

# Desarrollo de un método por microextracción en fase sólida para el análisis de la fracción volátil de la miel de abeja de Yucatán

## Solid-phase micro extraction method development for headspace analysis of volatile compounds in honeys from Yucatan

Luis Fernando Cuevas-Glory<sup>a</sup>, Elizabeth Ortiz-Vázquez<sup>b</sup>, Alma Centurión-Yah<sup>b</sup>, Jorge Antonio Pino Alea<sup>c</sup>, Enrique Sauri-Duch<sup>b</sup>

### RESUMEN

La certificación del origen floral de la miel es una aplicación importante para su control de calidad. El aroma de la miel de abeja es altamente dependiente de su fracción volátil, el cual es influenciado por la composición del néctar y que a su vez puede ser asociado con el origen botánico de la miel. Un método reciente involucra el análisis de la fracción volátil de los alimentos por diferentes métodos de extracción y técnicas cromatográficas. El objetivo de este trabajo se centró en desarrollar un método simple que permitiera, mediante la técnica de microextracción en fase sólida del espacio de cabeza (HS-SPME), analizar la fracción volátil de la miel de abeja. Se estudiaron los efectos de las condiciones polaridad y tipo de la fibra de extracción para SPME, tiempo de equilibrio, fuerza iónica, tamaño de la muestra, dilución y temperatura de equilibrio. Los resultados más favorables se obtuvieron con la fibra de Poldimetilsiloxano/Divilbenceno (PDMS/DVB) de 65  $\mu\text{m}$  y las condiciones de operación siguientes: adición de NaCl (20 %), tiempo de desorción (4 min), tamaño de la muestra (6 g), tiempo de extracción (40 min), temperatura (70 °C) de extracción y tiempo de equilibrio (30 min). Mediante este método se obtuvo una desviación estándar relativa menor al 10 %. Se observaron contrastes en los perfiles cromatográficos de los compuestos volátiles, lo cual permitió la diferenciación de algunas mieles de Yucatán.

**PALABRAS CLAVE:** Microextracción en fase sólida, Compuestos volátiles, Miel, Aroma.

### ABSTRACT

The assessment of the botanical origin of unifloral honeys is an important application in food quality control. The aroma is a quality factor of great importance in foods. The aroma of bee honey depends on its volatile fraction composition, which is influenced by both nectar composition and floral origin, which could also be associated with the honey's botanical origin. One recent method involves the analysis of the volatile fraction of foods by different methods of extraction and chromatography techniques. Herein, a simple method for analysing honey volatile compounds was developed using solid-phase micro extraction (SPME). The influence of different conditions related to the isolation and concentration step, such as polarity and type of fiber for SPME, desorption time, ionic force, sample size, time and temperature of the extraction, dilution and temperature of equilibrium, was studied. Highly advantageous results were obtained by using fiber composed of 65 mm Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene (PDMS/DVB), addition of sodium chloride (20 %), desorption time (4 min), sample size (6 g), time (40 min) and temperature (70 °C) of the extraction, and equilibrium time (30 min), enabling an repeatability below 10 % for the volatiles. Differences on the chromatogram profiles, relating to the composition of honey volatiles, were obtained and these results allowed the differentiation of various Yucatan honeys.

**KEYWORDS:** Headspace analysis, Solid-phase micro extraction, Volatile compounds, Honey.

Recibido el 18 de abril de 2007. Aceptado para su publicación el 4 de junio de 2008.

<sup>a</sup> Instituto Tecnológico de Campeche, Carretera Campeche-Escárcega km 9, Campeche, Campeche, CP 24500, México Tel.: +52 981 81920225 Ifcuevas@yahoo.com. Correspondencia al primer autor.

<sup>b</sup> Instituto Tecnológico de Mérida.

<sup>c</sup> Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia, La Habana, Cuba.

La miel de abeja no sólo es altamente apreciada por los consumidores por sus propiedades nutritivas y nutricionales, sino por su aroma característico y sabor dulce y agradable. El aroma es el resultado de la presencia en la miel de muchos compuestos volátiles<sup>(1,2)</sup>, algunos de los cuales provienen del néctar o de las secreciones de las plantas que son colectados por las abejas y otros son originados durante el procesamiento y almacenamiento de la miel<sup>(3,4,5)</sup>.

La preferencia de los consumidores está ligada a las características organolépticas, y éstas dependen del origen botánico del producto. Con el fin de determinar el origen botánico, los analistas deben realizar pruebas sensoriales, fisicoquímicas y de polen<sup>(1)</sup>. Algunos autores han propuesto la caracterización del origen botánico y floral de la miel por medio del estudio de los compuestos volátiles por cromatografía de gases (GC) y cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS)<sup>(6-15)</sup>. Algunas aproximaciones<sup>(6)</sup> han sido realizadas en este sentido, incluyendo la extracción con solventes<sup>(4,8,14)</sup>, extracción y destilación simultáneas<sup>(6,7)</sup>, extracción estática del espacio de cabeza<sup>(13)</sup>, purga y trampa<sup>(6,12)</sup> y microextracción en fase sólida del espacio de cabeza (HS-SPME)<sup>(9,11,15)</sup>. De todas estas técnicas, HS-SPME es una de las mejores opciones, ya que es de bajo precio, no utiliza solventes y es adecuada para la detección de analitos a baja concentración. Con esta técnica no es necesaria la extracción total de los analitos o el equilibrio perfecto, pero sí, que sea consistente el tiempo de muestreo, la temperatura, la polaridad de la fibra y la fuerza iónica<sup>(16)</sup>. Sin embargo, sólo algunas aplicaciones de HS-SPME en el análisis de la miel han tomado en cuenta estos factores que afectan la variabilidad y sensibilidad de los resultados analíticos<sup>(17)</sup>.

El propósito de esta investigación fue desarrollar un método por HS-SPME para determinar los compuestos volátiles en la miel, con la posibilidad de hallar posibles marcadores que permitan diferenciar su origen floral.

Se analizaron tres muestras de cada una de las mieles uniflorales de *Tahonal* (*Viguiera dentata*

Honey is greatly appreciated by consumers, not only for its nutritive and medicinal properties, but also for its characteristic aroma and sweet taste. Aroma is a result of the presence in honey of many volatile compounds<sup>(1,2)</sup>. Some of them come from the nectar or honeydew collected by bees, and others originate during the honey processing or storage<sup>(3,4,5)</sup>.

Consumer choice is linked to organoleptic characteristics and these depend on the botanical origin of the product. In order to determine the botanical origin of honey, the analyst must do a sensory test, physicochemical analysis, and results obtained from pollen analysis<sup>(1)</sup>. Some authors have proposed the characterization of botanical or floral origin by studying the volatile compounds of honey by GC or GC-MS<sup>(6-15)</sup>. Several approaches<sup>(6)</sup> have been employed for this purpose including solvent extraction<sup>(4,8,14)</sup>, simultaneous steam distillation-solvent extraction<sup>(6,7)</sup>, static headspace<sup>(13)</sup>, purge and trap<sup>(6,12)</sup> and headspace solid-phase micro extraction (HS-SPME)<sup>(9,11,15)</sup>. Of all of these techniques, HS-SPME is the best approach as a solvent-free and inexpensive technique, together with its reliable detection of low concentrations of analytes. This technique neither completes extraction of analytes nor is full equilibrium necessary, but consistent sampling time, temperature, fibre polarity, and sample ionic strength are critical<sup>(16)</sup>. However, only a few applications of HS-SPME to the analysis of honey have taken into account these factors that affect the variability and sensitivity of the analytical results<sup>(17)</sup>.

The aim of this investigation was the development of a method for determining honey volatile compounds by HS-SPME in order to determine possible markers of the floral origin.

Three samples of each of the following unifloral honeys were analyzed: *Tahonal* (*Viguiera dentata* Blake, var. *heliantoides*), *Tzitzilché* (*Gymnopodium floribundum* Rolfen) and *Habín* (*Piscidia piscipula* L.). The samples were supplied during 2005 and 2006 by beekeepers situated in Yucatan, Mexico. The honey samples were stored at -20 °C, as soon as harvested. *Tahonal* honey was used to

Blake, var. *heliantoides*), *Tzitzilché* (*Gymnopodium floribundum* Rolfen) y *Habín* (*Piscidia piscipula* L.). Las muestras fueron suministradas por apicultores de Yucatán, México, en los años 2005 y 2006. Las mieles fueron almacenadas a -20 °C tan pronto como fueron cosechadas, hasta su análisis. Para el proceso de estandarización se utilizó exclusivamente miel de *Tahonal*.

Se evaluaron cinco tipos de fibra de diferente polaridad y mecanismos de extracción, tales como: PDMS, 100 mm (Cat. No. 57300-U); PDMS/DVB, 65 mm (Cat. No. 57310-U); CAR/DVB, 65 mm (Cat. No. 5732); Carboxen/PDMS, 75 mm (Cat. No. 5718) y Carboxen/PDMS, 85 mm (Cat. No. 57334-U). La jeringa y las fibras para SPME se adquirieron de la compañía Supelco (Bellefonte, USA).

Con el objeto de lograr una buena extracción de compuestos volátiles, medidos por el área total de los cromatogramas y el número de picos, se evaluaron varias condiciones experimentales, las cuales se discuten en la sección de resultados y discusión. El procedimiento consistió en depositar 6 g de miel, 1.2 g de NaCl y 2.4 ml de agua desionizada (Barnsted E-pure) en viales de 15 ml, los cuales fueron herméticamente cerrados utilizando una septa PTFE-silicón. La muestra fue calentada y agitada magnéticamente para promover el equilibrio entre los analitos en el espacio de cabeza del vial, la muestra y el polímero de la fibra de sílice, lo cual permitió lograr una alta concentración de volátiles en la fibra<sup>(18)</sup>. El equilibrio fue evaluado a 30, 40, 50 y 60 min. El proceso de extracción mediante el sistema HS-SPME fue evaluado a varias temperaturas (40, 50 y 70 °C) y tiempos (20, 40 y 60 min) en un baño con termostato con agitación magnética constante (100 rpm). Al final del tiempo de extracción, la fibra para SPME era retirada del vial e insertada en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases para llevar a cabo la desorción térmica de los analitos.

Los análisis por cromatografía de gases fueron realizados en un cromatógrafo de gases marca Perkin Elmer AutoSystem XL (Norwalk, USA), equipado con un detector de ionización de flama. La

evaluate the effect of the experimental conditions for the extraction process.

Five fibres of different polarity, coatings and extraction mechanism were tested: PDMS, 100 mm (Cat. No. 57300-U); PDMS/DVB, 65 mm (Cat. No. 57310-U); CAR/DVB, 65 mm (Cat. No. 5732); Carboxen/PDMS, 75 mm (Cat. No. 5718); and Carboxen/PDMS, 85 mm (Cat. No. 57334-U). Both SPME manual holder and fibres were purchased from Supelco (Bellefonte, USA).

In order to achieve a good extraction of the volatile compounds, measured by total area and picks number in the GC chromatograms, the experimental conditions were studied, as mentioned in the results and discussion section. The procedure consisted of placing 6 g of honey in a 15-ml vial with 1.2 g of NaCl and 2.5 ml of Barnstead E-pure water. The vial was hermetically sealed with a PTFE-silicone septum, heated and stirred in order to establish an equilibrium among the concentration of analytes in the sample, in the headspace above the sample, and the polymer coating on the fused silica fiber<sup>(18)</sup>. The equilibrium was important in order to achieve high concentration of volatiles on the fiber polymer. The times of equilibrium evaluated were 30, 40, 50 and 60 min. The HS-SPME of the sample was carried out at three temperatures (30, 50 and 70 °C) and three times (20, 40 and 60 min) in a thermostatic bath with constant magnetic stirring (100 rpm). When the extraction step was finished, the SPME fibre was removed from the vial and inserted into the injection port of the GC for thermal desorption of the analytes.

GC analyses were performed on a Perkin Elmer AutoSystem XL (Norwalk, USA) gas chromatograph equipped with a flame ionisation detector (FID). Desorption time evaluation (2 and 4 min for split/splitless mode) at 280 °C were carried out using an inlet of 0.75 mm, which improves the GC resolution. Separation was done on a RTX-5 column (30 m x 0.25 mm x 0.50 mm film thickness; Restek Corp., Norwalk, USA). The column temperature was programmed as follows: 50 °C for 4 min, then increased to 200 °C at a rate of 10 °C/min, and finally increased to 230 °C at a rate of

evaluación del tiempo de desorción (2 y 4 min para el modo de split/splitless) fue realizada a una temperatura de 280 °C, empleando un inserto de 0.75 mm D.I. en el inyector, el cual mejora la resolución de la corrida cromatográfica. La separación de los compuestos volátiles fue realizada en una columna cromatográfica RTX-5 (Restek Corp., Norwalk, USA) de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro y 0.50  $\mu\text{m}$  de espesor de la fase estacionaria. La rampa de temperaturas de la columna fue programada de la siguiente manera: se inició con una temperatura de 50 °C, la cual se mantuvo por 4 min, posteriormente se incrementó la temperatura hasta 200 °C, a una velocidad de 10 °C/min, para finalmente llevarla hasta 230 °C, empleando una velocidad de 20 °C/min, en donde se mantuvo por 10 min. El flujo del gas de arrastre (helio) fue de 1 ml/min y la temperatura del detector de 280 °C.

Se llevaron a cabo análisis de blancos después de acondicionar las fibras a la temperatura recomendada por el fabricante con el fin de identificar posibles contaminantes provenientes de las fibras o del sistema cromatográfico. La evaluación de estos blancos no mostró compuestos extraños.

#### HS-SPME

Se llevaron a cabo ensayos preliminares con fibras de PDMS (100 mm) para establecer las condiciones experimentales para la microextracción en fase sólida del espacio de cabeza (HS-SPME) de los compuestos volátiles de la miel, particularmente la adición de cloruro de sodio, agua o ambos materiales a la miel. Los mejores resultados se obtuvieron con la adición de sal y agua (Figura 1). La presencia de cloruro de sodio a las muestras incrementó la extracción debido a que la adición de esta sal puede afectar el coeficiente de partición líquido-gas de los analitos<sup>(16)</sup>. La adición de agua disminuyó la densidad de la muestra y los analitos pudieron ser fácilmente evaporados de la matriz de miel.

Se evaluaron cinco fibras diferentes para SPME y dos tiempos de desorción para las condiciones arriba descritas. Estas fibras fueron seleccionadas con base

20 °C/min, held at 230 °C for 10 min. The carrier gas (helium) flow rate was 1 ml/min and detector temperature was 280 °C.

Blank analyses were run after conditioning the fibre at the manufacturer's recommended temperature in order to characterize possible contaminants from the fibre or from the chromatographic system. Examination of blanks did not show any interfering compound.

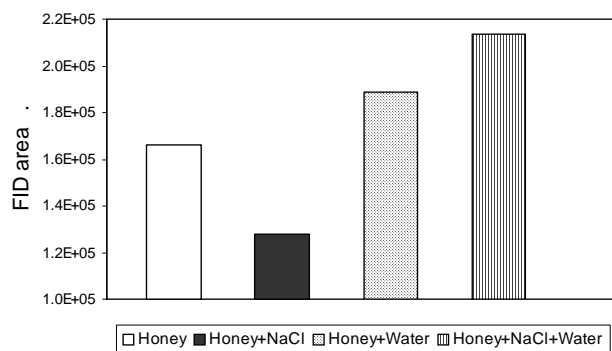
#### HS-SPME

Preliminary assays with PDMS (100 mm) fibre were carried out to establish the experimental conditions for HS-SPME of honey volatile compounds, particularly the addition of sodium chloride, water and/or both materials to the honey. The best results were obtained with the addition of salt and water (Figure 1). The addition of sodium chloride to the sample increased the extraction because this addition can affect the liquid-gas partition coefficients of the analytes<sup>(16)</sup>. The addition of water decreased the density of the sample and then the analytes easily evaporate from the sample.

Five different SPME fibres and two desorption times were evaluated in the conditions described above.

Figura 1 Efecto de adición de sal, agua y una solución de sal con agua en la concentración de los compuestos volátiles de la miel de *Tahonal*.

Figure 1 Effect of salt, water, and salt-water mixture on concentration of volatile compounds extracted from *Tahonal* honey

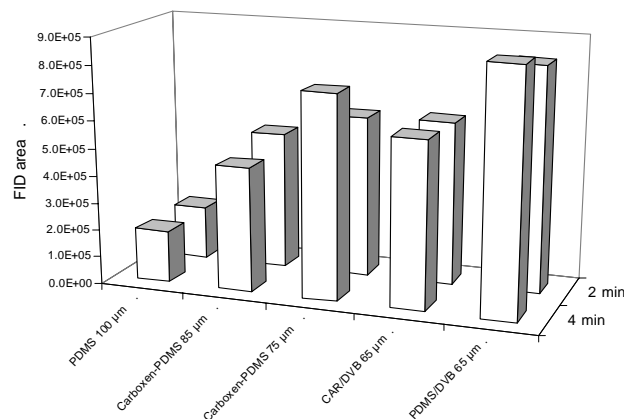


a los resultados reportados previamente<sup>(11,15)</sup> y a los resultados de ensayos preliminares obtenidos en el laboratorio. La Figura 2 presenta los resultados de estas fibras para la miel de *Tahonal*. La fibra de PDMS/DVB (65  $\mu\text{m}$ ) mostró la mayor eficiencia global en la extracción, ya que se observó una alta concentración de compuestos muy volátiles y semivolátiles, así como un alto número de estos compuestos. Verzera<sup>(15)</sup>, reportó que las fibras de PDMS/DVB (65  $\mu\text{m}$ ), comparada contra fibras de PDMS en igualdad de condiciones, son más adecuadas para la extracción de los compuestos volátiles de la miel. El tiempo de desorción de 4 min fue mejor que el de 2 min. De esta forma, la fibra de PDMS/DVB y el tiempo de 4 min de desorción fueron seleccionados para los análisis subsiguientes.

La adición de sal a la muestra (efecto *salting out*) puede modificar la eficiencia de la extracción. Al parecer, la naturaleza de la matriz puede ser modificada por sal, ya que su adición puede afectar el coeficiente de partición líquido-gas de los analitos<sup>(17,18)</sup>. El efecto de la sal fue investigado y varios ensayos fueron realizados con las mismas condiciones de extracción de los experimentos previos,

Figura 2. Evaluación del efecto del tipo de fibra para SPME y el tiempo de desorción en la concentración de los compuestos volátiles extraídos de la miel de *Tahonal*

Figure 2. Evaluation of different fibers, and fiber desorption time on concentration of volatile compounds extracted from *Tahonal* honey

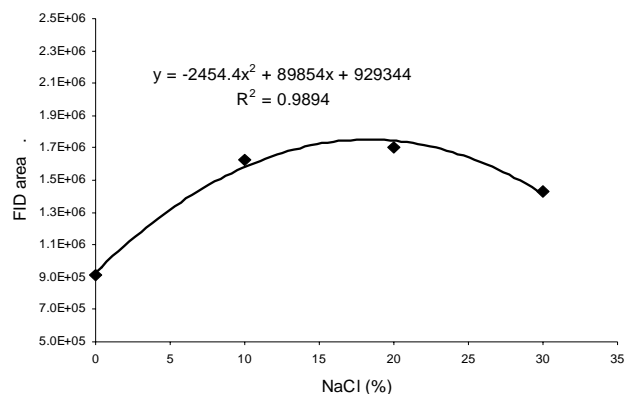


These fibres were selected based on the results previously reported<sup>(11,15)</sup> and those obtained in our laboratory in preliminary assays. Figure 2 presents the results with these fibres for *Tahonal* honey. The PDMS/DVB (65  $\mu\text{m}$ ) coating showed the best overall extraction efficiency, due to the higher concentration of very volatile and semivolatile compounds. Also, with this fibre the higher number of volatile compounds was obtained in the chromatogram (data not shown). Desorption time of 4 min was better than 2 min. Therefore, the PDMS/DVB fibre and 4 min desorption time were selected for subsequent analysis. Verzera<sup>(15)</sup> compared this fibre with PDMS coating and reported also this fibre as the most suitable for honey volatile compounds.

The addition of salt to the sample (salting out effect) can modify the extraction efficiency. It seems that the nature of the matrix can be modified by adding salt because this addition can affect the liquid-gas partition coefficients of the analytes<sup>(17,19)</sup>. The effect of salt was investigated and several assays were made with the same extraction conditions as in the previous experiments, but different amounts of sodium chloride (0-30 %) were added to the mixture of honey and water. As it is shown in Figure 3, there is a maximum in the extraction efficiency between 10 and 20 % of salt. Therefore,

Figura 3. Efecto de la proporción de sal adicionada a la muestra de miel de *Tahonal* en la concentración de los compuestos volátiles extraídos.

Figure 3. Effect of the amount of salt added to *Tahonal* honey on concentration of volatile compounds extracted



pero adicionando diferentes cantidades de cloruro de sodio (0-30 %) a la mezcla de miel y agua.

Tal como se muestra en la Figura 3, hay un máximo en la eficiencia de la extracción entre el 10 y 20 % de sal adicionada. Por lo tanto, la cantidad de 20 % de cloruro de sodio fue seleccionada en el experimento. Verzera<sup>(15)</sup> encontró que la adición de sal mejora la eficiencia de la extracción, mientras que Soria<sup>(14)</sup> no reportó efecto para esta adición.

El sistema HS-SPME es fuertemente influenciado por la temperatura de la muestra durante la extracción, debido al hecho de que los coeficientes de partición son dependientes de la temperatura, y la extracción de los analitos por la fibra es un proceso exotérmico<sup>(16)</sup>. Más aún, la temperatura de extracción está muy relacionada con el tiempo de extracción, por lo cual, ambas condiciones fueron estudiadas simultáneamente. Se probaron períodos de tiempo de extracción de 20, 40 y 60 min a temperaturas de 30, 50 y 70 °C (Figura 4). Las mejores condiciones de operación fueron seleccionadas de acuerdo al número y cantidad de los compuestos volátiles. La formación de artefactos y el tiempo de análisis fueron así mismo considerados. Se obtuvieron resultados altamente

20 % of sodium chloride was selected in all the experiments. Verzera<sup>(15)</sup> found that salt addition improves extraction efficiency, whereas Soria<sup>(14)</sup> reported no effect for this addition.

The HS-SPME is strongly influenced by the sample temperature during extraction due to the fact that partition coefficients are temperature-dependent and the extraction of the analytes by the fibre is an exothermic process<sup>(16)</sup>. Furthermore, the extraction temperature is closely related to the extraction time, so both conditions were studied simultaneously. Periods of time of 20, 40 and 60 min were tested at 30, 50 and 70 °C (Figure 4). The best operating conditions were selected according to the number and amount (peak's area) of the volatile compounds. Artifact formation and analysis time were also taken into account. Highly advantageous results were obtained at 40 min at 70 °C.

Finally, the influence of pre-extraction time (equilibrium time) was considered. As is shown in Figure 5, the equilibrium was reached at 30 min, so this time was selected for pre-extraction time.

In order to test method reproducibility, six different samples of the same *Tzitzilché* honey were analysed

Figura 4. Efecto del tiempo y temperatura de extracción en la concentración de los volátiles de la miel de *Tahonal*

Figure 4. Effect of both time and temperature of extraction on concentration of volatile compounds from *Tahonal* honey

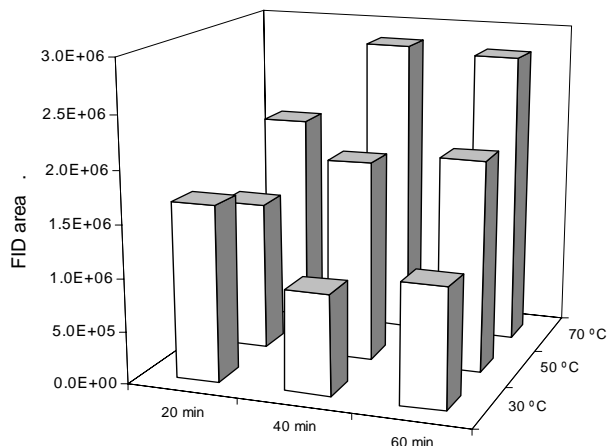
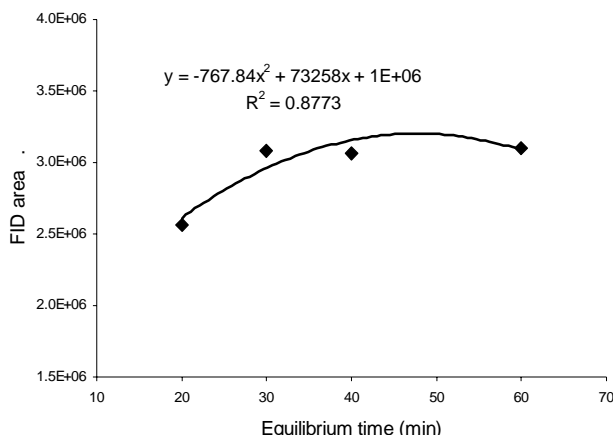


Figura 5. Efecto del tiempo de preextracción (equilibrio) en la concentración de los compuestos volátiles de la miel de *Tahonal*

Figure 5. Effect of pre-extraction (equilibrium) time on concentration of volatile compounds from *Tahonal* honey



favorables a un tiempo de 40 min y a una temperatura de 70 °C.

Finalmente, se tomó en cuenta la influencia del tiempo de pre-extracción o de equilibrio en el espacio de cabeza. En la Figura 5 se observa que el equilibrio se alcanzó a los 30 min, por lo que este tiempo fue seleccionado para realizar la pre-extracción de los volátiles de la miel.

Con el fin de medir la reproducibilidad del método, seis diferentes muestras de la misma miel de *Tzitzilché* fueron analizadas en condiciones experimentales idénticas (Cuadro 1). Las áreas de los picos fueron clasificadas como bajo, mediano y alto para calcular la desviación estándar relativa promedio (DER), las cuales fueron menores al 10 % en todos los casos.

*Aplicación para el análisis cuantitativo en miel de abeja*

Tres mieles comerciales disponibles de diferente origen floral (*Tahonal*, *Tzitzilché* and *Habín*) fueron

Cuadro 1. Área total de los compuestos volátiles de la miel de *Tzitzilché*, obtenida por HS-SPME-GC y su desviación estándar relativa (RSD)

Table 1. Chromatogram areas and relative standard deviations (RSD) for volatile compounds in *Tzitzilché* honey

Retention time (min)	Area	RSD (%)
Low level		
10.26	2918	10.1
13.28	18454	9.4
13.83	9013	6.6
15.76	20274	9.9
Middle level		
10.74	73696	8.6
12.99	57639	9.5
15.43	119594	9.9
17.76	73104	9.0
High level		
12.49	675514	6.4
13.56	1062336	9.7
16.39	1085816	8.9
16.60	165996	9.5

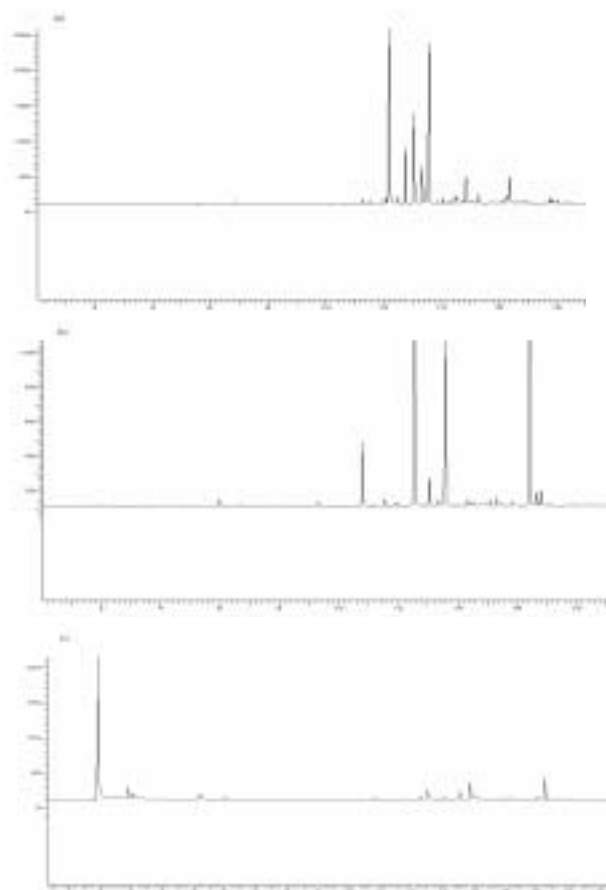
under identical experimental conditions (Table 1). The peak areas were classified as low, middle and high to calculate the average relative standard deviations (RSDs). It can be seen that the resulting RSDs were lower than 10 % in all cases.

*Application to qualitative analysis of honey*

Three commercial available honeys of different floral origin (*Tahonal*, *Tzitzilché* and *Habín*) were analyzed by the developed HS-SPME method (Figure 6). As can be seen from the figure, each floral honey has a typical volatile fraction composition. Choosing HS-SPME-GC/MS the

Figura 6. Cromatogramas obtenidos por HS-SPME-GC de: (a) miel de *Tahonal*, (b) miel de *Tzitzilché* y (c) miel de *Habín*.

Figure 6. HS-SPME-GC chromatogram of (a) *Tahonal* honey, (b) *Tzitzilché* honey and (c) *Habín* honey



analizadas mediante HS-SPME (siguiendo el método desarrollado en este trabajo. Como puede verse en la Figura 6, la composición de la fracción volátil es típica para cada tipo de miel analizada. Mediante HS-SPME-GC/MS la caracterización cualitativa y cuantitativa de las diferentes mieles será posible en un tiempo corto siguiendo este procedimiento sencillo y con buena reproducibilidad. Estos estudios están en progreso y serán publicados en fecha próxima.

Se puede resumir que los parámetros previamente identificados que tienen influencia en el proceso de extracción son: fibra de PDMS/DVB (65  $\mu\text{m}$ ) y tiempo de desorción de 4 min; adición de un 20 % de cloruro de sodio a las muestras de miel; tiempo de equilibrio de 30 min para la pre-extracción; tiempo de extracción de 40 min y temperatura para pre-extracción y extracción de 70 °C.

La técnica SPME/GC representa un método apropiado para la extracción de los compuestos volátiles de la miel y, debido a que no utilizan solventes, los análisis son finalizados en un tiempo relativamente corto, no hay interferencias debido al solvente y la cantidad de muestra requerida es mínima. De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, este método puede ser una poderosa alternativa para el análisis de los compuestos volátiles de la miel de abeja.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional para la Ciencia y Tecnología (CONACyT) de México por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo y al Consejo del Sistema Nacional para la Educación Tecnológica (CoSNET) por la beca concedida a Luis Cuevas-Glory para la realización de sus estudios de doctorado.

## LITERATURA CITADA

1. Anklam E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry* 1998;63(4):549-562.

qualitative and quantitative characterization of the different honeys will be possible in a short time, by a simple procedure and with good reproducibility, as necessary for a statistical validation. These studies are in progress and will be published at a further date.

Different parameters that influenced the extraction were: PDMS/DVB (65  $\mu\text{m}$ ) fibre and 4 min desorption time; addition of 20 % sodium chloride to the honey samples; equilibrium time of 30 min for pre-extraction; extraction time of 40 min, at a temperature of 70 °C.

SPME/GC represents a suitable extraction method for volatile compounds in bee honey since as organic solvents are not necessary; analyses are completed in a short time and sample consumption is low. The results obtained indicated that the proposed method could be a useful alternative for honey volatile compounds analysis.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the Consejo Nacional para la Ciencia y Tecnología (CONACyT) of Mexico for the financial support given and the Consejo del Sistema Nacional para la Educación Tecnológica (CoSNET) for providing Luis Cuevas-Glory doctoral fellowship.

*End of english version*

- 
2. Maga JA. Honey flavor. *Lebensm -Wiss U Tech* 1983;16(2):65-68.
  3. D'Arcy BR, Rintoul GB, Rowland CY, Blackman AJ. Composition of Australian honeys extractives. I Norisoprenoids, monoterpenes, and others natural volatiles from Blue Gum (*Eucalyptus leucoxylon*) and Yellow Box (*Eucalyptus melliodor*). *J Agric Food Chem* 1997;45(5):1834-1843.
  4. Guyot C, Bousseta A, Scheirman V, Collin S. Floral origin markers of chestnut and lime tree honeys. *J Agric Food Chem* 1998;46(2):625-633.
  5. Singh N, Bath PK. Relationship between heating and hydroxymethylfurfural formation in different honey types. *J Food Sci Tech* 1998;35(2):154-156.



## MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA PARA EL ANÁLISIS DE LA MIEL DE ABEJA DE YUCATÁN

6. Bouseta A, Collin S, Doufour J. Characteristic aroma profiles of unifloral honeys obtained with a dynamic headspace GC-MS system. *J Apic Res* 1992;32(2):96-109.
7. Bouseta A, Collin S. Optimized Likens-Nickerson methodology for quantifying honey flavors. *J Agric Food Chem* 1995;43(7):1890-1897.
8. Cuevas-Glory L, Pino JA, Santiago LS, Sauri-Duch E. A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey. *Food Chem* 2007;103(3):1032-1043.
9. de la Fuente E, Martínez-Castro I, Sanz J. Characterization of Spanish unifloral honeys by solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Separation Sci* 2005;28:1093-1100.
10. Pérez RA, Sánchez-Brunete C, Calvo RM, Tadeo JL. Analysis of volatiles from spanish honeys by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 2002;50(9):2633-2637.
11. Piasenzotto L, Gracco L, Conte L. Solid phase microextraction (SPME) applied to honey quality control. *J Sci Food Agric* 2003;83:1037-1044.
12. Radovic BS, Careri M, Mangia A, Musci M, Gerboles M, Anklam E. Contribution of dynamic headspace GC-MS analysis of aroma compounds to authenticity testing of honey. *Food Chem* 2001;72(4):511-520.
13. Rowland CY, Blackman AJ, D'Arcy BR, Rintoul GB. Comparison of organic extractives found in Leatherwood (*Eucryphia lucida*) honey and Leatherwood flowers and leaves. *J Agric Food Chem* 1995;43(3):753-763.
14. Soria AC, Martínez-Castro I, Sanz J. Analysis of volatile composition of honey by solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Separation Sci* 2003;26:793-801.
15. Verzera A, Campisi S, Zappala M, Bonaccorsi I. SPME-GC-MS analysis of honey volatile components for the characterization of different floral origin. *Am Lab* 2001;18-21.
16. Pawliszyn J. *Solid-Phase Microextraction. Theory and practice.* New York, USA: Wiley-VCH; 1997.
17. Pawliszyn J. *Application of Solid Phase Microextraction.* Ontario, Canada: Royal Society of Chemistry; 1999.
18. Wardencki W, Michulec M, Curylo J. A review of theoretical and practical aspects of solid-phase microextraction in food analysis. *Intern J Food Sci Technol* 2004;39:703-717.

