

# **BESTIMMUNG VON POLAREN PESTIZIDEN WIE GLYPHOSAT IN HONIG UND BIENENPRODUKTEN MITTELS LC-MS/MS**

Dr. Katharina Schmidt

Prüfleiterin Pestizid- & Rückstandsanalytik

7. Berliner LC-MS/MS Symposium am 14. März 2017



# GLIEDERUNG

01

Einleitung

02

Methodik

03

Daten



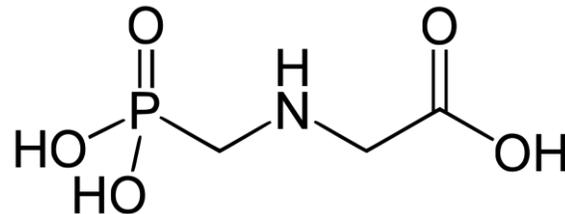
# EINLEITUNG - GLYPHOSAT

- weltweit einer der am meisten eingesetzten Wirkstoffe in Pflanzenschutzmitteln
- Breitbandherbizid
  - Einsatz in Landwirtschaft und Gartenbau zur Bekämpfung von Unkräutern
- Ausbringung vor der Aussaat und zur Sikkation vor der Ernte
- hemmt in Pflanzen das Enzym 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthetase
- Nutzung durch die Einführung von glyphosatresistenten Pflanzen signifikant gestiegen



# EINLEITUNG - GLYPHOSAT

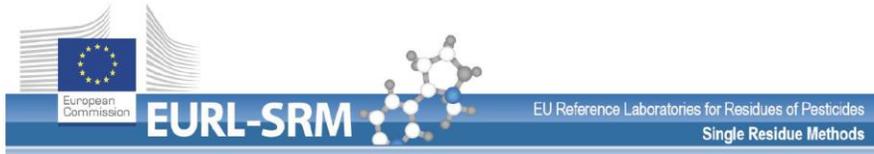
- nach BfR und EFSA, bei bestimmungsgemäßer Anwendung, kein krebserzeugendes Risiko für den Menschen zu erwarten
  - bestimmte Netzmittel (Beistoffe) besitzen höhere Toxizität als Glyphosat
  - Akute Referenzdosis (ARfD) 0,5 mg/kg Körpergewicht
  - Acceptable Daily Intake (ADI) 0,5 mg/kg Körpergewicht pro Tag
- Ende Juni 2016 wurde die auslaufende Genehmigung um weitere 18 Monate (bis Ende 2017) verlängert
- relativ kleines, hochpolares Molekül
  - wird nicht mit anderen Pestiziden im Multi-screening erfasst



# EINLEITUNG - HONIG & BIENENPRODUKTE

- Honig ist der natursüße Stoff, der von Bienen der Art *Apis mellifera* erzeugt wird (Richtlinie 2001/110/EG)
  - Bestandteile: verschiedene Zuckerarten (insb. Fructose und Glucose ), organische Säuren, Fermente und beim Honigsammeln aufgenommene feste Partikel
- Bienenpollen, Bienenwachs, Propolis und Gelée royale
- Rückstandshöchstgehalt von Glyphosat in Honig und sonstigen Imkereierzeugnissen beträgt 0,05 mg/kg





**Quick Method for the Analysis of numerous Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin via LC-MS/MS involving Simultaneous Extraction with Methanol (QuPpe-Method)**

- **Version 9.2** (October 2016, Document History, see page 65)

**Authors:** M. Anastassiades; D. I. Kolberg; A. Benkenstein; E. Eichhorn; S. Zechmann; D. Mack; C. Wildgrube; I. Sigalov; D. Dörk; A. Barth

**Automated Derivatization, SPE Cleanup and LC/MS/MS Determination of Glyphosate and Other Polar Pesticides**

Oscar G. Cabrices  
*Gerstel, Inc., 701 Digital Dr. Suite J,  
Linthicum, MD 21090, USA*

Andre Schreiber  
*AB SCIEX, 71 Four Valley Drive,  
Concord, Ontario L4K 4V8, Canada*

- **Vorteile:**

- einfache und schnelle Aufarbeitung
- anwendbar für die Matrix Honig
- direkte Messung von Glyphosat und dessen Metaboliten AMPA ohne Derivatisierung

- **Nachteile:**

- direkte Messung nicht mit jedem MS-System möglich
- geringe Matrixabtrennung

- **Vorteile:**

- Messung mit jedem MS-System möglich
- hohe Matrixabtrennung

- **Nachteile:**

- Derivatisierung nötig
- hoher Zuckergehalt des Honigs stört die Messung
  - Anpassung der Aufreinigung nötig
- zeitaufwendig

# METHODIK - VERGLEICHSMESSUNGEN



Glyphosatergebnisse der QuPPE-Methode in mg/kg	Glyphosatergebnisse nach Derivatisierung mittels FMOC-chlorid in mg/kg
0,055	0,053
0,219	0,200
0,047	0,048
0,028	0,032
0,035	0,031
0,068	0,070
0,058	0,050
0,332	0,330
0,037	0,036
0,112	0,110

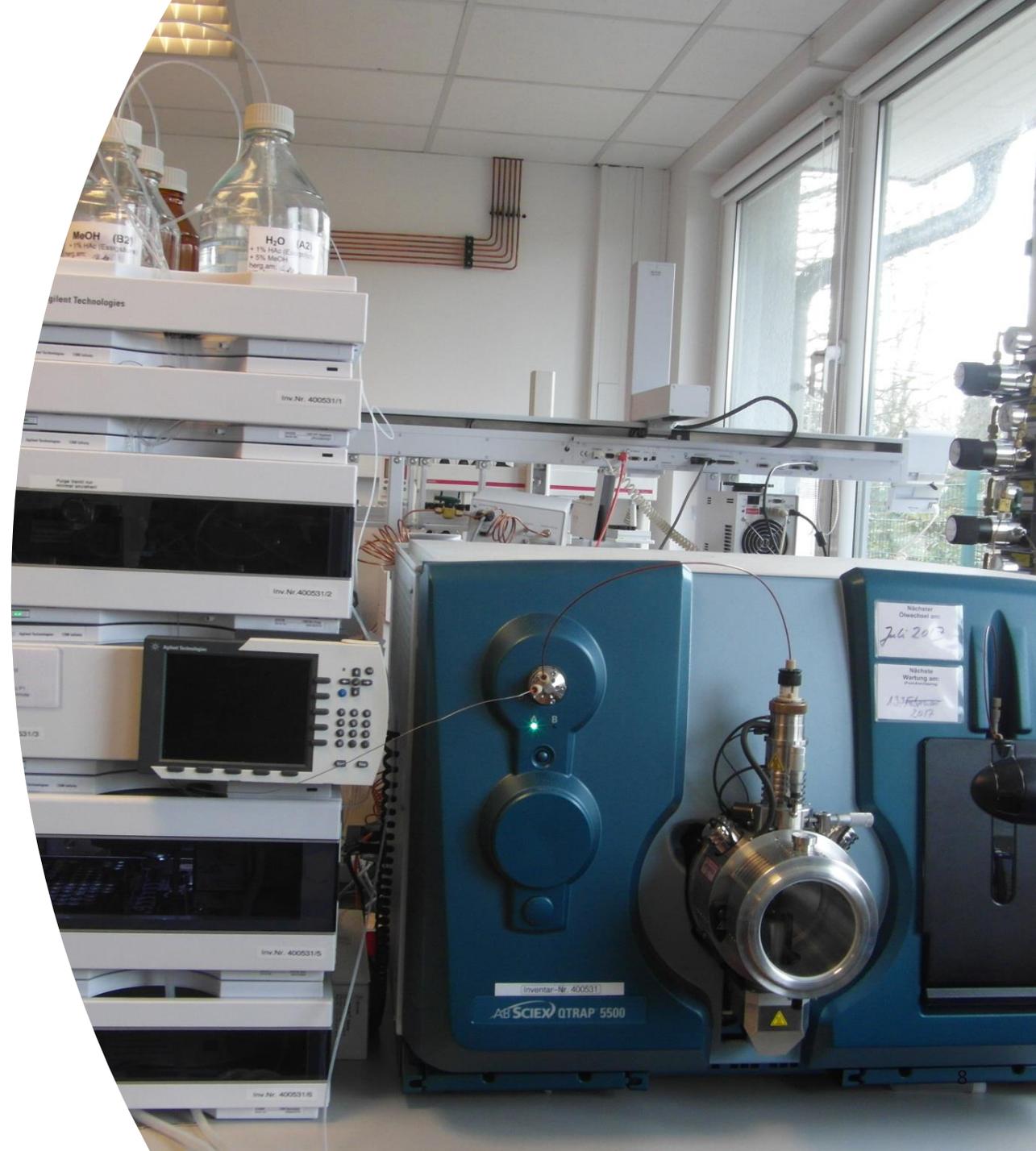
# METHODIK – QUPPE-METHODE

2 g Probe + 100  $\mu$ L interner Standard (ILIS)  
+ 10 mL Wasser

+ 10 mL saures MeOH  
20 min auf Horizontalschüttler, dann zentrifugieren

Aliquot des Extraktes durch ein Spritzenfilter in ein Vial  
filtrieren

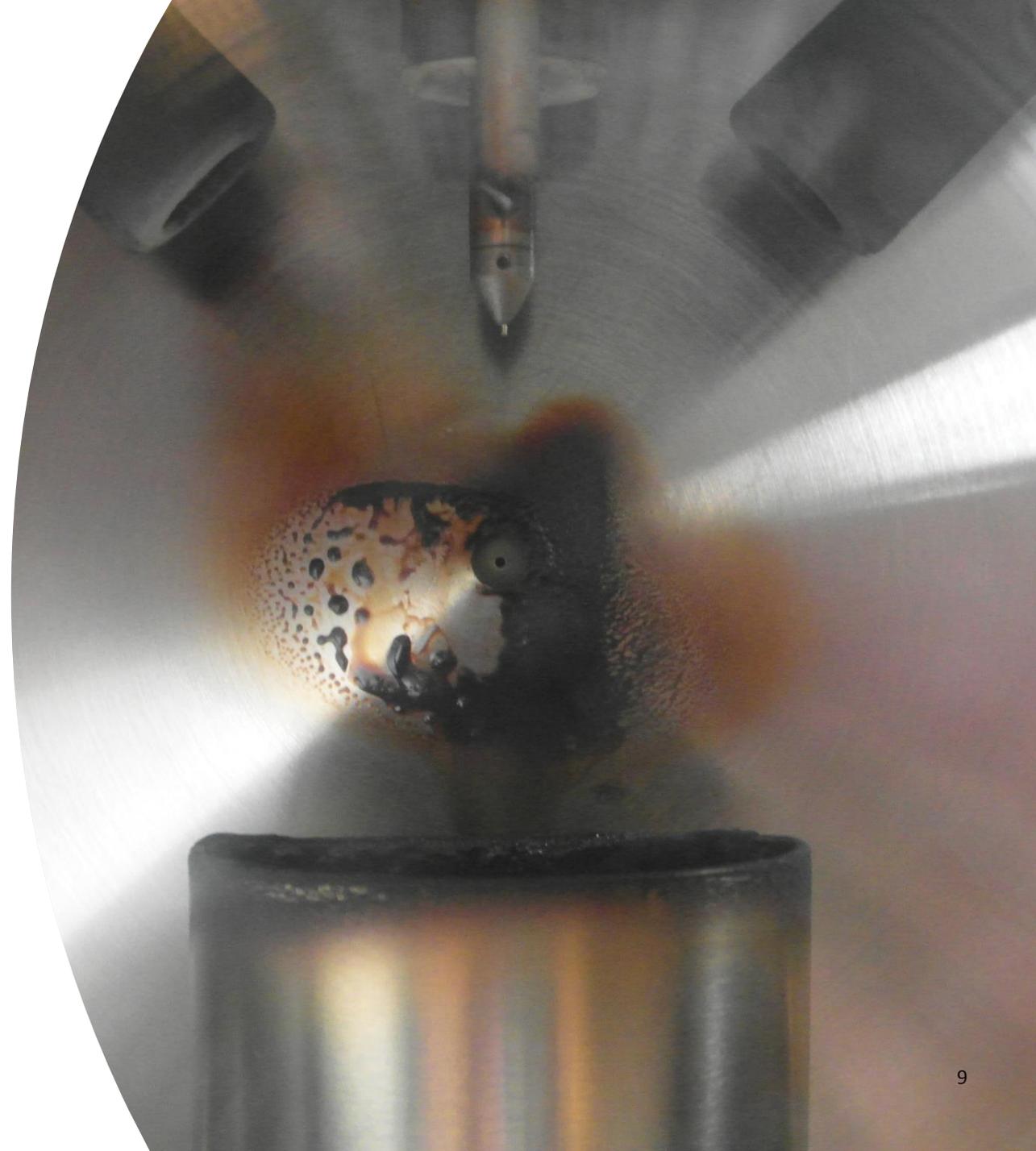
Messung des Extraktes mittels LC-MS/MS  
(Agilent HPLC & SCIEX 5500 QTRAP-System)



# METHODIK – QUPPE-METHODE

- Quantifizierung: int. Std. (Glyphosat- $^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}_1$ )  
Matrixkalibrierung  
gespikte Probe
- verwendete Säule: Hypercarb™, 2,1 x 100 mm  
5  $\mu\text{m}$
- Eluenten: A  $\text{H}_2\text{O} + 1\% \text{HAc} + 5\% \text{MeOH}$   
B  $\text{MeOH} + 1\% \text{HAc}$
- Gradientenprogramm (12 min):

Time (min)	Flow Rate ( $\mu\text{l}/\text{min}$ )	A(%)	B(%)
0.00	400	100	0
8.00	400	70	30
8.10	400	100	0
12.0	400	100	0



# METHODIK – QUPPE-METHODE



Acquisition method

- Acquisition Method
  - Mass Spec 11.980 min
    - Period 11.980 min
      - MRM
  - Integrated Valco Valve
  - Agilent 1260 Binary Pump (12.0 mins)
    - Equilibrate (0.0 mins)
    - Run (12.0 mins)
  - Agilent 1260 High Performance Autosampler
  - Agilent 1290 Thermostatted Column Compartme

MS Advanced MS

Experiment: 1

Scan type: MRM (MRM)

Scheduled MRM:  Enabled  Basic  Advanced Import List

Period Summary

Duration: 11.980 (min) Delay Time: 0 (sec)

Cycles: 1198 Cycle: 0.6000 (sec)

Polarity:  Positive  Negative

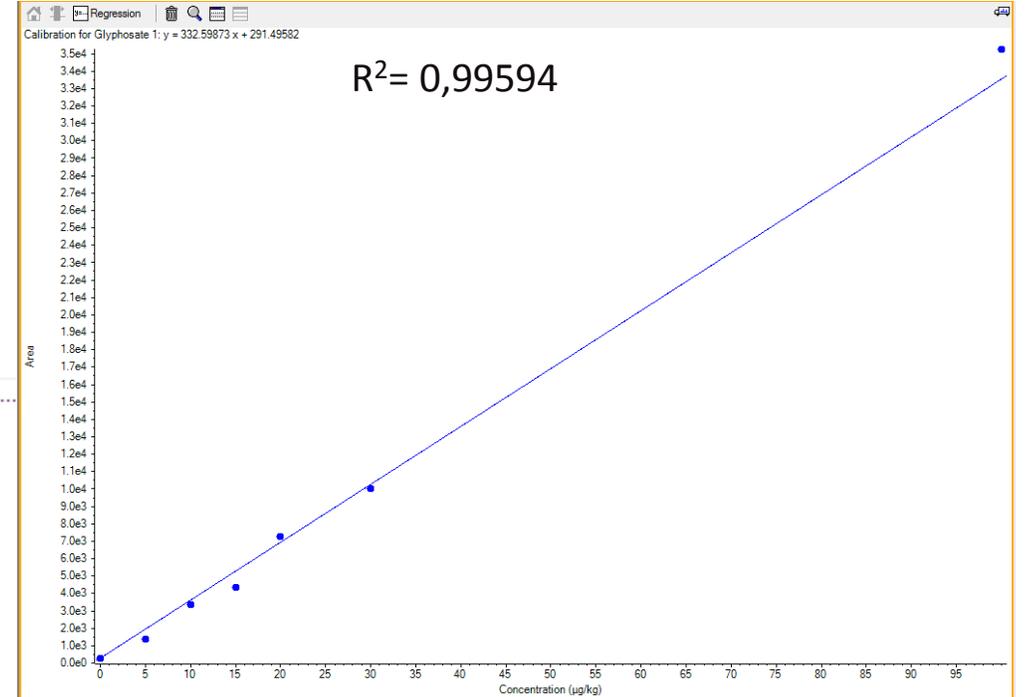
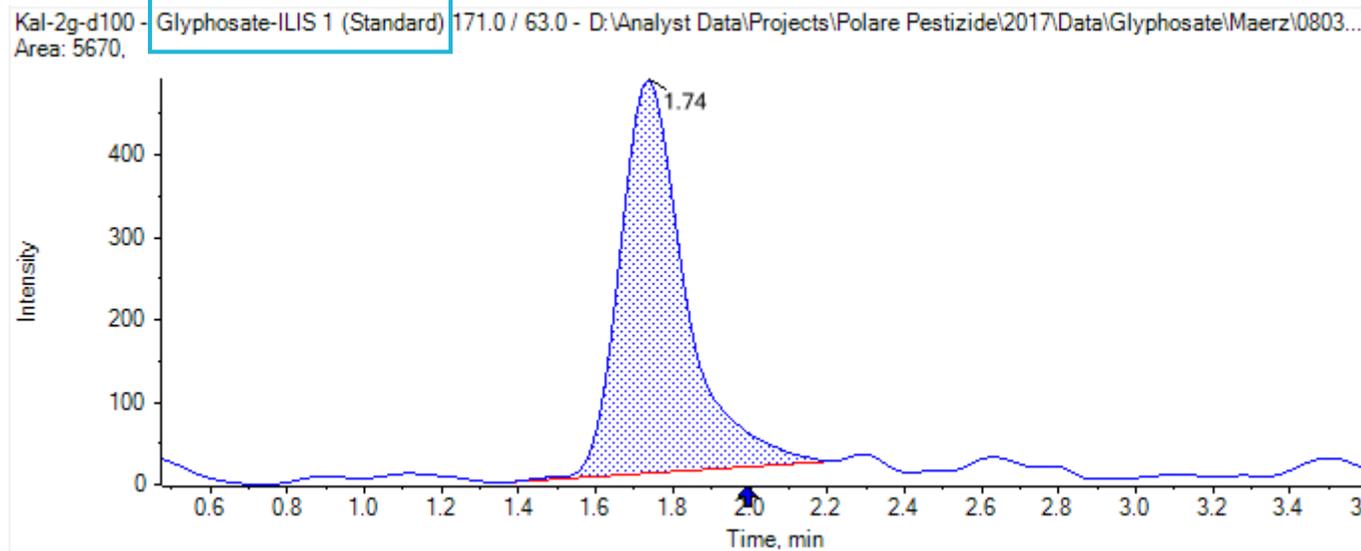
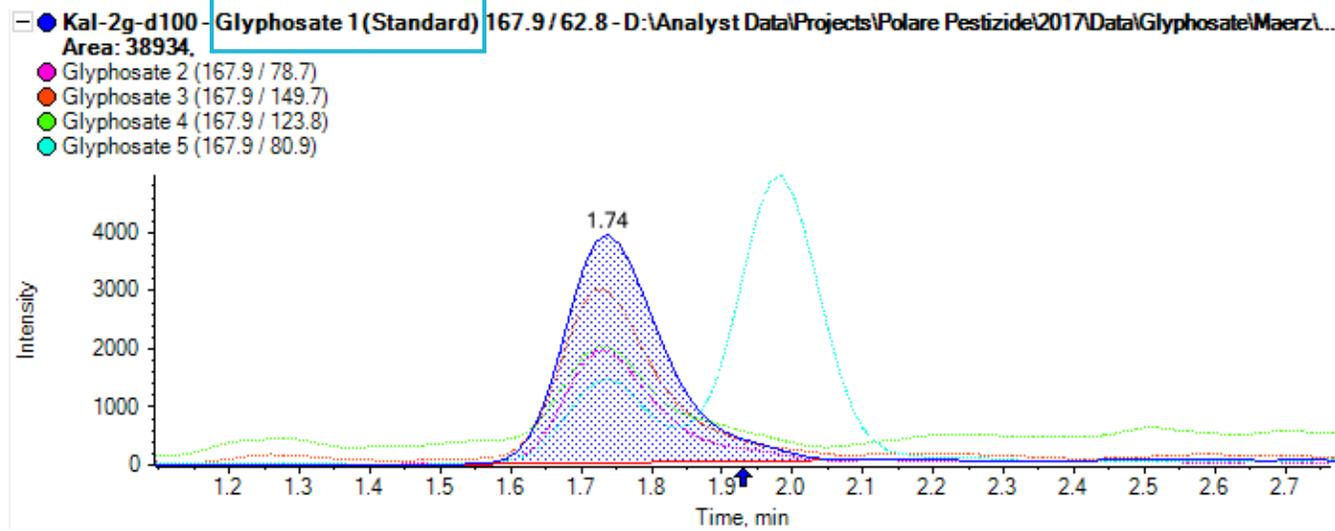
MRM detection window: 60 (sec)

Target Scan Time: 0.6 (sec)

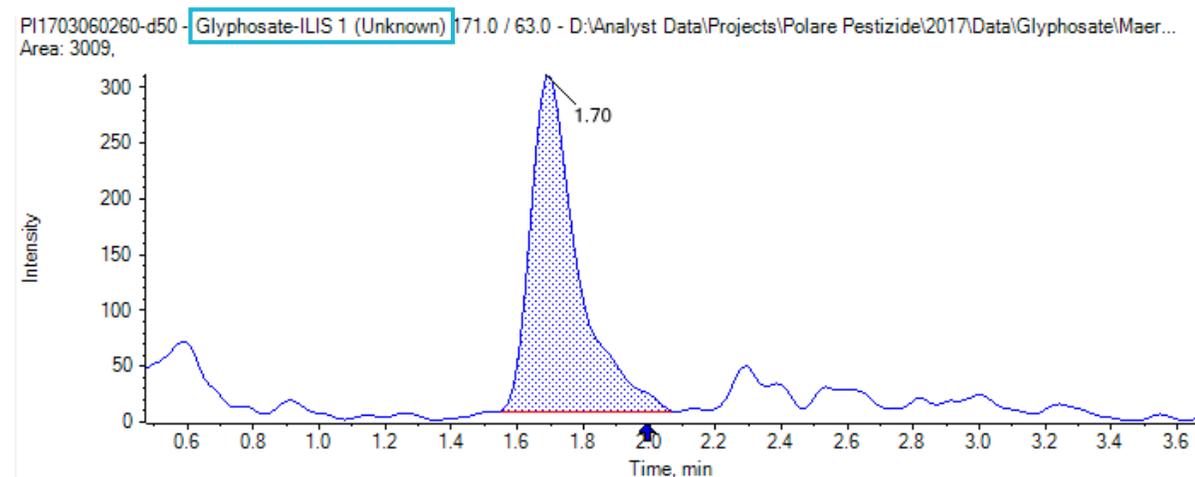
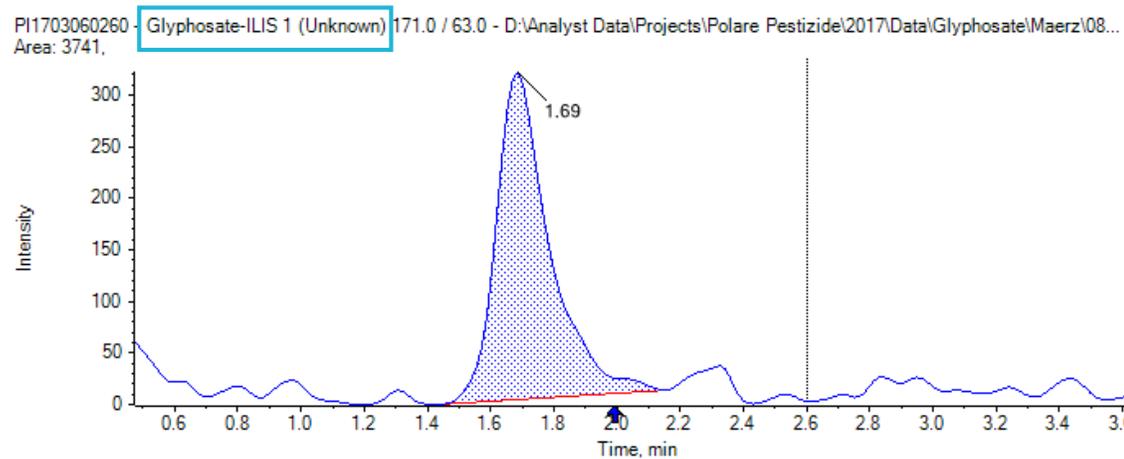
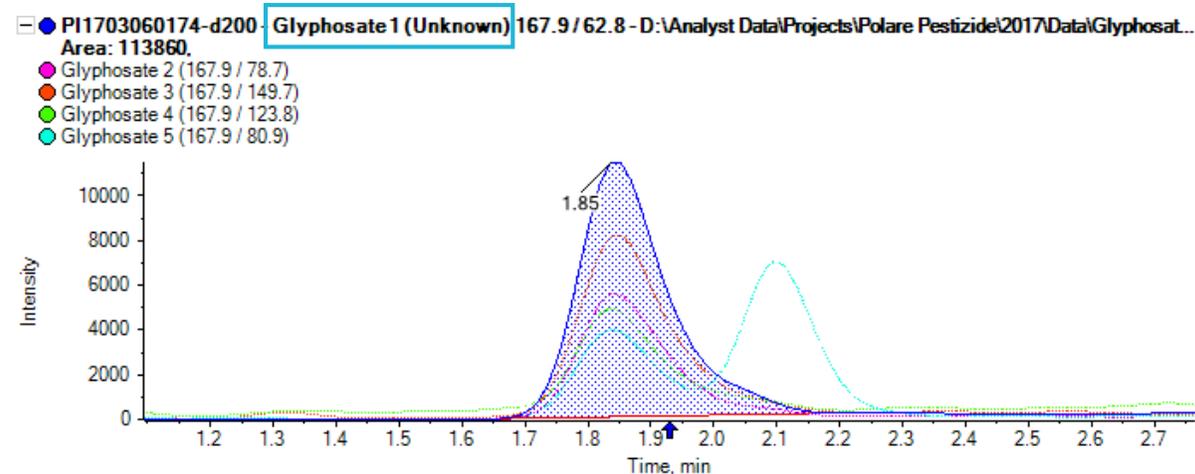
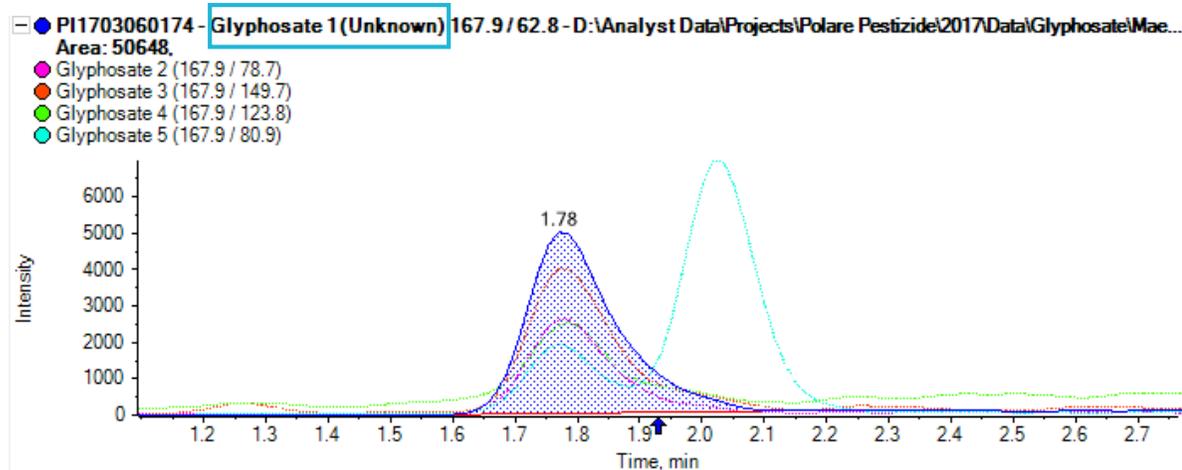
Edit Parameters...

	Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	Time (min)	ID	Group	Window (sec)	Primary / Secondary	Threshold	Dwell Weight	DP (volts)	EP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)
1	110.000	63.000	0.80	AMPA 1	AMPA	60.0	1		1.00	-30.000	-10.000	-30.000	-7.000
2	110.000	79.000	0.80	AMPA 2	AMPA	60.0	1		1.00	-30.000	-10.000	-58.000	-9.000
3	179.903	63.000	1.40	Glufosinate 1	Glufosinate	70.0	1		1.00	-40.000	-10.000	-50.000	-9.000
4	179.903	94.900	1.40	Glufosinate 2	Glufosinate	70.0	1		1.00	-40.000	-10.000	-24.000	-11.000
5	167.890	62.800	1.80	Glyphosate 1	Glyphosate	160.0	1		1.00	-30.000	-10.000	-30.000	-7.000
6	167.890	78.700	1.80	Glyphosate 2	Glyphosate	160.0	1		1.00	-30.000	-10.000	-58.000	-9.000
7	167.890	149.700	1.80	Glyphosate 3	Glyphosate	160.0	1		1.00	-45.000	-10.000	-14.000	-9.000
8	167.890	123.800	1.80	Glyphosate 4	Glyphosate	160.0	1		1.00	-45.000	-10.000	-16.000	-7.000
9	167.890	80.900	1.80	Glyphosate 5	Glyphosate	160.0	1		1.00	-45.000	-10.000	-22.000	-22.000
10	151.000	63.000	0.00	MPPA 1	MPPA	100.0	1		1.00	-30.000	-10.000	-30.000	-8.000
11	151.000	107.000	0.00	MPPA 2	MPPA	100.0	1		1.00	-30.000	-10.000	-35.000	-11.000
12	170.972	63.000	1.80	Glyphosate-ILIS 1	ISTD	160.0	1		1.00	-40.000	-10.000	-32.000	-7.000
13	170.972	78.900	1.80	Glyphosate-ILIS 2	ISTD	160.0	1		1.00	-45.000	-10.000	-22.000	-9.000
14	222.000	63.000	0.00	N-Acetyl-Glufosi	N-Ac-Glufosinate	100.0	1		1.00	-105.000	-10.000	-40.000	-21.000
15	222.000	136.000	0.00	N-Acetyl-Glufosi	N-Ac-Glufosinate	100.0	1		1.00	-105.000	-10.000	-40.000	-21.000
16	147.000	111.000	4.60	Ethephon-D4	ISTD-2	200.0	1		1.00	-55.000	-10.000	-40.000	-21.000
17													

# METHODIK – QUPPE-METHODE



# METHODIK – QUPPE-METHODE





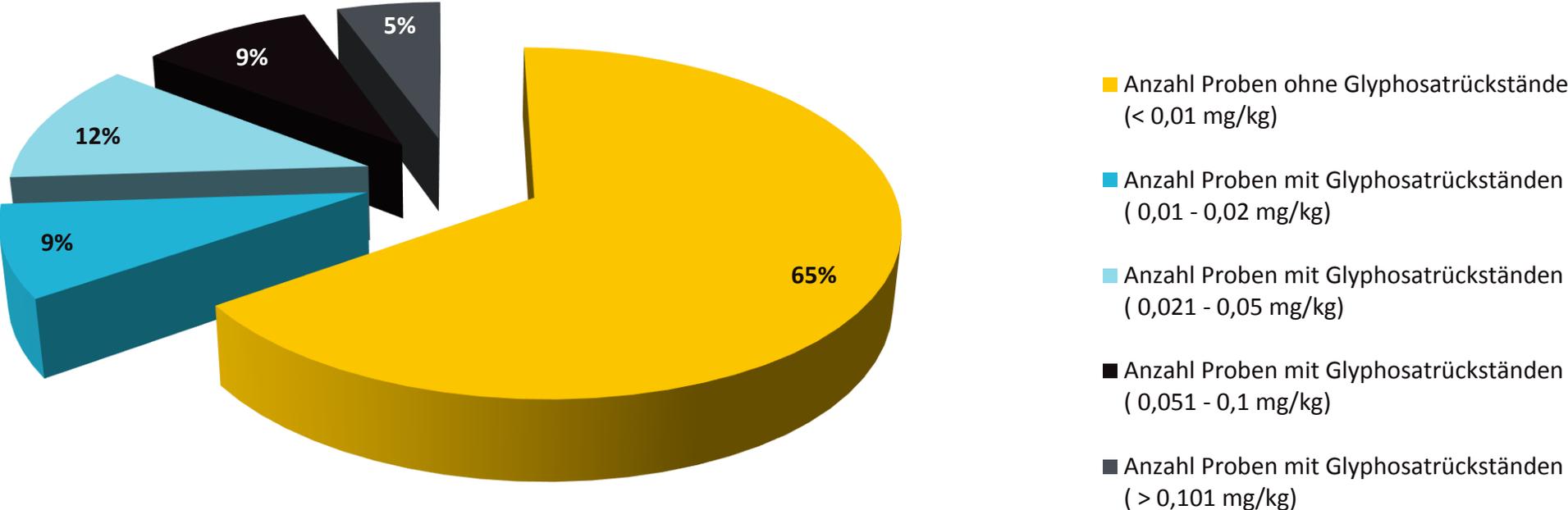
Bestimmungs-  
grenze  
10 µg/kg

Nachweis-  
grenze  
3 µg/kg

Wiederfindung  
95-115 %

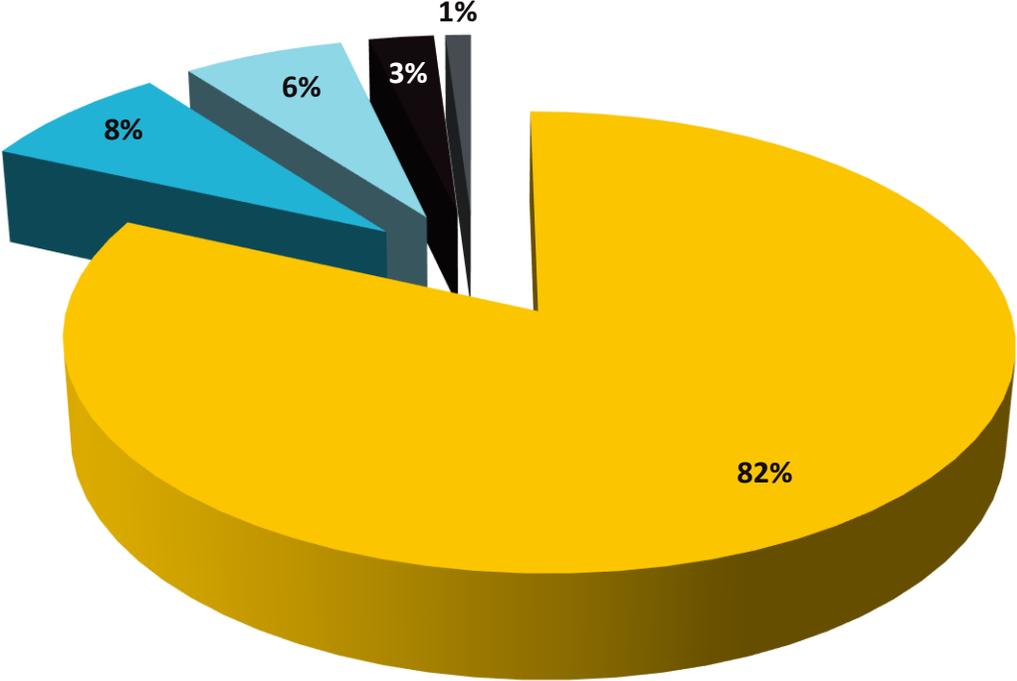


## Verteilung Glyphosatrückstände in 5293 Honigproben





## Verteilung Glyphosatrückstände in 867 Bio-Honigproben



- Anzahl Proben ohne Glyphosatrückstände (< 0,01 mg/kg)
- Anzahl Proben mit Glyphosatrückständen ( 0,01 - 0,02 mg/kg)
- Anzahl Proben mit Glyphosatrückständen ( 0,021 - 0,05 mg/kg)
- Anzahl Proben mit Glyphosatrückständen ( 0,051 - 0,1 mg/kg)
- Anzahl Proben mit Glyphosatrückständen ( > 0,101 mg/kg)



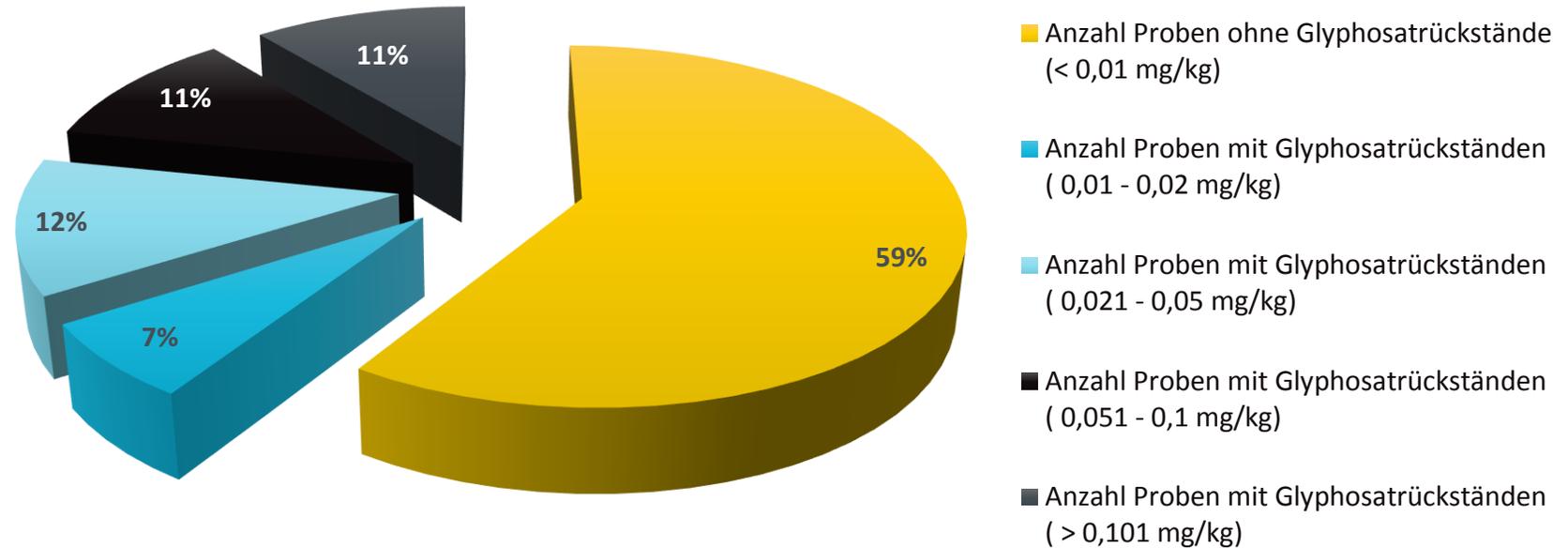
Land	Anzahl Proben	< 0,01 mg/kg	0,011 – 0,02 mg/kg	0,021 – 0,05 mg/kg	0,051 – 0,1 mg/kg	> 0,101 mg/kg
Argentinien	157	21	13	41	49	33
Mexiko	132	123	6	3	0	0
Ukraine	82	80	2	0	0	0
Brasilien	76	50	15	10	0	1
Österreich	72	65	3	2	2	0
Rumänien	72	70	2	0	0	0
Chile	71	32	19	16	4	0
Kuba	56	55	0	1	0	0
Deutschland	38	34	2	2	0	0
Uruguay	30	0	1	7	8	14

Art	Anzahl Proben	< 0,01 mg/kg	0,011 – 0,02 mg/kg	0,021 – 0,05 mg/kg	0,051 – 0,1 mg/kg	> 0,101 mg/kg
Polyflora	273	195	17	28	16	17
Blüte (Orange, Linde)	202	185	13	4	0	0
Wald	136	71	21	32	10	2
Berg	55	47	5	3	0	0
Raps	27	25	1	1	0	0
Manuka	10	4	0	2	2	2

# DATEN – WACHS, POLLEN, GELÉE ROYALE



## Verteilung Glyphosatrückstände in 147 Wachsproben



- 3 Pollenproben ohne Befund
- 22 Gelée royale-Proben
  - 21 Proben ohne Befund / 1 Probe mit 0,018 mg/kg

**VIELEN DANK FÜR IHRE AUFMERKSAMKEIT!**

**intertek**

**Total Quality. Assured.**