

UNIVERZA V NOVI GORICI  
FAKULTETA ZA ZNANOSTI O OKOLJU

UPORABA SUNTESTA ZA ŠTUDIJ RAZGRADNJE  
IZBRANIH NEONIKOTINOIDOV V ZEMLJI

DIPLOMSKO DELO

Barbara KRAŠOVEC

Mentorica: prof. dr. Polonca TREBŠE

Nova Gorica, 2012

## IZJAVA

Izjavljam, da je diplomsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Rezultati, ki so nastali v okviru skupnega raziskovanja z drugimi raziskovalci, ali so jih prispevali drugi raziskovalci (strokovnjaki), so v diplomskem delu eksplicitno prikazani oziroma navedeni (citirani).

Barbara Krašovec



## ZAHVALA

Rada bi se zahvalila svoji mentorici prof. dr. Polonci Trebše za pomoč, vodenje in trud pri izdelavi diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi dr. Romini Žabar za veliko koristnih informacij in pomoči pri delu z aparaturami ter mladim raziskovalcem, ki so me bodrili in mi pomagali pri praktičnem laboratorijskem delu.



## POVZETEK

V diplomskem delu sem ugotavljala hitrost razgradnje insekticidov imidakloprida in acetamiprida v zemlji. Obe spojini sodita med neonikotinoide in pri razpadu tvorita nekatere podobne produkte. Za študij fotorazgradnje obeh insekticidov sem uporabila aparaturo Suntest, ki simulira naravne pogoje, kot so osončenost, temperatura in vlaga. Z uporabo aparata sem simulirala različno osončene dni, tako da sem vzorce zemlje mase 250 mg in mase 500 mg z dodano množino imidakloprida in vzorce zemlje mase 250 mg z dodano množino acetamiprida obsevala s svetlobo z intenzitetami 250 W/m<sup>2</sup>, 500 W/m<sup>2</sup> in 750 W/m<sup>2</sup>. Vzorce zemlje z dodanim imidaklopridom z maso 250 mg sem obsevala z intenziteto svetlobe 250, 500 in 750 W/m<sup>2</sup>, vzorce zemlje z dodanim imidaklopridom z maso 500 mg z intenziteto svetlobe 750 W/m<sup>2</sup> v krajših časovnih intervalih (15, 30, 60 in 120 min), vzorce zemlje z dodanim acetamipridom z maso 250 mg pa sem obsevala z intenziteto svetlobe 750 W/m<sup>2</sup> tudi pri daljših časovnih intervalih (15, 30, 60, 120, 360 in 900 min) in z intenziteto svetlobe 250 W/m<sup>2</sup> v krajših časovnih intervalih (15, 30, 60 in 120 min). Vsi poskusi so bili izvedeni v treh paralelkah. S HPLC-DAD analizo vzorcev sem ugotovila, da je razpolovni čas imidakloprida v zemlji z intenziteto obsevanja 750 W/m<sup>2</sup> nekje med 15 in 30 min v 250 mg obsevanega vzorca. Pri acetamipridu je razpolovni čas dosežen šele po 900 min obsevanja v 250 mg vzorca, kar potrjuje, da je acetamiprid bolj stabilen ter da je masa 250 mg vzorca optimalna za obsevanje in pravilno določena. Z uporabo LC-MS tehnike ter na osnovi v prejšnjih študijah že identificiranih spojin sem poskusila določiti tudi razpadne produkte imidakloprida in acetamiprida, nastale po obsevanju vzorcev zemlje v aparatu Suntest.

Ključne besede: imidakloprid, acetamiprid, fotorazgradnja, Suntest, LC-MS

## ABSTRACT

In my diploma work I studied the degradation of imidacloprid and acetamiprid, which are widely used in agriculture as insecticides, on soil. Both belong to the group of neonicotinoid pesticides and decay in a similar degradation products. For the degradation experiments I applied Suntest apparatus which simulates natural conditions, like sunshine, temperature, humidity. By using Suntest I simulated different sunny days and irradiated samples with different intensities of light of 250, 500 and 750 W/m<sup>2</sup> for different time intervals (at 15, 30, 60 and 120 min) for 250 mg samples imidacloprid, and 500mg samples with 750 W/m<sup>2</sup> for different time intervals (at 15, 30, 60 and 120 min). Samples with acetamiprid were irradiated with light intensity of 250 at time intervals of 15, 30, 60, 120 min and with light intensity of 750 W/m<sup>2</sup> at time intervals of 15, 30, 60, 120, 360 and 900 min. Samples of soil with pesticides were weighting 250 and 500 mg for imidacloprid and 250 mg for acetamiprid, each experiment was performed in three replicates. After analysing the samples with HPLC-DAD I collected results which showed that the half-life of imidacloprid in soil with irradiation intensity of 750 W/m<sup>2</sup> is between 15 and 30 min in samples of 250 mg. In the case of acetamiprid half-life achieved the value of 900 min in samples of 250 mg. It was confirmed that acetamiprid is more stable then imidacloprid and that the weight of

250 mg sample for irradiation is optimal and correct. I also tried to determine the photodegradation products of imidacloprid and acetamiprid in irradiated soil samples with LC-MS.

Keywords: imidacloprid, acetamiprid, photodegradation, Suntest, LC-MS

## KAZALO VSEBINE

1 UVOD .....	1
1.1 Splošno.....	1
1.2 Namen naloge.....	3
2 TEORETIČNE OSNOVE .....	4
2.1 Neonikotinoidi.....	4
2.2 Kemijska zgradba, delovanje in delitev neonikotinoidov .....	4
2.3 Proces razgradnje fitofarmaceutskih sredstev (FFS) v zemlji.....	5
2.4 Imidakloprid.....	7
2.4.1 Fizikalno kemijske lastnosti imidakloprida.....	8
2.4.2 Delovanje imidakloprida .....	8
2.4.3. Kinetika strupenosti imidakloprida .....	9
2.4.4 Strupenost strupenosti imidakloprida.....	9
2.4.5 Dodatki k sredstvu imidakloprid .....	10
2.4.6 Imidakloprid v okolju.....	10
2.5 Acetamiprid.....	14
2.5.1 Fizikalne in kemijske lastnosti acetamiprida.....	14
2.5.2 Acetamiprid v okolju.....	15
2.5.3 Kinetika strupenosti acetamiprida .....	16
2.5.4 Določanje acetamiprida in neonikotinoidov v prsti.....	17
3 EKSPERIMENTALNI DEL .....	19
3.1 Uporabljeni materiali in metode.....	19
3.1.1 Reagenti in raztopine.....	19
3.1.2 Instrumenti in oprema .....	19
3.1.3 Priprava raztopin .....	22



3.1.4 Priprava onesnažene zemlje z imidaklopridom in acetamipridom.....	23
3.1.5 Analiziranje vzorcev .....	25
3.1.6 Priprava vzorcev za LC-MS analizo .....	26
4 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	27
4.1. Določevanje imidakloprida v 250 mg in 500 mg vzorca onesnažene zemlje z imidaklopridom.....	27
4.1.1 Fotorazgradnja imidakloprida v zemlji z maso 250 mg in 500 mg pri obsevanju z intenziteto svetlobe 250 , 500 in 750 W/m <sup>2</sup> .....	29
4.2 Določanje acetamiprida v 250 mg vzorca onesnažene zemlje z acetamipridom .....	33
4.2.1 Fotorazgradnja acetamiprida v zemlji z maso 250 mg pri obsevanju z intenziteto svetlobe 250 in 750 W/m <sup>2</sup> .....	35
4.3 Primerjava fotorazgradnje imidakloprida in acetamiprida v zemlji .....	37
4.4 Določevanje razgradnih produktov imidakloprida in acetamiprida po obsevanju v zemlji z LC-MS metodo.....	38
4.4.1 Določevanje razgradnih produktov imidakloprida po obsevanju v zemlji z LC-MS.	38
4.4.2 Določevanje razgradnih produktov acetamiprida po obsevanju v zemlji z LC-MS metodo.....	43
5 ZAKLJUČEK .....	49
6 VIRI.....	50





## KAZALO SLIK

Slika 1: Strukturne formule neonicotinooidov: acetamiprida, tiakloprida, klotianidina, tiametoksama, imidakloprida, nitenpirama ter dinotefurana (Nauen in Delholm, 2005)..	5
Slika 2: Razgradni produkti imidakloprida v prsti (Bacey, 2000).....	13
Slika 3: Kemijska struktura acetamiprida (Roberts in sod., 1999).....	15
Slika 4: Ultrazvočna kopel (Foto: Krašovec, B., 2011).....	20
Slika 5: Rotavapor (Foto: Krašovec, B., 2011).....	21
Slika 6: Suntest XLS+ (Atlas MTT, Illinois, US) (Foto: Krašovec, B., 2011).....	21
Slika 7: Odprt Suntest (Foto: Krašovec, B., 2011).....	21
Slika 8: Tekočinski kromatograf visoke ločljivosti (HPLC) z DAD detektorjem (Foto: Krašovec, B., 2011).....	22
Slika 9: Tekočinski kromatograf z masnim spektrometrom (LC-MS) (Foto: Žabar, R., 2012).....	22
Slika 10: Ročno stresanje centrifugirske tube (Foto: Krašovec, B., 2011).....	25
Slika 11: Kromatogram ekstrakta imidakloprida v zemlji (DAD detektor pri valovni dolžini 270 nm).....	27
Slika 12: Umeritvena krivulja imidakloprida v 250 mg vzorcu onesnažene zemlje z imidaklopidom v koncentracijskem območju od 1,25 do 10 mg imidakloprida/kg zemlje.....	28
Slika 13: Umeritvena krivulja imidakloprida v 500 mg vzorcu onesnažene zemlje z imidaklopidom v koncentracijskem območju od 1,25 do 10 mg imidakloprida/kg zemlje.....	28
Slika 14: Krivulja razpada imidakloprida po osvetljevanju vzorca zemlje, onesnaženega z imidaklopidom, z maso 250 mg pri intenziteti svetlobe $750 \text{ W/m}^2$ .....	29
Slika 15: Krivulja razpada imidakloprida po osvetljevanju vzorca zemlje, onesnaženega z imidaklopidom, z maso 500 mg pri intenziteti svetlobe $750 \text{ W/m}^2$ .....	30
Slika 16: Krivulja razpada imidakloprida po osvetljevanju zemlje, onesnažene z imidaklopidom, z maso 250 mg pri intenziteti svetlobe $500 \text{ W/m}^2$ .....	31
Slika 17: Krivulja razpada imidakloprida po osvetljevanju zemlje z maso 250 mg pri intenziteti svetlobe $250 \text{ W/m}^2$ .....	31
Slika 18: Meritve imidakloprida po osvetljevanju z imidaklopidom onesnažene zemlje z maso 250 mg pri intenziteti obsevanja 750, 500 in $250 \text{ W/m}^2$ .....	32

Slika 19: Delež ostanka imidakloprida v zemlji, onesnaženi z imidaklopridom, z maso 250 mg po obsevanju s Suntestom pri različnih intenzitetah obsevanja pri časih 0 min, 15 min, 30 min, 60 min, 120 min.....	33
Slika 20: Kromatogram ekstrakta acetamiprida v zemlji (DAD detektor pri valovni dolžini 245 nm).....	34
Slika 21: Umeritvena krivulja acetamiprida v 250 mg vzorcu z acetamipridom onesnažene zemlje pri koncentracijah 10; 5; 2,5 in 1,25 mg acetamiprida/kg zemlje...	34
Slika 22: Krivulja razpada acetamiprida po obsevanju vzorca 250 mg z acetamipridom onesnažene zemlje z intenziteto svetlobe 250 W/m <sup>2</sup> .....	35
Slika 23: Krivulja razpada acetamiprida po obsevanju vzorca 250 mg z acetamipridom onesnažene zemlje z intenziteto svetlobe 750 W/m <sup>2</sup> .....	36
Slika 24: Delež ostanka acetamiprida v zemlji, onesnaženi z acetamipridom, po obsevanju z intenziteto svetlobe 750 W/m <sup>2</sup> in 250 W/m <sup>2</sup> pri časih 0 min, 15 min, 30 min, 60 min in 120 min.....	37
Slika 25: Primerjava fotorazgradnje imidakloprida in acetamiprida (v procentih) v 250 mg vzorca zemlje pri obsevanju z intenziteto svetlobe 750 W/m <sup>2</sup> po času 15, 30, 60 in 120 min.....	38
Slika 26: Kromatogram vzorca zemlje, umetno onesnažene z imidaklopridom, z maso 250 mg, obsevanega 60 min pri intenziteti svetlobe 750 W/m <sup>2</sup> , posnet na HPLC.....	39
Slika 27: Kromatogram ekstrakta vzorca zemlje (250 mg), obsevanega 60 min pri intenziteti svetlobe 750 W/m <sup>2</sup> , z vrhom produkta, eluiranega pri času 4,72 min, posnet na LC-MS.....	40
Slika 28: Masni spekter neznanega produkta, eluiranega pri času 4,72 min, posnet na LC-MS.....	40
Slika 29: Kromatogram ekstrakta vzorca zemlje (250 mg), obsevanega 60 min pri intenziteti svetlobe 750 W/m <sup>2</sup> , z vrhom produkta, eluiranega pri času 2,14 min, posnet na LC-MS.....	41
Slika 30: Masni spekter neznanega produkta, eluiranega pri 2,14 min, posnet na LC-MS.....	41
Slika 31: Kromatogram ekstrakta vzorca zemlje (250 mg), obsevanega 60 min pri intenziteti svetlobe 750 W/m <sup>2</sup> , z vrhom produkta, eluiranega pri času 1,31 min, posnet na LC-MS.....	42
Slika 32: Masni spekter neznanega produkta, eluiranega pri 1,31 min, posnet na LC-MS.....	42

<i>Slika 33: Kromatogram vzorca zemlje, umetno onesnažene z acetamipridom, z maso 250 mg, obsevanega 900 min pri intenziteti svetlobe 750 W/m<sup>2</sup>, posnet na HPLC.....</i>	<i>44</i>
<i>Slika 34: Kromatogram ekstrakta vzorca zemlje (250 mg), obsevanega 360 min pri intenziteti svetlobe 750 W/m<sup>2</sup>, z vrhom produkta, eluiranega pri času 5,16 min, posnet na LC-MS.....</i>	<i>45</i>
<i>Slika 35: Masni spekter neznanega produkta, eluiranega pri 5,16 min, posnet na LC-MS.....</i>	<i>45</i>
<i>Slika 36: Kromatogram ekstrakta vzorca zemlje (250 mg), obsevanega 360 min pri intenziteti svetlobe 750 W/m<sup>2</sup>, z vrhom produkta, eluiranega pri času 2,74 min, posnet na LC-MS.....</i>	<i>46</i>
<i>Slika 37: Masni spekter neznanega produkta, eluiranega pri 2,74 min, posnet na LC-MS.....</i>	<i>46</i>
<i>Slika 38: Kromatogram ekstrakta vzorca zemlje (250 mg), obsevanega 360 min pri intenziteti svetlobe 750 W/m<sup>2</sup>, z vrhom produkta, eluiranega pri času 1,98 min, posnet na LC-MS.....</i>	<i>47</i>
<i>Slika 39: Masni spekter neznanega produkta, eluiranega pri 1,98 min, posnet na LC-MS.....</i>	<i>47</i>



## SEZNAM PREGLEDNIC

<i>Preglednica 1: Fizikalno kemijske lastnosti imidakloprida (Kollman in Sagawa, 1995) ..</i>	<i>8</i>
<i>Preglednica 2: Smrtna doza imidakloprida za različne organizme (EXTOXNET Database, Department of pesticides Regulation, 2000).....</i>	<i>9</i>
<i>Preglednica 3: Fizikalne in kemijske lastnosti acetamiprida (EC. Health and Consumer Protection Directorate, 2004).....</i>	<i>15</i>
<i>Preglednica 4: Smrtna doza acetamiprida za različne organizme (EC. Health and Consumer Protection Directorate, 2004) .....</i>	<i>16</i>
<i>Preglednica 5: Osvetljevanje vzorcev zemlje z imidaklopridom v aparaturi Suntest pri različnih časih, intenzitetah obsevanja vzorca in masah zemlje .....</i>	<i>24</i>
<i>Preglednica 6: Osvetljevanje vzorcev zemlje z acetamipridom v aparaturi Suntest pri različnih časih, intenzitetah obsevanja vzorca in masah zemlje .....</i>	<i>24</i>
<i>Preglednica 7: Razgradni produkti imidakloprida v vodi (Wamhof in Schneider, 1999) 43</i>	
<i>Preglednica 8: Spojine fotorazpadnih produktov acetamiprida v zemlji (Acetamiprid, Pesticide Fact Sheet, 2002).....</i>	<i>48</i>







## SEZNAM OKRAJŠAV

IMI – imidaklopid

ACE – acetamiprid

HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

DAD – detektor z diodno matriko

UV – ultravijolično

Vis – vidni spekter

FFS – fitofarmacevtska sredstva

LC-MS – tekočinska kromatografija z masno spektrometrijo

# 1 UVOD

## 1.1 Splošno

Po svetu narašča število prebivalcev in s tem tudi potreba po hrani. Z namenom od narave iztržiti čim več, posega sodobna kmetijska tehnologija po najrazličnejših zaščitnih sredstvih za zaščito rastlin pred škodljivci, s katerimi bi si zagotovila čim višjo proizvodnjo hrane. Pomaga si s širokim spektrom kemijskih zaščitnih sredstev za zaščito rastlin pred insekti, gobami, plesnimi, glodavci in s tem vnaša v okolje kemikalije, ki so lahko v nekaterih primerih za okolje neprimerne oziroma zanj ter za neciljne organizme v okolju škodljive, lahko pa se vežejo tudi v prehranjevalno verigo nekaterih živali ali reagirajo med seboj v še bolj strupene spojine.

Pesticidi so lahko naravne ali kemijsko sintetizirane snovi, ki jih uporabljamo za zatiranje škodljivcev, plevela in rastlinskih bolezni (Ur. l. RS, št. 98/2004). Uporabljajo se lahko tudi v drugih oblikah zaščite, kot na primer pri urejanju trate, okrasnih rastlin, v gozdarstvu, rastlinjakih, pri urejanju zelenic in parkov, grobišč in v ladjedelnicah ter pri upravljanju s tratami ob cestiščih, tirih in pločnikih.

Fitofarmacevtska sredstva za zaščito rastlin, krajše rečeno pesticide, lahko nadalje delimo glede na ciljno skupino organizmov, ki jih določena skupina pesticidov uničuje, in glede na njihovo sestavo (Zavod za zdravstveno varstvo Celje, 2012) na:

- fungicide (glivice, bakterije),
- insekticide (žuželke), herbicide (plevel),
- akaricide (pršice),
- rodenticide (glodavci) in limacide (polži).

Možna je tudi delitev glede na njihovo kemijsko sestavo: na organoklorne pesticide, fenolne in fenoksi kislinske pesticide, klorofenolne snovi, karbamatne in organofosforne pesticide ter neonicotinoide (EC, Health & Consumer protection directorate, 2004).

Zaradi načina vnosa pesticidov v zemljo, semena oz. na rastline se pesticidi lahko širijo tudi v zrak, vodo, prst ali preko živali in rastlin po prehranjevalni verigi navzgor do človeka. Načeloma vsak pesticid po določenem času razpade na razpadne produkte, kar pa ne pomeni nujno tudi manjšega tveganja za okolje, saj se lahko zgodi, da bo nova spojina, to je razgradni produkt, bolj strupena za neciljne organizme od izhodne.

V zemlji potečejo procesi mikrobiološke razgradnje, hidrolize, fotolize, pronicanja skozi prst in površinskega izhlapevanja. Vsi ti procesi so odvisni od lastnosti zemlje, lastnosti pesticidov in okoljskih dejavnikov, v katerih se nahajajo (Hultgren in sod., 2002). Pesticidna sredstva, ki jih nanašamo s škropljenjem in zalivanjem, lahko onesnažujejo atmosfero, prst in podtalnico (Walker in sod., 2001).

Ocene učinkovitosti pesticidov kažejo na to, da manj kot 0,1 % uporabljenih pesticidov dejansko doseže pridelek in ciljne organizme, ostali onesnažujejo tla, vodo in zrak in tako negativno vplivajo na neciljne organizme, okolje in človeka (Pimentel in Levitan, 1986).

Znanstveniki, ki delujejo na področju sinteze novih kmetijskih pripravkov, so si zastavili cilj pripraviti čim bolj učinkovit pripravek, ki bo imel hiter učinek na ciljni organizem in čim manjši učinek na človeka. Posebej so se hoteli izogniti učinkom, podobnim tistim, ki jih povzročajo na okolje organoklorni pesticidi, ki so v okolju obstojni tudi do 20 let in več in ki so s svojimi razpadnimi produkti zastrupljali okolje, ali pa organofosforni insekticidi, ki so zelo strupeni tudi za človeka (Larson in sod., 1997).

Pri načrtovanju sinteze pesticidov poskušajo zato upoštevati naslednja dejstva:

- da ti delujejo le na ciljne organizme,
- so biološko razgradljivi,
- so učinkoviti pri nizkih dozah uporabe,
- ne razpadejo v strupene produkte
- in so nestrupeni za okolje.

Kemična industrija je tako preko višjih in boljših meril prišla do proizvodnje neonicotinoidnih pesticidov, ki naj bi bili manj strupeni za človeka in bolj strupeni za ciljne organizme (Oto, 1999). Neonicotinoide so sposobni translocirati v rastline preko koreninskega sistema. Snovi delujejo na živčne nikotinske acetilholinske receptorje žuželk in so kot take zelo učinkovite pri zatiranju insektov ter tako uporabljene od leta 1990 po vsem svetu. Posledica velike uporabe pesticidov pa je tudi velika prisotnost teh v skupnem okolju.

Med neonicotinoide uvrščamo štiri aktivne snovi, ki so kemijsko podobne nikotinu: imidakloprid, acetamiprid, tiametoksan in klotianidin. Glavne skupine teh spojin so lahko niteometilenska, nitroiminska ali cianoiminska skupina (Matsuda in sod., 2001). Najbolj razširjen in uporaben insekticid med njimi je imidakloprid (Placke in Weber, 1993).

V Sloveniji se je po I. 2005 potreba po uporabi fitofarmaceutskih sredstev (FFS) zmanjšala in v letu 2008 se je porabilo le še 5,9 kg fitofarmaceutski sredstev na hektar, torej se je prodalo okoli 1200 ton FFS na leto. Od tega je bilo prodanih 69 % fungicidov, 24 % herbicidov, 3,5 % insekticidov in 1 % ostalih sredstev. Glede na uporabo v evropskih državah smo v porabi FFS višje (Poraba sredstev za varstvo rastlin, ARSO, 2012).

Onesnaženost podzemne vode s pesticidi in njihovimi produkti v Sloveniji je bila v letu 2007 po Uredbi o standardih kakovosti podzemne vode (Ur. l. RS, št. 100/2005) na Murškem polju, v Savski kotlini in Ljubljanskem polju večkrat povzročena. Trend preseganja vodne direktive od leta 2000 do leta 2008 pada (Kazalci okolja, ARSO, 2012).

## 1.2 Namen naloge

V diplomski nalogi sem z uporabo aparature Suntest ugotavljala hitrost razgradnje pesticidov imidakloprida in acetamiprida v zemlji pri izbranih pogojih osvetljenosti.

Za imidaklopid:

vsakič po tri paralelke vzorce zemlje, umetno onesnažene z imidaklopidom, (v nadaljevanju onesnažene zemlje) z maso 250 mg sem osvetljevala v aparaturi Suntest z intenziteto svetlobe:

- 250 W/m<sup>2</sup> pri časih 15, 30, 60 in 120 min,
- 500 W/m<sup>2</sup> pri časih 15, 30, 60 in 120 min,
- 750 W/m<sup>2</sup> pri časih 15, 30, 60 in 120 min.

Nato sem osvetljevala v aparaturi Suntest z intenziteto svetlobe 750 W/m<sup>2</sup> pri časih 15, 30, 60 in 120 min še tri paralelke vzorcev onesnažene zemlje z maso 500 mg.

Za acetamiprid:

- vsakič po tri paralelke vzorcev zemlje, umetno onesnažene z acetamipridom (v nadaljevanju onesnažene zemlje), z maso 250 mg sem osvetljevala v aparaturi Suntest z intenziteto svetlobe 750 W/m<sup>2</sup> pri časih 15, 30, 60, 120, 360 in 900 min
- in tri paralelke vzorca zemlje, onesnažene z acetamipridom, z maso 250 mg sem osvetljevala v aparaturi Suntest z intenziteto svetlobe 250 W/m<sup>2</sup> pri časih 15, 30, 60 in 120 min.

Optimizirati sem poskušala tudi postopek razgradnje in določanje imidakloprida ter acetamiprida v vzorcih zemlje (določiti čim bolj optimalne pogoje obsevanja in zadostno količino zemlje, še sprejemljivo za obsevanje) ter z LC-MS metodo identificirati razpadne produkte imidakloprida in acetamiprida v zemlji.

## 2 TEORETIČNE OSNOVE

### 2.1 Neonikotinoidi

Neonikotinoidi so insekticidi za zaščito rastlin, ki so v rabi od 90-ih let prejšnjega stoletja dalje. S svojo manj škodljivo vlogo do okolja so nasledili prej bolj uporabljene organofosforne pesticide (Council Direktive 91/414/EEC). So visoko sistemski insekticidi, sposobni visokega prehoda preko koreninskega sistema in listov v rastline (Cox, 2001; Placke in Weber, 1993).

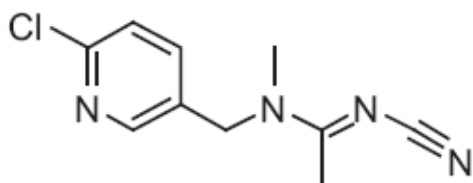
Strukturno so podobni strupu dvoživk iz družine *Dendrobatidae* in nikotinu. Kemično so torej podobni toksinu nikotinu, ki ga vsebuje rastlina tobaka (*Nicotiana Tabacum*) (Milevoj, 2007).

### 2.2 Kemijska zgradba, delovanje in delitev neonikotinoidov

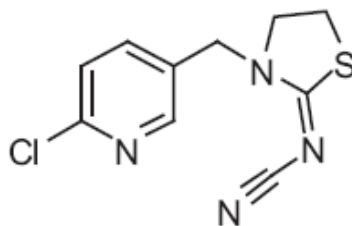
Neonikotinoidi so trdne, polarne in nehlapne snovi. Pri vrednostih pH od 5 do 9, ki jih najdemo v okolju, ne ionizirajo (Roberts in Hutson, 1999). Zaradi polarnosti in visoke topnosti so zelo mobilni. Mobilnost je odvisna od vrste prsti in adsorpcijskega koeficienta ( $K_{oc}$ ); višji kot je  $K_{oc}$ , manjša je mobilnost in obratno. Obstočnost v okolju je lahko različna in odvisna od pogojev (temperatura, osončenost itd). Glavni procesi razgradnje neonikotinoidov so tako hidroliza, fotorazgradnja in mikrobná razgradnja. V splošnem, če upoštevamo vse okoljske parametre (osvetljenost, pH, biorazgradljivost, itd.), sta najmanj obstojna v okolju acetamiprid in nitenpiram z razpolovnim časom prvega 15 dni in drugega 8 dni. Sledijo tiaklopid z razpolovnim časom 27 dni in tiametoksam z razpolovnim časom 28 dni, klotianidin z razpolovnim časom 34 dni ter imidaklopid z razpolovnim časom med 27 in 299 dni (Gupta in sod., 2002).

Molekula neonikotinoida je sestavljena iz dveh delov. Prvi del je substituiran aromatski heterociklični obroč, t. i. 6-kloropiridinilni del, in predstavlja prvi del molekule pri imidaklopidu, acetamipridu, nitenpiramu in tiaklopidu, medtem ko pri tiametoksamu in klotianidinu prvi del molekule predstavlja 2-klorotiazolni del. Prvi del je preko metilenskega mostička povezan s cianidinskim delom pri acetamipridu, s cikličnim nitroguanidinskim delom pri imidaklopidu in tiametoksamu ter z diaminonitometilensko skupino pri nitenpiramu. Močno elektrónprivlačna terminalna skupina je prisotna pri vseh neonikotinoidih in je vezana na etensko ali amidno skupino (Roberts in Hutson, 1999).

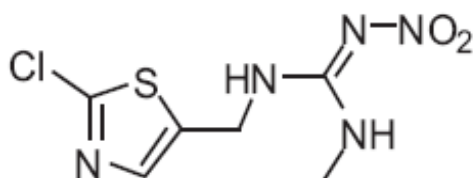
Na sliki 1 so prikazani pomembnejši predstavniki neonikotinoidov: imidaklopid, acetamiprid, klotianidin, nitenpiram, tiametoksam, tiaklopid ter dinetofuran.



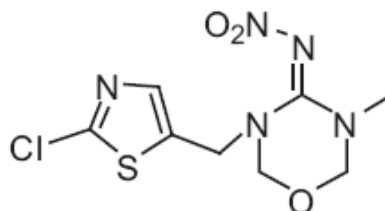
Acetamiprid



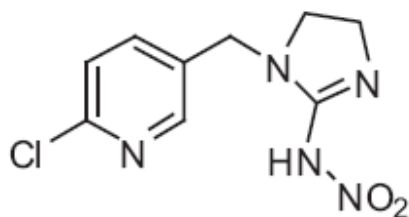
Tiakloprid



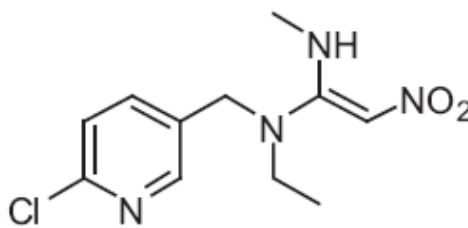
Klotianidin



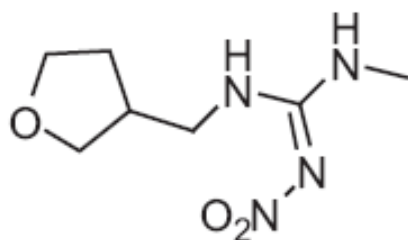
Tiametoksam



Imidakloprid



Nitenpiram



Dinotefuran

**Slika 1:** Strukturne formule neonicotinoïdov: acetamiprida, tiakloprida, klotianidina, tiametoksama, imidakloprida, nitenpirama ter dinotefurana (Nauen in Delholm, 2005)

### 2.3 Proces razgradnje fitofarmaceutskih sredstev (FFS) v zemlji

FFS vnašamo v zemljo z direktnim nanašanjem na tla, s škropljenjem, z izpiranjem s površja in rastlin ter preko prenašanja z zračnimi masami. Po vnosu pesticidov v



zemljo, se ti pod vplivom vremenskih razmer in z biološkimi ter mikrobnimi procesi vpijajo v zemljo in rastlino. Njihova mobilnost v zemlji in prenos v druge dele okolja (atmosfera, vodna telesa) je odvisna od mehanizmov in sorpcijskih in desorpcijskih lastnosti posameznih delcev tal. Razgradnja pesticidov v tleh je odvisna torej od različnih fizikalnih, kemijskih in bioloških procesov, ki jih privzemajo rastline, vključno s sorpcijo/desorpcijo, izhlapevanjem, s kemijsko in biološko razgradnjo, z odtekanjem in z izpiranjem s površine v tla. Ti procesi neposredno vplivajo na prenos pesticidov v tla in njihov prenos iz tal v vodo, zrak ali hrano. Pomen teh procesov se spreminja glede na kemijsko sestavo pesticida in lastnosti zemlje (Linn in sod., 1993).

Hitrost razgradnje FFS v zemlji se pospešuje tudi s fizikalno-kemijskimi lastnostmi tal, kot sta na primer višji pH, količina organskega ogljika v tleh, in biološkimi lastnostmi, kot so aktivnost in distribucija mikroorganizmov in okoljski pogoji, ki uravnavajo temperaturo tal ter vsebnost vlage (Walker in sod., 2001).

Pesticidi v tleh potujejo tudi zaradi razgradnje in absorpcije. Na razgradnjo, ki je bistvenega pomena za mobilnost pesticidov, vplivajo abiotski kot tudi biotski dejavniki (encimske katalize z mikroorganizmi). Ta vključuje zapletene mehanizme in različne interakcije med mikroorganizmi, sestavinami zemlje in pesticidi (Topp in sod., 1997).

Tekstura tal pomembno vpliva tudi na proces razgradnje, saj je dokazano, da na hitrost razgradnje vpliva poroznost, ki pospeši razgradnjo v zgodnji fazi obsevanja (Goncalves in sod., 2006).

Balmer je tako ugotovil, da velikost delcev tal, mineralna sestava, absorpcijske lastnosti in vsebnost vlage vplivajo na naravo tal in na fotoreakcije pesticidov v njih. Prodor svetlobe v tla je tako omejen z debelino plasti zemlje in z območjem valovnih dolžin v vidnem delu sončnega spektra (Balmer in sod., 2000).

Dejavniki, ki vplivajo na »usodo« pesticidov v tleh (Fito-info, Slovenski informacijski sistem za varstvo rastlin) so lahko:

- lastnosti FFS: parni tlak, polarnost spojin, obstojnost FFS v tleh, topnost, absorpcijske lastnosti, pH;
- lastnosti tal: tekstura tal, volumska gostota, organske snovi, mikrobiološke lastnosti (biomasa, struktura in aktivnost mikrobioloških združb), struktura tal, pH tal, globina tal, nagib, poraščenost tal;
- klimatske razmere: padavine, temperatura zraka in tal, vlažnost zraka, evapotranspiracija, sončno sevanje;
- kmetijske tehnike: način nanosa FFS, odmerek FFS, lastnosti gojene rastline (setev, razvojne faze rastlin, kolobar), obdelava tal, namakanje (vrsta, intenziteta).

## 2.4 Imidaklopid

Imidaklopid je sistemski, kloronikotinoide in insekticid, ki se ga uporablja od leta 1991. Lahko se ga lahko uporablja za obdelavo zemlje in semena. Imidaklopid deluje na zaščito celotne rastline pred insekti. Deluje proti enokrilnim žuželkam, kot so rižni lijaki ali listne uši, resarji, termiti, nekateri hrošči, ... S svojim delovanjem moti prenos dražljajev v živčnem sistemu insektov in povzroča blokade v sistemih nikotinergičnih nevronske poti. Ta pot je bolj značilna za žuželke kot toplokrvne živali. Smrtna doza vodi do odprtja Na kanalov, ki povzroči smrt ali paralizo insekta. Nasprotno na subkroničnih mejah imidaklopid povzroči zapiranje Na<sup>+</sup> kanalov med interakcijo z drugo podenoto istega receptorja. Imidaklopid tako varuje celotno rastlino med njeno rastjo, saj se prerazporedi po celotni rastlini med njeno rastjo in tako se po dozoritvi ohrani v rastlini še zelo malo imidakloprida (Suchail in sod., 2001).

Na tržišču po svetu so dosegljivi pripravki, ki vsebujejo imidaklopid, pod različnimi imeni, kot na primer Gaucho, Confidor, Admire, Advantage, Merit, Provado, Imicide, Vision in Premise.

Po svetu ga uporabljajo v kmetijstvu za zatiranje plevela in insektov, za zatiranje zajedavcev na hišnih ljubljenceh, za okrasne rastline in urejanje trat. Uporablja se ga tudi za zatiranje škarkov, termitov in zatiranje insektov po domovih. V kmetijstvu se ga največ porabi za zaščito semena oljne ogrščice, bombaža, sladkorne pese, koruze, za škropljenje sadnega drevja, tobaka, kave in druge zelenjave (Elbert in sod., 1998).

Imidaklopid v Sloveniji uporabljamo že od leta 1996 (Fitosanitarna uprava Republike Slovenije, 2012). Pripravki, ki so bili do sedaj registrirani v Sloveniji, so:

- CONFIDOR SL 200 – UPORABA: za škropljenje listov na hmelju, hruški, jablani (listne uši *Aphididae*), slivah, breskvah (resarji *Thrips Linnaeus, 1758*), češnjah (listne uši *Aphididae*), paradižniku, papriki, jajčevcih, okrasnih rastlinah in za mazanje trte, hmelja. V uporabi do 15. 2. 2016;
- GAUCHO FS 350 – UPORABA: za zatiranje listnih uši (*Aphididae*), strune (*Elateridae*) in švedske mušice (*Oscinella frit*) na koruzi. V uporabi je bil do 5. 4. 2010;
- GAUCHO WS 70 – UPORABA: za zatiranje listnih uši (*Aphididae*), mahovinarja (*Atomaria linearis*), pesne muhe (*Pegomya hyoscyami*), pesnega bolhača (*Chaetocnema tibialis*) na rdeči pesi. V uporabi je bil do 28. 3. 2010;
- KOHINOR SL 200 – UPORABA: za škropljenje listov na hmelju, hruški, jablani (listne uši *Aphididae*), slivah, breskvah (resarji *Thrips Linnaeus, 1758*), češnjah (listne uši *Aphididae*), paradižniku, papriki, jajčevcih, okrasnih rastlinah in za mazanje trte, hmelja. V uporabi do 6. 4. 2016.

Z vsemi pripravki imidakloprida je po Zakonu o vodah po 8. členu, po prilogi 1, na podlagi 65. člena tega zakona prepovedano gnojenje in uporaba teh sredstev za

varstvo rastlin na priobalnih zemljiščih v tlorisni površini 15 metrov od brega vode 1. reda, in 5 metrov od meja bregov vode 2. reda (Ur. l. RS, št. 62/2003).

#### 2.4.1 Fizikalno-kemijske lastnosti imidakloprida

V preglednici 1 so nazorno prikazane osnovne fizikalno-kemijske lastnosti imidakloprida.

**Preglednica 1: Fizikalno-kemijske lastnosti imidakloprida (Kollman in Sagawa, 1995)**

Splošno ime	Imidaklopid
CAS ime	1-[(6-chloro-3-pyridinyl)methyl]- <i>N</i> -nitro-2-imidazolidinimine
IUPAC ime	1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)- <i>N</i> -nitroimidazolidin-2-ylideneamine
Empirična formula	C <sub>9</sub> HClN <sub>5</sub> O <sub>2</sub>
Molekulska masa	225,7 g/mol
Barva	brezbarven, malo rumenkast
Agregatno stanje	brezbarvni kristali
Tališče (°C)	144 (136,4 in 143,8 – odvisno od kristalne oblike)
Gostota (g/mL; 20 °C)	1,543
Topnost v vodi (g/L; 20 °C)	0,61; 0,51
Topnost v drugih topilih (g/L; 20 °C)	diklorometan: 50–100; izopropanol: 1–2; toluen: 0,5–1; n-heksan: < 0,1; maščobe: 0,061 g/100 g
Porazdelitveni koeficient (log P <sub>ow</sub> ; 22 °C)	0, 57 (P <sub>ow</sub> = 3,72)
Parni tlak (Pa; 20 °C)	4 x 10 <sup>-10</sup>
Hidrolizni razpolovni čas	> 30 dni (25 °C, pH = 7)
Fotolizni razpolovni čas v vodi	3,89 x 10 <sup>-2</sup> dni (25 °C, pH = 7)
Anaerobni razpolovni čas	27,1 dni
Aerobni razpolovni čas	9,97 x 10 <sup>2</sup> dni
Razpolovni čas fotokemične razgradnje v zemlji	38,9 dni

#### 2.4.2 Delovanje imidakloprida

Imidaklopid deluje na živčni sistem insektov, saj se prilega na receptorska mesta v živčnem sistemu zaradi svoje oblike, naboja in velikosti, ki spremljajo molekule acetilholina (Cox, 2001). Acetoholin ima v telesu funkcijo prenosa signala med živčnimi celicami ali med živčnimi celicami in tkivom. Organofosforni pesticid deluje zaviralno na

encim acetilholinesteraze. Aktivna snov se tako prenaša po rastlini in na ta način deluje na veliko število škodljivcev.

Uporablja se kot insekticid za škropljenje listov ali semena. Imidaklopid se dobro prenaša iz korenin do listov in novih poganjkov (dobra ksilemska prevodnost), medtem ko je transport v korenine, gomolje in plodove slabši (slaba floemska prevodnost) (Fitosanitarna uprava republike Slovenije, 2004).

#### 2.4.3 Kinetika strupenosti imidakloprida

Imidaklopid je fotokemično nestabilen in dobro topen v vodi, ima nizek potencial bioakumulacije v okolju. Ker je vodotopen in netopen v lipidih, je nevarnost bioakumulacije v bioloških tkivih in biokoncentracije vzdolž prehranjevalne verige majhna (Krohn in Hellpointer, 2002), kot vidimo iz preglednice 2 spodaj.

**Preglednica 2:** Smrtna doza imidakloprida za različne organizme (EXTOXNET Database, Department of pesticides Regulation, 2000)

Ime organizma	Količina imidakloprida/kg telesne teže
Vodna bolha	85 mg
Izopodni rakec	34 mg
Šarenka	> 83 mg
Prepelica	52 mg
Raca	283 mg
Podgana	450 mg
Čebela	0,8 mg

#### 2.4.4 Strupenost imidakloprida

Glede na raziskave, opravljene na pticah, sesalcih, insektih, podganah in kopenskih nevretenčarjih in vodnih organizmih, lahko rečemo, da so ptice bolj občutljive na imidaklopid kot sesalci. Pri pticah imidaklopid povzroča nevrotoksičnost in škodljive vplive na preživetje in rast pri kronični izpostavljenosti. Med koristnimi nevretenčarji, kot so na primer čebele, imidaklopid pri nizkih odmerkih povzroči umrljivost ( $LC_{50}$  = smrtna doza; mg/kg osebka) in škodljiv učinek na čebele ( $LC_{50}$  = 0,8 mg/kg čebele) (SERA, 2005). Pri dvoživkah lahko imidaklopid povzroči kromosomske in DNA-poškodbe pri izpostavljenosti 8 mg/kg v 7 dneh (Feng in sod., 2004). Pri ribah so zmanjšano rast opazili pri 2,3 mg/kg po 96 dneh izpostavljenosti (SERA, 2005). Najbolj občutljive na imidaklopid so ličinke komarju podobnih žuželk vrste *Chironomus tentans*, kjer je znašala  $LC_{50}$  = 0,011 mg/kg (SERA, 2005).

#### 2.4.5 Dodatki k sredstvu imidaklopid

Komercialni imidaklopidni insekticidi kot vsi ostali insekticidi vsebujejo aktivne oziroma druge sestavine. Za zdaj je o njih še malo znanega, v pripravkih pa so našli do zdaj že kristale kremenovega silikata, za katerega se ve, da je za človeka rakotvoren in povzroča raka na pljučih, povzroča dihalne bolezni, genetske poškodbe in apatičnost (U.S. Dept. of Health and Human Services, 2000).

Naftalen je prav tako rakotvoren in povzroča raka na dihalnih poteh, poškodbo genetskega materiala in anemijo, poškodbo pljuč, katarakto in kožne alergije (Acros Organics, 1999).

#### 2.4.6 Izpostavljenost pri delu z imidaklopidom

Pripravki insekticidov z aktivno substanco imidaklopidom, kot so Confidor SL 200, Gaucho in drugi, se uporabljajo za škropljenje listov in semena. Delavci, ki v kmetijstvu in sadjarstvu prihajajo v stik s pripravki insekticidov iz imidakloprida med mešanjem ali razprševanjem teh izdelkov po semenu ali rastlinah, so z njimi v stiku preko dihalnih poti, prebavnega trakta ali preko kože in oči. Glede na to se morajo primerno zaščititi in nositi rokavice, očala ter zaščitno obleko. Imidaklopid se uporablja tudi v veterini za nadzor bolh, kar povzroča lahko večjo izpostavljenost za ljudi, ki so nato v stiku s hišnim ljubljencem, na kar naj bi bili ljudje tudi opozorjeni s strani veterinarja. Živali, kot so čebele, živina ali divjad, so imidaklopidu izpostavljene preko pridelkov – hrane (Fitosanitarna uprava republike Slovenije, 2012).

#### 2.4.6 Imidaklopid v okolju

Nizka konstanta  $K_{oc}$  (koeficient adsorpcije na organski ogljik) med 132 in 310 v odvisnosti z visoko topnostjo v vodi 514 mg/L kaže na to, da je potencial za pronicanje v podtalnico velik, raziskave, narejene pod normalnimi vremenskimi pogoji, kažejo na to, da je imidaklopid relativno nepremičen v muljnatih tleh (Zheng in Liu, 1999). Povezava med  $K_{ow}$  (porazdelitveni koeficient oktanol–voda), ki ima vrednost 3,7, v kombinaciji z njegovo hitro razgradnjo v vodi (razpolovni čas < 3 h) in v zemlji (< 39 dni) kaže na nizek potencial bioakumulacije (Kollman in Segawa, 1995).

#### **Imidaklopid v zraku**

Po nekaterih formulacijah naj bi pesticid po razprševanju prišel z vetrom tudi na druge površine. Nizek parni tlak  $1,0 \times 10^{-7}$  mm Hg kaže na to, da je ta pesticid relativno nehlapen. Ker ima imidaklopid nizek koeficient absorpcije v tla, ima tudi nizek potencial širjenja v zrak preko velike površine s prenašanjem delcev s tal. Nizka Henryjeva zakonska konstanta  $6,5 \times 10^{-11}$  atm m<sup>3</sup>/mol kaže tudi na to, da ima

imidakloprid tudi nizek potencial izhlapevanja iz vode (Imidakloprid, Pesticide fact Sheet, 2002).

### **Imidakloprid v vodi**

Pri raziskavah je bilo ugotovljeno, da imidakloprid težko pronica v podtalnico (Rouchard in sod., 1994), toda v študijah Bayer Corporation so našli imidakloprid v podtalnici več kot 18 metrov globoko pod površino ilovnatih tal. Koncentracije so bile v razponu 0,1 µg/L do 1 µg/L (Bayer Corp Science, 1998).

Imidakloprid je v sterilnih pogojih in odsotnosti svetlobe stabilen pri pH 4–9 (Krohn in Hellpointer, 2002). Pri študiji z radioaktivno označenim imidaklopridom (v odsotnosti svetlobe) so določili razpolovni čas ( $DT_{50}$ ) 30 dni v anaerobnih pogojih in 27 dni v aerobnih pogojih. Vrednost  $DT_{50}$  za imidakloprid v sedimentih znaša kar 130–160 dni (Krohn in Hellpointer, 2002).

Imidakloprid ne hidrolizira v kislem ali nevtralnem območju, se pa hidroliza povečuje v alkalnih pogojih in s povišano temperaturo (Zheng in Liu, 1999). Po raziskavah naj bi pri pH 7 le 1,5 % imidakloprida hidroliziralo v treh mesecih, medtem ko ga pri pH = 9 hidrolizira kar 20 %. Pri hidrolizi dobimo metabolit 1-[(6-kloro-3-piriminil)metil]-2-imidazolinidon, ki se lahko s pomočjo oksidativne cepitve vezi N–C med pirimidinom in imidazolidinom kasneje razcepi. Iz tega nastanejo anorganske molekule in ioni ( $CO_2$ ,  $NO_3^-$ ,  $Cl^-$ ), ki okolju niso škodljivi (Zheng in Liu, 1999).

Hidroliza imidakloprida je bila izvedena tudi na fitofarmaceutskem pripravku Confidor v pitni vodi (Wamhoff in Schenider, 1999). Identificirali so več razgradnih produktov, med katerimi je bil glavni 1-[(6-kloro-3-piriminil)metil]-2-imidazolinidon.

Hidroliza imidakloprida v vodi poteče v manj kot 3 urah. Glavni razpadni produkti, dobljeni pri fotokemijskih reakcijah v vodi, so: 1-[(6-kloro-3-piridin)metil]-2-imidazolidin (imidakloprid urea), 6-kloro-nikotinaldehid, *N*-metilnikotinske kisline, 6-kloro-3-piridil-metiletildiamin (Wamhoff in Schneider, 1999; Moza in sod., 1998).

### **Imidakloprid v bioti**

Preko škropljenja semena ostane imidakloprid v tleh skozi celotno vegetacijsko obdobje. Tako se lahko hitro absorbira skozi korenine v različne rastline: podatki za trsni sladkor kažejo, da se ga absorbira približno 50 %, medtem ko je vnos v krompir, riž ali koruzo le 20-odstoten (Solecki, 2001). Asimilacija skozi liste je nizka. Le 1,2–1,4 % asimiliranega imidakloprida se pričakuje v cvetnem prahu ali nektarju (Solecki, 2001).

### **Imidakloprid v prsti**

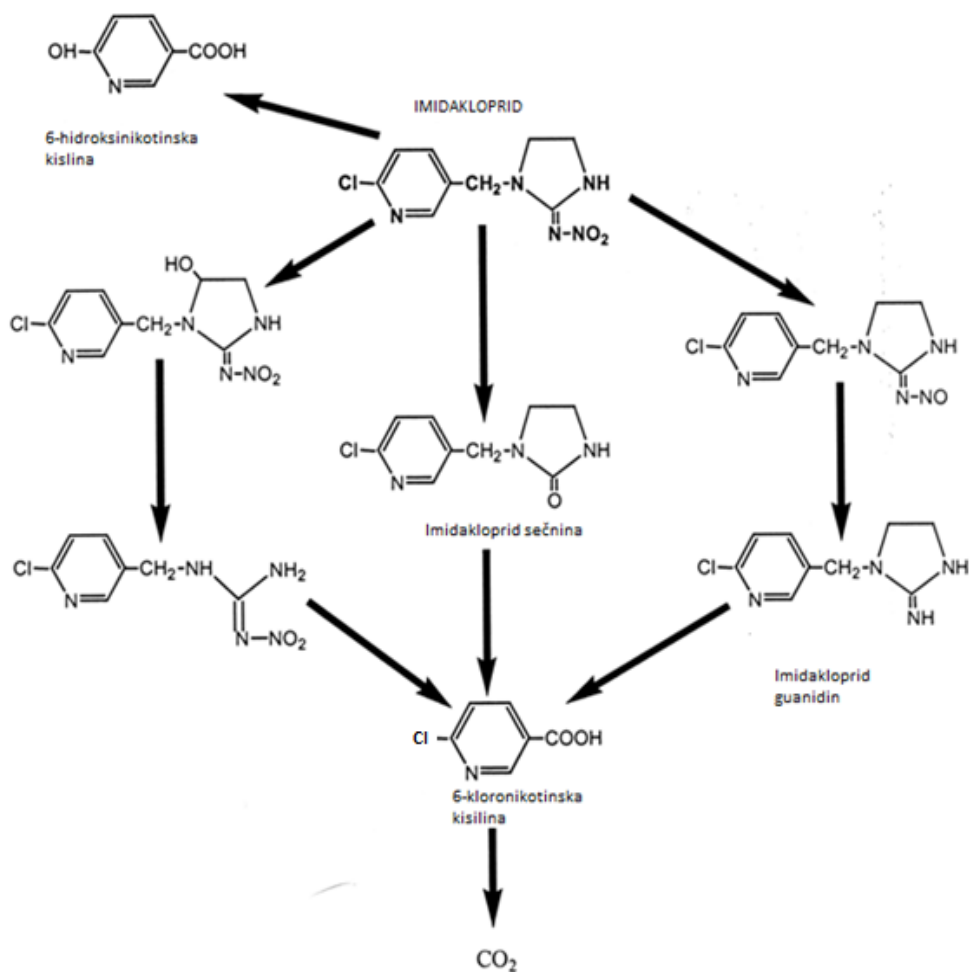
Visoka topnost v vodi in nizka konstanta  $K_{oc}$  ponazarjata nizko zmožnost adsorpcije na delce prsti. Raziskave so pokazale, da imidakloprid ostane v zemlji z razpadnim časom od 27 do 229 dni. Razpolovni čas v zemlji varira glede na tip prsti in prisotnost

podzemne vode. Scholz in sod. (1999) so odkrili, da imidakloprid razpada hitreje ob prisotnosti vegetacije  $t_{1/2} = 48$  dni, brez vegetacije razpada s  $t_{1/2} = 190$  dni. Razgradnja imidakloprida na zemlji s fotolizo ima razpolovni čas 39 dni. Ob odsotnosti sončne svetlobe je v zunanjih pogojih razpadni čas 229 dni in v laboratorijskih pogojih 997 dni (Imidakloprid, Pesticide Fact Sheet, 2002). Ta lastnost stabilnosti ob odsotnosti svetlobe daje imidaklopridu prednost in vzdržljivost pri škropljenju semena z njim in pri uporabi za zatiranje insektov, saj ne razpade, preden ga korenine lahko sprejmejo.

Na sorpcijo imidakloprida vplivajo tudi lastnosti tal, kot so organski ogljik in minerali. Ob povišani koncentraciji organskega ogljika in laminarnih silikatov gline v tleh se potencial izluževanja imidakloprida znižuje (Cox, 2001). Organska gnojila, kot sta piščančji gnoj in kravji gnoj, povečajo adsorpcijo pesticida na organsko snov in povečata njegov razpolovni čas. Razpolovni čas je tako ob uporabi kravjega gnoja kar 124 dni, medtem ko je ob odsotnosti gnojil le 40 dni. Vseeno pa je bila prisotnost imidakloprida v gnojenih tleh ob žetvi pridelkov enaka kot v tleh brez uporabe gnojil, saj ga rastline veliko absorbirajo skozi korenine in razkrojijo. Med  $K_{oc}$  in vsebnostjo apnenca v tleh ni bila najdena nobena povezava (Solecki, 2001).

Začetni razpadni produkti imidakloprida, ki so jih določili v prsti, so:

- 1-[(6-kloro-3-piridinil)metil]-2-imidazolidinon (imidakloprid sečnina)
  - 6-kloronikotinska kislina (6 CNA)
  - 6-hidroksinikotinska kislina
- CO<sub>2</sub> se nato tvori iz 6-kloronikotinske kisline (Scholz in Reinhard, 1999).



**Slika 2:** Razgradni produkti imidakloprida v prsti (Bacey, 2000)

Razgradnja v tleh poteka po dveh poteh: prva je hidroliza imidazolidnega obroča, druga pa je redukcija nitro skupine s končno oksidacijo do 6-kloronikotinske kisline (slika 2). Ogljikov dioksid je glavni produkt biorazgradnje imidakloprida. Glavni identificirani metaboliti so [1-[(6-kloro-3-piridilmetil)-2-imidazolidinon]imidakloprid sečnina, 6-kloronikotinska kislina (6 CNA) in 6-hidroksinikotinska kislina. Potrebno je poudariti, da lahko pri razgradni nastanejo metaboliti, ki so bolj strupeni kot imidakloprid sam (Krohn in Hellpointer, 2002). Tak primer je metabolit 2-imidazolidon, ki nastaja tekom razgradnje v tleh (tudi pod imenom etilen urea) in v kombinaciji z nitrati povzroča tumorje in genetske poškodbe. Drugi primer je metabolit desnitroimidakloprid, ki je tristostran bolj strupen od imidakloprida (Krohn in Hellpointer, 2002).

Proučevanje razgradnje imidakloprida v zemlji pod simuliranimi pogoji v laboratoriju je pokazalo, da poteka razgradnja postopno in kontrolirano. Razpolovni čas imidakloprida v aerobnih pogojih v tleh znaša 156 dni, v golih tleh brez vegetacije 185 dni, v tleh z vegetacijo pa od 83 do 124 dni. Na razpad imidakloprida tako vplivata vegetacija tal in pH tal – višji je pH, daljši je razpolovni čas (Krohn in Hellpointer, 2002).



## 2.5 Acetamiprid

Acetamiprid je sistemski insekticid in spada v skupino neonikotinoidnih insekticidov. Sintetiziran je bil leta 1989 in leta 1995 prvič registriran na Japonskem. Fitofarmacevtska sredstva z aktivno substanco acetamiprida se uporabljajo za škropljenje okrasnih rastlin, bombaževca, čajevca, zelenjave in sadja v namen zatiranja sesajočega mrčesa. Nanašajo se preko škropljenja na prst ali direktno na liste (Fito – info, Slovenski informacijski sistem za varstvo rastlin; Jeschke in Nauen, 2005). Na insekte vpliva tako neonikotinoidna elektro negativna nitrilna skupina, ki specifično reagira s kationskim vezavnim mestom insekta, tako da večinoma ne vpliva na sesalce, ki teh odražanj nimajo (Wallace, 2005).

V Sloveniji se uporablja različna fitofarmacevtska sredstva z aktivno substanco acetamiprida. Pri nas so registrirana 4 fitofarmacevtska sredstva, ki vsebujejo substanco acetamiprida v obliki insekticida ali v obliki gnojila.

Gnojila:

- Mospilan 20 SG (delež acetamiprida: 20 %),
- Celaflor careo koncentrat (delež acetamiprida: 0,5 %)
- Mospilan 20 SP (delež acetamiprida: 20 %)

Insekticidi, gnojila:

- Celaflor careo granulat (4 %)

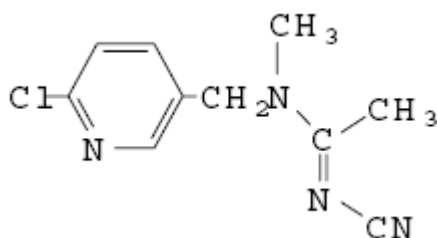
Ta sredstva so registrirana do leta 2016 in so namenjena zatiranju kaparjev (*Coccoidea*), lisnih uši (*Aphididae*), resarjev (*Thrips*), rilčkarjev (*Curculionidae*), ščitkarjev (*Aleyrodidae*), škržatov iz družine Cicadellidae in volnatih kaparjev (*Pseudococcidae*), koloradskega hrošča (*Leptinotarsa decemlineata*), češnjeve muhe (*Rhagoletis cerasi*) in drugih (Fitosanitarna uprava Republike Slovenije, 2004).

Z vsemi pripravki acetamiprida je po Zakonu o vodah po 8. členu, po prilogi 1, na podlagi 65. člena tega zakona prepovedano gnojenje in uporaba teh sredstev za varstvo rastlin na priobalnih zemljiščih v florisni površini 15 metrov od brega vode 1. reda, in 5 metrov od meja bregov vode 2. reda (Ur. l. RS, št. 62/2003).

### 2.5.1 Fizikalne in kemijske lastnosti acetamiprida

Molekula acetamiprida ((E)-N`-[(6-kloro-3-piridil)metil]ciano-N`-metilacetamidin) je sestavljena iz dveh delov. Osnova je substituiran aromatski heterociklični obroč, 6-kloro-3-piridinilni del, ki je preko metilenskega mostu povezan s cianidinaminskim delom (slika 3). Terminalno skupino predstavlja substituent z veliko močjo odvzemanja

elektronov, to je imino skupina (Roberts in Hutson, 1999). Vplive teh spojin vidimo tudi iz lastnosti v preglednici 3 spodaj.



**Slika 3:** Kemijska struktura acetamiprida (Roberts in sod., 1999)

**Preglednica 3:** Fizikalne in kemijske lastnosti acetamiprida (EC. Health and Consumer Protection Directorate, 2004)

Molekulska formula	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> CIN <sub>4</sub>
Molekulska masa	222,68 g/mol
Agregatno stanje	trdno, kristali
Barva	bela
Vonj	brez vonja
Parni tlak	< 1 x 10 <sup>-6</sup> Pa (25 °C)
Topnost v vodi	4250 mg/L (25 °C, destilirana voda)
Tališče	98,9 °C
Relativna gostota	1,330 g/cm <sup>3</sup> (20 °C)
Henryjeva konstanta	5,3 x 10 <sup>-8</sup> Pa m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> (25 °C)
Konstanta disociacije pKa	0,7 (25 °C)
Porazdelitveni koeficient oktanol–voda log P <sub>ow</sub>	0,8 (25 °C)
Koeficient adsorpcije v prsti K <sub>d</sub>	< 4,1 (mL/g, 20 °C)
Koeficient adsorpcije na organski ogljik K <sub>oc</sub>	132–267 (mL/g, 20 °C)
UV/VIS adsorpcija max; valovna dolžina max	247 nm, 217 nm

### 2.5.2 Acetamiprid v okolju

Pomembna pot razgradnje acetamiprida je aerobna razgradnja v zemlji in poteka zelo hitro ter omogoča biorazgradljivost. V pufernih raztopinah (vodi) je acetamiprid pri pH 4,5 in 7 stabilen, prav tako je stabilen na sončni svetlobi, počasi pa se razgrajuje pri pH 9 in 45 °C. Razpad poteka tudi s fotolitsko in anaerobno razgradnjo, vendar ta procesa pod naravnimi pogoji potekata za acetamiprid bistveno počasneje, podobno kot hidroliza (Tokieda in sod., 1998). Acetamiprid je v okolju relativno neobstoje in je v večini vrst prsti biorazgradljiv. Je srednje mobilan v večini prsti in vodnih sistemov (Acetamiprid, Pesticides Fact Sheet, 2002).

Poskusi na štirih različnih vrstah prsti so pokazali, da je koeficient adsorpcije acetamiprida pri 20 °C v prsti manjši od 4,1 mL/g in da je koeficient adsorpcije na organski ogljik med 132 in 267 mL/g (Acetamiprid, Pesticides Fact Sheet, 2002).

Ker je precej hitro razgradljiv, je večja verjetnost, da bodo njegovi metaboliti pronicali skozi prst v podzemno vodo. *N*-demetil acetamidrid je glavni produkt razgradnje acetamidrida. Acetamidrid ima tudi nizek potencial za bioakumulacijo v telesu. Iz prsti in listov rastlin izhlapeva zelo počasi, do 1 % na dan (EC. Health and Consumer Protection Directorate, 2004).

### 2.5.3 Kinetika strupenosti acetamidrida

Acetamidrid se hitro metabolizira v organizmih, vsebnost njegovih metabolitov v urinu pa znaša od 79–86 % začetne koncentracije. Nepredelanega tako ostane v organizmu le 3–7 %, ta ostane v blatu in urinu vretenčarjev. Glavno pot razgradnje predstavlja demetilacija v 1. fazi biotransformacije, kjer nastane najbolj značilen produkt 6-kloronikotinska kislina. Nastale spojine lahko nato s konjugacijo z glicinom preidejo v 2. fazo transformacije in se kot metaboliti izločijo iz organizma (Wallace, 2005).

#### Strupenost acetamidrida za živali

V prebavilih se acetamidrid hitro absorbira (> 96 % v 24 urah), tako je koncentracija v organizmu najvišja že po 30 minutah ali šele po 7 urah (odvisno od vrste). Najvišje koncentracije so najdene v nadledvični žlezi, ščitnici, jetrih in ledvicah (EC. Health and Consumer Protection Directorate, 2004). Predvidene količine za smrtno dozo na kilogram teže oseba oziroma sam osebek (v primeru čebele) so prikazane v preglednici 4 spodaj.

**Preglednica 4:** Smrtna doza acetamidrida za različne organizme (EC. Health and Consumer Protection Directorate, 2004)

Ime organizma	Količina acetamidrida/kg telesne teže
Podgana	213 mg
Raca	98 mg
Krap	100 mg
Zemeljski črv	9 mg
Čebela	0,014mg/čebelo
Človek	moški 417 mg/kg, ženska 314 mg/kg

V primeru Amesovega testa za ugotavljanje genotoksičnega učinka acetamidrida na bakterijah so rezultati za acetamidrid pokazali, da tako acetamidrid kot tudi njegovi metaboliti ne izkazujejo genotoksičnih učinkov (Jeschke in Nauen, 2005).

#### Acetamidrid v prsti

V prsti je acetamidrid zelo hitro razgradljiv. Za glineno zemljo je razpolovni čas 1–2 dni, za poljsko zemljo pa znaša približno 12 dni. Glavna pot razgradnje v zemlji je aerobna razgradnja z razpolovnim časom med 1 in 8,2 dneva, ki vodi do nastanka *N*-demetil acetamidrida. Precej počasneje pride do razgradnje do 6-kloronikotinske kisline. Tej sledi mineralizacija do ogljikovega dioksida (Tokieda in sod., 1998). Fotoliza v prsti

tako ne predstavlja pomembnejše poti razgradnje in je zanemarljiva (Acetamiprid, Pesticide Fact Sheet, 2002).

### Acetamiprid v vodi

Acetamiprid prehaja v vodo z izpiranjem s površine prsti ali erozije. Pri temperaturi 20 °C je acetamiprid stabilen za hidrolizo, ob izpostavitvah visokim temperaturam (90–95 °C, 2 uri) pa nastane s hidrolizo pretežno *N*-dimetil acetamiprid. Ta nastaja tudi pri anaerobni razgradni pri enakih pogojih, pri kateri znaša razpolovni čas 45 dni. V tem primeru doseže *N*-demetil acetamiprid maksimalno vrednost šele po šestih mesecih. Precej hitreje poteka razgradnja v aerobnih vodnih okoljih. S polintenziteto svetlobe se acetamiprid v vodi razgrajuje relativno počasi, saj je razpolovni čas pri pH 7 približno 34 dni (Acetamiprid, Pesticide Fact Sheet, 2002).

### Acetamiprid v zraku

Acetamiprid je zaradi relativno nizkega parnega tlaka nehlapna spojina. Ima nizek potencial za izhlapevanje iz vode, saj znaša Henryjeva konstanta pri 25 °C  $5,3 \times 10^{-8}$  Pa m<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup>. Študije so pokazale, da je izhlapevanje z listnih površin in tal po 24 urah manjše od 1 % (Acetamiprid, Pesticide Fact Sheet, 2002). V primeru fotokemične oksidativne degradacije v zraku je razpolovni čas 3 ure in pol (Acetamiprid, Pesticide Fact Sheet, 2002).

## 2.5.4 Določanje acetamiprida in neonikotinoidev v prsti

Neonikotinoide lahko določamo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti v kombinaciji s spektrofotometrično detekcijo v področju UV (HPLC-UV) (Tsamura in sod., 1998), tekočinsko kromatografijo z masno spektrometrijo (LC-MS) (Obana in sod., 2003), plinsko kromatografijo z masno spektrometrijo (GC-MS) in LC-MS na osnovi ionizacije z razprševanjem v visokem električnem polju (ESI) (Fidente in sod., 2005).

S **plinsko kromatografijo** zaradi nehlapnosti neonikotinoidev določamo njihove razgradne produkte. Pred injiciranjem vzorca je treba insekticide iz matriksa izolirati z ekstrakcijo na trdnem nosilcu (SPE) ali z ekstrakcijo tekoče-tekoče ter jih prenesti v hlapno organsko fazo (Vilchez, 1996).

Pri **tekočinski kromatografiji** za detekcijo uporabljamo detektor z diodno matriko (DAD) in masni analizator z ionsko pastjo (Baskaran in sod., 1997).

Najbolj uporabne ekstrakcije neonikotinoidev so ekstrakcija tekoče-tekoče, ekstrakcija na trdnem nosilcu (SPE) in ekstrakcija trdno-tekoče. Primerna topila za ekstrakcijo polarnih snovi, kot so neonikotinoidev, so diklorometan, metanol, acetonitril, in aceton (Ahmad in sod., 2006).

**Trdne vzorce** ekstrahiramo neposredno v organsko topilo (ekstrakcija trdno-tekoče), npr.: v diklorometan. Pogosto je potrebno tako pridobljene ekstrakte vzorcev naknadno čistiti s kromatografskimi kolonami (Rossi in sod., 2005). Pri ekstrakciji na trdem nosilcu (SPE) uporabljamo kolone C 10 (Baskaran in sod., 1997), Extrelut NT 20 kolone (Fidente in sod., 2005) in kolone LICHrolut, kot elucijska topila pa metanol, diklorometan in zmes etil acetata in metanola (1 : 1, v/v).

**Neonikotinoide** so poskusili določati tudi s HPLC-TLS detekcijo (Thermal Lens spectroscopy – laserska detekcija s toplotnimi lečami) (Guzsvany in sod., 2001). Določevali so neonikotinoide v vzorcih krompirja in rečne vode. V primerjavi s HPLC-DAD detekcijo so bile vrednosti LOD za tiametoksam, acetamiprid in tiaklopid 2,5- do 8,5-krat nižje: 0,015 mg/kg za tiametoksam, 3,2 mg/kg za acetamiprid in 7,5 mg/kg za tiaklopid. V primeru imidakloprida sta bili vrednosti LOD pri obeh metodah enaki, to je 27 mg/kg.

## 3 EKSPERIMENTALNI DEL

### 3.1 Uporabljeni materiali in metode

#### 3.1.1 Reagenti in raztopine:

- imidaklopid; 99,9-odstotna čistost, Riedel-de Haen
- acetamidrid; 99,9-odstotna čistost, Riedel-de Haen
- acetonitril, Sigma Aldrich, for HPLC > 99,9 %
- ultra čista laboratorijska voda, upornost > 18 M $\Omega$  cm<sup>-1</sup>
- metanol; 99-odstotna čistost, Riedel-de Haen
- etanol 30-odstotna čistost, Riedel-de Haen
- očetna kislina > 99,8 %, FLUKA
- zemlja

#### 3.1.2 Instrumenti in oprema:

- tehcnica
- siti za testiranje okoljskih vzorcev, skladni z DIN standardi, sito velikosti 1200 Mw, 800 dr. st. din nr. 20 in sito velikosti 300 Mw 200 dr. st. din nr. 20 (povzeto: Kalister, 2011)
- drobilnik
- steklene petrijevke premera 9 cm in višine 2 cm
- pipeti 5 mL in 1 mL
- tipsi, kapalke, bučke, čaše, plastične tube
- rotavapor (slika 5)
- digestorij
- ultrazvočna kopel (slika 4)
- 4  $\mu$ m filter (Chromafil Xtra PTFE-45/25, proizvajalec Macherey-Nagel)

Suntest XLS + solar simulator (Atlas MTT, Illinois, US) (sliki 6 in 7):

- sevalno območje: 300–400 nm/LUX ali 300–800 nm/LUX
- žarnica: 1700 W, ksenonska žarnica
- obseg površine obsevanja: 1100 mm<sup>2</sup>

Tekočinski kromatograf visoke ločljivosti s spektrofotometrijskim detektorjem z diodno matriko (HPLC-DAD) (slika 8):

- kromatograf: Hewlett Packard 1100 Series Agilent
- kolona: Zorbax C8, polnilo Chromasil (dimenzije 250 mm, 4,6 mm, 5  $\mu$ m)
- predkolona: Alltech 10-krat 4 mm

- detektor: spektrofotometrijski detektor z diodno matriko (DAD-diode array detector)
  - valovna dolžina merjenja: za imidaklopid 270 nm, za acetamidrid 250 nm
  - volumen injiciranja: 75  $\mu$ L
  - pretok: 1 mL/min
  - mobilna faza: ultračista laboratorijska voda, upornost  $> 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$  + očetna kislina pH 3 (70 %), acetonitril (30 %); Sigma Aldrich for HPLC  $> 99,9 \%$
  - elucija: izokratična
  - temperatura kolone: 25  $^{\circ}\text{C}$
- retencijski čas: za imidaklopid 8,02 min in za acetamidrid 9,1 min
- čas analize: za imidaklopid 12 min, za acetamidrid 10 min

Tekočinski kromatograf z masnim spektrometrom (LC-MS) (slika 9):

- tekočinski kromatograf: LC Perkin Elmer 2000 Series, proizvajalec: Schelton, CT, ZDA
- kolona: C18 Purospher STAR RP-18 (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), proizvajalec: Merck
- temperatura kolone: 25  $^{\circ}\text{C}$
- volumen injiciranja: 90  $\mu$ L
- pretok: 1 mL/min
- mobilna faza: ultračista laboratorijska voda, upornost  $> 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$  + očetna kislina pH 3, (70 %), acetonitril (30 %); Sigma Aldrich for HPLC  $> 99,9 \%$
- čas analize: 17 minut
- masni spektrometer: 3200 Q sistem TRAP MS, opremljen z ESI ionizacijo, proizvajalec: Applied Biosystems/Sciex MDS (Foster City, CA, USA)
- masna spektrometrična detekcija je bila izvedena v pozitivnem Q3 načinu, skenirali pa smo iz m/z 60 na m/z 400 v 1 s. ESI vir napetosti je bil 4500 V; DP 36 V ter temperatura Turbo Ion Spraya 400  $^{\circ}\text{C}$



**Slika 4:** Ultrazvočna kopel (Foto: Krašovec, B., 2011)



**Slika 5:** Rotavapor (Foto: Krašovec, B., 2011)



**Slika 6:** Suntest XLS+ (Atlas MTT, Illinois, US) (Foto: Krašovec, B., 2011)



**Slika 7:** Odprt Suntest (Foto: Krašovec, B., 2011)





**Slika 8:** Tekočinski kromatograf visoke ločljivosti (HPLC) z DAD detektorjem (Foto: Krašovec, B., 2011)



**Slika 9:** Tekočinski kromatograf z masnim spektrometrom (LC-MS) (Foto: Žabar, R., 2012)

### 3.1.3 Priprava raztopin

- Priprava standardne raztopine za imidakloprid

Standardno raztopino imidakloprida, s katero sem nato onesnažila zemljo za poskuse, sem pripravila tako, da sem v 10 mL bučko zatehtala 1,3 mg imidakloprida in mu dolila 96-odstotni etanol do oznake.

- Priprava standardne raztopine za acetamiprid

Standardno raztopino acetamiprida sem pripravila tako, da sem v 10 mL bučko zatehtala 1,3 mg acetamiprida in mu dolila 96-odstotni etanol do oznake.

- Priprava mobilne faze

V 50 mL bučko sem nalila 15 mL acetonitrila, 525  $\mu$ L očetne kisline in dolila ultra čisto laboratorijsko vodo, z upornostjo  $> 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ .

### 3.1.4 Priprava z imidaklopridom in acetamipridom onesnažene zemlje

#### **Priprava z imidaklopridom in acetamipridom onesnažene zemlje**

Po uspešno predhodno nabrani zemlji iz Ilirske Bistrice (Kalister, 2011) in opravljeni meritvi pH-ja zemlje (pH = 7,3), sem neonesnaženo zemljo onesnažila s standardno raztopino imidakloprida s koncentracijo 0,13 mg/mL, da sem dobila koncentracijo 10 mg insekticida/kg zemlje.

Zemljo sem najprej zmlela v terilniku ter jo presejala skozi sito z večjimi režami in nato nadaljevala sejanje skozi sito z manjšimi režami.

20 g neonesnažene zemlje sem zatehtala v stekleno petrijevko s 15 cm premera in jo prelila s 1540  $\mu$ L standardne raztopine imidakloprida ter dodala etanol, da se je zemlja lažje onesnažila po celotni površini, razprostrti po stekleni petrijevki, in pustila, da je čez noč odparil ves etanol. Tako pripravljeno onesnaženo zemljo (10 g) s koncentracijo 10 mg/kg sem z enakim utežnim delom neonesnažene zemlje mešala med seboj in dobila zemljo s koncentracijo 10; 5; 2,5 in 1,25 mg/kg.

Postopek sem ponovila za acetamiprid.

#### **Priprava vzorcev za HPLC-DAD analizo**

Postopek ekstrakcije

Postopek ekstrakcije sem povzela po literaturi (Thuyet in sod., 2010). V centrifugirske tube sem zatehtala 250 in 500 mg zemlje s koncentracijo (1,25; 2,5; 5 in 10 mg/kg) v treh paralelkah in vanjo dodala 5 mL acetonitrila. Nato sem ročno stresala centrifugirske tube 10 min (glej sliko 10). Zmes sem nato postavila v ultrazvočno kopel za 20 min, jo zatem vzela ven in počakala 20 min, da se je zemlja usedla in previdno oddekantirala acetonitril. Postopek sem ponovila še dvakrat. Ekstrakte sem nato prelila v bučko in na rotavaporju odparila acetonitril. V bučko nato dodala 1 mL predhodno pripravljene mobilne faze za HPLC-DAD analizo ter raztopino prefiltrirala z uporabo injekcije preko 4  $\mu$ m filtra v vialo.

Postopek je enak za acetamiprid.

### Razgradnja imidakloprida in acetamiprida v aparatu Suntest

Obsevanje vzorcev zemlje, onesnažene z imidaklopidom in acetamipridom, sem izvajala v sevalni komori naprave Suntest (sliki 6 in 7). Naprava upodablja sončno sevanje preko senzorja SUNSENSIV™ v sevalnem območju 300–400 nm/LUX ali 300–800 nm/LUX. V aparatu je nameščena 1700 W ksenonska žarnica, ki se dodatno zračno hladi. Celotna površina, namenjena izpostavljenosti oziroma obsevanju v aparatu Suntest, obsega 1100 mm<sup>2</sup>.

Aparat Suntest je za naše vzorce simuliral svetlobo z intenziteto sončne svetlobe 750, 500 oz. 250 W/m<sup>2</sup> in dejansko temperaturo 20,25 °C, medtem ko je temperatura sevalnega telesa 45 °C. Območje valovnih dolžin svetilke, uporabljene v vseh poskusih, je bilo od 300 do 800 nm. Petrijevke z enakomerno razporejeno onesnaženo zemljo so bile dane v Suntest na obsevanje in fotorazgradnjo na sončni svetlobi v časovnih intervalih.

Poskusi, opravljeni v diplomski nalogi, so prikazani v preglednicah 5 in 6.

**Preglednica 5:** Osvetljevanje vzorcev zemlje z imidaklopidom v aparaturi Suntest pri različnih časih, intenzitetah obsevanja vzorca in masah zemlje

Masa vzorca	Čas (min)/ Intenziteta svetlobe (W/m <sup>2</sup> )	15	30	60	120
250 mg	250	x	x	x	x
	500	x	x	x	x
	750	x	x	x	x
500 mg	750	x	x	x	x

**Preglednica 6:** Osvetljevanje vzorcev zemlje z acetamipridom v aparaturi Suntest pri različnih časih, intenzitetah obsevanja vzorca in masah zemlje

Masa vzorca	Čas (min)/ Intenziteta svetlobe (W/m <sup>2</sup> )	15	30	60	120	360	900
250 mg	250	x	x	x	x		
	750	x	x	x	x	x	x

### Priprava vzorcev za Suntest

V steklene petrijevke s premerom 9 cm in višino 2 cm sem zatehtala v treh paralelkah po 250 mg predhodno onesnažene zemlje s koncentracijo 10 mg/kg imidakloprida na kg zemlje in nato še tri paralelke po 500 mg vzorca z imidaklopidom onesnažene

zemlje. V petrijevke sem zemljo nanašala počasi, čim bolj razširjeno po dnu petrijevke, da je bila lahko čim bolj optimalno osvetljena v napravi Suntest. Petrijevke sem pred postavitvijo v Suntest po površini pokrivala še obrisala z etanolom, da res ne bi prihajajo do zatemnitev, ki bi zastirale sevanje.

Po končanem obsevanju sem vzorce zemlje ekstrahirala po prej opisanem postopku, povzetem po literaturi (Thuyet in sod., 2010). Pri ekstrakciji 250 mg vzorcev zemlje z imidaklopridom sem dodajala po 3 mL acetonitrila, pri ekstrakciji 500 mg vzorcev zemlje z imidaklopridom sem dodajala po 5 mL acetonitrila. Po uparitvi po postopku na rotavaporju sem v bučko vedno dodala 1 mL predhodno pripravljene mobilne faze za HPLC-DAD in vsebino nato prefiltrirala z uporabo injekcije čez 4  $\mu$ m filter vzorec v vialo.



**Slika 10:** Ročno stresanje centrifugirske tube (Foto: Krašovec, B., 2011)

Enak postopek sem uporabila tudi za acetamiprid.

### 3.1.5 Analiziranje vzorcev

Vzorci zemlje, onesnažene z imidaklopridom oziroma acetamipridom, sem najprej analizirala na HPLC-DAD instrumentu, kjer sem dobila podatke za umeritveno krivuljo imidakloprida in acetamiprida s koncentracijami 1,25; 2,5; 5 in 10 mg/kg v zemlji. Nato sem analizirala vsakič po tri paralelke obsevanih vzorcev imidakloprida v Suntestu (glej razpredelnico 5 in 6).

Iz podatkov o površini kromatografskega vrha, izmerjenega na HPLC-DAD iz obsevanih vzorcev, sem nato izračunala koncentracijo nerazgrajenih insekticidov v danem času obsevanja.

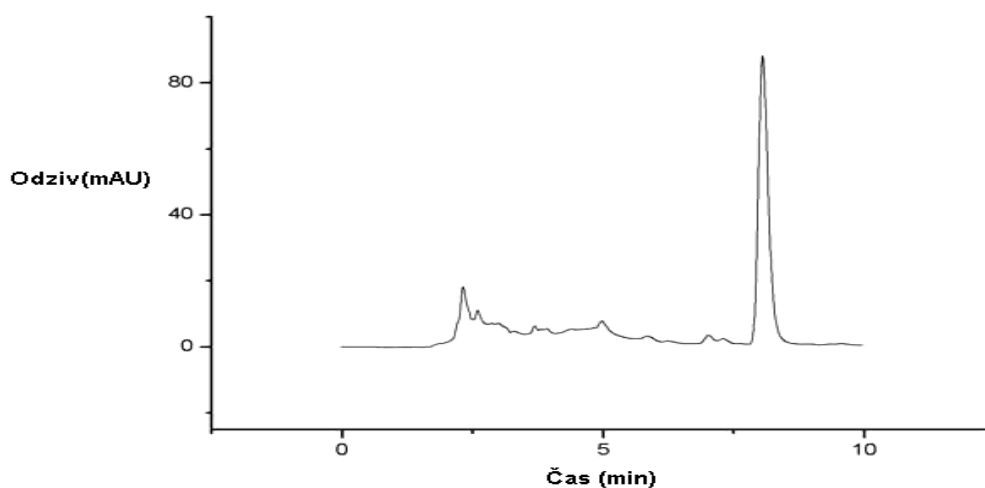
### 3.1.6 Priprava vzorcev za LC-MS analizo

Iz vzorcev, ki sem jih obsevala v aparaturi Suntest sem dodatno pregledala vzorce z imidaklopridom onesnažene zemlje in vzorce z acetamipridom onesnažene zemlje, katerih razgradni produkti so bili na kromatogramu najbolj vidni po analizi s HPLC-DAD. Izmed njih sem za vzorec, poslan na LC-MS, izbrala vzorec umetno onesnažene zemlje z imidaklopridom z maso 250 mg, obsevan z intenziteto svetlobe  $750 \text{ W/m}^2$  za 60 minut, in vzorec z acetamipridom umetno onesnažene zemlje, obsevan z intenziteto svetlobe  $750 \text{ W/m}^2$  za 360 min. Vzorca sem nato še enkrat ekstrahirala v digestoriju, jima dodala acetonitril, na koncu jima dodala mobilno fazo in ju pripravila vsakega v svojo mini vialo (1 mL).

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 Določevanje imidakloprida v 250 mg in 500 mg vzorca z imidaklopridom onesnažene zemlje

Pesticid imidakloprid se eluira iz kolone pod izbranimi pogoji, navedenimi v podpoglavju 3.1., z retencijskim časom 8,02 min pri maksimalni absorpciji 270 nm. Na sliki 11 je prikazan kromatogram ekstrakta imidakloprida iz zemlje, posnet na HPLC-DAD.

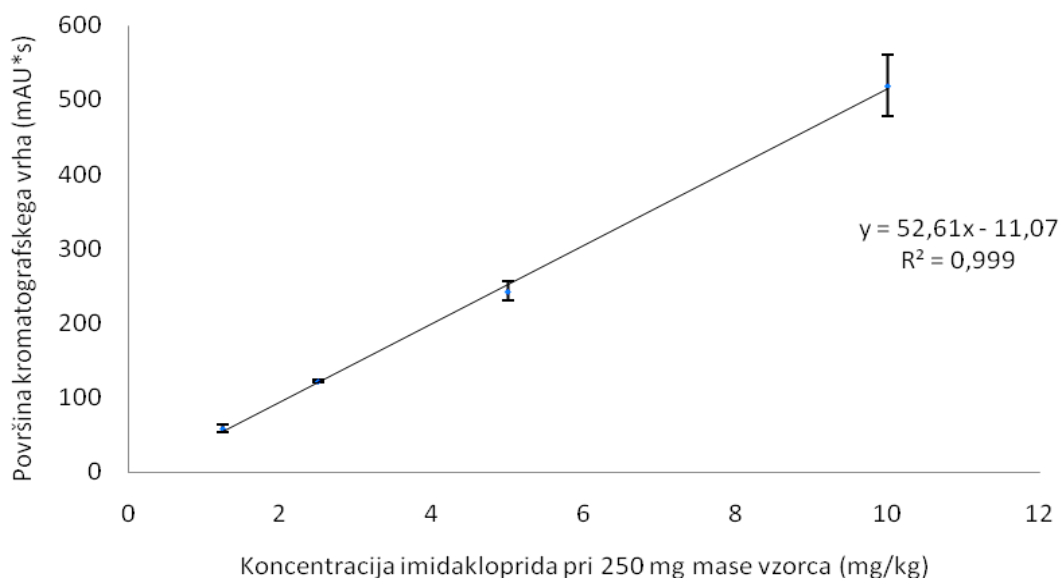


**Slika 11:** Kromatogram ekstrakta imidakloprida v zemlji (DAD detektor pri valovni dolžini 270 nm)

V diplomski nalogi sem stremela k temu, da bi dobila čim bolj optimalne rezultate za fotorazgradnjo imidakloprida v zemlji. Iz predhodnih rezultatov Kristine Kalister, ki je v svojem diplomskem delu (Kalister, 2011) skušala določiti najnižjo (100 mg) in najvišjo (5 g) še sprejemljivo maso za obsevanje vzorca, sem povzela, da naj bi bila optimalna masa vzorca nekje med 250 in 500 mg. Glede na njene rezultate in sklepanja sem tako v diplomski nalogi posvetila čas obsevanju vzorcev z maso 250 in 500 mg. Te sem obsevala v določenih časovnih intervalih z intenzitetami svetlobe 250, 500 in 750 W/m<sup>2</sup> za vzorce z maso 250 mg ter z intenziteto 750 W/m<sup>2</sup> za vzorec z maso 500 mg ter jih nato analizirala s HPLC-DAD. Delo je potekalo, kot je zapisano v poglavju Uporabljeni materiali in metode. Meritve sem izvedla v treh paralelkah za vsak vzorec.

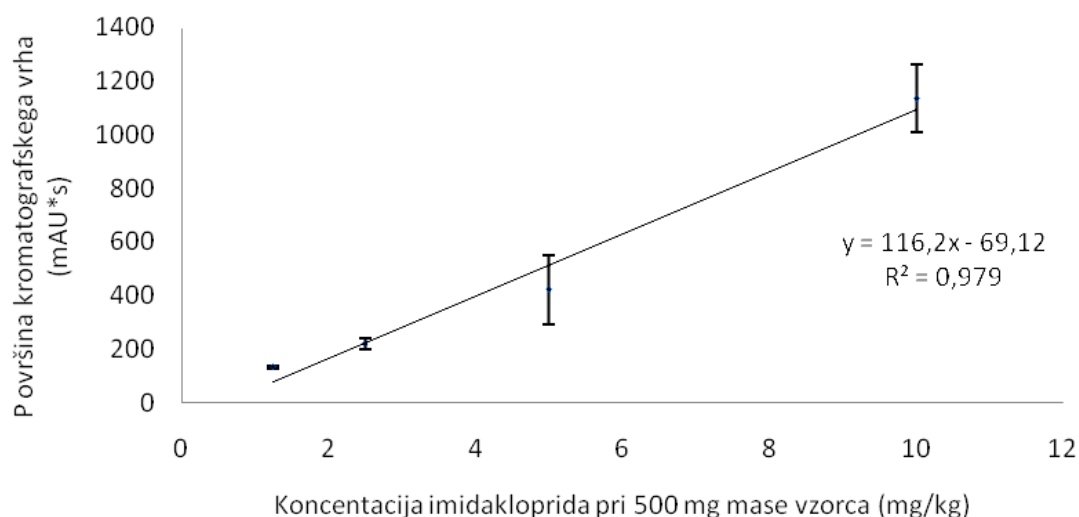
Najprej sem naredila umeritveni krivulji za imidaklopid v onesnaženi zemlji z koncentracijami 1,25; 2,5; 5 in 10 mg imidakloprida/kg zemlje z maso vzorca onesnažene zemlje 250 in 500 mg.

Na sliki 12 je prikazana umeritvena krivulja za imidaklopid, pri čemer smo za analizo uporabili 250 mg vzorca onesnažene zemlje.



**Slika 12:** Umeritvena krivulja imidakloprida v 250 mg vzorcu onesnažene zemlje z imidaklopidom v koncentracijskem območju od 1,25 do 10 mg imidakloprida/kg zemlje

Umeritveno krivuljo sem izdelala tudi za koncentracije imidakloprida v 500 mg vzorca zemlje, umetno onesnažene z imidaklopidom. Prikazana je na sliki 13.

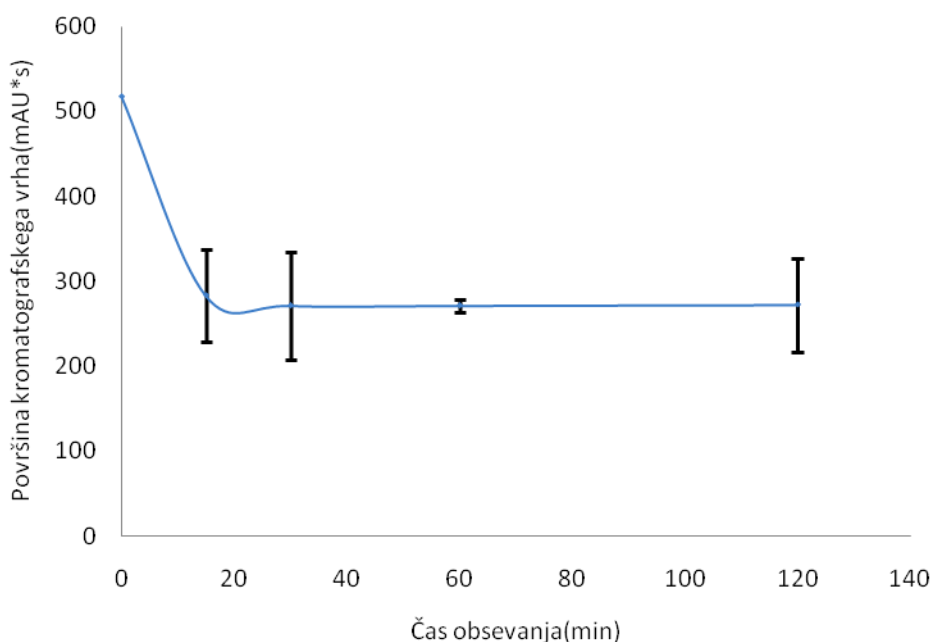


**Slika 13:** Umeritvena krivulja imidakloprida v 500 mg vzorcu onesnažene zemlje z imidaklopidom v koncentracijskem območju od 1,25 do 10 mg imidakloprida/kg zemlje

#### 4.1.1 Fotorazgradnja imidakloprida v zemlji z maso 250 mg pri obsevanju z intenziteto svetlobe 250, 500 in 750 W/m<sup>2</sup> in v zemlji z maso 500 mg pri obsevanju z intenziteto svetlobe 750 W/m<sup>2</sup>

Po izdelavi umeritvenih krivulj sem pričela z obsevanjem vzorcev zemlje, onesnažene s koncentracijo 10 mg imidakloprida/kg zemlje. Iz predhodno opravljenih poskusov razgradnje imidakloprida v Suntestu (Kalister, 2011) ter na osnovi umeritvenih krivulj, ki sem jih izdelala, sem obsevala vzorce z maso 250 in 500 mg. Vzorce zemlje sem natančno zatehtala in pretresla v petrijevke (opisano v poglavju Priprava vzorcev za Suntest). Po postopkih obsevanja, ekstrahiranja, odparevanja in analize s HPLC-DAD detektorjem sem dobila rezultate, ki so izraženi kot površine kromatografskih vrhov. Koncentracije preostalega nerazgrajenega pesticida sem odčitala iz umeritvenih krivulj. Iz dobljenih rezultatov, prikazanih na slikah 14, 15, 16, je razvidno, da se imidaklopid lažje razgrajuje v tanjših plasteh zemlje.

Na sliki 14 je prikazan razpad imidakloprida v 250 mg zemlje pri obsevanju s svetlobo z intenziteto 750 W/m<sup>2</sup>. Glede na to, da je pri 15 min razgradnja imidakloprida v prsti že 46-odstotna, po obdobju 120 min pa doseže 50-odstotno razgradnjo, lahko sklepamo, da je razpolovna doba za imidaklopid nekje med 15 in 30 min.

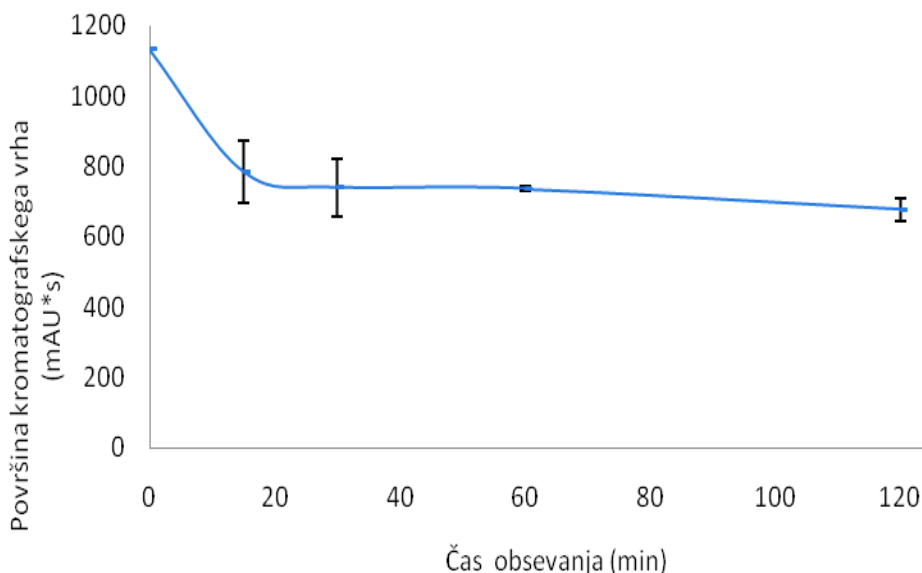


**Slika 14:** Krivulja razpada imidakloprida po osvetljevanju vzorca zemlje, onesnaženega z imidaklopidom, z maso 250 mg pri intenziteti svetlobe 750 W/m<sup>2</sup>

Za vzorce zemlje z maso 500 mg in isto intenziteto svetlobe (750 W/m<sup>2</sup>) je razvidno (slika 15), da imidaklopid zaradi debelejšje plasti zemlje, ki v globino očitno ni mogla biti dovolj osvetljena, ni razpadel v takšnem deležu kot v primeru obsevanja vzorca z maso 250 mg in je njegov delež po 120 minutah obsevanja še dokaj visok. V zemlji ga

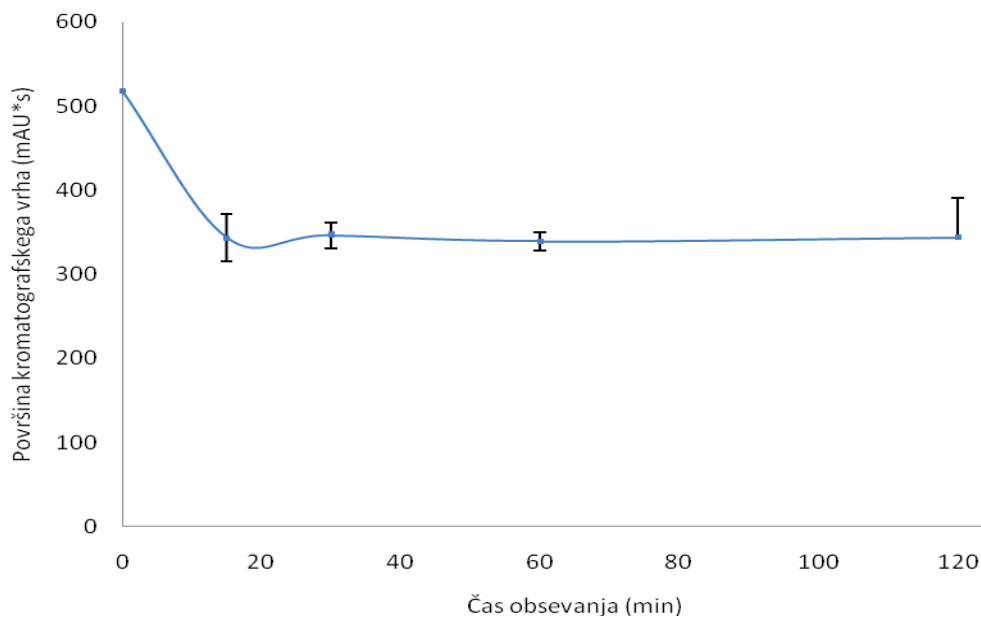


je po obsevanju še vedno več kot 70 %. Dobljeni rezultati tako v povezavi z debelino plasti zemlje utemeljujejo to, da fotorazgradnja poteka bolj intenzivno le v zgornjih plasteh zemlje oz. na njeni površini. Zato smo se odločili, da poskusov z maso vzorca 500 mg in manjšimi intenzitetami opustimo.



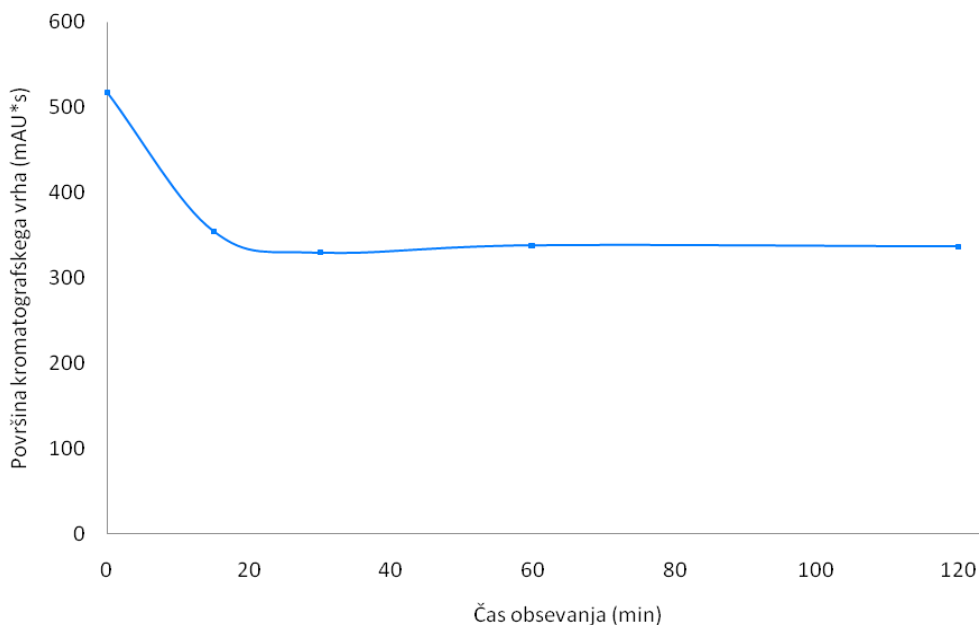
**Slika 15:** Krivulja razpada imidakloprida po osvetljevanju vzorca zemlje, onesnaženega z imidaklopridom, z maso 500 mg pri intenziteti svetlobe  $750 \text{ W/m}^2$

Na sliki 16 je prikazana krivulja razpada imidakloprida pri obsevanju vzorcev z maso 250 mg v Suntestu z intenziteto obsevanja  $500 \text{ W/m}^2$ . Vidimo, da je zaradi nižje intenzitete obsevanja vzorca prišlo do počasnejšega razpadanja imidakloprida v zemlji, torej je razpolovni čas daljši. Po 120 minutah obsevanja je razgradnja le 34-odstotna. V 250 mg vzorca zemlje, umetno onesnažene z imidaklopridom, pri intenziteti obsevanja z  $250 \text{ W/m}^2$  je fotorazgradnja imidakloprida sicer nižja kot pri obsevanju vzorca z intenziteto svetlobe  $500 \text{ W/m}^2$  in bistveno nižja kot pri obsevanju z intenziteto svetlobe  $750 \text{ W/m}^2$ . Iz tega sklepamo, da poleg mase zemlje tudi intenziteta svetlobe vpliva na hitrejšo fotorazgradnjo imidakloprida v zemlji.



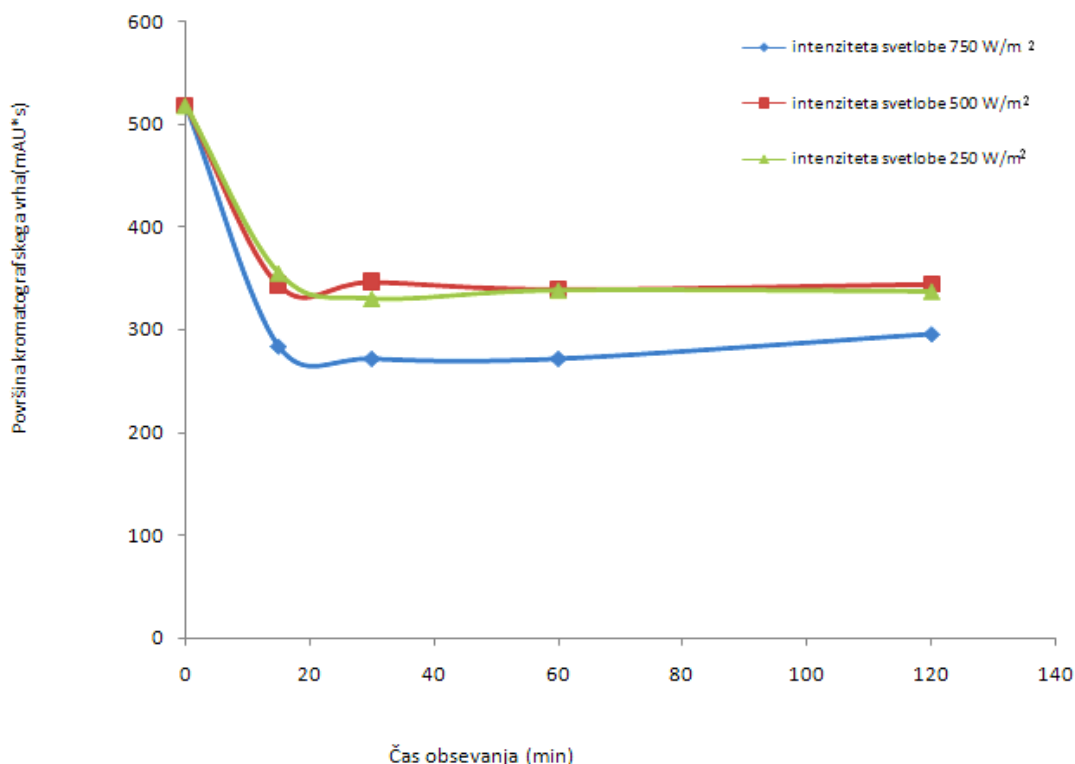
**Slika 16:** Krivulja razpada imidakloprida po osvetljevanju zemlje, onesnažene z imidaklopridom, z maso 250 mg pri intenziteti svetlobe  $500 \text{ W/m}^2$

Na sliki 17 vidimo krivuljo razpada imidakloprida po obsevanju vzorcev z maso 250 mg v Suntestu z intenziteto obsevanja  $250 \text{ W/m}^2$ . Vidimo, da je zaradi nižje intenzitete obsevanja vzorca prišlo do počasnejšega razpadanja imidakloprida v zemlji, torej je razpolovni čas daljši, in po 120 minutah obsevanja je razgradnja le 37-odstotna, imidakloprid pa se z nadaljnjim obsevanjem ne razgrajuje več.



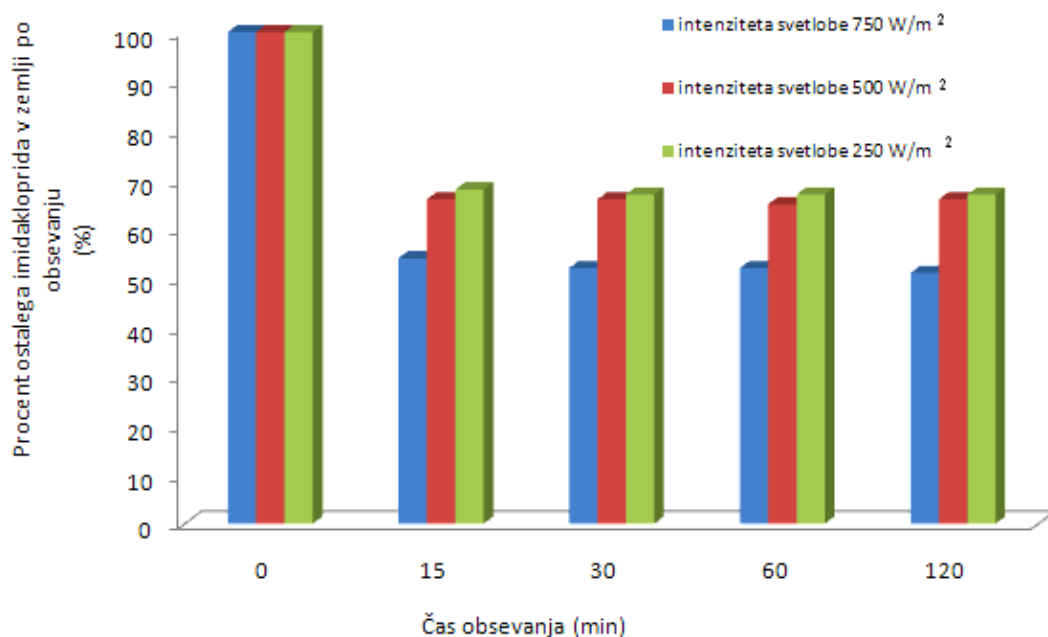
**Slika 17:** Krivulja razpada imidakloprida po osvetljevanju zemlje z maso 250 mg pri intenziteti svetlobe  $250 \text{ W/m}^2$

Glede na že prej omenjeno razlago razpada imidakloprida v zemlji pod vplivom sončne svetlobe sem na sliki 18 prikazala primerjavo razpada imidakloprida v zemlji z maso 250 mg pri različnih intenzitetah osvetljevanja ( $250 \text{ W/m}^2$ ,  $500 \text{ W/m}^2$  in  $750 \text{ W/m}^2$ ). S slike je razvidno, da intenziteta svetlobe v določeni meri pogojuje hitrost procesa razgradnje imidakloprida v zemlji.



**Slika 18:** Meritve imidakloprida po osvetljevanju z imidaklopridom onesnažene zemlje z maso 250 mg pri intenziteti obsevanja 750, 500 in 250  $\text{W/m}^2$

Na sliki 19 so prikazani deleži ostanka imidakloprida ob časovnih intervalih obsevanja v zemlji. Upoštevane so povprečne vrednosti meritev v treh paralelkah. Glede na iz poskusov dobljene podatke vidimo, da je prisotnost imidakloprida pri času 120 minut pri intenziteti osvetljenosti  $750 \text{ W/m}^2$  le še 50-odstotna, medtem ko je ostanek imidakloprida po 120 minutah pri nižjih intenzitetah osvetljenosti 66-odstoten in 68-odstoten. Iz dobljenih podatkov lahko sklepamo, da je razpolovni čas imidakloprida pri uporabljeni intenziteti osvetljevanja  $750 \text{ W/m}^2$  v Suntestu med 15 in 30 minutami.

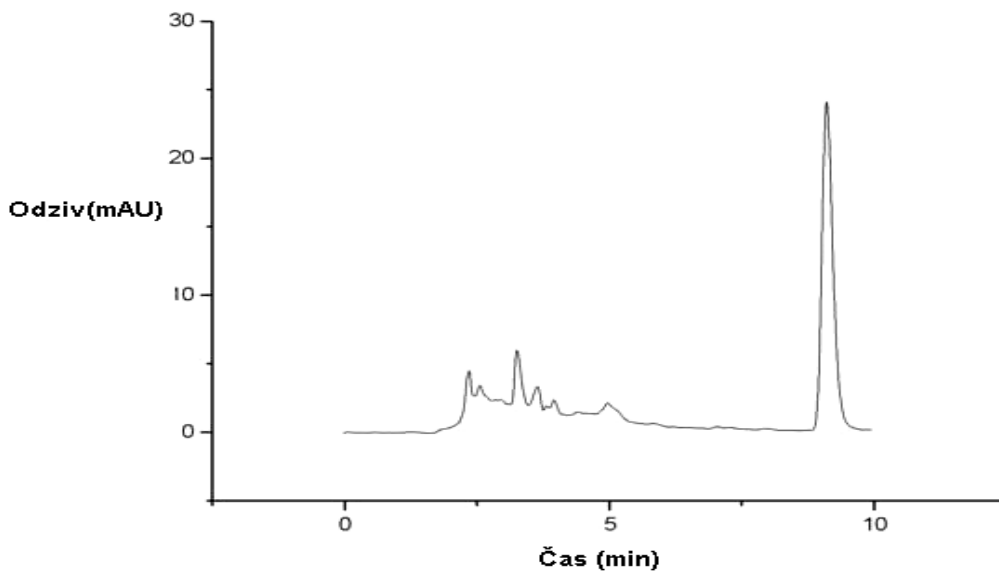


**Slika 19:** Delež ostanka imidakloprida v zemlji, onesnaženi z imidaklopridom, z maso 250 mg po obsevanju s Suntestom pri različnih intenzitetah obsevanja pri časih 0 min, 15 min, 30 min, 60 min, 120 min

#### 4.2 Določanje acetamiprida v 250 mg vzorca z acetamipridom onesnažene zemlje

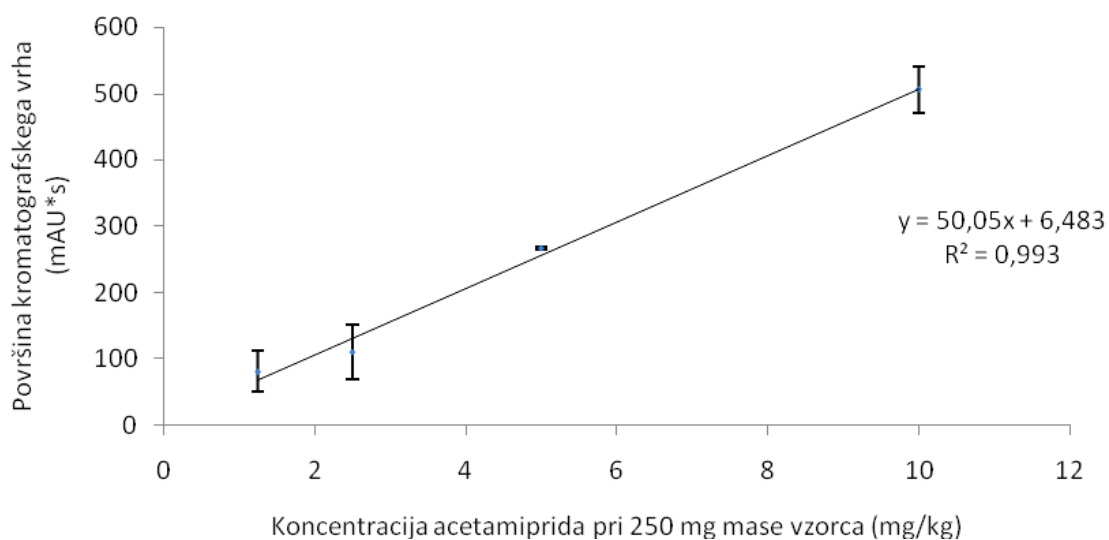
Za razumevanje fotorazgradnje acetamiprida v zemlji sem najprej naredila umeritveno krivuljo za acetamiprid v umetno onesnaženi zemlji za koncentracije 1,25; 2,5; 5 in 10 mg/kg. Iz tega sem nadalje sklepala na ostanek acetamiprida v zemlji po obsevanju v aparaturi Suntest. Postopek priprave vzorcev je potekal po postopku, opisanem v poglavju Uporabljeni materiali in metode.

Pesticid acetamiprid se eluira iz kolone pod izbranimi pogoji, navedenimi v podpoglavju 3.1, z retencijskim časom 9,1 min pri maksimalni absorpciji 250 nm. Na sliki 20 je prikazan kromatogram ekstrakta acetamiprida iz zemlje, posnet na HPLC-DAD.



**Slika 20:** Kromatogram ekstrakta acetamiprida v zemlji (DAD detektor pri valovni dolžini 245 nm)

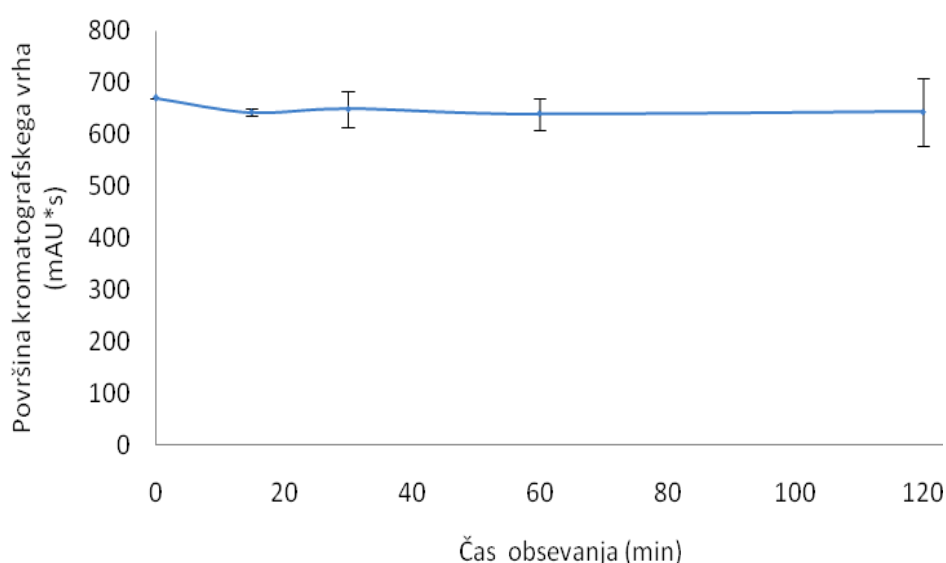
Na sliki 21 je prikazana umeritvena krivulja za vsebnost acetamiprida v 250 mg umetno onesnažene zemlje s koncentracijami 1,25; 2,5; 5 in 10 mg acetamiprida/kg zemlje z maso vzorca 250 mg.



**Slika 21:** Umeritvena krivulja acetamiprida v 250 mg vzorcu z acetamipridom onesnažene zemlje pri koncentracijah 10; 5; 2,5 in 1,25 mg acetamiprida/kg zemlje

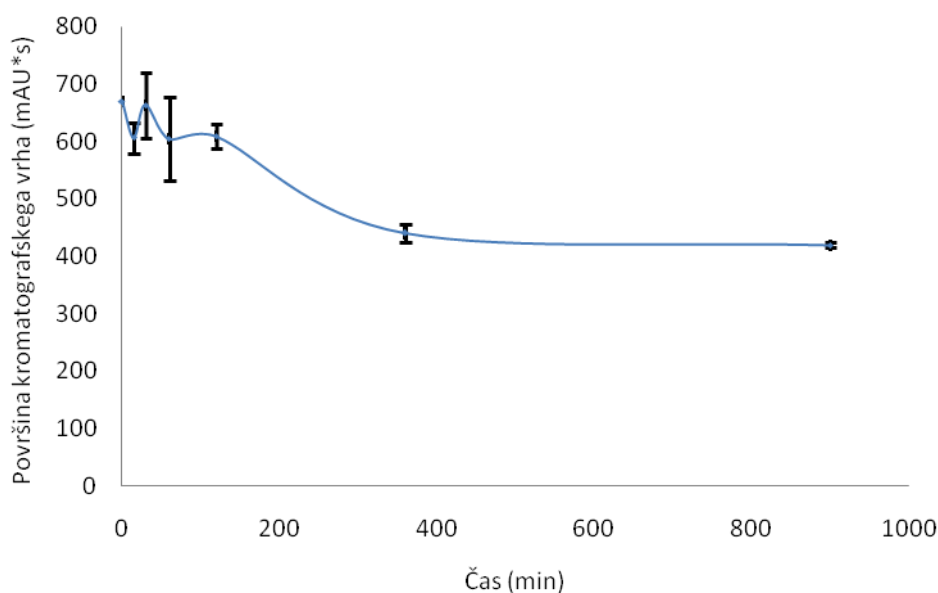
#### 4.2.1. Fotorazgradnja acetamiprida v zemlji z maso 250 mg s koncentracijo 10 mg acetamiprida/kg zemlje pri obsevanju z intenziteto svetlobe 250 in 750 W/m<sup>2</sup>

Pri fotorazgradnji acetamiprida (slika 22) v 250 mg vzorca z acetamipridom umetno onesnažene zemlje pri intenziteti obsevanja 250 W/m<sup>2</sup> pri časih obsevanja 15, 30, 60 in 120 min vidimo, da je fotorazgradnja bistveno počasnejša oziroma skoraj ne poteče, kot pri enaki količini vzorca umetno onesnažene zemlje z imidaklopridom pri isti intenziteti obsevanja v aparatu Suntest. To kaže, da acetamiprid v zemlji počasneje razpada, oz. bi bila za hitrejšo fotorazgradnjo acetamiprida v zemlji potrebna višja intenziteta svetlobe in daljši obsevalni čas.



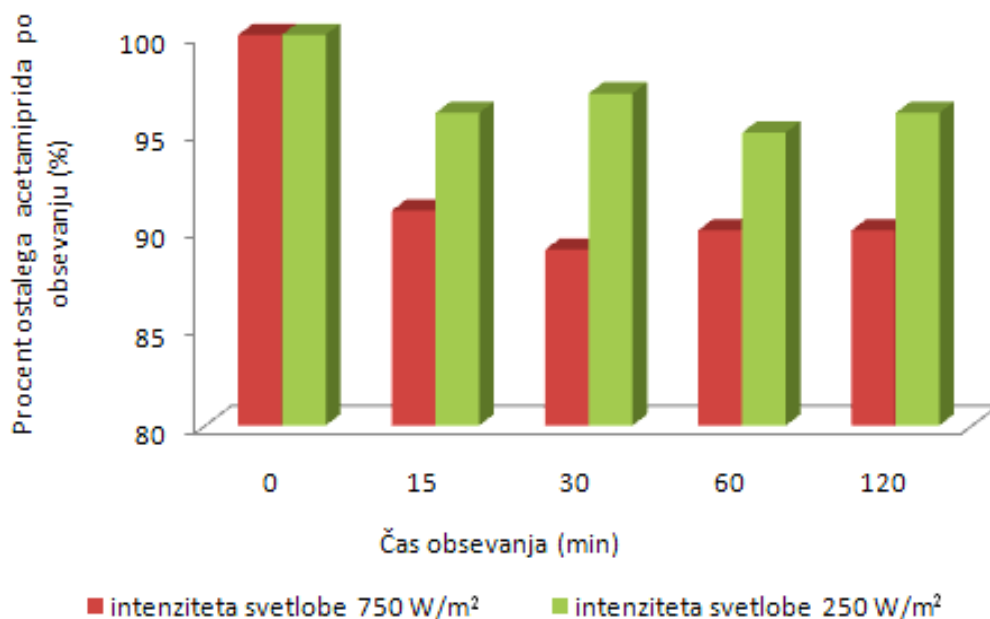
**Slika 22:** Krivulja razpada acetamiprida po obsevanju vzorca 250 mg z acetamipridom onesnažene zemlje z intenziteto svetlobe 250 W/m<sup>2</sup>

Zaradi prejšnjega poskusa sem sedaj uporabila višjo intenziteto svetlobe obsevanja v aparaturi Suntest in daljše čase obsevanja 15, 30, 60, 120, 360 in 900 min. Slika 23 tako nam prikazuje fotorazgradnjo acetamiprida v 250 mg umetno onesnažene zemlje pod vplivom svetlobe z intenziteto 750 W/m<sup>2</sup> v aparatu Suntest. Vidimo, da fotorazgradnja poteče, kar kaže na to da acetamiprid v zemlji razpada po daljšem času in višjih intenzitetah svetlobe, kot imidakloprid. Iz slike 23 je razvidno, da po času 360 min razpade 35 % acetamiprida, po času 900 min pa 39 %;



**Slika 23:** Krivulja razpada acetamiprida po obsevanju vzorca 250 mg z acetamipridom onesnažene zemlje z intenziteto svetlobe  $750 \text{ W/m}^2$

Na sliki 24 vidimo prikaz razpada acetamiprida v masi vzorca zemlje 250 mg pod vplivom sončne svetlobe pri obsevanju z intenziteto  $750 \text{ W/m}^2$  in  $250 \text{ W/m}^2$ . Upoštevane so povprečne vrednosti meritev v treh paralelkah. Z izvedbo poskusov fotorazgradnje z uporabo svetlobe različne intenzitete sem dokazala, da je fotorazgradnja acetamiprida odvisna od intenzitete svetlobe, s katero obsevamo vzorec, optimalna masa vzorca pa je, kot že dokazano pri imidaklopridu, 250 mg. Iz tega sledi, da je fotorazgradnja acetamiprida v vzorcu umetno onesnažene zemlje pri višji intenziteti svetlobe, v našem primeru pri  $750 \text{ W/m}^2$  in času 120 min, 10-odstotna, pri intenziteti svetlobe  $250 \text{ W/m}^2$  pri času 120 min pa težko govorimo o sploh kakršnikoli razgradni, saj ta znaša 4 %, pri čemer je potrebno poudariti, da je sipanje rezultatov izredno veliko.

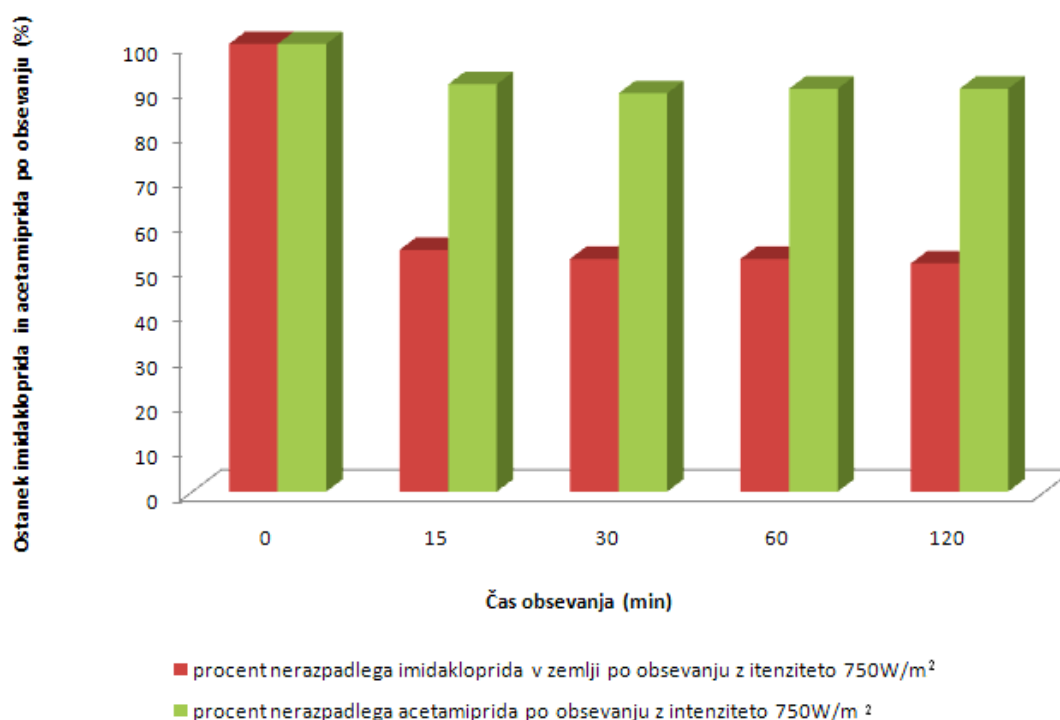


**Slika 24:** Delež ostanka acetamiprida v zemlji, onesnaženi z acetamipridom, po obsevanju z intenziteto svetlobe 750 W/m<sup>2</sup> in 250 W/m<sup>2</sup> pri časih 0 min, 15 min, 30 min, 60 min in 120 min

### 4.3 Primerjava fotorazgradnje imidakloprida in acetamiprida v zemlji

Primerjava fotorazgradnje imidakloprida in acetamiprida v umetno onesnaženih vzorcih zemlje v času 0, 15, 30, 60 in 120 min pri intenziteti svetlobe 750 W/m<sup>2</sup> v aparaturi Suntest je podrobno prikazana na spodnjem diagramu (slika 25). Glede na dobljene rezultate sklepam, da je fotorazgradnja imidakloprida v zemlji hitrejša, saj je glede na končni čas merjenja 120 min razgrajenega že 50 % imidakloprida, v primeru acetamiprida pa je pri času 120 min razgrajenega le 10 % acetamiprida v umetno onesnaženi zemlji. Upoštevane so povprečne vrednosti meritev v treh paralelkah.





**Slika 25:** Primerjava fotorazgradnje imidakloprida in acetamiprida (v procentih) v 250 mg vzorca zemlje pri obsevanju z intenziteto svetlobe 750 W/m<sup>2</sup> po času 15, 30, 60 in 120 min

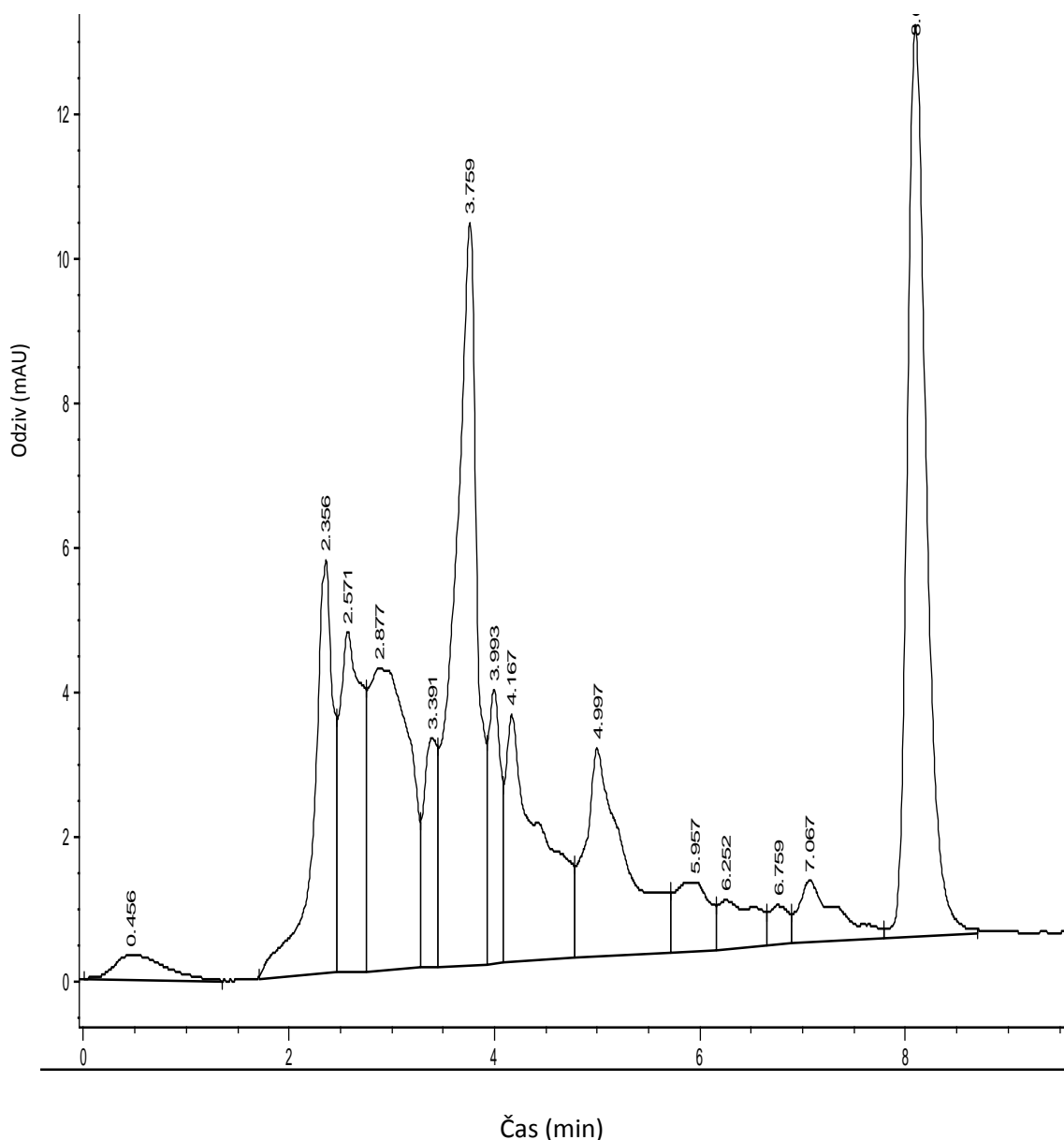
#### 4.4 Določevanje razgradnih produktov imidakloprida in acetamiprida po obsevanju v zemlji z LC-MS metodo

Na osnovi kromatogramov imidakloprida in acetamiprida v zemlji po obsevanju na aparaturi Suntest, posnetih na HPLC-DAD, sem izbrala tiste vzorce, pri katerih so bili signali še neznanih produktov najvišji. Izbrala sem vzorec z imidaklopridom umetno onesnažene zemlje z maso 250 mg, obsevan z intenziteto svetlobe 750W/m<sup>2</sup> 60 minut, in vzorec z acetamipridom umetno onesnažene zemlje, obsevan z intenziteto svetlobe 750W/m<sup>2</sup> 360 min. Te vzorce smo nato z uporabo LC-MS instrumenta analizirali in poskušali določiti razgradne produkte imidakloprida in acetamiprida. Za identifikacijo produktov imidakloprida sem si pomagala z masnimi spektri, posnetimi v predhodnih raziskavah (Žabar in sod., 2012), za identifikacijo produktov acetamiprida pa sem si pomagala z literaturnimi navedbami (Guohong in sod., 2009) in diplomsko nalogo Mojce Rotar (Rotar, 2011).

##### 4.4.1 Določevanje razgradnih produktov imidakloprida po obsevanju v zemlji z LC-MS

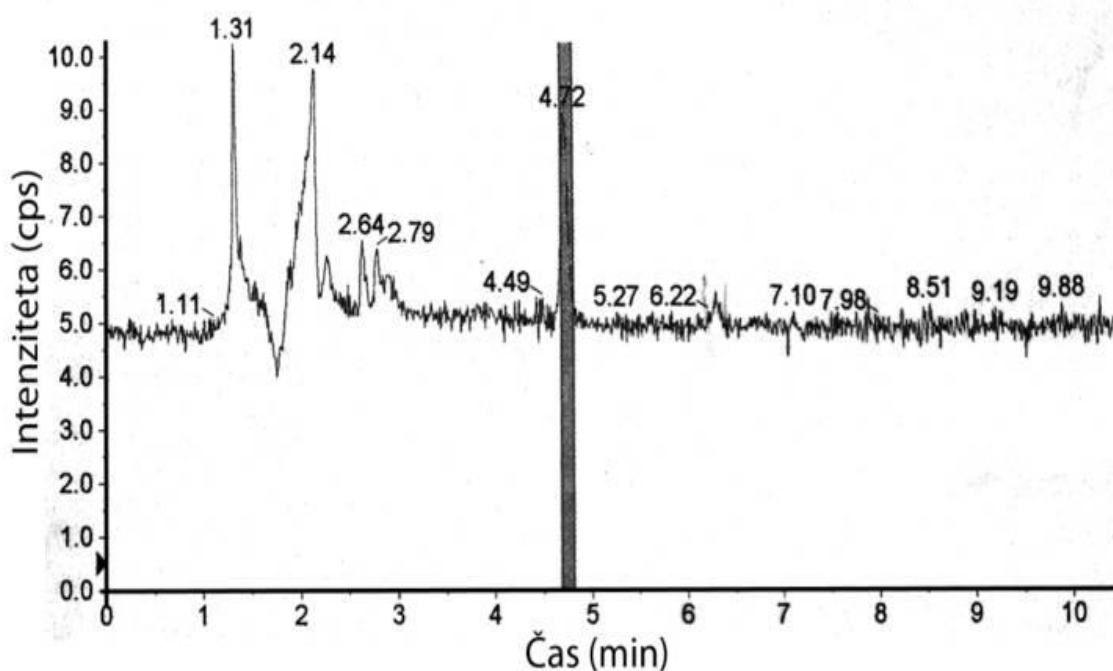
Najprej sem posnela vzorec imidakloprida z maso 250 mg, obsevan 60 min z intenziteto svetlobe 750 W/m<sup>2</sup> (slika 26), posnet na našem HPLC instrumentu. V

nadaljevanju so prikazani kromatogrami in masni spektri, posneti na LC-MS instrumentu. Čeprav smo za analizo uporabili kromatografske pogoje našega instrumenta, je prišlo zaradi drugačne konfiguracije instrumenta do razlik v retencijskih časih obeh kromatogramov.

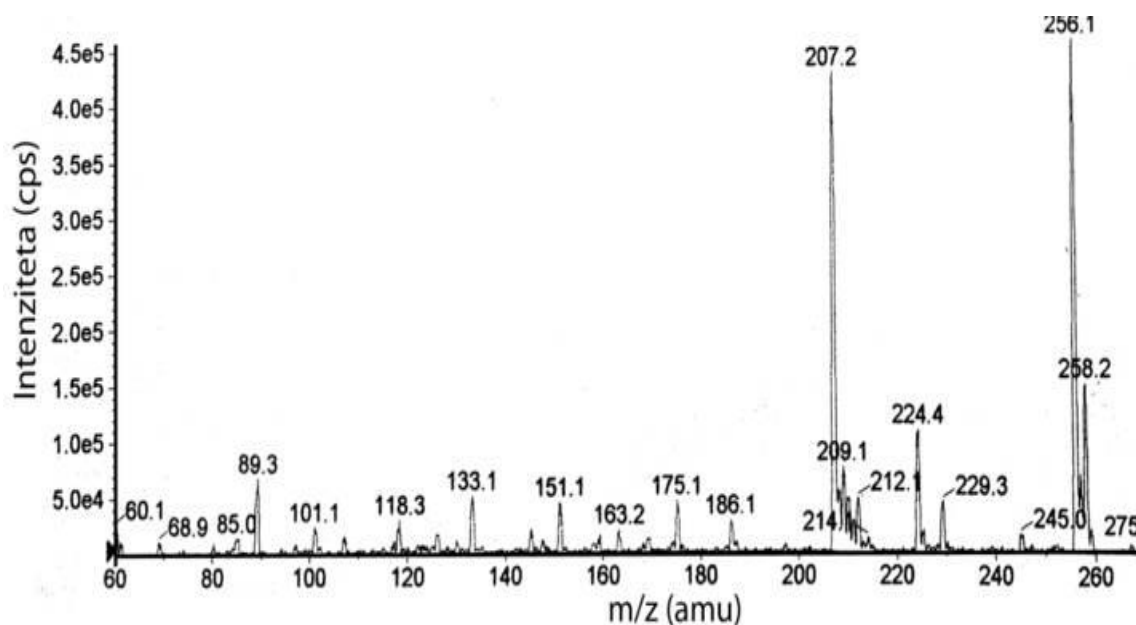


**Slika 26:** Kromatogram vzorca zemlje, umetno onesnažene z imidaklopridom, z maso 250 mg, obsevanega 60 min pri intenziteti svetlobe  $750 \text{ W/m}^2$ , posnet na HPLC

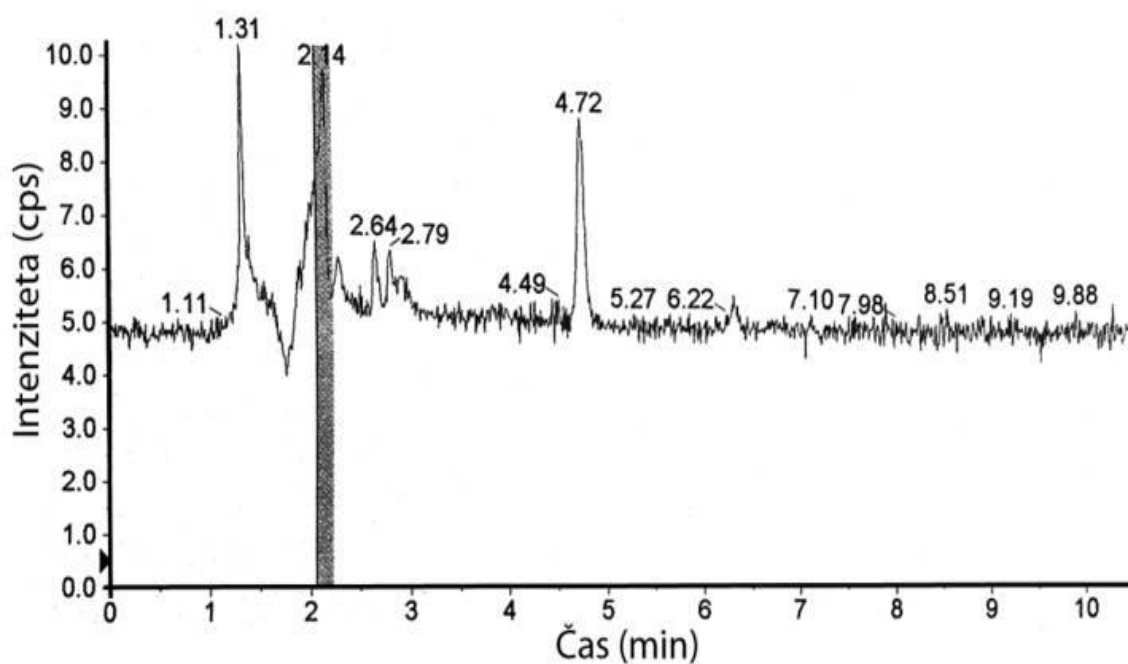
Na slikah 27, 29 in 31 so prikazani kromatogrami z označenimi kromatografskimi vrhovi neznanih produktov pri času 4,72; 2,14 ter 1,31 min, na slikah 28, 30 ter 32 pa njihovi masni spektri.



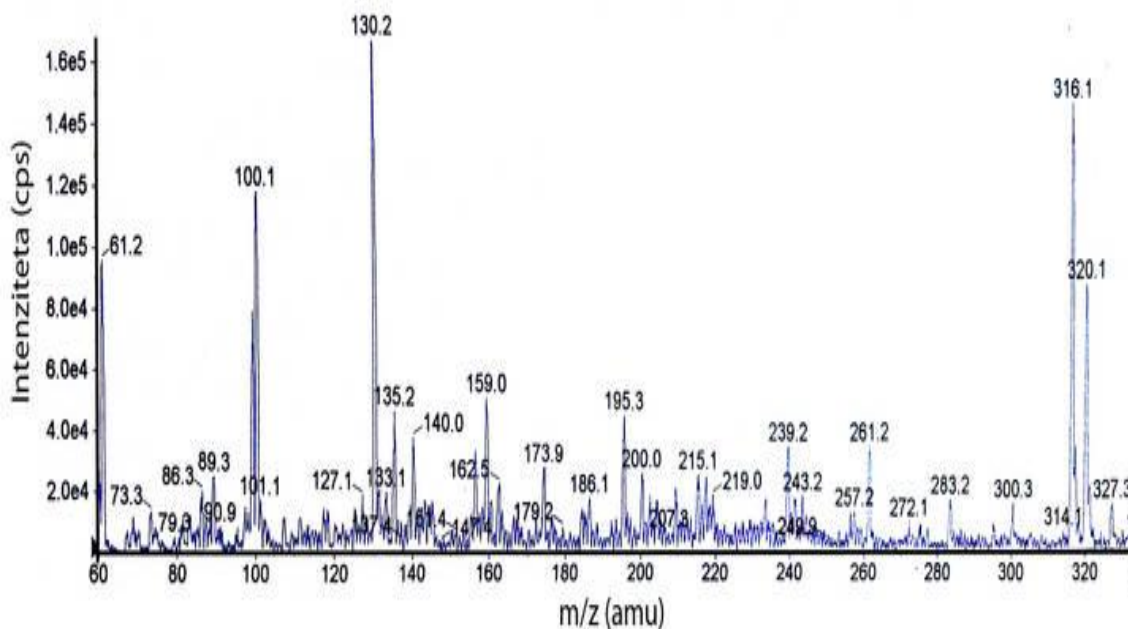
**Slika 27:** Kromatogram ekstrakta vzorca zemlje (250 mg), obsevanega 60 min pri intenziteti svetlobe  $750 \text{ W/m}^2$ , z vrhom produkta, eluiranega pri času 4,72 min, posnet na LC-MS



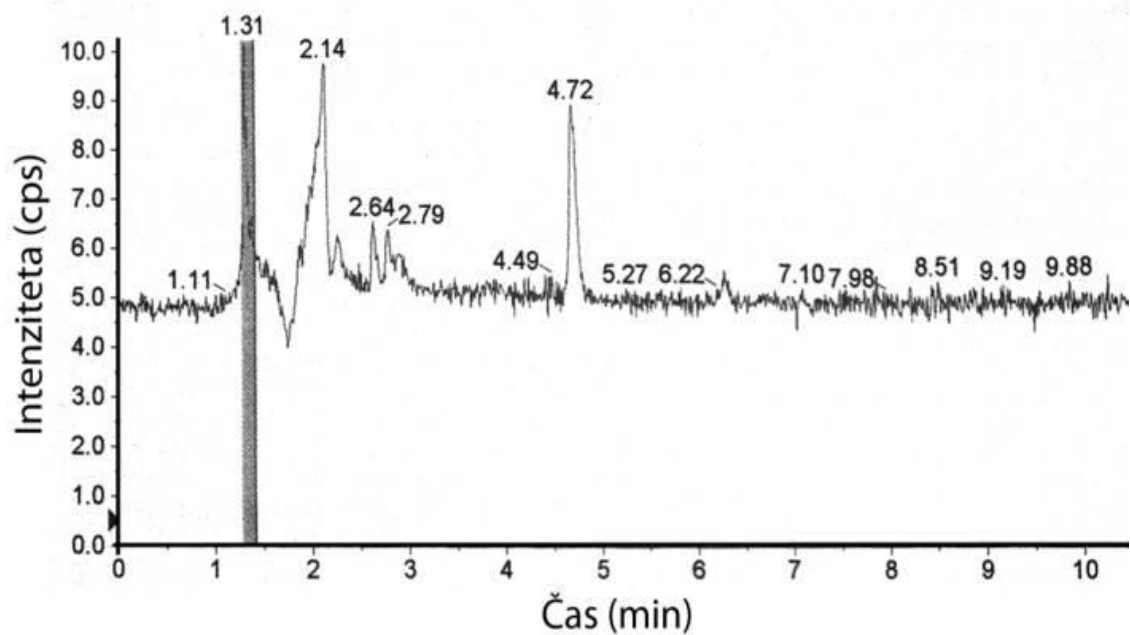
**Slika 28:** Masni spekter neznanega produkta, eluiranega pri času 4,72 min, posnet na LC-MS



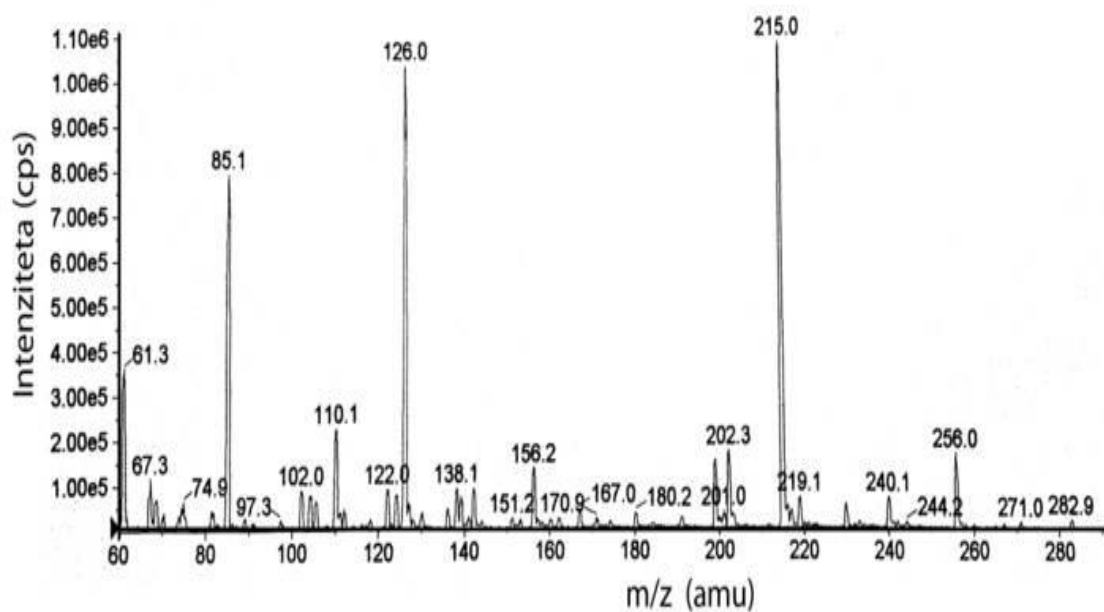
**Slika 29:** Kromatogram ekstrakta vzorca zemlje (250 mg), obsevanega 60 min pri intenziteti svetlobe  $750 \text{ W/m}^2$ , z vrhom produkta, eluiranega pri času 2,14 min, posnet na LC-MS



**Slika 30:** Masni spekter neznanega produkta, eluiranega pri 2,14 min, posnet na LC-MS



**Slika 31:** Kromatogram ekstrakta vzorca zemlje (250 mg), obsevanega 60 min pri intenziteti svetlobe  $750 \text{ W/m}^2$ , z vrhom produkta, eluiranega pri času 1,31 min, posnet na LC-MS

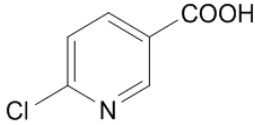
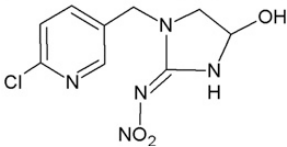
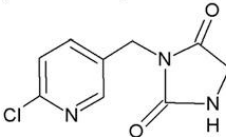
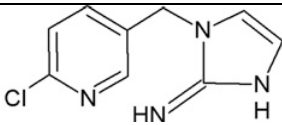


**Slika 32:** Masni spekter neznanega produkta, eluiranega pri 1,31 min, posnet na LC-MS

V preglednici 7 so zbrane strukture razgradnih produktov imidakloprida ter njihovi masni piki, ki so bili identificirani v raziskavi Žabarja in sodelavcev (2012), kjer je

potekala fotorazgradnja v vodi, ter v raziskavi Wamhofa in Schneiderja (1999), kjer je potekala fotorazgradnja imidakloprida v zemlji.

**Preglednica 7: Razgradni produkti imidakloprida v vodi (Wamhof in Schneider, 1999)**

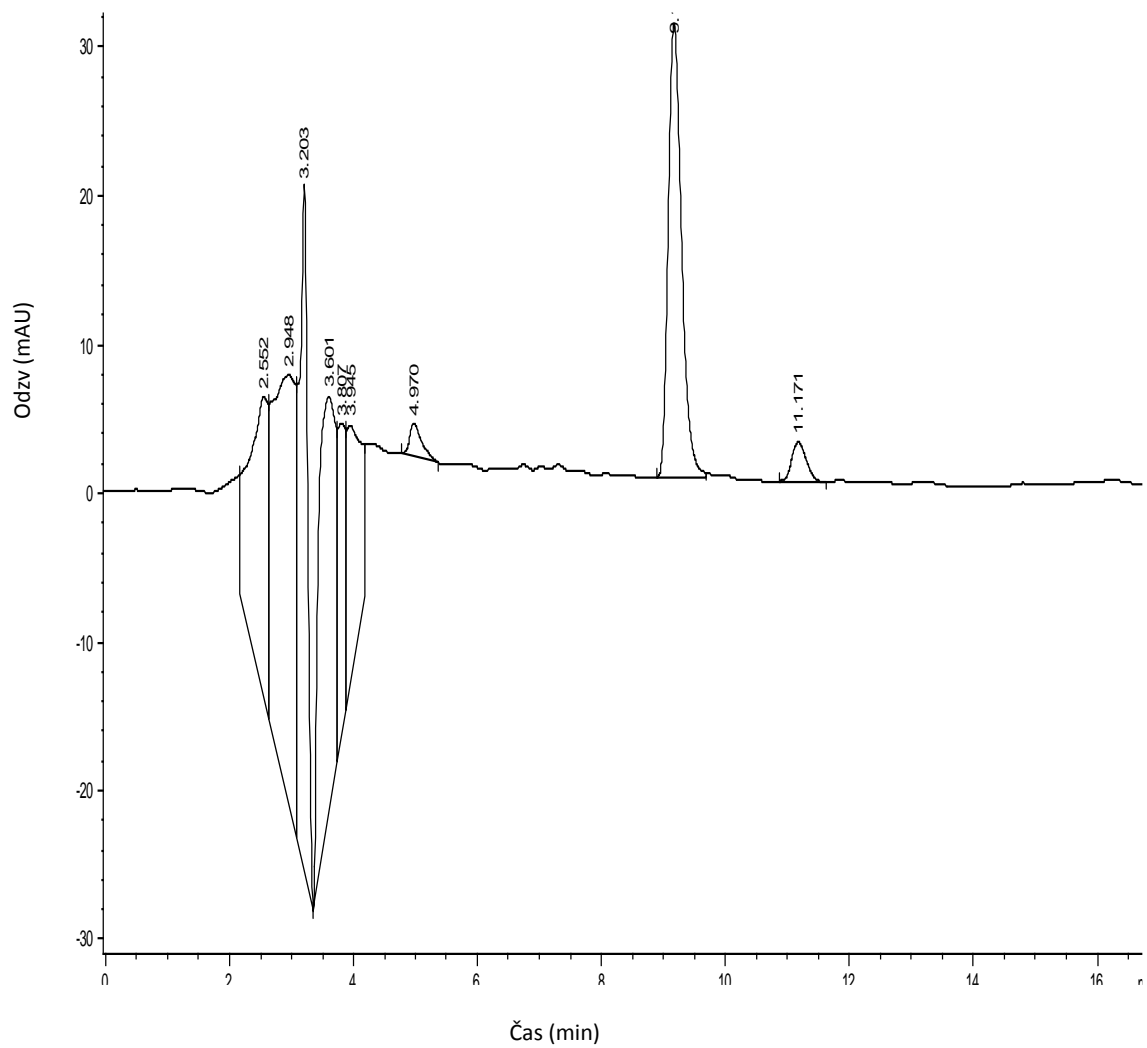
Spojine razpadnih produktov	Strukturna formula	Masni fragment (m/z)
6-kloronikotinska kislina		158
imidakloprid, hidroksi		272
imidakloprid sečnina		226
imidakloprid, desnitro olefin		209

Žal posneti masni spektri mojih vzorcev niso niti v retencijskih časih niti v masnih spektrih ustrezali razgradnim produktom, ki so bili že predhodno identificirani v omenjenih objavah. Vzrok za nedoločljivost je bil verjetno v matriksu vzorca, kajti v omenjeni objavi so produkte identificirali v vodnih vzorcih. Vzorec zemlje je bistveno bolj kompleksen, prav tako je ekstrakcija iz zemlje bolj kompleksen proces, zato predvidevam, da so lahko nekateri produkti ostali vezani na komponente zemlje.

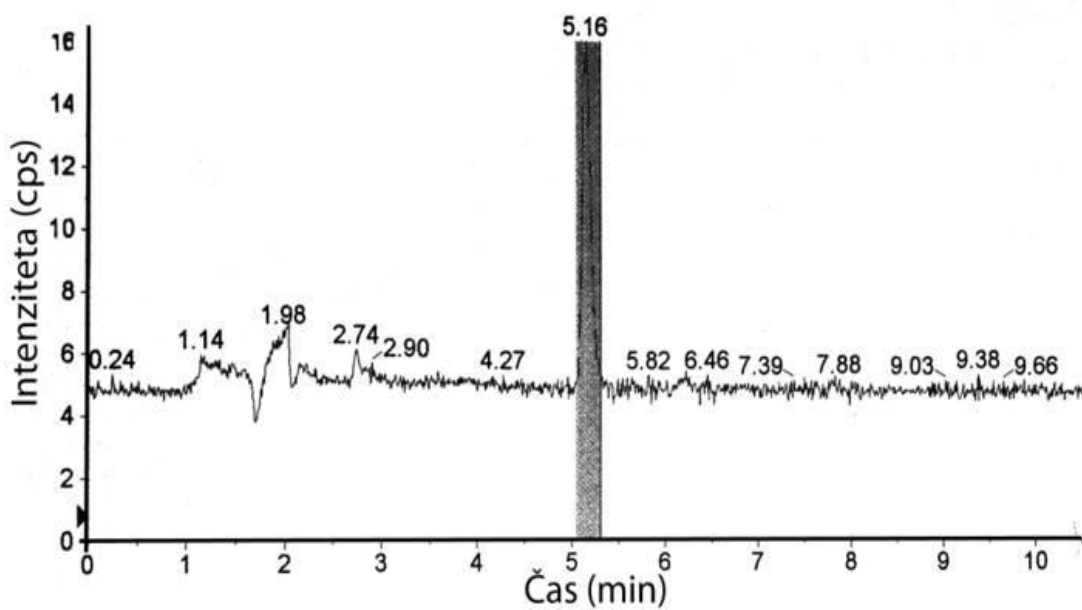
#### 4.4.2 Določevanje razgradnih produktov acetamiprida po obsevanju v zemlji z LC-MS metodo

V nadaljevanju sem analizirala vrhove fotorazpada acetamiprida v zemlji, posnetega predhodno na HPLC-DAD detektorju, torej vzorec z maso 250 mg, obsevan 360 min z intenziteto svetlobe 750 W/m<sup>2</sup> (slika 33).

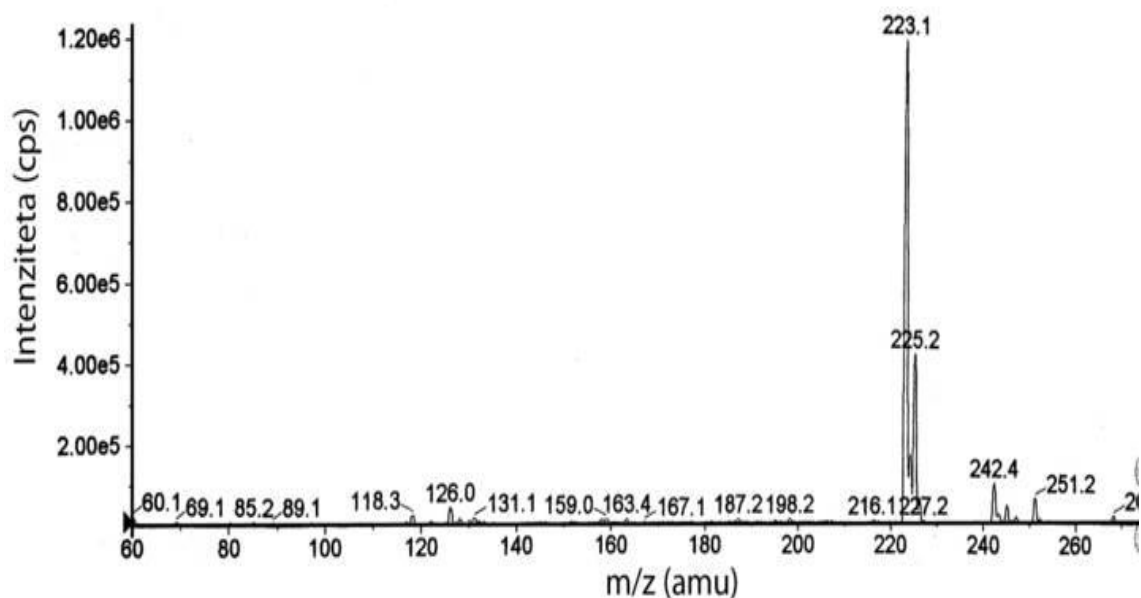
Na sliki 34 je prikazan kromatografski vrh razpadnega produkta, eluiranega pri času 5,16 min, na sliki 35 pa njegov masni spekter. V nadaljevanju smo analizirali še kromatografske vrhove razpadnih produktov, posnete na LC-MS napravi, s kromatografskimi vrhovi, posnetimi pri časih 2,47 min (slika 36) in 1,98 min (slika 38).



**Slika 33:** Kromatogram vzorca zemlje, umetno onesnažene z acetamidom, z maso 250 mg, obsevanega 900 min pri intenziteti svetlobe  $750 \text{ W/m}^2$ , posnet na HPLC

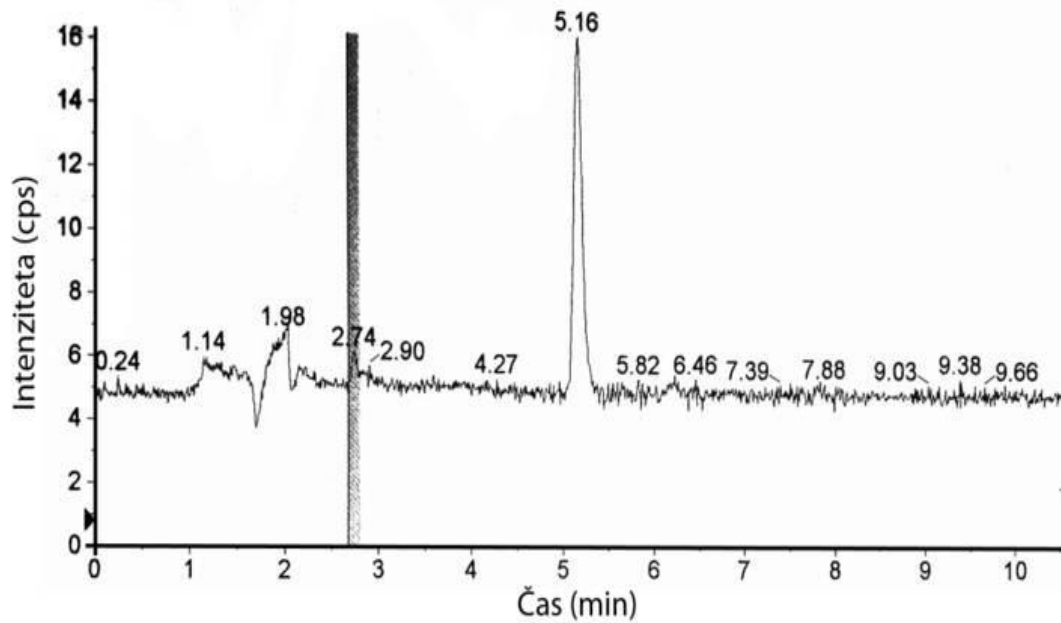


**Slika 34:** Kromatogram ekstrakta vzorca zemlje (250 mg), obsevanega 360 min pri intenziteti svetlobe  $750 \text{ W/m}^2$ , z vrhom produkta, eluiranega pri času 5,16 min, posnet na LC-MS

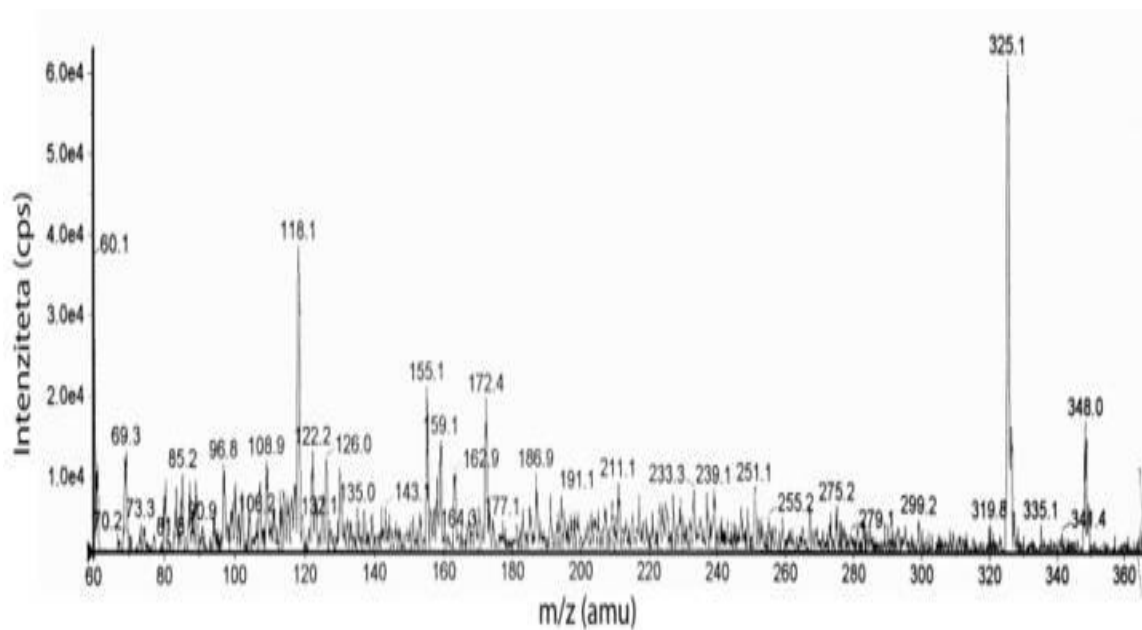


**Slika 35:** Masni spekter neznanega produkta, eluiranega pri 5,16 min, posnet na LC-MS

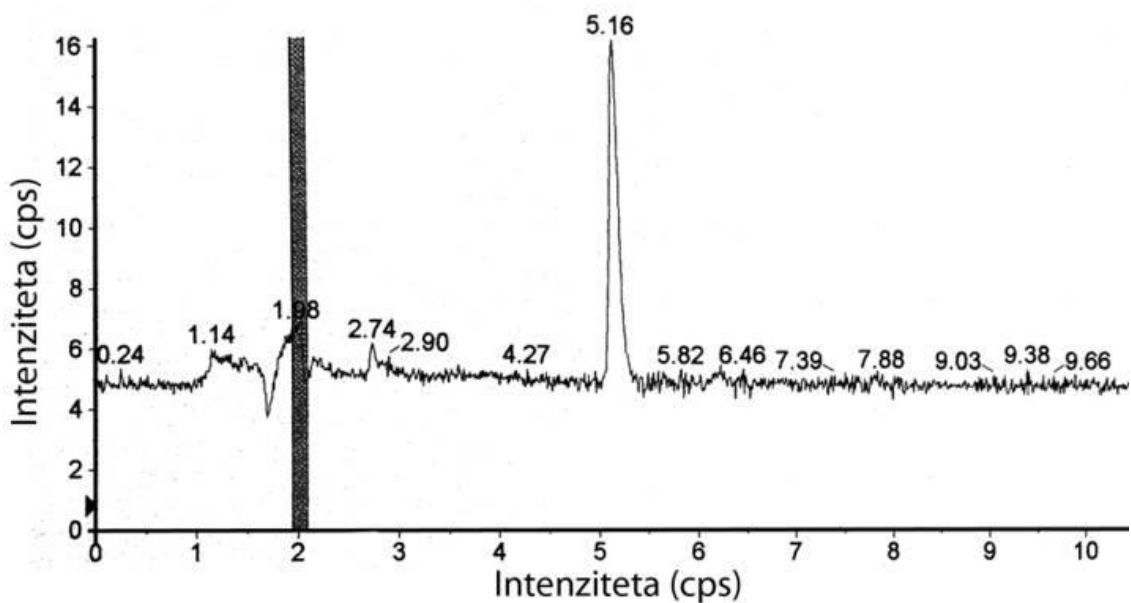




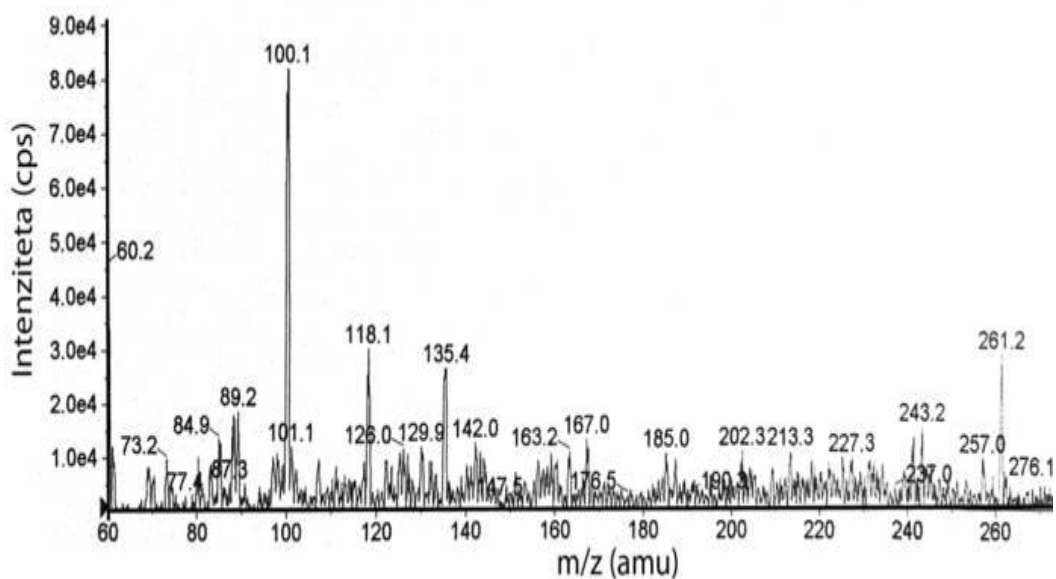
**Slika 36:** Kromatogram ekstrakta vzorca zemlje (250 mg), obsevanega 360 min pri intenziteti svetlobe  $750 \text{ W/m}^2$ , z vrhom produkta, eluiranega pri času 2,74 min, posnet na LC-MS



**Slika 37:** Masni spekter neznanega produkta, eluiranega pri 2,74 min, posnet na LC-MS



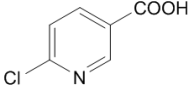
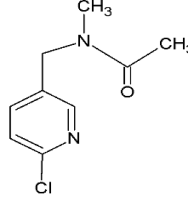
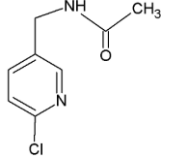
**Slika 38:** Kromatogram ekstrakta vzorca zemlje (250 mg), obsevanega 360 min pri intenziteti svetlobe  $750 \text{ W/m}^2$ , z vrhom produkta, eluiranega pri času 1,98 min, posnet na LC-MS



**Slika 39:** Masni spekter neznanega produkta, eluiranega pri 1,98 min, posnet na LC-MS

V preglednici 8 so zbrane strukture razgradnih produktov acetamiprida ter njihovi masni piki, ki so bili identificirani v literaturi (Guohong in sod., 2009) ter v diplomski nalogi Mojce Rotar (2011), kjer poteče fotorazgradnja v vodi pod vplivom sončne svetlobe.

**Preglednica 8:** Spojine fotorazpadnih produktov acetamiprida v zemlji (Acetamiprid, Pesticide Fact Sheet, 2002)

Spojine razpadnih produktov	Strukturna formula	Masni fragment (m/z)
6-kloronikotinska kislina		158
acetiliran metil(6-kloro-3-piridil)metilamina		199
acetiliran metil(6-kloro-3-piridil)amina		185

Po opravljenih ponovitvah poskusa na napravi LC-MS so bili rezultati tudi za acetamiprid nedorečeni. Žal posneti masni spektri mojih vzorcev niso niti v retencijskih časih niti v masnih spektrih ustrezali razgradnim produktom, ki so bili že predhodno identificirani v omenjenih objavah. Kot sem že omenila, je možen vzrok za nedoločljivost verjetno v matriksu vzorca, kajti v omenjeni objavi so produkte identificirali v vodnih vzorcih. Vzorec zemlje je bistveno bolj kompleksen, prav tako je ekstrakcija iz zemlje bolj kompleksen proces, zato predvidevam, da so lahko nekateri produkti ostali vezani na komponente zemlje.

Zaključim lahko, da poteka fotorazgradnja pesticida v zemlji le v omejenem obsegu, to je na površini. Identifikacija razgradnih produktov je zaradi kompleksne sestave prsti zelo zapletena. Možno je, da nekaterih produktov z omenjeno ekstrakcijo sploh nismo mogli ekstrahirati, zato jih nismo določili.

## 5 ZAKLJUČEK

V svoji diplomski nalogi sem se usmerila na raziskavo razgradnje imidakloprida in acetamiprida v zemlji pod vplivom sončne svetlobe. Vedno bolj se zavedamo vplivov pesticidov na naša življenja in okolje okoli nas, zato so podatki o razpadu pesticidov pod vplivom sončne svetlobe in času, v katerem ta poteče, dobrodošli. Za identifikacijo in raziskovanje razpadnih produktov po fotorazgradni pesticidov v zemlji, za katere v preteklosti ni bilo večjega zanimanja, spoznavamo, da moramo tej tematiki nakloniti še več časa.

Tako sem v prvem delu diplomskega dela usmerila pozornost na optimiziranje debeline in količine prsti za obsevanje z uporabo naprave Suntest (naprava, ki simulira sončno svetlobo). Vzorce zemlje sem umetno onesnaževala z imidaklopidom oz. z acetamipridom. Naredila sem umeritvene krivulje za maso 250 in 500 mg z imidaklopidom umetno onesnažene zemlje in 250 mg z acetamipridom umetno onesnažene zemlje z meritvami koncentracij (1,25; 2,5; 5 in 10 mg imidakloprida oz. acetamiprida na kg zemlje), s katerimi sem si nato pomagala pri ugotavljanju prisotnosti pesticidov v zemlji po obsevanju z uporabo sončne svetlobe različnih intenzitet (250, 500 in 750 W/m<sup>2</sup>) pri različnih časih (15, 30, 60, 120, 360 in 900 min).

Za uspešno fotokemijsko razgradnjo pesticida v prsti je najbolj pomembna debelina plasti obsevanega vzorca. Posledica predebele plasti onesnažene zemlje v petrijevki je prevelika količina neizpostavljenega vzorca, ki tako da nerealne rezultate, saj razgradnja poteče le na površini obsevane zemlje oziroma na obsevanih delih in se z globino ter usmeritvijo od obsevanja neizpostavljenega dela površine manjša. Zato je nujno, da obsevamo primerno količino vzorca, da dobimo realne rezultate. S svojim raziskovanjem sem prišla do sklepa, da je 250 mg masa vzorca onesnažene zemlje ravno prava za obsevanje, zato sem nadaljevala z enako maso zemlje tudi pri meritvah z acetamipridom.

Pri obsevanju vzorcev z različnimi intenzitetami sem ugotovila, da razgradnja poteče že v začetnem času. Pri imidaklopidu se pokaže njegov razpolovni čas pri 120 min obsevanja pri intenziteti svetlobe 750 W/m<sup>2</sup> (slika 14), oziroma se mu močno približa že po 15 min obsevanja, po katerih razpade že 46 % imidakloprida. Iz tega sklepam, da je močnejša intenziteta svetlobe, torej 750 W/m<sup>2</sup>, glede na poskuse, opravljene pri nižjih intenzitetah svetlobe: 250 W/m<sup>2</sup> (slika 17) in 500 W/m<sup>2</sup> (slika 16), ravno pravšnja. Pri obsevanju vzorcev zemlje, umetno onesnažene z acetamipridom, razpolovnega časa tudi po 900 min obsevanja z intenziteto svetlobe 750 W/m<sup>2</sup> nisem dosegla (po 900 min je bila razgradnja le 39-odstotna, slika 22), iz česar sklepam, da je za določitev razpolovnega časa acetamiprida potreben daljši čas obsevanja in višja intenziteta svetlobe, kot sem jo uporabila.

V drugem delu diplomske naloge sem se posvetila opazovanju in določevanju razgradnih produktov, ki bi jih lahko dobili po obsevanju pesticidov imidakloprida in acetamiprida v zemlji po določenem času. Razgradni produkti se po opazovanju na LC-MS napravi niso pokazali, oziroma so bili nedoločljivi, ter tako po obširnih pripravah na določevanje teh verjetno zaradi tehničnih težav z LC-MS napravo in težke ločljivosti pikov, prikazanih po obdelavi podatkov, rezultatov nismo dobili.

## 6 VIRI

Acros Organics. 1999. Material safety data sheet: Naphthalene, 99%. Fair Lawn, NJ. [www.fishersci.com](http://www.fishersci.com) (pregledano 22. 4. 2012)

Acetamiprid, Pesticide Fact Sheet, 2002, <http://www.epa.gov/opprd001/factsheets/acetamiprid.pdf> , (pregledano 22. 4. 2012)

Ahmad R., Nelson P.N., Kookana R.S. 2006. The molecular composition of soil organic matter as determined by <sup>13</sup>C NMR and elemental analyses and correlation with pesticide sorption. *Eur. J. Soil Sci.* 57, 883–893

Azevedo, A.S.O.N. 1998. Assessment and simulation of atrazine as influenced by drainage and irrigation. An interface between RZWQM and ArcView GIS. Doctor Thesis. Iowa State University, Ames, Iowa.

Bacey J. 2000. Environmental Fate of Imidacloprid. Environmental Monitoring and Pest Management Branch, <http://www.cdpr.ca.gov/docs/empm/pubs/fatememo/imid.pdf> , (pregledano 22.11.2011)

Balmer M.E., Goss K.U., Schwarzenbach R.P. 2000. Photolytic transformation of organic pollutants on soil surfaces—an experimental approach. *Environ. Sci. Technol.* 34, 1240–1246

Baskaran S., Kookana R. S., Naidu R. 1997. Determination of the Insecticide Imidacloprid in Water and soil Using High-performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A.* 787: 271–275

Bayer Corp Science, 1998, <http://www.bayercropscience.com/>, (pregledano 22. 4. 2012)

Council Directive 91 / 414EEC of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market, <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1991L0414:20070201:EN:PDF> , (pregledano 14. 8. 2012)

Cooper C.M. 1991. Insecticide concentration in ecosystem components of an intensively cultivated water shed in Mississippi. *J Freshw Ecol.* 6, 237–247

Cox C. 2001. Insecticide factsheet: Imidacloprid. *Journal of pesticide reform.* 1, 15– 21

EC. Health and Consumer Protection Directorate, 2004, <http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/newactive/acetamiprid.pdf>, (pregledano 15.8.2012)

Elbert A., Nauen R., Leicht W. 1998 Imidacloprid, a novel Chloronicotinyl insecticide: biological activity and agricultural importance. In: Ishaaya I, Degheele D (eds) *Insecticides with novel modes of action: mechanism and application*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 50-73

EXTOXNET Database, Department of pesticides Regulation, 1995,

<http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/imid.pdf>, (pregledano 15.8.2012)

Feng S., Kong Z., Wang X., Zhao L., Peng P. 2004. Acute toxicity and genotoxicity of two novel pesticides on amphibian. *Rana N. Hallowell. Chemosphere*, 56/5, 457–463

Fidente P., Seccia S., Vanni F., Morrica P. 2005. Analysis of nicotinoid insecticides residues in honey by solid matrix partition clean-up and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2005 Nov 11;1094(1-2):175-8. Epub 2005 Sep 22.

Fito-info, Slovenski informacijski sistem za varstvo rastlin,  
[http://www.fito-info.si/index1.asp?ID=VarOk/Usod\\_FFS/US\\_4.asp](http://www.fito-info.si/index1.asp?ID=VarOk/Usod_FFS/US_4.asp), (pregledano 12. 4. 2012)

Fitosanitarna uprava Republike Slovenije  
<http://spletni2.furs.gov.si/FFS/REGSR/index.htm>, (pregledano 22. 4. 2012)

Fu H.B., Quan X., Zhao H.M. 2005. Photodegradation of gamma-HCH by alpha-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and the influence of fulvic acid. *J. Photochem. Photobiol. A* 173, 143–149

FURS, Ocena tveganja imidakloprida za čebele, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Fitosanitarna uprava RS, Ljubljana,  
<http://www.furs.si/svn/ffs/imidakloprid/imidaklopridjunij2004.pdf>, (pregledano 22. 4. 2012)

Goncalves C., Dimou A., Sakkas V., Spendurada M.F., Albanis T.A. 2006. Photolytic degradation of quinalphos in natural waters and on soil matrices under simulated solar irradiation. *Chemosphere* 64: 1375-1382

Guohong X., Guoguang L., Dezhi S., Liqing Z. 2009. Kinetics of Acetamiprid Photolysis in Solution. *Bull Environ Contam Toxicol*. 82: 129132.

Gupta. S., Gajbhiye V.T., Agnihotri. N.P. 2002. Leaching Behaviour of Imidacloprid Formulations in Soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 68, 502–508

Guzsvány V.J., Csanádi J.J., Lazić S.D., Gaál F.F. 2001. Photocatalytic degradation of the insecticide acetamiprid on TiO<sub>2</sub> catalyst. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 20: 152159

Hultgren, R. P., Hudson, R. J. M., Sims, G. K. 2002. Effects of soil pH and soil water content on prosulfuron dissipation. *J. Agric. Food Chem*. 50, 3236-3243

Imidakloprid, Pesticide Fact Sheet, 2002,  
<http://npic.orst.edu/factsheets/imidacloprid.pdf>, (pregledano 15. 8. 2012)

Ishii Y., Kobori I., Araki Y., Kurogochi S., Iwaya K., and Kagabu S. 1994. *J. Agric. Food Chem*. 42: 12, 2917

Jeschke P., Nauen R. 2005. Neonicotinoid Insecticides. Bayer CropScience, Monheim, Germany, Elsevier BV: 53105.

Kalister, K., 2011, Fotokemijska razgradnja imidakloprida v zemlji, Diplomsko delo, Univerza v Novi Gorici, Fakulteta za znanosti o okolju, Nova Gorica

Kazalci okolja, ARSO, 2012

[http://kazalci.arso.gov.si/?data=group&group\\_id=6](http://kazalci.arso.gov.si/?data=group&group_id=6), (pregledano 15. 8. 2012)

Kollman in Segawa, DRP Pest Chem Database, 1995

Krohn J., Hellpointer E. 2002. Environmental fate of imidacloprid. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer 55, Special edition.

Larson, S.J., Capel, P.D., Majewski, M.S. 1997. Pesticides in surface waters—distribution, trends, and governing factors. 373

Linn D.M., Carski T.H., Brusseau M.L., Chang F.H. 1993. Sorption and Degradation of Pesticides and Organic Chemicals in Soil. Soil Science Society of America, Madison, WI, 260. 30

Litter M.I. 2005. Introduction to photochemical advanced Oxidation Processes for Water Treatment. V: The handbook of Environmental Chemistry, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2, 325–366

Liu W., Zheng W., Ma Y., Liu K. 2006. Sorption and Degradation of Imidacloprid in Soil and Water. J. Environ. Sci. Health B, 41, 623–634

Matsuda K., Buckingham S.D., Kleier D., Rauh J.J., Grauso M., Sattelle D.B. 2001. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. Trends in Pharmacological Sciences. Volume 22, Issue 11, 1; 573-580 metabolites in soils. J. Agric. Food Chem. Vol 45(4), 1468-1472.

Milevoj L. 2007. Kmetijska entomologija: splošni del. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 182

Moza P.N., Hustert K., Feicht E., Kettrup A. 1998. Photolysis of imidacloprid in aqueous solution. Chemosphere 36, 497–502

National Toxicology Program, Toxicology and carcinogenesis studies of naphthalene (CAS No. 91-20-3) in F344/N rats (inhalation studies), <http://ntp-server.niehs.nih.gov/htdocs/LT-studies/TR500.html>, (pregledano 22.4.2012)

Nauen R., Denholm I. 2005. Resistance of Insect Pests to Neonicotinoid: Current Status and Future Prospects. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 58: 200–215.

Obana H., Okihashi M., Akutsu K., Kitagawa Y., Hori S. 2003. Determination of Neonicotinoid Pesticide Residues in Vegetables and Fruits with Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography Mass Spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51, 2501–2505

Rotar, M., 2011. Odstranjevanje acetamiprida s fentonovo oksidacijo, Diplomsko delo, Univerza v Novi Gorici, Fakulteta za znanosti o okolju, Nova Gorica

Oto M. 1999. Time-Dependent Sorption of Imidacloprid in Two Different Soils. Bayer AG, Crop Protection Business Group, Crop Protection Development, Institute for Metabolism Research. *Agric. Food Chem.* 47, 327-332

Pesticidi in njihovi razgradni produkti v podzemni vodi, ARSO, [http://kazalci.arso.gov.si/?data=indicator&ind\\_id=27](http://kazalci.arso.gov.si/?data=indicator&ind_id=27), (pregledano 22. 4. 2012)

Žabar, R., Komel, T., Fabjan, J., Bavcon, K. M., Trebše, P., 2012. Photocatalytic degradation with immobilised TiO<sub>2</sub> of three selected neonicotinoid insecticides : Imidacloprid, thiamethoxam and clothianidin, 2012, *Chemosphere* 89 (2012) 293–301

Pimentel, D., Levitan, L., 1986. Pesticides: amounts applied and amounts reaching pests. *Bioscience* 36, 86–91

Placke F.J., Weber E., 1993. Method of determining imidacloprid residues in plant materials. Bayer AG, Pflanzenschutzzentrum Monheim, 51368 Leverkusen, Germany. *Pflanzenschutz-Nachrichten-Bayer-English-ed*, 46: 2, 109-182

Poraba sredstev za varstvo rastlin, ARSO, [http://kazalci.arso.gov.si/?data=indicator&ind\\_id=37](http://kazalci.arso.gov.si/?data=indicator&ind_id=37), (pregledano 22. 4. 2012)

Poraba sredstev za varstvo rastlin, ARSO, 2012.: [http://kazalci.arso.gov.si/?data=indicator&ind\\_id=37](http://kazalci.arso.gov.si/?data=indicator&ind_id=37), (pregledano 15. 8. 2012)

Roberts T. R., Hutson D. H. 1999. Neonicotinoids Overview, *Metabolic Pathways of Agrochemicals. Part 2: Insecticides and Fungicides.* Cambridge. The Royal society of Chemistry: 105-106, 111–120

Rossi S., Sabatini A. G., Cenciarini R., Ghini S, Girotti S. 2005. Use of High-Performance Liquid Chromatography-UV and Gas Chromatography-Mass Spectrometry for Determination of the Imidacloprid Content of Honeybees, Pollen, Paper Filters, Grass, and Flowers. *Chromatographia* 61, 189–195.

Schmuck R. 1999. No causal relationship between Gaucho® seed dressing in sunflowers and French bee syndrome. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 52/99, 257–299

Scholz K., Reinhard F. 1999. Photolysis of imidacloprid (NTN 33893) on the leaf surface of tomato plants, *Pestic. Sci.* 55; 633–675

SERA, 2005, Imidacloprid-Human Health and Ecological Risk Assessment –Final Report (Prepared for USDA, Forest service), SERA TR 05-43-24-03a

Solecki R. 2001. Toxicological evaluation – Imidacloprid, <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2001pr07.htm>, (pregledano 22. 4. 2012)

Stangroom S.J., Macleod C.L., Lester J.N. 1998. Photosensitized transformation of the herbicide 4-chloro-2-methylphenoxy acetic acid (MCPA) in water. *Water Res.* 32; 623–632



Suchail, S.; Guez, D.; Belzunces, L. P. 2001. Discrepancy between acute chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2482-2486

Thuyet D.Q., Yamazaki K., Phong T.K., Watanabe H., Nhung D.T.T., Takagi K., 2010. Determination of Imidacloprid in Paddy Water and Soil by Liquid Chromatography Electro spray Ionization- tandem Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry* 65, 8; 843-847

Tokieda M., Ozawa M., Kobayashi S., Gomyo T. 1998. Method to Determination of Total Residues of the Insecticide Acetamiprid and Its Metabolites in Crops by Gas Chromatography. *Journal of Pesticide Science* 22, 77–83.

Tomizawa M. Zhang N, Durkin KA, Olmstead MM, Casida JE. 2003. The neonicotinoid electronegative pharmacophore plays the crucial role in the high affinity and selectivity for the *Drosophila* nicotinic receptor: an anomaly for the nicotinic cation- $\pi$  interaction model. *Biochemistry*, 42, 7819–7827.

Topp E., Vallaeyts T., Soulas G. 1997. In: van Elsas, J.D., Trevors, J.T., Wellington, E.M.H. (Eds.), *Modern Soil Microbiology*. Marcel Dekker, New York, 547–575

Tsamura Y., Nakamura Y., Tonogai Y., Kakimoto Y., Tanaka Y., Shibata T. 1998. Determination of neonicotinoid pesticide nitenpyram and its metabolites in agricultural products. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* 39, 127–134.

U.S. Dept. of Health and Human Services, 2000,  
<http://ehis.niehs.nih.gov/roc/toc9.html>, (pregledano 15. 8. 2012)

Uradni List RS. št. 98/2004, 4290. Zakon o fitofarmacevtskih sredstvih (uradno prečiščeno besedilo) (ZFFS-UPB1)  
<http://www.uradni-list.si/1/content?id=51156>, (pregledano 22. 4. 2012)

Uradni List RS. št. 100/2005, 4351. Uredba o standardih kakovosti podzemne vode, Stran 10553,  
<http://www.uradni-list.si/1/content?id=58653>, (pregledano 22. 4. 2012)

Uradni List RS. št. 62/2003, 3038. Pravilnik o dolžnostih uporabnikov fitofarmacevtskih sredstev, Stran 9524,  
<http://www.uradni-list.si/1/objava.jsp?urlid=200362&stevilka=3038>, (pregledano 22. 4. 2012)

Ur. List. RS št.98 / 2004, Stran 11885- 4290, Zakon o fitofarmacevtskih sredstvih (ZFFS - UPB1) (uradno prečiščeno besedilo),  
<http://www.uradni-list.si/1/objava.jsp?urlid=200498&stevilka=4290#> , (pregledano 16. 4. 2012)

USEPA 1997. The incidence and severity of sediment contamination in surface waters of the United States. National Sediment Quality Survey, vol. EPA 823-R-97-006. U.S. Environmental Protection Agency, Washington DC, 1

Vilchez J.L., R. Khattabi R., Fernfindez J., A. Gonzfilez-Casado A., Navalon A. 1996. Determination of imidacloprid in water and soil samples by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 746; 289-294

Walker A., Jurado-Exposito M., Bending G. D., Smith V.J.R. 2001. Spatial variability in the degradation rate of isoproturon in soil. *Environ. Pollut.*, 111, 407–415

Wallace D. Acetamiprid. 2005. *Encyclopedia of Toxicology*. 2nd Edition. 2325.

Wamhoff H., Schneider V., 1999. Photodegradation of imidacloprid. *J. Agric. Food Chemosphere*. 47, 1730–1734

Wauchope R.D., Yeh S., Linders J.B.H., Kloskowski R., Tanaka K., Katayama A., Kordel, W., Gerstl Z., Lane M., Unsworth J. 2001. Pesticide soil sorption parameters: theory, measurement, uses, limitations and reliability. In: Poster presented at the IUPAC Congress/ General Assembly

Zavod za zdravstveno varstvo Celje,  
<http://www.zzv-ce.si/unlimitpages.asp?id=362>, (pregledano 22. 4. 2012)

Zheng W., Liu W. 1999. Kinetics and mechanism of the hydrolysis of imidacloprid. *Pestic. Sci.*, 55, 482–485

## PRILOGA

**Preglednica A:** Umeritvena premica za imidaklopid v 250 mg zemlje.

Koncentracija imidakloprida [mg/kg]	Površina kromatografskega vrha [mAU*s]	Povprečje [mAU*s]	Standardni odklon
	52,1		
1,25	59,1	58,3	6,2
	64,5		
	121,5		
2,5	120,2	121,6	2,3
	124,8		
	256,4		
5	246,1	242,3	15,7
	225,5		
	486,2		
10	493,2	518	50,5
	577,1		

**Preglednica B:** Umeritvena premica za imidaklopid v 500 mg zemlje.

Koncentracija imidakloprida [mg/kg]	Površina kromatografskega vrha [mAU*s]	Povprečje [mAU*s]	Standardni odklon
	136,4		
1,25	126,4	133,6	5
	133		
	228,1		
2,5	189,1	217	24,3
	234		
	316		
5	345	420	156,8
	601		
	965,3		
10	1160,8	1132	155,1
	1271,6		

**Preglednica C:** Površina kromatografskega vrha imidakloprida v 250 mg zemlje po obsevanju z intenziteto svetlobe  $750\text{W/m}^2$ , po analizi s HPLC-DAD.

Čas obsevanja [min] pri intenziteti $750\text{W/m}^2$	Površina kromatografskega vrha [mAU*s]	Povprečje [mAU*s]	Ostanek imidakloprida v zemlji [%]	Standardni odklon
	518			
0	518	518	100	0
	518			
	286,7			
15	243,7	283	54	6,7
	250,7			
	249,1			
30	278,9	271	52	7,2
	276,7			
	251			
60	274	266	51	8,9
	268,1			
	282,4			
120	229,4	262	50	7,3
	275,1			

**Preglednica D:** Površina kromatografskega vrha imidakloprida v 250 mg zemlje po obsevanju z intenziteto svetlobe  $500\text{W/m}^2$ , po analizi s HPLC-DAD.

Čas obsevanja [min] pri intenziteti $500\text{W/m}^2$	Površina kromatografskega vrha [mAU*s]	Povprečje [mAU*s]	Ostanek imidakloprida v zemlji [%]	Standardni odklon
	518			
0	518	518	100	0
	518			
	336,6			
15	378,7	341,6	66	4,1
	311			
	365,1			
30	300,9	346	66	18,4
	375,5			
	329,7			
60	332,2	339	65	13,8
	354,8			
	338,6			
120	319,6	344	66	17,7
	380,9			

**Preglednica E:** Površina kromatografskega vrha imidakloprida v 250 mg zemlje po obsevanju z intenziteto svetlobe  $250\text{W/m}^2$ , po analizi s HPLC-DAD.

Čas obsevanja [min] pri intenziteti $250\text{W/m}^2$	Površina kromatografskega vrha [mAU*s]	Povprečje [mAU*s]	Ostanek imidakloprida v zemlji [%]	Standardni odklon
	518			
0	518	518	100	0
	518			
	336,6			
15	418,7	355,6	68	34,1
	311			
	365,1			
30	250,9	330	63	18,4
	375,5			
	329,7			
60	332,2	331	63	13,8
	334,8			
	328,6			
120	315,6	331	63	17,7
	332,9			

**Preglednica F:** Površina kromatografskega vrha imidakloprida v 500 mg zemlje po obsevanju z intenziteto svetlobe  $750\text{W/m}^2$ , po analizi s HPLC-DAD.

Čas obsevanja [min] pri intenziteti $750\text{W/m}^2$	Površina kromatografskega vrha [mAU*s]	Povprečje [mAU*s]	Ostanek imidakloprida v zemlji [%]	Standardni odklon
	1132			
0	1132	1132	100	0
	1132			
	686,6			
15	762,7	780	69	109,8
	903,1			
	638,2			
30	840	740	65	100,9
	743,3			
	726,6			
60	742,1	735	64	8,5
	740,8			
	722			
120	661,1	676	59	40,1
	646,2			

**Preglednica G:** Umeritvena premica za acetamiprid v 250 mg zemlje.

Koncentracija acetamiprida [mg/kg]	Površina kromatografskega vrha [mAU*s]	Povprečje [mAU*s]	Standardni odklon
	84,4		
1,25	87,5	108	37,9
	151,7		
	89,7		
2,5	180,2	147	49,6
	170,3		
	351,2		
5	357,8	354,2	3,3
	353,7		
	710,7		
10	675,3	670,7	42,1
	626,8		

**Preglednica H:** Površina kromatografskega vrha acetamiprida v 250 mg zemlje po obsevanju z intenziteto svetlobe 750W/m<sup>2</sup>, po analizi s HPLC-DAD.

Čas obsevanja [min] pri intenziteti 750W/m <sup>2</sup>	Površina kromatografskega vrha [mAU*s]	Povprečje [mAU*s]	Ostanek acetamiprida v zemlji [%]	Standardni odklon
	670			
0	670	670	100	0
	670			
	626,9			
15	567,5	612,3	91	33,6
	624,4			
	603,4			
30	739	663,2	89	69,2
	647,3			
	511,9			
60	611,9	603,5	90	89,1
	689,7			
	612			
120	632,2	609,1	90	25,4
	581,8			
	423			
360	438,1	440	65	18,2
	459,2			
	474			
900	399	419	61	5,4
	385,2			

**Preglednica I:** Površina kromatografskega vrha acetamiprida v 250 mg zemlje po obsevanju z intenziteto svetlobe 250W/m<sup>2</sup>, po analizi s HPLC-DAD.

Čas obsevanja [min] pri intenziteti 250W/m <sup>2</sup>	Površina kromatografskega vrha [mAU*s]	Povprečje [mAU*s]	Ostanek acetamiprida v zemlji [%]	Standardni odklon
	670			
0	670	670	100	0
	670			
	651,2			
15	636,1	643,4	96	7,6
	642			
	697,8			
30	629	649	97	42,1
	621,3			
	619			
60	618,4	640	95	37,1
	683			
	612,9			
120	734,6	643	96	79,9
	583,9			