18, 24).

**Application of the SPE Procedure to Real Samples.** The developed method was applied to the analysis of 11 different honeys, 6 of them being commercial honey samples of different botanical origin (lavender, orange, thyme, rosemary, eucalyptus, and multifloral) and 5 being raw citrus honey samples obtained directly from beekeepers. Seven samples (64%) contained at least one of the pesticides determined. The pesticides found were dichlofluanid, triallate, and ethalfluralin. **Table 5** summarizes the pesticide levels encountered in the honey samples analyzed, and **Figure 4** depicts the chromatogram of a raw citrus honey sample containing dichlofluanid.

A few works on the monitoring of pesticide residue levels in honey have been previously published. In former studies with Spanish honeys from the northwestern region a few acaricides, amitraz, coumaphos, and fluvalinate (27), and some organophosphorus pesticides, azinphos-methyl, diazinon, ethion, methamidophos, and phosalone (28), were found at low microgram per kilogram levels.

In a more recent study on Portuguese and Spanish honeys (21), organochlorine pesticides were the compounds most frequently detected at concentrations from  $0.01$  to  $4.3 \mu\text{g}/\text{g}$ , mainly in Portuguese honeys, with lindane presenting the highest levels. Some acaricides and organophosphorus pesticides were also detected, but the concentrations found were lower than those observed for organochlorines.

In comparison with these studies, the pesticide residue concentrations found in our work are in the lower end. Contamination of the area surrounding bee colonies as well as pesticide use for treatment of beehives has a marked influence

on the kind and concentration of contaminants found in honey. This may explain the different types and levels of pesticides encountered in the diverse honey production areas studied.

**Conclusions.** A rapid and sensitive method was developed for the determination in honey of more than 50 compounds belonging to various classes of pesticides in a single analysis. The proposed method involves SPE and direct GC-MS analysis without a further cleanup step. The main advantages of this method are that a small volume of organic solvents is required and a large number of pesticides can be simultaneously determined and confirmed in a single step with good reproducibility and low detection limits. The developed method was applied to the determination of the studied pesticides in various Spanish honeys, and dichlofluanid, triallate, and ethalfluralin were the pesticides found. Although at least one pesticide was detected in 64% of the samples, the levels found were very low.

#### LITERATURE CITED

- (1) Driss, M. R.; Zafzouf, M.; Sabbah, S.; Bouguerra, M. L. Simplified procedure for organochlorine pesticides residues analysis in honey. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **1994**, *57*, 63–71.
- (2) Garcia, M. A.; Fernández, M. I.; Melgar, M. J. Contamination of honey with organophosphorus pesticides. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1995**, *54*, 825–832.
- (3) Al-Rifai, J.; Akeel, N. Determination of pesticide residues in imported and locally produced honey in Jordan. *J. Apic. Res.* **1997**, *36*, 155–161.
- (4) Menkissoglu-Spiroudi, U.; Diamantidis, G. C.; Georgiou, V. E.; Thrassyvoulou, A. T. Determination of malathion, coumaphos, and fluvalinate residues in honey by gas chromatography with nitrogen–phosphorus or electron-capture detectors. *J. AOAC Int.* **2000**, *83*, 78–182.
- (5) Jones, A.; McCoy, C. Supercritical fluid extraction of organophosphate and carbamate insecticides in honeybees. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 2143–2147.
- (6) Cossu, M.; Alamanni, M. C. Monitoring of pyrethroid residues in Sardinian honey by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Ital. J. Food* **2003**, *15*, 541–551.
- (7) Bernal, J. L.; del Nozal, M<sup>a</sup>. J.; Rivera, J. M.; Jiménez, J. J.; Atienza, J. Determination of the fungicide vinclozolin in honey and bee larvae by solid-phase and solvent extraction with gas chromatography and electron-capture and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* **1996**, *754*, 507–513.

- (8) Tsipi, D.; Triantafyllou, M.; Hiskia, A. Determination of organochlorine pesticide residues in honey applying solid-phase extraction with RP-18 material. *Analyst* **1999**, *124*, 473–475.
- (9) Jansson, C. Multiresidue method for the gas chromatographic determination of pesticides in honey after solid-phase extraction cleanup. *J. AOAC Int.* **2000**, *83*, 714–719.
- (10) Korta, E.; Bakkali, A.; Berrueta, I. A.; Gallo, B.; Vicente, F. Study of semi-automated solid-phase extraction for the determination of acaricide residues in honey by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2001**, *930*, 21–29.
- (11) Jimenez, J. J.; Bernal, J. L.; del Nozal, M<sup>a</sup>. J.; Martín, M<sup>a</sup>. T.; Mayorga, A. L. Solid-phase microextraction applied to the analysis of pesticide residues in honey using gas chromatography with electron-capture detection. *J. Chromatogr. A* **1998**, *829*, 269–277.
- (12) Fernandez, M.; Padrón, C.; Marconi, L.; Ghini, S.; Colombo, R.; Sabatini, A. G.; Girotti, S. Determination of organophosphorus pesticides in honeybees after solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. A* **2001**, *922*, 257–265.
- (13) Volante, M.; Galarini, R.; Miano, V.; Cattaneo, M.; Pecorelli, I.; Bianchi, M.; Marinoni, M. T.; Cossignani, L.; Damiáni, P. A SPME-GC-MS approach for antivarroa and pesticide residues analysis in honey. *Chromatographia* **2001**, *54*, 241–246.
- (14) Sánchez-Brunete, C.; Albero, B.; Miguel, E.; Tadeo, J. L. Determination of insecticides in honey by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography with nitrogen–phosphorus detection and mass spectrometric confirmation. *J. AOAC Int.* **2002**, *85*, 128–133.
- (15) Albero, B.; Sánchez-Brunete, C.; Tadeo, J. L. Multiresidue determination of pesticides in honey by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography with electron-capture detection. *J. AOAC Int.* **2001**, *84*, 1165–1171.
- (16) Waliszewski, S. M.; Pardo, V. T.; Waliszewski, K. N.; Ochoa, A.; Infanzon, R. M. A rapid and low cost monitoring method for fluvalinate determination in honey. *J. Sci. Food Agric.* **1998**, *77*, 149–152.
- (17) Russo, M. V.; Neri, B. Fluvalinate residues in honey by capillary gas chromatography-electron capture detection-mass spectrometry. *Chromatographia* **2002**, *55*, 607–610.
- (18) Rossi, S.; Dalpero, A. P.; Ghini, S.; Colombo, R.; Sabatini, A. G.; Girotti, S. Multiresidual method for the gas chromatographic analysis of pesticides in honeybees cleaned by gel permeation chromatography. *J. Chromatogr. A* **2001**, *905*, 223–232.
- (19) Gomis, D. B.; Mangas, J. J.; Castaño, A.; Gutierrez, M. D. Determination of acaricides in honey by liquid chromatography with ordinary, narrow-bore, and microbore columns. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3867–3870.
- (20) Fernandez, M.; Picó, Y.; Gorotti, S.; Mañes, J. Analysis of organophosphorus pesticides in honeybees by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 3540–3547.
- (21) Blasco, C.; Fernández, M.; Pena, A.; Lino, C.; Silveira, M. I.; Font, G.; Picó, Y. Assessment of pesticide residues in honey samples from Portugal and Spain. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 8132–8138.
- (22) Fillion, J.; Sauvé, F.; Selwyn, J. Multiresidue method for determination of residues of 251 pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography with fluorescence detection. *J. AOAC Int.* **2000**, *83*, 698–713.
- (23) Wong, J.; Webster, W.; Halverson, M. G.; Hengel, C. A.; Ngim, M. J.; Ebeler, S. E. Multiresidue pesticide analysis in wines by solid-phase extraction and capillary gas chromatography-mass spectrometric detection with selective ion monitoring. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 1148–1161.
- (24) Fernández Muiño, M. A.; Simal Lozano, J. Gas chromatographic-mass spectrometric method for the simultaneous determination of amitraz, bromopropylate, coumaphos, cymiazole and fluvalinate residues in honey. *Analyst* **1993**, *118*, 1519–1522.
- (25) Albero, B.; Sánchez-Brunete, C.; Tadeo, J. L. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in honey by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography/mass spectrometry. *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 576–582.
- (26) Jimenez, J. J.; Bernal, J. L.; del Nozal, M<sup>a</sup>. J.; Toribio, L.; Martín, M<sup>a</sup>. T. Gas chromatography with electron-capture and nitrogen–phosphorus detection in the analysis of pesticides in honey after elution from a Florisil column. *J. Chromatogr. A* **1998**, *823*, 381–387.
- (27) García, M. A.; Fernández, M. I.; Herrero, C.; Melgar, M. J. Acaricide residue determination in honey. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1996**, *56*, 881–887.
- (28) García, M. A.; Fernández, M. I.; Melgar, M. J. Contamination of honey with organophosphorus pesticides. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1995**, *54*, 825–832.

Received for review March 31, 2004. Revised manuscript received July 9, 2004. Accepted July 19, 2004. Financial aid from INIA (Project API02-002-C3-3) is acknowledged.

JF049470T

## CAPÍTULO II

DESARROLLO DE MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN ZUMOS DE FRUTAS Y HORTALIZAS

---

## **DESARROLLO DE MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN ZUMOS DE FRUTAS Y HORTALIZAS**

El control de las plagas y enfermedades en las frutas y hortalizas, que pueden afectar al rendimiento y calidad de las cosechas, se realiza habitualmente mediante la aplicación de pesticidas. La presencia de estos compuestos en los alimentos supone una gran preocupación para los consumidores, debido a los posibles efectos adversos a largo plazo para la salud, en especial en los niños ya que su consumo de frutas y hortalizas con relación a su peso corporal es mucho mayor. Además, son más susceptibles a los efectos de estos compuestos ya que se encuentran en las primeras fases de su desarrollo.

Como se ha indicado anteriormente, las agencias gubernamentales y las organizaciones internacionales establecen los límites máximos de residuos (LMR) de pesticidas en los alimentos. En el Reglamento (CE) N° 149/2008 del Parlamento Europeo y el Consejo, que modifica al Reglamento (CE) N° 396/2005, se establecen los LMR de pesticidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal armonizados para todos los Estados miembros de la Unión Europea. En el caso de alimentos transformados, como son los zumos, para los cuales no se han establecido LMR, se aplican los del alimento sin transformar aunque se está estudiando el incluir factores de concentración o de dilución que tengan en cuenta los cambios en los niveles de los pesticidas debidos a la transformación de estos alimentos.

Por lo general, se aplican diversos tipos de pesticidas a las cosechas por lo que es necesario el desarrollo de métodos analíticos que permitan la determinación del mayor número posible de compuestos en un único análisis. A su vez, los métodos desarrollados tienen que ser altamente selectivos y sensibles para poder determinar residuos de pesticidas en cantidades muy bajas, como es el caso de los zumos, ya que la transformación de los alimentos reduce la cantidad de pesticidas encontrados.

En la etapa de extracción no solamente hay que obtener extractos lo más limpios posible, sino que además hay que poder concentrar la muestra para poder determinar niveles lo más bajos posibles mediante técnicas instrumentales como la cromatografía de gases. La tendencia actual es trabajar en sistemas miniaturizados que permitan ahorrar una gran cantidad de disolventes, tiempo y dinero, manteniendo una buena fiabilidad. Por consiguiente, en el caso de los zumos, la extracción líquido-líquido ha dejado paso a la extracción líquido-sólido, donde la gran variedad de soportes sólidos y adsorbentes permiten extraer compuestos de muy distinta naturaleza.

Los trabajos de este capítulo presentan el desarrollo de métodos para determinar pesticidas en zumos de frutas y hortalizas. En los primeros dos trabajos se desarrollaron métodos para determinar dos grupos de pesticidas en zumos de distintas clases, según la familia de compuestos estudiados, empleando MSPD como técnica de extracción. A continuación se presenta un trabajo donde se puso a punto un método que permite determinar tiabendazol en naranjas, no solo en zumo sino también en la corteza y poder así estudiar el efecto del almacenamiento y el lavado de la fruta en los niveles de residuos encontrados. Por último, se presenta un método multiresiduos basado en la extracción en fase sólida que permite la determinación simultánea de más de cincuenta pesticidas en un solo análisis.

## **1. DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS EN ZUMOS DE FRUTAS MEDIANTE DISPERSIÓN DE LA MATRIZ EN FASE SÓLIDA Y CROMATOGRAFÍA DE GASES**

El objetivo de este trabajo ha sido la puesta a punto de un método basado en la dispersión de la matriz en fase sólida para la determinación de nueve pesticidas organofosforados (diazinon, metil-paratión, fenitrothion, malation, clorpirifos, fentoato, metidation, profenofos y etión) en zumos de frutas de distintas clases.

Se eligieron los compuestos organofosforados por su uso extensivo en el control de las cosechas así como por la alta solubilidad en agua de algunos de ellos. Esto último es muy importante ya que el principal componente de los zumos es el agua.

Los niveles de residuos se determinaron empleando la cromatografía de gases con un detector de nitrógeno fósforo (NPD) y la confirmación de la identidad de dichos residuos se llevó a cabo por cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas. La determinación cromatográfica se optimizó utilizando como patrones de cuantificación extractos de zumo a los que se les adicionó la mezcla de compuestos. Se había observado un incremento de la respuesta cromatográfica en los extractos de muestras control enriquecidos con los pesticidas en comparación con los patrones preparados con disolventes, lo que producía recuperaciones superiores al 100%. Este fenómeno, conocido como efecto matriz ha sido descrito ampliamente en la literatura científica. Al emplear extractos enriquecidos como patrones se contrarresta este efecto y se cuantifican adecuadamente los niveles de residuos.

La extracción de los compuestos se llevó a cabo empleando la dispersión de la matriz en fase sólida, usando Florisil como adsorbente. El posible efecto del material de la columna en el proceso analítico se ensayó utilizando columnas de

vidrio y de polipropileno. Los cromatogramas más limpios se obtuvieron cuando se utilizaban las columnas de vidrio por lo que éstas fueron las elegidas. En el proceso de extracción también se comprobó si la sonicación mejoraba o no las recuperaciones, observándose una extracción más eficaz cuando se realizaba en baño de ultrasonidos, sobre todo en las muestras más espesas como son los zumos de melocotón, piña y naranja.

El método desarrollado, en el que la extracción y la purificación se llevan a cabo de forma simultánea, permite la identificación y determinación de residuos de los analitos elegidos a unos niveles por debajo de los límites establecidos por la legislación vigente.

Se analizaron zumos de frutas comercializados en España y en la mayoría de ellos se detectó al menos uno de los compuestos estudiados, aunque a unas concentraciones muy bajas.

**DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS EN ZUMOS DE FRUTAS  
MEDIANTE DISPERSIÓN DE LA MATRIZ EN FASE SÓLIDA Y CROMATOGRFÍA DE  
GASES**

B. Albero, C. Sánchez-Brunete y J.L. Tadeo. "Determination of organophosphorus pesticides in fruit juices by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography", *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003, 51(24), 6915-21.

**Contribución**

Póster. "Determination of organophosphorus pesticides in fruit juices by MSPD and gas chromatography", *VII International Symposium on Analytical Methodology in the Environmental Field*, 21-24 Octubre 2004, La Coruña, España.

## Determination of Organophosphorus Pesticides in Fruit Juices by Matrix Solid-Phase Dispersion and Gas Chromatography

BEATRIZ ALBERO, CONSUELO SÁNCHEZ-BRUNETE, AND JOSÉ L. TADEO\*

Departamento de Medio Ambiente, INIA, Carretera de la Coruña Km 7, 28040 Madrid, Spain

A rapid multiresidue method was developed for the determination of nine organophosphorus pesticides in fruit juices. The analytical procedure is based on the matrix solid-phase dispersion (MSPD) of juice samples on Florisil in small glass columns and subsequent extraction with ethyl acetate assisted by sonication. Residue levels were determined by gas chromatography with nitrogen–phosphorus detection. Spiked blank samples were used as standards to counteract the matrix effect observed in the chromatographic determination. The NPD response for all pesticides was linear in the concentration range studied with determination coefficients >0.999. Average recoveries obtained for all of the pesticides in the different juices and fortification levels were >70% with relative standard deviations of <11%. The detection limits ranged from 0.1 to 0.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . The identity of the pesticides was confirmed by gas chromatography with mass spectrometric detection using selected ion monitoring. The proposed MSPD method was applied to determine pesticide residue levels in fruit juices sold in Spanish supermarkets. At least one pesticide was found in most of the samples, although the levels detected were very low, far from the maximum residue levels established for raw fruit.

**KEYWORDS:** Fruit juices; pesticides; MSPD; gas chromatography

### INTRODUCTION

Pesticides used in pre- and postharvest treatments to control diseases of fruits and vegetables may persist over the season and appear in processed products for human consumption, such as fruit juices, which are widely consumed, particularly by children.

Several pesticide groups, fungicides (1–3), pyrethroids (4), and triazine herbicides (5), have been determined in fruit juices. Organophosphorus pesticides have also been studied because some of them are extensively used and have a high solubility in water, the main component of fruit juices. Ethion, chlorpyrifos, phosmet, and azinphos-methyl have been detected in orange juice from Brazil and the United States (6), and methidathion has been detected in other juices (7). Maximum residue levels (MRL), for raw fruit but not for processed products such as juice, have been established by European Union legislation, and ~30–50% of the fruit and vegetable samples analyzed in Europe contained residue levels, although these were below the MRL in most cases (8).

The methods used to determine organophosphorus pesticides in fruits and vegetables are mainly based in liquid partitioning with organic solvents such as ethyl acetate (9) and dichloromethane (10), usually followed by a solid-phase extraction cleanup step (11, 12). In the past few years, new extraction procedures have been developed, such as solid-phase microextraction (SPME) (13) and supercritical fluid extraction (SFE) (14).

Matrix solid-phase dispersion (MSPD), based on the dispersion of the sample on an adsorbent, such as Florisil,  $\text{C}_{18}$ , alumina, or silica, is a technique that allows the extraction and cleanup in a single step. For solid samples, the mixture is done in a mortar and then transferred to the extraction columns (15–17), whereas for liquid samples the dispersion of the matrix in the adsorbent is done directly in the extraction columns (18, 19).

Organophosphorus pesticides are usually determined by gas chromatography with flame photometric detection (FPD) (9–11, 13) or nitrogen–phosphorus detection (NPD) (20), although HPLC with diode array detection (21) or coupled with tandem mass spectrometry (7) has also been applied.

The main objective of this work was to develop a rapid and simple method for the determination of nine organophosphorus pesticides (diazinon, parathion-methyl, fenitrothion, malathion, chlorpyrifos, phenthoate, methidathion, profenofos, and ethion) in different fruit juices based on MSPD of samples on Florisil. Residue levels were determined by gas chromatography with nitrogen–phosphorus detection (GC-NPD), and the confirmation of identity was performed by gas chromatography with mass spectrometric detection (GC-MS) using selected ion monitoring (SIM). The developed method was applied to the determination of organophosphorus pesticides in several fruit juices commercialized in Spain.

### MATERIALS AND METHODS

**Reagents.** Residue analysis grade methanol and ethyl acetate were purchased from Scharlau (Barcelona, Spain). Research grade Florisil (60–100 mesh) was supplied by Fluka Chemie (Buchs, Switzerland).

\* Author to whom correspondence should be addressed [telephone (34) 91-347-6821; fax (34) 91-357-2293; e-mail tadeo@inia.es].

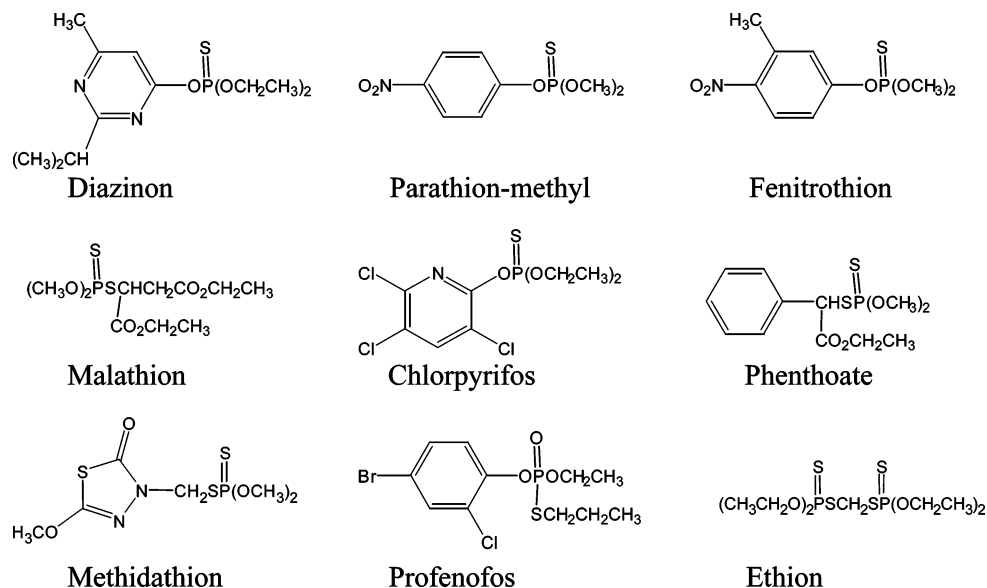


Figure 1. Chemical structures of the organophosphorus pesticides studied.

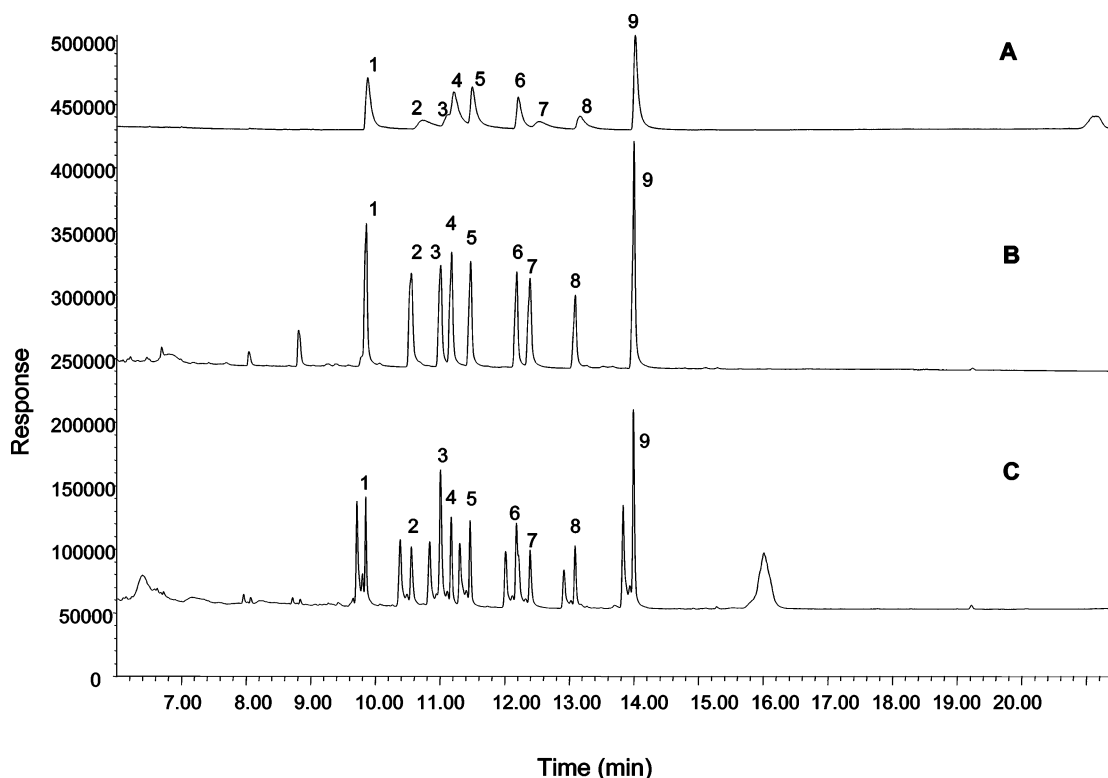


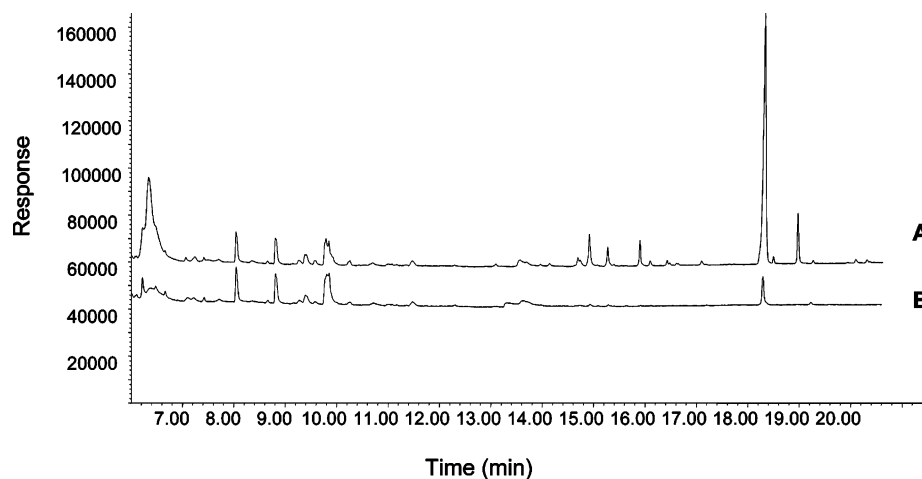
Figure 2. GC-NPD chromatograms of (A) standard mixture solution in ethyl acetate at  $0.025 \mu\text{g/mL}$ , (B) blank apple juice sample fortified at  $0.025 \mu\text{g/g}$  in ethyl acetate, and (C) blank apple juice sample fortified at  $0.025 \mu\text{g/g}$  in methanol. See Table 1 for peak identification.

The adsorbent was heated for 24 h at  $140^\circ\text{C}$  before use. Pesticide standards (99% purity) diazinon, parathion-methyl, fenitrothion, malathion, chlorpyrifos, phenthoate, methidathion, profenofos, and ethion were obtained from Reidel-de Haëns (Seelze, Germany). Figure 1 shows the chemical structures of these compounds. Various commercial fruit juices (apple, peach, orange, pineapple, and grape), made from concentrated juice, were purchased in supermarkets in Madrid.

Stock solutions of individual pesticide standards were prepared in ethyl acetate at  $500 \mu\text{g/mL}$  and stored at  $4^\circ\text{C}$ . Standard working solutions used for the fortification of juice samples were prepared by transferring 0.5 mL of the stock standard solutions to a 250-mL volumetric flask and diluting with methanol to a concentration of  $1 \mu\text{g/mL}$ . The working standard solution was diluted to prepare the 0.02, 0.05, and  $0.2 \mu\text{g/mL}$  standards (transferring 2, 5, and 20 mL of working solution to 100-mL volumetric flasks and diluting with methanol,

respectively). Ethyl acetate was used for the preparation of chromatographic standard solutions.

**GC-NPD Analysis.** An Agilent 6890 (Waldbronn, Germany) gas chromatograph, equipped with an automatic split-splitless injector model HP 7683 and a nitrogen-phosphorus detector, was employed. A fused silica capillary column (HP-1), cross-linked dimethylpolysiloxane, as nonpolar stationary phase ( $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm i.d.}$ ), and  $0.25 \mu\text{m}$  film thickness, supplied by Agilent (Madrid, Spain), was used. The injection port and detector temperatures were  $270$  and  $300^\circ\text{C}$ , respectively, with helium as carrier gas at a flow rate of  $1 \text{ mL/min}$ . The oven temperature was kept at  $70^\circ\text{C}$  for 1 min and then programmed at  $20^\circ\text{C/min}$  to  $220^\circ\text{C}$ , held for 2 min, programmed at  $10^\circ\text{C/min}$  to  $280^\circ\text{C}$ , and held for 5 min (total time = 21.50 min). A  $2 \mu\text{L}$  volume was injected in pulsed splitless mode (pulsed pressure = 310 kPa for



**Figure 3.** GC-NPD chromatograms of (A) blank apple juice sample extracted in a polypropylene column and (B) blank apple juice sample extracted in a glass column.

1.5 min). The constant flow rates of hydrogen and air were 2.0 and 60.0 mL/min, respectively, with nitrogen as makeup gas (30 mL/min).

**GC-MS Confirmation.** An Agilent 6890 gas chromatograph, equipped with an automatic injector model HP 7683 and a 5973 series mass selective detector, was used. The mass spectrometer was operated in electron impact ionization mode (ionizing energy = 70 eV) scanning from  $m/z$  80 to 400 at 4.45 scan/s. The ion source and quadrupole temperatures were 230 and 150 °C, respectively. A fused silica capillary column (ZB-5MS), 5% phenyl polysiloxane as nonpolar stationary phase (30 m  $\times$  0.25 mm i.d.) and 0.25  $\mu$ m film thickness, supplied by Phenomenex (Torrance, CA), was employed. Operating conditions were as follows: injector port temperature, 270 °C; injection volume, 2  $\mu$ L in pulsed splitless mode (pulsed pressure = 310 kPa for 1.5 min); helium as carrier gas at a flow rate of 1.0 mL/min; oven temperature program, 70 °C (1 min), increased at 20 °C/min to 220 °C, held for 2 min, then increased to 280 °C at 10 °C/min, and held for 5 min; solvent delay, 5 min. The total analysis time is 21.50 min, and the equilibration time is 2 min.

Analysis was performed by SIM with the ions indicated in **Table 4** using the following acquisition windows: (1) from 0 to 10.20 min; (2) from 10.20 to 10.90 min; (3) from 10.90 to 11.38 min; (4) from 11.38 to 12.10 min; (5) from 12.10 to 13.00 min; (6) from 13.00 to 13.70 min; (7) from 13.70 to 21.50 min. The dwell time for the ions monitored was 100 ms.

**Sample Preparation.** Glass columns, with Whatman no. 1 filters (2 cm diameter) placed at the bottom end, were filled with 2 g of Florisil. A 1 mL volume of juice was transferred to the glass column, fortified when required with 0.5 mL of the pesticide mixture in methanol. A 0.5 mL of methanol was added instead to unfortified samples. Methanol was used to allow a better distribution of the sample in the matrix. The columns were placed in a tube rack and closed with one-way stopcocks. Juice samples were extracted twice with ethyl acetate (5 mL) for 15 min in an ultrasonic bath (Raypa, Barcelona, Spain) at room temperature. Water level was adjusted to solvent level inside the columns. After sonication, columns were placed in a vacuum

manifold (Supelco Visiprep, Madrid, Spain) and the extraction solvent was filtered. The combined eluates were diluted to 10 mL with ethyl acetate for the highest fortification level. For the other two fortification levels and for commercial juice samples, the eluates were concentrated with a gentle stream of air to an appropriate volume (4 mL for the intermediate level or 2 mL for the lowest level and real samples) before GC analysis.

**Quantification.** The concentration of each compound in juice samples was determined by comparing the peak areas obtained in samples with those found in standards. Chromatographic standards were prepared by spiking blank samples with known amounts of pesticides.

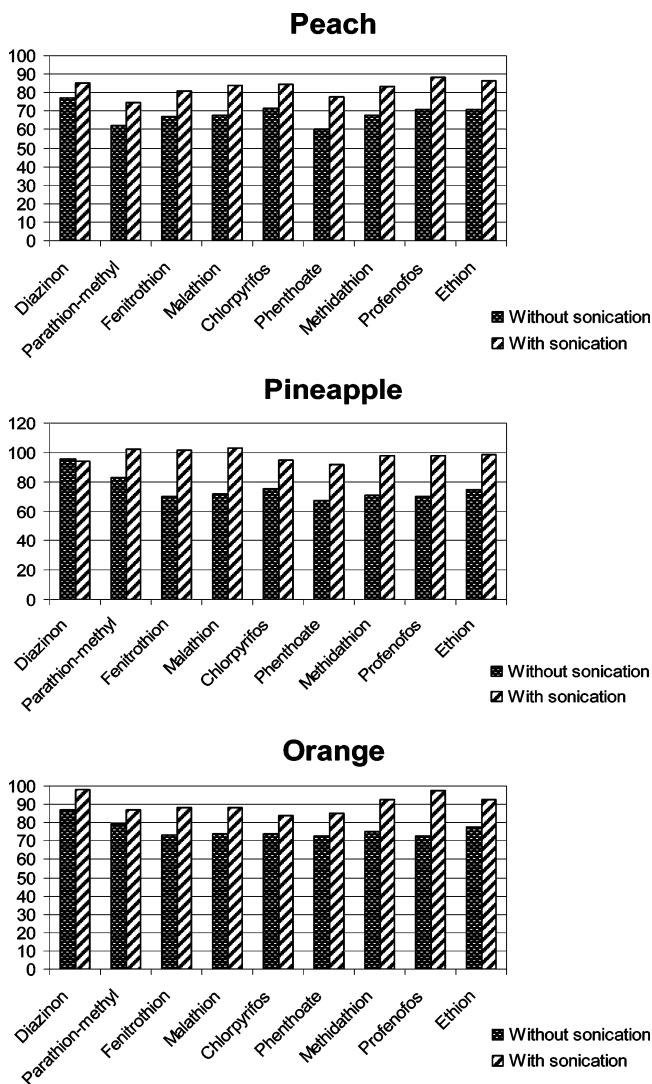
## RESULTS AND DISCUSSION

**Gas Chromatographic Determination.** In a first approach, standard mixtures in ethyl acetate were used for the quantification of pesticides in spiked samples by GC-NPD, but due to the low standard response recovery results were far higher than 100%. When standards were prepared by spiking blank juice samples with known amounts of pesticides, higher peak areas were obtained for the same pesticide concentration. Parts A and B of **Figure 2** show the different responses obtained with standard mixtures prepared in ethyl acetate or with a blank juice sample, respectively. There is an evident matrix effect that enhances the chromatographic response of organophosphorus pesticides. This effect has been described in previous works with different food matrices (20, 22). Therefore, the quantification of pesticide residues was carried out with fortified blank samples. The influence of solvent in the injection step of fortified samples was also assayed. **Figure 2C** shows a representative chromatogram of a fortified blank sample in methanol. The peak area of each compound is  $\sim$ 50% lower than that obtained with fortified samples in ethyl acetate. Moreover, other peaks were

**Table 1.** Retention Times ( $t_R$ ), Calibration Data, and Repeatability of the Pesticides Analyzed by GC-NPD

pesticide	$t_R$ , min	calibration data		repeatability <sup>a</sup> (RSD, %)	
		equation	determination coefficient	$t_R$	peak area
1. diazinon	9.848	$y = (1.42 \pm 0.02) \times 10^8 x + (4.7 \pm 0.3) \times 10^5$	0.9994	0.03	1.4
2. parathion-methyl	10.548	$y = (1.34 \pm 0.01) \times 10^8 x - (2.7 \pm 0.3) \times 10^5$	0.9998	0.04	2.0
3. fenitrothion	11.004	$y = (1.23 \pm 0.01) \times 10^8 x - (2.3 \pm 0.4) \times 10^5$	0.9997	0.02	1.9
4. malathion	11.717	$y = (1.48 \pm 0.01) \times 10^8 x - (2.9 \pm 0.4) \times 10^5$	0.9997	0.02	1.6
5. chlorpyrifos	11.465	$y = (1.30 \pm 0.02) \times 10^8 x - (2.6 \pm 0.4) \times 10^5$	0.9997	0.02	1.1
6. phenthoate	12.179	$y = (1.13 \pm 0.01) \times 10^8 x - (1.7 \pm 0.4) \times 10^5$	0.9998	0.02	4.2
7. methidathion	12.392	$y = (1.18 \pm 0.01) \times 10^8 x - (2.6 \pm 0.3) \times 10^5$	0.9998	0.03	2.4
8. profenofos	13.089	$y = (8.42 \pm 0.01) \times 10^7 x - (6.0 \pm 1.0) \times 10^4$	0.9997	0.02	3.2
9. ethion	13.996	$y = (2.502 \pm 0.007) \times 10^8 x - (4.1 \pm 0.2) \times 10^5$	0.9999	0.02	1.4

<sup>a</sup> Relative standard deviations of retention times and peak areas ( $n = 10$ ).



**Figure 4.** Influence of sonication on pesticide recovery in the extraction procedure. Juice samples were fortified at 0.025  $\mu\text{g/g}$ .

observed in the chromatogram that may be explained by degradation of compounds due to the effect of methanol at the high temperatures of the injection port. Hence, ethyl acetate was the solvent selected for the injection of samples and standards.

**Optimization of the MSPD Method.** The possible effect of column material on the analytical procedure was assayed using polypropylene and glass columns in the sample extraction step. **Figure 3** depicts the chromatograms obtained for blank apple juice samples employing polypropylene or glass columns. The results show that cleaner chromatograms were achieved with glass columns, minimizing the appearance of interfering peaks.

The effect of sonication was also studied in the optimization process of the MSPD method. In general, pesticide recovery from juice samples improved when the extraction was assisted with sonication, particularly in peach, pineapple, and orange juices (**Figure 4**), whereas for the thinner juices, apple and grape, the improvement in recovery was somewhat lower (data not shown). Therefore, the pesticide extraction from juice samples in the proposed method was carried out assisted by sonication.

**Method Validation. Linearity.** The linearity of all the organophosphorus pesticides was determined using blank apple juice samples fortified at concentration levels of 5, 10, 25, 50, and 100  $\mu\text{g/kg}$ . Previously, the influence of the different juices

**Table 2.** Recovery of the Studied Pesticides from Juice Samples<sup>a</sup>

pesticide	fortification level, $\mu\text{g/g}$	apple	peach	orange	pineapple	grape
diazinon	0.100	100.6 $\pm$ 4.1	94.5 $\pm$ 2.9	92.6 $\pm$ 2.7	96.6 $\pm$ 5.6	102.3 $\pm$ 1.5
	0.025	96.1 $\pm$ 5.2	84.9 $\pm$ 3.9	98.2 $\pm$ 2.0	93.8 $\pm$ 7.4	88.8 $\pm$ 9.2
	0.010	93.0 $\pm$ 7.8	94.4 $\pm$ 9.1	102.5 $\pm$ 3.7	88.6 $\pm$ 8.1	80.3 $\pm$ 6.2
parathion-methyl	0.100	96.7 $\pm$ 4.5	95.3 $\pm$ 2.5	98.7 $\pm$ 1.9	104.7 $\pm$ 3.0	108.6 $\pm$ 3.8
	0.025	94.3 $\pm$ 7.6	74.5 $\pm$ 2.1	87.1 $\pm$ 8.0	102.1 $\pm$ 2.4	90.7 $\pm$ 10.5
	0.010	73.2 $\pm$ 5.6	86.1 $\pm$ 8.6	87.7 $\pm$ 4.8	93.5 $\pm$ 5.6	82.9 $\pm$ 6.0
fenitrothion	0.100	92.9 $\pm$ 4.8	90.7 $\pm$ 5.3	94.0 $\pm$ 2.5	95.9 $\pm$ 4.7	94.7 $\pm$ 2.5
	0.025	86.3 $\pm$ 7.9	81.0 $\pm$ 8.1	88.4 $\pm$ 7.8	101.1 $\pm$ 1.9	78.1 $\pm$ 8.5
	0.010	70.2 $\pm$ 7.2	90.4 $\pm$ 10.3	99.8 $\pm$ 5.6	80.1 $\pm$ 6.1	79.0 $\pm$ 10.8
malathion	0.100	97.3 $\pm$ 4.7	94.0 $\pm$ 3.9	96.7 $\pm$ 1.4	101.4 $\pm$ 3.4	101.9 $\pm$ 2.0
	0.025	85.7 $\pm$ 7.7	84.0 $\pm$ 3.8	87.9 $\pm$ 7.2	102.7 $\pm$ 1.6	80.2 $\pm$ 6.9
	0.010	85.9 $\pm$ 5.7	92.3 $\pm$ 8.2	102.3 $\pm$ 7.6	88.2 $\pm$ 7.7	86.1 $\pm$ 8.9
chlorpyrifos	0.100	101.9 $\pm$ 9.8	98.3 $\pm$ 7.6	96.2 $\pm$ 1.1	104.0 $\pm$ 2.7	104.8 $\pm$ 2.6
	0.025	93.3 $\pm$ 3.6	84.3 $\pm$ 4.9	84.1 $\pm$ 5.9	94.4 $\pm$ 10.6	81.5 $\pm$ 6.4
	0.010	85.2 $\pm$ 6.1	95.3 $\pm$ 9.6	100.0 $\pm$ 9.6	89.1 $\pm$ 3.7	83.4 $\pm$ 10.5
phenthoate	0.100	93.4 $\pm$ 2.4	90.6 $\pm$ 4.8	93.4 $\pm$ 2.5	99.5 $\pm$ 4.9	97.5 $\pm$ 4.8
	0.025	82.1 $\pm$ 8.7	77.7 $\pm$ 2.9	84.8 $\pm$ 2.3	91.6 $\pm$ 9.9	75.7 $\pm$ 9.8
	0.010	75.8 $\pm$ 5.3	93.5 $\pm$ 9.4	93.0 $\pm$ 7.2	79.4 $\pm$ 4.3	72.4 $\pm$ 8.4
methidathion	0.100	91.3 $\pm$ 1.9	91.6 $\pm$ 3.1	95.4 $\pm$ 2.5	96.7 $\pm$ 5.0	97.0 $\pm$ 4.6
	0.025	80.6 $\pm$ 8.9	83.4 $\pm$ 2.6	92.4 $\pm$ 3.8	97.4 $\pm$ 9.9	75.6 $\pm$ 9.0
	0.010	80.1 $\pm$ 10.9	94.1 $\pm$ 7.7	97.5 $\pm$ 7.0	79.8 $\pm$ 3.3	78.1 $\pm$ 10.9
profenofos	0.100	101.6 $\pm$ 8.5	99.0 $\pm$ 10.7	101.5 $\pm$ 5.1	109.9 $\pm$ 4.3	105.1 $\pm$ 6.2
	0.025	85.6 $\pm$ 8.2	88.3 $\pm$ 1.1	97.3 $\pm$ 2.9	98.0 $\pm$ 10.5	88.0 $\pm$ 7.2
	0.010	71.2 $\pm$ 5.7	91.5 $\pm$ 9.1	98.8 $\pm$ 9.3	78.3 $\pm$ 6.6	79.2 $\pm$ 10.8
ethion	0.100	100.1 $\pm$ 3.7	97.0 $\pm$ 4.0	98.0 $\pm$ 3.1	104.6 $\pm$ 1.5	107.0 $\pm$ 2.2
	0.025	91.2 $\pm$ 6.5	86.3 $\pm$ 1.8	92.5 $\pm$ 2.3	98.1 $\pm$ 10.4	87.0 $\pm$ 5.1
	0.010	91.8 $\pm$ 7.8	92.9 $\pm$ 7.5	95.6 $\pm$ 7.3	89.6 $\pm$ 4.9	87.6 $\pm$ 7.8

<sup>a</sup> Recovery, %  $\pm$  RSD, % ( $n = 4$  at each fortification level for each juice sample).

**Table 3.** Limits of Detection (Micrograms per Kilogram) and Limits of Quantification (Micrograms per Kilogram) of the Pesticides Analyzed by GC-NPD

	apple		peach		orange		pineapple		grape	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ
diazinon	0.5	1.7	0.6	2.0	0.6	2.0	0.6	2.0	0.4	1.3
parathion-methyl	0.1	0.3	0.3	1.0	0.1	0.3	0.1	0.3	0.2	0.6
fenitrothion	0.1	0.3	0.1	0.3	0.1	0.3	0.1	0.3	0.1	0.3
malathion	0.3	1.0	0.3	1.0	0.2	0.6	0.3	1.0	0.1	0.3
chlorpyrifos	0.1	0.3	0.2	0.6	0.3	1.0	0.1	0.3	0.1	0.3
phenthoate	0.3	1.0	0.1	0.3	0.1	0.3	0.1	0.3	0.1	0.3
methidathion	0.1	0.3	0.2	0.6	0.2	0.6	0.1	0.3	0.1	0.3
profenofos	0.1	0.3	0.3	1.0	0.3	1.0	0.1	0.3	0.3	1.0
ethion	0.3	1.0	0.1	0.3	0.1	0.3	0.1	0.3	0.1	0.3

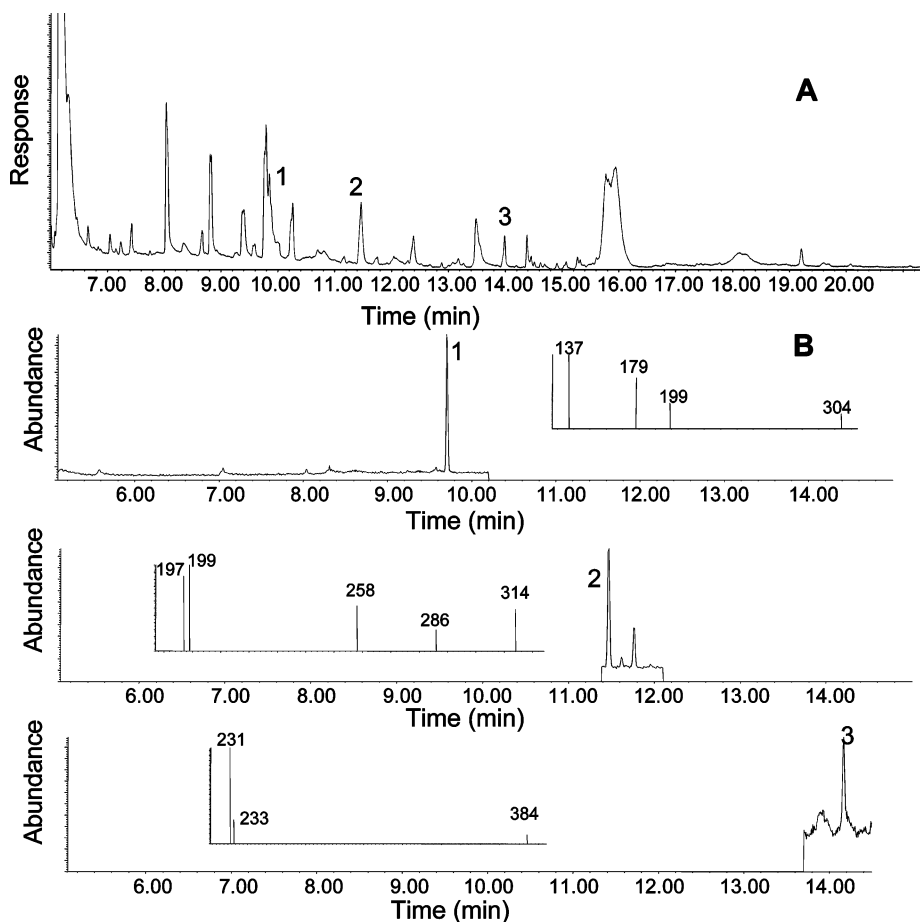
**Table 4.** Main Ions and Their Relative Abundance of the Studied Pesticides

pesticide	$t_R$ , min	$m/z^a$ (relative abundance, %)
diazinon	9.749	137 (100), 179 (93), 199 (53), 304* (52)
parathion-methyl	10.691	109 (100), 125 (83), 263* (58)
fenitrothion	11.125	109 (95), 125 (98), 260 (55), 277* (100)
malathion	11.254	127 (82), 158 (47), 173 (100)
chlorpyrifos	11.494	197 (95), 199 (100), 258 (44), 286 (28), 314 (73)
phenthoate	12.361	107 (27), 125 (53), 246 (24), 274 (100), 320* (7)
methidathion	12.719	85 (60), 125 (17), 145 (100), 302* (3)
profenofos	13.271	139 (77), 208 (100), 269 (36), 339 (65), 374* (30)
ethion	14.206	231 (100), 233 (14), 384* (15)

<sup>a</sup> Molecular ion is indicated by an asterisk.

in the peak areas of the studied pesticides was assayed, and similar peak areas with relative standard deviations of  $<5\%$  were obtained for all of the compounds in the different juices.

**Table 1** summarizes retention times and calibration data of the



**Figure 5.** (A) GC-NPD chromatogram of a commercial orange juice sample. Peaks: 1, diazinon; 2, chlorpyrifos; 3, ethion. (B) GC-MS chromatograms with the main ions of the mass spectra of the three pesticides detected.

studied pesticides. The slope and intercept values together with their relative standard deviations were determined by applying regression analyses. Good determination coefficients were obtained for all of the compounds, ranging from 0.9994 to 0.9999.

**Repeatability.** The repeatability of our chromatographic method was determined by performing the analysis of a sample spiked at 25  $\mu\text{g/L}$ . The sample was injected 10 times with an automatic injector, and the relative standard deviation (RSD) values obtained for retention times ranged from 0.02 to 0.04%, whereas for peak areas the values ranged from 1.1 to 4.2% (Table 1). Therefore, the repeatability achieved by automatic injection was very good.

**Stability.** Stock standard solutions and working solutions were found to be stable for at least 3 months and 1 week, respectively, when stored at 4  $^{\circ}\text{C}$ . Moreover, the stability of a fortified blank sample kept in the autosampler for 24 h was assayed, and differences of <3% were obtained.

**Specificity.** The specificity of the proposed MSPD procedure was assessed by analyzing blank juice samples. The absence of background peaks, above the signal-to-noise ratio of 3, at the retention times of target pesticides, showed that no interferences occurred. A chromatographic peak at 9.70 min was the only peak that partially overlaps with diazinon (9.85 min) (Figure 3).

**Recovery.** Table 2 shows the pesticide recovery results obtained. Five different fruit juices were fortified at 0.1, 0.025, and 0.010  $\mu\text{g/g}$  before extraction and analyzed by GC-NPD. The recoveries obtained for all pesticides ranged from 70 to 110% with RSDs of <11%. These results show that good

recoveries from juice samples were obtained throughout the proposed method. These values are similar to the recoveries reported by other authors for the MSPD extraction of several pesticides from fruit juices (7).

**Detection and Quantification Limits.** The limits of detection (LOD) of the proposed method were determined by considering a value 3 times the background noise obtained for blank samples, whereas the limits of quantification (LOQ) were determined considering a value 10 times the background noise. Table 3 summarizes the detection and quantification limits obtained for the individual pesticides in the different juices studied. Diazinon presents the highest limits in all five juices because it is partially overlapped by a peak from the sample. The range of LOD achieved is of the same order as those previously obtained by other authors using new sample preparation techniques, such as MSPD or SPME (7, 13).

**GC-MS Confirmation.** The identity of the organophosphorus pesticides was confirmed by GC-MS with SIM. Previously, a total ion chromatogram of a standard mixture solution was obtained to determine their main ions and retention times. Table 4 shows the retention times and main ions with their relative abundances of the organophosphorus pesticides. All of the studied compounds can be identified by their main ions, in the PEST library, at levels near 1 ppb per compound.

**Determination of Pesticide Levels in Commercial Juices.** The developed MSPD method was applied to the determination of organophosphorus pesticides in commercial fruit juices. Table 5 summarizes the pesticide levels found in 21 juices purchased in various supermarkets in Madrid. The pesticides found in the commercial juices analyzed were diazinon, chlorpyrifos, and

**Table 5.** Pesticide Levels (Micrograms per Kilogram) Found in Commercial Juices<sup>a</sup>

sample	diazinon	chlorpyrifos	ethion
		Apple	
1	4.7	0.5	ND <sup>b</sup>
2	4.5	ND	ND
3	4.0	1.4	ND
		Peach	
1	ND	0.7	ND
2	ND	0.6	ND
3	ND	0.6	ND
4	ND	2.8	ND
5	ND	3.2	ND
		Orange	
1	2.1	ND	ND
2	3.7	ND	ND
3	2.5	2.1	0.6
4	2.9	ND	ND
5	NQ <sup>c</sup>	1.2	ND
6	3.0	ND	ND
		Pineapple	
1	2.5	ND	ND
2	3.2	ND	ND
3	3.4	ND	ND
4	5.5	ND	ND
5	4.2	1.1	ND
		Grape	
1	2.6	ND	ND

<sup>a</sup> A total of 21 juice samples, purchased in Spanish supermarkets, were analyzed, and 20 samples (95%) were found to contain at least one of the nine pesticides determined. <sup>b</sup> ND, not detected. <sup>c</sup> NQ, detected but not quantified (lower than LOQ).

ethion. **Figure 5A** shows the NPD chromatogram of a commercial orange juice sample that contained 2.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  diazinon, 2.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  chlorpyrifos, and 0.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ethion. These pesticide levels were confirmed by GC-MS with SIM, and **Figure 5B** depicts the corresponding chromatograms for these compounds with the main ions of their mass spectra.

Few data on pesticide residues in fruit juices are available in the scientific literature; however, the organophosphorus pesticide levels found in our research are similar to those reported by other authors (6, 7). Despite a high percentage (95%) of the commercial juice samples studied containing residues, the levels detected were very low and clearly lower than the MRL established by the EU for the content in fruit of the pesticides analyzed.

**Conclusion.** A rapid method, based on MSPD, has been developed for the simultaneous determination of nine organophosphorus pesticides in different fruit juices by GC-NPD. With the proposed analytical procedure, the extraction and cleanup can be performed in a single step requiring a low volume of organic solvent. The good reproducibility and the low detection and quantification limits achieved with this method allow its application in the determination of pesticide levels in commercial fruit juices, below the MRL established for raw fruits. The developed MSPD method has been applied to determine organophosphorus pesticides in fruit juices sold in Spanish supermarkets, and diazinon and chlorpyrifos have been detected in many of the juices analyzed, whereas ethion was found in only one sample. The identities of the detected pesticides have been confirmed by GC-MS with SIM.

#### LITERATURE CITED

- Sannino, A.; Bandini, M.; Bolzoni, L. Multiresidue determination of 19 fungicides in processed fruits and vegetables by capillary gas chromatography after gel permeation chromatography. *J. AOAC Int.* **1999**, *82*, 1229–1238.
- Frank, R.; Braun, H. E.; Ripley, B. D.; Pitblado, R. Residues of nine insecticides and two fungicides in raw and processed tomatoes. *J. Food Prot.* **1991**, *54*, 41–46.
- Itak, J. A.; Selisker, M. Y.; Herzog, D. P.; Fleeker, J. R.; Bogus, E. R.; Mumma, R. O. Determination of captan in water, peaches, and apple juice by a magnetic particle-based immunoassay. *J. AOAC Int.* **1994**, *77*, 86–91.
- Sannino, A.; Bandini, M.; Bolzoni, L. Determination of pyrethroid pesticide residues in processed fruits and vegetables by gas chromatography with electron capture and mass spectrometric detection. *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 101–108.
- Khrolenko, M.; Dzygiel, P.; Wieczorek, P. Combination of supported liquid membrane and solid-phase extraction for sample pre-treatment of triazine herbicides in juice prior to capillary electrophoresis determination. *J. Chromatogr. A* **2002**, *975*, 219–227.
- Hankin, L.; Pylypiw, H. M., Jr. Pesticides in orange juice sold in Connecticut. *J. Food Prot.* **1991**, *54*, 310–311.
- Perret, D.; Gentili, A.; Marchese, S.; Sergi, M.; D'Ascenzo, G. Validation of a method for the determination of multiclass pesticide residues in fruit juices by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after extraction by matrix solid-phase dispersion. *J. AOAC Int.* **2002**, *85*, 724–730.
- Shaw, I. Pesticides in food. In *Pesticide Chemistry and Bio-science*; Brooks, G. T., Roberts, T. R., Eds.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, U.K., 1999; pp 421–428.
- Cai, C. P.; Liang, M.; Wen, R. R. Rapid multiresidue screening method for organophosphate pesticides in vegetables. *Chromatographia* **1995**, *40*, 417–420.
- De Paoli, M.; Barbina, M. T.; Mondini, R.; Pezzoni, A.; Valentino, A. Determination of organophosphorus pesticides in fruits by on-line size-exclusion chromatography-liquid chromatography-gas chromatography-flame photometric detection. *J. Chromatogr. A* **1992**, *626*, 145–150.
- Schenck, F. J.; Howard-King, V. Rapid solid-phase extraction cleanup for pesticide residues in fresh fruits and vegetables. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1999**, *63*, 277–281.
- Pihlström T.; Österdahl B. Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables after cleanup with solid-phase extraction using ENV+ (polystyrene-divinylbenzene) cartridges. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 2549–2552.
- Simplício, A. L.; Vilas Boas, L. Validation of a solid-phase microextraction method for the determination of organophosphorus pesticides in fruits and fruit juice. *J. Chromatogr. A* **1999**, *833*, 35–42.
- Tena, M. T.; Rios, A.; Valcárcel, M.; Sánchez-Alarcón, M. Supercritical fluid extraction of organophosphorus pesticides from orange samples: Effect of solid additives on recovery. *Chromatographia* **1997**, *46*, 524–528.
- Barker, S. A. Matrix solid-phase dispersion. *LC-GC Int.* **1998**, *11*, 719–724.
- Kristenson, E. M.; Haverkate, E. G. J.; Slooten, C. J.; Ramos, L.; Vreuls, R. J. J.; Brinkman, U. A. Th. Miniaturized automated matrix solid-phase dispersion extraction of pesticides in fruit followed by gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *J. Chromatogr. A* **2001**, *917*, 277–286.
- Torres, C. M.; Picó, Y.; Marín, R.; Mañes, J. Evaluation of organophosphorus pesticide residues in citrus fruits from the Valencian community (Spain). *J. AOAC Int.* **1997**, *80*, 1122–1128.
- Albero, B.; Sánchez-Brunete, C.; Tadeo, J. L. Multiresidue determination of pesticides in honey by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography with electron-capture detection. *J. AOAC Int.* **2001**, *84*, 1165–1171.
- Schenck, F. J.; Wagner, R. Screening procedure for organochlorine and organophosphorus pesticide residues in milk using matrix solid-phase dispersion (MSPD) extraction and gas chromatographic determination. *Food Addit. Contam.* **1995**, *12*, 535–541.

- (20) Wylie, P. L.; Uchiyama, K. Improved gas chromatographic analysis of organophosphorus pesticides with pulsed splitless injection. *J. AOAC Int.* **1996**, *79*, 571–577.
- (21) Laganà, A.; D'Ascenzo, G.; Fago, G.; Marino, A. Determination of organophosphorus pesticides and metabolites in crops by solid-phase extraction followed by liquid chromatography/diode array detection. *Chromatographia* **1997**, *46*, 256–264.
- (22) Jiménez, J. J.; Bernal, J. L.; del Nozal, M. J.; Toribio, L.; Arias, E. Analysis of pesticide residues in wine by solid-phase

extraction and gas chromatography with electron capture and nitrogen–phosphorus detection. *J. Chromatogr. A* **2001**, *919*, 147–156.

---

**Received for review June 2, 2003. Revised manuscript received August 29, 2003. Accepted September 2, 2003. Financial aid from INIA (Project RTA01-041) is acknowledged.**

JF030414M

## **2. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE HERBICIDAS EN ZUMOS MEDIANTE DISPERSIÓN DE LA MATRIZ EN FASE SÓLIDA Y CROMATOGRAFÍA DE GASES**

En este trabajo se ha llevado a cabo el desarrollo de un método que permita determinar quince herbicidas pertenecientes a distintas familias de compuestos como son las triazinas, dinitroanilinas, tiocarbamatos y cloroacetanilidas en zumos de uva y hortalizas basado en la dispersión de la matriz en fase sólida.

Los herbicidas se emplean para controlar las malas hierbas que pueden producir una importante disminución del rendimiento de las cosechas. Los zumos se eligieron considerando las frutas y hortalizas cuyo cultivo requiere habitualmente la aplicación de herbicidas.

La preparación de la muestra se basó en el trabajo anterior en el que se determinaron pesticidas organofosforados. En este caso, la determinación analítica se hizo mediante cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas en lugar de emplear un detector de nitrógeno-fósforo, lo que permite la cuantificación e identificación simultánea de los residuos de pesticidas.

En primer lugar se estudió el posible efecto matriz en la respuesta cromatográfica y se observó, como en el trabajo anterior, un incremento en la respuesta cuando los patrones se preparaban empleando extractos de zumo, previamente analizados para comprobar que no tuvieran residuos de los pesticidas objeto de estudio. A continuación se evaluó si las recuperaciones mejoraban al emplear la sonicación para aumentar la eficacia de la extracción empleando la dispersión de la matriz en fase sólida. Aunque las recuperaciones obtenidas sin sonicación estaban en el intervalo de valores aceptables (70-120%) se llevó a cabo la extracción asistida por sonicación porque las recuperaciones eran más altas, principalmente en el zumo de uva.

Los ensayos de recuperación se llevaron a cabo a tres niveles de concentración comprendidos entre 10 y 100 µg/L, obteniéndose recuperaciones superiores al 82%.

El método desarrollado se aplicó a la determinación de herbicidas en muestras reales y no se observaron residuos de estos compuestos por encima del límite de detección.

## DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE HERBICIDAS EN ZUMOS MEDIANTE DISPERSIÓN DE LA MATRIZ EN FASE SÓLIDA Y CROMATOGRAFÍA DE GASES

B. Albero, C. Sánchez-Brunete, A. Donoso y J.L. Tadeo. "Determination of herbicide residues in juice by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography-mass spectrometry", *Journal of Chromatography A* 2004, 1043(2), 127-33.

### Contribución

Póster. "Determination of herbicide residues in juice by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography/mass spectrometry", "**3<sup>rd</sup> Scientific Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques**", 19-21 Noviembre 2003, Almería, España.

# Determination of herbicide residues in juice by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography–mass spectrometry<sup>☆</sup>

B. Albero, C. Sánchez-Brunete, A. Donoso, J.L. Tadeo\*

*Departamento de Medio Ambiente (INIA), Carretera de La Coruña Km 7, 28040 Madrid, Spain*

Received 8 March 2004; accepted 18 May 2004

## Abstract

A rapid multiresidue method was developed for the determination of 15 herbicides in carrot, grape, and multivegetable juices. The analytical procedure was based on the matrix solid-phase dispersion of juice samples on Florisil, placed in glass columns, and subsequent extraction with ethyl acetate with assisted sonication. The recoveries through the method ranged from 82 to 115% with relative standard deviations equal or lower than 10% for all the herbicides studied. The analysis of samples was accomplished using gas chromatography–mass spectrometry with selected ion monitoring. Spiked blank samples were used as standards to counteract the matrix effect observed in the chromatographic determination. The detection limits ranged from 0.1 to 1.6  $\mu\text{g/l}$ . The developed method was applied to the analysis of herbicide residues in commercial juice samples.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

*Keywords:* Fruit juices; Matrix solid-phase dispersion; Extraction methods; Pesticides

## 1. Introduction

Herbicides are widely used in horticultural crops to control weeds that may produce important yield reductions. The introduction of these pesticides in the food chain via the environment can be considered a risk for human health due to the toxicity of most of these compounds.

Methods used to determine herbicide residues in fruits and vegetables are mainly based on liquid partitioning with organic solvents such as ethyl acetate, acetonitrile, and dichloromethane, usually followed by a solid-phase extraction cleanup step [1–6]. In the last years, new extraction procedures have been developed to overcome the drawbacks caused by using high amounts of glassware and toxic solvents in the classical liquid extraction methods. With this aim, several procedures based on solid-phase microextraction (SPME) [7], supercritical fluid extraction

(SFE) [8–10], pressurized liquid extraction (PLE) [11], and microwave-assisted extraction (MAE) [12] have been used.

Matrix solid-phase dispersion (MSPD), based on the dispersion of the sample on an adsorbent, such as Florisil, C<sub>18</sub>, alumina, or silica, allows the extraction and cleanup of analytes in one single step. The dispersion of solid samples is previously done in a mortar and then the mixture is transferred to the extraction columns [13]. In the case of liquid samples, the dispersion of the matrix in the adsorbent can be done directly in the extraction columns [14,15].

The determination of herbicides in fruits and vegetables can be performed by gas chromatography with electron-capture detection (ECD) [11,13] or nitrogen–phosphorus detection (NPD) [6,12], when herbicide molecules have functional groups giving a selective and sensitive response with those detectors. Gas chromatography coupled with mass spectrometry has also been employed in the determination of herbicides due to its high selectivity when used in the selected ion monitoring (SIM) mode [2,4,5,7,10]. Herbicides with a low volatility or thermally unstable are determined by liquid chromatography with ultraviolet [3,4] or fluorescence detection [5]. The application of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) in the determination of herbicides has also been reported [16,17].

<sup>☆</sup> Presented at the 3rd Meeting of the Spanish Association of Chromatography and Related Techniques and the European Workshop, 3rd Waste Water Cluster, Aguadulce (Almería), 19–21 November 2003.

\* Corresponding author. Tel.: +34 913 476 821; fax: +34 913 572 293.  
E-mail address: [tadeo@inia.es](mailto:tadeo@inia.es) (J.L. Tadeo).

The aim of this work was to develop a multiresidue method, based on matrix solid-phase dispersion, for the determination of 15 herbicides belonging to different chemical classes (triazines, dinitroanilines, thiocarbamates, and chloroacetanilides) in carrot, grape, and multivegetable juices. Residues were determined by GC–MS with selected ion monitoring and the developed method was applied to the determination of herbicide residues in commercial juices.

## 2. Experimental

### 2.1. Materials

#### 2.1.1. Chemicals

Herbicide standards (99% purity) were purchased from Riedel-de Haen (Seelze, Germany). Ethyl acetate and methanol (pesticide grade) were obtained from Scharlau (Barcelona, Spain). Florisil 60–100 mesh, heated at 140 °C overnight before use, was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland).

#### 2.1.2. Herbicide solutions

Stock solutions (500 µg/ml) of each herbicide were prepared by dissolving 50 mg of the herbicide in 100 ml ethyl acetate and stored at 4 °C. Three stock solutions containing 0.2, 0.1, and 0.02 µg/ml of each pesticide in methanol were prepared and used to fortify the juice samples. Standard solutions in ethyl acetate were prepared to fortify blank juice samples used as chromatographic standards.

#### 2.1.3. Internal standard solutions

The internal standard solution was prepared by dissolving lindane in ethyl acetate to obtain a 500 µg/ml solution. A working internal standard solution of 0.05 µg/ml in ethyl acetate was prepared.

#### 2.1.4. Columns

Glass columns (10 cm × 2 cm i.d.) were purchased from Pobel (Madrid, Spain) and Whatman No. 1 filter paper circles of 2 cm diameter, placed at the bottom end, were from Whatman (Maidstone, UK).

### 2.2. Apparatus

#### 2.2.1. GC–MS

An Agilent 6890 gas chromatograph (Waldbronn, Germany) equipped with an automatic injector Model HP 7683 and a 5973 series mass selective detector was used. A fused silica capillary column (ZB-5MS), 5% phenyl polysiloxane as nonpolar stationary phase (30 m × 0.25 mm i.d.) and 0.25 µm film thickness, supplied by Phenomenex (Torrance, CA, USA), was employed. Operating conditions were as follows: injector port temperature 280 °C, injection volume 2 µl in pulsed splitless mode (pulsed pressure 45 psi

Table 1

Retention time ( $t_R$ ), molecular mass ( $M_r$ ), target ion ( $T$ ), qualifier ion ( $Q$ ), and abundance ratio of qualifier ion/target ion ( $Q/T$ )<sup>a</sup> of the herbicides studied

	Pesticide	$t_R$ (min)	$M_r$	$T$	$Q$	$Q/T$ (%)
1	EPTC	7.94	189.3	128	189	23.7
2	Propachlor	12.33	211.7	120	176	36.6
3	Trifluralin	13.75	335.5	306	264	74.9
4	Simazine	15.24	201.7	201	186	60.2
5	Atrazine	15.50	215.7	200	215	61.1
6	Terbumeton	15.80	225.3	210	169	83.9
7	Lindane <sup>b</sup>	15.90	290.8	183	219	84.6
8	Terbutylazine	16.22	229.7	214	229	29.6
9	Triallate	17.49	304.7	86	268	49.8
10	Metribuzin	18.88	214.3	198	199	39.7
11	Alachlor	19.68	269.8	160	188	89.8
12	Prometryn	19.99	241.4	241	184	78.4
13	Terbutryn	20.66	241.4	226	241	48.7
14	Metolachlor	21.66	283.8	162	238	53.2
15	Cyanazine	22.06	240.7	212	213	38.4
16	Pendimethalin	23.55	281.3	252	281	10.7

<sup>a</sup>  $Q/T$  (%) are the results of abundance values of the qualifier ion ( $Q$ ) divided by the abundance of the target ion ( $T$ ) × 100.

<sup>b</sup> Internal standard.

for 1.5 min; 1 psi = 6894.76 Pa); helium as carrier gas at a flow-rate of 1.0 ml/min; oven temperature program: 70 °C (2 min), programmed at 25 °C/min to 150 °C, increased to 200 °C at 3 °C/min, followed by a final ramp to 280 °C at a rate of 8 °C, and held for 5 min. The total analysis time is 36.87 min and the equilibration time 2 min.

Mass spectrometric parameters: electron impact ionization mode with an ionizing energy of 70 eV scanning from  $m/z$  60 to 500 at 4.45 scan/s, ion source temperature 230 °C, MS Quad temperature 150 °C, electron multiplier voltage maintained 1000 V above autotune; solvent delay, 5 min.

Analysis was performed with SIM based on the use of target and qualifier ions. Herbicides are identified according to the retention times, target ions and the qualifier-to-target ion ratios. The target and qualifier abundances were determined by injection of individual herbicide standards under the same chromatographic conditions in full-scan from  $m/z$  60 to 500. Quantification was based on the peak area ratio of the target ion divided by the peak area of the internal standard. Standards were prepared spiking blank samples to counteract possible matrix effects. Table 1 lists the herbicides studied with their retention times, the target and qualifier ions together to the qualifier to target abundance ratios. The SIM program used to analyse herbicides in juice is summarised in Table 2.

#### 2.2.2. Laboratory equipment

An ultrasonic water bath (Raypa, Barcelona, Spain) was used in the extraction procedure. The generator of this apparatus has an output of 150 W and a frequency of 33 kHz. A 12-port vacuum manifold Visiprep (Supelco, Madrid, Spain) was employed.

Table 2  
SIM program used to determine herbicides in juice

Group	Time (min)	Pesticide	<i>m/z</i>	Dwell time (ms)	Scan rate (cycles/s)
1	5.00	EPTC	128, 189	100	4.26
2	11.70	Propachlor, trifluralin	120, 176, 264, 306	100	2.15
3	14.00	Simazine, atrazine	186, 200, 201, 215	100	2.15
4	15.70	Terbumeton, lindane (IS) <sup>a</sup>	169, 183, 210, 219	100	2.15
5	16.10	Terbuthylazine	214, 229	100	4.26
6	17.00	Triallate	86, 268, 270	100	2.86
7	18.00	Metribuzin	198, 199	100	4.26
8	19.30	Alachlor, prometryn	160, 188, 241, 184	100	2.15
9	20.40	Terbutryn	226, 241	100	4.26
10	21.55	Metolachlor, cyanazine	162, 238, 212, 213	100	2.15
11	23.00	Pendimethalin	252, 281	100	4.26

<sup>a</sup> IS: internal standard.

### 2.3. Juice samples

Various commercial brands of carrot, grape, and multi-vegetable (made mainly from tomato, carrot, pepper, and onion) juices were purchased from supermarkets in Madrid. A total of eight different juices, four carrot, two grape, and two multivegetable, were analysed.

### 2.4. Procedure

The sample preparation is based on a previously published method for the determination of insecticide and fungicide residues in fruit juices [14,15]. Glass columns, with Whatman No.1 filters placed at the bottom end, were filled with 2 g of Florisil. A 1 ml volume of juice was applied to the column, fortified when required with 0.5 ml of herbicide standard mixture in methanol. A 0.5 ml volume of methanol was added instead to unfortified samples. Methanol was used to achieve a better distribution of the sample throughout the column. The columns were placed in a tube rack and closed with one-way stopcocks. Juice samples were extracted twice with 5 ml ethyl acetate for 15 min in an ultrasonic bath at room temperature. Water level in the bath was adjusted to solvent level inside the columns. After extraction, solvent was filtered by vacuum in a manifold equipment. The extracts were collected in 10 ml graduated glass tubes and concentrated with a gentle stream of air to a volume of 4 ml for the highest fortification level, 2 ml for the intermediate level, and 1 ml for the lowest spiking level. A 0.5 ml of internal standard was added before the chromatographic analysis. For each fortification level, blank sample extracts were obtained and spiked with herbicides to be used as chromatographic standards.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Determination of herbicide residues

Herbicide residue levels were determined by (GC–MS–SIM) to achieve the sensitivity necessary for trace quantita-

tive analysis. The use of qualifier and target ions, in addition to the retention time, allowed to confirm positive identification of the herbicides studied. Moreover, the use of the internal standard minimized the possible variations in retention time and peak areas improving the reliability of the method.

The possible matrix effect on the chromatographic response was studied. When standards were prepared by spiking blank juice samples with known amounts of herbicides, higher peak areas were accomplished for the same herbicide concentration. Fig. 1 shows the different response obtained with standard mixtures prepared in ethyl acetate or with a blank juice sample. There is an evident matrix effect that enhances the chromatographic response of these herbicides. This effect has been previously described for other pesticides in food matrices [18,19]. Therefore, the quantification of herbicides was performed with fortified blank samples.

The effect of sonication in the extraction step was assayed by comparing a set of juice samples fortified at 0.05 µg/ml and extracted with assisted sonication with another set extracted without sonication. Recoveries obtained without sonication were in the range of widely accepted values (70–120%). Nevertheless, a small increase in recovery with sonication was observed for many compounds from carrot and multivegetable juices. The enhancement on recovery was clearly observed in grape juice (Table 3) where differences in the range 4–13% were obtained for most compounds. These results are in agreement with those found in a previous work on organophosphorus pesticide determination in fruit juices, where pesticide recoveries were improved by sonication particularly in thicker juices [15]. Therefore, extraction assisted with sonication was applied throughout the work.

### 3.2. Validation of the analytical method

#### 3.2.1. Linearity

The linearity of all the herbicides was determined using blank carrot juice samples fortified in the range from 0.01 to 0.05 µg/ml and with the internal standard at 0.025 µg/ml. The detector response was linear in the range

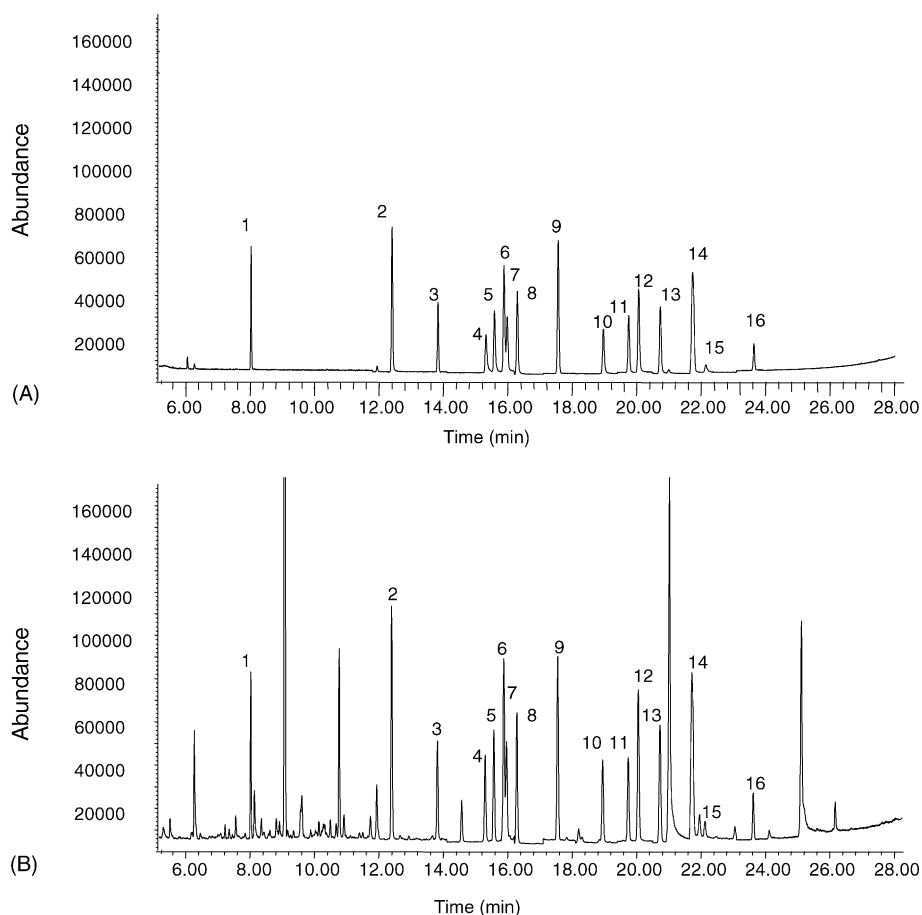


Fig. 1. GC-MS-SIM chromatograms of a standard mixture solution at  $0.025 \mu\text{g/ml}$  (A) and a blank carrot juice sample fortified at  $0.025 \mu\text{g/ml}$  (B). See Table 1 for peak identification.

of concentrations studied. When other blank juices, grape or multivegetable, were used similar responses were obtained. Table 4 summarises the calibration data of the studied herbicides. The slope and intercept values together with their

standard deviations were determined applying regression analyses. Good determination coefficients were obtained for all the compounds ranging from 0.9963 to 0.9999.

### 3.2.2. Repeatability

The repeatability of the chromatographic method was determined by performing the analysis of a standard solution at  $0.025 \mu\text{g/ml}$ . The solution was injected 10 times with an automatic injector and the relative standard deviations (R.S.D.s) obtained for retention times ranged from 0.03 to 0.08%, whereas for relative peak areas the values were lower than 5.1% (Table 4). Therefore, the repeatability achieved with the chromatographic method in the conditions assayed was very good.

The repeatability of the whole analytical procedure was also determined by replicate analysis of a fortified sample during different days. The repeatability of the method, expressed as R.S.D., was lower than 11% for all the studied herbicides.

### 3.2.3. Specificity

The specificity of the proposed MSPD procedure was assessed by analysing control blank juice samples. The absence of background peaks, above the signal to noise ratio

Table 3  
Influence of sonication on herbicide recovery in the extraction procedure

	Recovery (%) $\pm$ R.D.S. (%), $n = 4$	
	Without sonication	With sonication
EPTC	$82 \pm 5$	$90 \pm 7$
Propachlor	$82 \pm 5$	$92 \pm 5$
Trifluralin	$86 \pm 9$	$94 \pm 10$
Simazine	$88 \pm 6$	$96 \pm 7$
Atrazine	$89 \pm 7$	$94 \pm 7$
Terbumeton	$86 \pm 7$	$90 \pm 6$
Terbutylazine	$89 \pm 6$	$97 \pm 7$
Triallate	$80 \pm 5$	$93 \pm 8$
Metribuzin	$86 \pm 9$	$93 \pm 8$
Alachlor	$88 \pm 8$	$94 \pm 7$
Prometryn	$88 \pm 7$	$95 \pm 9$
Terbutryn	$90 \pm 7$	$94 \pm 8$
Metolachlor	$86 \pm 7$	$91 \pm 7$
Cyanazine	$102 \pm 5$	$98 \pm 5$
Pendimethalin	$86 \pm 7$	$90 \pm 7$

Grape juice samples were fortified at  $0.05 \mu\text{g/ml}$ .

Table 4  
Calibration data and repeatability<sup>a</sup> of the studied herbicides

Herbicide	Calibration data			Repeatability (R.S.D. %) <sup>b</sup>	
	Slope (mean ± S.D.)	Intercept (mean ± S.D.)	Determination coefficient	t <sub>R</sub>	Peak area
EPTC	1.54 ± 0.02	−0.03 ± 0.03	0.9997	0.08	3.5
Propachlor	2.49 ± 0.04	0.11 ± 0.05	0.9995	0.05	4.1
Trifluralin	0.93 ± 0.02	−0.008 ± 0.024	0.9992	0.07	3.9
Simazine	1.01 ± 0.02	0.01 ± 0.02	0.9994	0.06	3.6
Atrazine	1.35 ± 0.03	0.07 ± 0.05	0.9987	0.06	4.7
Terbumeton	2.25 ± 0.13	0.20 ± 0.20	0.9966	0.06	3.6
Terbutylazine	2.14 ± 0.03	0.07 ± 0.04	0.9998	0.06	3.7
Triallate	1.75 ± 0.01	0.07 ± 0.02	0.9999	0.05	3.3
Metribuzin	1.42 ± 0.06	−0.01 ± 0.08	0.9963	0.05	4.9
Alachlor	0.98 ± 0.03	0.05 ± 0.04	0.9977	0.05	3.4
Prometryn	1.88 ± 0.04	0.15 ± 0.06	0.9994	0.05	4.1
Terbutryn	1.49 ± 0.03	0.08 ± 0.04	0.9996	0.05	3.8
Metolachlor	3.25 ± 0.04	0.37 ± 0.06	0.9998	0.04	4.4
Cyanazine	0.37 ± 0.01	−0.04 ± 0.01	0.9985	0.04	5.1
Pendimethalin	0.74 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.9994	0.03	4.4

<sup>a</sup> Repeatability of the chromatographic method.

<sup>b</sup> Relative standard deviations of retention times and peak areas relative to the internal standard ( $n = 10$ ).

of 3, at the retention times of the herbicides, showed that no interferences occurred.

### 3.2.4. Recovery

Table 5 shows the herbicide recovery results obtained. Juice samples, previously analysed to verify the lack of the compounds studied, were fortified at 0.10, 0.05 and 0.01 µg/ml before extraction and analysed by GC–MS. The recoveries obtained for all compounds ranged from 82 to 115% with relative standard deviations equal or lower than 10%. These results show that good recoveries from juice samples were obtained throughout the proposed method. Representative chromatograms of a fortified juice sample and a blank sample are depicted in Fig. 2.

### 3.2.5. Detection and quantification limits

The limits of detection (LODs) of the proposed method were determined by considering a value three times the background noise obtained for blank samples, whereas the limits of quantification (LOQs) were determined considering a value 10 times the background noise. Table 6 summarises the detection and quantification limits obtained for each herbicide.

### 3.3. Real samples

The developed MSPD procedure was applied to the determination of herbicides in commercial juices. Carrot, grape, and multivegetable juices of different brands were purchased

Table 5  
Herbicide recoveries obtained from juice samples<sup>a</sup>

	Carrot, fortification levels (µg/ml)			Grape, fortification levels (µg/ml)			Multivegetable, fortification levels (µg/ml)		
	0.1	0.05	0.01	0.1	0.05	0.01	0.1	0.05	0.01
EPTC	88 ± 2	90 ± 7	82 ± 8	84 ± 8	90 ± 7	90 ± 9	97 ± 7	93 ± 8	102 ± 9
Propachlor	92 ± 2	93 ± 6	91 ± 5	89 ± 7	92 ± 5	94 ± 10	92 ± 7	89 ± 6	95 ± 10
Trifluralin	91 ± 5	90 ± 6	95 ± 7	89 ± 8	94 ± 10	91 ± 7	101 ± 5	86 ± 6	109 ± 8
Simazine	93 ± 3	92 ± 6	93 ± 7	89 ± 7	96 ± 7	102 ± 6	96 ± 6	90 ± 9	101 ± 5
Atrazine	93 ± 2	93 ± 5	97 ± 5	88 ± 7	94 ± 7	101 ± 3	102 ± 6	95 ± 7	109 ± 10
Terbumeton	91 ± 4	85 ± 9	93 ± 10	85 ± 6	90 ± 6	103 ± 6	95 ± 4	90 ± 5	101 ± 8
Terbutylazine	93 ± 3	94 ± 4	96 ± 5	88 ± 7	97 ± 7	103 ± 5	97 ± 6	89 ± 9	104 ± 8
Triallate	88 ± 3	91 ± 5	91 ± 9	85 ± 8	93 ± 8	105 ± 8	98 ± 6	86 ± 8	110 ± 8
Metribuzin	97 ± 6	91 ± 9	96 ± 5	88 ± 6	93 ± 8	103 ± 5	104 ± 7	90 ± 9	115 ± 4
Alachlor	91 ± 3	91 ± 5	91 ± 7	86 ± 7	94 ± 7	105 ± 9	95 ± 5	89 ± 8	101 ± 9
Prometryn	90 ± 3	94 ± 5	99 ± 6	91 ± 7	95 ± 9	103 ± 4	103 ± 6	90 ± 10	108 ± 8
Terbutryn	91 ± 2	99 ± 5	97 ± 9	90 ± 7	94 ± 8	104 ± 5	98 ± 6	87 ± 9	109 ± 8
Metolachlor	90 ± 2	94 ± 4	96 ± 3	84 ± 7	91 ± 7	107 ± 5	103 ± 6	92 ± 6	112 ± 7
Cyanazine	90 ± 8	89 ± 8	95 ± 6	84 ± 9	94 ± 8	108 ± 3	98 ± 8	95 ± 4	102 ± 6
Pendimethalin	85 ± 4	90 ± 5	99 ± 8	82 ± 7	90 ± 7	104 ± 6	100 ± 4	84 ± 8	109 ± 9

<sup>a</sup> Recovery % ± R.S.D. % ( $n = 4$  at each fortification level for each juice sample).

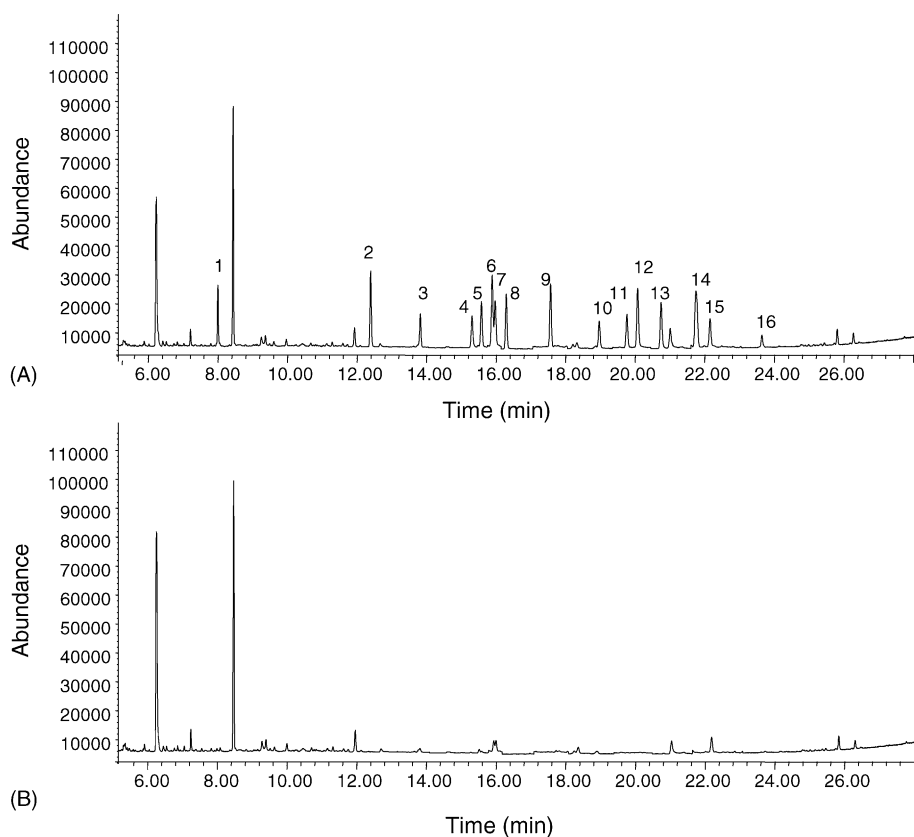


Fig. 2. GC-MS-SIM chromatograms of a grape juice sample fortified at 0.01  $\mu\text{g/ml}$  (A) and a blank grape juice sample (B). See Table 1 for peak identification.

Table 6  
Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of the studied herbicides

	LOD ( $\mu\text{g/l}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/l}$ )
EPTC	0.7	2.3
Propachlor	0.1	0.3
Trifluralin	0.3	1.0
Simazine	0.3	1.0
Atrazine	0.2	0.7
Terbumeton	1.6	5.3
Terbuthylazine	0.2	0.7
Triallate	0.1	0.3
Metribuzin	0.7	2.3
Alachlor	0.3	1.0
Prometryn	0.1	0.3
Terbutryn	0.2	0.7
Metolachlor	0.2	0.7
Cyanazine	0.8	2.7
Pendimethalin	0.8	2.7

in local supermarkets and analysed following the proposed method. No residues, above the detection limit, of the herbicides studied were found in these samples.

#### 4. Conclusions

A rapid method, based on MSPD, has been developed for the simultaneous determination of 15 herbicides in different

juices by GC-MS with selected ion monitoring. With the proposed analytical procedure, the extraction and cleanup can be performed in a single step requiring a low volume consumption of organic solvents. Good recoveries and low detection limits were achieved with this procedure. The developed MSPD method was applied to determine herbicide residue levels in carrot, grape and multivegetable juices sold in Spain and no residues above the detection limits were found.

#### Acknowledgements

Financial aid from INIA (project RTA01-041) is acknowledged.

#### References

- [1] R.S. Sheridan, J.R. Meola, J. AOAC Int. 82 (1999) 982.
- [2] W. Liao, T. Joe, W.S. Cusick, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 74 (1991) 554.
- [3] A. Sannino, J. AOAC Int. 81 (1998) 1048.
- [4] C. Sorce, N. Ceccarelli, R. Lorenzi, Agric. Med. 124 (1994) 132.
- [5] J. Fillion, R. Hindle, M. Lacroix, J. Selwyn, J. AOAC Int. 78 (1995) 1252.
- [6] J. Engebretson, G. Hall, M. Hengel, T. Shibamoto, J. Agric. Food Chem. 49 (2001) 2198.

- [7] M. Volante, M. Cattaneo, M. Bianchi, G. Zoccola, J. Environ. Sci. Health B33 (1998) 279.
- [8] K. Yoshii, M. Okada, Y. Tsumura, Y. Nakamura, S. Ishimitsu, Y. Tonogai, J. AOAC Int. 82 (1999) 1239.
- [9] A. Kaihara, K. Yoshii, Y. Tsumura, Y. Nakamura, S. Ishimitsu, Y. Tonogai, J. Health Sci. 46 (2000) 336.
- [10] S.J. Lehotay, K.I. Eller, J. AOAC Int. 78 (1995) 821.
- [11] K. Adou, W.R. Bontoyan, P.J. Sweeney, J. Agric. Food Chem. 49 (2001) 4153.
- [12] A. Bouald, A. Martín-Esteban, P. Fernández, C. Cámara, Fresen. J. Anal. Chem. 367 (2000) 291.
- [13] L. Kadenczki, Z. Arpad, I. Gardi, A. Ambrus, L. Gyorfí, G. Reese, W. Ebing, J. AOAC Int. 75 (1992) 53.
- [14] J.L. Tadeo, C. Sánchez-Brunete, Chromatographia 57 (2003) 793.
- [15] B. Albero, C. Sánchez-Brunete, J.L. Tadeo, J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 6915.
- [16] M. Khrolenko, P. Dzygiel, P. Wiczorek, J. Chromatogr. A 975 (2002) 219.
- [17] M.Y. Selisker, D.P. Herzog, R.D. Erber, J.R. Fleeker, J.A. Itak, J. Agric. Food Chem. 43 (1995) 544.
- [18] J.J. Jiménez, J.L. Bernal, M.J. del Nozal, L. Toribio, E. Arias, J. Chromatogr. A 919 (2001) 147.
- [19] P.L. Wylie, K. Uchiyama, J. AOAC Int. 79 (1996) 571.

### 3. DETERMINACIÓN DE TIABENDAZOL EN ZUMO Y CORTEZA DE NARANJA POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS CON DETECCIÓN POR FLUORESCENCIA Y CONFIRMACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRIA DE MASAS DESPUÉS DE LA EXTRACCIÓN MEDIANTE DISPERSIÓN DE LA MATRIZ EN FASE SÓLIDA

El objetivo del trabajo fue poner a punto un método que permitiese determinar tiabendazol en naranjas, analizando tanto el zumo como la corteza, empleando la cromatografía de líquidos con detector de fluorescencia. El tiabendazol es un fungicida sistémico que se utiliza como tratamiento de frutas, principalmente cítricos, durante el almacenamiento después de la cosecha. Por lo general, este compuesto se aplica junto con otros compuestos, como el ortofenilfenol, mediante un proceso de inmersión de los frutos y su posterior tratamiento con ceras naturales.

La influencia del adsorbente en la recuperación del tiabendazol se estudió mediante ensayos con Florisil y alúmina, empleando acetato de etilo como disolvente de extracción. Las recuperaciones mejoran considerablemente cuando se emplea alúmina, sobre todo en las muestras de zumo. Por lo tanto, éste fue el adsorbente elegido para la MSPD. Esta técnica de extracción permite ahorrar en consumo de disolventes, material de vidrio y tiempo. Por consiguiente, el método propuesto presenta una clara ventaja frente a los métodos convencionales de extracción.

En general, los niveles de residuos de tiabendazol encontrados en zumos de naranja son muy bajos, de unas pocas partes por billón, por lo que es necesario reducir al máximo las interferencias cromatográficas debidas a la matriz. La extracción mediante MSPD, sin una posterior purificación, permite determinar niveles de tiabendazol alrededor de 20 µg/kg. Una posterior limpieza mediante extracción en fase sólida, empleando un cartucho de intercambio catiónico PRS (ácido propilsulfónico), permite determinar niveles de tiabendazol cerca de 1 µg/kg. No obstante, cuando los niveles de tiabendazol son elevados, como es el caso de la

corteza de naranja, este segundo proceso no sería necesario y se podría analizar directamente las muestras tras su extracción mediante MSPD.

En el análisis por cromatografía líquida se obtuvieron buenos resultados cuando se empleó metanol-agua (60:40) como fase móvil en régimen isocrático. Sin embargo, se observó una variabilidad en el tiempo de retención del tiabendazol que se puede explicar por la posible presencia de la forma catiónica del analito a pH ácidos. Cuando las muestras y los patrones de calibración se tamponaron a pH 6, con la solución de elución empleada en la purificación, al ser el pH superior al  $pK_a$  del tiabendazol (4,7), se obtuvieron tiempos de retención reproducibles tanto en las muestras como en los patrones. La confirmación de la identidad de los residuos se llevó a cabo mediante SPME de los extractos obtenidos con anterioridad y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

El método MSPD desarrollado se aplicó a la determinación de tiabendazol tanto en zumos de naranja comerciales como en naranjas frescas tratadas con este compuesto, analizando en estas últimas la corteza y el zumo. En las naranjas frescas los residuos se encuentran mayoritariamente en la corteza y en los zumos comerciales apenas se observan niveles de residuos por encima del límite de detección, aunque en dos muestras se determinaron residuos a un nivel de 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Estos niveles son claramente inferiores al LMR establecido por la Unión Europea para el tiabendazol en el fruto entero (6  $\text{mg}/\text{kg}$ ).

Además de optimizar tanto la preparación de la muestra como la determinación cromatográfica, se hizo un estudio del efecto del almacenamiento de los frutos y del lavado de los mismos en los niveles de tiabendazol hallados en el zumo y en la corteza.

DETERMINACIÓN DE TIABENDAZOL EN ZUMO Y CORTEZA DE NARANJA POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS CON DETECCIÓN POR FLUORESCENCIA Y CONFIRMACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRIA DE MASAS DESPUÉS DE LA EXTRACCIÓN MEDIANTE DISPERSIÓN DE LA MATRIZ EN FASE SÓLIDA

B. Albero, C. Sánchez-Brunete y J.L. Tadeo. "Determination of thiabendazole in orange juice and rind by liquid chromatography with fluorescence detection and confirmation by gas chromatography - mass spectrometry after extraction by matrix solid-phase dispersion", *Journal of AOAC International* 2004, 87(3), 664-70.

**Contribución**

Póster. "Determination of thiabendazole in orange juice and rind by liquid chromatography with fluorescence detection and confirmation by gas chromatography-mass spectrometry", "**3<sup>rd</sup> Scientific Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques**", 19-21 Noviembre 2003, Almería, España.

## RESIDUES AND TRACE ELEMENTS

# Determination of Thiabendazole in Orange Juice and Rind by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection and Confirmation by Gas Chromatography/Mass Spectrometry After Extraction by Matrix Solid-Phase Dispersion

BEATRIZ ALBERO, CONSUELO SÁNCHEZ-BRUNETE, and JOSÉ L. TADEO<sup>1</sup>

INIA, Departamento de Medio Ambiente, INIA, Apdo. 8111, 28080 Madrid, Spain

**A method was developed for the determination of thiabendazole (TBZ) in orange juice and rind based on matrix solid-phase dispersion (MSPD). TBZ was extracted with ethyl acetate and the extract was subsequently cleaned up on a solid-phase extraction column. Fungicide residues were determined by liquid chromatography with fluorescence detection. Recoveries through the method ranged from 87 to 97% with relative standard deviations  $\leq 11\%$ . The detection and quantitation limits were 0.15 and 0.50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectively. The confirmation of TBZ residues in positive samples was performed by solid-phase microextraction followed by gas chromatography with mass spectrometric detection using selected ion monitoring. The developed method was applied to determine TBZ levels in commercial orange juices and in juice and rind of fresh oranges. The influence of storage and washing of fruits on TBZ residues was also studied.**

Thiabendazole (TBZ; Figure 1) is a postharvest systemic fungicide widely used to control diseases occurring during the storage and commercialization of fruits and vegetables. It is usually applied as a dip treatment combined with natural waxes to prevent fruit decay, particularly in citrus fruits. A certain proportion of the amount applied is retained in the fruit where it can reach the edible portion. Processed products, such as homemade and commercial orange juices, highly consumed by children, may consequently contain TBZ residues (1–3).

Conventional methods used for the determination of TBZ in fruits are usually based on liquid-liquid extraction (4–7), where large amounts of organic solvents and glassware are required. Frequently, a subsequent cleanup step is performed with solid-phase extraction (SPE) columns or ion-exchange cartridges (1, 8–10). During the past few years, new extraction

techniques have been developed for the determination of pesticides in fruit, such as supercritical fluid extraction (SFE; 11) and solid-phase microextraction (SPME; 12, 13). Matrix solid-phase dispersion (MSPD) is another alternative technique based on the dispersion of the sample on an adsorbent such as Florisil, C18, alumina, or silica. Usually, the mixture is prepared in a mortar and then transferred to the extraction column (14), although the dispersion of the matrix on the adsorbent can be prepared directly in the column when liquid samples are analyzed (15). MSPD is a simultaneous extraction and cleanup technique that requires less solvent and is less time-consuming than conventional methods.

The determination of TBZ is often performed with liquid chromatography (LC) with fluorescence or UV detection (1, 4–11). Recently, LC coupled with mass spectrometry (MS; 16) or tandem MS (14, 17) has also been applied. Despite its low volatility, the GC determination of TBZ has been reported by several authors (3, 18, 19). Capillary electrophoresis has also been applied in the determination of this fungicide in fruits and vegetables (20, 21).

The aim of this work was to develop a rapid method for the determination of TBZ in orange juice and rind, based on MSPD, and the application of the developed method to commercial juices and fresh oranges. Residue levels were determined by LC with fluorescence detection and the confirmation of their identity was performed by SPME followed by GC with MS detection (GC/MS) in selected ion monitoring (SIM) mode. The influence of washing and storage of fruits on the residue levels found in juice and rind was also studied.

## Experimental

### Reagents and Samples

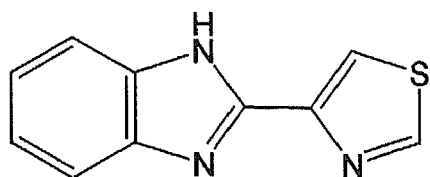
(a) *TBZ standard (99% purity)*.—Obtained from Reidel-de Haëns (Seelze, Germany).

(b) *Solvents*.—Residue analysis grade ethyl acetate and LC grade methanol and water were purchased from Scharlau (Barcelona, Spain).

(c)  *$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$* .—Analysis grade; Panreac (Barcelona, Spain).

Received July 16, 2003. Accepted by JS October 29, 2003.

<sup>1</sup> Author to whom correspondence should be addressed; e-mail: tadeo@inia.es.



thiabendazole

Figure 1. Chemical structure of thiabendazole (TBZ).

(d) *Aluminium oxide*.—Standardized for column chromatographic adsorption analysis according to Brockman; Merck (Darmstadt, Germany).

(e) *Florisil (60–100 mesh)*.—Research grade (Fluka Chemie, Buchs, Switzerland). The adsorbent was heated for 24 h at 140°C before use.

(f) *H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 85%*.—Analysis grade (Panreac).

(g) *NaOH, 1%*.—Dissolve 1 g NaOH in 100 mL water.

(h) *SPE column conditioning solution*.—1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in methanol–water (80 + 20). Add 2 mL H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and 40 mL water to 200 mL volumetric flask and dilute to 200 mL with methanol.

(i) *SPE column elution solution*.—0.1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O in water–methanol (70 + 30). Dissolve 3.22 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O in 100 mL water in 200 mL volumetric flask. Add 60 mL methanol and dilute to 200 mL with water.

(j) *TBZ stock solution*.—Dissolve 50 mg TBZ in 100 mL ethyl acetate to obtain a concentration of 500 µg/mL. Store at 4°C.

(k) *TBZ intermediate standard solutions*.—Transfer 2 mL TBZ stock solution to 100 mL volumetric flask and dilute to volume with methanol to obtain a concentration of 10 µg/mL. Transfer 10 mL intermediate standard solution to 100 mL volumetric flask and dilute to volume with methanol to obtain a concentration of 1 µg/mL.

(l) *TBZ working solutions*.—Prepare a set of TBZ standards for fortification of juice and rind samples. Transfer 10, 5, and 1 mL 10 µg/mL standard solution to 25 mL volumetric flasks and dilute to volume with methanol to give concentrations of 4, 2, and 0.4 µg/mL. Transfer 2 and 1 mL 1 µg/mL standard solution to 20 mL volumetric flasks and dilute with methanol to obtain concentrations of 0.1 and 0.05 µg/mL. For the lowest fortification level transfer 2 mL 0.1 µg/mL solution to 20 mL volumetric flask and dilute with methanol to give a concentration of 0.01 µg/mL.

(m) *Orange samples*.—Commercial juices and fresh oranges were purchased in local supermarkets in Madrid. TBZ was applied to fresh oranges as a dip treatment with a subsequent application of natural waxes.

#### Apparatus

(a) *Extraction columns*.—Glass columns (20 cm × 20 mm id) were purchased from Pobel (Madrid, Spain) and Whatman

No. 1 filter paper circles, 2 cm diameter, placed at the bottom end, were from Whatman (Maidstone, UK).

(b) *Vacuum manifold*.—Supelco Visiprep (Madrid, Spain).

(c) *SPE columns*.—Bond Elut LRC, PRS (propylsulfonic acid); 500 mg/10 mL (Scharlab, Barcelona, Spain).

(d) *Syringe filters*.—25 mm Nylon filters, 0.45 µm (Jasco, Madrid, Spain).

(e) *Filtration columns*.—Polypropylene columns (75 × 12 mm id) were obtained from Becton Dickinson (Madrid, Spain).

(f) *Centrifuge*.—Model Medifriger from J.P. Selecta (Barcelona, Spain).

(g) *Centrifuge tubes*.—Glass, 100 mL (Pobel).

(h) *SPME fibers*.—85 µm polyacrylate (PA) and 100 µm polydimethylsiloxane (PDMS) were supplied by Supelco (Madrid, Spain).

(i) *LC system*.—An Agilent Model 1100 LC system (Wilmington, DE) equipped with autosampler with 100 µL sample loop and programmable fluorescence detector operated at excitation wavelength of 305 nm, emission wavelength of 345 nm, and photomultiplier gain of 12 was used. A Zorbax Eclipse XDB-C8 column, 150 × 4 mm id, 5 µm particle size, supplied by Agilent (Madrid, Spain) was used. A C<sub>8</sub> LC guard cartridge system, 4 × 3 mm id, from Phenomenex (Torrance, CA) was used. LC conditions: mobile phase, methanol–water (60 + 40); flow rate, 0.6 mL/min; injection volume, 40 µL; total analysis time, 12 min.

(j) *GC/MS system*.—An Agilent 6890 gas chromatograph, equipped with 5973 Series mass selective detector, was used. The mass spectrometer was operated in electron impact ionization mode (ionizing energy 70 eV) scanning from *m/z* 80 to 400 at 4.45 scan/s. The ion source and quadrupole temperatures were 230° and 150°C, respectively. A fused silica capillary column (ZB-5MS), 5% phenyl polysiloxane as nonpolar stationary phase (30 m × 0.25 mm id) and 0.25 µm film thickness, supplied by Phenomenex, was used. Operating conditions were as follows: injector port temperature, 320°C; helium as carrier gas at a flow rate of 1.0 mL/min; pulsed splitless mode (pulsed pressure 45 psi for 1.5 min); oven temperature program: 100°C (1 min), increased 25°C/min to 280°C, held 2 min; solvent delay, 2 min. The total analysis time is 10.20 min and the equilibration time 2 min. Analysis was performed with SIM using *m/z* 174 and 201.

#### Sample Preparation and Extraction

*Juice samples*.—Orange juice squeezed in the laboratory was centrifuged 10 min at 4500 rpm. Glass columns, with Whatman No. 1 filters placed at the bottom end, were filled with 6 g alumina. A 1 mL volume of centrifuged juice was transferred to the column, previously fortified when required with 0.5 mL of the pesticide mixture in methanol. A 0.5 mL volume of methanol was added instead to unfortified samples to achieve a better dispersion of the matrix in the column. The columns were placed in a vacuum manifold and the samples were extracted twice with 5 mL ethyl acetate. The filtered extracts were collected in graduated 10 mL glass tubes.

**Rind samples.**—The rind of orange fruits was cut up with a knife and ground in a food processor. A 2 g amount of ground orange rind and 6 g alumina were placed in a glass mortar and mixed with a pestle until a homogenous powdered sample was obtained. The blended sample was then transferred to an extraction column with Whatman No. 1 filters at the bottom end. Samples were previously fortified with 0.5 mL TBZ standard in methanol and, to unfortified samples, 0.5 mL methanol was added instead. Samples were extracted twice with 5 mL ethyl acetate and placed in a vacuum manifold, where the extraction solvent was filtered.

#### Cleanup

A PRS SPE column was conditioned with 10 mL SPE column conditioning solution, 3 mL methanol, and 5 mL ethyl acetate. The extract was transferred to the conditioned SPE column and filtered by applying vacuum that allowed the column to air-dry. TBZ retained in the column was eluted with 9.5 mL SPE column elution solution. The eluate was collected in a 10 mL graduated glass tube and 0.2 mL NaOH 1% was added. The eluate was diluted to volume with SPE column elution solution. Samples were filtered before LC analysis.

#### Quantitation

Samples were analyzed by LC with fluorescence detection. The concentration of each compound was determined by comparing peak areas obtained in samples with those found for standard mixtures of known concentration. The chromatographic standards were prepared with SPE elution solution containing NaOH in the same proportion as samples (0.2 mL NaOH 1% in 10 mL solution).

#### Washing and Storage Assay

Oranges were hand-washed under a stream of tap water during 1 min (ca 2 L water). Fresh fruits were stored at  $7^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  at relative air humidity of  $60 \pm 10\%$  for 3 months. Four replicates per assay were analyzed.

## Results and Discussion

#### Method Development

**Liquid chromatographic determination.**—Good results were obtained using methanol–water (60 + 40) as mobile phase. A variability of the retention time of TBZ that may be explained by the presence of its cationic form at acidic pH was observed. When sample solutions and standards were prepared with the SPE elution solution containing NaOH (0.2 mL NaOH 1% in 10 mL solution), a resulting pH of 6 was achieved, higher than the TBZ pKa of 4.7 and, consequently, a reproducible retention time of TBZ was obtained for the different samples and standards analyzed.

**MSPD procedure.**—The influence of the adsorbent on the recovery of TBZ throughout the extraction procedure was evaluated. Florisil and alumina were assayed by using ethyl acetate, an extraction solvent that has shown good results in previous studies (14). Figure 2 shows that TBZ recoveries

clearly improved when alumina was used, particularly for juice samples. Alumina was consequently the adsorbent selected for MSPD. The proposed MSPD procedure allowed extraction from 12 orange samples in about 1 h, using a low volume of ethyl acetate (10 mL) per sample. Therefore, this technique provides a procedure that is rapid and uses less solvent and glassware than conventional liquid extraction procedures.

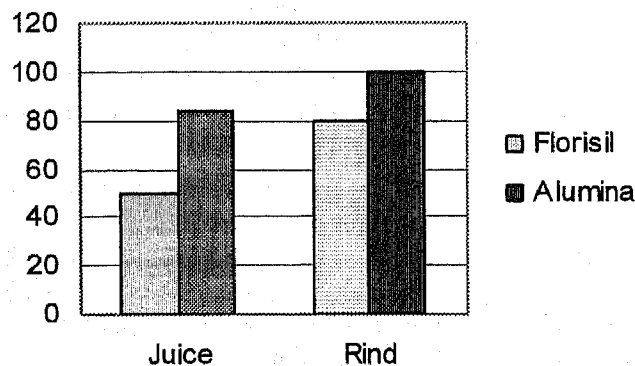
**Cleanup.**—TBZ residue levels that may be found in orange juices are usually very low, around a few  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; therefore the presence of chromatographic interferences coming from the matrix should be reduced at maximum. Although the previous MSPD procedure provides rather clean extracts, allowing TBZ determination at levels down to  $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ , a PRS SPE column was used in a subsequent purification step to allow determination of TBZ residues around  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ . Figure 3 shows that cleaner chromatograms of juice and rind samples were obtained after the cleanup step. Nevertheless, when TBZ levels in samples are high, as may be the case of orange rind, this additional cleanup would not be necessary.

#### Validation of the Analytical Method

**Linearity.**—The linearity of the method was assayed by analyzing standard solutions in the range of 1–100  $\mu\text{g}/\text{L}$ . The calibration curve for TBZ was linear over the concentration range studied with a correlation coefficient  $r = 0.99997$ . The results of the linear regression analysis of the calibration data were: a (slope) = 12.24,  $s_a = 0.05$ ; b ( $y$ -intercept) = 3.0,  $s_b = 2.2$ , where  $s_a$  and  $s_b$  are the standard deviations of the slope and  $y$ -intercept, respectively.

**Repeatability.**—The repeatability of our chromatographic method was determined by analyzing a standard solution at  $2.5 \mu\text{g}/\text{L}$ . The solution was injected 6 times with an automatic injector and the relative standard deviation (RSD) values obtained for retention time and peak area were 0.1 and 0.9%, respectively. Therefore, the repeatability achieved with our chromatographic method was very good.

The repeatability of the whole analytical procedure was also determined by analyzing 4 replicates of a fortified sample



**Figure 2.** Influence of adsorbent on TBZ recovery (%) in the extraction procedure. Juice and rind samples were fortified at  $0.025 \mu\text{g}/\text{g}$ .

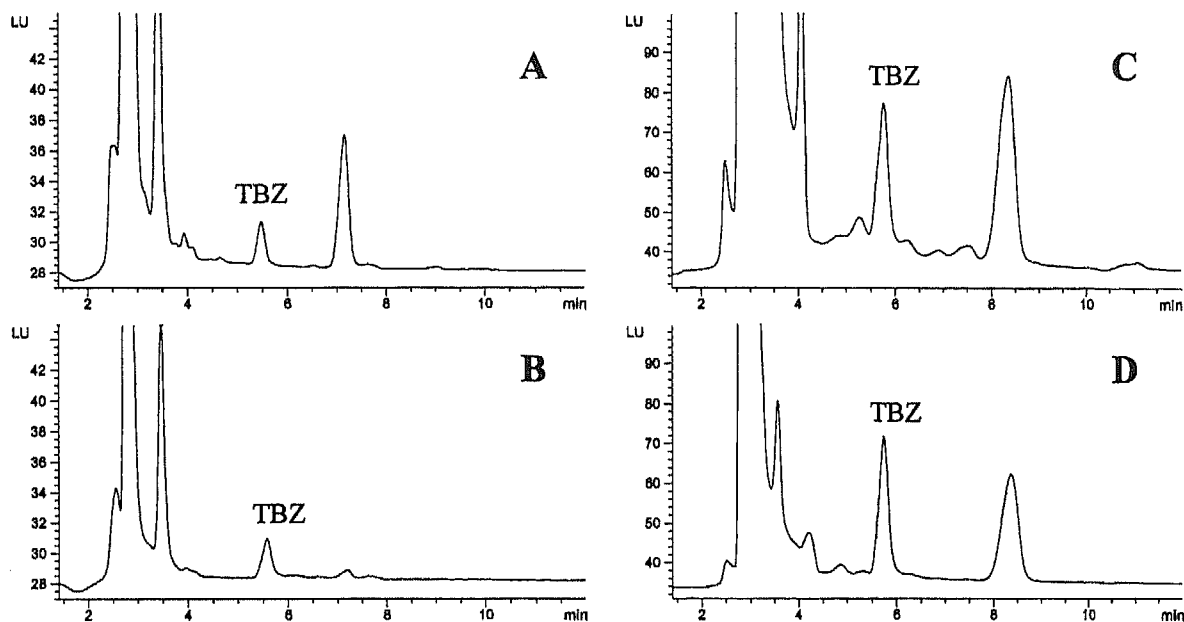


Figure 3. Liquid chromatograms of (A) juice sample fortified at 0.025  $\mu\text{g/g}$  without cleanup; (B) juice sample fortified at 0.025  $\mu\text{g/g}$  with cleanup; (C) rind sample fortified at 0.1  $\mu\text{g/g}$  without cleanup; (D) rind sample fortified at 0.1  $\mu\text{g/g}$  with cleanup.

during different days. The repeatability of the method (RSD) was 4.8% for juice samples and 7.4% for rind samples.

**Stability.**—Stock standard solutions and working solutions were stable for at least 3 months and 1 week, respectively, when stored at 4°C. Moreover, the stability of a standard solution kept in the autosampler for 24 h was determined by comparing its peak area with that obtained from a freshly prepared standard solution. The values obtained for both standard solutions were not statistically different (*t*-paired test), and therefore the standard solutions were found to be stable for at least 24 h at room temperature.

**Specificity.**—The specificity of the proposed MSPD procedure was assessed by analyzing blank juice samples. The absence of background peaks, above the signal-to-noise ratio of 3, at the retention time of TBZ, showed that no interferences occurred.

**Recovery.**—The recovery results obtained for orange juice and rind are summarized in Table 1. Juice samples were fortified at 0.050, 0.025, and 0.005  $\mu\text{g/g}$ , whereas fortification levels for rind samples ranged from 0.025 to 1.000  $\mu\text{g/g}$ . Recovery of TBZ varied from 87% in juice to 97% in rind, with RSDs of  $\leq 11\%$ . These results are similar to those published by other authors (7, 14) and show that good recoveries from juice and rind samples were obtained throughout the proposed procedure.

**Detection and quantification limits.**—The limits of detection (LOD) of the proposed method were determined by considering a value 3 times the background noise obtained for blank samples, whereas the limits of quantitation (LOQ) were determined considering a value 10 times the background

noise. Figure 4A shows a liquid chromatogram of a standard solution at 0.10  $\mu\text{g/L}$ , whereas Figure 4B depicts the chromatogram of a blank juice sample. Analyzing the background noise of this blank sample, the LOD for TBZ in juice is 0.15  $\mu\text{g/kg}$  and the quantitation limit is 0.50  $\mu\text{g/kg}$ . Similar values were found for rind samples. These values are in the lower end of those reported in previous papers (2, 7, 14).

#### Application to Real Samples

The developed MSPD method was applied to the determination of TBZ in commercial orange juices and fresh

Table 1. Recovery of TBZ<sup>a</sup>

Fortification level, $\mu\text{g/g}$	Mean, %	RSD, % <sup>b</sup>
Juice		
0.050	87	4
0.025	88	5
0.005	88	4
Rind		
1.000	97	8
0.500	89	6
0.100	94	3
0.025	95	11

<sup>a</sup> Four replicates for each fortification level.

<sup>b</sup> RSD = Relative standard deviation.

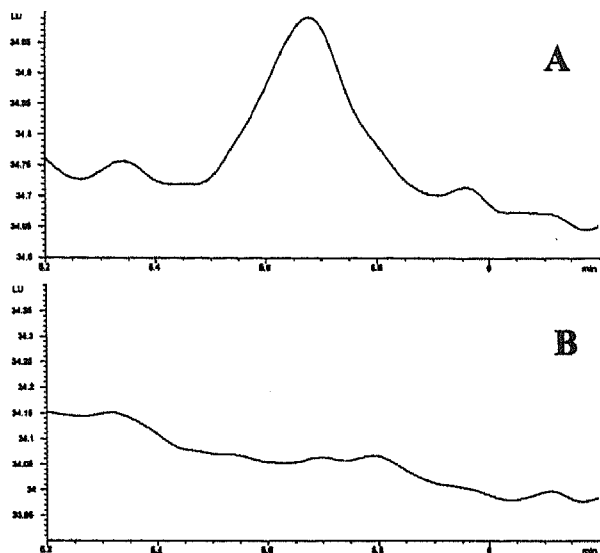


Figure 4. Liquid chromatograms of (A) standard solution at 0.1 µg/L; (B) blank juice sample.

oranges treated with TBZ, by analyzing both rind and juice. Table 2 summarizes the TBZ residue levels found in the different samples analyzed. TBZ residues in fresh oranges are mainly found in rind and only a small fraction appears in juice. Most of the commercial juices do not present residue levels above the detection limits, although 2 of the samples presented very low TBZ levels (3 µg/kg). These levels in juice are far lower than the maximum residue level (MRL) established by the European Union for TBZ in whole fruit (6 mg/kg). Very scarce data on TBZ residues in fruit juices, particularly orange juice, are available in the scientific literature (14). TBZ levels in whole fruit have been more widely studied, and the residue levels found in our research are in agreement with the levels in fruit reported by other authors (4, 7, 17).

The influence of washing and storage of fruits on TBZ residue levels found in juice and rind was also studied. TBZ levels in rind decreased more than 50% when oranges were washed thoroughly with water, and a 70% reduction of TBZ residues in rind was observed when oranges were stored 3 months in the refrigerator. TBZ levels found in fresh, washed, and aged oranges are summarized in Table 3. The influence of washing and storage is clearly observed in rind with values significantly lower than those of fresh oranges, the decrease being more important in aged oranges. TBZ residues in juice are more similar, although levels in fresh oranges are significantly lower than the others. Therefore, the proportion of TBZ level in juice versus that of whole fruit is much lower in fresh oranges (3%) than in washed and aged oranges (12–15%).

The persistence and distribution of TBZ in orange fruits depend on several factors such as the type of application and the storage conditions. A 25% loss of TBZ in orange rind after

Table 2. TBZ residue levels (µg/g) found in orange juice and rind

Sample No.	Commercial juices	Fresh oranges	
		Juice	Rind
1	ND <sup>a</sup>	0.08	6.7
2	ND	0.07	6.4
3	0.003	0.07	6.2
4	ND	0.09	8.3
5	0.003		
6	ND		
7	ND		

<sup>a</sup> ND = Not detected.

1 month storage and a reduction around 90% of TBZ in oranges washed a few hours after its application have been reported by other authors (3, 22).

#### GC/MS Confirmation

Pesticide identity is often confirmed by MS, usually coupled with LC or GC. In this case, it would be more convenient to perform the confirmation by LC/MS. Nevertheless, this equipment is expensive and not widely available in analytical laboratories; consequently, the confirmation of TBZ residues was studied by GC/MS. Although the GC determination has been reported in the scientific literature (3, 18, 19), it presents problems because of low volatility and poor transfer of this compound in the GC injection port. Figure 5A depicts a representative chromatogram obtained by direct injection, and shows the poor response obtained for TBZ. Nevertheless, when SPME was followed by GC analysis, the response clearly improved

Table 3. Influence of fruit washing and storage on TBZ levels<sup>a</sup>

Samples	Whole fruit, µg/g	Juice, µg/g	Rind, µg/g	C <sub>Juice</sub> /C <sub>Whole fruit</sub> %
Fresh oranges	2.9 ± 0.6 <sup>b</sup>	0.08 ± 0.01 <sup>b</sup>	7.1 ± 1.0 <sup>c</sup>	3 ± 1 <sup>b</sup>
Washed oranges	1.2 ± 0.2	0.14 ± 0.04	3.4 ± 0.1	12 ± 4
Aged oranges	0.9 ± 0.2	0.13 ± 0.02	2.2 ± 0.6	15 ± 3

<sup>a</sup> Mean values ± standard deviation (n = 4). Whole fruit values were calculated from juice and rind levels. Oranges were washed by hand with tap water. Aged oranges were maintained 3 months in the refrigerator at 7° ± 1°C and 60 ± 10% of relative air humidity, presenting a weight loss of 36 ± 2%.

<sup>b</sup> Fresh orange values are significantly different from the others at p < 0.05.

<sup>c</sup> All values are significantly different at p < 0.05.

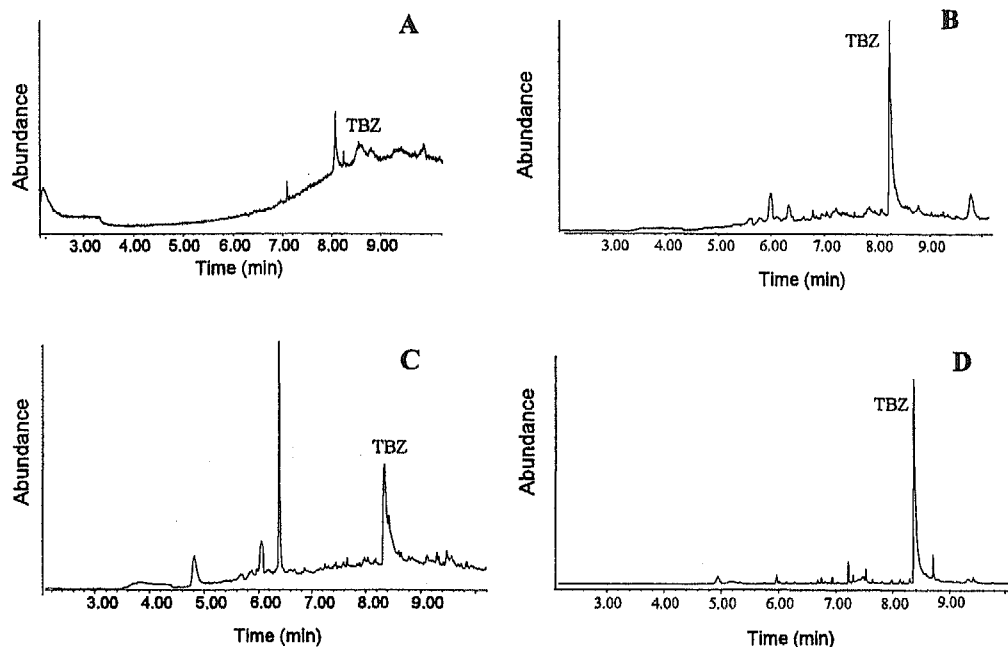


Figure 5. GC/MS chromatograms in SIM of (A) direct injection of standard at 0.25  $\mu\text{g/mL}$  in ethyl acetate; (B) SPME analysis with PA fiber of standard at 0.010  $\mu\text{g/mL}$  in water; (C) SPME analysis of juice sample; (D) SPME analysis of rind sample.

(Figure 5B). Therefore, confirmation of TBZ residues by SPME and GC/MS was studied. A total ion chromatogram of a standard solution was obtained to determine the TBZ retention time and the main ions of its mass spectrum. Table 4 summarizes the main ions with their relative abundance and the proposed fragment identity of TBZ.

First, 2 different fiber coatings were assayed, PA and PDMS. Prior to sampling, fibers were conditioned for 1 h at 270°C to reduce possible interferences. A 4 mL volume of TBZ standard was placed in a vial and stirred magnetically. Sampling was performed by inserting the fiber 30 min in the liquid and then placing it in the injection port of the gas chromatograph for 5 min to allow desorption. Best results were obtained with the PA fiber, because higher temperatures can be used in the injection port that improved the transfer of TBZ to the GC column.

This method was applied to confirm TBZ residues in real samples and an LOD of 0.1  $\mu\text{g/kg}$  was achieved, considering 3 times the background noise obtained with a blank sample. Representative chromatograms obtained by SPME analysis are depicted in Figures 5C and 5D. The developed SPME method allowed confirmation of TBZ residues in positive juice and rind samples and confirmed the absence of residues in negative samples, in accordance with the results previously obtained by LC with fluorescence detection.

## Conclusions

A rapid method was developed for determination of TBZ in orange juice and rind at very low levels, based on an MSPD

extraction procedure and subsequent SPE purification. The good reproducibility and low detection and quantitation limits achieved with this method allowed its application to the determination of levels of TBZ in freshly squeezed and commercial orange juices. The influence of washing and storage of fruits on juice and rind levels of TBZ was also studied. TBZ residues in positive samples were confirmed by SPME followed by GC/MS with SIM. The proposed method can be used as a routine technique in monitoring programs to determine low residue levels of TBZ in orange juice and rind samples.

## Acknowledgments

Financial aid from INIA (Project RTA01-041) is acknowledged.

Table 4. Main ions, relative abundance, and proposed fragment identity of thiabendazole

<i>m/z</i>	Relative abundance, %	Proposed fragment identity
174	84	$\text{C}_9\text{H}_6\text{N}_2\text{S}$
175	18	$\text{C}_9\text{H}_7\text{N}_2\text{S}$
201	100	$\text{C}_{10}\text{H}_7\text{N}_3\text{S}$
202	20	$\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_3\text{S}$

## References

- (1) Young, M.S., Phillips, D.J., Iraneta, P.C., & Krol, J. (2001) *J. AOAC Int.* **84**, 556–561
- (2) Bushway, R.J., Brandon, D.L., Bates, A.H., Li, L., Larkin, K.A., & Young, B.S. (1995) *J. Agric. Food Chem.* **43**, 1407–1412
- (3) Lafuente, M.T., Tadeo, J.L., & Tuset, J.J. (1987) *J. Chromatogr. Sci.* **25**, 84–87
- (4) Arenas, R.V., & Johnson, N.A. (1994) *J. AOAC Int.* **77**, 710–713
- (5) Mountfort, K.A., Reynolds, S.L., Thorpe, S.A., & White, S.N. (1994) *Food Agric. Immunol.* **6**, 17–22
- (6) Hiemstra, M., Joonsten, J.A., & De Kok, A. (1995) *J. AOAC Int.* **78**, 1267–1274
- (7) Bushway, R.J., Li, L., Paradis, L.R., & Perkins, L.B. (1995) *J. AOAC Int.* **78**, 815–820
- (8) Arenas, R.V., Rahman, H., & Johnson, N.A. (1996) *J. AOAC Int.* **79**, 579–582
- (9) Ito, Y., Ikai, Y., Oka, H., Hayakawa, J., & Kagami, T. (1998) *J. Chromatogr. A* **810**, 81–87
- (10) Yamazaki, Y., & Ninomiya, T. (1999) *J. AOAC Int.* **82**, 1474–1478
- (11) Kaihara, A., Yoshii, K., Tsumura, Y., Nakamura, Y., Ishimitsu, S., & Tonogai, Y. (2000) *J. Health Sci.* **46**, 336–342
- (12) Lambropoulou, D.A., & Albanis, T.A. (2002) *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3359–3365
- (13) Simplício, A.L., & Vilas Boas, L. (1999) *J. Chromatogr. A* **833**, 35–42
- (14) Perret, D., Gentili, A., Marchese, S., Sergi, M., & D'Ascenzo, G. (2002) *J. AOAC Int.* **85**, 724–730
- (15) Tadeo, J.L., & Sánchez-Brunete, C. (2003) *Chromatographia* **57**, 793–798
- (16) Young, M.S., Early, M.F., Mallet, C.R., & Krol, J. (2001) *J. AOAC Int.* **84**, 1608–1613
- (17) Ito, Y., Goto, T., Oka, H., Matsumoto, H., & Miyazaki, Y. (2003) *J. Agric. Food Chem.* **51**, 861–866
- (18) Oishi, M., Onishi, K., Kano, I., Nakazawa, H., & Tanabe, S. (1994) *J. AOAC Int.* **77**, 1293–1296
- (19) Navickiene, S., & Ribeiro, M.L. (1999) *J. High Resolut. Chromatogr.* **22**, 303–304
- (20) Rodríguez, R., Picó, Y., Font, G., & Mañes, J. (2002) *J. Chromatogr. A* **949**, 359–366
- (21) Eash, D.T., & Bushway, R.J. (2000) *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* **23**, 261–272
- (22) Cabras, P., Schirra, M., Pirisi, F.M., Garau, V.L., & Angioni, A. (1999) *J. Agric. Food Chem.* **47**, 3352–3354

#### 4. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PESTICIDAS EN ZUMOS MEDIANTE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Al igual que en el caso del capítulo anterior donde se presentaba un método analítico para determinar en la miel más de cincuenta pesticidas de distintas familias químicas, el objetivo de este trabajo fue desarrollar un método para analizar un elevado número de pesticidas en zumos de frutas y hortalizas.

La extracción no se basó en la MSPD como en los anteriores trabajos presentados en este capítulo, debido a ciertas limitaciones que presenta esta técnica con relación a la cantidad de muestra utilizada, que es un inconveniente a la hora de obtener los límites de detección necesarios, en especial de aquellos compuestos con una peor respuesta cromatográfica.

La determinación analítica se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas en el modo de selección de iones. La cuantificación se llevó a cabo empleando extractos de zumo enriquecidos para contrarrestar el efecto matriz y un patrón interno, hexazinona, para minimizar el efecto de las posibles variaciones en los tiempos de retención y las áreas de los picos.

El adsorbente utilizado en la extracción en fase sólida fue C<sub>18</sub> empleando la mezcla hexano - acetato de etilo como disolvente extractante, al igual que en el método multirresiduos desarrollado para la determinación de alrededor de cincuenta pesticidas en la miel.

Se obtuvieron muy buenos resultados con recuperaciones por encima del 91% y desviaciones estándar relativas inferiores al 9% en los distintos niveles ensayados. Además se consiguieron límites de detección entre 0,1 y 4,6 µg/L para los distintos pesticidas estudiados.

Una vez optimizado, el método se aplicó al análisis de distintas muestras reales y se encontraron residuos de al menos uno de los compuestos en la mitad de las muestras analizadas. Se encontraron residuos de diazinon, etion y procimidona. Los niveles encontrados son muy inferiores a los LMR establecidos para frutas y hortalizas.

**DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PESTICIDAS EN ZUMOS MEDIANTE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRIA DE MASAS**

B. Albero, C. Sánchez-Brunete y J.L. Tadeo. "Multiresidue determination of pesticides in juice by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry", *Talanta* 2005, 66(4), 917-24.

**Contribución**

Póster. "Multiresidue determination of pesticides in juice by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry", ***IV Congreso de la Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines***, 5-7 Octubre 2004, Madrid, España.

# Multiresidue determination of pesticides in juice by solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry

Beatriz Albero, Consuelo Sánchez-Brunete, José L. Tadeo\*

*Departamento de Medio Ambiente, INIA, Ctra. de la Coruña Km. 7, 28040 Madrid, Spain*

Received 22 July 2004; received in revised form 11 November 2004; accepted 17 December 2004

Available online 20 January 2005

## Abstract

A multiresidue method based on solid-phase extraction was developed for the simultaneous determination of 50 pesticides in commercial juices. The extraction procedure was carried out in  $C_{18}$  columns preconditioned with acetonitrile and water. The subsequent elution of pesticides was performed with a mixture of hexane-ethyl acetate (1:1, v/v) prior to the determination by gas chromatography with electron impact mass spectrometric detection in the selected ion monitoring mode (GC–MS–SIM), using one target and two qualifier ions. Standards were prepared spiking blank juice samples to counteract the observed matrix effect. Average recoveries for all the pesticides studied were higher than 91% with relative standard deviations lower than 9% in the concentration range of 0.02–0.1  $\mu\text{g/mL}$  and the detection limits achieved ranged from 0.1 to 4.6  $\mu\text{g/L}$ . The proposed method was applied to the analysis of these compounds in commercial juices and diazinon, ethion and procymidone were the pesticides encountered, although the levels found were very low.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Multiresidue; Juice; Pesticides; Gas chromatography–mass spectrometry; SPE

## 1. Introduction

A large number of pesticides are often employed to control pest and diseases that damage fruits. Residues left after pesticide treatment may penetrate plant tissues and appear in the pulp and juice of fruit and vegetables, although their concentrations are, in general, lower than those observed in whole fruit [1]. The presence of pesticide residues in food is one important concern for consumers, due to their possible long adverse health effects, especially for children as they consume a higher proportion of fruits and vegetables in relation to their body weight and are more susceptible to chemicals since they are in early development stages. Government agencies and international organisations limit the amount of pesticides in food establishing maximum residue limits (MRLs), with the aim of protecting the consumers' health [2].

Multiresidue methods have been developed for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables [3–6] but few methods are available in the scientific literature for their determination in juice. Since only trace amounts of pesticides are usually found in juice samples, preconcentration and purification steps are required. The type of matrix has an important influence on the particular sample preparation applied and in the case of fruit juices, solid-phase extraction (SPE) [7,8] and matrix solid-phase dispersion (MSPD) [9–12] have been used with good results. In these cases, a simultaneous extraction and cleanup of extracts occurs, which often allows the direct analysis. Solid-phase microextraction (SPME), a solventless and highly sensitive procedure, has been also applied for multiclass pesticide analysis in juice [13–15].

The most frequently used technique for analysis of pesticides in juices is gas chromatography with different selective detectors as electron-capture (ECD) [16,17], nitrogen-phosphorus (NPD) [18], and flame photometry (FPD) [19]. The confirmation of residue identity is usually performed

\* Corresponding author. Tel.: +34 91 347 6821; fax: +34 91 357 2293.  
E-mail address: [tadeo@inia.es](mailto:tadeo@inia.es) (J.L. Tadeo).

by mass spectrometry (MS) using selected ion monitoring [20]. Among the analytical methods used in residue analysis, liquid chromatography (LC) with diode-array [6,8] is effective in thermally labile and nonvolatile compounds determination. Liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS) or with tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) has lately become a powerful analytical technique for the identification and quantification of residues in juices [12,21].

The frequent application of diverse types of pesticides makes necessary the determination of as many compounds as possible in a single analysis. In addition, the use of reliable miniaturised methods is also desirable to carry out the analysis of samples with a low solvent consumption. MSPD was initially employed in our laboratory for the analysis of various pesticide classes in fruit juices [9,22]. Nevertheless, due to some limitations of the method, particularly the small input of sample allowed, this technique presented the drawback of not achieving the required detection limits when a wide number of pesticides were determined, mainly for those compounds showing a low detector response. To overcome these difficulties, the use of SPE as an alternative sample preparation procedure was studied.

This paper presents a rapid multiresidue method based on solid-phase extraction to simultaneously determine and confirm 50 pesticides in fruit and vegetable juices by gas chromatography–mass spectrometry. The method was applied to the analysis of these compounds in different juice samples taken from the supermarket.

## 2. Experimental

### 2.1. Apparatus

#### 2.1.1. GC–MS

An Agilent 6890 (Waldbronn, Germany) gas chromatograph equipped with an automatic split-splitless injector Model HP 7683 and a 5973 series mass-selective detector was used for the analysis of the pesticides studied. A fused-silica capillary column (ZB-5MS), 5% phenyl polysiloxane as nonpolar stationary phase (30 m × 0.25 mm i.d.) and 0.25 μm film thickness, supplied by Phenomenex (Torrance, CA) was used, with helium as carrier gas at a constant flow of 1 mL/min. The temperature programme was the following: initial temperature, 70 °C held for 2 min, then at rate of 25 °C/min to 150 °C, 3 °C/min to 200 °C, and 8 °C/min to 280 °C maintaining this temperature 10 min. The total analysis time was 41.87 min and the equilibration time 2 min. The temperature of the injection port was 280 °C and a 2 μL volume was injected in pulsed splitless mode (pulsed pressure 310 kPa for 1.5 min).

Mass spectrometric parameters: electron impact ionisation mode with an ionising energy of 70 eV, ion source temperature 230 °C, MS Quad temperature 150 °C, electron multiplier voltage 1000 V above autotune when performing

selected ion monitoring, scanning from  $m/z$  60 to 500 at 3.62 s per scan; solvent delay, 5 min.

Analysis was performed in the selected ion monitoring mode (SIM) based on the use of one target and two qualifier ions. Pesticides were identified according to the retention times, the target and qualifier ions, and the qualifier to target abundance ratios. Target and qualifier abundances were determined by injection of individual pesticide standards under the same chromatographic conditions in full-scan mode. Quantification was based on peak area ratio of the target ion divided by the internal standard. Spiked blank samples were used as standards to counteract possible matrix effects. Table 1 summarises the pesticides studied with their retention times, the target and qualifier ions, and the qualifier to target abundance ratios. Table 2 indicates the SIM programme used to analyse pesticides in juice.

#### 2.1.2. Extraction equipment

The extraction was carried out in polypropylene columns (5 mL, 6 cm × 12 mm i.d.) supplied by Becton-Dickinson (Madrid, Spain). Teflon frits of 1 cm diameter and 20 μm pore size (Supelco, Bellefonte, PA, USA), placed at the end of the column, were used. A 12-port vacuum manifold (Supelco Visiprep, Madrid, Spain) was employed to filter the samples.

### 2.2. Materials

#### 2.2.1. Chemicals and reagents

Pesticide standards, 99% purity, were purchased from Riedel-de Hæen (Seelze, Germany). Ethyl acetate, hexane, methanol, dichloromethane, and acetonitrile, residue analysis grade, were obtained from Scharlab (Barcelona, Spain). Water, HPLC grade, was purchased from Scharlab (Barcelona, Spain). Silica Bondesil-C<sub>18</sub>, particle diameter of 40 μm, was obtained from Scharlab (Barcelona, Spain) and anhydrous sodium sulfate, reagent grade, was from Merck (Darmstadt, Germany).

#### 2.2.2. Pesticide solutions

Stock solutions (500 μg/mL) of each pesticide were prepared by dissolving 50 mg of the pesticide in 100 mL ethyl acetate. An intermediate stock solution containing all the pesticides at 5 μg/mL was prepared transferring 1 mL of each stock solution to a 100 mL volumetric flask and diluting to volume with ethyl acetate. Three working solutions containing 2.0, 1.0, and 0.4 μg/mL of each pesticide in ethyl acetate were used to fortify juice samples. Stock and working solutions were stored at 4 °C and used for no longer than 3 months and 1 week, respectively.

#### 2.2.3. Internal standard solution

The internal standard solution was prepared by dissolving 50 mg hexazinone in 100 mL ethyl acetate. A working internal standard solution of 1 μg/mL in ethyl acetate was prepared.

Table 1  
Retention times ( $t_R$ , min), target ion (T), qualifier ions ( $Q_1$ ,  $Q_2$ ), and qualifier to target abundance ratios ( $Q_1/T$ ,  $Q_2/T$ )<sup>a</sup> of the pesticides studied

	Pesticide	$t_R$	T	$Q_1$	$Q_2$	$Q_1/T$ (%)	$Q_2/T$ (%)
1	EPTC	7.91	128	189	86	24.2	65.8
2	Molinate	10.77	126	187	83	21.5	14.5
3	Propachlor	12.27	120	176	93	38.2	31.0
4	Ethalfuralin	13.29	276	316	292	76.2	46.3
5	Trifluralin	13.68	306	264	290	74.8	13.4
6	Simazine	15.18	201	186	173	73.3	29.4
7	Atrazine	15.44	200	215	173	57.4	22.4
8	Lindane	15.88	183	219	147	82.6	38.4
9	Terbutylazine	16.14	214	229	173	28.2	37.6
10	Diazinon	16.81	179	137	304	103.2	48.3
11	Chlorothalonil	17.33	266	264	270	100.0	10.8
12	Triallate	17.41	86	268	128	39.6	21.2
13	Metribuzin	18.81	198	144	182	14.3	8.4
14	Parathion-methyl	19.18	263	109	125	92.8	79.4
15	Tolclofos-methyl	19.41	265	125	250	23.5	10.8
16	Alachlor	19.66	160	188	146	88.4	91.2
17	Prometryn	19.91	241	184	226	73.1	55.4
18	Terbutryn	20.58	226	241	185	48.7	73.8
19	Fenitrothion	20.71	277	125	260	113.8	39.9
20	Pirimiphos-methyl	20.95	290	276	305	85.9	67.7
21	Dichlofluanid	21.06	123	224	167	47.0	39.3
22	Aldrin	21.34	263	293	221	38.1	19.8
23	Malathion	21.38	173	127	93	104.3	79.3
24	Metolachlor	21.64	162	238	146	57.0	14.2
25	Fenthion	21.77	278	169	109	24.1	26.6
26	Chlorpyrifos	21.89	197	314	97	67.4	69.2
27	Triadimefon	22.06	208	181	128	27.6	51.6
28	Butralin	22.79	266	267	295	100.0	58.9
29	Pendimethalin	23.49	252	281	220	13.0	16.0
30	Phenthoate	24.05	274	246	125	23.4	28.4
31	Procymidone	24.26	283	96	285	118.8	70.0
32	Methidathion	24.56	145	85	125	83.8	16.4
33	Endosulfan I	24.89	241	195	239	94.5	33.0
34	Profenophos	25.80	208	339	139	75.6	80.2
35	Oxadiazon	26.16	175	258	334	51.9	18.5
36	Cyproconazole	26.68	222	139		51.3	
37	Endosulfan II	26.96	195	237	241	83.7	36.4
38	Ethion	27.54	231	153	384	67.5	11.7
39	Ofurace	28.08	132	160	281	79.4	34.5
40	Benalaxyl	28.22	148	206	91	25.9	40.6
41	Endosulfan sulfate	28.33	272	229	387	63.6	52.9
42	Hexazinone	28.80	171	128	83	14.9	12.2
43	Nuarimol	28.88	235	203	314	78.1	53.5
44	Bromopropylate	29.92	341	183	343	42.4	49.4
45	Tetradifon	30.62	159	229	111	58.2	50.3
46	$\lambda$ -Cyhalothrin	31.43	181	197	208	71.1	52.7
47	Fenarimol	31.58	139	219	330	76.2	31.9
48	Pyrazophos	31.74	221	373	181	17.5	20.6
49	Coumaphos	32.78	362	226	109	62.0	102.4
50	$\alpha$ -Cypermethrin	34.20	181	163	209	98.9	63.9
51	Fluvalinate tau-I	36.21	250	181	252	19.4	33.8
52	Fluvalinate tau-II	36.35	250	181	252	20.1	33.1

<sup>a</sup>  $Q/T$  (%) are the results of abundance values of the qualifier ion ( $Q_1$ ,  $Q_2$ ) divided by the abundance of the target ion (T)  $\times$  100.

### 2.3. Juice samples

Various commercial brands of carrot, peach, grape, orange, pineapple, and apple juices were purchased from supermarkets in Madrid. Juice samples were analysed following the procedure described below and those samples showing the absence of target analytes were used as

blank juice samples in the preparation of standards and in the recovery study.

### 2.4. Procedure

A 10 mL volume of juice was placed in a Sovirell tube and 3 mL of methanol was added. For recovery studies, samples were previously fortified adding 0.5 mL of the pesticide

Table 2  
SIM program used to analyse and confirm pesticides in juice

Group	Time (min)	Pesticide	<i>m/z</i>	Dwell time (ms)	Scan rate (cycles/s)
1	5.00	EPTC, molinate	83, 86, 126, 128, 187, 189	100	1.44
2	11.70	Propachlor	93, 120, 176	100	2.86
3	12.70	Ethalfuralin, trifluralin	264, 276, 290, 292, 306, 316	100	1.44
4	14.40	Simazine, atrazine	173, 186, 200, 201, 215	100	1.72
5	15.70	Lindane, terbuthylazine	147, 173, 183, 214, 219, 229	100	1.44
6	16.60	Diazinon	137, 179, 304	100	2.86
7	17.15	Chlorothalonil, triallate	86, 128, 264, 266, 268, 270	100	1.44
8	17.90	Metribuzin	144, 182, 198	100	2.86
9	19.00	Parathion-methyl, tolclofos-methyl	109, 125, 250, 263, 265	100	1.72
10	19.59	Alachlor, prometryn	146, 160, 184, 188, 226, 241	100	1.44
11	20.40	Terbutryn, fenitrothion, pirimiphos-methyl, dichlofluanid	123, 125, 167, 185, 224, 226, 241, 260, 276, 277, 290, 305	50	1.27
12	21.26	Aldrin, malathion	93, 127, 173, 221, 263, 293	100	1.44
13	21.59	Metolachlor, fenthion, chlorpyrifos, triadimefon	97, 109, 128, 146, 162, 181, 197, 208, 238, 278, 279, 314	50	1.27
14	22.50	Butralin, pendimethalin	220, 252, 266, 267, 281, 295	100	1.44
15	23.85	Phenthoate, procymidone	96, 125, 246, 274, 283, 285	100	1.44
16	24.45	Methidathion, endosulfan I	85, 125, 145, 195, 239, 241	100	1.44
17	25.40	Profenophos, oxadiazon	139, 175, 208, 258, 339, 344	100	1.44
18	26.40	Cyproconazole, endosulfan II	139, 195, 222, 237, 241	100	1.72
19	27.30	Ethion	153, 231, 384	100	2.86
20	27.90	Ofurace, benalaxyl, endosulfan sulfate	91, 132, 148, 160, 206, 229, 272, 281, 387	50	1.69
21	28.60	Hexazinone (IS) <sup>a</sup> , nuarimol	83, 128, 171, 203, 235, 314	100	1.44
22	29.50	Bromopropylate, tetradifon	111, 159, 183, 229, 341, 343	100	1.44
23	31.10	λ-Cyhalothrin, fenarimol, pyrazophos	139, 181, 197, 208, 219, 221, 330, 373	50	2.17
24	32.50	Coumaphos	109, 226, 362	100	2.86
25	33.50	α-Cypermethrin	163, 181, 209	100	2.86
26	36.00	Fluvalinate tau-I, fluvalinate tau-II	181, 250, 252	100	2.86

<sup>a</sup> IS: internal standard.

mixture in ethyl acetate, to give final concentrations in the range of 0.02–0.1 µg/mL. The extraction columns, with a Teflon frit and 1 g of C<sub>18</sub> placed at the end, were preconditioned with 3 mL of acetonitrile and 5 mL of water using a 12-port vacuum manifold to filter the solvents. The juice solution was transferred to the column and the Sovirell tube was washed with 5 mL of water that were also transferred to the column. The elution of the pesticides retained in the solid-phase was carried out twice with 5 mL of hexane-ethyl acetate (1:1, v/v) and the combined eluates were collected in 10 mL graduated tubes. The eluates were concentrated under a gentle stream of air to allow the addition of 1 mL of the internal standard. The final volume of the higher fortification levels was 10 and 2 mL for the lowest fortification level and real samples. Anhydrous sodium sulfate was added to guarantee the dryness of the extracts that were then stored at 4 °C until the chromatographic analysis.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Analysis by gas chromatography–mass spectrometry

In previous works, an enhancement of the chromatographic response was observed when blank juice samples

were spiked with known amounts of pesticides, due to the matrix effect [9,22]. Fig. 1 shows the different responses obtained when standards are prepared with blank juice samples or with ethyl acetate, and a blank juice sample chromatogram showing the absence of interferences at the retention time of the target analytes. Many compounds presented an increase in their chromatographic response, some of them from two- to five-fold, although organochlorine pesticides were the compounds that presented the lowest matrix effect. Sample components may compete for the active sites of the glass liner decreasing the interaction between the active sites and the analyte and thus a larger amount of analyte is transferred to the chromatographic column. This effect has been reported by other authors in the determination of pesticides in food commodities [18,23]. Therefore, quantification was carried out preparing standards with blank juice samples to counteract this matrix effect.

Pesticide levels were quantified and its identity confirmed with GC–MS–SIM as this chromatographic technique provides the necessary sensitivity required for trace analysis in juice samples. The use of target and qualifier ions, together with the qualifier to target abundance ratios and the retention times, allowed to confirm positively the identity of the pesticides studied. The possible variations in retention times and peak areas were diminished by the addition of an internal standard. A good resolution of all the pesticides stud-

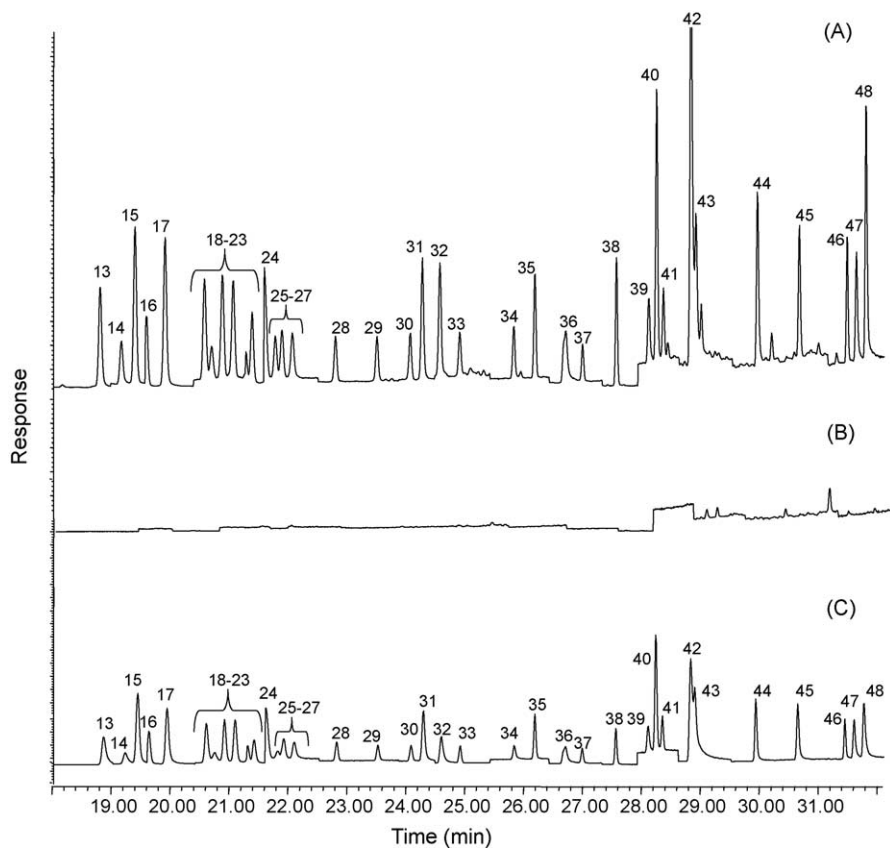


Fig. 1. Matrix effect observed in the GC–MS–SIM analysis of pesticides: (A) blank grape juice sample spiked at 0.05 µg/mL, (B) blank grape juice sample and (C) standard mixture solution in ethyl acetate at 0.05 µg/mL. See Table 1 for peak identification.

ied was achieved with the proposed chromatographic programme, Fig. 2.

### 3.2. Validation of the analytical method

#### 3.2.1. Linearity

The linearity of the method was assayed by analysing blank juice samples fortified in the range from 0.02 to 0.2 µg/mL with the internal standard at 0.1 µg/mL. The

detector response was linear in the range of concentrations studied with determination coefficients  $\geq 0.996$  for all the compounds. Table 3 summarises the calibration data for the pesticides studied.

#### 3.2.2. Repeatability

The repeatability of the chromatographic method was established performing the analysis of a juice sample fortified

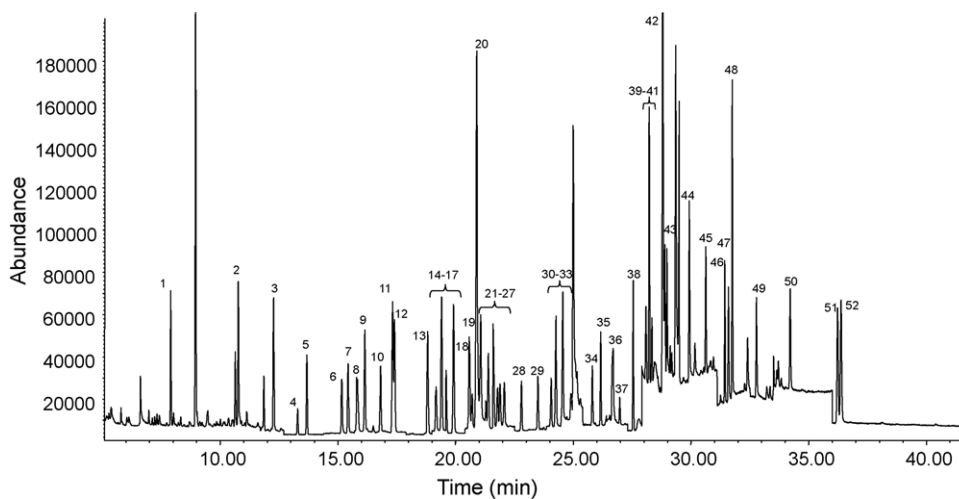


Fig. 2. GC–MS–SIM chromatogram of a carrot juice fortified at 0.05 µg/mL. See Table 1 for peak identification.

Table 3  
Calibration data, limits of detection (LOD,  $\mu\text{g/L}$ ), limits of quantification (LOQ,  $\mu\text{g/L}$ ), and repeatability of the studied pesticides

Pesticide	Calibration data		LOD	LOQ	Repeatability (RSD, %) <sup>a</sup>	
	Equation	Determination coefficient			Peak area	$t_R$
EPTC	$y = 3.50 \times 10^{-1}x + 5.81 \times 10^{-3}$	1.000	4.6	15.2	3.8	0.018
Molinate	$y = 5.77 \times 10^{-1}x - 1.10 \times 10^{-3}$	1.000	0.1	0.3	4.7	0.009
Propachlor	$y = 4.77 \times 10^{-1}x + 1.76 \times 10^{-3}$	1.000	0.1	0.3	5.8	0.007
Ethalfuralin	$y = 6.98 \times 10^{-2}x - 4.87 \times 10^{-3}$	0.999	0.6	2.0	5.5	0.009
Trifluralin	$y = 3.45 \times 10^{-1}x - 5.81 \times 10^{-2}$	0.999	0.1	0.3	4.9	0.009
Simazine	$y = 1.95 \times 10^{-1}x - 5.47 \times 10^{-3}$	0.999	0.3	1.2	6.7	0.010
Atrazine	$y = 2.73 \times 10^{-1}x - 6.21 \times 10^{-3}$	1.000	0.1	0.3	5.7	0.008
Lindane	$y = 2.24 \times 10^{-1}x - 5.63 \times 10^{-3}$	0.999	1.3	4.3	5.2	0.007
Terbutylazine	$y = 4.59 \times 10^{-1}x - 9.86 \times 10^{-4}$	1.000	1.4	4.7	6.5	0.007
Diazinon	$y = 2.12 \times 10^{-1}x + 4.35 \times 10^{-3}$	0.999	0.1	0.3	5.5	0.006
Chlorothalonil	$y = 4.48 \times 10^{-1}x + 1.18 \times 10^{-4}$	1.000	1.5	4.9	6.8	0.004
Triallate	$y = 4.00 \times 10^{-1}x - 4.24 \times 10^{-3}$	1.000	0.2	0.7	6.4	0.005
Metribuzin	$y = 8.18 \times 10^{-1}x - 7.35 \times 10^{-2}$	0.998	0.1	0.3	7.4	0.002
Parathion-methyl	$y = 1.26 \times 10^{-1}x - 8.67 \times 10^{-3}$	0.998	0.4	1.3	7.6	0.004
Tolclofos-methyl	$y = 8.85 \times 10^{-1}x - 7.04 \times 10^{-3}$	1.000	0.3	1.0	6.2	0.005
Alachlor	$y = 1.51 \times 10^{-1}x - 3.81 \times 10^{-3}$	1.000	0.5	1.6	7.0	0.003
Prometryn	$y = 5.17 \times 10^{-1}x - 2.11 \times 10^{-2}$	0.999	0.4	1.3	6.8	0.005
Terbutryn	$y = 3.51 \times 10^{-1}x - 1.49 \times 10^{-2}$	0.999	0.1	0.3	7.0	0.004
Fenitrothion	$y = 1.07 \times 10^{-1}x - 7.73 \times 10^{-3}$	1.000	0.6	2.0	8.1	0.005
Pirimiphos-methyl	$y = 2.54 \times 10^{-1}x - 1.47 \times 10^{-2}$	0.999	3.8	12.5	6.6	0.003
Dichlofuanid	$y = 3.53 \times 10^{-1}x - 1.21 \times 10^{-2}$	0.999	1.2	4.0	7.3	0.003
Aldrin	$y = 6.96 \times 10^{-2}x - 3.08 \times 10^{-4}$	1.000	1.7	5.6	7.3	0.002
Malathion	$y = 2.43 \times 10^{-1}x - 1.48 \times 10^{-2}$	0.998	0.1	0.3	7.4	0.004
Metolachlor	$y = 2.86 \times 10^{-1}x - 2.73 \times 10^{-3}$	1.000	4.2	13.9	8.2	0.000
Fenthion	$y = 5.37 \times 10^{-1}x - 6.31 \times 10^{-2}$	0.996	0.4	1.3	7.9	0.005
Chlorpyrifos	$y = 1.28 \times 10^{-1}x - 8.21 \times 10^{-3}$	0.999	0.4	1.3	7.0	0.003
Triadimefon	$y = 2.14 \times 10^{-1}x - 1.04 \times 10^{-2}$	1.000	0.2	0.7	7.4	0.004
Butralin	$y = 3.38 \times 10^{-1}x - 6.39 \times 10^{-2}$	0.999	0.6	2.0	7.7	0.002
Pendimethalin	$y = 2.88 \times 10^{-1}x - 5.27 \times 10^{-2}$	1.000	0.5	1.6	6.4	0.004
Phenthoate	$y = 2.51 \times 10^{-1}x - 1.27 \times 10^{-2}$	0.999	0.3	1.0	7.3	0.002
Procymidone	$y = 2.70 \times 10^{-1}x + 5.92 \times 10^{-3}$	1.000	0.1	0.3	6.4	0.005
Methidathion	$y = 4.67 \times 10^{-1}x - 1.75 \times 10^{-2}$	0.999	0.1	0.3	8.0	0.003
Endosulfan I	$y = 5.44 \times 10^{-2}x + 5.23 \times 10^{-4}$	1.000	0.2	0.7	6.0	0.004
Profenophos	$y = 1.10 \times 10^{-1}x - 1.26 \times 10^{-3}$	1.000	0.3	1.0	8.7	0.001
Oxadiazon	$y = 2.75 \times 10^{-1}x + 1.89 \times 10^{-3}$	1.000	1.1	3.6	7.0	0.002
Cyproconazole	$y = 4.27 \times 10^{-1}x - 3.13 \times 10^{-2}$	0.998	0.1	0.3	6.4	0.002
Endosulfan II	$y = 5.65 \times 10^{-2}x - 1.27 \times 10^{-4}$	0.999	0.8	2.6	7.3	0.003
Ethion	$y = 4.13 \times 10^{-1}x - 3.96 \times 10^{-2}$	0.998	0.1	0.3	7.7	0.003
Ofurace	$y = 1.50 \times 10^{-1}x - 8.87 \times 10^{-5}$	0.999	0.2	0.7	7.2	0.002
Benalaxyl	$y = 7.58 \times 10^{-1}x - 1.68 \times 10^{-2}$	1.000	0.1	0.3	5.7	0.002
Endosulfan sulfate	$y = 1.39 \times 10^{-1}x - 3.14 \times 10^{-3}$	0.999	0.6	2.0	5.5	0.002
Nuarimol	$y = 2.48 \times 10^{-1}x - 2.31 \times 10^{-3}$	1.000	0.2	0.7	5.5	0.003
Bromopropylate	$y = 4.61 \times 10^{-1}x - 1.45 \times 10^{-2}$	1.000	0.1	0.3	5.3	0.001
Tetradifon	$y = 2.50 \times 10^{-1}x + 8.81 \times 10^{-3}$	1.000	0.5	1.6	4.3	0.002
$\lambda$ -Cyhalothrin	$y = 3.15 \times 10^{-1}x - 4.18 \times 10^{-2}$	0.999	1.2	3.9	5.2	0.002
Fenarimol	$y = 2.31 \times 10^{-1}x - 6.43 \times 10^{-3}$	1.000	0.8	2.6	4.0	0.003
Pyrazophos	$y = 1.13 \times 10^0x - 8.27 \times 10^{-2}$	0.999	2.9	9.6	4.4	0.001
Coumaphos	$y = 2.35 \times 10^{-1}x - 2.23 \times 10^{-2}$	0.998	1.1	3.6	5.2	0.002
$\alpha$ -Cypermethrin	$y = 2.34 \times 10^{-1}x - 1.56 \times 10^{-2}$	0.999	1.5	4.9	5.4	0.003
Fluvalinate tau-I	$y = 3.95 \times 10^{-1}x - 1.72 \times 10^{-2}$	1.000	2.4	7.9	7.7	0.002
Fluvalinate tau-II	$y = 6.56 \times 10^{-1}x - 6.41 \times 10^{-2}$	0.999	0.4	1.3	5.0	0.004

<sup>a</sup> Relative standard deviation of retention times and peak areas ( $n = 10$ ).

at 0.05  $\mu\text{g/mL}$ . The sample was injected 10 times with an automatic injector. A good repeatability, expressed as relative standard deviations (RSDs), was obtained for retention times and peak areas with values lower than 0.02 and 9%, respectively (Table 3). Moreover, the repeatability of the complete analytical method, expressed as RSD, was in the range from 4.0 to 8.9% for all the studied compounds and it was

determined performing replicate analysis of a fortified sample during different days.

### 3.2.3. Recovery

Juice samples, previously analysed to verify the lack of the pesticides studied, were fortified at 0.1, 0.05, and 0.02  $\mu\text{g/mL}$  before extraction and 1 mL of the internal standard (1  $\mu\text{g/mL}$ )

Table 4  
Recovery of the studied pesticides from juice samples (mean  $\pm$  RSD, %) <sup>a</sup>

Compound	Fortification levels ( $\mu\text{g/mL}$ )			Compound	Fortification levels ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	0.1	0.05	0.02		0.1	0.05	0.02
EPTC	97.1 $\pm$ 3.5	98.2 $\pm$ 3.5	100.5 $\pm$ 4.4	Triadimefon	99.7 $\pm$ 2.7	97.7 $\pm$ 6.1	100.6 $\pm$ 4.6
Molinate	98.0 $\pm$ 1.9	97.6 $\pm$ 3.2	99.0 $\pm$ 3.6	Butralin	99.9 $\pm$ 3.8	96.1 $\pm$ 7.6	98.8 $\pm$ 5.5
Propachlor	98.6 $\pm$ 1.6	96.1 $\pm$ 5.6	98.9 $\pm$ 2.5	Pendimethalin	100.0 $\pm$ 4.4	95.9 $\pm$ 6.9	100.0 $\pm$ 8.7
Ethalfuralin	99.3 $\pm$ 2.8	97.1 $\pm$ 4.3	98.6 $\pm$ 4.5	Phenthoate	101.1 $\pm$ 5.0	97.0 $\pm$ 7.5	96.5 $\pm$ 5.8
Trifluralin	99.7 $\pm$ 2.8	96.3 $\pm$ 4.0	99.1 $\pm$ 4.6	Procymidone	100.9 $\pm$ 3.7	98.3 $\pm$ 7.8	96.3 $\pm$ 4.7
Simazine	97.7 $\pm$ 1.3	91.5 $\pm$ 6.1	95.6 $\pm$ 3.2	Methidathion	99.5 $\pm$ 4.6	97.1 $\pm$ 6.5	98.7 $\pm$ 5.7
Atrazine	99.9 $\pm$ 1.8	95.7 $\pm$ 4.4	99.1 $\pm$ 2.8	Endosulfan I	98.2 $\pm$ 4.5	95.5 $\pm$ 8.5	97.8 $\pm$ 5.1
Lindane	98.3 $\pm$ 2.7	92.4 $\pm$ 4.1	96.7 $\pm$ 3.4	Profenophos	98.7 $\pm$ 4.0	97.2 $\pm$ 6.9	100.3 $\pm$ 6.2
Terbutylazine	100.3 $\pm$ 1.8	97.2 $\pm$ 2.5	99.4 $\pm$ 2.1	Oxadiazon	98.1 $\pm$ 3.4	97.3 $\pm$ 6.6	97.3 $\pm$ 3.2
Diazinon	99.7 $\pm$ 1.5	97.3 $\pm$ 2.0	94.9 $\pm$ 6.5	Cyproconazole	98.5 $\pm$ 4.0	96.1 $\pm$ 6.9	97.7 $\pm$ 4.6
Chlorothalonil	100.1 $\pm$ 2.1	96.7 $\pm$ 2.9	100.1 $\pm$ 4.5	Endosulfan II	98.9 $\pm$ 3.1	94.5 $\pm$ 8.9	101.2 $\pm$ 5.1
Triallate	98.0 $\pm$ 2.7	96.8 $\pm$ 3.2	100.1 $\pm$ 7.6	Ethion	99.0 $\pm$ 4.5	96.6 $\pm$ 7.8	98.9 $\pm$ 5.5
Metribuzin	98.9 $\pm$ 2.8	91.4 $\pm$ 4.9	98.0 $\pm$ 4.5	Ofurace	98.8 $\pm$ 4.1	97.2 $\pm$ 5.5	99.1 $\pm$ 6.0
Parathion-methyl	98.8 $\pm$ 2.8	96.2 $\pm$ 4.9	97.5 $\pm$ 5.6	Benalaxyl	99.0 $\pm$ 3.7	98.6 $\pm$ 6.1	99.3 $\pm$ 3.4
Tolclofos-methyl	100.3 $\pm$ 2.3	97.9 $\pm$ 5.4	98.6 $\pm$ 2.9	Endosulfan sulfate	99.6 $\pm$ 3.8	97.6 $\pm$ 7.3	98.7 $\pm$ 4.2
Alachlor	99.7 $\pm$ 3.1	96.7 $\pm$ 4.9	98.3 $\pm$ 3.2	Nuarimol	101.5 $\pm$ 3.5	98.2 $\pm$ 3.8	101.8 $\pm$ 4.0
Prometryn	98.6 $\pm$ 2.4	95.7 $\pm$ 5.8	97.3 $\pm$ 3.8	Bromopropylate	101.5 $\pm$ 3.1	98.0 $\pm$ 5.3	101.0 $\pm$ 3.1
Terbutryn	98.3 $\pm$ 2.8	95.3 $\pm$ 6.0	95.9 $\pm$ 4.5	Tetradifon	99.9 $\pm$ 2.1	98.0 $\pm$ 4.2	101.1 $\pm$ 5.0
Fenitrothion	99.1 $\pm$ 4.1	97.3 $\pm$ 6.9	98.3 $\pm$ 4.5	$\lambda$ -Cyhalothrin	96.8 $\pm$ 4.1	95.4 $\pm$ 6.4	96.4 $\pm$ 4.6
Pirimiphos-methyl	99.5 $\pm$ 2.8	96.8 $\pm$ 6.2	98.8 $\pm$ 3.8	Fenarimol	100.0 $\pm$ 3.2	98.3 $\pm$ 2.4	101.8 $\pm$ 6.8
Dichlofluanid	98.8 $\pm$ 2.7	96.4 $\pm$ 7.0	98.4 $\pm$ 4.1	Pyrazophos	101.2 $\pm$ 2.9	98.4 $\pm$ 3.3	99.9 $\pm$ 5.0
Aldrin	99.2 $\pm$ 3.2	95.2 $\pm$ 6.4	98.1 $\pm$ 4.9	Coumaphos	100.2 $\pm$ 4.6	97.8 $\pm$ 5.0	100.5 $\pm$ 3.9
Malathion	99.0 $\pm$ 3.1	97.0 $\pm$ 5.8	98.2 $\pm$ 7.0	$\alpha$ -Cypermethrin	97.9 $\pm$ 4.0	97.0 $\pm$ 6.8	98.5 $\pm$ 5.1
Metolachlor	100.8 $\pm$ 4.6	95.2 $\pm$ 6.4	98.1 $\pm$ 4.7	Fluvalinate tau-I	96.5 $\pm$ 4.5	94.9 $\pm$ 7.9	99.1 $\pm$ 4.0
Fenthion	101.0 $\pm$ 4.0	97.5 $\pm$ 6.3	101.8 $\pm$ 4.9	Fluvalinate tau-II	96.6 $\pm$ 4.7	96.4 $\pm$ 7.3	97.6 $\pm$ 2.7
Chlorpyrifos	100.1 $\pm$ 2.9	97.1 $\pm$ 7.2	99.1 $\pm$ 3.9				

<sup>a</sup> Results are the mean of three different juices (orange, grape, and carrot) (four replicates of each juice at each fortification level).

was added prior to the chromatographic analysis. The average recoveries achieved following the proposed method are shown in Table 4. The recoveries obtained for all pesticides were >91% with RSDs <9%.

### 3.2.4. Detection and quantification limits

Blank juice samples were used to determine the detection and quantification limits for each pesticide. The limits of detection (LODs) were established by considering a value three times the background noise of the blank sample at the

retention time of each pesticide, and the limits of quantification (LOQs) were calculated by considering a value 10 times that background noise. Table 3 shows the LODs and LOQs obtained for each pesticide. The LODs achieved with the proposed method are similar to those previously obtained by other authors for pesticides in fruit juices [8,14].

### 3.2.5. Application to real samples

The developed SPE method was applied to the determination of pesticides in commercial juices. Table 5 summarises

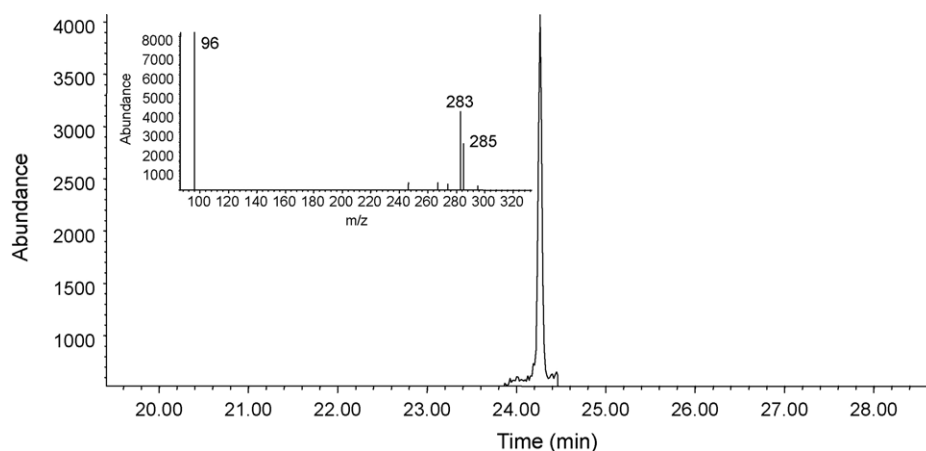


Fig. 3. GC-MS-SIM chromatogram of a commercial peach juice sample that contained procymidone at 3.1  $\mu\text{g/L}$ .

Table 5  
Pesticide levels ( $\mu\text{g/L}$ ) found in juice samples<sup>a</sup>

Sample	Diazinon	Ethion	Procymidone
Orange			
1	ND <sup>b</sup>	0.3	ND
Pineapple			
1	0.5	ND	ND
2	0.5	ND	ND
Apple			
1	0.3	ND	ND
2	0.3	ND	ND
Peach			
1	ND	ND	3.1

<sup>a</sup> A total of 12 juice samples were analysed and six samples (50%) were found to contain at least one of the pesticides studied.

<sup>b</sup> ND: not detected.

the pesticide levels found in 12 juices commercialised in Spain (two different brands of each kind of juice: apple, peach, pineapple, orange, grape and carrot). Six samples (50%) contained at least one of the pesticides studied. The pesticides found were diazinon, ethion, and procymidone. Fig. 3 shows the chromatogram of a commercial peach juice sample that contained 3.1  $\mu\text{g/L}$  of procymidone.

Data on pesticide residues found in fruit juices is rather scarce in the scientific literature. A few insecticides and fungicides have been detected in fruit juices by other authors [12,24] and the levels found are of the same order of those encountered in our study. However, the detected levels are much lower than the MRLs established for these pesticides in fruits and vegetables.

#### 4. Conclusions

A simple and rapid method was developed to determine residues of 50 pesticides in various commercial fruit and vegetable juices. This method involves solid-phase extraction and direct GC analysis without a further clean up step. The GC–MS–SIM analysis showed a high sensitivity and confirmatory power necessary for the determination of pesticide residues at the levels found in juices. The proposed method allowed the simultaneous determination and confirmation of a large number of pesticides with good reproducibility and low detection limits. The developed method was applied to the determination of the studied pesticides in various Spanish juices and diazinon, ethion, and procymidone were the pesticides found, with 50% of the samples containing at least one pesticide.

#### Acknowledgment

Financial aid from INIA (Project RTA01-041) is acknowledged.

#### References

- [1] C.S. Burchat, B.D. Ripley, P.D. Leishman, G.M. Ritcey, Y. Kakuda, G.R. Stephenson, *Food Addit. Contam.* 15 (1998) 61.
- [2] European Community, Brussels (1990) EC Council Directive 90/642/EEC of November 27, 1990 on fixing maximum levels for pesticide residues in and on fruit and vegetables, *Official Journal of European Communities*, L350, 0071.
- [3] J. Aybar, E. Fernández, L.E. García-Ayuso, A. Gonzalez, L. Cuadros-Rodriguez, *Talanta* 60 (2003) 433.
- [4] A. Kaihara, K. Yoshii, Y. Tsumura, Y. Nakamura, S. Ishimitsu, Y. Tonogai, *J. Health Sci.* 46 (2000) 336.
- [5] H. Obana, K. Akutsu, M. Okihashi, S. Kakimoto, S. Hori, *Analyst* 124 (1999) 1159.
- [6] R.M. Garcinuño, L. Ramos, P. Fernández-Hernando, C. Cámara, *J. Chromatogr. A* 1043 (2004) 225.
- [7] M. Khrolenko, P. Dzygiel, P. Wiczorek, *J. Chromatogr. A* 975 (2002) 219.
- [8] S. Topuz, G. Osan, B. Alpertunga, *Food Control.* 16 (2005) 87.
- [9] B. Albero, C. Sánchez-Brunete, J.L. Tadeo, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 6915.
- [10] B. Albero, C. Sánchez-Brunete, J.L. Tadeo, *J. Chromatogr. A* 1007 (2003) 137.
- [11] J.L. Tadeo, C. Sánchez-Brunete, *Chromatographia* 57 (2003) 793.
- [12] D. Perret, A. Gentill, S. Marchese, M. Sergi, G. D'Ascenso, *J. AOAC Int.* 85 (2002) 724.
- [13] D.A. Lambropoulou, T.A. Albanis, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 3359.
- [14] M. Natangelo, S. Tavazzi, E. Benfenati, *Anal. Lett.* 35 (2002) 327.
- [15] C.G. Zamboni, M. Quinto, N. De Vietro, F. Palmisano, *Food Chem.* 86 (2004) 269.
- [16] A. Sannino, M. Bandini, L. Bolzoni, *J. AOAC Int.* 86 (2004) 101.
- [17] S.M.M. Ismail, H.M. Ali, R.A. Habiba, *J. Agric. Food Chem.* 41 (1993) 610.
- [18] M. Oishi, K. Onishi, I. Kano, H. Nakazawa, S. Tanabe, *J. AOAC Int.* 77 (1994) 1293.
- [19] H.G. Bolles, H.E. Dixon-White, R.K. Peterson, J.R. Tomerlin, E.W. Day, G.R. Oliver, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 1817.
- [20] F. Will, E. Kruger, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 858.
- [21] A. Sannino, L. Bolzoni, M. Bandini, *J. Chromatogr. A* 1036 (2004) 161.
- [22] B. Albero, C. Sánchez-Brunete, A. Donoso, J.L. Tadeo, *J. Chromatogr. A* 1043 (2004) 127.
- [23] P.L. Wylie, K. Uchiyama, *J. AOAC Int.* 79 (1996) 571.
- [24] L. Hankin, H.M. Pylypiw Jr., *J. Food Prot.* 54 (1991) 310.

### III. DISCUSIÓN INTEGRADORA

---

## **DISCUSIÓN INTEGRADORA**

El trabajo de investigación recogido en esta memoria se ha enfocado en el desarrollo de métodos analíticos más rápidos y sencillos que los existentes hasta el momento, aplicando nuevas técnicas de preparación de muestras en dos matrices de características distintas, como son la miel y los zumos, para la determinación de residuos de pesticidas en los dos tipos de alimentos citados.

La primera parte de esta memoria, el Capítulo I, se centró en el desarrollo de distintos métodos analíticos para determinar pesticidas y contaminantes orgánicos en la miel, mientras que la segunda parte de la misma, el Capítulo II, se enfocó en la puesta a punto de la metodología analítica que permitiera determinar pesticidas en zumos de frutas y hortalizas.

A continuación, se va a discutir la metodología analítica empleada en cada una de las partes de la presente memoria.

### **DESARROLLO DE MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS DE RESIDUOS DE PESTICIDAS Y OTROS CONTAMINANTES ORGÁNICOS EN LA MIEL**

Según la Directiva 2001/110/CE, “la miel tiene que estar exenta, en la medida de lo posible, de materias orgánicas e inorgánicas ajenas a su composición”. El uso de pesticidas en cultivos próximos a las colmenas o en las propias colmenas para combatir plagas, así como el tratamiento de las abejas con antibióticos pueden contaminar la miel y aparecer residuos en la misma. Otra potencial fuente de residuos ajenos a la miel es la presencia de contaminantes en el medio ambiente como los PCBs y los PAHs. El desarrollo de métodos que permitan determinar de forma rápida y precisa la presencia de contaminantes orgánicos en la miel es muy importante para proteger la salud de los consumidores.

La mayoría de los métodos desarrollados para la determinación de pesticidas en la miel hasta el momento de iniciar este trabajo de investigación, se habían basado en la utilización de la extracción líquido-líquido empleando grandes cantidades de disolventes no miscibles con el agua, como el hexano, seguida de una posterior purificación de los extractos mediante el uso de adsorbentes, o del aislamiento de los analitos empleando la cromatografía en capa fina. Aunque también se habían desarrollado métodos para analizar pesticidas en la miel usando la extracción con fluidos supercríticos y la SPME con buenos resultados. Los pesticidas organoclorados y los organofosforados han sido los compuestos que más se han estudiado en la miel debido a su aplicación en los cultivos, junto con los acaricidas, ya que éstos se emplean para tratar las colmenas.

En el primer trabajo presentado se eligieron acaricidas e insecticidas pertenecientes a distintas familias químicas. Entre los compuestos elegidos se encontraban el bromopropilato y el fluvalinato debido a que han sido ampliamente aplicados en las colmenas para prevenir y controlar el ataque del ácaro *Varroa jacobsoni* que puede provocar grandes pérdidas en las colmenas.

Como técnica de extracción se optó por la MSPD porque permite la extracción y purificación de muestras sólidas o viscosas, como es el caso de la miel, empleando disolventes orgánicos en una cantidad mucho menor que los métodos clásicos de extracción. La optimización de los parámetros involucrados en el proceso extractivo como la naturaleza y cantidad del adsorbente, la cantidad de muestra, así como la naturaleza y volumen del disolvente, se llevó a cabo con muestras de miel enriquecidas. Se prepararon extractos control para comprobar la ausencia de interferencias que pudieran influir en los ensayos de recuperación.

Aunque, en general, se obtuvieron buenas recuperaciones para los compuestos organoclorados y los organofosforados, éstas eran más bajas para los piretroides y los acaricidas bromopropilato y tetradifon. Se llevaron a cabo ensayos para observar el efecto de la sonicación en la extracción y se comprobó que las recuperaciones mejoraban cuando la extracción era asistida por la acción de la radiación de ultrasonidos.

Esta técnica extractiva permite determinar los compuestos elegidos de una forma rápida al no ser necesaria una etapa posterior de limpieza en una matriz tan compleja como es la miel. El método desarrollado se empleó para la determinación de mieles españolas de diferente origen botánico y no se encontraron residuos de los pesticidas estudiados a niveles por encima de sus límites de detección.

En el siguiente trabajo se eligió otro grupo de insecticidas, la mayoría compuestos organofosforados, porque se utilizan frecuentemente para controlar plagas en cultivos de frutales y en viñedos que pueden ser la fuente de néctar que recolecten las abejas para producir la miel y algunos están considerados como dañinos o tóxicos para éstas y otros insectos beneficiosos. La determinación en este caso se realizó empleando un detector de nitrógeno-fósforo debido a la estructura química de los pesticidas elegidos.

El método de extracción se basó en el trabajo anterior optimizándolo para los compuestos objeto de estudio. En primer lugar, se incrementó la cantidad de muestra un 50% para obtener niveles de concentración más bajos sin que afectara al proceso extractivo. Además se tuvo que trabajar con columnas de vidrio en lugar de las de polipropileno para evitar las interferencias debidas al material de las columnas.

La extracción se llevó a cabo con la misma mezcla de hexano y acetato de etilo utilizada en el trabajo anterior. No obstante, las recuperaciones obtenidas no eran buenas para dos de los compuestos, el pirimicarb y el amitraz. Las recuperaciones algo bajas de estos pesticidas se podían deber a que el primero es un compuesto muy soluble en agua pero no tanto en disolventes orgánicos mientras que el amitraz se degrada con el tiempo en función de la temperatura y el pH de la solución. Al aumentar la polaridad del disolvente de extracción mejoraban las recuperaciones de estos compuestos, pero los extractos eran más sucios ya que se co-extraían sustancias que antes quedaban retenidas en la fase sólida, por lo que se eligió la mezcla de disolventes indicada anteriormente.

Una mejora respecto al trabajo anterior fue la utilización de la espectrometría de masas para confirmar la identidad de los residuos. El método se aplicó a muestras de mieles españolas y tampoco se detectaron residuos de estos insecticidas por encima de sus límites de detección.

A la vista de los buenos resultados obtenidos con la técnica de extracción basada en la MSPD para determinar pesticidas en miel, se pensó que sería interesante emplearla para analizar otros contaminantes orgánicos en esta matriz. Se eligieron los PAHs por su potencial presencia en la miel, ya sea por causas naturales como antropogénicas. Aunque la preparación de la muestra para su posterior análisis cromatográfico es la misma que la empleada en el trabajo anterior, se probaron distintos disolventes de extracción con el fin de conseguir los mejores resultados. Los resultados obtenidos indicaron que la mezcla hexano-acetato de etilo, empleada en los trabajos anteriores, era la mejor, sobre todo, en el caso de los compuestos de mayor peso molecular.

En el análisis cromatográfico, se eligió la espectrometría de masas como sistema de detección porque permite la cuantificación de los residuos y la confirmación de su identidad. La débil fragmentación de los PAHs da como resultado espectros donde el principal y más abundante ion es el ion molecular por lo que se seleccionaron éstos para trabajar en el modo SIM. La limpieza de los extractos junto con la selectividad y la sensibilidad de la GC-MS permitieron la determinación de residuos de estos compuestos a nivel de trazas. En este caso, tampoco se hallaron residuos de estos compuestos cuando se analizaron muestras de miel española de distinto origen botánico y geográfico.

Por último, se decidió desarrollar un método multiresiduo que permitiera analizar más de cincuenta pesticidas simultáneamente. El desarrollo de métodos multiresiduos, en los que se determina un número de compuestos lo más amplio posible, es muy importante en los programas de vigilancia de seguridad alimentaria, ya que en un único análisis se pueden detectar residuos de una gran variedad de compuestos, lo que permite actuar rápidamente en el caso de alerta. En un principio, se ensayó la utilización de la MSPD en el proceso de extracción

debido a los buenos resultados obtenidos en los trabajos anteriores, pero al trabajar con un elevado número de pesticidas no se consiguieron límites de detección aceptables. Por este motivo se decidió emplear la extracción en fase sólida como método alternativo.

A diferencia de los trabajos anteriores, en este caso se emplearon extractos de miel enriquecidos como patrones de cuantificación debido al acusado efecto matriz observado, en vez de patrones preparados con disolventes puros. El efecto matriz mejora la transferencia de los compuestos desde el inyector a la columna lo que se traduce en un incremento en la respuesta cromatográfica de los compuestos. Además de trabajar con este tipo de patrones se utilizó un patrón interno para contrarrestar las posibles variaciones en el tiempo de retención y el área de los picos de los compuestos.

La determinación se llevó a cabo empleando la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas en el modo SIM, como en el análisis de los PAHs, por la selectividad y sensibilidad de la técnica así como por la posibilidad de confirmar la identidad de los residuos, que es especialmente importante cuando se analizan muestras reales de miel.

El método desarrollado se aplicó al análisis de distintas mieles españolas y en el 64% de las muestras se hallaron residuos de al menos uno de los compuestos estudiados. Los pesticidas encontrados fueron dos herbicidas, la etalfluralina y el triatato, y un fungicida, el diclofluanid. Estos compuestos tienen una apreciable presión de vapor, lo que favorece su distribución medioambiental y puede explicar su presencia en las mieles estudiadas.

## **DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN ZUMOS DE FRUTAS Y HORTALIZAS**

Hasta el año 2002 apenas se habían publicado trabajos de investigación sobre métodos analíticos para determinar residuos de pesticidas en los zumos de frutas. Los trabajos que habían sido publicados, con anterioridad al inicio de este

trabajo, se centraban en el estudio de fungicidas como el tiabendazol, de insecticidas organofosforados y piretroides y de herbicidas del grupo de las triazinas.

En el primer trabajo se decidió desarrollar un método analítico para determinar residuos de pesticidas organofosforados en distintos zumos de frutas. La presencia de residuos de etion, clorpirifos, fosmet y azinfos-metil en zumos de naranja brasileños y estadounidenses así como residuos de metidation en otros tipos de zumos fue el motivo por el cual se optó por este grupo de pesticidas. Al igual que en el trabajo donde se estudiaron insecticidas organofosforados en la miel, la determinación se llevó a cabo con un detector selectivo como el NPD y la confirmación se hizo mediante cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas en el modo SIM. En este caso se emplearon extractos enriquecidos como patrones de cuantificación como en el último trabajo presentado en el Capítulo I debido al efecto matriz anteriormente comentado.

Se eligió la MSPD como técnica de extracción y se optimizó teniendo en cuenta el material de la columna, el adsorbente, el disolvente de extracción y la influencia de la sonicación en los ensayos de recuperación. Una vez puesto a punto el método, éste se empleó para el análisis de distintos zumos de frutas encontrándose residuos en el 95% de las muestras, aunque los niveles eran muy bajos y muy inferiores a los LMR establecidos para estos pesticidas en las frutas.

A raíz de los buenos resultados obtenidos en la recuperación de pesticidas organofosforados se planteó la posibilidad de aplicar este método para determinar herbicidas en zumos de uva y hortalizas, ya que son los pesticidas más empleados en la actualidad en dichos cultivos. En este segundo trabajo, la preparación de la muestra para su análisis cromatográfico es igual que la del trabajo donde se determinaron nueve pesticidas organofosforados en zumos de fruta, si bien se eligió emplear la espectrometría de masas como método de determinación en vez de emplear detectores como el ECD y el NPD, por la posibilidad de confirmar simultáneamente los residuos encontrados en los zumos. En este trabajo se estudió el efecto de la matriz en la respuesta cromatográfica y, al igual que en el

trabajo anterior, se observó un claro aumento de la respuesta cuando se utilizaban patrones preparados con extractos enriquecidos frente aquellos hechos con disolventes puros, por lo que se emplearon los extractos de muestra enriquecidos como patrones de cuantificación.

Se analizaron diversas muestras de zumos de hortalizas y uva de distintas marcas comerciales, y en este caso, a diferencia de los pesticidas organofosforados en los zumos de frutas, no se encontraron residuos de herbicidas a niveles por encima de sus límites de detección (LOD).

En el siguiente trabajo presentado en esta memoria se llevó a cabo el desarrollo de un método analítico para determinar tiabendazol en naranjas analizando el zumo y la corteza de las mismas. El tiabendazol es un fungicida sistémico empleado para conservar las naranjas y otros cítricos durante su almacenamiento y su comercialización. Después de la aplicación de este compuesto, una cierta cantidad del mismo puede quedar retenida en el fruto y pasar a la parte comestible contaminándola. Además de poner a punto un método para determinar tiabendazol, se estudió el efecto del lavado y el almacenamiento de las naranjas sobre los niveles de residuos de tiabendazol, por su posible influencia en la preparación doméstica de zumo de naranja.

Al igual que en la mayoría de los trabajos presentados en esta memoria se eligió la MSPD para preparar las muestras aunque en este caso se utilizó la alúmina como adsorbente en vez de Florisil porque las recuperaciones eran mucho mejores. En la determinación se empleó la cromatografía de líquidos con detección por fluorescencia debido a la estructura química del tiabendazol. Los niveles de tiabendazol en el zumo de naranja son, en general, del orden de  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , sin embargo nuestro método sólo permitía cuantificar hasta  $20 \mu\text{g}/\text{kg}$  por lo que era necesario realizar una purificación posterior para reducir al máximo las posibles interferencias debidas a la matriz. En este caso, se llevó a cabo una purificación mediante SPE utilizando un adsorbente de intercambio catiónico, lo que permitió establecer un LOQ de  $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ . La confirmación se llevó a cabo empleando la SPME en los extractos preparados para su análisis por HPLC para luego realizar la

desorción de la fibra en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas.

En la segunda parte del trabajo, se estudió el efecto del lavado y el almacenamiento en los niveles de residuos encontrados en el zumo y la corteza de naranja. Se observó una clara reducción en los niveles de tiabendazol en la corteza cuando se lavaban o se almacenaban durante tres meses, no obstante en el zumo los niveles de residuos son muy similares, aunque son algo inferiores en los procedentes de fruta fresca.

Por último, se desarrolló un método multirresiduo para determinar más de cincuenta pesticidas en los zumos de fruta, basándonos en el método multirresiduo presentado en el Capítulo I de esta memoria en el que la extracción se realiza empleando SPE con C<sub>18</sub> como adsorbente. En el caso de los zumos, al ser soluciones acuosas, no es necesario disolver la muestra como en el caso de la miel, pero el resto del procedimiento es análogo en las dos matrices.

Se analizaron muestras de zumos de distintas frutas y en la mitad de las muestras se detectaron residuos de al menos uno de los pesticidas estudiados aunque a niveles muy bajos, claramente por debajo de los LMR, lo que no supone un riesgo para los consumidores.

## **IV. CONCLUSIONES**

---

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la investigación recogida en esta memoria han permitido conseguir los objetivos principales de esta Tesis, relativos al desarrollo de metodología analítica aplicada a la determinación de pesticidas y otros contaminantes orgánicos en dos matrices claramente distintas, como son la miel y los zumos de frutas. A continuación, se resumen las conclusiones más relevantes de los trabajos realizados en esta investigación.

### CAPÍTULO I

#### 1. Determinación de pesticidas en la miel mediante MSPD y GC-ECD

- La extracción empleando MSPD permite obtener extractos muy limpios, por lo que no es necesaria una posterior etapa de purificación, reduciéndose el tiempo del análisis, el empleo de disolventes y material de vidrio evitándose las posibles pérdidas de los analitos que se originarían al incrementar el número de etapas del proceso de preparación de la muestra.
- La utilización de la radiación de ultrasonidos en el proceso extractivo permite obtener mejores resultados en los ensayos de recuperación con un efecto más acusado en los piretroides y en el endosulfan sulfato.
- El uso en la extracción mediante MSPD de un agente desecante como el sulfato sódico junto con el adsorbente Florisil evita la aparición de dos fases en los extractos debido al contenido acuoso de la miel, que es muy variable y depende de una serie de factores como son el origen floral y la localización geográfica de las colmenas.
- La ausencia de interferencias en el análisis cromatográfico de los extractos obtenidos por MSPD ha permitido conseguir límites de detección del orden de  $\mu\text{g}/\text{kg}$  empleando un detector selectivo como el de captura de electrones.

## 2. Análisis de insecticidas en la miel mediante MSPD y GC-NPD

- El método analítico desarrollado, basado en el empleo de la MSPD, permite la determinación simultánea de catorce insecticidas de forma sencilla y rápida minimizando el consumo de disolventes orgánicos.
- El amitraz es el pesticida que presenta la recuperación más baja en las muestras de miel, en comparación con el resto de compuestos estudiados, debido a su labilidad.
- El empleo del detector NPD permitió conseguir límites de detección en torno a los 10 µg/kg y mediante la espectrometría de masas en el modo SIM se pudo confirmar la identidad de los residuos en los extractos de miel.

## 3. Determinación de PAHs en la miel mediante MSPD y GC-MS

- La determinación de dieciséis PAHs en la miel se llevó a cabo con fiabilidad empleando el método de extracción desarrollado para la determinación de insecticidas presentado en el trabajo anterior. Por consiguiente, la MSPD es una buena alternativa a otras técnicas de extracción usadas para la determinación de PAHs en otros alimentos, como la extracción Soxhlet y la extracción líquido-líquido.
- La recuperación de los PAHs de mayor peso molecular es más baja probablemente debido a su mayor adsorción en el Florisil o su menor solubilidad en el disolvente.
- La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas en modo SIM seleccionando básicamente los iones moleculares permitió realizar de forma simultánea la cuantificación y la confirmación de la identidad de los residuos, con límites de detección próximos a 1 µg/kg.

## 4. Análisis de pesticidas en la miel mediante SPE y GC-MS

- Se ha desarrollado un método rápido y sensible para determinar más de cincuenta pesticidas pertenecientes a distintos grupos en un solo análisis basado

en la SPE y GC-MS sin la necesidad de una etapa de purificación adicional de los extractos.

- La cuantificación se ha realizado con patrones preparados en extractos enriquecidos debido al incremento observado en la respuesta cromatográfica por el efecto matriz, que puede explicarse por una mejor la transferencia de los analitos del inyector a la columna.

- El método propuesto se aplicó al análisis de once muestras de miel y se detectaron residuos de tres pesticidas (diclofluanid, etalfluralina y trialato) en el 64% de las muestras.

## **CAPÍTULO II**

### **1. Determinación de pesticidas organofosforados en zumos de frutas mediante MSPD y GC-NPD**

- El análisis simultáneo de nueve pesticidas organofosforados en zumos de frutas se llevó a cabo con buenos resultados empleando la MSPD en la preparación de la muestra y la cromatografía de gases con NPD en la determinación.

- Los límites de cuantificación y de detección conseguidos con este método permiten su aplicación para detectar residuos de pesticidas en zumos comerciales, que por lo general se encuentran a nivel de trazas. La cuantificación se realizó con extractos enriquecidos para contrarrestar el efecto matriz, obteniéndose unos límites de cuantificación entre 0,3 y 2 µg/kg.

- En la mayoría de los zumos analizados se hallaron residuos de al menos uno de los pesticidas estudiados, aunque los niveles encontrados fueron muy bajos, inferiores a 6 µg/kg.

## **2. Determinación de herbicidas en los zumos mediante MSPD y GC-MS**

- El método de extracción por MSPD desarrollado para determinar pesticidas organofosforados es también aplicable a la determinación de los herbicidas en zumos de frutas y hortalizas, siendo buenos los resultados obtenidos.
- El análisis de las muestras mediante la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas en el modo SIM permite obtener unos límites de detección en torno a 1 µg/kg.
- La cuantificación se llevó a cabo con extractos enriquecidos debido al efecto matriz observado.

## **3. Determinación de tiabendazol en naranjas mediante MSPD y HPLC-FLD**

- Se ha desarrollado un método rápido, basado en la MSPD, para determinar residuos de tiabendazol en zumo y corteza de naranja mediante análisis por HPLC con detector de fluorescencia.
- La necesidad de conseguir límites de cuantificación lo suficientemente bajos, en torno a 1 µg/kg, ha obligado a realizar una posterior purificación de los extractos, sobre todo en el caso de los zumos, utilizando cartuchos de SPE con un adsorbente de intercambio catiónico.
- Los residuos hallados pueden confirmarse utilizando la SPME para la extracción del tiabendazol de los extractos y su posterior análisis por GC-MS.
- El lavado y el almacenamiento de las naranjas favorece la eliminación de la mayor parte de los residuos de tiabendazol de la corteza aunque es poco importante su efecto en los niveles de tiabendazol en el zumo.
- La mayor parte del tiabendazol, más del 95%, se encuentra en la corteza del fruto tratado, mientras que las concentraciones encontradas en el zumo están en torno a 10 µg/kg.

#### **4. Método multiresiduo para determinar pesticidas en los zumos mediante SPE y GC-MS**

- Se ha desarrollado un método sencillo y rápido, basado en SPE, que permite la determinación de más de cincuenta pesticidas mediante GC-MS sin la necesidad de una etapa adicional de limpieza de los extractos.
- El límite de detección conseguido para los distintos compuestos es inferior a 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y se han utilizado extractos enriquecidos para contrarrestar el efecto matriz.
- En la mitad de las muestras analizadas se hallaron residuos de al menos uno de los siguientes pesticidas: diazinon, etion y procimidona. Los niveles encontrados fueron muy bajos, inferiores a los 3,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

**V. ANEXO**

---

## GLOSARIO DE TÉRMINOS

AOAC	Asociación oficial de químicos analíticos
ArfD	Dosis de referencia aguda
ASE	Extracción acelerada con disolventes
CCAH	Comité científico de la alimentación humana
DAD	Detector de diodos en fila
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DI	Inmersión directa
DL <sub>50</sub>	Dosis letal mínima
DVB	Divinilbenceno
ECD	Detector de captura electrónica
EI	Impacto electrónico
EE.UU.	Estados Unidos
EPA	Agencia para la Protección del Medio Ambiente
EPTC	Dipropiltiocarbamato de S-etilo,
FAO	Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas
FLD	Detector de fluorescencia
GC	Cromatografía de gases
GC-MS	Cromatografía de gases-Espectrometría de masas
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficacia
HPLC-MS	Cromatografía de líquidos- Espectrometría de masas
HS	Espacio de cabeza
IDA	Ingesta diaria admisible
Kow	Coeficiente de partición octanol-agua
LC	Cromatografía de líquidos
LLE	Extracción líquido-líquido
LMRs	Límites máximos de residuos
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación

LVI	Inyección de grandes volúmenes
MAE	Extracción asistida por microondas
MIP	Polímero de impresión molecular
MS	Espectrometría de masas
MSPD	Dispersión de la matriz en fase sólida
NOEL	Nivel sin Efecto Observable
NPD	Detector de nitrógeno-fósforo
OMS	Organización Mundial de la Salud
PA	Poliacrilato
PAHs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
PBDEs	Polibromodifeniléteres
PCBs	Policlorobifenilos
PCDD	Policlorodibenzo-p-dioxinas
PCDF	Policlorodibenzofuranos
PDMS	Polidimetilsiloxano
PLE	Extracción con líquidos presurizados
PRS	Ácido propilsulfónico
PTV	Vaporización con temperatura programada
PVC	Cloruro de polivinilo
SBSE	Extracción mediante barra de agitación
SFC	Cromatografía con fluidos supercríticos
SFE	Extracción con fluido supercrítico
SIM	Monitorización de iones seleccionados
SPE	Extracción en fase sólida
SPME	Microextracción en fase sólida
TID	Detector termoiónico
UE	Unión Europea
US-EPA	Agencia para la Protección del Medio Ambiente de los Estados Unidos
UV	Ultravioleta
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético