

*Original Article/Artículo Original*

## Comparison of two methods for multi-residue analysis of organophosphorus pesticides in agricultural products with high and low moisture content

### Comparación de dos métodos para el análisis multiresiduo de plaguicidas organofosforados en productos de origen agrícola con alto y bajo contenido de humedad

Bastidas-Bastidas, P. de J., Leyva-Morales, J. B.<sup>1\*</sup>, Olmeda-Rubio, C.<sup>2</sup>, Pineda-Landeros, J. M.<sup>2</sup>, Martínez-Rodríguez, I. E.<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Universidad Autónoma de Nayarit, Secretaría de Investigación y Posgrado, Centro Nayarita de Innovación y Transferencia de Tecnología, A.C. (CENITT).

Av. Emilio M. González s/n, Col. Cd. Industrial, Tepic, Nayarit, México, C.P. 63173.

<sup>2</sup> Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (Unidad Culiacán). Carretera a Eldorado km. 5.5, Campo el Diez, Culiacán, Sinaloa, México, C.P. 80129.

<sup>3</sup> Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (Unidad Mazatlán) Avenida Sábalo-Cerritos, S/N, Mazatlán, Sinaloa, México, C.P. 82112.

**Cite this paper/Como citar este artículo:** Bastidas-Bastidas, P. de J., Leyva-Morales, J. B., Olmeda-Rubio, C., Pineda-Landeros, J. M., Martínez-Rodríguez, I. E. (2019). Comparison of two methods for multi-residue analysis of organophosphorus pesticides in agricultural products with high and low moisture content. *Revista Bio Ciencias* 6(nesp), e654. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.06.nesp.e654>



#### ABSTRACT

The current trend for chemically innocuous food production, in order to guarantee consumers' health, induces a need for analyzing chemical contaminants associated to their production. As pesticides are one of the main residues demanding a special attention, their analysis in food becomes an imperative need. Considering that organophosphorus pesticides are the most used for worldwide pesticide control, a methodological comparison (PAM 302 vs. QuEChERS methods) of the determination of four compounds of this type in matrixes of low and high moisture content was performed in the present study, emphasizing on their assessment depending on the parameters of detection and quantification limits, linearity, accuracy and precision. In addition, the application of both methods in real samples was performed, thus demonstrating its efficiency.

#### Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: January 17<sup>th</sup> 2017

Accepted/Aceptado: April 18<sup>th</sup> 2018

Available on line/Publicado: March 26<sup>st</sup> 2019.

#### RESUMEN

La tendencia actual por la producción de alimentos inocuos desde el punto de vista químico con el fin de garantizar la salud de los consumidores induce a la necesidad de analizar contaminantes químicos asociados a la producción de estos. Siendo los plaguicidas uno de los principales residuos que demandan especial atención, el análisis de estos en los alimentos se convierte en una necesidad prioritaria. Considerando que los plaguicidas organofosforados son de los más utilizados para el control de plagas a nivel mundial, en el presente estudio se realizó una comparación metodológica (Método PAM 302 vs. QuEChERS) de la determinación de cuatro compuestos de este tipo en matrices de bajo y alto contenido de humedad enfatizando la evaluación de estos en función de los parámetros de límites de detección y cuantificación, linealidad, exactitud y precisión. Además, se realizó la aplicación de ambos métodos en muestras reales demostrando así su eficiencia.

#### \*Corresponding Author:

Leyva-Morales, J. B.: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Universidad Autónoma de Nayarit, Secretaría de Investigación y Posgrado, Centro Nayarita de Innovación y Transferencia de Tecnología, A.C. (CENITT). Av. Emilio M. González s/n, Col. Cd. Industrial, Tepic, Nayarit, México, C.P. 63173. Tel.: +52(311) 4 56 67 41. E-mail: [neo1702@gmail.com](mailto:neo1702@gmail.com)

---

## KEY WORDS

---

organophosphorus pesticides, agricultural products, food safety.

---

### Introduction

Nowadays there is a trend from the phytosanitary authorities to require food safety, in order to guarantee consumers' health. From the different chemical risks associated with food primary production, pesticides and specific residues deriving from their use represent the main group of attention, since residues analyses of pesticides in food determine the trade of these products (Codex Alimentarius, 2016). International Organizations such as Food and Agriculture Organization (FAO), European Commission, Food and Drug Administration of the United States (FDA) and the Federal Commission of Health Risks Protection in Mexico (COFEPRIS) establish the so-called Maximum Residue Limits (MRL), which refer to the lowest concentration of pesticide residues found in food that has previously been demonstrated to be safe for consumers (CICOPLAFEST, 2016; Codex Alimentarius, 2016; EPA, 2016a, b; European Commission, 2016; FDA, 2016). It is important to mention that MRL which are emitted and published by the Codex Alimentarius is just a guide and each country is free to adopt or establish its own MRLs, adjusting them on the basis of their own characteristics regarding food consuming habits and modality of use of pesticides in agriculture, ensuring that they consider environmental and health aspects (Codex Alimentarius, 2016).

In this sense, the presence and/or absence of agrochemical contaminants (phytosanitary) in food must to be demonstrated, therefore it is necessary to rely on increasingly sensitive and selective analytical techniques, allowing warning on the presence of these potentially harmful contaminants for consumers' health. To do so, laboratories for pesticide residues analysis have used multi-residues methods which have been modified throughout the years, mainly adjusting to the technological development of the measurement tools (FDA, 1999). These methods were firstly semi-quantitative and were performed using paper chromatography, then the development of gas chromatography allowed for more precise measurements, in addition to the use of specific and

---

## PALABRAS CLAVE

---

plaguicidas organofosforados, productos agrícolas, inocuidad química

---

### Introducción

En la actualidad existe una tendencia por parte de las autoridades fitosanitarias a exigir la inocuidad de los alimentos, esto con el fin de garantizar la salud de los consumidores. De los diferentes peligros químicos asociados a la producción primaria de alimentos, los plaguicidas y específicamente los residuos que derivan de su uso representan el principal grupo de atención, por lo que los análisis de residuos de plaguicidas en los alimentos condicionan el comercio de estos productos (Codex Alimentarius, 2016). Debido a esto organismos internacionales como la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés), la Comisión Europea, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) y la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) en México establecen los denominados Límites Máximos de Residuos (MRL), los cuales se refieren a la concentración más baja de residuos de plaguicidas encontrada en los alimentos que ha sido previamente demostrado que es segura para los consumidores (CICOPLAFEST, 2016; Codex Alimentarius, 2016; EPA, 2016a,b; European Commission, 2016; FDA, 2016). Cabe resaltar que los MRL emitidos y publicados por el Codex Alimentarius son sólo una guía y cada país puede adoptar o establecer sus propios MRL s que se ajusten a sus características propias en cuanto a hábitos de consumo de alimentos y modalidades de uso de los plaguicidas en la agricultura, asegurando que tengan en cuenta los aspectos ambientales y de sanidad (Codex Alimentarius, 2016).

En este ámbito, se debe demostrar la presencia y/o ausencia de contaminantes agroquímicos (fitosanitarios) en los alimentos, por lo que es necesario contar con técnicas analíticas cada vez más sensibles y selectivas, que permitan alertar sobre la presencia de estos contaminantes potencialmente dañinos a la salud del consumidor. Para esto, los laboratorios para el análisis de residuos de plaguicidas han usado métodos multiresiduos que han sido modificados a través de los años ajustándose principalmente al desarrollo tecnológico de los instrumentos de medición (FDA, 1999). Dichos métodos al principio fueron semi cuantitativos y se realizaban empleando la cromatografía en papel, posteriormente el desarrollo de la cromatografía de gases permitió mediciones más precisas aunado al uso de detectores específicos y selectivos (Mills et

selective detectors (Mills *et al.* 1963; Luke *et al.* 1975, 1981, 1983; Lee *et al.*, 1991). However, these traditional methods generally include procedures of sample preparation which require large periods of time, high quantities of toxic organic solvents, various steps of extraction of analytes and elimination of interferences (Ramos, 2012; Puri, 2014; Nollet & Rathore, 2016).

An alternative to these methods is the called "QuEChERS method" (acronym of Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe), developed by Anastassiades *et al.* (2003) in order to analyze veterinary drugs, is used nowadays due to its high potential to adapt to analysis of pesticide residues in both agricultural and animal products and has been widely accepted by the international community for the analysis of pesticide residues in different foods. Some of the food matrixes in which it has been demonstrated to be successful for pesticide extraction are: avocado (Benavides & Echeverría, 2014), rice (Hou *et al.*, 2013), shrimp (Omar *et al.*, 2013), peach (Pinho Costa *et al.*, 2014), cocoa grains (Dankyi *et al.*, 2015), orange juice (Rizzetti *et al.*, 2016), olive oil (García-Reyes *et al.*, 2007), tamarind (Paz *et al.*, 2015), corn and soy (Marchis *et al.*, 2012).

For the above mentioned, the aim of the present study was to perform a comparative study between the QuEChERS method and the conventional PAM 302 method (liquid-liquid extraction) for determining organophosphorus pesticides residues in agricultural products of high (> 80 %) and low (< 10 %) moisture content. To that end, 4 pesticides, representative of the organophosphorus group (acephate, methamidophos, dichlorvos and dimethoate) were analyzed, using Ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometer (UPLC-MS/MS) and gas chromatography with flame photometric detector (GC-FPD); the comparison of the methods was performed using different parameters of validation like: recuperation, linearity, precision (like repeatability), accuracy and detection and quantification limits.

## Material and methods

### Analytical standards

An individual stock solution was prepared for each one of the analytical standards of high purity organophosphorus pesticides (> 97 %), in acetone, from which mixtures were prepared at intermediate

*al.* 1963; Luke *et al.* 1975, 1981, 1983; Lee *et al.*, 1991). Sin embargo, estos métodos tradicionales generalmente incluyen procedimientos de preparación de muestra que requieren largos periodos de tiempo, grandes cantidades de disolventes orgánicos tóxicos, varios pasos de extracción de los analitos y eliminación de interferencias (Ramos, 2012; Puri, 2014; Nollet & Rathore, 2016).

Una alternativa a estos métodos es el llamado "Método QuEChERS" (acrónimo de Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) desarrollado por Anastassiades *et al.* (2003), con la finalidad de analizar drogas veterinarias, es utilizado en la actualidad debido a su gran potencial de adaptación al análisis de residuos de plaguicidas en productos de tanto de origen agrícola como animal y ha sido ampliamente aceptado por la comunidad internacional para el análisis de residuos de plaguicidas en diferentes alimentos. Algunas de las matrices alimentarias en las cuales ha demostrado ser exitoso para la extracción de plaguicidas son: aguacate (Benavides & Echeverría, 2014), arroz (Hou *et al.*, 2013), camarón (Omar *et al.*, 2013), durazno (Pinho Costa *et al.*, 2014), granos de cocoa (Dankyi *et al.*, 2015), jugo de naranja (Rizzetti *et al.*, 2016), aceite de oliva (García-Reyes *et al.*, 2007), tamarindo (Paz *et al.*, 2015), maíz y soya (Marchis *et al.*, 2012).

Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue realizar un estudio comparativo entre el método convencional PAM 302 (extracción líquido-líquido) y el método QuEChERS para la determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en productos agrícolas de alto (> 80 %) y bajo contenido (< 10 %) de humedad. Para ello, se analizaron 4 plaguicidas representativos del grupo de organofosforados (acefato, metamidofos, diclorvos y dimetoato) utilizando cromatografía líquida de ultradesempeño acoplada a espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS) y cromatografía de gases con detector fotométrico de flama (GC-FPD); la comparación de los métodos se realizó utilizando diferentes parámetros de validación como: recuperación, linealidad, precisión (como repetibilidad), exactitud y límites de detección y cuantificación.

## Material y métodos

### Estándares analíticos

Se preparó una solución madre individual de cada uno los estándares analíticos de plaguicidas organofosforados de alta pureza (> 97 %), en acetona, a

**Table 1.**  
**Stock solution of the analytes under study**

**Tabla 1.**  
**Solución madre de los analitos bajo alcance**

Analytical Standard	Percentage of Purity (%)	Stock solution (mg/mL)
Acephate	99.5	1.8208
Methamidophos	97.7	1.1138
Dichlorvos	98	5.3625
Dimethoate	99.2	4.956
Atrazine d5 (IS)	98	0.49
IS= Internal Standard		
IS= Estándar Interno		

concentrations of 10 ng/μL and 50 ng/μL that were used to fortify control samples and prepare working solutions in the same solvent (Table 1).

#### Material of analysis

Control samples of fresh tomato (as a product with high moisture content) were obtained from a producer of organic fruits while wheat flour samples (as product with low moisture content) were acquired in the local market of the city of Culiacan, Sinaloa, both were previously analyzed in duplicate to demonstrate that they were free of analytes under scope.

#### Sample preparation

Products with high (tomato) and low (flour) moisture content were prepared according to that reported in the Pesticide Analytical Manual (PAM), specifically in the 102-A section, which refers to sample preparation for pesticide analysis. In the case of tomato, the edible part was blended and homogenized in an industrial blender (Brand: Waring, Model: 7010G), where a portion was taken as a representative sample for the analysis; while in the case of flour, a subsample required for the analysis was taken (FDA, 1999).

partir de la cual se prepararon mezclas a concentraciones intermedias de 10 ng/μL y 50 ng/μL que se utilizaron para fortificar las muestras control y para preparar las disoluciones de trabajo en el mismo solvente (Tabla 1).

#### Material de análisis

Muestras control de fruto fresco de tomate (como producto de alto contenido de humedad) fueron obtenidas de un productor de frutos orgánicos mientras que muestras de harina de trigo (como producto de baja humedad) se adquirieron en el mercado local de la ciudad de Culiacán, Sinaloa, ambas fueron previamente analizadas por duplicado para demostrar que se encontraban libres de los analitos bajo alcance.

#### Preparación de la muestra

Los productos con alto (tomate) y bajo contenido (harina) de humedad fueron preparados conforme a lo reportado en el Manual Analítico de Plaguicidas (PAM), específicamente en el apartado 102-A referente a la preparación de muestras para el análisis de plaguicidas. En el caso del tomate, la parte comestible fue licuada y homogenizada en una licuadora industrial (Marca: Waring, Modelo: 7010G), donde una porción fue tomada como muestra representativa para el análisis; mientras que en el caso de la harina se tomó la submuestra necesaria para el análisis (FDA, 1999).

**Determination of pesticides by PAM 302 method**

In the case of samples with high moisture content,  $100 \pm 1.0$  g of the prepared sample were weighted in a blender glass and 200 mL of acetone were added; in the case of samples with low moisture content, between 10 and  $50 \pm 0.5$  g were weighted in a blender glass and 350 mL of a mixture of water-acetone at 35 % were added, and they were blended at high speed for 2 min. In both cases, the extract was vacuum filtered using a pump (Brand: Welch, Model: 2567B-50B), and an aliquot of 40 mL was placed in a 1,000 mL separating funnel containing 7.0 g of sodium chloride, then 50 mL of methylene chloride and 50 mL of acetone (all the solvents were HPLC grade), it was shaken for 1 minute and the phases were let separated, the aqueous phase (lower phase) was transferred to a second 500 mL separating funnel, while the organic phase was filtered through anhydrous sodium sulphate and received in a 500 mL Kuderna-Danish concentrator. The aqueous layer contained in the 500 mL separating funnel was re-extracted again twice with 50 mL of methylene chloride, each re-extraction was passed through anhydrous sodium sulphate and was received in the Kuderna-Danish concentrator, at the end sodium sulphate was rinsed with 30 mL of methylene chloride. Some heating pearls were added to the heater and a Snyder column was placed inside, initiating the evaporation, in a concentric rings steam bath (Brand: Therm Scientific, Model: 2898), at low temperature (to avoid abrupt reaction of solvents), which was progressively increased. It was evaporated almost until dryness and then 100 mL of petroleum ether were added, it was evaporated almost until dryness and 50 mL more of petroleum ether were added, the evaporation was pursued almost until dryness and 30 mL of acetone were added, doing it on the walls of the column to drag possible rest of samples, it was evaporated to obtain approximately 1.0 mL of the extract. Then it was let cooling and after that the intern standard of triphenyl phosphate (TPP) was added and were diluted with 4 mL of acetone, until subsequent determination of the extract by means of gas chromatography with flame photometric detector (CG-FPD) (FDA, 1999).

**Instrumentation and chromatographic conditions**

Standards and samples were automatically injected by means of an autosampler 7693 of Agilent with split/splitless injection ports with a 30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m capillary column Brand Agilent VF-5 Pesticides, under the following conditions (Table 2).

**Determinación de plaguicidas mediante el método PAM 302**

Para el caso de muestras con alto contenido de humedad,  $100 \pm 1.0$  g de la muestra preparada, fueron pesados en un vaso de licuadora y se agregaron 200 mL de acetona; para el caso de muestras secas, entre 10 y  $50 \pm 0.5$  g fueron pesados en vaso de licuadora y se agregaron 350 mL de una mezcla de agua-acetona al 35 % y se licuaron a alta velocidad por 2 min. En ambos casos, el extracto se filtró al vacío utilizando una bomba (Marca: Welch, Modelo: 2567B-50B), y una alícuota de 40 mL se colocó en un embudo de separación de 1,000 mL conteniendo 7.0 g de cloruro de sodio, posteriormente se adicionaron 50 mL de cloruro de metileno y 50 mL de acetona (todos los solventes fueron grado HPLC), se agitó por un minuto y se dejaron separar las fases, la fase acuosa (inferior) fue transferida a un segundo embudo de separación de 500 mL, mientras que la fase orgánica fue filtrada a través de sulfato de sodio anhidro y recibida en un concentrador Kuderna-Danish de 500 mL. La capa acuosa contenida en el embudo de separación de 500 mL fue re-extraída dos veces más con 50 mL de cloruro de metileno, cada re-extracción fue pasada a través del sulfato de sodio anhidro y recibida en el concentrador Kuderna-Danish al final el sulfato de sodio fue enjuagado con 30 mL de cloruro de metileno. Se agregaron algunas perlas de calentamiento al concentrador y se le colocó una columna Snyder, iniciando la evaporación, en un baño de vapor de anillos concéntricos (Marca: Thermo scientific, Modelo: 2898), a temperatura suave (para evitar reacción brusca de los solventes) la cual se fue aumentando paulatinamente, se evaporó casi a sequedad y luego se agregaron 100 mL de éter de petróleo, se evaporó casi a sequedad y se agregaron 50 mL más de éter de petróleo, se continuó la evaporación casi a sequedad y se agregaron 30 mL de acetona, haciéndolo por las paredes de la columna para arrastrar posibles restos de muestra, se evaporó para obtener aproximadamente 1.0 mL del extracto. Se dejó enfriar y luego se agregó el estándar interno de trifenílfosfato (TPP) y se aforó a 4 mL con acetona, quedando listo el extracto para para su posterior determinación mediante cromatografía de gases con detector fotométrico de flama (CG-FPD) (FDA, 1999).

**Instrumentación y condiciones cromatográficas**

Los estándares y las muestras fueron inyectados de forma automática a través de un automuestreador 7693 de Agilent a puertos de inyección split/splitless con columna capilar Marca Agilent VF-5 Pesticides de 30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m, bajo las siguientes condiciones (Tabla 2).

**Table 2.**  
**Program of temperature of the oven used in the chromatographic separation**

**Tabla 2.**  
**Programa de temperatura del horno usado en la separación cromatográfica**

Stage	Temperature (°C)	Rate (°C/min)	Duration (min)	Total (min)
Inicial	100	--	2	2
1	170	20	1.25	6.75
2	275	4	12	45

Temperature of the Injector: 250°C  
 Gas: Helium 1.5 mL/min  
 Make up: Nitrogen 30 mL/min  
 Mode: Split - Rate 10:1  
 Volume of injection: 2.0 µL  
 Temperature of the detector: FPD-250 °C

Temperatura del Inyector 250°C  
 Gas: Helio 1.5 mL/min  
 Make up: Nitrógeno 30 mL/min  
 Modo: Split - Tasa 10:1  
 Volumen de inyección: 2.0 µL  
 Temperatura del detector: FPD-250 °C

#### Calculations

To calculate the concentration of analyte in the sample, an external standard was used by means of the use of the following formula:

$$PPM \text{ or } mg/kg = \frac{(response \text{ of pick of the sample}) \times (ng \text{ of injected standar})}{(response \text{ of the pick of the sample}) \times (mg \text{ equivalent of injected sample})}$$

$$mg \text{ equivalent} = W \times \frac{mL \text{ de aliquot}}{Total \text{ volume of the filtrate}} \times \frac{1}{Final \text{ volume}}$$

Where:

W = Weight of the sample in grams.

Total volume = 200 + M.

200 = Volume of solvent used in the extraction.

M = Moisture content in the sample in mL.

#### Determination of pesticides by QuEChERS method

##### Extraction and partition

15 ± 0.1 g of sample were weighted in the case of products with high moisture content (fresh fruits) and 1-5 ± 0.05 g of dry samples (flour) in a 50 mL centrifuge tube. In the case of dry samples, 10 g of water were added and it was let resting for 10 minutes to ensure moisturizing, later 15 mL of acidified acetonitrile at

#### Cálculos

Para calcular la concentración del analito en la muestra se utilizó un estándar externo mediante el uso de la fórmula siguiente:

$$PPM \text{ or } mg/kg = \frac{(respuesta \text{ del pico de la muestra}) \times (ng \text{ de estandar inyectados})}{(respuesta \text{ del pico de la estandar}) \times (mg \text{ equivalentes de muestra inyectados})}$$

$$mg \text{ equivalentes} = P \times \frac{mL \text{ de aliquot}}{Total \text{ volume of the filtrate}} \times \frac{1}{Vol. \text{ final}}$$

Donde:

P= Peso de la muestra en gramos.

Volumen total = 200 + W.

200 = Volumen de solvente usado en la extracción.

W = Contenido de humedad en la muestra en mL.

#### Determinación de plaguicidas mediante el método QuEChERS

##### Extracción y partición

Se pesaron 15 ± 0.1 g para el caso de productos con alto contenido de humedad (frutos frescos) y 1-5 ± 0.05 g de muestras secas (harina) en un tubo de 50 mL para centrifuga. En el caso de las muestras secas se agregaron 10 g de agua y se dejó reposar 10 minutos para asegurar la hidratación, posteriormente se adicionaron 15

1 % with acetic acid were added and shaken in an ultrasound bath (Brand: Branson, Model: CPX8800H) for 10 minutes, posteriorly 6.0 g of magnesium sulphate and 1.5 g of sodium acetate were added, mixed manually and vigorously for one minute and centrifuged (centrifuge Brand: Hettich, Model: EBA21) at 4,000 r.p.m. for 5 minutes.

#### Clean-up (dispersion in solid phase)

From 1 to 8 mL of supernatant were placed into a centrifuge tube containing 50 mg of primary/secondary amine (PSA) and 150 mg of anhydrous magnesium sulphate for each millimeter of extract, it was mixed with vortex for one minute and then centrifuged at 4,000 r.p.m. for 5 minutes.

#### Dilution

100  $\mu$ L of dispersed supernatant were taken and diluted with 890  $\mu$ L of mobile phase of ammonium formate 5 mM pH 3.0 + 10  $\mu$ L of the internal standard solution (d5 atrazine at 0.4900 ng/ $\mu$ L) for its determination by means of Ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometer (UPLC-MS/MS).

#### Calculations

The calculation of results (concentration in mg/kg) was realized by means of the method of internal standard as expressed below:

$$\text{ppm o } \frac{\text{mg}}{\text{kg}} = \frac{\frac{\text{Response of analyte in sample}}{\text{Response of IS in sample}} \times \frac{\text{ng of injected standard}}{\text{ng of injected IS}}}{\frac{\text{Response of standard}}{\text{Response of IS in standard}} \times \frac{\text{mg equivalent injected of sample}}{\text{ng of IS in sample}}}$$

Where:

IS = Internal Standard

#### Instrumentation and chromatographic conditions

Each sample was automatically injected through a Sample-Manager system – FTN Acquity of Waters to an equipment of Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC Acquity serie H) equipped with a column Brand Waters Acquity UPLC BEH  $C_{18}$  1.7 $\mu$ m, 2.1 x 50mm, in a volume of 5.0  $\mu$ L. Conditions employed were established by the laboratory during the development of the chromatographic method, with mobile phase A (ammonium

mL de acetonitrilo acidificado al 1 % con ácido acético y se agitaron en baño ultrasónico (Marca: Branson, Modelo: CPX8800H) por 10 minutos, posteriormente se agregaron 6.0 g de sulfato de magnesio más 1.5 g de acetato de sodio, se mezclaron manualmente de forma vigorosa durante un minuto y se centrifugaron (centrífuga Marca: Hettich, Modelo: EBA21) a 4,000 r.p.m. por 5 minutos.

#### Limpieza (dispersión en fase sólida)

De 1 a 8 mL del sobrenadante se colocaron en un tubo de centrifuga conteniendo 50 mg de amina primaria/secundaria (PSA) y 150 mg de sulfato de magnesio anhidro por cada mililitro de extracto tomado se mezclaron con vórtex por un minuto y luego se centrifugaron a 4,000 r.p.m. por 5 minutos.

#### Dilución

Se tomaron 100  $\mu$ L del sobrenadante dispersado, se diluyeron con 890  $\mu$ L de fase móvil formiato de amonio 5 mM pH 3.0 + 10  $\mu$ L de la disolución de estándar interno (atrazina d5 a 0.4900 ng/ $\mu$ L) para su determinación por Cromatografía Líquida de Ultradeseño con Detector de Espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS).

#### Cálculos

El cálculo de resultados (concentración en mg/kg) se realizó mediante el método de estándar interno tal como se expresa a continuación:

$$\text{ppm o } \frac{\text{mg}}{\text{kg}} = \frac{\frac{\text{Respuesta del analito en la muestra}}{\text{Respuesta del IS en la muestra}} \times \frac{\text{ng de estandar inyectados}}{\text{ng de IS inyectados}}}{\frac{\text{Respuesta del estandar}}{\text{Respuesta del IS en el estandar}} \times \frac{\text{mg equivalentes inyectados de muestra}}{\text{ng de IS en la muestra}}}$$

Donde:

IS = Estándar Interno

#### Instrumentación y condiciones cromatográficas

Cada muestra fue inyectada de forma automática a través de un sistema Sample Manager– FTN Acquity de Waters a un equipo de cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución (UPLC Acquity serie H) equipado con columna Marca Waters Acquity UPLC BEH  $C_{18}$  1.7 $\mu$ m, 2.1 x 50mm, en un volumen de 5.0  $\mu$ L. Las condiciones empleadas fueron establecidas por el laboratorio durante el desarrollo del método cromatográfico, quedando como

formate 5 mM, pH 3.0) and mobile phase B (methanol + ammonium formate 5 mM + 0.1 % of formic acid), with the following gradient (Table 3).

fase móvil A (formiato de amonio 5 mM, pH 3.0) y fase móvil B (metanol + formiato de amonio 5 mM + 0.1 % de ácido fórmico) con el siguiente gradiente (Tabla 3).

**Table 3.**  
**Gradient of the chromatographic method UPLC / MS-MS**

**Tabla 3.**  
**Gradiente del método cromatográfico UPLC / MS-MS**

Gradient	Time (min)	Flow (mL/min)	% A	%B
0	Inicial	0.35	83	17
1	5	0.35	10	90
2	5.1	0.35	10	90
3	7.5	0.35	83	17

With a total running time of 9.0 minutes. The identification and quantification were performed by means of ESI<sup>+</sup> mode in a Mass Spectrometer Xevo TQ-S of Waters and workstation MassLynx. Ions were monitored using MRM (Multiple Reaction Monitoring) for at least two transitions under the following conditions of tandem mass (Table 4).

Con un tiempo total de corrida de 9.0 minutos. La identificación y cuantificación se realizó mediante sonda ESI<sup>+</sup> en un espectrómetro de masas Xevo TQ-S de Waters y estación de trabajo MassLynx. Los iones fueron monitoreados usando MRM (Multiple Reaction Monitoring) para al menos dos transiciones bajo las siguientes condiciones de tándem masas (Tabla 4).

**Table 4.**  
**MS tandem conditions for the analytes under the scope**

**Tabla 4.**  
**Condiciones en tándem de MS para los analitos bajo el alcance**

Analite	Parent m/z	Daughter m/z	Dwell (s)	Cone (V)	Collision (eV)
Acephate	184.1	125.1	0.003	8	18
		143	0.003	8	8
Methamidophos	142	93.9	0.003	17	13
		124.9	0.003	17	13
Dichlorvos	221	79	0.003	23	34
		109	0.003	23	22
Dimethoate	230.1	125	0.003	12	20
		199	0.003	12	10
Atrazine d5	221.3	78.89	0.003	40	24
		100.98	0.003	40	22
		136.99	0.003	40	22



### Experiments for verification

#### Fortified control samples (in distinct days) for fresh product

Level 1. Control sample (fresh tomato) fortified with 200  $\mu\text{L}$  of mixture at the concentration of 10 ng/ $\mu\text{L}$  (low level).

Level 2. Control sample (fresh tomato) fortified with 1 mL of mixture at the concentration of 10 ng/ $\mu\text{L}$  (medium level).

Level 3. Control sample (fresh tomato) fortified with 2.5 mL of mixture at the concentration of 50 ng/ $\mu\text{L}$  (high level).

#### Fortified control samples (in distinct day) for dry product

Level 1. Control sample (grain wheat) fortified with 200  $\mu\text{L}$  of mixture at the concentration of 10 ng/ $\mu\text{L}$  (low level).

Level 2. Control sample (grain wheat) fortified with 1 mL of mixture at the concentration of 10 ng/ $\mu\text{L}$  (medium level).

Level 3. Control sample (grain wheat) fortified with 2.5 mL of mixture at the concentration of 50 ng/ $\mu\text{L}$  (high level).

#### Parameters of verification evaluated in the methodological comparison

In both methods, the parameters limit of detection (LOD), limit of quantification limit (LOQ), linearity of the equipment (working interval), linearity of the method, accuracy and precision of the method (in conditions of repeatability) were assessed according to EURACHEM validation guide and posteriorly a comparison of these parameters were performed between both methods.

#### Linearity of the method and working linear interval (measuring equipment)

To establish the linearity of the system, a calibration curve was constructed for each analyte with six levels of concentration (range 0.05 to 1.0 ng/ $\mu\text{L}$ ) for PAM 302 method and seven levels of concentration (range 1.0 to 40  $\mu\text{g/L}$ ) for QuEChERS method. For this, standards were used in mixture, each level of concentration of the mixture of standards was analyzed under operating conditions and graphs of area were

### Experimentos para la verificación

#### Muestras control fortificadas (en días distintos) para producto fresco

Nivel 1. Muestra control (tomate fresco) fortificada con 200  $\mu\text{L}$  de mezcla a la concentración 10 ng/ $\mu\text{L}$  (nivel bajo).

Nivel 2. Muestra control (tomate fresco) fortificada con 1 mL de mezcla a la concentración 10 ng/ $\mu\text{L}$  (nivel intermedio).

Nivel 3. Muestra control (tomate fresco) fortificada con 2.5 mL de mezcla a la concentración 50 ng/ $\mu\text{L}$  (nivel alto).

#### Muestras control fortificadas (en días distintos) para producto seco

Nivel 1. Muestra control (trigo grano) fortificada con 200  $\mu\text{L}$  de mezcla a la concentración 10 ng/ $\mu\text{L}$  (nivel bajo).

Nivel 2. Muestra control (trigo grano) fortificada con 1 mL de mezcla a la concentración 10 ng/ $\mu\text{L}$  (nivel intermedio).

Nivel 3. Muestra control (trigo grano) fortificada con 2.5 mL de mezcla a la concentración 50 ng/ $\mu\text{L}$  (nivel alto).

#### Parámetros de verificación evaluados en la comparación metodológica

En ambos métodos se evaluaron los parámetros de límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), linealidad del equipo (intervalo de trabajo), linealidad del método, exactitud y precisión del método (en condiciones de repetibilidad) según la guía de validación del EURACHEM y posteriormente se hizo una comparación de estos entre los métodos.

#### Linealidad del método e Intervalo lineal de trabajo (equipos de medición)

Para establecer la linealidad del sistema se construyó una curva de calibración para cada analito con seis niveles de concentración (0.05 ng/ $\mu\text{L}$  a 1.0 ng/ $\mu\text{L}$ ) para método PAM 302 y siete niveles de concentración (rango 1.0 a 40  $\mu\text{g/L}$ ) para el caso del método QuEChERS. Para este ejercicio se usaron los estándares en mezcla, cada nivel de concentración de la mezcla de estándares fue analizada bajo condiciones de operación y se obtuvieron gráficas

obtained under the curve of theoretical concentration against the response of the detectors (counts of area), using Excel 2010 and confirming with the graph generated by MS Workstation 7.01 and OpenLab Chemstation software for the PAM 302 method and by MassLynx software for QuEChERS method.

The linearity of the method was established with the fortification of control sample in three levels of concentration, high, medium and low, previously mentioned within the working linear range and drawing a graph with the average quantity of recovering against the quantity of added analyte, in both cases (linearity of the system and of the method), the criterion of acceptance according to EURACHEM (1998) is that the coefficient of determination ( $R^2$ ) is higher or equal to 0.98.

#### **Precision (Repeatability)**

It was determined by fortifying control samples in three levels of concentration (low, medium and high), seven replicates of each level of concentration and each level in different days were performed and in the determining step they were ran in simple replicate, percentages of recovering were calculated (% R) and the precision in repeatability conditions was assessed as the coefficient of variation (% CV) of the repetitions of the medium level.

$$\% CV = (\sigma/\text{Mean}) * 100$$

Where:

$\sigma$  = Standard deviation of the 7 replicates.

Mean = Average of recovering in the 7 replicates.

The criterion of acceptance is that percentage of CV is  $\leq 20$  % (EURACHEM, 1998).

#### **Accuracy (% of recovering)**

To evaluate this parameter, data of the percentage of recovering obtained in each level were taken and the average recuperation of the three levels was obtained for each analyte.

$$\% \text{ de recovering} = (\text{Observed Concentration}/\text{Expected Concentration}) * 100$$

The criterion of acceptance was that the percentage of recovering is between 70 and 120 % (EURACHEM, 1998).

de área bajo la curva de la concentración teórica contra respuesta de los detectores (conteos de area), usando Excel 2010 y confirmando con el gráfico generado por los softwares MS Workstation 7.01 y OpenLab Chemstation, para método PAM 302 y por el software MassLynx para método QuEChERS.

La linealidad del método se estableció con la fortificación de muestras control en tres niveles de concentración alto, medio y bajo mencionadas anteriormente dentro del rango lineal de trabajo y graficando el promedio de las cantidades de recobro contra las cantidades de analito agregadas, en ambos casos (linealidad del sistema y del método), el criterio de aceptación según el EURACHEM (1998) es que el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) sea mayor o igual que 0.98.

#### **Precisión (Repetibilidad)**

Se determinó fortificando muestras control en tres niveles de concentración (bajo, medio y alto), se realizaron siete réplicas de cada nivel de concentración y cada nivel en días diferentes y en la etapa determinativa fueron corridas en réplica simple, se calcularon los porcentajes de recobro (% R) y la precisión en condiciones se repetibilidad se evaluó como el coeficiente de variación (% CV) de las repeticiones del nivel intermedio.

$$\% CV = (\sigma/\text{Media}) * 100$$

Donde:

$\sigma$  = Desviación estándar de las 7 réplicas.

Media = Promedio del recobro en las 7 réplicas.

El criterio de aceptación es que el porcentaje del CV debe ser  $\leq 20$  % (EURACHEM, 1998).

#### **Exactitud (% de recobro)**

Para evaluar este parámetro se tomaron los datos de porcentaje de recobro obtenidos en cada nivel y se obtuvo el promedio de las recuperaciones de los tres niveles para cada analito.

$$\% \text{ de recobro} = (\text{Concentración Observada}/\text{Concentración Esperada}) * 100$$

El criterio de aceptación es que el porcentaje de recobro debe estar entre el 70 % y 120 % (EURACHEM, 1998).

### Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantification (LOQ)

These parameters were estimated from the data of repeatability of first level of fortification calculating the recuperated concentration and obtaining the standard deviation (SD) which was used to estimate detection limits (LODs) and quantification limits (LOQs) of the method, as described in the following formula (USEPA, 2000):

$$\text{LOD} = t_{0.99} * \text{SD}$$

$$\text{LOQ} = 3 * \text{LOD}$$

$\text{LOD} = t_{0.99} * \text{SD}$  ( $t_{0.99} = 3.1427$ ; value from tables of one-tail t-Student with 6 degrees of freedom ( $n = 7$ ) and 99 % of confidence level).

### Límite de detección (LOD) y Límite de Cuantificación (LOQ)

Estos parámetros fueron estimados de los datos de la repetibilidad del primer nivel de fortificación calculando la concentración recuperada y obteniendo la desviación estándar (SD) que se utilizó para estimar los límites de detección (LODs) y de cuantificación (LOQs) del método como se describe en las siguientes fórmulas (USEPA, 2000):

$$\text{LOD} = t_{0.99} * \text{SD}$$

$$\text{LOQ} = 3 * \text{LOD}$$

$\text{LOD} = t_{0.99} * \text{SD}$  ( $t_{0.99} = 3.1427$ ; valor de tablas de t de Student de una cola con 6 grados de libertad ( $n=7$ ) y 99% de nivel de confianza).

## Results and Discussion

### Detection Limits (LODs) and Quantification Limits (LOQs)

Detection limits obtained for each analyte by means of analytical method for the matrix of high moisture content are presented in Table 5, and in Table 6 for the matrix of low moisture content. As observed, PAM 302 method presented lower limits, both detection and quantification than the QuEChERS method. However, detection and quantification limits of the latest were lesser than those reported by Ahumada and Zamudio (2011) for acephate (LOD = 0.01 mg/kg and LOQ = 0.04 mg/kg) and dimethoate (LOD = 0.005 mg/kg and LOQ = 0.02 mg/kg) using the QuEChERS-UPLC/MS-MS method in the same matrix (tomato). Meanwhile in the case of the whole wheat flour, LOQs of 0.01 mg/kg have been reported for dichlorvos and methamidophos using the QuEChERS-UPLC/MS-MS method, which were lower than those reported in the present study (Bordin *et al.*, 2016).

Other methods employed in determining organophosphorus compounds in tomato as the QuEChERS method and determining by means of gas chromatography coupled to a detector of simple mass spectrophotometry (GC-MS) reported LODs and LOQs higher for dimethoate (LOD = 0.1 and LOQ = 0.4 mg/kg) (Dominguez *et al.*, 2014) and dichlorvos (LOD = 9.72 and LOQ = 32.4 mg/kg) (Jahanmard *et al.*, 2015).

## Resultados y Discusión

### Límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs)

Los límites de detección obtenidos para cada analito por método analítico para la matriz de alto contenido de humedad se observan en el Cuadro 5 mientras que para la matriz de bajo contenido se observan en el Cuadro 6. Como puede observarse el método PAM 302 presenta menores límites tanto de detección como de cuantificación que el método QuEChERS. Sin embargo, los límites de detección y cuantificación de este último son mejores que los reportados por Ahumada & Zamudio (2011) para acefato (LOD=0.01 mg/kg y LOQ= 0.04 mg/kg) y dimetoato (LOD=0.005 mg/kg y LOQ= 0.02 mg/kg) empleando el método QuEChERS-UPLC/MS-MS en la misma matriz (tomate). Mientras que, en el caso de harina integral de trigo se han reportado LOQs de 0.01 mg/kg para diclorvos y metamidofos empleando el método QuEChERS-UPLC/MS-MS los cuales son inferiores a los reportados en el presente estudio (Bordin *et al.*, 2016).

Otros métodos empleados en la determinación de organofosforados en tomate como el método QuEChERS y determinación mediante cromatografía de gases acoplado a detector de espectrometría de masas simple (GC-MS) reportan LODs y LOQs superiores para dimetoato (LOD=0.1 y LOQ=0.4 mg/kg) (Dominguez *et al.*, 2014) y diclorvos (LOD=9.72 y LOQ=32.4 mg/kg) (Jahanmard *et al.*, 2015).

On the other hand, inferior limits have been reported as well for some compounds as diazinon (LOD = 0.0001 and LOQ = 0.0002 mg/kg) (Fenoll *et al.*, 2007), dimethoate and dichlorvos (LOD = 0.003 and LOQ = 0.009 mg/kg) (Trivedi *et al.*, 2014) in tomato using the same quantification technic employed here for PAM 302 method.

Por otro lado, también se han reportado límites inferiores para algunos compuestos como diazinón (LOD=0.0001 y LOQ=0.0002 mg/kg) (Fenoll *et al.*, 2007), dimetoato y diclorvos (LOD=0.003 y LOQ=0.009 mg/kg) (Trivedi *et al.*, 2014) en tomate usando la misma técnica de cuantificación empleada aquí para el método PAM 302.

**Table 5.**  
**Detection limits by analytical method for the high humidity matrix**

**Tabla 5.**  
**Límites de detección de los métodos analíticos en la matriz de alta humedad**

<b>Analites</b>	<b>Limit of detection (LOD) (mg/kg) PAM 302 Method</b>	<b>Limit of detection (LOD) (mg/kg) QuEChERS Method</b>
Methamidophos	0.006	0.009
Acephate	0.005	0.006
Dichlorvos	0.008	0.006
Dimethoate	0.009	0.006

**Table 6.**  
**Detection limits by analytical method for the low humidity matrix**

**Tabla 6.**  
**Límites de detección de los métodos analíticos en la matriz de baja humedad**

<b>Analites</b>	<b>Limit of detection (LOD) (mg/kg) PAM 302 Method</b>	<b>Limit of detection (LOD) (mg/kg) QuEChERS Method</b>
Methamidophos	0.006	0.04
Acephate	0.011	0.039
Dichlorvos	0.007	0.033
Dimethoate	0.009	0.026

**Table 7.**  
**Quantification limits by analytical method for the high humidity matrix**

**Tabla 7.**  
**Límites de cuantificación para los métodos analíticos en la matriz de alta humedad**

<b>Analites</b>	<b>Limit of quantification (LOQ) (mg/kg) PAM 302 Method</b>	<b>Limit of quantification (LOQ) (mg/kg) QuEChERS Method</b>
Methamidophos	0.017	0.027
Acephate	0.014	0.018
Dichlorvos	0.023	0.018
Dimethoate	0.026	0.018

**Table 8.**  
**Quantification limits by analytical method for the low humidity matrix**

**Tabla 8.**  
**Límites de cuantificación para los métodos analíticos en la matriz de baja humedad**

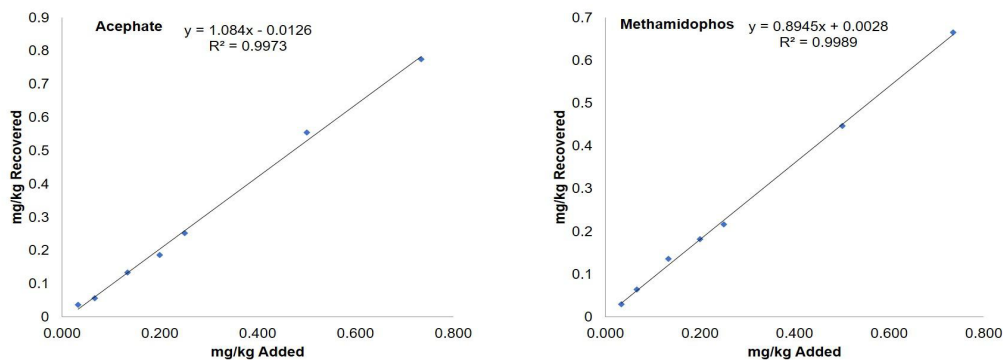
Analites	Limit of quantification (LOQ)	Limit of quantification (LOQ)
	(mg/kg) PAM 302 Method	(mg/kg) QuEChERS Method
Methamidophos	0.018	0.121
Acephate	0.034	0.118
Dichlorvos	0.02	0.099
Dimethoate	0.027	0.078

**working linear interval**

All calibration curves of the analytes under this study, regardless of the method, achieved the criterion specified in EURACHEM. Figure 1 shows an example of calibration curves of acephate and methamidophos in matrix of high moisture content.

**Intervalo lineal de trabajo**

Todas las curvas de calibración de los analitos bajo estudio, independientemente del método, cumplieron con el criterio especificado en el EURACHEM. La Figura 1 muestra a manera de ejemplo las curvas de calibración de acefato y metamidofos en matriz de alta humedad.



**Figure 1. Calibration curves for acephate and methamidophos in a high humidity matrix.**

**Figura 1. Curvas de calibración para acefato y metamidofos en matriz de alta humedad.**

**Linearity of the method**

Both methods showed a linear response for the evaluated analytes which achieved the established criterion, results obtained as for both matrixes of high and low moisture content were summarized in Table 9.

**Linealidad del método**

Ambos métodos mostraron una respuesta lineal para los analitos evaluados cumpliendo con el criterio establecido, en el cuadro 9 se resumen los resultados obtenidos tanto para la matriz de alto como la de bajo contenido de humedad.

**Table 9.**  
**Linearity of the methods in matrices of high and low moisture content**

**Tabla 9.**  
**Linealidad de los métodos en matrices con bajo y alto contenido de humedad**

Analites	High moisture content matrix		Low moisture content matrix	
	PAM 302 <sup>1</sup>	QuEChERS <sup>2</sup>	PAM 302 <sup>1</sup>	QuEChERS <sup>2</sup>
	r <sup>2</sup>		r <sup>2</sup>	
Methamidophos	0.997	0.997	0.999	0.9919
Acephate	0.999	0.999	0.999	0.9958
Dichlorvos	0.999	0.997	0.999	0.9967
Dimethoate	0.995	0.999	1.000	0.9995
Criterion	<b>r<sup>2</sup> &gt; 0.99</b>			

<sup>1</sup>GC-FPD= Gas Chromatography with Flame Photometric Detector; <sup>2</sup>UPLC-MS/MS= Ultra Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry Detector.

<sup>1</sup>GC-FPD= Cromatografía de gases con detector fotométrico de flama; <sup>2</sup>UPLC-MS/MS= Cromatografía líquida de ultra eficiencia con detector de espectrometría de masas en tándem.

#### Precision in repeatability conditions

Precision was estimated as relative deviation standard or % CV in the low level of concentration. Results of precision for the assessed methods are presented in Table 10, which indicate that both methods are precise, since in all cases they achieved the evaluation criterion.

#### Precisión en condiciones de repetibilidad

La precisión fue estimada como desviación estándar relativa o % CV en el nivel bajo de concentración. Los resultados de precisión para los métodos evaluados se observan en el cuadro 10, los cuales indican que ambos métodos son precisos ya que en todos los casos se cumple con el criterio de evaluación.

**Table 10.**  
**Precision of the methods in matrices of high and low moisture content**

**Tabla 10.**  
**Precisión de los métodos en matrices con bajo y alto contenido de humedad**

Analites	Coefficient of variation in matrix of high moisture content (%)		Coefficient of variation in matrix of low moisture content (%)	
	PAM 302 <sup>1</sup>	QuEChERS <sup>2</sup>	PAM 302 <sup>1</sup>	QuEChERS <sup>2</sup>
Methamidophos	10.07	8.38	4.8	13.54
Acephate	7.54	7.08	9.08	14.66
Dichlorvos	12.23	5.69	5.68	10.46
Dimethoate	13.71	5.82	7.43	8.95
Criterion	<b>%CV ≤ 20</b>			

<sup>1</sup>GC-FPD= Gas Chromatography with Flame Photometric Detector; <sup>2</sup>UPLC-MS/MS= Ultra Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry Detector.

<sup>1</sup>GC-FPD= Cromatografía de gases con detector fotométrico de flama; <sup>2</sup>UPLC-MS/MS= Cromatografía líquida de ultra eficiencia con detector de espectrometría de masas en tándem.

### Accuracy of the methods

The percentage of recovery or recovering is a parameter demonstrating the efficiency of the extraction method for each analyte in intentionally fortified samples. Both methods demonstrated to be exact for the set objective, percentages of recovering for the QuEChERS method were between 85 and 95 % for the matrix of low moisture content and between 91 and 101 % for the one of high moisture content; while for the PAM 302 method, recovering were observed between 93 and 99 % for the matrix with low moisture content and between 91 and 110 % for the one of high moisture content, in all cases they achieved the established criterion (Table 11).

### Exactitud de los métodos

El porcentaje de recuperación o porcentaje de recobro es un parámetro que demuestra la eficiencia del método de extracción para cada analito en muestras fortificadas intencionalmente. Ambos métodos demostraron ser exactos par el objetivo planteado, los porcentajes de recobro para el método QuEChERS estuvieron entre 85 y 99 % para la matriz de baja humedad y entre 91 y 101 % para la de baja; mientras que para el método PAM 302 se observaron recobros entre 93 y 99 % para la matriz con bajo contenido de humedad y entre 91 y 110 % para la de alta, en todos los casos se cumple con el criterio establecido (Tabla 11).

**Table 11.**  
**Accuracy of the methods in matrices of high and low moisture content**

**Tabla 11.**  
**Exactitud de los métodos en matrices con bajo y alto contenido de humedad**

Analites	Percentage of average recovery (%R) in a high moisture content matrix		Percentage of average recovery (%R) in a low moisture content matrix	
	PAM 302 <sup>1</sup>	QuEChERS <sup>2</sup>	PAM 302 <sup>1</sup>	QuEChERS <sup>2</sup>
Methamidophos	91.64 ± 9.23	100.50 ± 9.26	99.94 ± 4.79	99.03 ± 6.91
Acephate	94.61 ± 7.14	91.44 ± 5.54	97.65 ± 8.87	84.89 ± 4.46
Dichlorvos	97.24 ± 11.90	100.04 ± 4.18	92.77 ± 5.27	95.40 ± 5.29
Dimethoate	110.16 ± 13.73	101.10 ± 1.68	95.72 ± 7.11	98.59 ± 2.74
Criterion	<b>70&lt;%R &lt;120</b>			

<sup>1</sup>GC-FPD= Gas Chromatography with Flame Photometric Detector; <sup>2</sup>UPLC-MS/MS= Ultra Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry Detector.

<sup>1</sup>GC-FPD= Cromatografía de gases con detector fotométrico de flama; <sup>2</sup>UPLC-MS/MS= Cromatografía líquida de ultra eficiencia con detector de espectrometría de masas en tándem.

Regarding the extraction methods evaluated in the present study, PAM 302 is based on a liquid-liquid extraction (LLE) consisting in the distribution of the analytes in different organic solvents due to the coefficient of partition of each analyte. It is a technic of extraction commonly used in standardized methods for pesticide analysis (Farajzadeh *et al.*, 2014; Puri, 2014). However, it presented more disadvantages than advantages, such as: use of high volumes of toxic organic volumes, formation of emulsions, low sensitivity, it is a delayed process that normally requires an extra step for washing the extract, it is expensive and tedious (Ramos, 2012; Farajzadeh *et al.*, 2014).

En lo que respecta a los métodos de extracción evaluados en el presente estudio, el PAM 302 se basa en una extracción líquido-líquido (LLE) que consiste en la distribución de los analitos en diferentes disolventes orgánicos debido al coeficiente de partición de cada analito. Es una técnica de extracción comúnmente utilizada en métodos estandarizados de análisis de plaguicidas (Farajzadeh *et al.*, 2014; Puri, 2014). Sin embargo, presenta mayores desventajas que ventajas como son: empleo de grandes volúmenes de disolventes orgánicos tóxicos, formación de emulsiones, baja sensibilidad, es un proceso tardado ya que normalmente requiere un paso extra para limpieza del extracto, es costoso y tedioso (Ramos, 2012; Farajzadeh *et al.*, 2014).

While QuEChERS method is based on a dispersive solid phase extraction (d-SPE) consisting in dispersing the sample with anhydrous magnesium sulphate to achieve the separation of the water present in the organic solvent used to extract the analytes. Posteriorly, the obtained extract was mixed with PSA sorbent which is used to eliminate polar compounds co-extracted from the matrix (fatty acids, some sugars, polar pigments, etc.) and in some cases other sorbents were added as well such as C18 or carbon-graphite to eliminate other interferents (sterols, pigments as chlorophyll, etc.) (Anastassiades *et al.*, 2003). Among the advantages of this process are its velocity, robustness, high percentage of recovering, ease of handling, minimum requirement of solvent and low cost. One of its disadvantages is that evaporation and reconstitution of the final extract is required to improve the sensitivity of the studied pesticides (Anastassiades *et al.*, 2003; Ramos, 2012; Bruzzoniti *et al.*, 2014; Puri, 2014).

Regarding pesticide quantification in food samples, gas and liquid chromatography coupled to mass spectrophotometry are currently the most used instrumental technics in residues analysis, since they allow the unequivocal identification of the analytes, while the use of selective detectors normally requires realizing a confirmation by means of a different column and/or detector (Di Stefano *et al.*, 2012; Gómez-Ramos *et al.*, 2013; Bruzzoniti *et al.*, 2014; Hird *et al.*, 2014; Puri, 2014; Saraji & Boroujeni, 2014).

#### Monitoring the method applied to real samples

In order to demonstrate the performance of the assessed methods, real samples were obtained from markets and supermarkets in Culiacan, Sinaloa. A total of four samples were analyzed (three representative samples for matrices with high moisture content and one representative sample for matrices with low moisture content).

In one of the tomato samples, two of the analytes under scope were detected (methamidophos and dimethoate). Residues were detected in concentrations of 0.056 and 0.038 mg/kg, respectively by means of the QuEChERS methods and 0.031 and 0.023 mg/kg, respectively for the PAM 302 method.

Mientras que el método QuEChERS se basa en la extracción dispersiva en fase sólida (d-SPE) la cual consiste en la dispersión de la muestra con sulfato de magnesio anhidro para lograr la separación del agua presente en ésta del disolvente orgánico usado para extraer los analitos. Posteriormente, el extracto obtenido se mezcla con el sorbente PSA que se utiliza para eliminar componentes polares co-extraídos de la matriz (ácidos grasos, algunos azúcares, pigmentos polares, etc.) y en algunos casos también se adicionan otros sorbentes como C18 o carbón-grafito para eliminar otros interferentes (esteroles, pigmentos como la clorofila, etc.) (Anastassiades *et al.*, 2003). Entre las ventajas de este procedimiento están su rapidez, robustez, alto porcentaje de recuperación, facilidad de manejo, requerimiento mínimo de disolvente y bajo costo. Una de sus desventajas es que se requiere de la evaporación y reconstitución del extracto final para mejorar la sensibilidad de los plaguicidas estudiados (Anastassiades *et al.*, 2003; Ramos, 2012; Bruzzoniti *et al.*, 2014; Puri, 2014).

Respecto a la cuantificación de plaguicidas en muestras alimentarias, la cromatografía de gases y líquidos acoplada a espectrometría de masas actualmente son las técnicas instrumentales más utilizadas en el análisis de residuos debido a que permiten la identificación inequívoca de los analitos mientras que con el uso de detectores selectivos normalmente se requiere realizar confirmación ya sea con el uso de columna y/o detector diferente (Di Stefano *et al.*, 2012; Gómez-Ramos *et al.*, 2013; Bruzzoniti *et al.*, 2014; Hird *et al.*, 2014; Puri, 2014; Saraji & Boroujeni, 2014).

#### Monitoreo del método aplicado a muestras reales

Para demostrar el desempeño de los métodos evaluados, muestras reales se obtuvieron de mercados y supermercados en Culiacán, Sinaloa. Un total de cuatro muestras fueron analizadas (tres muestras representativas para matrices con alto contenido de humedad y una muestra representativa para matrices con bajo contenido de humedad).

En una de las muestras de tomate se detectaron dos de los analitos bajo el alcance (metamidofos y dimetoato). Los residuos fueron detectados en concentraciones de 0.056 y 0.038 mg/kg, respectivamente mediante el método QuEChERS y 0.031 y 0.023 mg/kg, respectivamente por el método PAM 302.



## Conclusions

Results of the verification of performance in both proposed methods were satisfactorily in accordance to what was indicated in the validation guide of EURACHEM methods for parameters of linearity, accuracy, precision in repeatability conditions, detection and quantification limits.

Percentages of recovering varied in the range of 91.6 to 110.1 % with CV in the range of 4.8 to 13.7 %. LOD of the different analytes was established in the range of 0.006 to 0.0009 mg/kg in matrixes of high moisture content and of 0.006 to 0.040 mg/kg in matrixes of low moisture content, while LOQ was established in the range of 0.014 to 0.027 mg/kg in matrixes of high moisture content and of 0.018 to 0.121 mg/kg in matrixes of low moisture content.

The proposed methods were successfully applied in the analysis of real samples, detecting pesticide residues in a tomato sample.

For the notorious advantages presented by the QuEChERS methods with respect to the PAM 302 method and in addition to the use of detector of tandem mass spectrometry, using or implementing of this method was recommended for matrixes of both low and moisture content, even increasing the scope of the here proposed method to other pesticides of the same or different chemical class.

## Acknowledgements

We thank the LANIIA-CIAD personnel specially QFB Celida Isabel Martínez Rodríguez and M.C. Pedro de Jesús Bastidas Bastidas for their technical assistance.

## References

- Ahumada, D. A. & Zamudio, A. M. (2011). Analysis of pesticide residues in tomato using QuEChERS sample preparation and Ultra-Fast liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Revista Colombiana de Química*, 40(2): 227-246. <http://www.scielo.org.co/pdf/rcq/v40n2/v40n2a7.pdf>
- Anastassiades, M., Lehotay, S., Stajnbaher, D. and Schenck, F. (2003). Fast and easy multiresidue method employin acetonitrile extraction/partitionin and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, 86(2): 412-431. <https://pubag.nal.usda.gov/pubag/downloadPDF.xhtml?id=555&content=PDF>.
- Benavides, S. & Echeverría, J. (2014). Validación de un método para el análisis de residualidad de plaguicidas en aguacate Hass. *Revista Facultad de Ciencias Universidad Nacional de Colombia*, 3 (2): 64-107. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rfc/article/viewFile/50863/51159>

## Conclusiones

Los resultados de la verificación de desempeño de los métodos propuestos fueron satisfactorios conforme a lo indicado en la guía de validación de métodos del EURACHEM para los parámetros de linealidad, exactitud, precisión en condiciones de repetibilidad, límites de detección y cuantificación.

Los porcentajes de recuperación variaron en el rango de 91.6 a 110.1 % con CV en el rango de 4.8 a 13.7 %. El LOD de los distintos analitos se estableció en el rango de 0.006 a 0.0009 mg/kg en matrices de alta humedad y de 0.006 a 0.040 mg/kg en matrices de baja humedad, mientras que el LOQ se estableció en el rango de 0.014 a 0.027 mg/kg en matrices de alta humedad y de 0.018 a 0.121 mg/kg en matrices de baja humedad.

Los métodos propuestos se aplicaron con éxito en el análisis de muestras reales detectando residuos de plaguicidas en una muestra de tomate.

Por las ventajas notorias que presenta el método QuEChERS respecto al PAM 302 y aunado al uso de detector de espectrometría de masas en tándem, se recomienda el uso o implementación de este tanto para matrices de baja como de alta humedad aumentando inclusive el alcance del método aquí propuesto a otros plaguicidas de la misma o diferente clase química.

## Agradecimientos

Agradecemos al personal de LANIIA-CIAD especialmente a la QFB Celida Isabel Martínez Rodríguez y al M.C. Pedro de Jesús Bastidas Bastidas por su asistencia técnica.

- Bordin, A. B., Minetto, L., do Nascimento Filho, I., Beal, L. L. and Moura, S. (2017). Determination of pesticide residues in whole wheat flour using modified QuEChERS and LC–MS/MS. *Food Analytical Methods*, 10(1): 1-9. <http://doi.org/10.1007/s12161-016-0542-2>
- Bruzzoniti, M. C., Checchini, L., De Carlo, R. M., Orlandini, S., Rivoira, L. and Del Bubba, M. (2014). QuEChERS sample preparation for the determination of pesticides and other organic residues in environmental matrices: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(17): 4089–4116. <http://doi.org/10.1007/s00216-014-7798-4>
- CICOPLAFEST. (Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas). (2016). Catálogo oficial de plaguicidas. México D.F. 483 pp.
- Codex Alimentarius Commission. (2016). Pesticide residues in food and feed. <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/pestres/en/> [Last checked December 10<sup>th</sup> 2018].
- Dankyi E, Carboo D, Gordon C and Fomsgaard IS. (2015). Application of the QuEChERS procedure and LC-MS/MS for the assessment of neonicotinoid insecticide residues in cocoa beans and shells. *Journal of Food Composition and Analysis* 44: 149-157. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.09.002>
- Di Stefano, V., Avellone, G., Bongiorno, D., Cunsolo, V., Muccilli, V., Sforza, S., and Vékey, K. (2012). Applications of liquid chromatography-mass spectrometry for food analysis. *Journal of Chromatography A*, 1259: 74–85. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.04.023>
- Domínguez, A. M., Placencia, F., Cereceda, F., Fadic, X., and Quiroz, W. (2014). Analysis of tomato matrix effect in pesticide residue quantification through QuEChERS and single quadrupole GC/MS. *Chilean journal of agricultural research*, 74(2): 148-156. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392014000200004>
- EPA (US Environmental Protection Agency). (2016a). Analytical methods and procedures for pesticides. <https://www.epa.gov/pesticide-analytical-methods> [Last checked December 10<sup>th</sup> 2018].
- EPA (US Environmental Protection Agency). (2016b). Pesticides. <https://www.epa.gov/science-and-technology/pesticides-science> [Last checked December 10<sup>th</sup> 2018].
- EURACHEM (A Focus for Analytical Chemistry in Europe). (1998). EURACHEM Guide, The Fitness for purpose of analytical methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, Editor: H. Holcombe, LGC, Teddington. <http://www.eurachem.nl/images/eurachem/Fitnessforpurpose.pdf>
- European Commission. (2016). EU Pesticides Database. <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=homepage&language=EN> [Last checked December 10<sup>th</sup> 2018].
- Farajzadeh, M. A., Sorouraddin, S. M., and Mogaddam, M. R. A. (2014). Liquid phase microextraction of pesticides: a review on current methods. *Microchimica Acta*, 181(9–10), 829–851. <http://doi.org/10.1007/s00604-013-1157-6>
- FDA. Food & Drug Administration. (1999). Pesticide Analytical Manual Volume I: Multiresidue Methods, 3rd Edition, U.S. Department of Health and Human Services, Washington, DC.
- FDA. Food & Drug Administration. (2016). U S Food and Drug Administration. <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/FSMA/default.htm> [Last checked December 10<sup>th</sup> 2018].
- Fenoll, J., Hellín, P., Martínez, C. M., Miguel, M., and Flores, P. (2007). Multiresidue method for analysis of pesticides in pepper and tomato by gas chromatography with nitrogen–phosphorus detection. *Food chemistry*, 105(2): 711-719. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.12.060>
- García-Reyes, J.F., Ferrer, C., Gomez-Ramos, M.J., Molina-Díaz, A. and Fernández-Alba, A.R. (2007). Determination of pesticide residues in olive oil and olives. *Trends in Analytical Chemistry*, 26(3): 239-251. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.01.004>
- Gómez-Ramos, M. M., Ferrer, C., Malato, O., Agüera, A. and Fernández-Alba, A. R. (2013). Liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry for pesticide residue analysis in fruit and vegetables: screening and quantitative studies. *Journal of Chromatography A*, 1287: 24–37. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.065>
- Hird, S. J., Lau, B. P. Y., Schuhmacher, R. and Krska, R. (2014). Liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of chemical contaminants in food. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 59: 59–72. <http://doi.org/10.1016/j.trac.2014.04.005>
- Hou, X., Han, M., Dai, X., Yang, X.F. and Yi, S. (2013). A multi-residue method for the determination of 124 pesticides in rice by modified QuEChERS extraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* 138: 1198-1205. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.089>

- Jahanmard, E., Ansari, F., and Feizi, M. (2016). Evaluation of Quechers sample preparation and GC mass spectrometry method for the determination of 15 pesticide residues in tomatoes used in salad production plants. *Iranian journal of public health*, 45(2): 230-238. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4841878/pdf/IJPH-45-230.pdf>
- Lee, S.M., Papatkakis, M.L., Hsiao-Ming, C.F. and Carr, J.E. (1991). Multipesticide residue method for fruits and vegetables: California Department of Food and Agriculture. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 339: 376-383. <https://rd.springer.com/content/pdf/10.1007%2F00322352.pdf>
- Luke, M.A., Froberg, J.E. and Masumoto, H.T. (1975). Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen, and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 58(5): 1020-1026. <https://europepmc.org/abstract/med/1158821>
- Luke, M. A., Froberg, J. E., Doose, G. M., and Masumoto, H. T. (1981). Improved multiresidue gas chromatographic determination of organophosphorus, organonitrogen, and organohalogen pesticides in produce, using flame photometric and electrolytic conductivity detectors. *Journal-Association of Official Analytical Chemists*, 64(5): 1187-1195. <https://europepmc.org/abstract/med/7287614>
- Luke, M. A., & Doose, G. M. (1983). A modification of the Luke multiresidue procedure for low moisture, nonfatty products. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 30(1): 110-116. <https://doi.org/10.1007/BF01610107>
- Marchis, D., Ferro, G.L., Brizio, P., Squadrone, S. and Abete, M.C. (2012). Detection of pesticides in crops: A modified QuEChERS approach. *Food Control* 25: 270-273. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.10.055>
- Mills, P. A., Onley, J. H., and Guither, R. A. (1963). Rapid method for chlorinated pesticide residues in non-fatty foods. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 46: 186-191.
- Nollet, L. M. L., & Rathore, H. S. (2016). Handbook of pesticides: methods of pesticide residues analysis. (C. Press, Ed.). United States of America: Taylor and Francis Groups, LLC.
- Omar, N., Bakar, J. and Muhammad, K. (2013). Determination of organochlorine pesticides in shrimp by gas chromatography-mass spectrometry using a modified QuEChERS approach. *Food Control* 34: 318-322. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.04.029>
- Paz, M., Correia-Sá, L., Becker, H., Longhinotti, E., Domingues, V.F. and Delerue-Matos, C. (2015). Validation of QuEChERS method for organochlorine pesticides analysis in tamarind (*Tamarindus indica*) products: Peel, fruit and commercial pulp. *Food Control* 54: 374-382. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.005>
- Pinho-Costa, F., Souza-Caldas, S. and Primel, G.E. (2014). Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in canned and fresh peach. *Food Chemistry* 165: 587-593. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.099>
- Puri, P. (2014). Current trends in extraction methodologies for pesticide residues in food matrices. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, 7(2): 331-342. <https://pdfs.semanticscholar.org/8b82/cdea9f6578fc88b6cb182606b2abedc13141.pdf>
- Ramos, L. (2012). Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. *Journal of Chromatography A*, 1221: 84-98. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.11.011>
- Rizzetti, T.M., Kemmerich, M., Martins, M.L., Prestes, O.D., Adaime, M.B. and Zanella, R. (2016). Optimization of a QuEChERS based method by means of central composite design for pesticide multiresidue determination in orange juice by UHPLC-MS/MS. *Food Chemistry* 196: 25-33. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.010>
- Saraji, M., & Boroujeni, M. K. (2014). Recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406: 2027-2066. <http://doi.org/10.1007/s00216-013-7467-z>
- Trivedi, P., Sharma, V. P., Srivastava, L. P., and Malik, S. (2014). Multiresidue analysis of organophosphorus pesticides in fruits and vegetables by GC-NPD. *International Journal of Advanced Research*, 2(10): 600-606. [https://www.researchgate.net/publication/269107003\\_Multiresidue\\_analysis\\_of\\_organophosphorus\\_pesticides\\_in\\_fruits\\_and\\_vegetables\\_by\\_GC-NPD](https://www.researchgate.net/publication/269107003_Multiresidue_analysis_of_organophosphorus_pesticides_in_fruits_and_vegetables_by_GC-NPD)