

# DETERMINAZIONE DEL ROTENONE NEL MIELE MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESTAZIONE E RIVELAZIONE ULTRAVIOLETTA

G. Scortichini, G. Diletti, L. Annunziata, V. Langella & S. Calvarese  
Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise «G. Caporale», Teramo - Italia

## RIASSUNTO

*Il presente lavoro descrive un metodo per la determinazione dell'insetticida rotenone nel miele mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC). L'estrazione dell'analita è stata effettuata con miscela acetone/acqua, seguita da un processo di ripartizione liquido/liquido con etere etilico e successiva purificazione su cartuccia di estrazione in fase solida (SPE) di allumina neutra. L'analisi cromatografica è stata condotta su colonna C<sub>18</sub> (250 x 4 mm, 5 µm), impiegando acetonitrile/acqua (65:35, v/v) come fase mobile. L'analita in esame è stato rivelato nell'ultravioletto, alla lunghezza d'onda di 295 nm.*

*La metodica sviluppata, applicata a campioni di miele si è dimostrata specifica per l'analita in esame.*

*Il limite di rivelazione ottenuto è stato pari a 40 µg kg<sup>-1</sup>. Sono state valutate la precisione e l'esattezza del metodo analizzando campioni fortificati a tre livelli di aggiunta (100-250-500 µg kg<sup>-1</sup>).*

*I valori di riproducibilità intra-laboratorio (coefficiente di variazione percentuale 9,2-10,6%) e di recupero medio dell'analita (81,4-86,6%) sono risultati soddisfacenti. La curva di taratura è stata lineare nell'intervallo 0,125-2 µg ml<sup>-1</sup>, con un coefficiente di determinazione R<sup>2</sup> pari a 0,9999.*

*Le concentrazioni di rotenone riscontrate in campioni di miele prodotto da api trattate con tale acaricida sono risultate comprese nell'intervallo 120-430 µg kg<sup>-1</sup>.*

## PAROLE CHIAVE

HPLC - Miele - Rotenone - SPE

## Introduzione

Il rotenone ([2R-(2α,6α,12α)]-1,2,12,12a-tetraidro-8,9-dimetossi-2-(1-metiletetil)-[1]benzopirano[3,4-b]furo[2,3-h][1]benzopiran-6(6aH)-one) (Figura 1) è una sostanza ad azione insetticida presente nelle radici di alcune Leguminose delle zone tropicali, appartenenti ai generi *Derris* e *Lonchocarpus* (7). Il meccanismo d'azione del rotenone è basato sull'inibizione della respirazione cellulare ed agisce sul sistema nervoso degli insetti (5).

Recentemente è stato condotto uno studio per sperimentare l'attività del rotenone contro la varroasi, malattia parassitaria delle api causata dall'acaro *Varroa destructor* (5). La somministrazione di rotenone, effettuata direttamente sugli

alveari, pone il problema della possibile presenza di residui di tale sostanza nel miele prodotto dalle api sottoposte a trattamento. Conseguentemente è nata l'esigenza di disporre di un metodo affidabile per la ricerca di residui di rotenone nel miele. In letteratura sono riportati vari metodi analitici per la ricerca di residui di pesticidi nel miele, basati sull'analisi strumentale in cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) o in gascromatografia (GC) (1, 2, 11). Per l'analisi del rotenone sono disponibili metodi relativi alle acque (4, 10), ai prodotti ittici e sedimenti (6), a mangimi e tessuti animali (3) ed al latte (9). Jimenez *et al.* (12) hanno descritto un metodo di analisi HPLC per la determinazione del

## DETERMINATION OF ROTENONE IN HONEY BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY AND ULTRAVIOLET DETECTION

### Summary

A method to determine residues of the insecticide rotenone in honey using high-performance liquid chromatography (HPLC) is described. The sample was extracted with an acetone/water mixture, followed by a liquid/liquid partition with diethyl ether. A solid-phase extraction (SPE) clean-up step on alumina neutral cartridge was then performed. The chromatographic analysis was conducted on a C<sub>18</sub> column (250 x 4 mm, 5 µm) using acetonitrile-water (65:35, v/v) as mobile phase. Rotenone was detected in the ultraviolet range at a wavelength of 295 nm. The specificity of the method was demonstrated through analyses of raw and commercial honey samples. The limit of detection was equal to 40 µg

rotenone nel miele. Tale metodo utilizza una lunghezza d'onda di rivelazione di 210 nm, alla quale si ha tipicamente una scarsa specificità dovuta ai numerosi gruppi cromofori che presentano assorbimenti nella regione del basso ultravioletto. Il presente lavoro descrive una metodica per la ricerca del rotenone nel miele, caratterizzata da semplicità dei processi di estrazione e purificazione del campione e da una determinazione HPLC che permette di ottenere una buona specificità di rivelazione, grazie alla lunghezza d'onda prescelta (295 nm).

## Materiali e metodi

### Standard di riferimento

Lo standard di riferimento di rotenone è stato fornito dalla ditta Sigma (St. Louis, MO, USA). La soluzione madre è stata preparata sciogliendo 50 mg di rotenone in 100 ml di acetonitrile (500 µg ml<sup>-1</sup>). Tale soluzione, conservata a +4°C, è risultata stabile per un mese. Dalla soluzione madre è stata preparata una soluzione intermedia diluendo 1:50 (v/v) la soluzione madre con acetonitrile (10 µg ml<sup>-1</sup>). Da quest'ultima sono state ottenute, per ulteriore diluizione in acetonitrile, le soluzioni per la taratura strumentale, alle concentrazioni di 0,125-0,25-0,5-1-2 µg ml<sup>-1</sup>.

### Materiali e reagenti

Sono stati utilizzati solventi organici (etere etilico, diclorometano, acetone ed acetonitrile) con grado di purezza HPLC (J.T. Baker, Deventer, Olanda). L'acqua ultrapura è stata prodotta da un sistema Milli-Ro/Milli Q Millipore (Bedford, MA, USA). Il solfato di sodio anidro, con grado di purezza analitico, è stato ottenuto dalla Carlo Erba (Milano, Italia). Per la

purificazione del campione, è stata impiegata una cartuccia di estrazione in fase solida (SPE) Alumina N (3 ml/500 mg, J.T. Baker, Deventer, Olanda).

### Strumentazione e condizioni cromatografiche

L'analisi HPLC è stata eseguita con apparecchiatura Varian costituita da pompa a gradiente Star 9010, rivelatore ultravioletto Star 9050 ed autocampionatore Star 9100 (Walnut Creek, CA, USA). La separazione cromatografica è stata realizzata su colonna 250 x 4 mm, 5 µm con precolonna 4 x 4 mm, 5 µm (Lichrospher RP-18 Merck Darmstadt, Germania), termostate a +30°C. Come fase mobile è stata utilizzata una miscela acetonitrile/acqua (65:35, v/v), impostando il flusso a 1 ml min<sup>-1</sup>. La lettura è stata effettuata alla lunghezza d'onda di 295 nm. Il volume iniettato è stato di 20 µl.

### Preparazione del campione

I campioni di miele commerciale sono stati omogeneizzati prima del prelievo per l'analisi, mentre i campioni di miele grezzo sono stati sottoposti a torchiatura e filtrazione su cotone per rimuovere il materiale estraneo, costituito principalmente da cera d'api. Un'aliquota di 5 g di miele è stata solubilizzata con 25 ml di una miscela acetone/acqua (1:1, v/v), mediante agitazione manuale (1 min) ed ultrasuoni (15 min). Una frazione dell'estratto, pari a 5 ml, è stata sottoposta a partizione con 8 ml di etere etilico, ripetendo tre volte il processo. Gli estratti eterici sono stati riuniti e filtrati su carta da filtro Whatman 41, contenente 2 g di solfato di sodio anidro. Successivamente l'estratto è stato portato a secco a +60°C sotto flusso di azoto e il residuo è stato ripreso con 2 ml di

kg<sup>-1</sup>. The precision and accuracy of the method were evaluated trueeness honey samples spiked at three concentration levels (100-250-500 µg kg<sup>-1</sup>). The intra-laboratory coefficient of variation (from 9.2 to 10.6%) and mean recovery values (from 81.4 to 86.6%) were satisfactory. The calibration curve was linear in the range 0.125-2 µg ml<sup>-1</sup>, with a determination coefficient R<sup>2</sup> of 0.9999. Rotenone levels in honey samples from bees treated with this miticide were in the range 120-430 µg kg<sup>-1</sup>.

### Keywords

High-performance liquid chromatography – Honey – Rotenone – Solid-phase extraction.

### Introduction

Rotenone ([2R-(2α,6αα,12αα)]-1,2,12,12α-tetrahydro-8,9-dimethoxy-2-(1-methylethenyl)-[1]benzopyrano[3,4-b]furo[2,3-h][1]benzopyran-6(6aH)-one) (Fig. 1) is an insecticide found in the roots of certain tropical plants of the *Derris* and *Lonchocarpus* genuses (7). The action mechanism of rotenone is based on inhibiting cellular respiration, thereby affecting the nervous system of insects (5).

Recent studies have been performed to test the activity of rotenone against varroasis, a parasitic disease of bees caused by the mite *Varroa destructor* (5). The administration of rotenone, applied directly to the beehive, creates a problem linked to the possible presence of rotenone residues in the honey produced by the bees undergoing treatment. Consequently, a reliable method to detect rotenone residues in honey had to be found. Some literature includes descriptions of various analytical methods to detect pesticide residues in honey, based on high-performance liquid chromatography (HPLC) or gas chromatography (GC) (1, 2, 11). To analyse rotenone, various methods are available such as those linked to water, (4, 10), to fish and sediments (6), to animal chow and tissues (3) and to milk (9). Jimenez *et al.* (12) have described an HPLC method for the determination of rotenone in honey. This method uses a detection wavelength of 210 nm, at which poor specificity is commonly obtained due the numerous chromophore groups that feature absorption levels in the lower end of the ultraviolet range. This paper describes a method to detect rotenone in honey, characterised by the simplicity of the sample extraction and

diclorometano/acetonitrile (3:1, v/v).

#### Purificazione del campione

La cartuccia SPE Alumina N (500 mg), contenente 2 g di solfato di sodio anidro al di sopra della fase stazionaria, è stata condizionata con 5 ml di diclorometano/acetonitrile (3:1, v/v). L'aliquota dell'estratto è stata trasferita sulla cartuccia, percolando alla velocità di 1 ml min<sup>-1</sup> e raccogliendo direttamente l'eluato. La cartuccia è stata lavata con 2+2 ml di diclorometano/acetonitrile (3:1, v/v), riunendo l'eluato al precedente ed evaporando a secco, a 60°C sotto flusso di azoto. Il residuo è stato ripreso con 500 µl di acetonitrile, agitando su vortex per 1 min. La soluzione così ottenuta è stata filtrata su microfiltro in PTFE da 0,22 µm.

#### Prove di validazione

Le prove effettuate hanno incluso l'analisi di 10 bianchi

campione e di 36 campioni con aggiunta standard. I bianchi sono stati utilizzati per la valutazione della specificità e per il calcolo del limite di rivelazione. Le aggiunte standard sono state effettuate a tre livelli, pari a 100, 250 e 500 µg kg<sup>-1</sup>. La ripetibilità (precisione intra-saggio) è stata valutata analizzando sei campioni per ogni livello di aggiunta nella stessa giornata. Ulteriori diciotto prove (sei per ogni livello di aggiunta) sono state effettuate a distanza di tempo dalla serie di prove precedenti per la valutazione della riproducibilità intra-laboratorio (precisione inter-saggio). L'esattezza del metodo è stata espressa in termini di percentuali di recupero del rotenone rispetto alle quantità aggiunte. La linearità di risposta è stata valutata costruendo tre curve di taratura a 5 livelli di concentrazione (0,125-0,25-0,5-1-2 µg ml<sup>-1</sup>) in tre diverse giornate e calcolando il

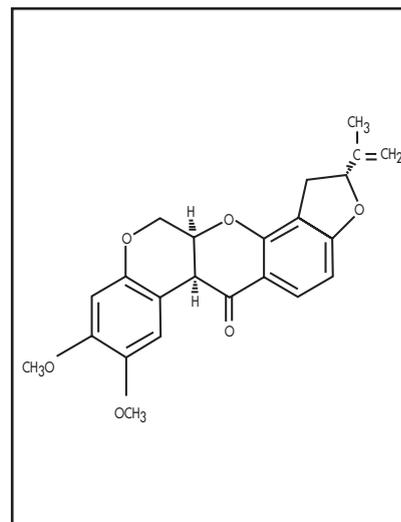


Figura 1: Struttura chimica del rotenone.  
Figure 1: Chemical structure of rotenone.

clean-up processes and by HPLC determination that allows for good detection specificity due to the wavelength selected (295 nm).

#### Materials and methods

##### Reference standard

The reference standard for rotenone was provided by Sigma (St Louis, USA). The stock solution was prepared by dissolving 50 mg of rotenone in 100 ml of acetonitrile (500 µg ml<sup>-1</sup>). This solution, kept at 4°C, remained stable for one month. An intermediate solution was prepared by diluting 1:50 (v/v) the stock solution with acetonitrile (10 µg ml<sup>-1</sup>). The latter was in turn used to obtain the solutions for the instrumental calibration by further diluting in acetonitrile at concentrations of 0.125-0.25-0.5-1-2 µg ml<sup>-1</sup>.

##### Materials and reagents

Organic solvents (diethyl ether, dichloromethane, acetone and acetonitrile) were HPLC grade (J.T. Baker, Deventer, the Netherlands). The ultra-pure water was produced using a Milli-Ro/Milli Q Millipore system (Bedford, USA). Analytical grade anhydrous sodium sulphate was obtained from Carlo Erba (Milan, Italy). For the clean-up of the sample, a solid-phase extraction (SPE) alumina cartridge was used (3 ml/500 mg) (J.T. Baker, Deventer, the Netherlands).

##### Chromatographic instruments and conditions

The HPLC analysis was performed with Varian equipment consisting of a 9010 Star gradient pump, a 9050 Star ultraviolet detector and a 9100 Star autosampler (Walnut Creek, USA). The

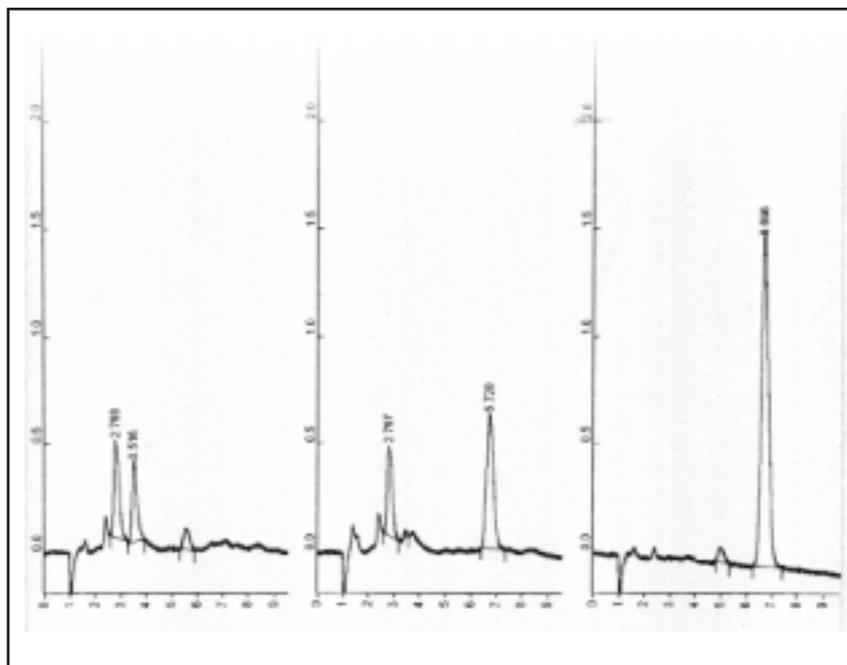


Figura 2: Cromatogramma di un bianco campione di miele.  
Figure 2: Chromatogram of a blank honey sample.

Figura 3: Cromatogramma di un bianco campione di miele con aggiunta di 250 µg kg<sup>-1</sup> di rotenone.  
Figure 3: Chromatogram of a blank honey sample spiked with 250 µg kg<sup>-1</sup> rotenone.

Figura 4: Cromatogramma di una soluzione standard di rotenone a 1 µg ml<sup>-1</sup>.  
Figure 4: Chromatogram of a rotenone standard solution 1 µg ml<sup>-1</sup>.

coefficiente di determinazione. Il limite di rivelazione è stato calcolato come contenuto apparente di rotenone corrispondente alla media più tre volte la deviazione standard per le determinazioni del bianco.

### Analisi di campioni reali

Il metodo presentato è stato applicato nella ricerca di residui di rotenone in campioni di miele prelevati nell'ambito di uno studio sperimentale volto a valutare l'efficacia del trattamento acaricida con prodotti a base di tale sostanza, a concentrazioni e su supporti diversi (5). I campioni di miele sono stati prelevati dopo periodi di 1-3 settimane dall'ultimo trattamento acaricida.

### Risultati

La tecnica di estrazione in fase solida su cartuccia di allumina neutra ha consentito di ottenere cromatogrammi privi di picchi interferenti con il rotenone, come si evidenzia dal tracciato di uno dei campione di miele negativi per la sostanza in oggetto (Figura 2). In Figura 3 e 4 sono riportati, rispettivamente, i cromatogrammi

di un campione negativo con aggiunta di rotenone pari a 250  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e di uno standard di rotenone da 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . I risultati relativi alla precisione ed accuratezza del metodo, ottenuti attraverso l'aggiunta di rotenone ad un miele negativo, sono sintetizzati in Tabella 1 e 2. Le prove di ripetibilità hanno fornito percentuali di recupero dell'analita comprese tra il 75,5 e 90,9% con un coefficiente di variazione percentuale (CV%) compreso nell'intervallo 5,9-6,7%. Le percentuali di recupero relative alle prove di riproducibilità intra-laboratorio sono risultate nell'intervallo 81,4-86,6% (CV% 9,2-10,6%). La linearità del metodo è stata valutata costruendo tre curve di taratura a 5 livelli di concentrazione, in tre diverse giornate. La retta media ottenuta ha presentato un coefficiente di determinazione  $R^2$  pari a 0,9999 (Figura 5). Il limite di rivelazione del metodo è stato pari a 40  $\mu\text{g kg}^{-1}$  di rotenone. L'applicazione del metodo su 6 campioni di miele ottenuti da uno studio relativo alla valutazione

chromatographic separation was performed on a 250 x 4 mm column, 5  $\mu\text{m}$  with 4 x 4 mm guard column, 5  $\mu\text{m}$  (Lichrospher RP-18 Merck Darmstadt, Germany), with column oven set at +30°C. Acetonitrile/water (65:35, v/v) was used as mobile phase, setting the flow rate to 1  $\text{ml min}^{-1}$ . The detection wavelength was 295 nm. The volume injected was 20  $\mu\text{l}$ .

### Sample preparation

The commercial honey samples were homogenised before taking the aliquot for analysis, whereas the raw honey samples underwent pressing and filtering through cotton to remove any foreign matter, mainly beeswax. A 5 g sample was sonicated with 25 ml of an acetone/water mixture (1:1, v/v), through manual shaking (1 min) and ultrasound (15 min). A fraction of the extract, amounting to 5 ml, was partitioned with 8 ml of diethyl ether and the process was repeated three times. The ether extracts were combined and filtered on Whatman 41 filter paper, containing 2 g anhydrous sodium sulphate. The extract was then dried at +60°C under a flow of nitrogen and the residue was taken up with 2 ml of dichloromethane/acetonitrile (3:1, v/v).

### Sample clean-up

The SPE alumina cartridge (500 mg), containing 2 g anhydrous sodium sulphate above the stationary phase, was conditioned with 5 ml dichloromethane/acetonitrile (3:1, v/v). The portion of the extract was transferred onto the cartridge, percolating at a speed of 1  $\text{ml min}^{-1}$  and then the eluate was collected. The cartridge was washed with 2+2 ml dichloromethane/acetonitrile (3:1, v/v), combining the eluate with the previous one and evaporating to dryness at +60°C under a flow of nitrogen. The residue was redissolved with 500  $\mu\text{l}$  acetonitrile, shaking over a vortex for 1 min. The solution obtained was then filtered with a PTFE 0.22  $\mu\text{m}$  microfilter.

### Validation tests

The tests performed included the analysis of 10 blank samples and 36 spiked samples. The blanks were used for the evaluation of specificity and for the calculation of the detection limit. The spiked samples were prepared at three concentration levels, amounting to 100, 250 and 500  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . The repeatability (intra-assay precision) was evaluated by analysing six samples for each concentration level on the same day. Further eighteen tests (six for each concentration level) were performed for

Tabella 1: Ripetibilità (precisione intra-saggio).

Table 1: Repeatability (intra-assay precision).

Livello di aggiunta Spiking level ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Recupero medio % Mean percentage recovery	Deviazione standard Standard deviation	Coefficiente di variazione Coefficient of variation (CV%)
100 (n=6)	90.9	5.5	6.1
250 (n=6)	75.5	5.1	6.7
500 (n=6)	78.2	4.6	5.9

Tabella 2: Riproducibilità intra-laboratorio (precisione inter-saggio).

Table 2: Intra-laboratory reproducibility (intra-assay precision).

Livello di aggiunta Spiking level ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Recupero medio % Mean percentage recovery	Deviazione standard Standard deviation	Coefficiente di variazione Coefficient of variation (CV%)
100 (n=12)	84.4	8.1	9.6
250 (n=12)	81.4	7.5	9.2
500 (n=12)	86.6	9.2	10.6

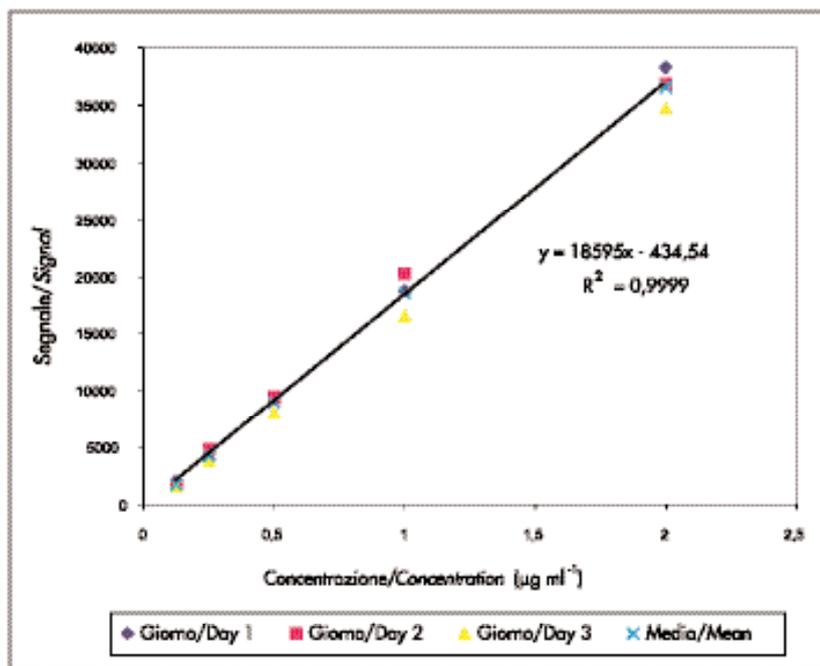


Figura 5: Linearità di risposta con soluzioni standard (intervallo 0,125-2 µg ml<sup>-1</sup>).

Figure 5: Linearity of response with standard solutions (range 0.125-2 µg ml<sup>-1</sup>).

dell'efficacia del rotenone come acaricida (5), ha fornito concentrazioni comprese nell'intervallo 40-430 µg kg<sup>-1</sup>.

## Discussione

Lo scopo della presente ricerca è stato quello di sviluppare e validare un metodo analitico affidabile e di semplice esecuzione per la determinazione di residui di rotenone in campioni di miele grezzo e commerciale. In assenza di limiti massimi di residui per la sostanza in oggetto nel miele, i livelli di aggiunta per l'esecuzione delle prove di validazione sono stati prescelti in base ai tenori di rotenone rilevati in campioni di miele, prelevati nel corso di uno studio sperimentale di valutazione dell'efficacia del trattamento acaricida delle api con tale sostanza (5). Il processo di estrazione ha permesso una rapida dissoluzione del campione di miele grezzo o commerciale. La partizione liquido/liquido con

etere etilico, già descritta da Bowman *et al.* (3) per i tessuti animali, ha permesso di trasferire il rotenone in fase organica e rimuovere la componente zuccherina del campione. L'etere etilico è risultato maggiormente efficace nell'estrazione dell'analita in esame rispetto ad altri solventi organici, quali esano ed etere di petrolio, testati nella fase di sviluppo del metodo. L'introduzione dello stadio di purificazione SPE si è reso necessario in quanto l'analisi HPLC dell'estratto ottenuto dopo la partizione liquido/liquido, aveva evidenziato la presenza di sostanze interferenti che rendevano difficoltosa l'identificazione e soprattutto la quantificazione del rotenone. L'estrazione in fase solida su cartuccia di allumina neutra costituisce una modifica di un processo di purificazione già descritto per il latte (9) ed ha consentito la rimozione dei coestratti polari. I tracciati

the evaluation of intra-laboratory reproducibility (inter-assay precision). The trueness was expressed in terms of rotenone recovery rates. The linear response was evaluated by constructing three calibration curves at five concentration levels (0.125-0.25-0.5-1-2 µg ml<sup>-1</sup>) on three different days and calculating the determination coefficient. The detection limit was calculated as apparent rotenone content corresponding to the mean, plus three times the standard deviation of the blank.

## Real samples analysis

The method presented was applied for the detection of residues of rotenone in honey samples taken as part of an experimental study aimed at assessing the efficacy of the miticide treatment with rotenone-based product, with different concentrations and supports (5). The honey samples were taken after periods of 1-3 weeks after the last miticide treatment.

## Results

The SPE on the alumina cartridge technique allowed to obtain chromatograms without any peaks interfering with rotenone, as shown by the chromatogram of a blank sample (Fig. 2). The chromatograms of a blank sample spiked with rotenone at 250 µg kg<sup>-1</sup> and of a rotenone standard at 1 µg ml<sup>-1</sup> are illustrated in Figures 3 and 4, respectively. The results relating to the precision and trueness of the method, obtained by adding rotenone to a blank honey sample, are summarised in Tables I and II. The repeatability tests provided recovery percentages between 75.5% and 90.9% with a coefficient of variation (CV%) included in the range from 5.9% to 6.7%. The recovery rates related to the intra-laboratory reproducibility were in the range 81.4%-86.6% (CV% 9.2-10.6%). The linearity of response was evaluated by constructing three calibration curves at five concentration levels, over three days. The mean curve showed a determination coefficient R<sup>2</sup> of 0.9999 (Fig. 5). The method detection limit was equal to 40 µg kg<sup>-1</sup> of rotenone. The application of this method to six honey samples obtained from a study to evaluate the efficacy of rotenone as a miticide (5), provided concentrations included in the range 40-430 µg kg<sup>-1</sup>.

## Discussion

The purpose of this study was to develop and validate a reliable and

cromatografici di campioni negativi di miele grezzo e raffinato, hanno dimostrato l'assenza di interferenti nell'intervallo di eluizione del rotenone (tempo di ritenzione 6-7 min). Un contributo importante alla specificità del metodo è derivato dalla scelta della lunghezza d'onda di rivelazione (295 nm), che si è rivelata estremamente selettiva per l'analita in esame. I dati di precisione e accuratezza del metodo, ottenuti nel corso delle prove di ripetibilità e di riproducibilità intra-laboratorio, sono risultati conformi ai valori guida suggeriti dalla normativa europea vigente (8). Il limite di rivelazione ottenuto è idoneo allo scopo di rivelare residui di rotenone ai livelli presenti in campioni di miele prodotto da api sottoposte a trattamento acaricida con dosi efficaci di tale principio attivo. In conclusione, il metodo sviluppato è adeguato per la ricerca di routine del rotenone in campione di miele, grazie alle sue caratteristiche di semplicità d'esecuzione, rapidità ed affidabilità delle prestazioni analitiche.

### Bibliografia/References

1. **Bernal J.L., del Nozal M.J., Rivera J.M., Jiménez J.J. & Atienza J.** (1996). - Determination of the fungicide vinclozolin in honey and bee larvae by solid-phase and solvent extraction with gas chromatography and electron-capture and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A*, **754**, 507-513.
  2. **Bernal J.L., del Nozal M.J., Toribio L., Jiménez J.J. & Atienza J.** (1997). - High-performance liquid chromatographic determination of benomyl and carbendazim residues in apian samples. *J. Chromatogr. A*, **787**, 129-136.
  3. **Bowman M.C., Holder C.L. & Bone L.I.** (1978). - High pressure liquid chromatographic determination of rotenone and degradation products in animal chow and tissues. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **61** (6), 1445-1455.
  4. **Bushway R.J.** (1984). - High-performance liquid chromatographic analysis of rotenone and rotenonone in water by direct injection. *J. Chromatography*, **303**, 263-266.
  5. **Calvarese S., Langella V. & Battistini M.L.** (1998). - Studio del rotenone per il controllo della Varroasi. Teramo, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise «G. Caporale», Teramo, Italia.
  6. **Dawson V. & Allen J.** (1988). - Liquid chromatographic determination of rotenone in fish, crayfish, mussels and sediments. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71** (6), 1094-1096.
  7. **Draper W.M., Dhoot J.S. & Perera S.K.** (1999). - Determination of rotenoids and piperonyl butoxide in water, sediments and piscicide formulations. *J. Environ. Monit.*, **1**, 519-524.
  8. Commissione Europea (2002). - Decisione 2002/657/CE del 12 agosto 2002, che attua la direttiva del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati. G.U.C.E. n. L 221 17 agosto 2002: 8-36.
  9. General Inspectorate for Health Protection (1996). - Analytical Methods for Pesticides Residues in Foodstuffs. Sesta Edizione, parte II. The Netherlands.
  10. **Ho J.S. & Budde W.L.** (1994). - Investigation of the natural pesticide rotenone in water using liquid-solid disk extraction, supercritical fluid elution and liquid chromatography/particle beam mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **66** (21), 3716-3722.
  11. **Jiménez J.J., Bernal J.L., del Nozal M.J., Toribio L. & Martín M.T.** (1998). - Gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection in the analysis of pesticides in honey after elution from a florisil column Influence of the honey matrix on the quantitative results. *J. Chromatogr. A*, **823**, 381-387.
  12. **Jiménez J.J., Bernal J.L., del Nozal M.J., Novo M., Higes M. and Llorente J.** (2000). - Determination of rotenone residues in raw honey by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **871**, 67-73.
- straightforward analytical method to detect rotenone residues in raw and commercial honey samples. In the absence of a maximum residue limit for rotenone in honey, concentration levels for validation tests were chosen beforehand on the basis of the rotenone contents measured in honey samples, taken during an experimental study to evaluate the efficacy of the miticide treatment of bees using this substance (5). The extraction process enabled rapid dissolution of the raw and commercial honey sample. The liquid/liquid partition with diethyl ether described by Bowman *et al.* (3) for animal tissues, allowed the authors to transfer the rotenone in the organic phase and remove the sugar component from the sample. The diethyl ether was found to be more effective in the extraction of the sample compared to other organic solvents, such as hexane and petroleum ether, tested during the method development. The introduction of the SPE clean-up step was necessary since the HPLC analysis of the extract obtained after liquid/liquid partition had shown the presence of interfering substances which made identification and almost all quantification of the rotenone difficult. The SPE on an alumina cartridge here described is a modification to a clean-up process previously reported for milk (9) and enabled the removal of polar coextracts. The chromatograms of blank samples of raw and refined honey have shown the absence of interference in the elution range of rotenone (retention time: 6-7 minutes). An important contribution to the specificity of the method was the choice of detection wavelength (295 nm), which proved to be extremely selective for the sample. The precision and trueness of the method, obtained during the repeatability and intra-laboratory reproducibility tests, were in agreement with the guideline values suggested by European standards (8). The detection limit obtained is suitable for the purpose of detecting rotenone residue at the levels present in samples of honey produced by bees that have been treated with miticides containing efficient doses of this active ingredient. In conclusion, the method developed is appropriate for the routine detection of rotenone in honey samples, due to its simple approach and the rapid and reliable analytical performance levels.