

## Newsletter Bestimmung von Amitraz in Honig

### Zusammenfassung

QSI verwendet seit Ende Januar 2018 eine neue LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von Amitraz (inkl. seiner Metaboliten) in Honig. Das neue Verfahren liefert gegenüber der zuvor verwendeten Hydrolyse-Methode deutlich höhere Werte für Amitraz, welches in der EU mit einer Höchstmenge von 0,2 mg/kg als Tierarzneimittel sowie als Pestizid rechtlich geregelt ist.

Für die Qualitätskontrolle durch die Honig-Industrie ist es aus Sicht der Beurteilung der Verkehrsfähigkeit und möglicher Beanstandungen durch Behörden oder Verbraucherorganisation unseres Erachtens sicherer, mit der neuen Methodik zu untersuchen, da die Befunde der neuen Methodik die tatsächlich enthaltenen Befunde realistischer widerspiegeln. Kritisch zu beurteilen sind in Bezug auf Rückstände insbesondere Bio-Waren, da Amitraz in der Bio-Imkerei nicht zugelassen ist, in der konventionellen Imkerei jedoch häufig verwendet wird und zum Beispiel auch über kontaminiertes Wachs in den Honig eingetragen werden kann.

Folgende Punkte sind bei der analytischen Qualitätskontrolle von Amitraz-Rückständen in Honig zu beachten:

1. Unterschiedliche Labore bieten die Amitraz-Analytik mit unterschiedlichen Methoden bzw. Bestimmungsgrenzen (BG) an und berichten meist nur Befunde oberhalb der BG. Die von den Behörden verwendeten Methoden sind in der Regel nicht bekannt. Ebenso unbekannt sind die stöchiometrischen Umrechnungsfaktoren, die zur Berechnung der Summe Amitraz verwendet werden sowie ob überhaupt eine Umrechnung über die Molmassen, wie sie rechtlich in Europa vorgeschrieben ist, durch die Labore erfolgt. Die „realen“ Amitraz-Gehalte in einer Honig-Charge sind unbekannt und können je nach Untersuchungsmethode und Berechnung von den Laboren möglicherweise unter- oder überschätzt werden. Falsch-positive Befunde sind dagegen bei Verwendung von LC-MS/MS- oder GC-MS/MS-Methoden und entsprechender Qualitätssicherung quasi ausgeschlossen.
2. Die einzelnen Messwerte der drei Amitraz-Metaboliten DMPF, DMF und DMA unterliegen wie der berechnete Wert von Amitraz einer erweiterten Messunsicherheit von +- 50 % und können damit möglicherweise (z.B. bei Bio-Ware) mal oberhalb und mal unterhalb der jeweiligen BG gefunden werden. Befunde knapp unterhalb der BG können in einer weiteren Untersuchung auch oberhalb der BG liegen. Einige Labore berichten keine Werte unterhalb der BG.
3. Die Messunsicherheiten für Honig-Rohwaren sind höher anzunehmen als für homogenisierte Waren. Zur Untersuchung eingereichte Labormuster sind eventuell nicht für die gesamte Charge repräsentativ. Im Zweifel sollten mehrere Proben einer Charge untersucht werden (insb. Bio-Ware mit Positivbefund), um verlässliche Aussagen über die gesamte Charge zu erhalten.

QSI berichtet neben dem rechtlich geregelten Wert von Amitraz jetzt auch die mit der neuen Methodik bestimmten Gehalte der drei Amitraz-Metaboliten explizit im Analysenbericht. Die Bestimmung von Amitraz kann mit unterschiedlichen Bestimmungsgrenzen bestellt werden (5 µg/kg, 10 µg/kg, 20 µg/kg) sowie auch innerhalb von Paketen zusammen mit anderen Bienenarzneimitteln und ist auch im Pestizid-Screening (600+ Pestizide, LC-MS/MS und GC-MS/MS) enthalten. Bitte sprechen Sie uns für ein individuelles Angebot gerne an.

## Hintergrund und technische Information zur Methodenänderung

Der Wirkstoff Amitraz ist als zugelassenes Bienenarzneimittel (Varroazid) sowie als Pestizid mit einer Höchstmenge von 0,2 mg/kg für Honig in Europa geregelt (37/2010/EU und 396/2005/EG) und wird dementsprechend häufig als Rückstand in Honig detektiert. In der Bio-Imkerei ist Amitraz dagegen nicht zugelassen. Die Substanz Amitraz ist instabil und wird beim Eintrag in Honig innerhalb kürzester Zeit zu den drei bekannten Metaboliten DMPF, DMF und DMA abgebaut, so dass die Substanz Amitraz selbst im Honig in der Regel nicht mehr nachweisbar ist. Dies wird sowohl durch die Rückstandsdefinition von Amitraz („Amitraz einschließlich der Metaboliten, die den 2,4 –Dimethylanilinrest, ausgedrückt als Amitraz, enthalten“) als auch durch die Analysemethoden berücksichtigt. Unserer Erfahrung nach liegen in Honig in der Hauptsache die Metaboliten DMPF und DMF vor.

Für die Bestimmung von Amitraz in Honig gibt es verschiedene publizierte Methoden, die historisch mit der Evolution moderner Messgeräte entstanden sind. Da QSI die Analytik von Amitraz bereits seit dem Jahr 2000 mit GC-MS bzw. seit 2005 mit LC-MS/MS anbietet, wurde seinerzeit die vom staatlichen Veterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt Frankfurt (Oder) beschriebene Methode<sup>1</sup> etabliert. Diese Methode wurde sowohl von amtlicher Seite als auch von QSI innerhalb von Laborvergleichsuntersuchungen (Ringversuchen) umfangreich getestet und als geeignet für den Amitraz-Nachweis bewertet. Diese Methode basiert auf der chemische Umwandlung (saure Hydrolyse) aller im Honig vorliegender Metaboliten zu einem einzigen „Endmetaboliten“, der dann analysiert und quantifiziert wird. Die neueren Methoden messen dagegen die im Honig entstandenen Metaboliten des Amitraz direkt (entweder mittels LC-MS/MS oder GC-MS/MS) und berechnen daraus mathematisch in Summe den Gehalt an Amitraz.

Die vom Amt publizierte und durch QSI und viele andere Labore in den letzten Jahren angewandte Hydrolyse-Methode hat folgende Schwachstelle: die bei „Amitraz-Gabe im Feld“ entstehenden Metaboliten im Honig werden mit der alten Methode nur teilweise im Labor zum „Endmetaboliten“ hydrolysiert und damit chemisch erfasst. Selbst unter der allgemein akzeptierten Annahme bei der Berechnung der Summe Amitraz aus den Metaboliten, dass aus einem Molekül Amitraz nur ein Molekül Metabolit DMPF, DMF oder DMA wird, wurden mit der alten Hydrolyse-Methode Unterbefunde im Vergleich zu moderneren Methoden erhalten, bei denen die real bestehenden Metaboliten direkt im Honig analysiert werden. Die Thematik der „richtigen Quantifizierung“ von Amitraz ist komplex und wurde viele Jahre in den Pestizidlaboren diskutiert, u.a. auf dem European Pesticides Residue Workshop EPRW 2012<sup>2</sup>. Allgemein gilt: der „wahre“ Rückstandsgehalt einer Honig-Probe ist generell nicht bekannt. Die Untersuchungsmethoden können nur versuchen, den Gehalt bestmöglich zu ermitteln. Es ist nach neuesten Erkenntnissen aber anzunehmen, dass in den letzten Jahren die Labore, die die Hydrolyse-Methode verwendet haben, vergleichsweise niedrige Amitraz-Befunde in Honigproben mit gewachsenen Rückständen erhalten haben, und dass die Labore, die die Metaboliten direkt messen, vergleichsweise höhere Befunde erhalten haben.

---

<sup>1</sup> Rückstandsbestimmung von Cymiazol und Gesamt-Amitraz in Bienenhonig durch GC-MS und LC-MS-MS. Christlieb Hemmerling, Astrid Maye und Gilda Seidl. Staatliches Veterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt Frankfurt (Oder)-Markendorf, Ringstr.1030, D-15236 Frankfurt (Oder). Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 96. Jahrgang, Heft 12, 2000

<sup>2</sup> von J Hepperle, Food Chem. 2015 Jan 1;166:240-7 and other links under: [http://www.ua-bw.de/pub/pestschriftum\\_results.asp?PS\\_Autoren=Sch%FCle&subid=1&Thema\\_ID=5&lang=DE](http://www.ua-bw.de/pub/pestschriftum_results.asp?PS_Autoren=Sch%FCle&subid=1&Thema_ID=5&lang=DE)

Amitraz-Grenzwertüberschreitungen von Honig gab es mit der alten Methode unserer Erfahrung nach nur äußerst selten. Mit der neuen Methode wurde der Grenzwert von 0,2 mg/kg bei einigen Proben überschritten, jedoch unter Berücksichtigung der Messunsicherheit von 50% für Pestizide (DG SANTE) führten diese noch nicht zu einer Verkehrsunfähigkeit (erst ab 0,4 mg/kg). Im weltweiten Handel sind jedoch unserer Erfahrung nach zum Teil niedrigere Amitraz-Spezifikationen zwischen den Handelspartnern vereinbart.

Die Berechnung des tatsächlichen Amitraz-Gehaltes einer realen Probe ist leider nicht trivial. Entsprechend der Rückstandsdefinition von Amitraz („Amitraz einschließlich der Metaboliten, die den 2,4 -Dimethylanilinrest, ausgedrückt als Amitraz, enthalten“) müssen aus rechtlicher Sicht die Gehalte der drei Metaboliten zunächst über ihre Molmassen auf die Muttersubstanz Amitraz umgerechnet werden. Geregelt ist hierbei nicht, mit welcher Stöchiometrie der Metabolismus erfolgt und welcher dann der finalen Berechnung der Summe Amitraz zugrunde liegt. In den meisten Laboren wurden konventionell die über die Molmassen umgerechneten Gehalte der Metaboliten bei einer angenommenen Umsetzung von 1:1 einfach summiert und damit der Gehalt für Amitraz ermittelt (s. auch EPRW 2012). Mit dieser Annahme zur Berechnung erhielt man realistische Werte in gewachsenen Proben bei Verwendung der Hydrolyse-Methode. Mit der neuen Methodik werden allerdings die Metaboliten direkt bestimmt und es ergeben sich mit der „klassischen“ Berechnung sehr viel höhere Werte. Es stellte sich die Frage, ob die neue Methode die realen Gehalte überschätzt bzw. ob die Werte mit der klassischen Hydrolyse-Methode unterschätzt werden und welches nun der „wahre“ Gehalt ist.

Wir sind aufgrund neuester Untersuchungen und Kenntnisse der Auffassung, dass bei Verwendung der neuen Methode die „klassische“ Berechnung die Amitraz-Gehalte in realen Proben etwa um einen Faktor 2 überschätzt. QSI verwendet nach neuesten Erkenntnissen daher ab sofort eine stöchiometrische Umrechnung von 1:2, d.h. die Annahme, dass aus einem Molekül Amitraz im Honig immer zwei Moleküle Metabolit entstehen. Aus Gründen der Transparenz berichtet QSI neben dem rechtlich relevanten Summenwert für Amitraz nun auch die Gehalte der einzelnen Metaboliten und einen Hinweis, mit welcher Stöchiometrie die Werte auf das Amitraz umgerechnet werden. Es ist aber nach unserer Kenntnis auch zu berücksichtigen, dass diese „klassische“ Berechnung, die für die Hydrolyse-Methode als korrekt angenommen wurde, vermutlich immer noch gängige Praxis vieler Labore (auch Ämter/Behörden) ist, auch wenn sie bereits eine neue Methodik verwenden und damit die Befunde unserer Auffassung nach überschätzen. Aktuell diskutieren wir die Amitraz-Berechnung unter anderem mit dem EU-Referenzlabor für Pestizidrückstände (CVUA Freiburg), welches mit neuer Analysemethoden noch die „klassische“ Berechnung durchführt. Diese Berechnung mag für andere Matrices wie Obst und Gemüse korrekt sein, jedoch unseres Erachtens nicht für die Matrix Honig, in der in den meisten Proben nur die beiden Metaboliten DMPF und DMF vorliegen. Sobald sich hierzu Neuigkeiten ergeben, werden wir Sie dazu informieren.

Insbesondere für Bio-Ware muss berücksichtigt werden, dass jeder Amitraz-Positivbefund aus rechtlicher Sicht sowie aus Verbrauchersicht bzw. aus Sicht des Handels problematisch sein kann. Amitraz-Rückstände in Bio-Ware können entweder durch die nicht erlaubte Anwendung von Amitraz durch den Imker verursacht werden, oder aber z.B. auch aus kontaminiertem Wachs in den Honig migriert sein (mögliche Quelle in der Bioimkerei: recycelte Mittelwände, keine Bio-Qualität). Dies könnte zum Beispiel durch eine Untersuchung des Bienenwachses auf Amitraz überprüft werden.