



**Universidad de Valladolid**

# Determinación de tiametoxam, clotianidina e imidacloprida y metabolitos en miel

**Deamelys Hernández Domínguez**

**Máster de Técnicas Avanzadas en Química  
Curso 2013-2014  
Departamento de Química Analítica  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Valladolid**



**Universidad de Valladolid**

Departamento de  
Química Analítica



M<sup>a</sup>. Teresa Martín Gómez, Profesora-Investigadora del " Programa Ramón Y Cajal" en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Valladolid, como TUTORA del trabajo " Determinación de Tiametoxam, clotianidina e imidacloprida y metabolitos en miel", realizado por Dña. Deamelys Hernández Domínguez, Licenciada en Químicas por la Universidad de la Habana (Cuba),

INFORMA QUE:

Dicho trabajo ha sido realizado en el CINQUIMA dentro del Grupo TESEA que pertenece al Departamento de Química Analítica de la Universidad de Valladolid. Que la alumna Deamelys Hernández Domínguez, ha realizado el trabajo satisfactoriamente y con dedicación, demostrando poseer una gran cualificación y capacidad de trabajo y de análisis. POR LO QUE CONLUYO que: El trabajo se encuentra plenamente integrado dentro de los objetivos que se pretenden en el Máster de Técnicas Avanzadas en Química. Tanto el tema del trabajo como los aspectos científicos desarrollados en el mismo reúnen las condiciones para ser defendidos ante el correspondiente tribunal, como Trabajo Fin de Máster.

Valladolid, 30 de Junio de 2014

Fdo. M<sup>a</sup> Teresa Martín Gómez



*A Bárbaro Domínguez Bernal y a Martha Faba Gómez.*

Esta investigación ha sido llevada a cabo en el instituto *CINQUIMA* (Parque Científico de la Universidad de Valladolid) bajo la dirección de las Dras. M<sup>a</sup> Teresa Martín Gómez y Laura Sánchez Hernández a quienes agradezco por los conocimientos y el tiempo brindado.

Quisiera agradecer además al profesor José Luis Bernal por acogerme en su grupo de investigación. A la profesora Laura Toribio y a mi amiga Pily por hacer que mi estancia en España fuera muy agradable.

*Para la realización de la investigación recogida en esta memoria se ha contado con la ayuda económica aportada por el Ministerio de Economía y Competitividad-INIA en el proyecto RTA-2013-00042-CLO-03 a quienes expresamos nuestro agradecimiento.*

<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS Y OBJETIVOS</b>	3
<b>PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS</b>	14
1. INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS	14
1.1 Equipo Cromatográfico	14
1.2 Material Adicional	19
1.3 Reactivos y Disolventes	19
2. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS	20
2.1 Condiciones del Detector de Masas	20
2.2 Condiciones Cromatográficas	21
2.2.1 Resumen de las condiciones cromatográficas	21
3. TRATAMIENTO DE MUESTRA	23
3.1 Extracción en fase sólida	24
3.2 Etapa de lavado	25
3.3 Etapa de elución	26
4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO	29
4.1 Selectividad	29
4.2 Efecto matriz	31
4.3 Linealidad, límite de detección y de cuantificación	32
4.4 Porcentajes de recuperación	33
4.5 Precisión	34
<b>APLICACIÓN DEL MÉTODO</b>	36
1. ANÁLISIS DEL TIAMETOXAM Y SUS METABOLITOS	37
2. ANÁLISIS DE LA IMIDACLOPRIDA Y SUS METABOLITOS	42
3. ANÁLISIS DE LA CLOTIANIDINA Y SUS METABOLITOS	46
<b>CONCLUSIONES</b>	51
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	52

## INTRODUCCION

Las abejas y otros insectos polinizadores juegan un papel crucial en la producción de alimentos, ya que alrededor de un tercio de los cultivos alimentarios del mundo dependen directamente de la polinización natural de las abejas y otros insectos. A ello debe añadirse su función de mantenimiento de la biodiversidad, el asentamiento de población en zonas desfavorecidas y otros muchos aspectos beneficiados por la presencia de abejas.

Lamentablemente y desde comienzos de esta centuria se ha apreciado a nivel mundial una notable y creciente disminución del número de individuos y colmenas. Este fenómeno, conocido como “Trastorno del Colapso de las Colmenas”, ha dado origen a una gran preocupación socioeconómica y medioambiental, habiéndose propuesto numerosos estudios y dado numerosas opiniones para explicarlo y, en su caso, tratar de revertir la situación que realmente es alarmante. Este tipo de situaciones propicia la aparición de diversas teorías con bandos muy enfrentados. Hoy en día se admite por los científicos que es un fenómeno multifactorial entre los que se destaca la exposición de las abejas a pesticidas sistémicos como la imidacloprida así como a distintas infecciones que afectan a estos insectos, siendo el más destacado el microsporidio *Nosema ceranae*; indicándose en este caso que aparece un efecto sinérgico entre ambos factores que conduce a un estado inmunodepresivo de los insectos implica una muerte masiva de abejas melíferas. Obviamente existen otros factores a tener en cuenta entre los que conviene destacar el tratamiento y manipulación inadecuada de las colmenas, al que no suele dársele importancia por razones poco convincentes o poco convenientes.

Ante esa situación alarmante hay una explicación que goza de numerosos adeptos: achacar el efecto a los plaguicidas y en especial a los nuevos insecticidas derivados de la nicotina, los neonicotenoïdes. El movimiento ha provocado que la Unión Europea, en Julio de 2013, haya suspendido cautelarmente el uso de semillas tratadas tanto con fipronil como con imidacloprida, tiametoxam y clotianidina, regulación que entró en vigor a finales de 2013.

Obviamente para comprobar la incidencia de este factor debe disponerse de una metodología analítica que permita el conocimiento de la cantidad de residuos posibles en los productos apícolas. Nosotros nos hemos centrado en la miel, producto principal de la colmena. En este trabajo y en colaboración con el Centro Apícola Regional (CAR) de Guadalajara, se han analizado residuos de los tres neonicotenoïdes cuyo uso ha sido suspendido, así como, de sus posibles metabolitos en muestras de mieles procedentes de colmenas situadas en campos de maiz y girasol cuyas semillas habían sido tratadas.

Para todo ello se ha desarrollado un método de análisis, partiendo de trabajos realizados con anterioridad por el Grupo de Investigación Tesea, para la determinación de tiametoxam, imidacloprida y clotianidina en mieles de distintos orígenes florales, y su posterior aplicación a muestras procedentes del CAR. Se ha establecido una metodología analítica para la identificación de posibles metabolitos de los compuestos de interés.

## ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Los neonicotinoides son una familia de insecticidas sintéticos relativamente nuevos [1], que se derivan de la nicotina la cual ha sido ampliamente usada como insecticida por más de 200 años. El uso de la nicotina con este fin tiene la inconveniencia de que es rápidamente degradada y por esto es que se diseñan los neonicotinoides que presentan una mayor permanencia (excepto el dinofuran).

Los neonicotinoides son ampliamente utilizados en el tratamiento de semillas, suelos y también en tratamientos foliares en cultivos como cereales, algodón, granos, leguminosas, patatas, arroz y vegetales. Se caracterizan por presentar una particular efectividad contra insectos chupadores y además por un efecto residual largo. Las tasas de aplicación de insecticidas neonicotinoides es mucho menor que las de insecticidas más antiguos, tradicionalmente usados precisamente por su mayor efecto residual [2].

Los neonicotinoides se distinguen por su modo de acción, ellos actúan sobre el sistema nervioso central, específicamente sobre el receptor de acetilcolina nicotínico post-sináptico de los insectos, causándoles en pocas horas la parálisis por interrupción de los impulsos nerviosos y posteriormente la muerte [3]. Sin embargo son mucho menos tóxicos para los mamíferos debido a que los neonicotinoides bloquean una ruta neuronal específica que es más abundante en insectos que en mamíferos de sangre caliente, estos insecticidas son por tanto selectivos a los insectos frente a los mamíferos [4], son clasificados por la *Agencia de Protección Ambiental* norteamericana (EPA siglas en inglés) según su toxicidad como: tóxicos de tipo II o tipo III.

Uno de los grupos de pesticidas que más interés ha generado los últimos veinte años y ha sido señalado como uno de los principales factores responsables de lo que se

denominó *trastorno de despoblamiento de las colmenas* (Colony Collapse Disorder CCD por sus siglas en inglés) ha sido la familia de los neonicotinoides. El CCD se ha tornado un serio problema medioambiental y una pérdida significativa para la economía, porque muchos cultivos agrícolas, en diferentes partes del mundo, son polinizados por abejas y las pérdidas en la apicultura son cuantiosas, un grave problema de cuya solución dependía la apicultura mundial y con ello la supervivencia de muchos cultivos que sin las abejas no serían viables (**Figura 1**).

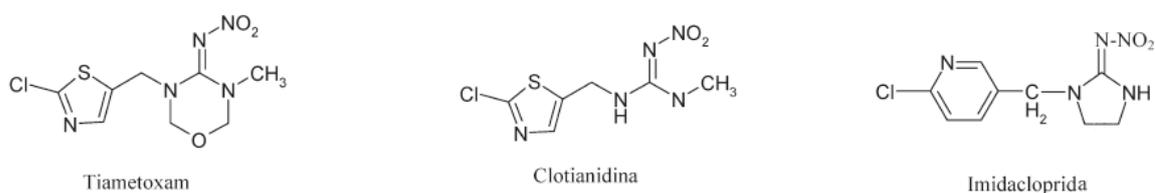


**Figura 1:** Síndrome de despoblamiento de las colmenas

El aumento en el uso de neonicotinoides tales como: Tiametoxam, Clotianidina e Imidacloprida, ha coincidido con el aumento de muertes de abejas desde 2005. Estudios sugieren que residuos de estas sustancias pueden acumularse en el polen, cera y néctar de las plantas que han sido tratadas lo que representa un riesgo para el polinizador [2]. En 2012, varios estudios fueron publicados que muestran que los neonicotinoides tuvieron rutas previamente no detectadas de exposición que afectaron a las abejas, incluyendo a través del polvo, polen y néctar, y las abejas morían en el campo sin regresar a la colmena quedando esta despoblada siendo este el principal

síntoma del CCD. Estudios formales en 2013 provocaron una revisión por parte de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria la cual concluyo que algunos neonicotinoides plantean un riesgo inaceptablemente alto para las abejas [5].

Los neonicotinoides tiametoxam, clotianidina e imidacloprida son moléculas muy polares, solubles en agua y poco volátiles (**Figura 2**) [6, 7]. La **Tabla 1** muestra diferentes propiedades físicas y químicas de estos tres compuestos, encontradas en diferentes manuales de uso de pesticidas.



**Figura 2:** Estructura de los neonicotinoides tiametoxam, clotianidina e imidacloprida.

**Tabla 1:** Masa molecular, temperatura de fusión, presión de vapor, solubilidad en H<sub>2</sub>O y coeficiente de reparto de los analitos en n-octanol y agua [log (P<sub>ow</sub>)] del tiametoxam, clotianidina e imidacloprida.

Compuesto	M(x)g/ mol	T. fusión °C	Presión de vapor (Pa) 20°C	Solubilidad en H <sub>2</sub> O (g/L) 20°C	log (P <sub>ow</sub> ) 25 °C
Tiametoxam	291.5	138 - 140	2.7 x 10 <sup>-9</sup>	4.10	- 0.13
Clotianidina	249.7	176 - 178	5.7 x 10 <sup>-8</sup>	0.27	1.05
Imidacloprida	255.7	136 - 143	2.0 x 10 <sup>-7</sup>	0.51	0.57

El metabolismo de los neonicotinoides no solo ha sido descrito en insectos también se ha estudiado en mamíferos como ratones [8] y humanos [9]. En el estudio de la imidacloprida (IMI) se ha detectado que su metabolismo es principalmente hepático donde una enzima nitrorreductasa reduce IMI nitroso (IMI-NO) a IMI amino (-NH<sub>2</sub>), estudios *in Vitro* demuestran que el citocromo P450 también es capaz de reducir la IMI. El resto de nitroguanidina es además un sitio común para el metabolismo de los neonicotinoides a través de la escisión de la guanidina y la reducción a

nitrosoguanidina y aminoguanidina derivados. **La Tabla 2** muestra las masas teóricas de los metabolitos de tiametoxam, clotianidina e imidacloprida encontrados en la bibliografía.

Los neonicotinoides han sido determinados en diversas matrices tales como alimentos (frutas y vegetales entre otros) [10 - 13], suelos [14, 15], cuerpos acuíferos [16, 17], agua de beber [18], insectos [16, 19 ] y en muestras biológicas como orina [20]. Desde que se determinó que el uso de los neonicotinoides es un factor influyente en el despoblamiento de las colmenas se han desarrollado múltiples métodos analíticos para detectar estos insecticidas en matrices de colmena como cera [19, 21], jalea real [22], néctar [19, 23], polen [1; 19, 24] y miel [2, 7, 19, 25].

**Tabla 2:** Masa teórica de los metabolitos del tiametoxam, clotianidina e imidacloprida encontrados en la bibliografía.

Neonicotinoide	Denominación	Masa teórica +H
<b>Tiametoxam</b>	Tiametoxam	292.0307
	TM-1	276.0322
	TM-2	262.0529
	TM-3	247.0420
	TM-4	248.0260
	TM-5	161.0675
	TM-6	116.0824
	TM-7	278.0114
	TM-8	262.0165
	TM-9	248.0373
	TM-10	300.0322
	TM-11	233.0264
	TM-12	234.0104
	TM-13	147.0518
TM-14	102.0667	
<b>Imidacloprida</b>	Imidacloprida	256.0636
	IMI-1	272.0550
	IMI-2	230.0445
	IMI-3	288.0499
	IMI-4	211.0750
	IMI-5	226.0859
	IMI-6	240.0652
	IMI-7	254.0445
	IMI-8	278.0808
	IMI-9	212.0591
IMI-10	131.0569	

<b>Clotianidina</b>	IMI-11	129.0412
	IMI-12	434.1078
	IMI-13	374.1119
	IMI-14	536.1647
	IMI-15	209.0800
	Clothianidina	250.0165
	CM-1	236.0009
	CM-2	191.0158
	CM-3	206.0267
	CM-4	220.0060
	CM-5	258.0216
	CM-6	191.9998
	CM-7	205.0315
	CM-8	220.0423
	CM-9	234.0216
	CM-10	272.0373
	CM-11	206.0155
	CM-12	119.0569
	CM-13	74.0718
	CPM-4	334.0330
CPM-5	285.0545	

La miel es una matriz compleja que presenta en su composición azúcares, agua, aminoácidos y minerales (Ca, Co, Fe, Mn, Mg, Zn, P, K) además de antioxidantes de tipo flavonoides y fenólicos. Los porcentajes de estos componentes vienen determinados por el tipo de miel así como por sus características físicas, químicas y organolépticas. Debido a esta complejidad, los métodos analíticos utilizados para la determinación de sustancias a nivel de trazas en mieles precisan de una etapa previa de limpieza o tratamiento de muestra que permita eliminar de forma selectiva las interferencias. Esto hace que esta etapa se considere una de las más importantes del proceso analítico.

En la bibliografía, se han descrito varias técnicas de tratamiento previo para la extracción de los neonicotinoides en mieles, incluyendo: extracción líquido-líquido (LLE) [26], extracción sólido-líquido (SLE), microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) [27, 28], la extracción en fase sólida (SPE) [12,14], microextracción en fase sólida (SPME) [29], extracción con fluidos supercríticos (SFE) [29], extracción con solventes acelerados (ASE) [26, 30], extracción asistida por microondas (MAE) [31],

ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) [32-33], y el método de extracción QuEChERS (por sus siglas en inglés Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) [1, 2, 34].

Entre ellas la LLE es una técnica sencilla pero laboriosa que generalmente consume grandes cantidades de disolventes orgánicos tóxicos y presenta problemas adicionales como la formación de emulsiones y la necesidad de una etapa adicional de evaporación de disolventes para la concentración de los analitos.

La SLE es un método de extracción sencillo como la LLE pero no presenta los inconvenientes descritos con anterioridad aunque, si suele consumir grandes cantidades de disolventes orgánicos. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en la determinación de neonicotinoides en matrices de colmena como el polen.

Aunque la SPME es una técnica de tratamiento previo bastante eficiente que combina la extracción, preconcentración y desorción de los analitos a partir de matrices gaseosas, acuosas, y sólidas en un paso y no requiere disolventes orgánicos, tiene algunas limitaciones. Por ejemplo, las fibras son frágiles, el recubrimiento de éstas es muy caro presentando en ocasiones efecto de memoria. En esta técnica muchas variables que influyen en la repetibilidad de los resultados como: temperatura, velocidad de agitación, efecto salino, pH y volumen de muestra.

La eficiencia de SFE se ve también afectada por un gran número de parámetros como son: la naturaleza del fluido supercrítico, temperatura, presión, forma de la celda de extracción y el contenido de humedad de la matriz. Esto hace que la optimización del método sea una tarea tediosa y difícil desde el punto de vista práctico y junto con el alto costo del equipamiento, son las principales desventajas de esta técnica.

Los métodos ELISA, ampliamente utilizados en la determinación de diversas sustancias, también han sido utilizados como métodos de pesquisaje en la determinación de neonicotinoides en distintas matrices. Aunque generalmente ELISA es un método rápido de análisis, tiene como desventaja que puede presentarse

reacciones cruzadas con otras sustancias de estructura similar por lo que no es utilizado generalmente como método de confirmación.

En los últimos años la DLLME ha sido introducida en el análisis de insecticidas y ha sido aplicada a muestras de miel. La DLLME se basa en un sistema de disolvente ternario donde se utiliza una mezcla de un disolvente de alta densidad que se utiliza como extractante y un disolvente polar miscible en agua que ejerce la función de dispersante. Los disolventes extractantes utilizados en esta técnica son los orgánicos clorados y los dispersantes suelen ser acetona, metanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano. La mezcla apropiada de disolventes de extracción y dispersante es inyectada rápidamente en la solución acuosa que contiene los analitos. Inmediatamente se forma una turbidez debido a la formación de gotas muy pequeñas dispersas en el seno de la muestra acuosa. El área superficial entre el disolvente de extracción es muy elevada, por lo que el estado de equilibrio se alcanza rápidamente y en consecuencia el tiempo de extracción es muy corto. Sin embargo, este método presenta como inconvenientes la poca selectividad extractiva y el uso de disolventes organoclorados los cuales plantean una amenaza potencial al medio ambiente.

El método de extracción más utilizado en la literatura analizada para la extracción de los neonicotinoides en la miel en los últimos años ha sido el QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe). Este método consta de dos etapas una de extracción y la otra de limpieza. La etapa de extracción utiliza sulfato de magnesio para reducir el contenido de agua de la muestra y el cloruro de sodio para el *salting out* en la mayoría de los casos, además del disolvente extractor. En la etapa de limpieza se somete a la muestra a una SLE o una SPE con carbón grafitizado o con cartuchos C<sub>18</sub> en presencia de aminas primarias/secundarias, quedando la muestra libre de pigmentos, lípidos, esteroides etc. Aunque el método dicese ser rápido, fácil, barato, eficaz, robusto y seguro es un método que consta de dos etapas en la que se utilizan varias sales etc. Y además son necesarias modificaciones del método original para

obtener buenos rendimientos en la extracción de insecticidas en función de la matriz. Utilizando el método QuEChERS para la determinación de neonicotinoides en miel [2], los resultados presentados en cuanto a recuperación, límite de detección y cuantificación fueran del orden de los métodos de SPE descritos [20].

Así la SPE ha mostrado ser un método exitoso para la extracción de analitos de la miel. Se conoce que esta técnica es sencilla y presenta una alta eficiencia en el enriquecimiento de las muestras. Además los disolventes que se utilizan generalmente son baratos [35]. En este tipo de extracción los materiales utilizados como fase sólida juegan un papel fundamental en el enriquecimiento de la muestra. Para la extracción de neonicotinoides se han empleado C<sub>18</sub> [36], gel de sílice [14, 37], Amberlite XAD [38], así como el uso de nanotubos de carbono de pared múltiple [36]. La **Tabla 3** muestra un resumen de las fases sólidas utilizadas en la extracción de neonicotinoides en distintas matrices.

Los métodos basados en SPE como método de extracción – limpieza, han sido llevados a cabo en combinación con la cromatografía como método de separación, tanto gaseosa como líquida. La cromatografía gaseosa tiene el inconveniente de poder ser usada solo para separar compuestos volátiles y térmicamente estables. No obstante, hay técnicas, como la derivatización que son utilizadas para convertir los analitos en volátiles. Esto no se puede llevar a cabo en todos los casos y supone un paso adicional en el tratamiento de la muestra. En la literatura se ha descrito el uso de la cromatografía gaseosa para determinar neonicotinoides después de un proceso de derivatización [39].

**Tabla 3:** Características de los cartuchos más utilizados para la extracción de los neonicotinoides en diferentes matrices.

Matriz	Cartucho SPE	Información de la fase sólida	Referencia
Frutas y vegetales	Extrelut-NT20	Tierras diatomeas hidratadas	[40]
H <sub>2</sub> O	-	polidimetilsiloxano	[41]
H <sub>2</sub> O	LiChrolut EN	Fase polimérica	[20]
Plantas y flores	C <sub>18</sub>	C <sub>18</sub>	[42]
Polen y miel	ChemElut CE	Tierras diatomeas hidratadas	[13]
	Silica gel	(SiOH) <sub>n</sub>	[13]
Polen	ISOLUTE® MFC <sub>18</sub>	C <sub>18</sub>	[14]
Muestras agrícolas	Florisil,	Polipropileno	[14]
	silica gel,	(SiOH) <sub>n</sub>	[14]
	Envi-Carb/NH <sub>2</sub>	Fase reversa e intercambio aniónico	[16]
Miel	Extrelut-NT20	Tierras diatomeas hidratadas	[28]
Orina	Bond Elute PCX	Polímero intercambiador catiónico	[22]

Sin embargo, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica analítica que permite analizar un rango más amplio de tipos de sustancias. Muchos métodos han sido desarrollados para el análisis de neonicotinoides por HPLC acoplado generalmente a detectores tales como: ultravioleta-visible (HPLC-UV), diodos alineados (HPLC-DAD) y/o espectrómetro de masas (HPLC-MS). Aunque también se han descrito métodos de detección electroquímicos como la polarografía [43], y la voltamperometría cíclica [44]. Actualmente HPLC-MS es una de las técnicas más poderosas en el análisis de traza de analitos polares, iónicos y poco volátiles. Por otro lado, ofrece una separación cromatográfica, de los compuestos sin descomposición térmica en combinación con la alta sensibilidad e información estructural sobre los analitos que ofrece el detector de masas.

La separación de los neonicotinoides debido a sus propiedades físicas se ha llevado a cabo en columnas de fase reversa, tales como: C<sub>18</sub> y C<sub>8</sub> [1, 12, 15]. Las fases móviles más utilizadas han sido mezclas de acetonitrilo con disoluciones acuosas de ácido

fórmico [21, 30]. Sin embargo el uso de alcoholes de pequeña y mediana masa molecular (metanol, propanol, n-butanol y n-pentanol) como modificadores orgánicos de la fase móvil han permitido mejorar la separación cromatográfica y disminuir el tiempo de retención de los analitos [45].

Los instrumentos modernos de LC-MS emplean ionización a presión atmosférica (API). Este modo de ionización proporciona una excelente sensibilidad y selectividad que permite el análisis de los analitos de interés a niveles de trazas. Para el análisis de neonicotinoides en matrices de colmena se han encontrado el uso de ionización química a presión atmosférica (APCI) [26] e ionización por electrospray (ESI), siendo la técnica ESI en modo positivo la más utilizada [20, 23, 27]. Además, se ha descrito el empleo de analizadores de masas como el cuadrupolo [23] y la trampa de iones [46] para el análisis de los neonicotinoides y para la identificación de sus metabolitos espectrómetros de masas híbridos como, triple cuadrupolo [1], o cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF) [47].

En este trabajo se plantean los siguientes objetivos.

- ❖ Implementar una metodología rápida y sencilla basada en una extracción en fase sólida y la utilización de LC/MS como método de separación-detección, que permita determinar a nivel de trazas los neonicotinoides tiametoxam, clotianidida e imidacloprida en miel.
- ❖ Analizar con el método implementado muestras de miel recogidas en colmenas cercanas a campos de maíz y girasol tratados con tiametoxam
- ❖ Investigar la presencia de metabolitos del tiametoxam, clotianidina e imidacloprida en las muestras de miel analizadas utilizando UPLC/Q-TOF como método de separación/detección y experimentos MS/MS para su confirmación.

## Parte Experimental

### 1. Instrumentación y Reactivos

#### 1.1 Equipo cromatográfico

Para la determinación de los neonicotinoides en miel, se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución de Agilent Technologies, modelo 1100, acoplado a un espectrómetro de masas de cuadrupolo, el cual está equipado con dos fuentes de ionización que ionizan a presión atmosférica, Electrospray (ESI) e Ionización química (APCI), controlado por un software HP chemstation. Un esquema del equipo es representado en la **Figura 3**.



**Figura 3:** Esquema del equipo de HPLC–MS empleado

Partes del Equipo:

- ✚ Desgasificador: consta de un contenedor de vacío de cuatro canales, que incluye una membrana tubular de plástico y una bomba de vacío. Esta cámara genera un ligero vacío en las cuatro cámaras del contenedor. De esta forma los gases disueltos de la fase móvil quedan eliminados al pasar a través de la membrana.

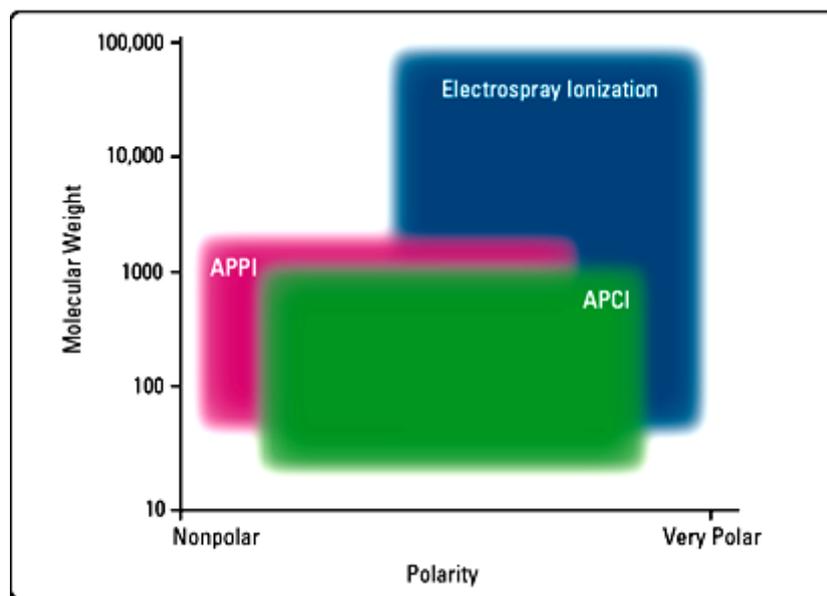
- ✚ Bomba cuaternaria para gradientes: incluye una cabeza de bomba con una válvula de entrada activa con un cartucho y una válvula de salida. Tiene una unidad de amortiguación entre las dos cámaras de los émbolos. Está equipada con un sensor de fuga que cuando se activa produce la desconexión automática del equipo.
- ✚ Muestreador automático controlado electrónicamente: con una bandeja con capacidad de 100 muestras y permite inyectar volúmenes de muestra entre 0.1 – 100  $\mu\text{L}$ .
- ✚ Compartimiento de columna termostataado: sistema Peltier que permite mantener la columna a temperatura constante. El intervalo de trabajo va desde 10 – 80  $^{\circ}\text{C}$ . Presenta altas velocidades de refrigeración y calentamiento lo que permite obtener resultados reproducibles.
- ✚ Detector de masas:
  - Sistema de vacío, el cual consta de una bomba mecánica y dos bombas turbo moleculares enfriadas por aire.
  - Generador de  $\text{N}_2$ , el cual consta de un sistema que transforma el aire comprimido en  $\text{N}_2$  mediante un sistema de filtros y membranas de separación.
  - Sistema de introducción de muestra, desde el HPLC con quien esta acoplado.
  - Sistema de ionización, el equipo puede operar con dos fuentes de ionización a presión atmosférica diferentes: API–electrospray e ionización química a presión atmosférica. Algunas de las características más importantes son:
    - ✓ Auto-calibración y sintonización.
    - ✓ Capacidad multiseñal. Se puede medir en dos modos.

1. Scanning (SCAN): permite monitorear todos los iones dentro del intervalo seleccionado. Útil para la identificación inequívoca de los analitos.

2. Selected Ion Monitoring (SIM): permite monitorear los iones seleccionados. Es más sensible que el modo scan por lo que es el más utilizado para cuantificar.

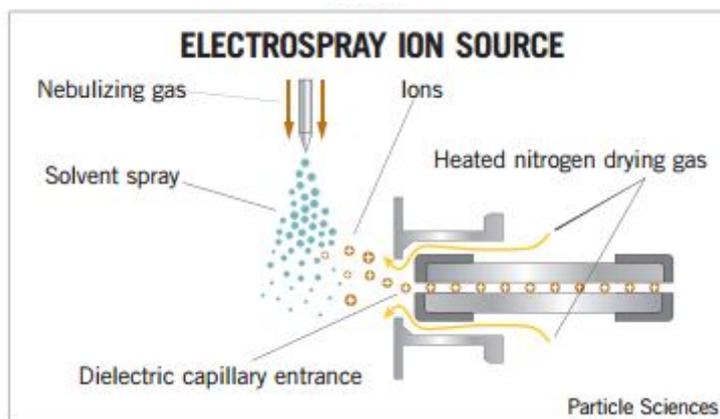
- Analizador cuadrupolar hiperbólico de molibdeno.
- Detector de dínodo de alta energía.

La Ionización a Presión Atmosférica (API) es una técnica de ionización blanda que, al actuar a presión atmosférica, y no en alto vacío como es lo habitual en otras técnicas, consigue un altísimo rendimiento. Como interfase para HPLC, tiene la virtud de aceptar todo el flujo procedente de un cromatógrafo líquido de alta presión convencional, desde 1 a 4 mL/min, lo que incide favorablemente sobre la sensibilidad del proceso. En general, se ioniza la muestra a presión atmosférica, se elimina el disolvente, se ioniza el analito y se trasladan los iones al MS. Además de las fuentes de ionización atmosférica con las que el equipo puede operar (ESI y APCI) existen otras fuentes de este tipo como la APPI. En la **Figura 4** se representa el campo de aplicación de las tres interfases antes mencionadas, y su efectividad en función de la polaridad y del tamaño molecular de los analitos.



**Figura 4:** Campo de aplicación de las fuentes de ionización a presión atmosférica APPI, APCI y ESI.

En la ionización ESI se aplica un voltaje potencial de 3-6 KV entre el capilar de entrada de la muestra y el contraelectrodo. Por efecto del intenso gradiente de campo eléctrico presente, la muestra emerge del capilar de entrada en forma de un aerosol de pequeñas gotas, que adquieren una carga eléctrica muy elevada. Al avanzar estas gotas por la cámara de desolvatación, llega un momento en que su tamaño es tan pequeño, que las fuerzas coulombianas de repulsión entre los iones con múltiple carga generados en su interior son capaces de vencer la tensión superficial, momento en que los iones escapan a la fase gaseosa denominándose a este proceso evaporación iónica. La **Figura 5** muestra esquemáticamente la formación de los iones en esta fuente.



**Figura 5:** esquema de la formación de iones en la fuente ESI.

Para la separación de iones con diversas relaciones masa/carga ( $m/z$ ) existen varios tipos de analizadores. En nuestro caso contamos con un analizador cuadrupolar. Estos tienen la característica de ser más compactos, menos caros y más robustos que otros analizadores. También ofrecen la ventaja de emplear tiempos de barrido bajos ( $< 100$  ms), lo que es particularmente útil para realizar barridos de picos cromatográficos a tiempo real. Los analizadores de cuadrupolo son actualmente los de utilización más frecuente.

Para la segunda parte del trabajo que consistió en la búsqueda de metabolitos de 3 neonicotinoides, se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (ACQUITY UPLC, Waters, Milford, MA) acoplado a un espectrómetro de masas de analizador híbrido cuadrupolo tiempo de vuelo (Q-TOF) (maXisimply, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) mediante una interfase ESI. El control del espectrómetro de masas y el análisis de datos se realizaron por medio del software Bruker Compass version 4.1.

Las partes del equipo son básicamente las mismas que la del HPLC-MS utilizado para el análisis de los neonicotinoides, la diferencia está en que el espectrómetro de masas de este equipo consta de dos analizadores dispuestos en tándem, el primero es un cuadrupolo y el segundo un analizador TOF. El principio de los analizadores de TOF

se basa en la relación entre la masa y la velocidad de los iones. Se mide el tiempo que necesitan los iones acelerados para recorrer una distancia que depende de las características del instrumento, sin que los iones estén sometidos a un campo eléctrico y/o magnético. Las prestaciones del TOF son especialmente interesantes, sobre todo en cuanto a la resolución y la exactitud en la determinación de la masa ya que se consiguen valores inferiores a partes por millón. Además en conjunto con el analizador Cuadrupolo permite llevar a cabo una identificación inequívoca de los analitos de interés a través de experimentos MS/MS.

### **1.2 Material adicional**

El material empleado en el desarrollo del método analítico fue:

- Baño ultrasónico modelo Brasonic 5, suministrado por Scharlau Chemie S.A (Barcelona, España).
- Balanza analítica de presión Mettler. AE-240 (Darmstad, Germany)
- Micropipetas Eppendorf AG (Hamburg, Germany).
- Vasos de precipitado de 20mL
- Precolumna Security GardC<sub>18</sub> de Phenomenex (Torrance, CA, USA).
- Columna KINETEX 5 $\mu$ , C<sub>18</sub>100 Å (150 x 4.60 mm) de Phenomenex (Torrance, CA, USA).
- Sistema de extracción sólido-líquido con sistema de vacío Watercorporation (Milford, MA, USA).
- Centrifuga 5810R de Eppendorf (Hamburg Alemania)
- Cartuchos de extracción sólido-líquido Strata X polimérico 33 $\mu$ m 200mg/6mL Phenomenex (Torrance, CA, USA).

### **1.3 Reactivos y Disolventes**

- Patrón de tiametoxam, clotianidina e imidacloprida suministrados por Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augburg, Germany). Disoluciones patrón de 100 $\mu$ g/mL

preparadas pesando 1mg de patrón y disolviendo el sólido en 10mL de acetona.

- Agua ultrapura obtenida por un equipo compacto que consta de dos unidades de purificación (Mili-RO y mili-Q) de milipore (Belford, MA, USA).
- Ácido fórmico 98-100% pureza P.A. suministrado por Labscan Ltd. (Dublín, Irlanda).
- Acetonitrilo grado HPLC-UV suministrado por Labscan Ltd. (Dublín, Irlanda).
- Metanol grado HPLC-UV suministrado por Labscan Ltd. (Dublín, Irlanda).
- Acetona grado HPLC-UV suministrado por Labscan Ltd. (Dublín, Irlanda).

## **2. Condiciones Cromatográficas**

Para llevar a cabo una adecuada identificación de los analitos en las muestras de miel, fue necesario, en primer lugar, establecer las condiciones de detección y separación cromatográfica que permitan obtener los mejores resultados.

### **2.1 Condiciones del Detector de Masas**

En estudios anteriores del grupo de investigación se optimizaron estos parámetros para los tres analito objetos de estudio. Debido a las propiedades físicas de los mismos se utilizó como fuente de ionización ESI y realizando un análisis de inyección en flujo (FIA) se evaluaron y optimizaron las condiciones de detección. La **Tabla 4** muestra los parámetros optimizados para el tiametoxam, clotianidina e imidacloprida y las condiciones óptimas para cada uno de ellos.

**Tabla 4:** intervalo estudiado para la optimización de los parámetros del detector y condiciones óptimas para la detección del tiametoxam, la clotianidina e imidacloprida.

Parámetros del MS	Intervalo estudiado	Valor óptimo para los analitos		
		Tiametoxam	Clotianidina	Imidacloprida
<b>Voltaje del fragmentador</b>	20-380V	100V	140V	140V
<b>Temperatura del gas secante (N<sub>2</sub>)</b>	10-350°C	350	350	350
<b>Voltaje del capilar</b>	2000-5600 V	2500V	2500V	2500V
<b>Presión del gas del nebulizador (N<sub>2</sub>)</b>	10-60psi	60psi	60psi	60psi
<b>Flujo del gasecante (N<sub>2</sub>)</b>	2-12L/min	10L/min	10L/min	10L/min
<b>Ganancia</b>	5-20	10	10	10

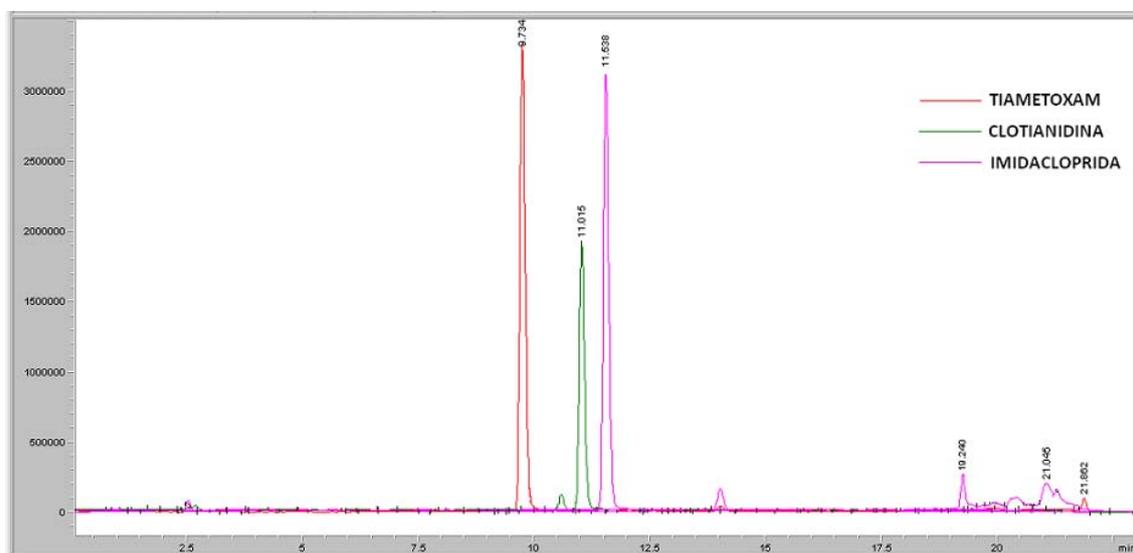
## 2.2 Condiciones Cromatográficas.

Después de fijar las condiciones óptimas de detección se deben seleccionar las condiciones cromatográficas que permitan analizar selectivamente a los analitos. Las condiciones óptimas son aquellas en las que los analitos se separen entre ellos, no coeluyen con interferencias y en las que se obtengan picos estrechos y simétricos que permitan una cuantificación exacta, en el menor tiempo posible. Para esto debe seleccionarse correctamente la columna cromatográfica, la composición de la fase móvil, el flujo, la temperatura del análisis y el volumen de inyección.

### 2.2.1 Resumen de las condiciones cromatográficas

Como resultado de los estudios realizados en nuestro grupo de investigación se ha publicado un método de separación de 7 neonicotinoides entre los cuales se encuentran el tiametoxam, la clotianidina y la imidacloprida [21]. Este método se utilizó para este trabajo para la separación de los tres neonicotinoides de interés en miel, y consistió en separar los analistas en una columna Kinetex C<sub>18</sub> de 150mm x 4.60mm de diámetro interno y tamaño de partícula 2.6µm de Phenomenex en un régimen de

gradiente con una mezcla de una solución de ácido fórmico en agua al 0.1% (A) y acetonitrilo (B). El gradiente consistió en (1) 0 min (A-B, 90:10, v/v), (2) 8 min (A-B, 65:35, v/v), (3) 13 min (A-B,60:40, v/v), (4) 17 min (A-B, 0:100, v/v), (5) 21 min (A-B, 90:10, v/v) con un *post time* de 7 min. El flujo fue de 0.5 mL/min a una temperatura de 35°C y una inyección de 15µL. La **Figura 6** muestra los cromatogramas de los iones  $[M+H]^+$  superpuestos de los 3 analitos bajo las condiciones descritas. Se puede apreciar una separación mayor de línea base con tiempos de retención menores a 12min.



**Figura 6:** Cromatograma de los iones  $[M+H]^+$  del tiametoxam, la clotianidina y la imidacloprida obtenido bajo las condiciones descritas en el texto.

La segunda parte de trabajo que consistió en la búsqueda de los metabolitos de los tres analitos estudiados se llevó a cabo utilizando un método que consistió en: separar los analitos en una columna Kinetex C18 de 150mm x 4,60mm de diámetro interno y tamaño de partícula 2,6µm de Phenomenex en un régimen de gradiente con una mezcla de una solución de ácido fórmico en agua al 0,1% (A) y acetonitrilo que contenía un 0,1% de ácido fórmico (B). El gradiente consistió en (1) 0 min (A-B, 90:10, v/v), (2) 8 min (A-B, 65:35, v/v), (3) 13 min (A-B, 60:40, v/v), (4) 14 min (A-B, 0:100,

v/v), (5) 16 min (A-B, 50:50, v/v), (6) 17 min (A-B, 90:10, v/v) con un *post time* de 7 min. El flujo fue de 0,5 mL/min a una temperatura de 35°C y una inyección de 50 µL.

Las condiciones óptimas para la detección por Q-TOF con ionización ESI y modo positivo se muestran en la **Tabla 5**.

La fragmentación (MS/MS) se llevó a cabo en el monitoreo de reacción múltiple de modo (MRM) mediante el uso de una ventana de 5 m/z de colisión. Mientras tanto, los cromatogramas de iones extraídos se obtuvieron con una ventana diferente ( $\pm 0,02$  m/z) con el fin de extraer la masa exacta.

**Tabla 5:** Condiciones para la detección del tiametoxam, la clotianidina e imidacloprida en el Q-TOF.

Parámetros del Q-TOF	
Voltaje del capilar	3500V
Temperatura del gas secante (N <sub>2</sub> )	340°C
Presión (psi) del gas del nebulizador (N <sub>2</sub> )	4.1bar
Flujo del gas secante (N <sub>2</sub> )	9L/min
Energía de colisión	25eV

### 3 Tratamiento de muestra

Sabiendo que los analitos de interés se encuentran a niveles de trazas, el siguiente estudio que se realizó tenía como fin desarrollar un método de extracción-limpieza que nos permitiera por un lado eliminar los componentes mayoritarios de la matriz, ya que estos podrían interferir en el análisis cromatográfico de los analitos, y por otro lado concentrar los compuestos de interés de modo que puedan ser detectados y cuantificados a bajas concentraciones.

Entre las técnicas utilizadas para la separación y concentración de tiametoxam, clotianidina e imidacloprida en miel, descritas previamente en la sección de antecedentes, destacan las ventajas del uso de la SPE frente a otras estrategias

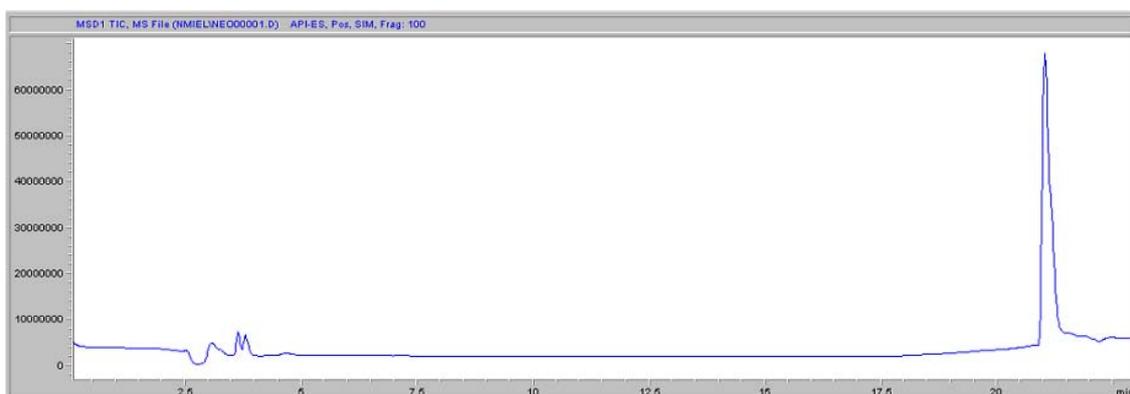
publicadas. Dicha revisión muestra las ventajas del uso de la extracción en fase sólida frente a otras técnicas publicadas de extracción-limpieza.

En base a la experiencia del grupo de investigación en el tratamiento de mieles, mediante SPE se seleccionaron cartuchos poliméricos de fase reversa (Strata X 33um Polymeric Sorbent con 250 mg de sorbente) ya que presentan una fase adecuada para que los analitos de interés queden retenidos reversiblemente.

### 3.1 Extracción en fase sólida

Después de seleccionar los cartuchos de SPE, rellenos se procedió al estudio de cada una de las etapas de extracción y la posterior selección de las condiciones más adecuadas en cada una de ellas.

El primer paso consistió en comprobar si se producía la retención reversible de los analitos en el cartucho seleccionado. Para esto se procedió a la activación del cartucho pasando 5mL de metanol y 5mL de agua sin dejarlo secar. A través del cartucho activado se pasaron 10mL de una disolución que contenía los analitos a una concentración de 1µg/mL y a un flujo de 1mL/min. El eluato fue analizado en el sistema cromatográfico. Como puede observarse en la **Figura 7** cromatograma total de iones (TIC) presentó la ausencia de señal analítica en el tiempo de retención de los analitos por lo que los analitos habían quedados retenidos en el cartucho.

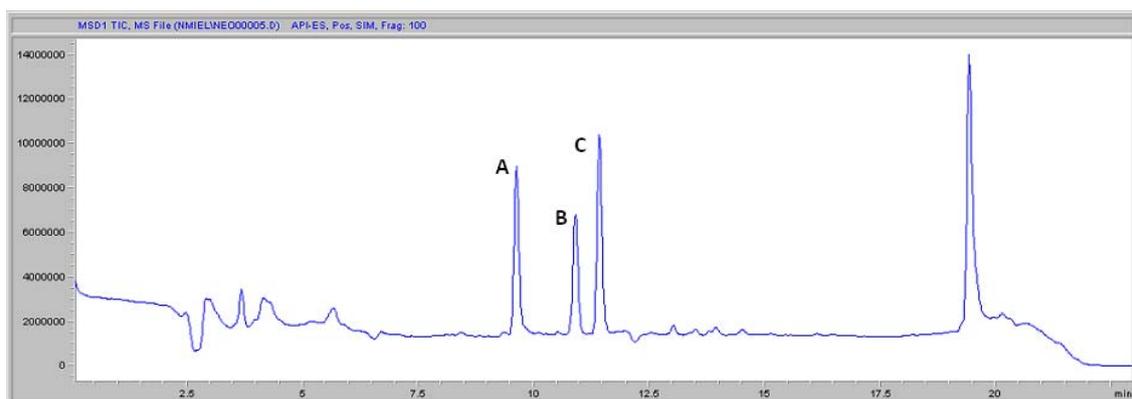


**Figura 7:** TIC del eluato recogido del cartucho Strata X 250mg/ 6mL después de pasar 10mL de la disolución de 1µg/mL de cada patrón.

Con el fin de establecer la capacidad de retención del cartucho se prepararon muestras con diferentes cantidades de miel entre 2 y 6g, diluidas en 10mL de agua ultrapura, a las cuales se les adicionó una cantidad conocida de cada uno de los analitos (5µg/g). Cuando se partieron de masas mayores a 6g se dificultó la disolución de la miel en los 10mL de agua obteniéndose disoluciones altamente viscosas de ahí que no se probase con masas mayores. Las muestras fueron pasadas a través del cartucho con un flujo adecuado. De los resultados que se obtuvieron se dedujo que al utilizar cantidades superiores a 5g no se producía la retención completa de los analitos ya que se observaron señales en el cromatograma a sus respectivos tiempos de retención. Por tanto se estableció una cantidad de muestra de 5g para diluir en 10mL de agua ultrapura.

### 3.2 Etapa de Lavado.

Con los analitos retenidos en el cartucho se estudió la posibilidad de pasar una disolución de lavado capaz de eluir componentes mayoritarios de la matriz, los cuales son posibles interferentes en el análisis cromatográfico. Sabiendo que las mieles son ricas en azúcares se utilizó una mezcla de MeOH:H<sub>2</sub>O (70:30 v/v) para la etapa de lavado. Se pasaron 2mL de la mezcla a través de un cartucho cargado con los analitos a una concentración de 5µg/g y se analizó el eluato. La presencia de señal al tiempo de retención de los analitos con los espectros de masa correspondientes mostró que la mezcla de lavado no era adecuada ya que era capaz de eluir a los analitos. Por ello fueron empleadas otras mezclas MeOH:H<sub>2</sub>O con una composición hasta de un 10% de metanol. Sin embargo en todos los casos se perdía analito y los cromatogramas obtenidos no presentaban muchas señales además de la de los analitos por lo que se decidió no utilizar una etapa de lavado en el procedimiento (**Figura 8**)



**Figura 8:** TIC del eluato recogido a través del cartucho después de pasar 2mL de la mezcla MeOH:H<sub>2</sub>O 70:30 (v/v) donde: **A**, tiametoxam; **B**, clotianidina y **C** imidacloprida)

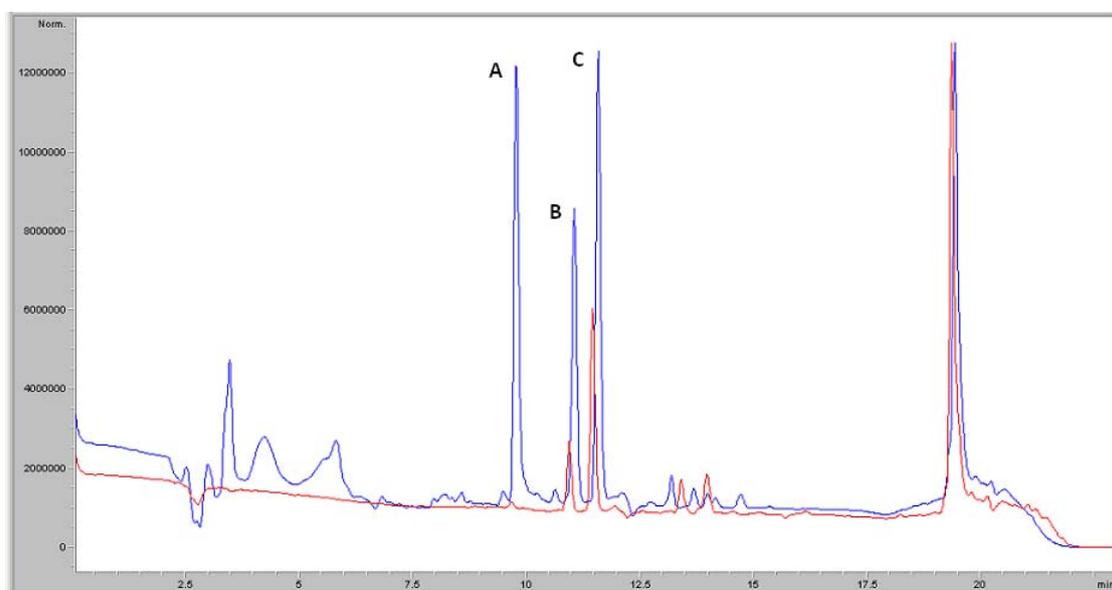
### 3.3 Etapa de elución

Con los resultados obtenidos en la etapa de lavado se hubiera podido pensar en el uso del metanol como extractante. Sin embargo, esta opción se descartó y se decidió estudiar mezclas ACN:H<sub>2</sub>O ya que estos disolventes componen la fase móvil lo que evita utilizar un disolvente como el metanol que tiene mayor polaridad frente a la fase móvil y hace que en ocasiones los picos se deformen. Además el ACN y el H<sub>2</sub>O son dos disolventes ampliamente utilizados para la extracción de neonicotinoides.

Así se estudió el poder de elución de 5 mezclas ACN:H<sub>2</sub>O con un contenido de ACN comprendido entre el 30 y el 50% de la mezcla. Para escoger la mezcla adecuada, se prepararon 5 mieles dopadas a 5µg/g, se disolvieron en agua y se pasaron por los cartuchos a 1mL/min. Después se pasaron 4mL de la mezcla de elución en dos fracciones (2mL(1) + 2mL(2)) a través del cartucho. Los 2 extractos resultantes en cada caso fueron colectados y analizados. Los resultados obtenidos muestran que al emplear la mezcla ACN:H<sub>2</sub>O (30:70 v/v) e inyectar primeros 2mL se obtuvieron señales de los tres analitos, mayoritariamente del tiametoxam. Al inyectar los otros 2 mL se comprobó que para eluir los analitos se precisaban los 4 mL de la mezcla, pues en esta segunda fracción aparecieron de nuevo señales de todos los analitos.

A continuación se probó con la mezcla ACN:H<sub>2</sub>O (35:65 v/v). Los resultados obtenidos indicaban que al emplear esta mezcla la elución del tiametoxam se producía completamente con solo 2mL pero se necesitaron al menos 4mL de la mezcla para extraer totalmente la laclotianidina e imidacloprida. Como puede observarse en la **Figura 9**.

Al emplear la mezcla ACN:H<sub>2</sub>O (45:55 v/v) el TIC de los primeros 2mL mostró las señales de los tres analitos. Mientras que el Tic de los segundos 2mL no mostró señales para ninguno de los analitos. Lo que significa que esta mezcla fue capaz de eluir los analitos con 2mL (**Figura 10**).



**Figura 9:** TICs obtenidos al inyectar los eluatos de 2mL(1) en azul y de 2mL(2) en rojo de la mezcla ACN:H<sub>2</sub>O (35:65 v/v). Dónde: **A**, tiametoxam; **B** clotianidina; y **C**, imidacloprida.

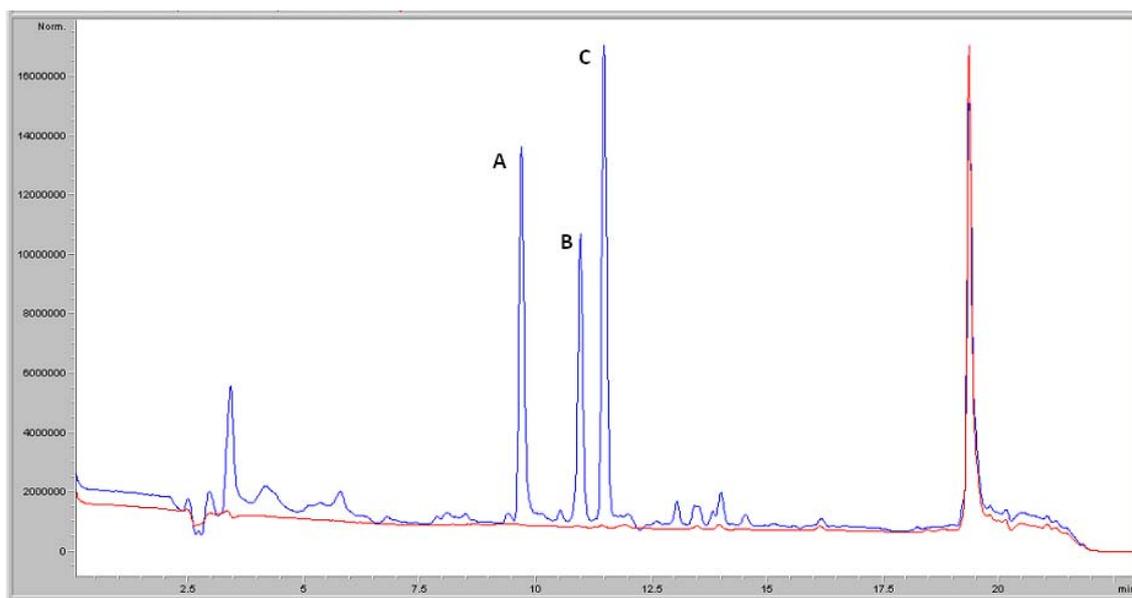
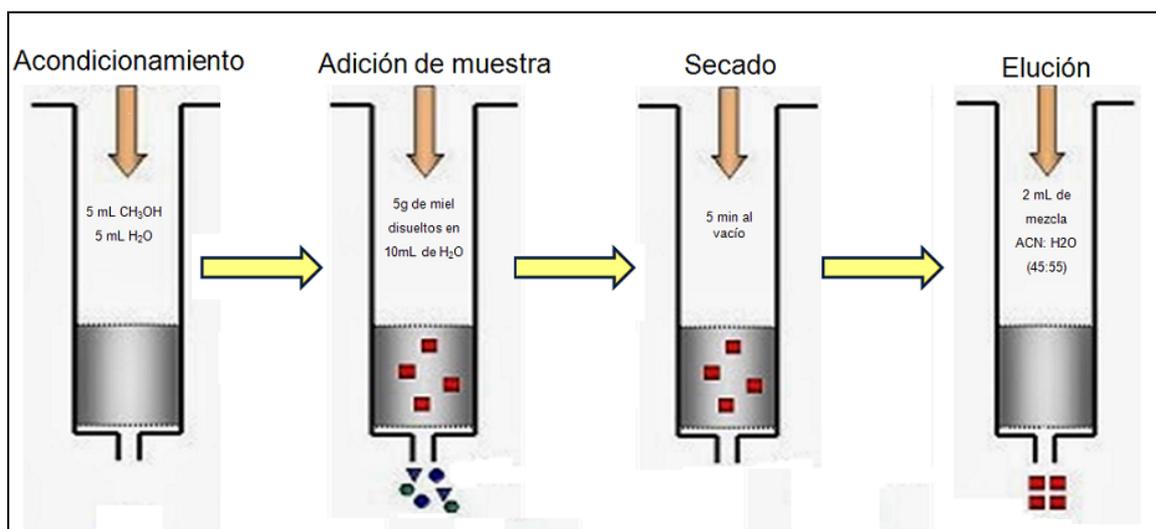


Figura 10: TICs de los eluatos de 2mL(1) en azul y de 2mL(2) en rojo de la mezcla ACN:H<sub>2</sub>O (45:55 v/v). Dónde: **A**, tiametoxam; **B**, clotianidina y **C**, imidacloprida)

Finalmente, se probó una mezcla ACN:H<sub>2</sub>O (50:50 v/v): Esta mezcla se comportó igual que la anterior, y logró eluir la totalidad de los analitos con los 2 primeros mL. Se seleccionó como disolvente de elución el empleo de mezcla ACN: H<sub>2</sub>O (45:55 v/v) ya que los cromatogramas obtenidos eran más limpios que en el caso del 50:50 v/v. Con esta mezcla se probó disminuir el volumen necesario para la elución completa de los analitos, probándose 1.5 y 1.0mL. No obstante, se comprobó que no era posible disminuir el volumen de elución empleado, fijándose este en 2mL.

Como consecuencia de los estudios realizados y a la vista de los resultados, el tratamiento de muestra que se propone para llevar a cabo la determinación de tiametoxan, clotianidina e imidacloprida en miel se muestra en la **Figura 11**: A una columna Strata X, previamente activada con 5mL de metanol y 5mL de agua, se pasan 5g de miel disueltos en 10mL de agua, el cartucho es mantenido al vacío por 5 min y posteriormente se eluye con 2mL de un mezcla ACN:H<sub>2</sub>O (45:55 v/v)



**Figura 11:** Técnica de extracción de los neonicotinoides tiametoxam, clotianidina e imidacloprida en miel.

#### 4 Validación del método analítico

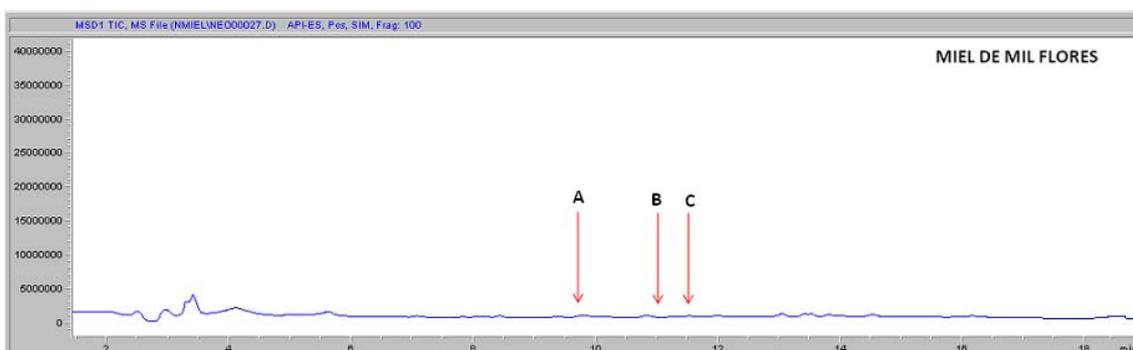
El método fue evaluado según los parámetros: selectividad, precisión, linealidad, tanto por ciento de recuperación y límites de detección y cuantificación. El método fue validado en mieles de diferentes orígenes florales con el fin de determinar si el método era apto para ser utilizado en mieles de cualquier procedencia floral.

##### 4.1 Selectividad

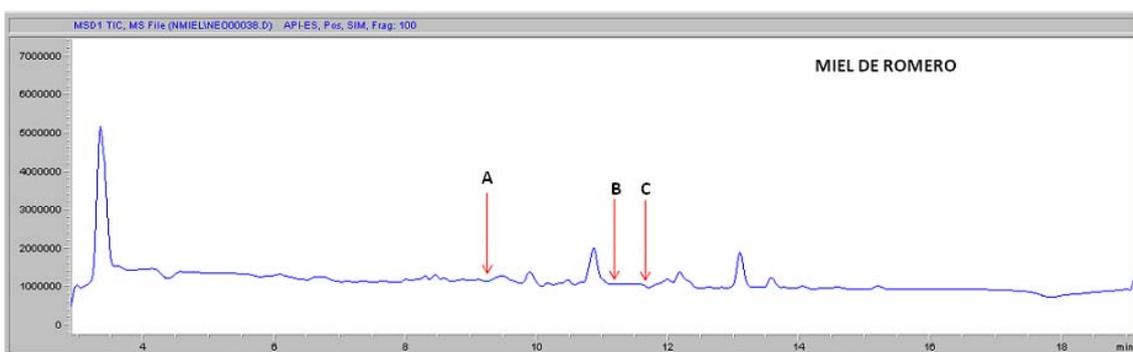
Para conocer si el método está libre de falsos positivos se procedió al análisis de mieles blanco de distintos orígenes florales y se comprobó si había presencia de señales cromatográficas al tiempo de retención de los analitos.

El estudio se realizó para cuatro tipos de mieles, miel de mil flores, miel de espliego, miel de bosque y miel de romero las cuales fueron sometidas al proceso descrito anteriormente. Como se puede observar en los cromatogramas correspondientes de la **Figura 12–15** hay ausencia en todas las mieles analizadas de señal al tiempo de retención de los analitos. Aunque en la miel de bosque se observan algunas señales cercanas al tiempo de retención del tiametoxan estas presentan un espectro de masas

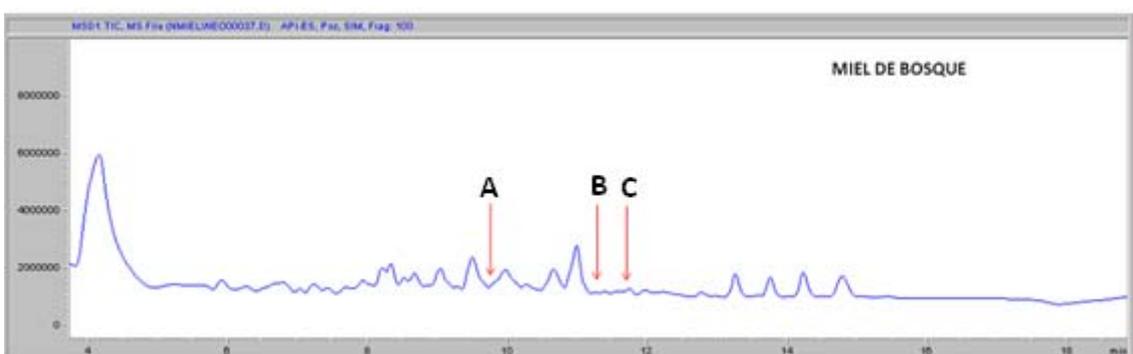
distinto al del neonicotinoide. Por lo que se concluye que el método es selectivo a los analitos.



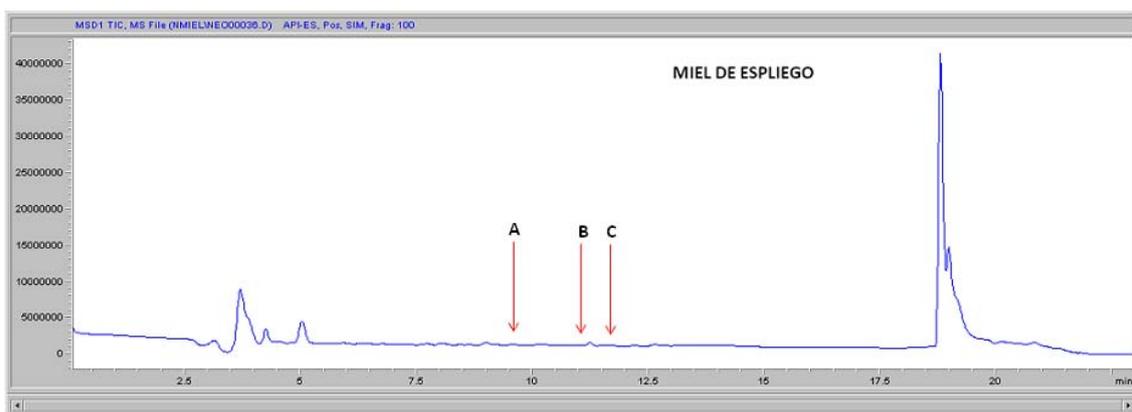
**Figura 12:** TIC de una miel de mil flores blanco donde: **A** representa el tiempo de retención del tiametoxam, **B** de clotianidina y **C** de imidacloprida.



**Figura 13:** TIC de una miel de romero blanco donde: **A** representa el tiempo de retención del tiametoxam, **B** de clotianidina y **C** de imidacloprida.



**Figura 14:** TIC de una miel de bosque blanco donde: **A** representa el tiempo de retención del tiametoxam, **B** de clotianidina y **C** de imidacloprida.



**Figura 15:** TIC de una miel de espliego blanco donde: **A** representa el tiempo de retención del tiametoxam, **B** de clotianidina y **C** de imidacloprida.

#### 4.2 Efecto Matriz

Para comprobar el efecto matriz, se realizó la comparación de las pendientes de las líneas de calibrado de cada analito en disolución acuosa y las pendientes de las líneas de calibrado de las mieles tratadas y adicionadas con los analitos después del tratamiento. Se estudiaron los cuatro tipos de mieles: miel de romero, miel de espliego, miel de bosque y miel de mil flores (**Tabla 6**). De esta manera se pudo evaluar que existe un efecto matriz en los tres analitos en los cuatro tipos de miel, en la mayoría de los casos de supresión. Solo no se observó un efecto matriz en la imidacloprida cuando fue ionizada en una matriz de miel de mil flores, para las demás mieles se observó un efecto de supresión de la señal de imidacloprida en menor medida en comparación con los otros dos analitos. Finalmente de las cuatro mieles analizadas, la miel de bosque la cual se caracteriza por ser más oscura, presentó un efecto matriz de supresión de la señal de los analitos más acentuado. El resultado de este estudio indica por tanto que la cuantificación de los analitos debe ser realizada empleando un método de adición de estándar.

**Tabla 6:** Pendientes de la línea de calibrado en disolvente y en mieles.

Compuesto	$m \pm SD \times 10^6$ (Patrón)	$m \pm SD \times 10^6$ (milflores)	$m \pm SD \times 10^6$ (espliego)	$m \pm SD \times 10^6$ (romero)	$m \pm SD \times 10^6$ (bosque)
Tiametoxam	25.0±1.0	16.0±0.7	12.3±0.3	15.9 ±0.5	9.8±0.4
Clotianidina	14.0±0.9	13.0±0.5	9.1±0.2	9.9±0.2	7.0±0.2
Imidacloprida	23.0±1.0	24.0±1.0	20±1.0	20.9±0.8	18.0±1.0

#### 4.3 Linealidad, límite de detección y de cuantificación

Para conocer el intervalo en el cual la respuesta analítica de la técnica y la concentración presentan una dependencia lineal se realizó el ensayo de linealidad. Además el mismo nos permitió estimar el límite de detección y de cuantificación de la técnica.

Así se prepararon los cuatro tipos de mieles dopadas a 5 niveles de concentración, barriendo un rango de concentraciones desde el límite de cuantificación (LC) hasta 1 µg/g para cada analito y para cada tipo de miel estudiado y se llevó a cabo el estudio de correlación por mínimos cuadrados entre el área de los picos de los analitos a cada nivel de concentración.

Después se realizó un análisis estadístico de los datos para conocer qué porcentaje de la regresión era explicado por una variación lineal y si había otro tipo de regresión que explicara mejor la tendencia de los datos. Para ello se utilizó el programa de cómputo Microsoft Excel 2010. En todos los casos el coeficiente de determinación de las correlaciones de los tres analitos en las cuatro mieles estuvo por encima del 0.990 (**Tabla 7**) y no se observaron tendencias en la evaluación de los residuos. Además la prueba de significación *t-student* mostró que no había diferencias significativas entre las regresiones y el modelo lineal a un nivel de confianza del 95%.

A continuación se estimaron los LD y LC de los analitos en cada tipo de miel. Para esto se midió el ruido al tiempo de retención de los analitos en cada tipo de miel blanco y se realizó una relación con la altura del pico del analito en una muestra

dopada a una concentración conocida (relación señal/ruido, S/R). El criterio seguido para establecer los límites fue una relación S/R = 3 para el LD y S/R = 10 para LC.

En este estudio se pudo observar que estos límites presentaron una gran variación con el tipo de miel, obteniéndose LDs del orden de los 2-3ppb ( $\mu\text{g/Kg}$ ) para la miel de romero mientras que para la miel de bosque estos límites se encuentran alrededor de los 15-19ppb. En el caso de la miel de mil flores y de espliego los valores de LD estuvieron comprendidos entre 9-10ppb y 2-10ppb respectivamente (**Tabla 7**).

**Tabla 7:** Pendiente de la línea de calibrado, límites de confianza de la pendiente, coeficientes de determinación de las líneas de calibrado, límites de detección y cuantificación estimados para los tres analitos en las cuatro mieles estudiadas.

Analito	Miel	Pendiente $\pm$ límites de confianza $\times 10^5$	$R^2$	LD ( $\mu\text{g/Kg}$ )	LQ ( $\mu\text{g/Kg}$ )
Tiametoxam	Mil flores	92.0 $\pm$ 4.0	0.993	10.0	30.0
	Romero	140.0 $\pm$ 4.0	0.998	3.0	10.0
	Bosque	90.0 $\pm$ 3.0	0.998	15.0	50.0
	Espliego	110.0 $\pm$ 5.0	0.996	10.0	30.0
Clotianidina	Mil flores	84.0 $\pm$ 2.0	0.998	9.0	30.0
	Romero	89.0 $\pm$ 4.0	0.996	2.0	9.0
	Bosque	62.0 $\pm$ 4.0	0.991	19.0	60.0
	Espliego	78.0 $\pm$ 4.0	0.995	5.0	20.0
Imidacloprida	Mil flores	158.0 $\pm$ 8.0	0.993	10.0	30.0
	Romero	180.0 $\pm$ 10.0	0.992	3.0	10.0
	Bosque	170.0 $\pm$ 3.0	0.999	19.0	60.0
	Espliego	220.0 $\pm$ 10.0	0.992	2.0	6.0

#### 4.4 Porcentajes de recuperación

Con el objetivo de conocer la cantidad del analito recuperado en una muestra real se comparan los resultados obtenidos de la extracción de los analitos en muestras adicionadas con concentraciones conocidas, con los resultados de las muestras preparadas a la misma concentración pero que no, fueron sometidas al proceso de extracción. La comparación entre las respuestas de estas muestras nos permitirá determinar el porcentaje de recuperación de la técnica. La **Tabla 8**, muestra el resultado del estudio de recuperación a cuatro niveles de concentración para cada uno

de los tres analitos en las cuatro mieles estudiadas. El método mostró un mayor porcentaje de recuperación en las mieles de bosque y romero obteniéndose en todos los casos valores superiores al 85%, mientras que en las mieles de mil flores y espliego los estuvieron comprendidos entre el 61–96%.

**Tabla 8:** Porcientos de recuperación en cuatro niveles de concentración para tiametoxam, clotianidina e imidacloprida en las mieles estudiadas

Compuesto	Concentración (µg/g)	Porcentaje de Recuperación (%)			
		Mil flores	Espliego	Bosque	Romero
Tiametoxam	0.2	65	81	98	105
	0.4	63	79	96	99
	0.6	68	86	96	96
	0.8	64	85	96	91
Clotianidina	0.2	61	83	89	86
	0.4	61	79	86	95
	0.6	62	85	94	95
	0.8	65	84	87	88
Imidacloprida	0.2	83	78	91	85
	0.4	73	79	86	94
	0.6	76	94	105	95
	0.8	75	96	89	87

#### 4.5 Precisión

La evaluación de la precisión permite cuantificar los niveles de variación de la respuesta de un método. Ésta se determina calculando el coeficiente de variación (CV%) de la respuesta de un analito (área absoluta) a una concentración determinada.

16 muestras de mieles dopadas a 0.1µg/g fueron analizadas en un periodo de dos días por el método descrito. En el primer ensayo (día 1) se analizaron 10 de las muestras dopadas y se determinó el CV% de la señal de los analitos en estas muestras para evaluar la precisión intra-ensayo. En el segundo ensayo (día 2) se analizaron las otras 6 muestras y con la determinación del CV% de la señal de los analitos en estas muestras y en las del primer ensayo se avaluó la precisión inter-

ensayo. El método mostró ser preciso ya que los valores de CV% intra-ensayo se mantuvieron por debajo del 5% y para el inter-ensayo por debajo del 10%. Además para el tiametoxam, clotianidina e imidacloprida la precisión intra-ensayo fue del 2.15%, 3.32% y 2.37% respectivamente y la inter-ensayo 6.76%, 4.23% y 7.54% respectivamente.

Con todo ello, los parámetros evaluados para la técnica de detección planteada cumplen con los criterios de aceptación exigidos por la norma SANCO para la validación de métodos analíticos.

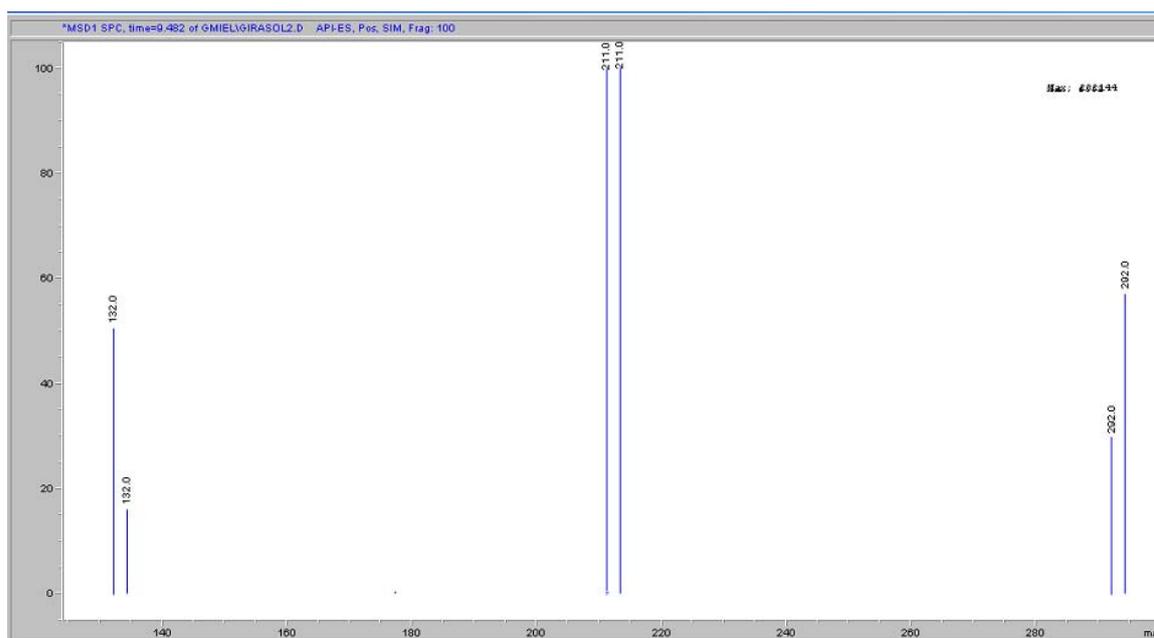
## APLICACIÓN DEL MÉTODO

El método validado se aplicó a 9 muestras de miel recogidas en colmenas de abejas que estaban cercanas a campos de maíz (identificadas como M1–M4) y de girasol (identificadas como G1-G5) tratados con tiametoxam. Antes de analizar las muestras éstas se centrifugaron a 10000 rpm por 30min a 20°C para eliminar partículas sólidas y restos de la propia colmena.

El estudio realizado se llevó a cabo con el fin de determinar la presencia de los neonicotinoides tiametoxam, imidacloprida, clotianidina y de sus metabolitos en la miel de abejas que habían polinizado en campos de maíz y girasol tratados con tiametoxam (tratamiento de la semilla de la planta). Las muestras de miel provienen de apiarios experimentales del CAR de Marchamalo (Guadalajara, España). Las muestras fueron recogidas en agosto del 2013 y analizadas en febrero del 2014. Hasta el análisis estuvieron conservadas adecuadamente.

Sin embargo en las muestra G2, G3, G5 y M2 se observó un pico al tiempo de retención del tiametoxam cuyo espectro de masas mostró los iones característicos del analito ( $m/z$  132, 211, 292). No obstante comparando con el espectro obtenido de un patrón de tiametoxam se encontró que la intensidad del ion de relación  $m/z$  132 en la muestra era mayor mientras que el  $m/z$  211 era menor que en la del patrón (**Figura 16**). Esto nos llevó a plantearnos la confirmación de la presencia de tiametoxam en las muestras empleando experimentos MS/MS en un Q-TOF. Los resultados mostraron que el pico encontrado en estas muestras no se correspondía con el neonicotinoide tiametoxam.

Después del análisis de las muestras por LC–MS no se encontró clotianidina e imidacloprida en ninguna de las mieles analizadas, al menos con concentraciones superiores al LOD del método validado.



**Figura 16:** Comparación de los espectros de masas de la muestra (señal a la derecha) y de un patrón (señal a la izquierda) de 0.5µg/g.

A continuación, tanto las muestras sospechosas en el primer análisis como las negativas fueron analizadas en un equipo HPLC/Q-TOF para buscar además la posible presencia de metabolitos de los tres neonicotinoides. Teniendo en cuenta que esta técnica permite obtener la relación m/z de manera exacta, se buscaron los metabolitos descritos en la literatura (**Tabla 2**) para cada neonicotinoide basándose en sus masas teóricas.

#### 1. ANÁLISIS DE LOS METABOLITOS DEL TIAMETOXAM.

Se analizaron las muestras de mieles y un blanco en las mismas condiciones cromatográficas. Después, los cromatogramas iónicos de cada uno de los metabolitos en cada una de las muestras se compararon con los del blanco. Aquellas señales presentes en las muestras y ausentes en el blanco fueron considerados como posibles metabolitos.

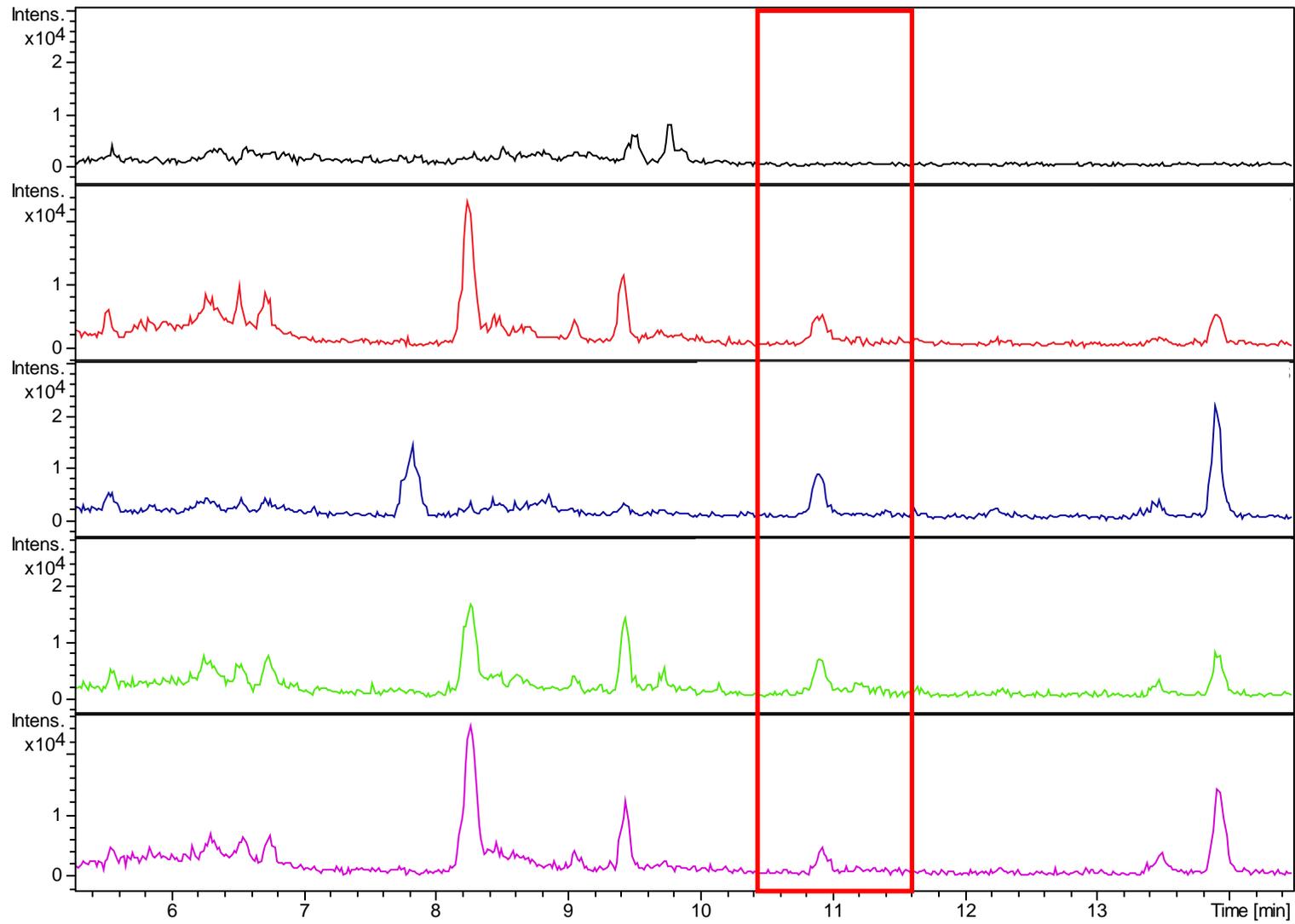
Así, todas las muestras presentaron una señal de relación m/z 161.0675 alrededor de los 11.0 min y varias señales de relación m/z 147.0518 entre los 12 y los 13 min. Las

**Figura 17 y 18** muestran los resultados obtenidos para las mieles de maíz. Estas masas se corresponden con las de los metabolitos TM-5 (nitroguanidina A, NG-A) y TM-13 (nitroguanidina C, NG-C) respectivamente los cuales han sido descritos como metabolitos que son únicos del tiametoxam. El hecho de que se encuentren en todas las muestras es significativo ya que todas las muestras de mieles proceden de campos tratados con tiametoxam. Posteriormente se llevó a cabo la confirmación mediante experimentos MS/MS.

Como puede verse en la **Figura 19** a partir de la fragmentación del ión de relación  $m/z$  161.0675 (NG-A), se identificaron los iones de relación  $m/z$  147.07, 119.08 y 105.07 como pertenecientes al  $[M+H]^+$  analizado (iones hijos). Hay evidencia en la literatura consultada de que estos iones guardan relación con el metabolito del tiametoxam identificado como NG-A [8]. Así el ion de relación  $m/z$  147 se ha identificado como NG-C, el  $m/z$  119 como NG-E y al  $m/z$  105 como NG-G argumentando que sus estructuras se encuentran como resultado de la escisión de la molécula de tiametoxam (**Figura 20**).

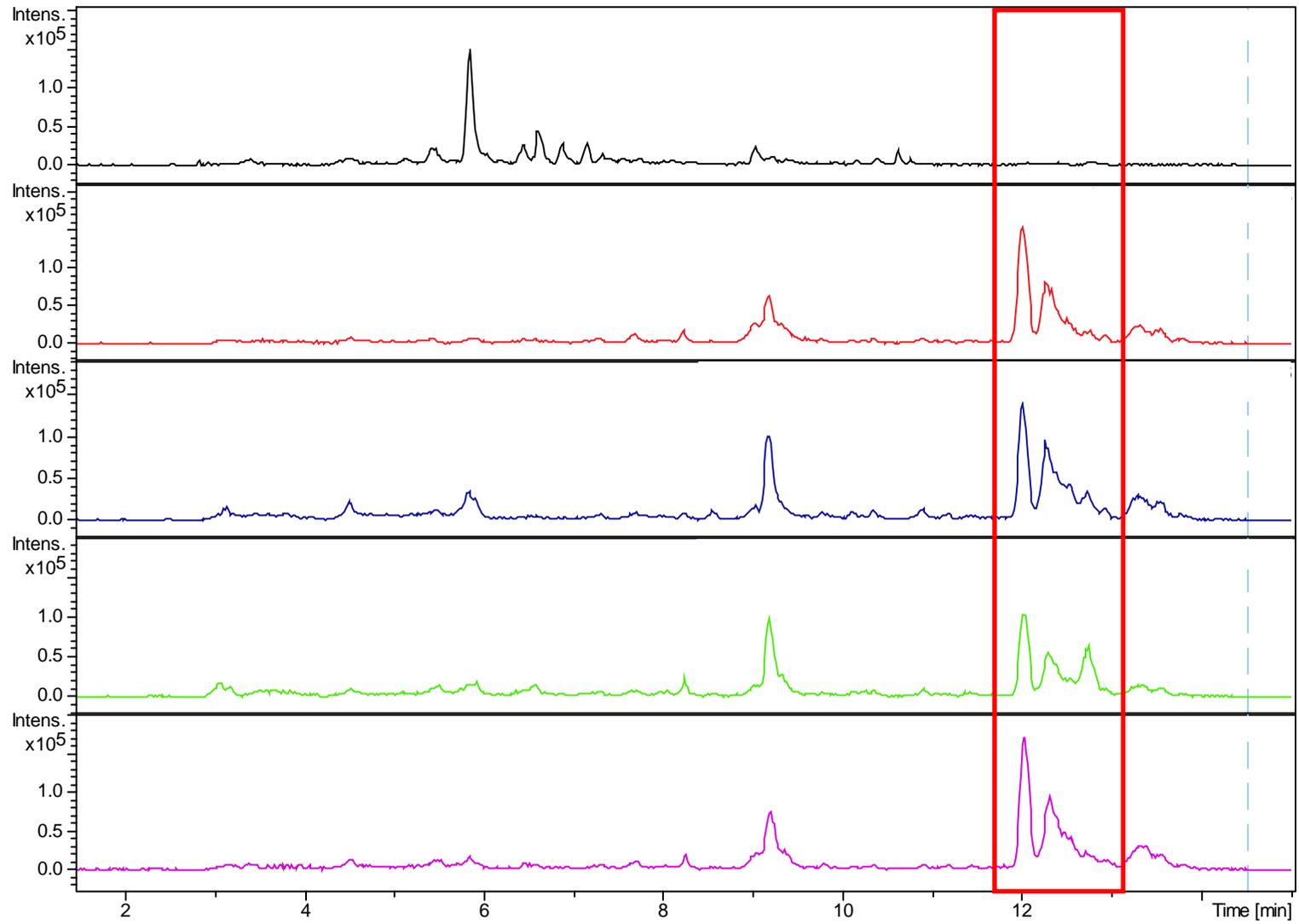
Destacar además que se observó que esta señal era más intensa en las mieles de maíz que en las de girasol analizadas.

Parte experimental

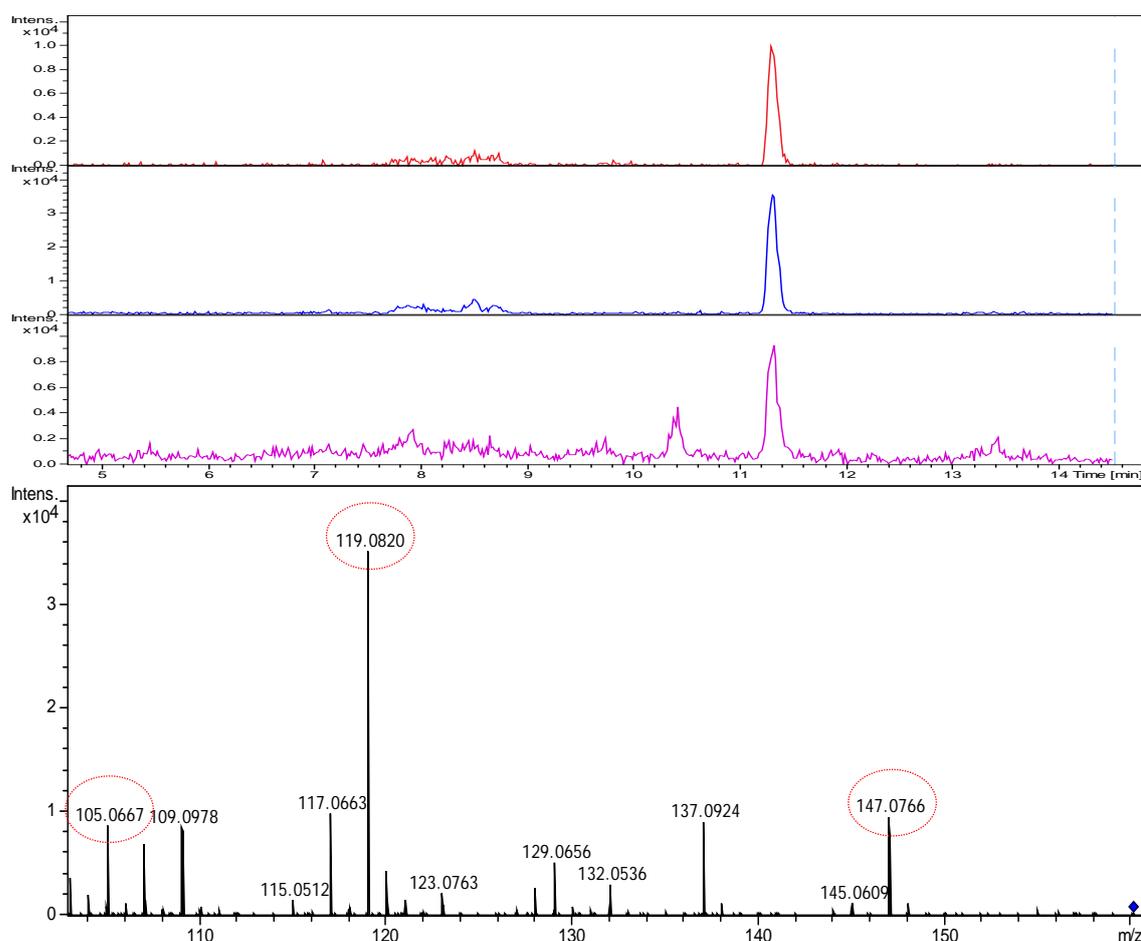


**Figura 17:** Cromatograma del ión 161.0675 de las mieles: blanco, M1, M2, M3, M4 (arriba hacia abajo)

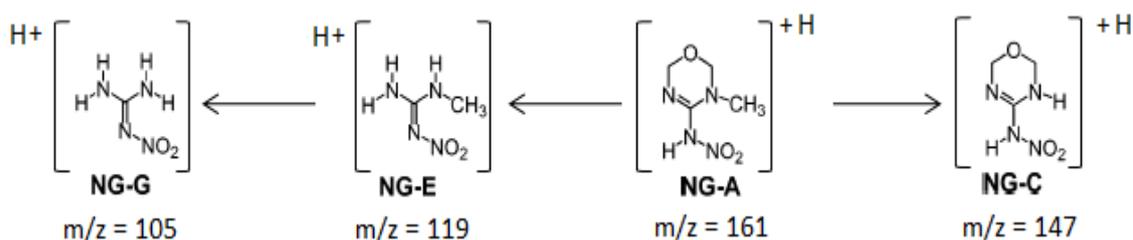
Parte experimental



**Figura 18:** Cromatograma del ión 147.0518 de las mieles blanco, M1, M2, M3, M4 (arriba hacia abajo)



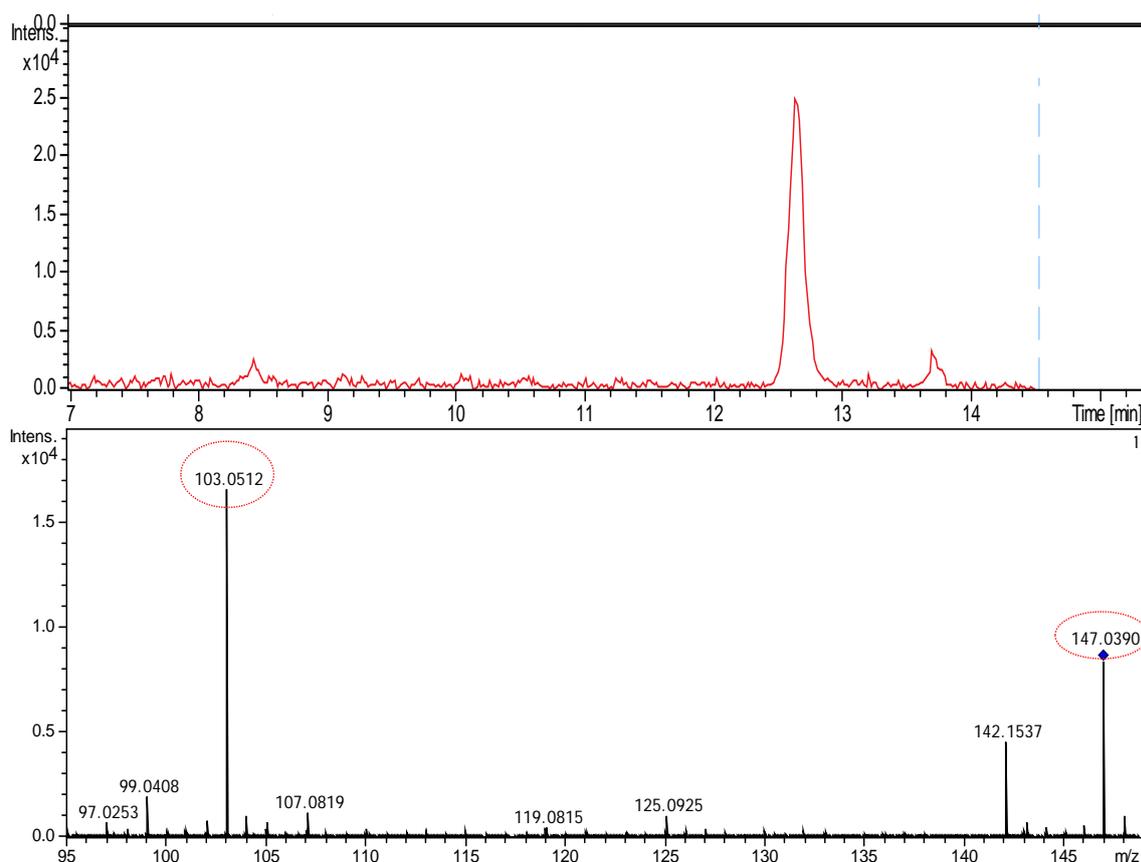
**Figura 19:** Cromatogramas de los iones y espectro de MS/MS del  $[M+H]^+$  161.0675. De arriba hacia abajo se encuentran los iones  $m/z$  147.07 (rojo), 119.08 (azul) y 105.07 (lila) y señalados con líneas de puntos en el espectro de masas.



**Figura 20:** Asignación estructural a los iones  $m/z$  147.07, 119.08, 105.07 del metabolito NG-A del tiametoxam.

Para el análisis de fragmentación del ion  $[M+H]^+$  de relación  $m/z$  147.0518 (NG-C), se identificó un ion hijo de relación  $m/z$  103.05 (**Figura 21**) Este fragmento puede estar relacionado estructuralmente con NG-G.

Coincidentemente, en el espectro del metabolito TM-5 explicado anteriormente se encuentra el ion 147.07 que se justifica por el reordenamiento de un protón seguido de la pérdida de un grupo metileno lo que dejaría la pérdida de 14uma. Esta diferencia estructural es la misma descrita en la bibliografía para estos dos metabolitos del tiametoxam. Por lo tanto esta coincidencia refuerza la hipótesis de que estos metabolitos se encuentran en las mieles analizadas.



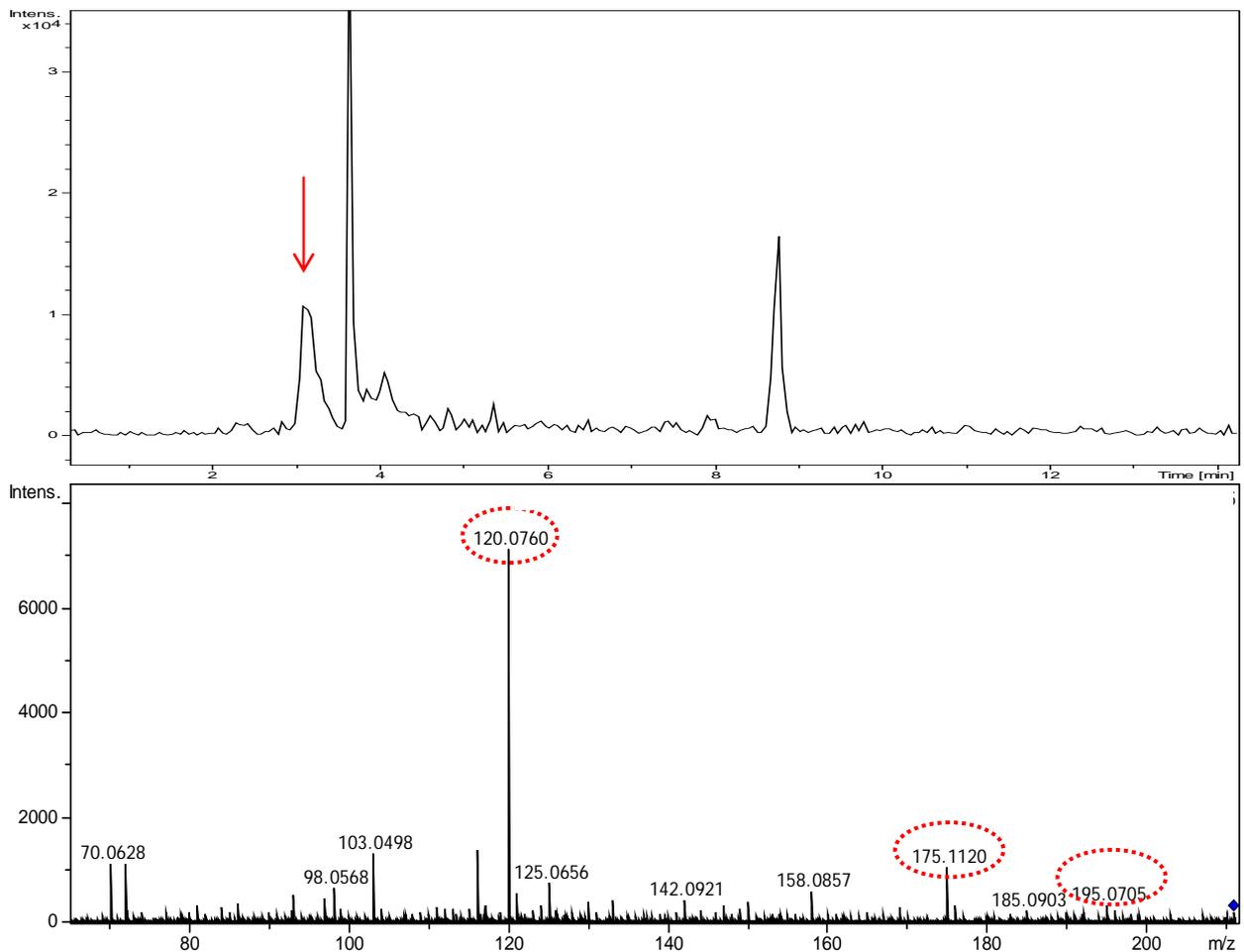
**Figura 21:** TIC y espectro de MS/MS del  $[M+H]^+$  161.0675. Señalados con líneas de puntos en el espectro de masas de  $m/z$  103.05.

## 2. ANÁLISIS DE LOS METABOLITOS DE LA IMIDACLOPRIDA

Para la búsqueda de metabolitos de la imidacloprida mediante HPLC/ Q-TOF se procedió de la misma forma que en la búsqueda de los metabolitos del tiametoxam.

En este caso en todas las muestras menos en la G3 se encontró una señal para la relación  $m/z$  211,0750 alrededor de los 3.0 min y señal de relación  $m/z$  209.0800

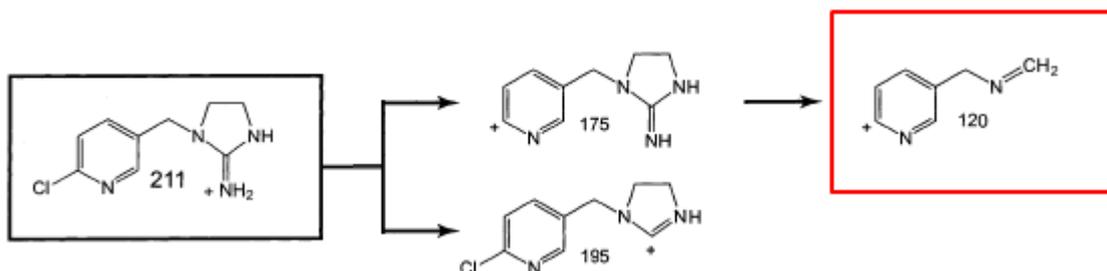
alrededor de los 10.5 min (**Figura 22**). Estas masas coinciden con la del metabolito IMI-4 o N-desnitro-imidacloprida (IMI-NH) e IMI-15.o N-desnitro-olefin-imidacloprida (IMI-NH-ole) respectivamente. Existe un artículo en el cual estos metabolitos han sido determinados en muestras de mieles dopadas [1] y donde los tiempos de retención de los analitos con respecto a la IMI se encuentran en concordancia con los obtenidos en este trabajo.



**Figura 22:** Cromatograma y espectro MS/MS del ion  $[M+H]^+$  211.08. Iones hijos señalados con líneas de punto.

En la fragmentación del ión de relación m/z 211.0750, se identificaron los iones de relación m/z 195.07, 175.11 y 120.08 iones hijos al  $[M+H]^+$  analizado. Hay evidencia en la literatura consultada de que los iones de relación m/z 175.11 y 195.07 son comunes

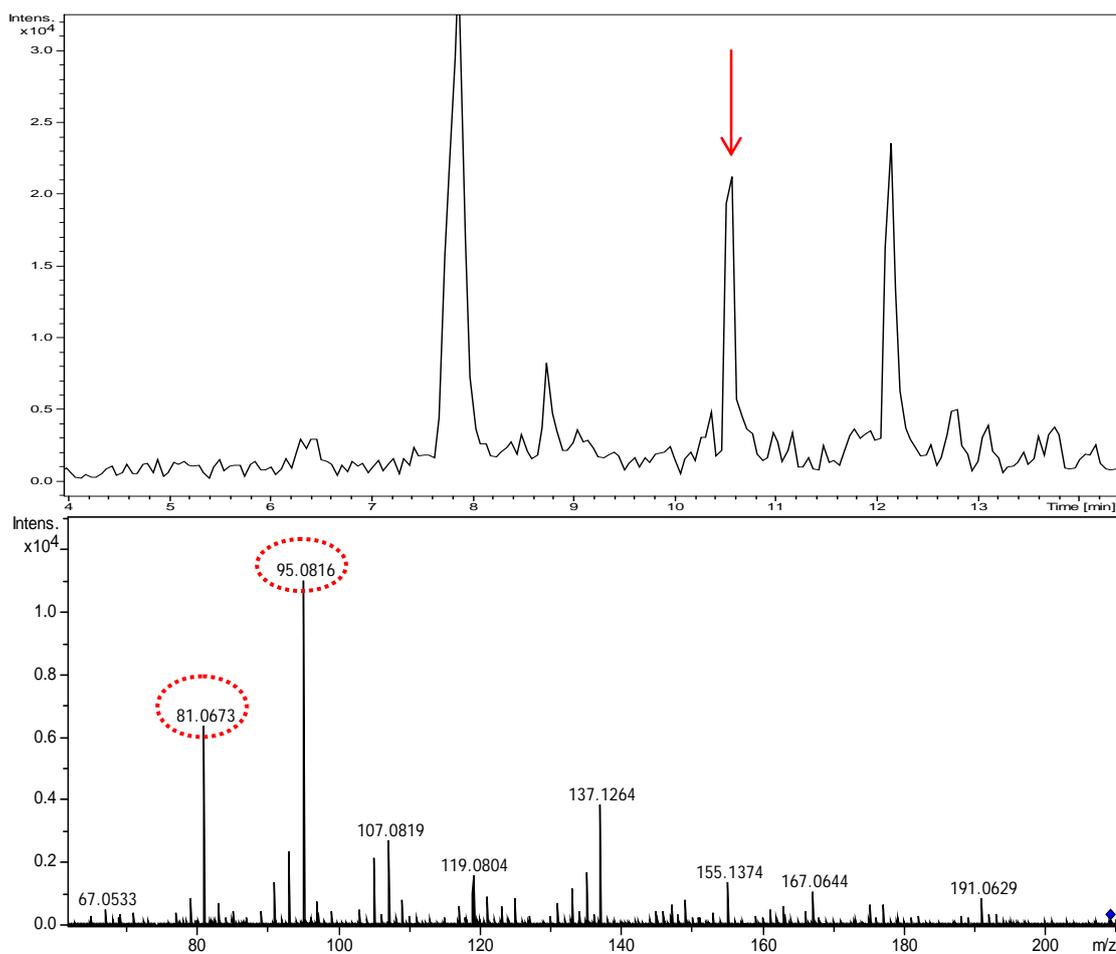
para los metabolitos de la IMI [46]. Aunque no se encontró referenciada la señal de relación  $m/z$  120.08, basándonos en las posibles rupturas de la IMI-NH se le asignó la estructura que se encuentra en la **Figura 23**.



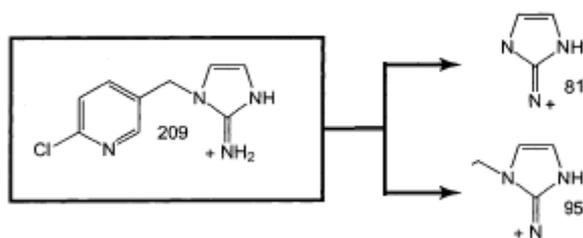
**Figura 23:** Asignación estructural de los iones de relación  $m/z$  175.11, 195.07 y 120.08.

Para el análisis de la fragmentación del ión  $[M+H]^+$  de relación  $m/z$  209.0800 (IMI-NH-ole), se identificaron los iones de relación  $m/z$  81.06 y 95.08 como iones hijo (**Figura 24**). En la bibliografía no se han encontrado referencias acerca de estos iones, pero se asignaron siguiendo el patrón de fragmentación encontrado para algunos metabolitos de la IMI (**Figura 25**).

## Parte experimental



**Figura 24:** cromatograma y espectro MS/MS del ion  $[M+H]^+$  211.08. Iones hijos señalados con líneas de punto.



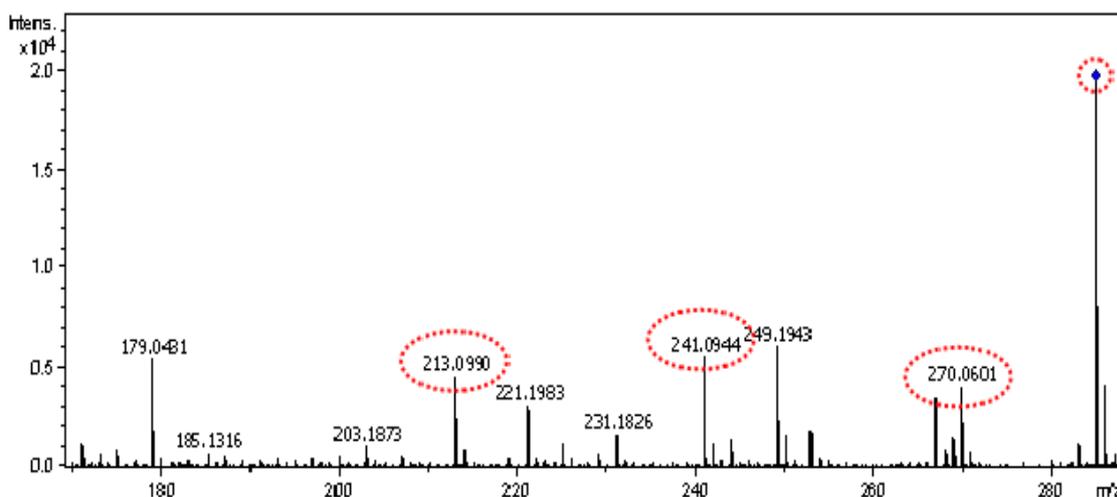
**Figura 25:** Asignación estructural de los iones de relación m/z 95.08 y 81.06.

### 3. ANÁLISIS DE LOS METABOLITOS DE LA CLOTIANIDINA

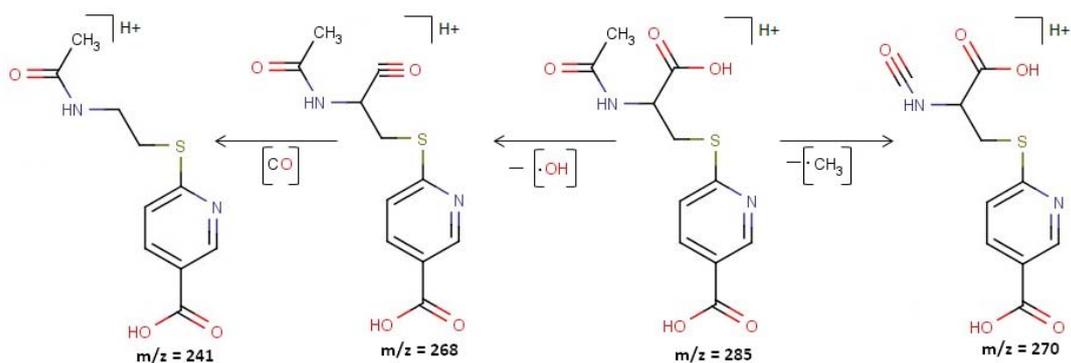
La búsqueda de metabolitos de la clotianidina (CLO) en el HPLC/Q-TOF fue realizada de igual forma que para los 2 neonicotinoides anteriores.

En este caso en algunas de las muestras se encontró una señal de relación  $m/z$  285.0545 alrededor de los 12 min cuya masa coincide con la del metabolito denominado CPM-5

La fragmentación no fue eficiente con lo cual se observó una gran intensidad en el ión  $[M+H]^+$  (**Figura 26**), aun así se pudieron identificar los iones hijos de relación  $m/z$  270.06, 269.06, 241.09 y 213.09. El ion 270.06 se puede interpretar como la pérdida de un radical metilo ( $\cdot CH_3$ ), ruptura muy usual en moléculas metiladas. Por otra parte el ion de relación  $m/z$  268.06 se puede atribuir a la pérdida del hidroxidrilo ( $\cdot OH$ ) y el  $m/z$  241.09 a la pérdida de (CO) como molécula neutra, esta ruptura es característica de ácidos carboxílicos (**Figura 27**)



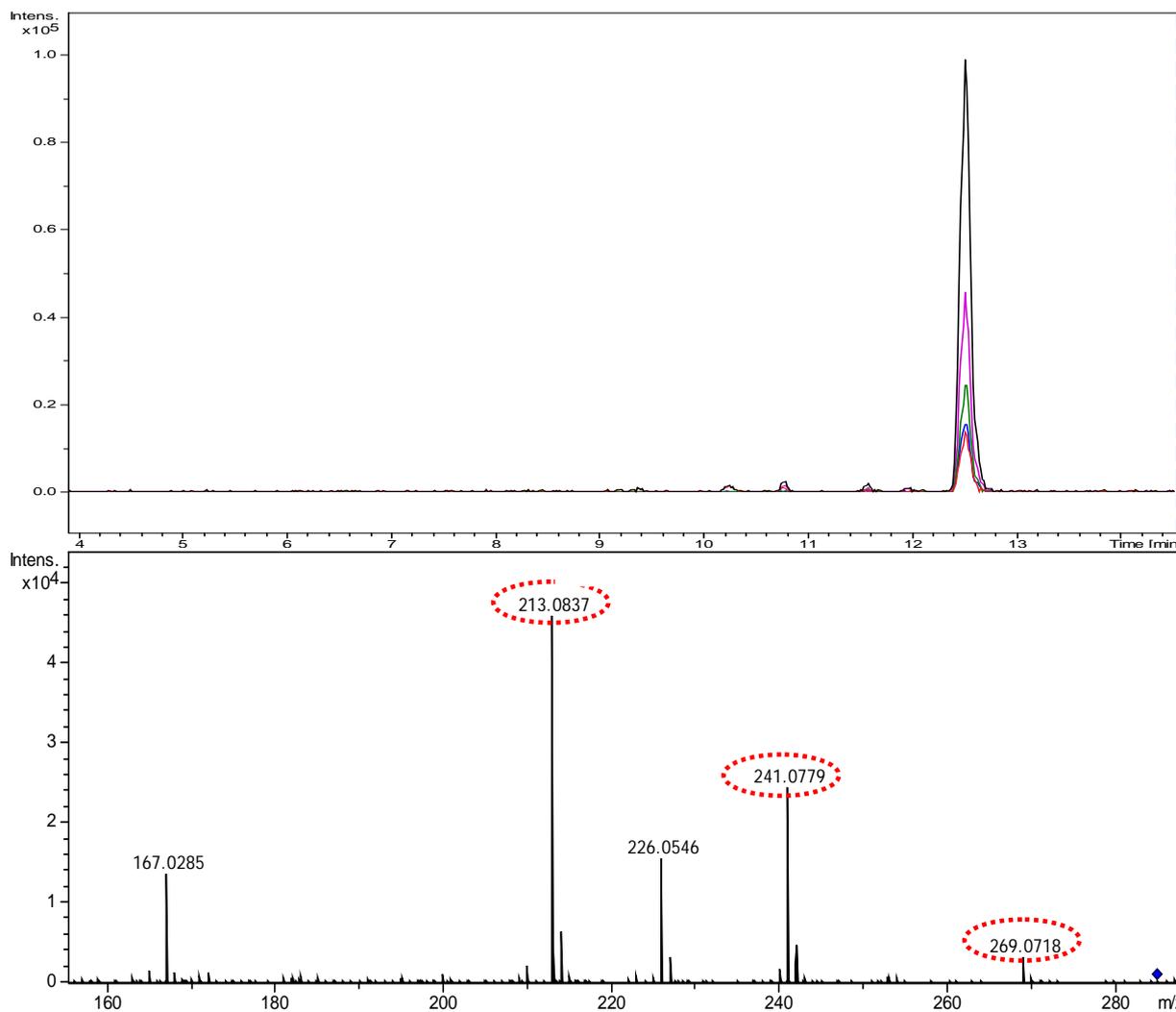
**Figura 26:** Espectro de masas del  $[M+H]^+$  285.0545 obtenido con un voltaje de fragmentación de 25eV. Señalado con línea de puntos los iones hijo.



**Figura 27:** Asignación estructural de los iones de relación  $m/z$  270.06, 268.06 y 241.09.

Con el fin de lograr obtener un espectro MS/MS del ion  $m/z$  285.0545 con iones hijos más intensos, lo que permite una mayor información estructural del metabolito en cuestión, se repitió el análisis anterior pero aumentando la energía de colisión de 25 a 35eV.

Como resultado se pudo observar un espectro con iones hijos más intensos que fueron los mismos encontrados previamente, lo que corrobora que estos fragmentos pertenecen a la ruptura del ion  $m/z$  285.0545. En la **Figura 28** se muestra la superposición de los cromatogramas de los iones hijos, la aditividad de las intensidades de estos iones también corroboran que provienen de la misma molécula.



**Figura 28:** Superposición de los cromatogramas de los iones hijos y espectro MS/MS del  $[M+H]^+$  285.0545 obtenido con un voltaje de fragmentación de 35eV. Señalado con línea de puntos los iones hijo.

El resumen de estos resultados se encuentra en la **Tabla 9**. El análisis de las muestras fue cualitativo ya que no contamos con patrones de los metabolitos detectados, por lo que en la tabla se denota con un signo positivo (+) a las muestras donde se encontró analito y con uno negativo (-) donde no se encontró.

**Tabla 9:** Resumen de los metabolitos encontrados en las muestras analizadas

muestra	NG-A	NG-C	IMI-NH	IMI-NH ole	CPM-5
G1	+	+	+	+	+
G2	+	+	+	+	-
G3	+	+	-	-	-
G4	+	+	+	+	+
G5	+	+	+	+	+
M1	+	+	+	+	-
M2	+	+	+	+	-
M3	+	+	+	+	+
M4	+	+	+	+	-

Con todo ello en este trabajo es posible concluir que se pudieron identificar mediante los análisis realizados y la ayuda de la literatura, 5 metabolitos de los 3 neonicotinoides tiametoxam, imidacloprida y clotianidina, los cuales están suspendidos por la Unión Europea desde 2013. Para el tiametoxam se identificaron los metabolitos nitroguanidínicos NG-A y NG-C, cuya relación estructural se pudo explicar con los espectros obtenidos. Para la imidacloprida se identificaron dos desnitro metabolitos, el N-desnitro-imidacloprida y el N-desnitro-olefin-imidacloprida de los cuales, la única diferencia estructural es una instauración en el anillo guanidínico. Finalmente, en la clotianidina se encontró el metabolito CPM-5 y cuya estructura pudo justificarse a través de la interpretación de su espectro MS/MS.

Es interesante resaltar que los metabolitos encontrados para el tiametoxam y la imidacloprida guardan una similitud estructural entre ellos, lo que pudiera deberse al hecho de que en esta matriz son más estables los metabolitos con ciertas características estructurales. Este hecho no es aislado, suele manifestarse en muchas matrices en las cuales los metabolitos se acumulan según sus propiedades. Un ejemplo es que, una planta tratada con un insecticida puede acumular selectivamente los metabolitos del mismo, por lo que en sus hojas puede encontrarse un metabolito

mientras en el tallo puede encontrarse otro. Todo ello refuerza la hipótesis de que los compuestos encontrados en las mieles sean estos metabolitos.

## Conclusiones

- Se implementó un método sencillo basado en una SPE y posterior detección por HPLC–MS para la determinación de los neonicotinoides tiametoxam, clotianidina e imidacloprida en muestras de miel.
- El método mostró ser lineal aunque se observó un efecto matriz para todas las mieles estudiadas. Por ello la cuantificación de las muestras deberá llevarse a cabo mediante una adición de estándar.
- La metodología mostró gran variabilidad en sus límites de detección con respecto a la miel analizada. Se obtuvieron límites de detección para la miel de romero de entre 2µg/Kg y 3µg/Kg para los tres analitos mientras que en la miel de bosque estos valores estuvieron comprendidos entre 15µg/Kg y 19µg/Kg. Mientras que para la miel de espliego estuvo comprendido entre 2µg/Kg y 10µg/Kg.
- Los valores de porcentaje de recuperación fueron superiores al 60% para todos los niveles de concentración y en las cuatro mieles estudiadas, destacándose la miel de romero por ser aquella en la que se alcanzaron mayores porcentajes de recuperación para los analitos.
- En la búsqueda de los metabolitos neonicotinoides estudiados en las muestras analizadas. Se encontraron e identificaron 5 metabolitos La NG-A y NG-C como metabolitos del tiametoxam, la IMI-NH, la IMI-NH-ole como metabolitos de la imidacloprida y el CPM–5 para la clotianidina.
- Todo ello pone de manifiesto el interés del trabajo desarrollado para el control de neonicotinoides en productos apícolas como la miel.

**Bibliografía.**

1. Kamel A. Refined methodology for the determination of neonicotinoid pesticides and their metabolites in honey bees and bee products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 10 (2009) 5926-5931
2. Proietto M., Scordino M., Sabatino L., Pantò V., Morabito G., Chiappara E., Traulo P., Gagliano G. UHPLC/MS-MS analysis of six neonicotinoids in honey by modified QuEChERS: method development, validation, and uncertainty measurement. *International Journal of Food Science*, 1 (2013) 1-8.
3. Iwasa T., Motoyama N., Ambrose J.T., Roe R. M. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Protection*, 23 (2004) 371–378.
4. Guzsvány V., Csanádi J., Gaál F. NMR Study of the influence of pH on the persistence of some neonicotinoids in water, *Acta Chimica. Slovenica* 53 (2006) 52–57.
5. Di Prisco G., Cavaliere V., Annoscia D., Varricchio P., Caprio E., Nazzi F., Gargiulo G., Pennacchio F. Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Applied Biological Sciences*, 12 (2013) 1-6.
6. El Informe General sobre la actividad de la Unión Europea (2013).
7. Jovanov P., Guzsvány V., Franko M., Lazić S., Sakač M., Šarić B., Banjac V. Multi-residue method for determination of selected neonicotinoid insecticides in honey using optimized dispersive liquid–liquid microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* 111 (2013) 125–133.
8. Ford K. A., Casida J. E. Unique and Common metabolites of thiamethoxam, clothianidin, and dinotefuran in mice. *Chemical Research Toxicology*, 19 (2006), 1549-1556.
9. Taira K., Fujioka K., Aoyama Y. Qualitative profiling and quantification of neonicotinoid metabolites in human urine by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *PLOS ONE*. 8 (2013) 1-12.
10. Di Muccio A., Fidente P., Attard D., Dommarco R., Seccia S., Morrica P. Application of solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry to the determination of neonicotinoid pesticide residues in fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1108 (2006) 1–6.

11. Bonmatin J.M., Marchand P. A., Charvet R., Moineau I., Bengsch E. R., Colin M. E. Quantification of imidacloprid uptake in maize crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53 (2005) 5336-5341.
12. Watanabe E., Baba K., Eun H. Simultaneous determination of neonicotinoid insecticides in agricultural samples by solid-phase extraction cleanup and liquid chromatography equipped with diode-array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (2007) 3798-3804.
13. Wang Z., Xue M., Cui S., Ma X., Zhang Q., Li X. Determination of clothianidin residues in garlic by liquid chromatography–tandem mass spectrometry combined with QuEChERS. *Journal of Food, Agriculture and Environment*. 10 (2012) 232-236.
14. Zhonghua L., Yijun D., Guodong H., Yuyu G., Jueping N., Hua W., Sheng Y. Soil microbial degradation of neonicotinoid insecticides imidacloprid, acetamiprid, thiacloprid and imidacloprid and its effect on the persistence of bioefficacy against horsebean aphid *Aphis craccivora* Koch after soil application. *Pest Manag Sci*. 67 (2011) 1245–1252.
15. Thirumalaiandi R., Mariappan P., Ramabhadran J. Rapid and Sensitive Analytical Method for Simultaneous Determination of Imidacloprid and Thiamethoxam Residues in Soils of Sugarcane Ecosystem by Reversed-Phase HPLC. *Water Air Soil Pollut* 223 (2012) 6045–6050.
16. Rancan M., Sabatini A.G., Achilli G., Galletti G.C. Determination of Imidacloprid and metabolites by liquid chromatography with an electrochemical detector and post column photochemical reactor. *Analytica Chimica Acta* 555 (2006) 20–24.
17. Araujo K., Ettiene G., Hernández M., Cáceres A., Pérez H. Development of an online method for the determination of the insecticide imidacloprid in natural waters with photochemically induced fluorescence detection. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 29 (2012) 542-559.
18. Seccia S., Fidente P., Attard D., Morrica P. Multiresidue determination of nicotinoid insecticide residues in drinking water by liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 553 (2005) 21–26.
19. Schoning R., Schmuck R. Analytical determination of imidacloprid and relevant metabolite residues by LC MS/MS. *Bulletin of Insectology*, 56:1(2003) 41-50.

20. Nomura H., Ueyama J., Kondo T., Saitob I., Muratac K., Iwatac T., Wakusawaa S., Kamijimad M. Quantitation of neonicotinoid metabolites in human urine using GC-MS. *Journal of Chromatography B*. 941 (2013) 109–115.
21. Yáñez K. P., Martín M. T., Bernal J. L., Nozal M. J., Bernal J. Trace Analysis of Seven Neonicotinoid Insecticides in Bee Pollen by Solid–Liquid Extraction and Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Food Analysis Methods*, 7 (2014) 490–499.
22. Giroud B., Vauchez A., Vulliet E., Wiest L., Buleté A. Trace level determination of pyrethroid and neonicotinoid insecticides in beebread using acetonitrile-based extraction followed by analysis with ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1316 (2013) 53– 61.
23. Pohorecka K., et al. Residues of Neonicotinoid Insecticides in Bee Collected Plant Materials from Oilseed Rape Crops and Their Effect on Bee Colonies. *Journal of Apicultural Science*, 56:2 (2012) 115-134.
24. Bonmatin J. M, Moineau I., Charvet R., Fleche C., Colin M. E., Bengsch E. R. A LC/APCI-MS/MS Method for Analysis of Imidacloprid in Soils, in Plants, and in Pollens. *Analytical Chemistry*, 75 (2003) 2027-2033.
25. Fidente P., Seccia S., Vanni F., Morrica P. Analysis of neonicotinoid insecticides residues in honey by solid matrix partition clean-up and liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1094 (2005) 175–178.
26. Wang P., Yang X., Wang J., Cui J, Dong A .J., Zhao H.T., Zhang L. W., Wang Z.Y., Xu R. B., Li W. J., Zhang Y. C., Zhang H., Jing J. Multi-residue method for determination of seven neonicotinoid insecticides in grains using dispersive solid-phase extraction and dispersive liquid–liquid micro-extraction by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 134:3(2012) 1691-1698.
27. Vichaponga J., Burakham R., Srijaranai S. Vortex-assisted surfactant-enhanced-emulsification liquid–liquid microextraction with solidification of floating organic droplet combined with HPLC for the determination of neonicotinoid pesticides. *Talanta* 117 (2013) 221–228.

28. Cai L., Xing J., Dong L., Wu C. Application of polyphenylmethylsiloxane coated fiber for solid-phase microextraction combined with microwave-assisted extraction for the determination of organochlorine pesticides in Chinese teas. *Journal of Chromatography A*, 10 (2003) 11-21.
29. Lang Q., Wai C.M. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies — a practical review. *Talanta*, 53 (2001) 771–782.
30. Xiao Z., Li X., Wang X., Shen J., Ding S. Determination of neonicotinoid insecticides residues in bovine tissues by pressurized solvent extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 879 (2011) 117–122.
31. Singh S. B., Foster G. D., Khan S. U. Microwave-assisted extraction for the simultaneous determination of thiamethoxam, imidacloprid, and carbendazim residues in fresh and cooked vegetable samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (2004) 105–109.
32. Ramesh A., Thirugnanam P. E., Balakrishnamurthy P. Hapten synthesis, generation of polyclonal antibodies and development of ELISA for determination of thiamethoxam residues in food and environmental samples. *Indian Journal of Biotechnology*, 6 (2007) 365-371.
33. Kim H. J., Shelver W. L., Li Q. X. Monoclonal antibody-based enzyme-linked immune sorbent assay for the insecticide imidacloprid. *Analytica Chimica Acta*, 509 (2004) 111–118.
34. Watanabe E., Eun H., Baba K., Arao T., Ishii Y., Endo S., Ueji M. Evaluation and validation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for the neonicotinoid insecticide Imidacloprid in Agricultural Samples. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 52 (2004) 2756–2762.
35. Bo Mi K., Joon-Seong P., Jeong-Heui C., Abd E., Tae Woong N., Jae-Han S. Residual determination of clothianidin and its metabolites in three minor crops via tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 131 (2012) 1546–1551.
36. Zhou Q., Ding Y., Xiao J. Sensitive determination of thiamethoxam, imidacloprid and acetamiprid in environmental water samples with solid-phase extraction packed with multiwalled carbon nanotubes prior to high-performance liquid chromatography. *Analytical Bioanalysis Chemistry*, 385 (2006) 1520–1525.

37. Baskaran S., Kookana R.S, Naidu R. Simultaneous Determination of Imidacloprid, Thiacloprid, and Thiamethoxam in Soil and Water by High-performance Liquid Chromatography with Diode-array Detection *J Chromatogr A*. 787(1997)271–275.
38. Obana H., Okihashi M., Akutsu K., Kitagawa Y., Hori S. Determination of acetamiprid, imidacloprid, and nitenpyram residues in vegetables and fruits by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 50 (2002) 4464–4467.
39. Segura A., Cruces-Blanco C., Perez S., Fernandez A. Determination of imidacloprid and its metabolite 6-chloronicotinic acid in greenhouse air by application of micellar electrokinetic capillary chromatography with solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 1003 (2003) 189–195.
40. Rossi S., Sabatini A. G., Cenciarini R., Ghini S., Girotti S. Use of high-performance liquid chromatography–UV and gas chromatography–mass spectrometry for determination of the imidacloprid content of honeybees, pollen, paper filters, grass, and flowers. *Chromatographia*, 61 (2005) 189-195.
41. Ding T., Jacobs D., Lavine B. K. Liquid chromatography-mass spectrometry identification of imidacloprid photolysis products. *Microchemical Journal*, 99 (2011) 535–541.
42. Kitsiou V., Filippidis N., Mantzavinos D., Poulios I. Heterogeneous and homogeneous photocatalytic degradation of the insecticide imidacloprid in aqueous solutions. *Applied Catalysis B: Environmental*, 86 (2009) 27–35.
43. Guzvány V.J., Gaál F. F., Bjelica L. J., Ökrész S. N. Voltammetric determination of imidacloprid and thiamethoxam. *Journal of the Serbia. Chemical. Society*, 70:5 (2005) 735–743.
44. Guzsány V., Kádár M., Gaál F., Tóth K., Bjelica L. Rapid differential pulse polarographic determination of thiamethoxam in commercial formulations and some Real Samples. *Microchimica Acta*, 154 (2006) 321–328.
45. Ding T., Lavine B., K. Separation of imidacloprid and its degradation products using reversed phase liquid chromatography with water rich mobile phases. *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 9221– 9226.
46. Hernández F., Sancho J.V., Ibáñez M., Grimalt S. Investigation of pesticide metabolites in food and water by LC-TOF-MS. *Trends in Analytical Chemistry*, 10 (2008) 862 – 872.

47. Schulz-Jander D. A., Leimkuehler w. M, Casida J.E. Neonicotinoids insecticides: reduccion and cleavage of imidacloprid Nitroimine and cytosolic enzimes. Chemical Research Toxicology, 15 (2002), 1158-1165.