

Bestimmung von Amitraz in Honig nach SPDE – GC-MS/MS

Methode des Chemischen und Veterinäruntersuchungsamtes Sigmaringen (Hedingerstraße 2/1, 72488 Sigmaringen), H. Hahn, A. Nothhelfer und S. Preuß

1. Einleitung:

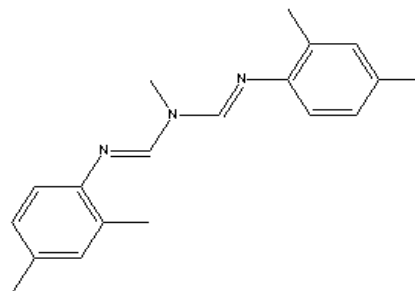
Amitraz (Abb. 1), chemisch zugehörig der Gruppe der Formamidine, wird in der Landwirtschaft zur Bekämpfung von Milben, Blattläusen und anderen saugenden Insekten verwendet. In der Imkerei ist der Einsatz von Amitraz zum Schutz der Bienenvölker vor der Varroa-Milbe bekannt geworden.

Die Grenzwerte für Amitraz-Rückstände in Lebensmitteln sind für Deutschland in der Rückstandshöchstmengenverordnung festgeschrieben. Für Honig beträgt die Höchstmenge 200 µg/kg.

Honig wird regelmäßig im Rahmen des Nationalen Rückstandskontrollplans auf Amitraz-Rückstände untersucht. Hierzu wurde bisher das relativ aufwändige Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG (1) angewandt. Die Bestimmung erfolgt dabei gaschromatographisch nach alkalischer Spaltung von Amitraz und Isolierung des Reaktionsprodukts 2,4-Dimethylanilin (Abb. 1) durch Clevenger-Destillation.

Dieses Prinzip konnte durch Kombination der automatisiert ablaufenden SPDE-Aufgabetechnik (siehe Abb. 2) und der massenspektrometrischen Detektion im MS/MS-Modus (SPDE-GC/MS/MS) wesentlich vereinfacht werden. Im Folgenden wird ein Verfahren beschrieben, das die Bestimmung von Amitraz auf einen Bruchteil der bislang erforderlichen Analysendauer reduziert.

Als interner Standard dient 4-Chlor-2-methylanilin. Die Quantifizierung erfolgt durch Vergleich mit dotierten Honigen anhand einer Matrixkalibrierung, d.h. rückstandsfreiem Honig wird Amitraz zugesetzt.



Amitraz

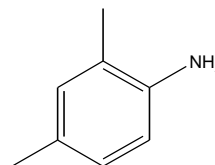
(1,5-Di(2,4-dimethylphenyl)-3-methyl-1,3,5-triazapenta-1,4-diene)

Synonyme: Ovasyn; Mitac; Baam; Triazid; Tactic; 1,5-Di(2,4-dimethylphenyl)-3-methyl-1,3,5-triazapenta-1,4-diene; Formamidine, N-methyl-N'-2,4-xylyl-N-(N-2,4-xylylformimidoyl)-; Methylbis(2,4-xylyliminomethyl)amine

Summenformel: C₁₉H₂₃N₃

CAS-Nr.: 33089-61-1

Molekulargewicht: 293,41 g/mol



2,4-Dimethylanilin

Summenformel: C₈H₁₁N

CAS-Nr.: 95-68-1

Molekulargewicht: 121,18 g/mol

Abb. 1: Chemische Daten von Amitraz und dem Reaktionsprodukt 2,4-Dimethylanilin

2. Reagenzien und Vergleichssubstanzen

- Amitraz, z. B. Fa. Promochem (C 102300)
- 4-Chlor-2-methylanilin als Interner Standard (z.B. Fa. Aldrich C5,110-5)
- Natronlauge: 5 %

3. Lösungen

Stammlösungen

- Amitraz: 500 mg/l in Aceton.

Dotierungslösungen:

Verdünnung der Stammlösungen jeweils im Verhältnis 1:50 mit Aceton (resultierende Konzentrationen: 10 mg/l)

Kalibrierreihe:

Es werden zu jeweils 2 g rückstandsfreiem Honig unterschiedliche Volumina der Amitraz-Dotierungslösung (10 mg/l) sowie der ISTD-Dotierungslösung (10 mg/l) zugemischt. Beispielsweise ergibt sich folgende Reihe:

	Probe	Blindmatrix	S I	S II	S III	S IV	S V
Amitraz-Dotierungslsg., µl	-	-	20	40	60	100	200
Amitraz, µg	-	-	0,2	0,4	0,6	1	2
Konz. Amitraz i.d. Probe, µg/kg		-	100	200	300	500	1000
ISTD Dotierungslsg., µl	60	60	60	60	60	60	60
Konz. ISTD, µg/kg	300	300	300	300	300	300	300

Die Stammlösungen und Verdünnungen werden im Tiefkühlschrank aufbewahrt.

4. Geräte und Hilfsmittel

20 ml Headspace-Gläschen

Stahlkappen (für den CTC-Combipal-Probengeber unbedingt erforderlich) mit Silikon/Teflon-Dichtung.

SPDE-System der Firma Chromtech für die Verwendung mit dem CTC-Combipal-Probengeber (Anreicherung auf innenbeschichteter Spritzennadel, siehe Abb. 2).

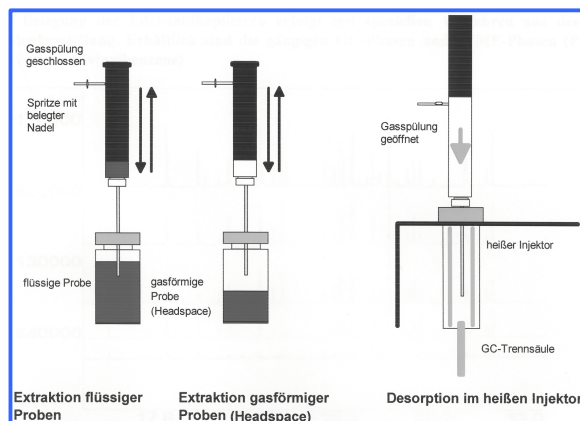


Abb. 2: Prinzip der automatischen SPDE-Extraktion. Der Analyt wird durch Pumpbewegungen auf der speziellen SPDE-Nadel angereichert und anschließend thermisch desorbiert.

5. Durchführung

2,00 g Honig werden in ein 20 ml Headspacegläschen eingewogen. Anschließend werden 5 ml 5%ige Natronlauge zugesetzt.

Die verschlossenen Vials werden im Thermoblock für 1 Stunde bei 95 °C konditioniert. Nach Abkühlung wird das aus Amitraz entstandene 2,4-Dimethylanilin mittels SPDE-GC/MS/MS gemessen.

6. Bedingungen

Folgende Geräte und Einstellungen haben sich bewährt.

Geräte: GC: Thermo-Finnigan Trace 2000
MS/MS (Iontrap): Thermo-Finnigan Polaris Q
Autosampler: CTC-Combipal mit Chromtech SPDE (s.o.) mit spezieller 2.5 ml Headspace-Spritze mit innenbeschichteter Kanüle 80 mm mit 50 µm PDMS (Polydimethylsiloxan) belegt (Code Nr.: SPDE-1-50-80)

GC-Säule: DB-1701 / 45 m / 0,32 mm i.D. / 1 µm Belegung

Säulenfluss: 1,2 ml/min Helium

Temperaturprogramm GC-Ofen: 50 °C - 1,5 min - 20 °/min - 120 °C - 0 min - 15 °/min - 200 °C - 0 min - 10 °/min - 270 °C - 10 min

Temperatureinstellungen: Injektor: 250 °C; Interface: 270 °C

SPDE-Bedingungen:

Pre Incubation Time (sec):	40
Needle Flush time (sec):	10
Syringe Temp (°C)	40
Incubation Temp (°C):	40
Agitator Speed (rpm):	500
Agitator On Time (sec):	10
Agitator Off Time (sec):	2
Sample Penetration (mm):	35
Extraction Strokes (Anzahl der Hübe)	25
Extraktionsvolumen pro Hub (µl)	2000
Desorption Gas Volume (µl):	750
Injector Penetration (mm):	50
Desorption Flow Speed (µl/sec):	50
Pre Desorption Time (sec):	15
GC-Runtime (min):	30
Temp. Nadelkonditionierung (°C)	260
Zeitdauer Nadelkonditionierung (min)	3

MS/MS - Bedingungen:

Ionisierungsart: Electron Impact (EI), Anregungsenergie 70 eV

Ionenübergänge (jeweils Anregungsspannung: 1,2 V; q-Wert: 0,45):

Gruppe 1 (2,4-Dimethylanilin): 10-13,2 min, Precursor: 120,5 ± 1 m/e, Produktionsbereich: 60-110 m/e

Gruppe 2 (4-Chlor-2-methylanilin): 13,2-17 min, Precursor: 106 ± 0,7 m/e, Produktionsbereich: 53-107 m/e

7. Auswertung

Die Auswertung erfolgt nach dem Internen-Standard-Verfahren. Zur Erstellung der Kalibrierkurve werden die Flächenquotienten von 2,4-Dimethylanilin und 4-Chlor-2-methylanilin gegen die Amitraz-Konzentrationen aufgetragen.

Die Amitraz-Konzentrationen der Proben-Messlösungen werden aus den Flächenquotienten und den Regressionsparametern (Steigung, Achsenabschnitt) bestimmt.

Die berechnete Konzentration ist bereits auf 2 g Honig bezogen. Somit muss noch auf die Einwaage umgerechnet werden.

$$\text{Rückstandsgehalt (} \mu\text{g/kg) Amitraz} = \frac{C_{A_Kalib} \times 2}{EW}$$

(berechnet als „Gesamtgehalt von Amitraz und aller Metaboliten, die 2,4-Dimethylanilin-Gruppe enthalten, insgesamt berechnet als Amitraz“)

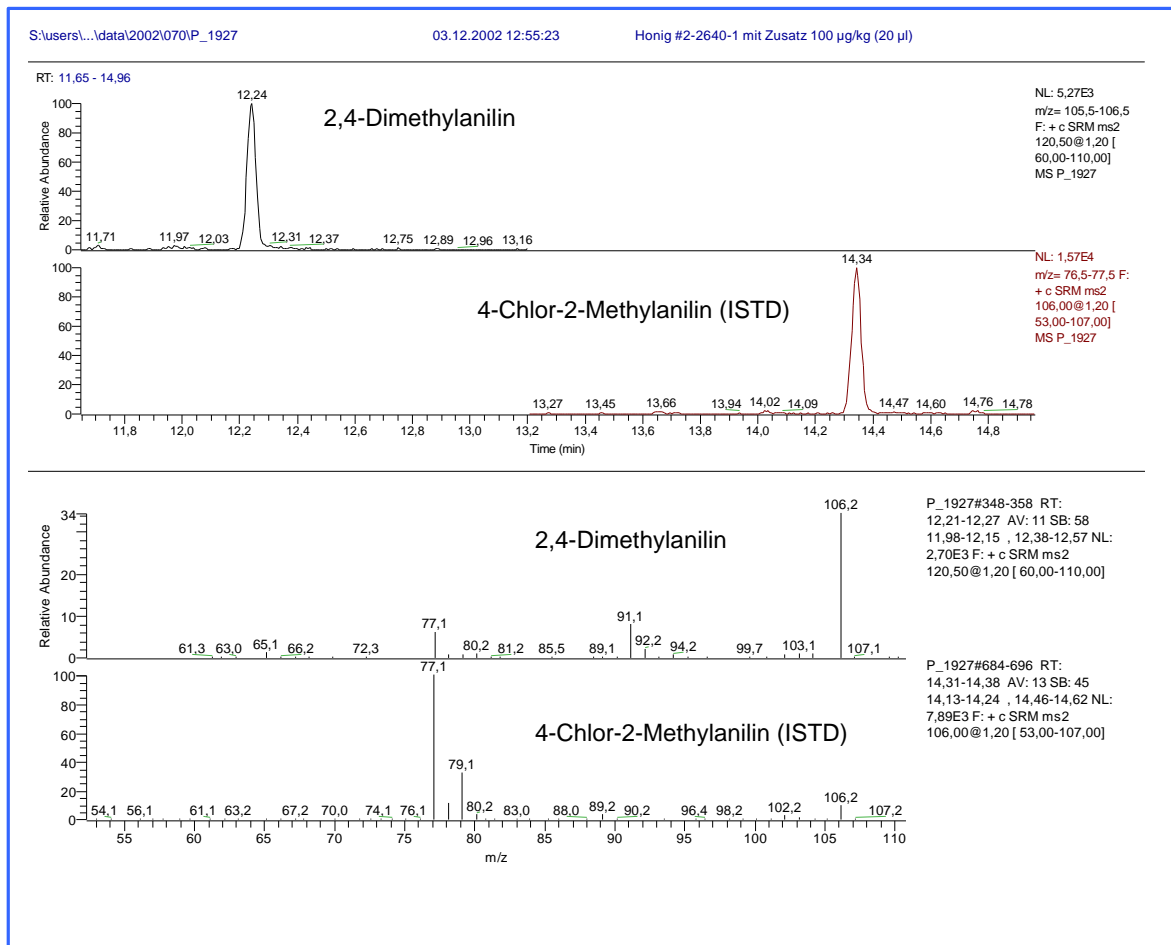
C_{A_Kalib} = Konzentration von Amitraz in µg/kg (bestimmt über Kalibriergerade)

EW = Einwaage der Probe in g

8. Validierung

Auf der Basis der Untersuchung von dotierten Proben konnte eine rechnerische Nachweisgrenze (nach dem DFG-Verfahren) von 140 µg/kg Honig bzw. eine Bestimmungsgrenze von 200 µg/kg Honig ermittelt werden. Die Wiederfindung betrug zwischen 87 und 99 %. Eine massenspektrometrische Identifizierung ist bis zu einer Konzentration von 15 µg/kg Amitraz möglich (S/N 5:1). Ein Screening ist damit problemlos durchzuführen. Konzentrationen im Bereich des Grenzwertes (200 µg/kg Honig) werden mit dem § 35-LMBG-Referenzverfahren abgesichert.

8. Chromatogramme und Spektren



10. Literatur

- (1) Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG L 00.00-58: Gaschromatographische Bestimmung von Amitraz und Vinclozolin sowie ihren 2,4-Dimethylanilin bzw. 3,5-Dichloranilin enthaltenden Metaboliten in Lebensmitteln, Stand Juli 2000, Beuth-Verlag.

Wir danken dem Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Sigmaringen (H. Hahn, A. Nothhelfer und S. Preuß) für die freundliche Überlassung der Daten und der Zusammenfassung dieser SPDE-Applikation.