

UNIVERZA V NOVI GORICI  
FAKULTETA ZA ZNANOSTI O OKOLJU

FOTOKEMIJSKA RAZGRADNJA IMIDAKLOPRIDA  
V ZEMLJI

DIPLOMSKO DELO

Kristina KALISTER

Mentor: prof. dr. Polonca Trebše

Nova Gorica, 2011

## 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 eksplicitno prikazani oziroma navedeni (citirani) v diplomskem delu.

Kristina Kalister

## ZAHVALA

Rada bi se zahvalila svoji mentorici doc. dr. Polonci Trebše za pomoč in trud pri izdelavi diplomskega dela. Zahvaljujem se tudi Romini Žabar za veliko koristnih nasvetov, Andreji Šuligoj, Vesni Lavtižar in ostalim mladim raziskovalcem za pomoč in koristne nasvete pri praktičnem laboratorijskem delu.

Prav tako pa gre velika zahvala moji družini, ki me je spodbujala in mi stala ob strani v najtežjih trenutkih.

## POVZETEK

V diplomskem delu sem ugotavljala hitrost razgradnje pesticida imidakloprida, sistemskega insekticida, ki se pogosto uporablja v kmetijstvu za nadzor insektov v zemlji. V ta namen sem uporabila aparat suntest, ki simulira naravne pogoje, kot je na primer osončenost. Z uporabo aparata sem simulirala sončen poletni dan in obsevala vzorce z intenziteto svetlobe  $750 \text{ W/m}^2$  v različnih časovnih intervalih (od 15 min do 12 h). Ker debelina in enakomernost nanosa obsevane zemlje v petrijevki močno vplivata na fotorazgradnjo imidakloprida, sem skušala določiti primerno oziroma zadostno količino vzorca za obsevanje in nadaljno analizo. Stopnjo razgradnje imidakloprida sem določala z uporabo tekočinske kromatografije z detekcijo na diodno matriko (HPLC-DAD). Obsevanje vzorcev imidakloprida večje mase (5 g) se je pokazalo kot zelo neustrezno, zato sem v nadaljevanju diplomskega dela obsevala manjšo količino zemlje, onesnažene z imidaklopidom. Razgradnja imidakloprida v manjših količinah vzorca (100 mg) je potekala eksponentno. Največja količina imidakloprida se je razgradila v prvih 60 minutah in se je pri daljšem času obsevanja ustalila. Za določitev razgradnih produktov v zemlji sem vzorce ekstrahirala z acetonitrilom in jih analizirala na tekočinskem kromatografu v kombinaciji z masno selektivnim detektorjem (LC-MS). Njihove produkte pa žal nisem uspela določiti zaradi kompleksnosti vzorca ter premajhnih množin le-teh.

## ABSTRACT

In the diploma thesis I have set photodegradation of pesticide imidacloprid, which is a systemic insecticide that is widely used in agriculture to control insects. To this end, I used suntest device that simulates a sunny summer day and irradiated samples placed under the light intensity  $750 \text{ W/m}^2$ . Since the coating thickness and uniformity of the irradiated soil in the petri dish strongly influence on the photodegradation properties of imidacloprid, I wanted to provide a suitable and sufficient amount of sample for irradiation and further analysis. Imidacloprid in soil samples that I irradiated in different time intervals (from 15 min to 12h), monitored its degradation and analyzed it by liquid chromatography coupled with diode array detection (HPLC-DAD). Degradation of large quantities of irradiated samples (5 g) is very uneven, so it was necessary to identify the most suitable, a small amount of treated soil. Irradiation of soil samples in small quantities (100 mg) was held on an exponentially decomposition. Maximum degradation of imidacloprid has expired in the first 60 minutes, and after prolonged irradiation time constant stabilized. Imidacloprid and its degradation products extracted from water samples with acetonitrile, and analyzed on a liquid chromatograph in combination with mass selective detector (LC-MS). Products I could not determine, because of their polarity and elution with the mobile phase.

**KLJUČNE BESEDE:** imidakloprid, fotokemična razgradnja, aparat Suntest

**KEY WORDS:** imidacloprid, photodegradation, suntest apparatus

## KAZALO VSEBINE

1. UVOD .....	1
1.1 Glavni cilji: .....	3
2. TEORETIČNI DEL.....	4
2.1 Neonikotinoidi .....	4
2.2 Kemijska zgradba.....	4
2.3 Razgradni procesi v zemlji .....	6
2.4 Imidakloprid.....	9
2.5 Določanje imidakloprida v zemlji.....	15
3. EKSPERIMENTALNI DEL.....	16
3.1 Reagenti in raztopine .....	16
3.3 Priprava raztopin .....	19
4. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	21
4.1 Ekstrakcija velike in male količine .....	21
4.2 Obsevanje večje in manjše količine v aparatu Suntest .....	23
4.3 Določanje razgradnih produktov imidakloprida v zemlji.....	25
5. ZAKLJUČEK .....	27
6. VIRI.....	28
PRILOGE (ANNEXES) .....	



## 1. UVOD

Vsaka snov ali mešanica snovi, ki je namenjena preprečevanju ali uničevanju škodljivih organizmov oziroma plevelov, je pesticid. Gre za stroškovno najbolj učinkovito sredstvo, ki omogoča ohranitev trenutnega donosa in prispeva k gospodarski sposobnosti preživetja. Pesticide lahko razvrščamo glede na njihov cilj, način ali obdobje delovanja ter glede na njihove kemijske lastnosti. V uporabi je več kot 500 različnih pesticidov, predvsem v kmetijstvu (Azevedo, 1998). V zadnjih 50-ih letih se je poraba pesticidov znatno povečala, predvsem zaradi velikega naraščanja prebivalstva.

V zadnjih letih je v literaturi objavljenih precej raziskav, ki obravnavajo prisotnost pesticidov v vodi ali hrani in možne nezaželene učinke le-teh na zdravje ljudi ter na ekosistemsko ravnotežje. Med možnimi kroničnimi učinki teh spojin lahko omenimo kancerogene (Blair in sod., 1985; Blair in sod., 1993) in nevrotoksične učinke (Tanner in Laangston, 1990) ter tiste učinke, ki vplivajo na reprodukcijo (Hileman, 1994) in razvoj celice, predvsem v zgodnji fazi odrašanja (Gray in sod., 1994).

Pravzaprav je bilo ocenjeno, da manj kot 0,1 % pesticidov dejansko doseže pridelek in ciljne organizme; ostalo kontaminira tla, vodo, zrak in tako negativno vpliva na netarčne organizme (Pimentel in Levitan, 1986). Poleg tega veliko pesticidov, med njimi tudi organoklorini insekticidi, ostanejo v ekosistemu dalj časa, tudi 20 let in več po prepovedi njihove uporabe (Larson in sod., 1997). Ko pa pesticid vstopi v prehransko verigo, je velika verjetnost biomagnifikacije, kar pomeni kopičenje pesticida v maščobnih tkivih živih organizmov, kjer lahko doseže višje koncentracije kot v okolju (Brewer, 1979).

Pesticide so začeli prvič uporabljati v kmetijske namene v drugi polovici 19. stoletja. V zadnjem desetletju prejšnjega stoletja so razvili novo generacijo pesticidov, tako imenovani neonikotinoidi, z namenom, da nadomestijo organofosfatne pesticide, ki so negativno vplivali na vsa živa bitja, tudi na človeka in na okolje. Njihova slaba lastnost je namreč akutna toksičnost za človeka (Chambers in Levi, 1992).

Pri razvoju novih pesticidov je namreč potrebno upoštevati sledeča dejstva:

- da delujejo pretežno na ciljne organizme, ne pa tudi na neciljne,
- da so biološko razgradljivi,
- da je njihova učinkovitost visoka pri nizkih dozah uporabe,
- da ne razpadajo v toksične produkte,
- da so nestrupeni za okolje.

Neonikotinoidi so nova skupina sintetiziranih organskih spojin. Na tržišču so se pojavili v začetku devetdesetih let prejšnjega stoletja. To so visokosistemski insekticidi, sposobni translacije v rastline preko koreninskega sistema. Na ta način omogočajo zaščito pred različnimi škodljivci skozi daljše časovno obdobje (Cox, 2001).

Med neonikotinoide uvrščamo šest aktivnih snovi, ki so kemijsko podobne nikotinu: imidaklopid, acetamiprid, nitenpiram, tiametoksam, tiaklopid in klotianidin. Glavne skupine teh spojin so lahko nitrometilenska, nitroiminska ali cianoiminska skupina (Matsuda in sod., 2001). Neonikotinoidi so učinkoviti insekticidi s širokim spektrom delovanja. Vsrkajo ga korenine rastlin, nato pa se prek rastlinskega soka prenese po celotni rastlini in tako tudi med njeno rastjo zagotovi zaščito pred škodljivci (Placke in Weber, 1993). Uporabljajo se tako površinsko kot tudi v zemlji, pa tudi za tretiranje semen. Najbolj razširjen in uporabljen med njimi je imidaklopid.

Obstajajo številne poti, prek katerih pesticidi vstopijo v tla: direktna aplikacija v zemljo, škropljenje v kombinaciji z oranjem, izpiranje, itd. Usoda pesticidov v zemlji je odvisna od

mnogih dejavnikov: od bioloških dejavnikov, fizikalno-kemijskih procesov, lastnosti in vrste prsti, količine padavin, vremena, pokritosti tal, od oblike pesticida (vodotopni koncentrat, močljiv prašek, koncentrirana suspenzija) ter raznih dodatkov, kot so površinsko aktivne snovi (surfaktanti) (Gupta in sod., 2002). Najpomembnejši način transporta je vertikalno pronicanje v globlje plasti.

V prsti lahko poteče razgradnja in pretvorba pesticidov ter njegovih ostankov s pomočjo metabolizma živih organizmov ali fotokemično na površini zemlje. Razpolovni čas posameznega pesticida je odvisen tudi od vrste prsti, njene pH vrednosti, uporabe organskih gnojil in pokritosti tal. Na primer za imidakloprid je znano, da se hitreje razgradi v prsti, ki je pokrita z rastjem (razpolovni čas  $t_{1/2}$ = 48 dni), kot pa v tleh, ki niso porasla z vegetacijo ( $t_{1/2}$ = 190 dni) (<http://www.cdpr.ca.gov/docs/empm/pubs/fatememo/imid.pdf>). Potrebno je tudi upoštevati vpliv vegetacije (neporasla, porasla tla), temperaturo in vlažnost tal (Krohn in Hellpointer, 2002).



## **1.1 Glavni cilji:**

- z uporabo aparature Suntest izvesti fotokemijsko razgradnjo imidakloprida v zemlji pri izbranih pogojih osvetljenosti ( $750 \text{ W/m}^2$ );
- optimizirati postopka razgradnje in določanja imidakloprida v vzorcih zemlje (določiti zadostno količino vzorca tako za obsevanje kot tudi za analizo);
- identificirati razgradne produkte imidakloprida v zemlji.

## 2. TEORETIČNI DEL

### 2.1 Neonikotinoidi

Neonikotinoidne insekticide uporabljamo za zaščito rastlin od začetka devetdesetih let. Skladno z Evropsko direktivo o rastlinskih zaščitnih sredstvih (Council Directive 91/414/EEC of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market) delno nadomeščajo organofosfatne insekticide, ki so bili v rabi od 70-ih let prejšnjega stoletja. (FURS, 2004).

Gre za t. i. sistemske insekticide, kar pomeni, da jih vsrkajo listi rastlin, nato pa se prek rastlinskega soka prenesejo po celotni rastlini in tako tudi med njeno rastjo zagotovijo zaščito pred škodljivci (Placke in Weber, 1993).

Razvili so jih na Japonskem v 80-ih letih. So analogi strupa dvoživk iz družine *Dendrobatidae* in nikotina. Kemično so podobni nikotinu – toksinu, ki ga vsebuje tobak (Milevoj, 2007).

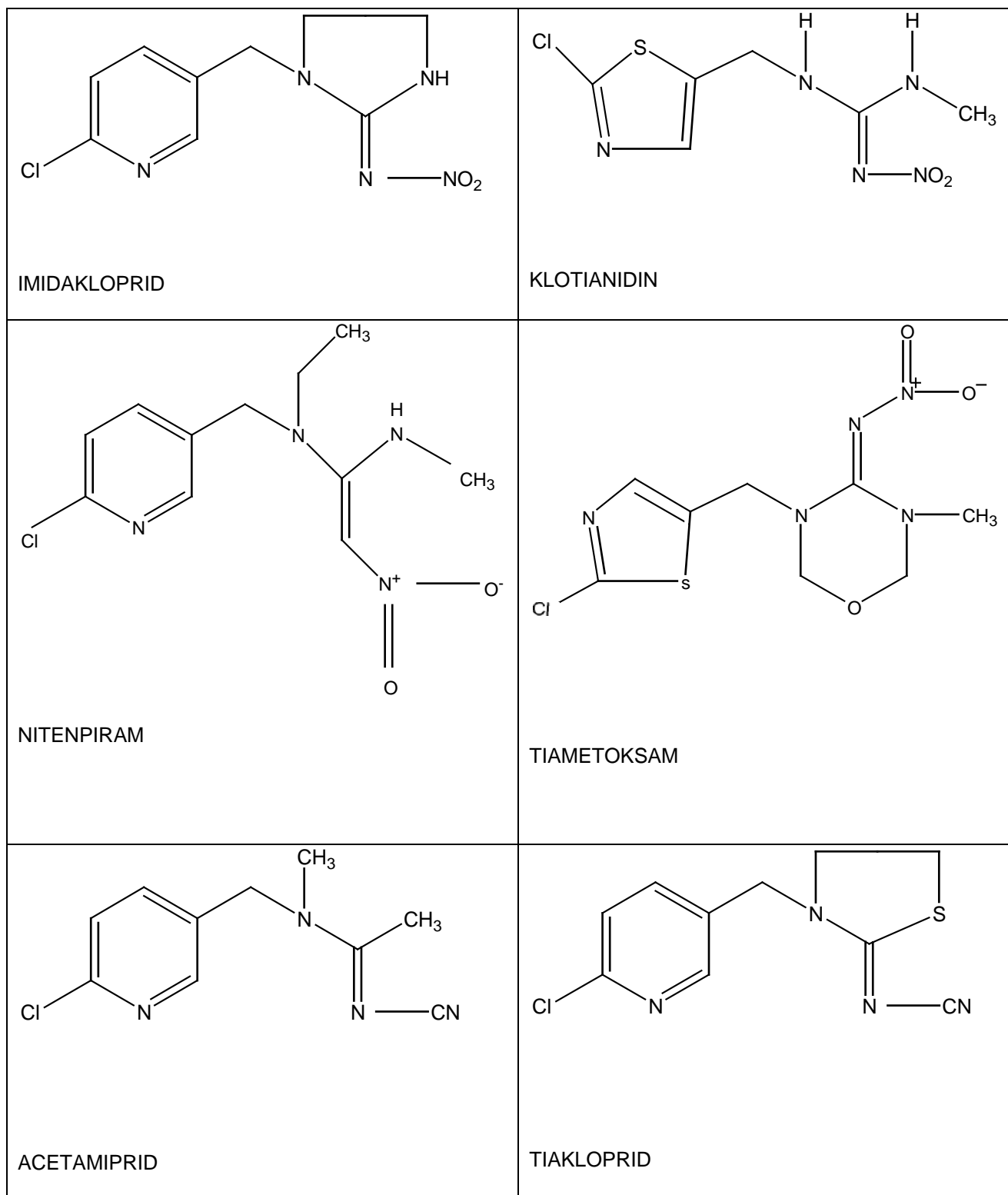
Za razliko od neonikotinoidov je pri nikotinu insekticidna učinkovitost slabo izražena, poleg tega pa je nestabilen in zato neprimeren za kmetijsko uporabo za zaščito semen in listov različnih kultur. Obe skupini, neonikotinoidi in nikotinoidi, delujejo kot agonisti nikotinskih acetilholinskih receptorjev (nAChR) in jih reverzibilno blokirajo. Osnovna razlika v delovanju je v tem, da se nikotinoidi ionizirajo pri fiziološkem pH ter so selektivni za nAChR sesalcev, medtem ko se neonikotinoidi ne ionizirajo pri omenjenem pH in so bolj selektivni za nAChR insektov. Selektivnost neonikotinoidov temelji na drugačni strukturi in farmakoloških lastnostih nAChR insektov in sesalcev. Prav to pa naj bi bil tudi razlog, da so neonikotinoidi za neciljne organizme (vretenčarje) manj strupeni (Tomizawa in sod., 2003).

Po rastlini se širijo akropetalno (po rastlini navzgor), bazipetalno (po rastlini navzdol) in translaminarno (globinsko). Njihovo delovanje na sesajoče/grizoče žuželke je kontaktno, sistemsko, hitro in dolgotrajno. Zaradi podobne strukture z nikotinom uvrščamo imidakloprid in strukturno analogne insekticide (acetamiprid, klotianidin, tiametoksam, nitenpiram in tiakloprid) med neonikotinoide (Milevoj, 2007).

### 2.2 Kemijska zgradba

Strukturno je molekula neonikotinoida sestavljena iz dveh delov. Substituiran aromatski heterociklični obroč je 6-kloropiridinil in predstavlja prvi del pri imidaklopridu, acetamipridu, nitenpiramu in tiaklopridu; 2-klorotiazol pa pri tiametoksamu in klotianidinu. Prvi del aromatskega obroča je preko metilenskega mostička povezan s cianodinamskim delom pri acetamipridu, s cikličnim nitrogvanidinskim delom pri imidaklopridu in tiametoksamu ter s diamionitrometilensko skupino pri nitenpiramu. Močno elektron-privlačna terminalna skupina je prisotna pri vseh neonikotinoidih in je vezana na etensko ali amino skupino (Roberts in Hutson, 1999).

Vsi neonikotinoidi so nehlapne, v vodi dobro topne, polarne in neionizirane molekule pri pH vrednostih med 5 in 9. So zelo mobilni v zemlji, predvsem zaradi njihove visoke polarnosti. Sposobni so tudi translacije v rastline, kar se odraža v veliki učinkovitosti proti sesajočim škodljivcem (Roberts in Hutson, 1999). Slika 1 prikazuje kemijske strukture imidakloprida, klotianidina, nitenpirama, tiametoksama, acetamiprida in tiakloprida.



**Slika 1:** Kemijske strukture imidakloprida, klotianidina, nitenpirama, tiametoksama, acetamiprida in tiakloprida.

## 2.3 Razgradni procesi v zemlji

Pesticidi pridejo v zemljo z direktno aplikacijo, s škropljenjem, z izpiranjem, itd. Po aplikaciji so pesticidi podvrženi številnim dejavnikom. Njihova mobilnost v tleh in prenos v druge dele okolja (atmosfera, vodna telesa) sta odvisna od mehanizmov in kinetike sorpcijskih in desorpcijskih lastnosti posameznih delcev tal (Moorman in sod., 2001) ter številnih dejavnikov, ki so navedeni v Tabeli 1. Obnašanje pesticidov v tleh je odvisno od različnih dinamičnih fizikalnih, kemijskih in bioloških procesov, ki jih privzemajo rastline, vključno s sorpcijo-desorpcijo, z izhlapevanjem, s kemijsko in biološko razgradnjo, z odtokanjem in z izpiranjem. Ti procesi neposredno vplivajo na prenos pesticidov v tla in njihov prenos iz tal v vodo, zrak ali hrano. Pomen teh procesov pa se spreminja glede na kemijsko naravo pesticida in lastnosti tal (Linn in sod., 1993).

Pomembna procesa, ki vplivata na mobilnost in na pretvorbe pesticidov v tleh, sta tudi razgradnja in absorpcija. Razgradnja je bistvenega pomena, nanjo vplivajo tako abiotiki kot tudi biotski dejavniki (encimske katalize z mikroorganizmi). Vključuje zapletene mehanizme in različne interakcije med mikroorganizmi, sestavinami zemlje in pesticidi (Topp in sod., 1997).

Na hitrost razgradnje vplivajo tudi fizikalno-kemijske lastnosti tal (pH, vsebnost organskega ogljika) in biološke lastnosti (aktivnost in distribucija mikroorganizmov in okoljski pogoji, ki uravnavajo temperaturo tal ter vsebnost vlage). Odvisna pa je tudi od lastnosti kemikalije. Pesticidi vsebujejo bodisi bazične bodisi kisle funkcionalne skupine (Walker in sod., 2001). Dokazano je, da je razgradnja mnogih nevtralnih spojin hitrejša pri višjem pH-ju. Pri ionskih spojinah, kjer se moč sorpcije zmanjša, se hitrost za razgradnjo poveča s povečanjem pH zemlje. Izjemoma v primeru, ko prevladujejo abiotični dejavniki, višji pH negativno vpliva na stopnjo razgradnje (Kah in Brown, 2006).

Sorpcija igra ključno vlogo pri razpršenem prenosu gibanja, obstojnosti, preoblikovanju in bioakumulaciji pesticidov (De Jonge in sod., 1996). Sorpcijo nevtralnih spojin je raziskal tudi Gao (Gao in sod., 1998) in opazil, da je v veliki meri odvisna od vsebnosti organskih snovi v tleh, kar se je kasneje izkazalo za ključno pri določanju neionskih pesticidov (Ahmad in sod., 2006). Sorpcija šibkih organskih kislin je odvisna od pH tal (Clausen in Fabricius, 2002), delno zaradi svojega kislinsko-bazičnega ravnotežja (Wauchope in sod., 2001), delno zaradi učinkov pH na druge lastnosti tal, kot so električni naboj in ionska moč. Druge sestavine zemlje, poleg huminskih kislin tudi glina in Fe-oksidi, so pomembni sorbenti ionskih pesticidov (Clausen in Fabricius, 2002)

Balmer (Balmer in sod., 2000) je 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 zelo omejen z debelino plasti zemlje in z območjem valovnih dolžin v vidnem delu sončnega spektra. Huminske kisline, kompleksne organske molekule, ki so produkt razgradnje rastlin in živali v zemlji, lahko bodisi izboljšajo, bodisi zavirajo fotolizo (Fu in sod., 2005).

Na proces razgradnje pesticidov pomembno vpliva tudi tekstura tal. Goncalves in sod. (2006) so pokazali, da na hitrost razgradnje vpliva poroznost, ki pospeši razgradnjo v zgodnji fazi obsevanja. Če so prisotni večji delci prsti, je tudi več vmesnih prostorčkov za pronicanje in razprševanje svetlobe, kar pospeši proces fotorazgradnje.

**Tabela 1:** Dejavniki, ki vplivajo na usodo pesticidov v tleh, vir: [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)

Lastnosti FFS	DEJAVNIKI OKOLJA		Kmetijske tehnike
	Lastnosti tal	Klimatske razmere	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- parni tlak</li> <li>- polarnost spojin</li> <li>- obstojnost FFS v tleh</li> <li>- topnost</li> <li>- polarnost</li> <li>- absorpcijske lastnosti</li> <li>- pH</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- tekstura tal</li> <li>- volumska gostota tal</li> <li>- organska snov</li> <li>- mikrobiološke lastnosti (biomasa, struktura in aktivnost mikrobnih združb)</li> <li>- struktura tal</li> <li>- pH tal</li> <li>- globina tal</li> <li>- nagib</li> <li>- poraščenost tal (intercepcija)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- padavine (intenziteta, količina in razporeditev padavin skozi leto)</li> <li>- temperatura zraka in tal</li> <li>- vlažnost zraka</li> <li>- evapotranspiracija</li> <li>- sončno sevanje</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- način nanosa FFS</li> <li>- odmerki FFS</li> <li>- lastnosti gojene rastline (setev, razvojne faze rastlin, kolobar)</li> <li>- obdelava tal</li> <li>- namakanje (vrsta, intenziteta)</li> </ul>

### 2.3.1 Fotorazgradnja pesticidov

Veliko raziskav obravnava uporabo sončne in UV-svetlobe za razgradnjo pesticidov v zraku, vodi in tleh. Z obsevanjem s svetlobo ustrezne valovne dolžine lahko znotraj molekule povzročimo fotokemijske spremembe. Valovne dolžine vidnega spektra obsegajo med 400 in 800 nm, valovne dolžine UV-območja pa med 400 in 172 nm. UV-območje se deli na 4 razrede: UV-A (dolgovalovna svetloba), UV-B, UV-C (kratkovalovna svetloba) in VUV (vakuumska ultravijolična svetloba). Za raziskave v laboratorijih se uporablja visokotlačne živosrebrove ali ksenonove žarnice z emisijo v bližnjem UV-območju, ki predstavljajo vir UV-svetlobe (Litter, 2005).

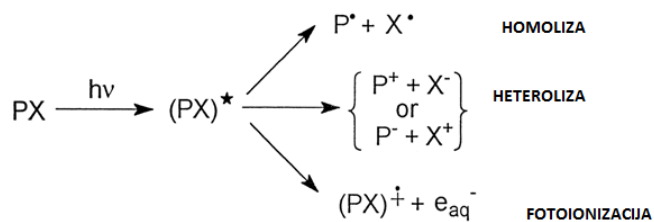
Fotorazgradnja poteče, ko molekula (običajno onesnažilo) sama absorbira svetlobo ali pa se oksidira preko fotoinduciranih procesov aktivnih skupin (hidroksilni radikali, singletni kisik, ...) (Cooper, 1991).

Fotorazgradne študije pesticidov (pretežno v vodi) so bile opravljene v štirih kategorijah: fotoliza, fotoinducirana razgradnja in fotokatalitična razgradnja, ki vključuje tudi razgradnjo s hidroksilnimi radikali.

### 2.3.2 Fotoliza

Velika večina pesticidov (med njimi tudi imidakloprid) absorbira svetlobo v UV-Vis območju na relativno kratki valovni dolžini. Ker sončna svetloba, ki doseže zemljino površino (predvsem UV-A, z različnimi količinami UV-B), vsebuje le majhno količino kratkih valovnih dolžin UV-sevanja, je pričakovati, da bo neposredna fotoliza pesticidov le omejenega pomena. Direktno obsevanje vodi k vzbujanju pesticidov od njihovega osnovnega stanja do vzbujenega singletnega stanja, ki lahko kasneje preide v tripletno stanje. Takšna vzbujena

stanja lahko kasneje reagirajo v naslednjih procesih: homolizi, heterolizi ali fotoionizaciji (Burrows in sod., 2002) in so prikazana na sliki 2.



**Slika 2:** Možne poti razgradnje preko direktne fotolize (Burrows in sod., 2002)

S homolizo nastanejo radikali, ki zaženejo verižno reakcijo, pri čemer nastanejo končni produkti. Dodatna reakcija v prisotnosti kisika proizvaja superoksidne radikale:

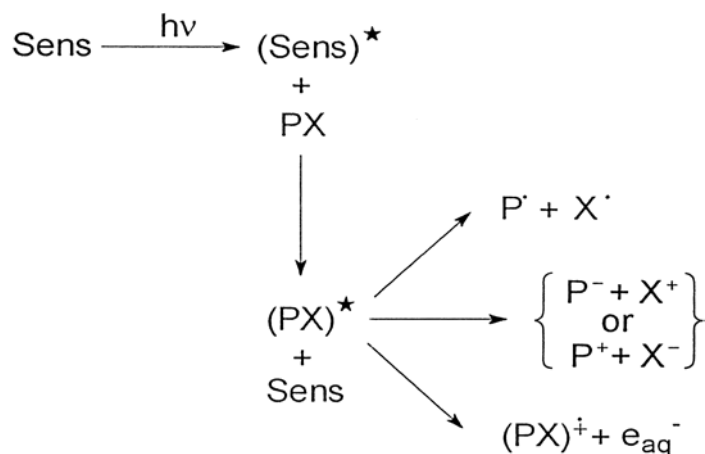


Superoksidni radikal nima velike oksidacijske moči, vendar je vseeno zmožen reagirati z aromatskimi spojinami (Litter, 2005).

### 2.3.3 Fotoinducirana razgradnja

Fotoinducirana razgradnja temelji na absorpciji svetlobe druge molekule, ki kasneje prenese energijo iz svojega vzbujenega stanja na onesnažilo. Vzbujanje s svetlobo (fotovzbujanje) lahko vključuje tudi redoks-reakcije, kot je foto-Fentonova reakcija, kjer prenos elektrona ali atoma povzroči nastanek prostih radikalov (Stangroom in sod., 1998; Aguer in Richard, 1996; Burns in sod., 1997; Canonica in Freiburghaus, 2001).

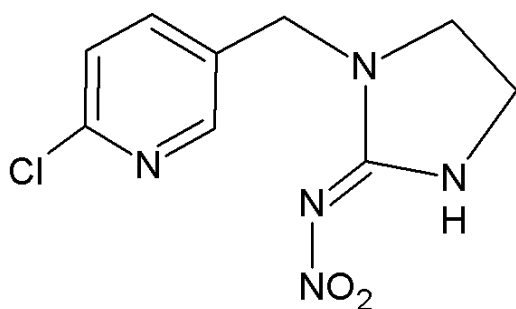
Pomembna prednost fotoinducirane razgradnje je uporaba daljših valovnih dolžin od tistih, ki ustrezajo absorpcijskim lastnostim onesnažil. Slika 3 prikazuje kemični potek z uporabo fotoinducirane fotolize.



**Slika 3:** Kemični potek z uporabo fotoinducirane fotolize (Burrows in sod., 2002)

## 2.4 Imidakloprid

Imidakloprid je relativno nov insekticid, ki ga proizvaja družba Bayer CropScience AG. Od njegove uvedbe na trg leta 1991 so bili proizvodi z imidaklopridom odobreni v skoraj 120 državah za uporabo na več kot 140 kmetijskih pridelkih. Imidakloprid se prodaja pod različnimi imeni, vključno s Confidorjem in Gaucho (Bayer CropScience, <http://www.bayercropscience.com>). Slika 4 prikazuje kemijsko strukturo imidakloprida.



**Slika 4:** Kemijska struktura imidakloprida

### 2.4.1 Uporaba

Imidakloprid je sistemski insekticid, ki se pogosto uporablja v kmetijstvu za zatiranje insektov, za obdelavo zemlje in za zdravljenje listov različnih pridelkov ter sadovnjakov. Uporablja se tudi za zatiranje ščurkov in termitov. Najdemo ga celo za zatiranje insektov v gospodinjstvih prostorih (Cox, 2001).

Ima zelo širok spekter uporabe, saj ga je mogoče uporabljati pri obdelavi tal proti termitom, za zaščito semena, npr. oljne ogrščice, bombaža, koroze, sončnice, sladkorne pese, za foliarno škropljenje tobaka, kave, sadja in zelenjave in drugih kmetijskih pridelkov (Elbert in sod., 1998).

Imidakloprid najdemo na našem tržišču v pripravkih z različnimi trgovskimi imeni:

- Confidor SL 200 (za škropljenje sadja, zelenjave in okrasnih rastlin; imidakloprid 20 %; od 22. 06. 1995; uporabljamo ga: na hmelju za zatiranje hmeljeve uši (*Phorodon humuli*), na jablanah za zatiranje listnih uši (Aphididae), na hruškah in češnjah za zatiranje listnih uši (Aphididae), na slivah za zatiranje listnih uši (Aphididae), na jablanah in hruškah za zatiranje sadnega listnega duplinarja (*Leucoptera scitella*) in sadnega listnega zavrtača (*Lyonetia clercella*), na hruškah za zatiranje hruševe bolšice (*Psylla* spp.), na breskvah za zatiranje listnih uši (Aphididae) in resarjev (Thripidae), na paradižniku, papriki in jajčevcu za zatiranje listnih uši (Aphididae), rastlinjakovega ščitkarja (*Trialeurodes vaporariorum*) in resarjev (Thripidae) (Bayer CropScience, <http://www.bayercropscience.com>);
- Kohinor SL 200 (za škropljenje sadja, zelenjave in okrasnih rastlin).

## 2.4.2 Delovanje imidakloprida

Imidaklopid deluje na živčni sistem insektov. Aktivna snov se prenaša po rastlini in na ta način deluje na veliko število škodljivcev.

Uporabljamo jo lahko kot foliarni insekticid ali za tretiranje 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) (FURS, 2004).

Acetilholin ima v telesu funkcijo prenosa signala med živčnimi celicami ali med živčnimi celicami in tkivom. Na receptorska mesta v živčnem sistemu se imidaklopid zaradi svoje oblike, naboja in velikosti prilega na receptorska mesta v živčnem sistemu, ki spremljajo molekule acetilholina (Cox, 2001). V nasprotju z organofosfatnimi pesticidi, ki delujejo kot zaviralci encima acetilholinesteraze (AChE), je imidaklopid zelo strupen za žuželke, z relativno nizko toksičnostjo za sesalce. (Chao in Casida, 1997).

## 2.4.3 Fizikalno-kemijske lastnosti

Fizikalno kemijske lastnosti imidakloprida so prikazane v tabeli 2.

**Tabela 2:** Fizikalno-kemijske lastnosti imidakloprida,  
vir: (<http://extoxnet.orst.edu/pips/imidaclo.htm>)

Splošno ime	Imidaklopid
CAS ime	1-[(6-kloro-3-piridinil) metil]-N-nitro-2-imidazolidinimin
IUPAC ime	(EZ)-1-(6-kloro-3-piridilmetil)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine
Empirična formula	$C_9H_{10}ClN_5O_2$
Molekulska masa	255,7 g/mol
Barva	Brezbarven
Agregatno stanje	Brezbarvni kristali
Tališče (°C)	144 (136,4 in 143,8 – odvisno od kristalne oblike)
Gostota (g/mL; 20 °C)	1,543
Kislost in bazičnost	Zelo šibke osnovne lastnosti, ki niso neposredno merljive v vodi
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/100g
Porazdelitveni koeficient (log Pow) (22 °C)	0,57 (Pow =3,72)
Parni tlak (Pa; 20 °C)	$4 \times 10^{-10}$

Ker je imidaklopid fotokemično nestabilen in dobro topen v vodi, ima nizek potencial bioakumulacije v okolju. Ker pa je vodotopen (hidrofilen; porazdelitveni koeficient  $\log P_{ow} = 0,57$ ) in netopen v lipidih, je nevarnost bioakumulacije v bioloških tkivih in biokoncentracije vzdolž prehranjevalne verige majhna (Krohn in Hellpointer, 2002).



#### 2.4.4 Kinetika in metabolizem imidakloprida

Kinetika imidakloprida pri sesalcih in koristnih žuželkah je povzeta v tabeli 3. Na splošno se imidakloprid zlahka absorbira, hitro izloča ter se ne bioakumulira v živih bitjih.

**Tabela 3:** Presnova imidakloprida pri sesalcih in koristnih žuželkah

	Žival	Podatek
Absorbcija	Podgana	Prekomerno absorbira (>92 %) iz prebavil (Klein, 1987; Solecki, 2001)
Razširjenost	Podgana	Lahko se porazdeli med tkiva in organe, razen maščobnih tkiv, centralnega živčnega sistema in mineralnih delov kosti ( Klein, 1987; Solecki, 2001)
	Čebela	Najnižje koncentracije imidakloprida in metabolitov v hemolimfi, najvišje koncentracije v danki (Klein, 1987; Solecki, 2001)
Akumulacija	Podgana	Ni znakov za bioakumulacijo (Klein, 1987; Solecki, 2001 )
Kopičenje	Podgana	>92 % odmerka se izloči preko ledvic in z blatom (večinoma iz želodca) v roku 48 ur po odmerku (Klein, 1987; Solecki, 2001)
	Čebela	(DT50) je 25 h (Klein, 1987; Solecki, 2001)
Biotransformacija	Podgana	Hitra presnova: nespremenjena spojina 10–16 %; glavni metabolit se izloča preko urina in blata: 6-kloronikotinska kislina in njen konjugat glicina, 4- in 5-hidroksi-imidakloprid in olefin (Klein, 1987; Solecki, 2001)
	Čebela	Razpolovni čas je 20 min; presnova imidakloprida v 4- ali 5-hidroksi-imidakloprid, 4,5-dihidroksi-imidakloprid, 6-kloronikotinska kislina in derivati olefin ter sečnine (Suchail in sod., 2004)

#### 2.4.5 Strupenost imidakloprida

Strupenost imidakloprida je bila dobro raziskana na sesalcih, pticah, kopenskih nevretenčarjih in vodnih organizmih.

Ptice so bolj občutljive na imidakloprid kot sesalci. Pri pticah imidakloprid povzroča nevrotoksičnost in škodljive vplive na preživetje in rast pri kronični izpostavljenosti. Med koristnimi kopenskimi nevretenčarji (npr. čebele) imidakloprid pri nizkih odmerkih povzroči umrljivost in škodljive učinke na čebele (LOAEL=1,5 ng/čebelo) (SERA, 2005). Pri dvoživkah lahko imidakloprid povzroči kromosomske in DNA-poškodbe pri izpostavljenosti 8 mg/L v 7 dneh (Feng in sod., 2004). Pri ribah so zmanjšano rast opazili pri 2,3 mg /L po 96 dneh izpostavljenosti (SERA, 2005). Najbolj občutljive na imidakloprid pa so bile ličinke komarju podobnih žuželk vrste *Chironomus tentans*, kjer je znašala LC50=0,0105 mg /L (SERA, 2005).

Oralna izpostavitvev imidaklopridu v enem samem odmerku 200 mg/kg ali več je povzročila kar nekaj funkcionalnih motenj pri podganah, te motnje pa so se zmanjšale po 6 dneh. Pri odmerkih 380–650 mg/kg telesne mase je polovica poskusnih podgan umrla. Smrtna doza

pri miših je bila precej nižja (LD50: 130–170 mg/kg telesne teže) (Bomann, 1989; Solecki, 2001).

Za čebele je najnižji NOAEL znašal 0,013 mg/kg telesne teže (akutno). V neposredni bližini škropljenja in pri 100 % absorpciji so ocenili dnevni odmerek imidakloprida na 64 mg/kg telesne teže (SERA, 2005).

Za ribe, konkretno za šarenko, znaša NOAEC 1,2 mg/L (96 dni). Ocenjena onesnaženost površinskih voda, ki se lahko zgodi pri uporabi imidakloprida z dozo 0,2 kg/ha, v razponu do 300 m iz smeri vetra znaša do 0,01 mg/L in to v primeru, da se neposredno škropi (SERA, 2005). Te koncentracije izpostavljenosti so ocenjene za 2 m globoke ribnike (spiranje z onesnaženih tal ni vključeno).

#### 2.4.6 Izpostavljenost

Imidakloprid se uporablja kot aktivna snov v različnih pripravkih (Confidor SL 200), ki se uporabljajo tako za foliarno nanašanje kot tudi za tretiranje semen (Gaucho FS 350, trenutno prepovedan). Delavci v kmetijstvu in sadjarstvu so lahko izpostavljeni med mešanjem ali razprševanjem preko dihal, prebavnega trakta ali preko kože in oči. Imidakloprid se uporablja tudi v veterinarske namene za nadzor bolh, kar povzroča večjo izpostavljenost ljudi z dotikom hišnih ljubljencev. Živali, kot so čebele, so izpostavljene pripravku preko nektarja ali cvetnega prahu (FURS, 2004).

#### 2.4.7 Imidakloprid v okolju

##### 2.4.7.1. Rastline

Imidakloprid se hitro absorbira skozi korenine v trsni sladkor (približno 50), medtem ko vnos v krompir, riž ali koruzo ne presega 20 % (Schmuck, 1999). Asimilacija skozi listje je nizka, vendar se poveča na 80 % z nekaj dodatki. Najvišja koncentracija imidakloprida in njegovih metabolitov se lahko pričakuje v listih. Le 1,2–1,4 % asimiliranega imidakloprida se pričakuje na cvetnem prahu ali nektarju (Schmuck, 1999). Uporabljeni imidakloprid za tretiranje semen ostane v tleh skozi celotno vegetacijsko obdobje.

##### 2.4.7.2. Voda

Imidakloprid je stabilen v vodi pri pH 4–9, v sterilnih pogojih in odsotnosti svetlobe (Krohn in Hellpointer, 2002). S študijo z radioaktivno označenim imidaklopridom (v odsotnosti svetlobe) so določili razpolovni čas (DT50) 30 dni v aerobnih pogojih in 27 dni v anaerobnih pogojih. DT50 vrednost za imidakloprid v sedimentih znaša 130–160 dni (Krohn in Hellpointer, 2002).

Imidakloprid ne hidrolizira v kislem ali nevtralnem, se pa hidroliza povečuje v alkalnih pogojih in s povišano temperaturo (Zheng in sod., 1999). Raziskave so pokazale, da je pri pH 7 le 1,5 % imidakloprida hidroliziralo v treh mesecih, medtem ko je pri pH 9 hidroliziralo 20 % imidakloprida (Zheng in Liu, 1999). Ugotovili so tudi, da hidroliza povzroča nastanek imidaklopridijevega metabolita 1-[(6-kloro-3-piridinil)metil]-2-imidazolidona, ki se lahko kasneje razcepi s pomočjo oksidativne cepitve vezi N-C med piridinom in imidazolidinom. Kot

produkti nastajajo anorganski ioni in molekule, ki okolju niso škodljivi: CO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in Cl<sup>-</sup> (Zheng in Liu, 1999).

Tudi fotokemijske pretvorbe v vodi so bile predmet raziskav številnih skupin. Tako je Moza in sod. (1998) obseval imidakloprid s svetlobo valovne dolžine 290 nm, pri čemer se je v 4 urah razgradilo 90 % le-tega. Glavni produkti so bili 6-kloronikotinaldehid, N-metilnikotinamid, 1-(6-kloronikotinil)imidazolidon in 6-kloro-3-piridilmetil etilendiamin (Moza in sod., 1998).

Fotokemijsko razgradnjo imidakloprida s sončno svetlobo so študirali tudi na površini paradižnikovih listov, pri čemer je bila fotorazgradnja izredno hitra, identificirali pa so štiri produkte (Scholz in Reinhard, 1999).

Kole in sod. (1999) je preučeval UV-fotolizo (240–260 nm) imidakloprida v 10-procentni raztopini acetonitrila v vodi. Identificirali so tri produkte, za katere so sklepali, da so nastali s cepitvijo N-NO<sub>2</sub> vezi, hidrosiliranjem imidazolijevega obroča in oksidativno cepitvijo metilenskega mostička.

Ugotovljeno je bilo tudi, da obsevanje imidakloprida v vodi pri pH 7 s ksenonovimi lučmi vodi do razgradnje imidakloprida. Polovica imidakloprida se je namreč razgradila v 57 minutah, identificirali pa so devet metabolitov, med njimi ciklični guanidinijev derivat, sečnino, olefinski guanidin in dva produkta s kondenziranimi obročnima sistemoma (Roberts in Hutson, 1999).

Fotolizo imidakloprida so študirali tudi na fitofarmaceutskem pripravku Confidor v pitni vodi (Wamhoff in Schneider, 1999). Identificirali so več razgradnih produktov, med katerimi je bil glavni 1,6-dikloro-3-piridinil-metil-2-imidazolidinon.

#### 2.4.7.3 Zrak

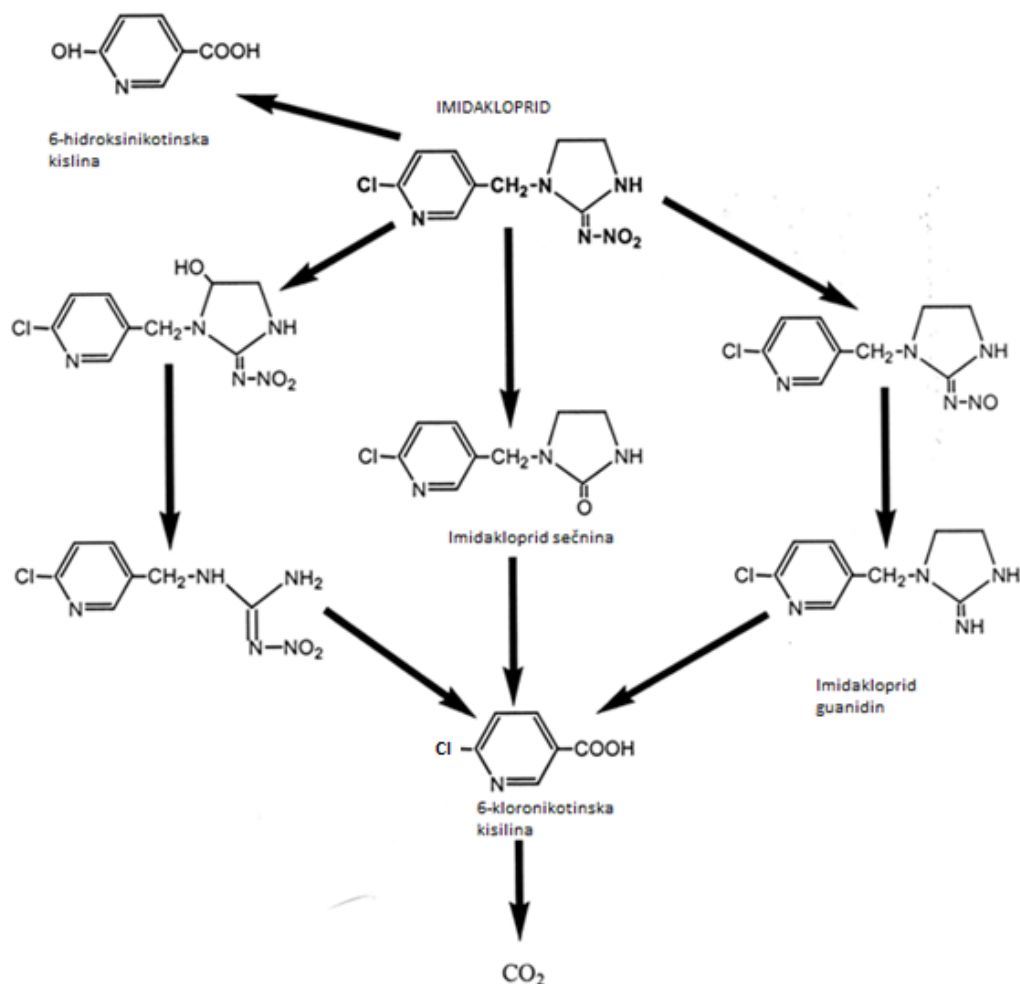
Nizek parni tlak kaže, da je imidakloprid nehlapen, zato je malo verjetno, da bo razpršen po zraku na velikem področju zaradi izhlapevanja. Ko je prisoten v zraku v plinasti obliki ali areosolih, se hitro razgradi pod vplivom sončne svetlobe (Krohn in Hellpointer, 2002).

#### 2.4.7.4 Razgradnja imidakloprida v prsti

Razgradnja in pretvorba imidakloprida in njegovih ostankov v prsti lahko poteka preko metabolizma živih organizmov, na površini zemlje pa tudi fotokemično. Glavni način transporta je vertikalno pronicanje v vedno globlje plasti, kjer lahko doseže podtalnico (Gupta in sod., 2002).

Možne poti razgradnje imidakloprida v prsti so prikazane na sliki 3, ki je povzeta po literaturi (Bacey, 2000). Pod različnimi vremenskimi pogoji se spreminja tudi razpolovna doba imidakloprida v tleh in znaša od 27 do 229 dni (Bacey, 2000). Npr. organska gnojila povečajo absorpcijo na organske snovi in podaljšajo razpolovno dobo do 40 dni. Ko je bil uporabljen le kravji gnoj, se je razpolovna doba podaljšala do 124 dni. Imidakloprid se razgradi hitreje pod vegetacijo z razpolovno dobo 48 dni, brez vegetacije le-ta znaša 190 dni. V odsotnosti svetlobe se razpolovna doba poveča iz 39 dni na 229 dni (Bacey, 2000). Visoka topnost v vodi in nizek log Pow kaže majhno možnost absorpcije imidakloprida na zemeljske delce in večjo možnost pronicanja v podtalnico. Koeficient sorpcije za imidakloprid je v razponu od 109 (peščena ilovica) do 411 mL/g (pesek), zato so ga določili kot srednje mobilnega v tleh, z možnostjo globljega prodora v tla (Krohn in Hellpointer, 2002). Imidakloprid so odkrili že v podtalnici (5,5 m pod površino zemlje, peščene ilovice, v koncentraciji 1 mg/L (Bacey, 2000).

Imidakloprid ima nizek potencial bioakumulacije v okolju. Na to kaže relativno nizka vrednost Kow (3,7) in hitra razgradnja imidakloprida v prsti, odvisno od svetlobnih razmer. Prav tako ne izkazuje sposobnosti vezave na delce, predvsem zaradi nizkega Koc, ki znaša 132 do 310 dni (Gupta in sod., 2002). Možne poti pretvorbe imidakloprida v prsti so prikazane na sliki 5.



**Slika 5:** Možne poti razgradnje imidakloprida v prsti (Bacey, 2000)

Glavni razgradni produkti imidakloprida v zemlji so 6-kloronikotinska kislina (iz katere sčasoma ob popolni mineralizaciji nastane CO<sub>2</sub>), ciklična urea, 6-hidroksinikotinska kislina, olefinski ciklični nitroguanidin in nitrozo- ter nitroderivati.

## 2.5 Določanje imidakloprida v zemlji

Najbolj razširjena analizna tehnika za določanje pesticidov je plinska kromatografija. Vendar je za določanje neonikotinoidnih pesticidov neustrezna predvsem zaradi njihove nizke hlapnosti in termične nestabilnosti. Za določanje imidakloprida v okolju so bile razvite različne analitske metode, ki zahtevajo bodisi visoke koncentracije imidakloprida v vzorcih vode ali tal (50-2000 µg/L) bodisi zapletene postopke ekstrakcije pri vzorcih z nizko koncentracijo imidakloprida (Ishii Y. in sod., 1994).

Za analizo neonikotinoidov v prsti se največkrat uporabljajo kromatografske tehnike, ki omogočajo ločevanje in določevanje (kvalitativno in kvantitativno) ozko sorodnih komponent v kompleksnih vzorcih. Eden takih je tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC). Uporablja se za določanje koncentracije imidakloprida in njegovih razpadnih produktov. Glavne vrste detektorjev so detektor na diodno vrsto (DAD) in masni selektivni detektor (MS). Pri študiji Baskaran (Baskaran in sod., 1997) so za HPLC analizo uporabili mobilno fazo acetonitril : voda v razmerju 20 : 80. Pri tem so vzorce prsti predhodno ekstrahirali trdno-tekoče z acetonitrilom (acetonitril : voda, 80 : 20) (Baskaran in sod., 1997).

GC-MS je plinska kromatografija z masnim spektrometrom, s katerim se določa razpadne produkte imidakloprida. Za GC-MS analizo je potrebna predhodna ekstrakcija teh vzorcev. Zaradi nizkega parnega tlaka so imidakloprid predhodno pretvorili v hlapno spojino (Vilchez in sod., 1996).

Za določanje radiokemične čistosti so v zemlji, onesnaženi z imidaklopridom, uporabili tankoplastno kromatografijo (TLC). Predhodno so bili vzorci raztopljeni z acetonitrilom in hranjeni pri temperaturi -18 °C (Oi, 1999).

Pri študiji Ruiz de Erenchun in sod. (1997) so za analizo imidakloprida in njegovih produktov uporabili tekočinsko kromatografijo z detektorjem v UV-območju. Meja detekcije je znašala 0,01–1,0 mg/kg. Amperometrični detektor pri LC je mogoče uporabiti v oksidativnem ali redukcijskem načinu. Redukcijska amperometrična detekcija zahteva živosrebrove elektrode za razširitev uporabljenega potencialnega območja na negativne potenciale. Uporabili so Ag/AgCl-elektrodo za visoko selektivno-reduktivno amperometrično določanje insekticidov. Vsi vzorci so bili predhodno ekstrahirani z acetonitril-metanol-voda (3 : 2 : 2) (Ruiz de Erenchun, in sod 1997).

Za določanje imidakloprida in njegovih metabolitov v zemlji so uporabili LC-MS z elektro-razprševanjem. Kromatografska ločitev je potekala z mobilno fazo acetonitril in 0,1 % očetne kisline. Vzorci so bili predhodno ekstrahirani s tekočo-tekočo ekstrakcijo z diklorometanom (Proenca in sod., 2005).

### **3. EKSPERIMENTALNI DEL**

#### **3.1 Reagenti in raztopine**

- imidaklopid 99,9% čistost, Riedel-de Haën
- 2-krat deionizirana voda
- acetonitril, Sigma Aldrich, for HPLC >99,9 %
- metanol

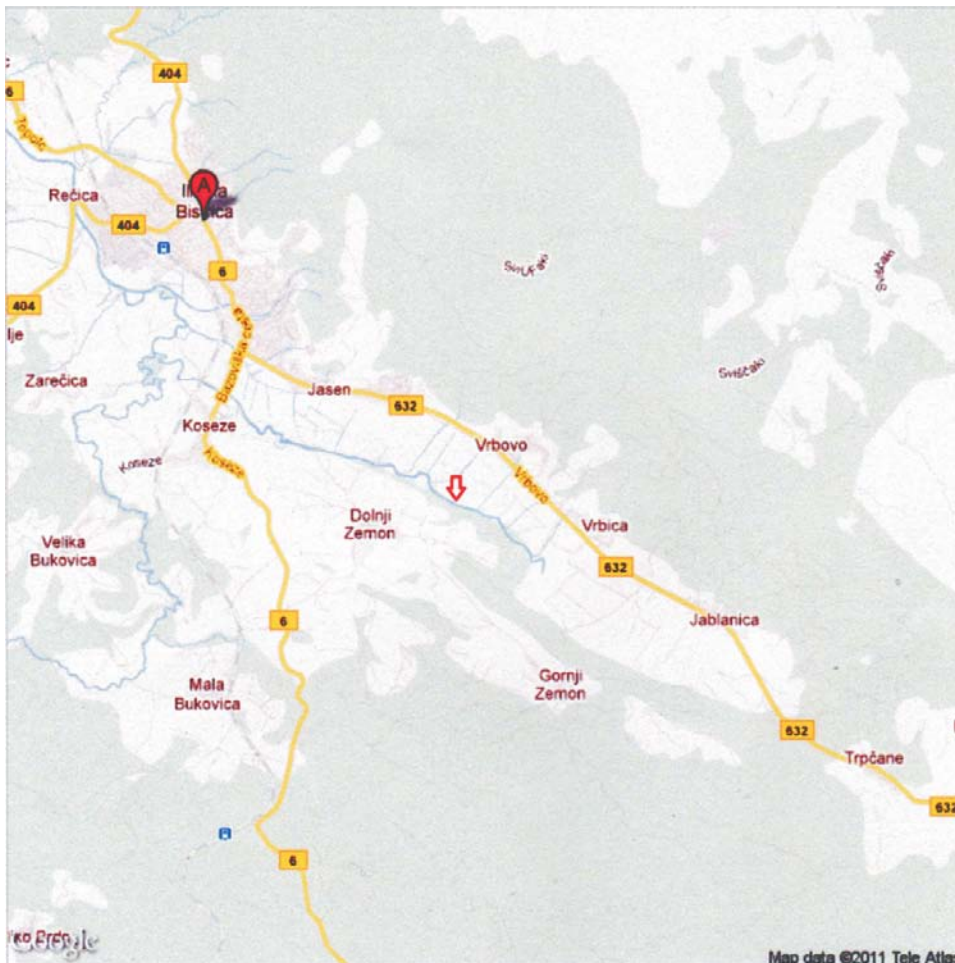
##### **3.1.1 Inštrumenti in oprema**

- pH-meter
- ultrazvočna kopel
- rotavapor

Vzorci zemlje, umetno onesnažene z imidaklopidom, sem obsevala v komori (aparatu Suntest XLS+), ki preko SUNSENSIV™ senzorja posnema sončno sevanje.

Za kvantitativno določanje imidakloprida sem uporabila tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti v kombinaciji z detektorjem z diodno matriko (HPLC-DAD) proizvajalca Agilent (Agilent 1100), medtem ko sem za identifikacijo njihovih razgradnih produktov uporabila tekočinsko kromatografijo z masnim analizatorjem z ionsko plastjo (LC-MS), sicer tekočinski kromatograf LC Perkin Elmer Series 2000 (Schelton, CT, USA), povezan z 3200 Q sistemom TRAP MS in opremljen z elektro-ion spray (ESI).

## 3.2 Odvzem vzorca zemlje



**Slika 6:** Odvzeto mesto vzorca, vir: <http://maps.google.com/>

### 3.2.1 Vzorčenje

Slika 6 prikazuje mesto vzorčenja odvzete zemlje, ki se nahaja v okolici Ilirske Bistrice, na kmetijski površini, ki ni namenjena kmetijski obdelavi. Od glavne ceste Ilirska Bistrica-Podgora je oddaljeno 2 km in 1 km od reke Reke. Vzorec zemlje sem odvzela pod površino, in sicer ob sončnem vremenu, 5. marca 2011, pri temperaturi okoliškega zraka 13 °C, ko že 3 dni ni deževalo. Na izbranem vzorčnem mestu površine 2 m<sup>2</sup> sem odvzela 2 kg zemlje. Področje sem razdelila na 4 kvadrante in iz vsakega odvzela približno 0,5 kg zemlje.

### 3.2.2 Sejanje in sušenje vzorca

Zemljo sem nato odnesla v laboratorij za nadaljnjo obdelavo. Najprej sem jo porazdelila po papirju in počakala nekaj dni, da se je posušila. Nato sem zemljo 2 h sušila še pri temperaturi 120 °C, da sem odstranila odvečno vodo (adsorbirano, absorbirano ali vkleščeno v mikroprostorčkih) ter zemljo sterilizirala. Zemljo sem nato presejala najprej skozi sito 1200 Mw, 800 Dr.St. in nadaljevala sejanje skozi sito velikosti 300 Mw 200 Dr.St DIN Nr. 20.

### 3.2.3 Določanje pH zemlje

Po uspešni kalibraciji pH-metra (s pH 4,0 in 7,0) sem v 100 mL čašo odtehtala 10 g zemlje (m (dejanska)=10.0027 g), dodala 50 mL 1M KCl in 2 h mešala s stekleno palčko ter izmerila pH.

### 3.2.4 Priprava vzorcev za poskus

2 kg nabrane nekontaminirane zemlje sem umetno onesnažila z imidaklopridom s končno koncentracijo 20 mg imidakloprida/kg zemlje. Z mešanjem z neonesnaženo zemljo sem nato pridobila različno onesnaženo zemljo s koncentracijami 10 mg/kg, 5 mg/kg, 2,5 mg/kg in 1,25 mg imidakloprida/kg suhe zemlje.

Delo je potekalo v dveh smereh:

#### a.) Ekstrakcija imidakloprida iz zemlje

Postopek ekstrakcije sem povzela po literaturi (Thuyet in sod., 2009).

Imidakloprid sem ekstrahirala iz zemlje z ročnim stresanjem (5 min) v centrifugirski tubi, tako da sem k 5 g oziroma 100 mg suhe zemlje s koncentracijo imidakloprida 10 mg/kg, 5 mg/kg, 2,5 mg/kg in 1,25 mg/kg suhe zemlje dodala 10 mL acetonitrila. Zmes sem nato postavila še v ultrazvočno kopel za 20 min. Nato sem počakala 1 uro, da se je zemlja v centrifugirki usedla in nato previdno dekantirala acetonitril. Postopek sem ponovila še dvakrat. Ekstrakte sem nato prelila v bučko in uparila acetonitril. V bučko sem dodala 2 mL mobilne faze za HPLC-DAD analizo, in sicer mešanico acetonitrila in vodne raztopine očetne kisline (30 % acetonitrila, 70 % vodne raztopine očetne kisline (1,5 vol.%)). Raztopino iz bučke sem prefiltrirala in vsebino prelila v vialo za HPLC-DAD in LC-MS analizo.

#### b.) Fotorazgradnja imidakloprida

Umetno onesnaženo zemljo (5 g oziroma 100 mg suhe zemlje s koncentracijo imidakloprida 10 mg/kg suhe zemlje sem enakomerno razporedila po stekleni petrijevki s premerom 9 cm in višino 2 cm ter jo postavila v aparat Suntest. Intenziteto svetlobe v njem sem naravnala na 750 W/m<sup>2</sup>, torej na simulirane »poletne« pogoje, ko je intenziteta svetlobe velika. Prvotno smo študijo fotorazgradnje zastavili tako, da bomo testirali različne debeline zemlje in ugotovili, pri kateri količini vzorca dobimo zanesljive rezultate. Ker pa se je v nadaljevanju raziskovalnega dela mentorica odločila, da je za tovrstno raziskavo potrebno raziskovalno delo, preobsežno za diplomsko delo, sem nadaljevala raziskovalno delo le še s testiranjem najmanjše izbrane plasti zemlje. Tako sem v nadaljevanju v petrijevko nanesele 100 mg kontaminirane zemlje z določeno koncentracijo imidakloprida in jo obsevala v različnih časovnih intervalih. Pred obsevanjem vzorcev sem steklene petrijevke dodatno površinsko očistila z etanolom, da sem preprečila in izključila možne negativne vplive (nečistoče na površini) na obsevanje vzorca.

Za obsevanje večje količine zemlje (5 g) sem zatehtala po 2 paralelki vsakega vzorca zemlje (2 x 5 g) in jih obsevala v različnih časovnih intervalih za 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 9 h in 12 h. Za obsevanje manjše količine onesnažene zemlje (100 mg) pa sem zatehtala po 3 paralelke vsakega vzorca (3 x 100 mg) in jih obsevala v različnih časovnih intervalih za 15 min, 30 min, 60 min, 120 min, 150 min, 3 h, 6 h in 9 h. Po končanem obsevanju sem zemljo ekstrahirala po zgoraj razloženem postopku, povzetem po literaturi Thuyet in sod. (2009). Pri ekstrakciji majhne količine zemlje (100 mg) sem namesto 10 mL topila acetonitrila uporabila 2 mL topila in v bučko dodala 1 mL (namesto 2 mL) mobilne faze namenjene za HPLC-DAD analizo.



### 3.2.5 Fotorazgradnja imidakloprida v aparatu SUNTEST

Študija fotorazgradnje je bila opravljena v komori, prikazani na sliki 7. Sončno sevanje se upravlja preko SUNSENSIV™ senzorja v sevalnem območju 300–400 nm/340 nm ali 300–800 nm/LUX. V aparatu je nameščena 1700 W ksenonska žarnica, ki se dodatno zračno hladi. Vgrajen senzor omogoča neposredno določitev in nadzor temperature sevalnega telesa, ki zajema temperaturno območje BST 45 °C. Celotna površina, namenjena izpostavljenosti oz. obsevanju v aparatu Suntest, obsega 1100 mm<sup>2</sup>.

Aparat Suntest za naše vzorce simulira sončen poletni dan z intenziteto sončne svetlobe 750 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 300–800 nm. Petrijevke z enakomerno razporejeno kontaminirano zemljo so bile dane v suntest za fotoobsevanje in izpostavljene sončni svetlobi v časovnih intervalih od 15 min do 12 h.



**Slika 7:** Aparat Suntest.

## 3.3 Priprava raztopin

### 3.3.1 Priprava mobilne faze

V 50 mL bučko sem nalila 15 mL acetonitrila, 525 µL očetne kisline in dolila dvakrat deionizirano vodo do oznake.

### 3.4 Kromatografski pogoji za HPLC-DAD in LC-MS

Spodaj so navedeni kromatografski pogoji za HPLC-DAD, ki sem jih uporabila za analizo koncentracije imidakloprida v prsti:

**Tabela 4:** Kromatografski pogoji za HPLC-DAD

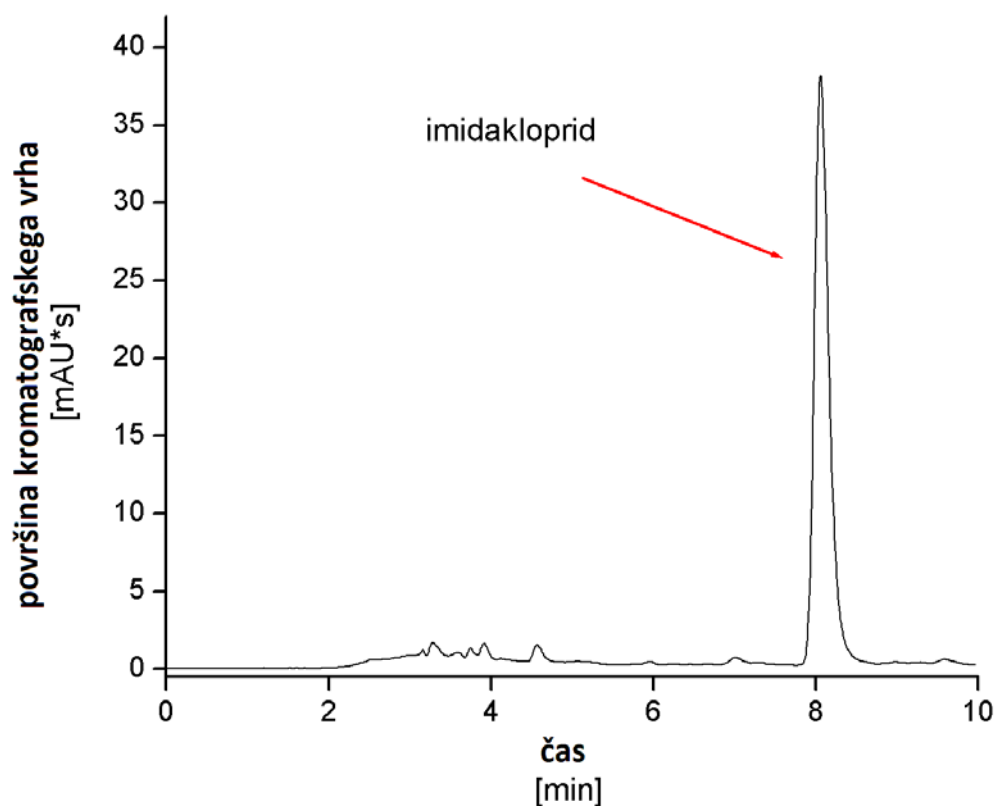
Kolona	Zorbax C8
Volumen injiciranja	75,00 $\mu$ L
Detektor	Diodna matrika (270 nm)
Pretok	1,000 mL/min
Mobilna faza	A = acetonitril (30 %) B = očetna kislina, pH = 3 (70 %)
Elucija	Izokratična
Čas analize	12 min
Temperatura analize	25 °C

#### Kromatografski pogoji za LC-MS

Aparatura: Tekočinski kromatograf LC PerkinElmer Series 2000, proizvajalca Shelton, CT, ZDA. Masni spektrometer, povezan z 3200 Q sistemom TRAP MS in opremljen z elektronsko ionsko plastjo (ESI), proizvajalec Applied Biosystems/Sciex MDS (Foster City, CA, USA). Ločitev je bila dosežena z uporabo kromatografske C8 kolone dimenzij 250 mm x 4,6 mm. Masno-spektrometrična detekcija je bila izvedena v pozitivnem načinu Q3, skenirana iz m/z 60 na m/z 400 v 1 s. ESI vir napetosti je bil 3500 V, DP pa 36 V in temperatura Turbo Ion Spray pri 300 °C. Temperatura kolone je bila 25 °C, pretok: 1 mL/min, volumen iniciranja: 90  $\mu$ L, čas analize: 15 min. Mobilna faza je bila enaka kot pri HPLC-DAD programu.

LC-MS-analize mojih vzorcev je opravila Romina Žabar, ker sama na omenjenem instrumentu nisem smela delati.

## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA



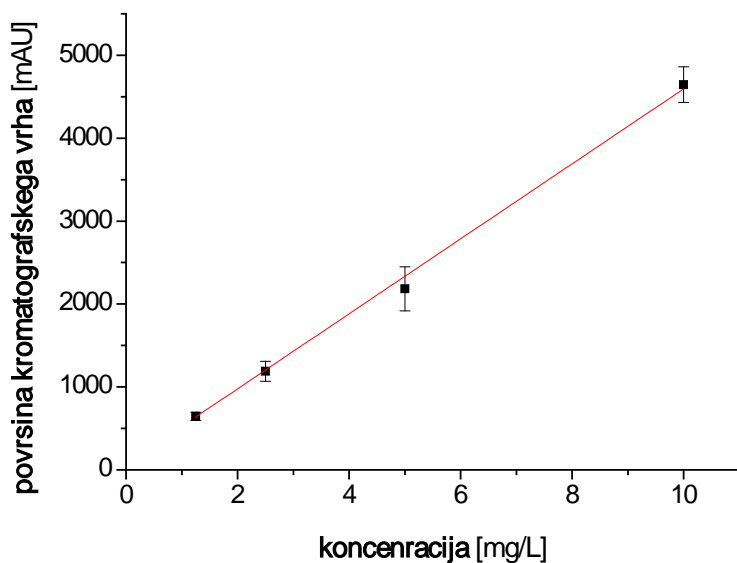
**Slika 8:** Kromatogram ekstrakta imidakloprida iz zemlje (DAD detektor pri 270 nm)

Imidakloprid se izloči iz kolone z retenzijskim časom 8,059 min, pri maksimalni absorpciji 269 nm. Na sliki 8 je prikazan kromatogram ekstrakta imidakloprida iz zemlje posnet na HPLC-DAD.

### 4.1 Ekstrakcija velike in male količine

Ekstrakcijo sem najprej izvedla z veliko količino vzorca onesnažene zemlje 5 g. Zatehtala sem po 5 paralelk vsakega vzorca zemlje (5 x 5 g). Iz umeritvene krivulje na sliki 9 je opaziti lepe odzive pri določenih koncentracijah imidakloprida. Zaradi predebele plasti zemlje v petrijevki po obsevanju v aparatu Suntest sem nato izvedla še raziskavo na manjši količini vzorca onesnažene zemlje 100 mg. Zatehtala sem po 3 paralelke vsakega vzorca zemlje (3 x 5 mg). Obe umeritveni krivulji sta prikazani na slikah 9 in 10. Za višje koncentracijsko območje smo dobili večjo linearnost kot za nižje koncentracijsko območje, vendar je rezultat za preliminarnе rezultate tudi za nižje koncentracijsko območje še v mejah sprejemljivosti ( $R^2 = 0,94822$ ).

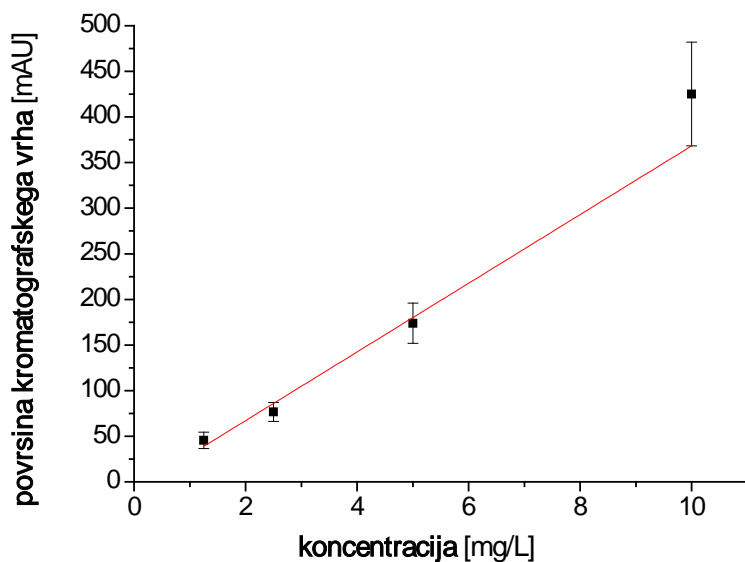
#### 4.1.1 Umeritvena krivulja za imidakloprid pri večji količini (5 g)



**Slika 9:** Umeritvena krivulja za določanje imidakloprida na HPLC-DAD

Enačba umeritvene krivulje je bila  $y = 452x + 73$  z natančnostjo  $R^2 = 0,998$ .

#### 4.1.2 Umeritvena krivulja za imidakloprid pri manjši količini (100 mg)



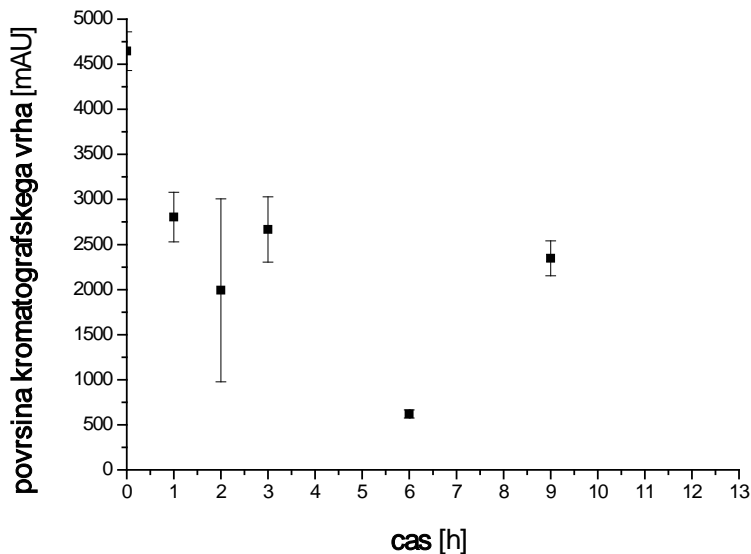
**Slika 10:** Umeritvena krivulja za določanje imidakloprida na HPLC-DAD

Enačba umeritvene krivulje je bila  $y = 37.7x - 8.2$  z natančnostjo  $R^2 = 0,948$ .

## 4.2 Obsevanje večje in manjše količine v aparatu Suntest

### 4.2.1 Fotorazgradnja imidakloprida v prsti (5 g)

Zatehtala sem po 2 paralelki vsakega vzorca zemlje (2 x 5 g). Stehtane vzorce sem dala v petrijevke in postavila v aparat Suntest, kjer sem jih obsevala z intenziteto svetlobe 750 W/m<sup>2</sup>.

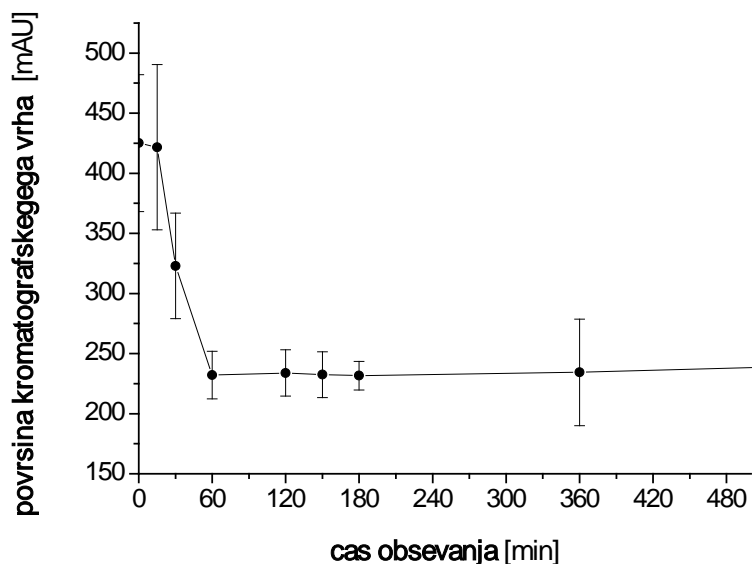


**Slika 11:** Krivulja razpada imidakloprida v prsti (5 g) po obsevanju

Rezultati poskusa razgradnje imidakloprida z debelejšim nanosom zemlje, prikazani na sliki 11, izkazujejo veliko variabilnost. Predvidevamo, da je bila zaradi predebele plasti nanosa zemlje po petrijevki fotorazgradnja imidakloprida neučinkovita z obzirom na dejstvo, da svetloba le malo prodira v zemljo. Čeprav je izmerjena debelina plasti zemlje v petrijevki znašala zgolj 3 mm, rezultati potrjujejo, da je bila plast še vedno predebela. Fotorazgradnja je potekla samo na površini prsti, medtem ko na zasenčeni strani in v globljih plasteh fotorazgradnja ni potekla.

#### 4.2.2 Fotorazgradnja imidakloprida v prsti (100 mg)

Zatehtala sem po 3 paralelke vsakega vzorca zemlje (3 x 100 mg). Stehtane vzorce sem dala v petrijevke in postavila v aparat Suntest, kjer sem jih obsevala s svetlobo intenzitete  $750 \text{ W/m}^2$ .

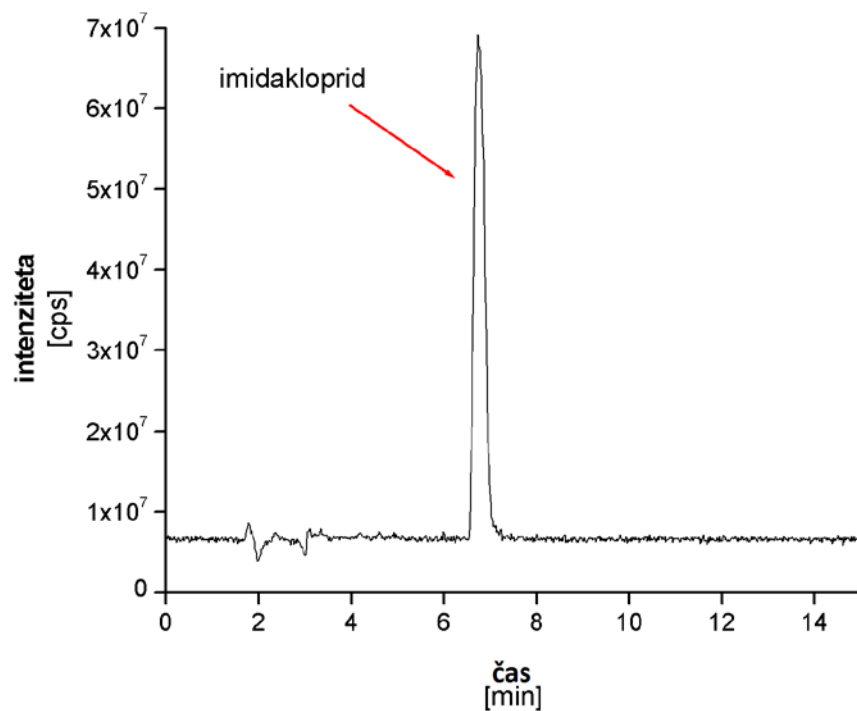


**Slika 12:** Krivulja razpada imidakloprida v prsti (100 mg) po obsevanju

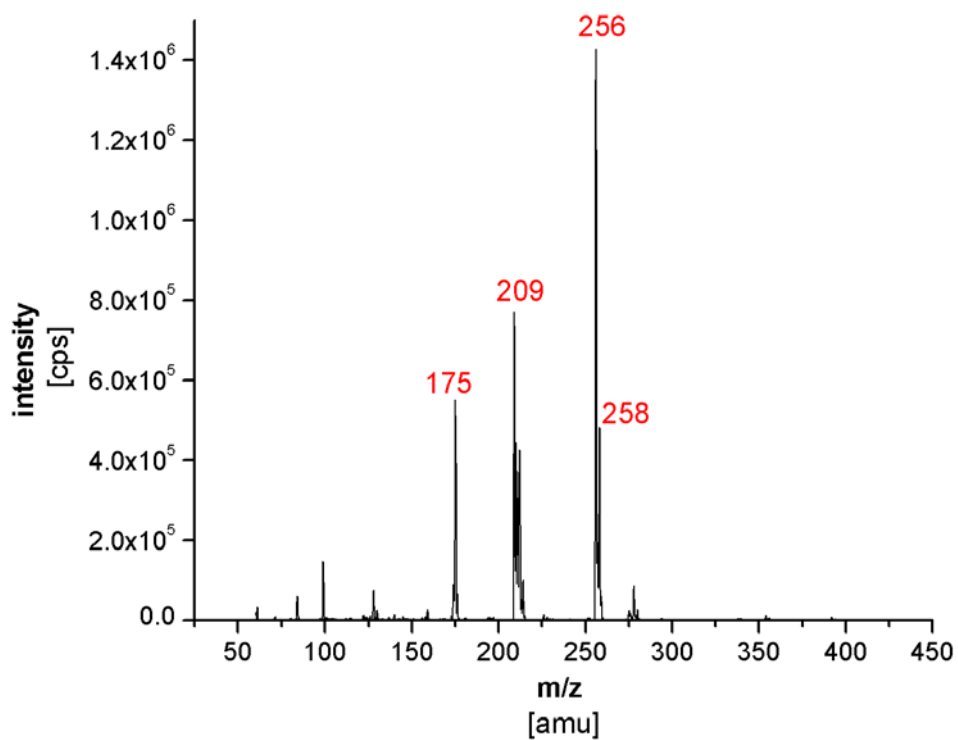
Na sliki 12 je prikazan potek fotorazgradnje imidakloprida v tanjši plasti prsti (masa vzorca 100 mg). Iz grafa lahko sklepam, da se največ imidakloprida razgradi v prvih 60 minutah, nato pa se kljub daljšemu obsevanju njegova koncentracija ne zmanjšuje več, temveč se ustali. Predvidevam, da se je enakomerno razgradil imidakloprid, ki je bil pretežno na površini zemlje, medtem ko se imidakloprid, ki je bil na dnu petrijevke, ni razgrajeval, saj ni bil izpostavljen UV-A svetlobi. Zaradi tanjše plasti zemlje je obstajala tudi večja možnost fotorazgradnje po skoraj vsej površini kontaminiranega vzorca zemlje. Debelina plasti zemlje v petrijevki je znašala namreč v drugem primeru le 1 mm. Vzorce sem obsevala v različnih časovnih intervalih od 15 minut, 30 minut, 60 minut, 120 minut, 150 minut, 180 minut, 360 minut do 9h. Glede na to, da glavni del razgradnje poteka v prvi uri (45,42 % razgradnja imidakloprida), sem želela še dodatno skrajšati intervale obsevanja, in na ta način dobiti natančnejšo krivuljo razpada. Žal pa so krajši časi obsevanja vzorcev težko nastavljivi, saj se mora aparat Suntest stabilizirati, za kar pa potrebuje čas.

### 4.3 Določanje razgradnih produktov imidakloprida v zemlji

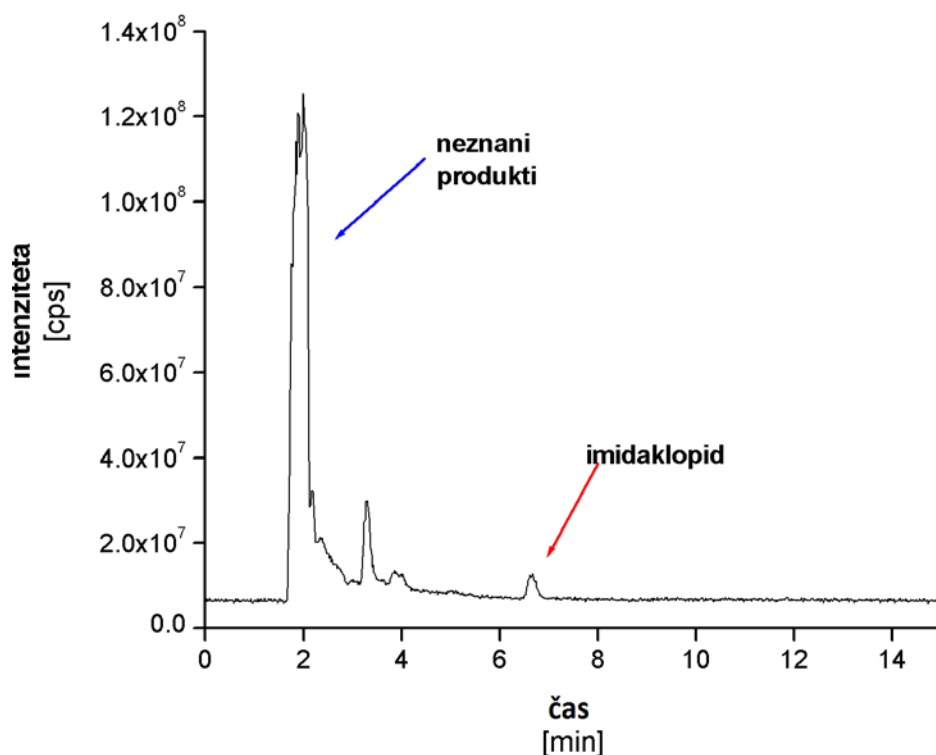
Razgradne produkte imidakloprida smo določali na LC-MS.



**Slika 13:** Kromatografski vrh vzorca imidakloprida brez obsevanja



**Slika 14:** Masni fragmenti imidakloprida brez obsevanja



**Slika 15:** Kromatogram vzorca imidakloprida po 90 minutah obsevanja

Obsevani vzorec za LC-MS analizo sem ekstrahirala na enak način, kot je opisano v poglavju Materiali in metode. Na kromatogramu, prikazanem na sliki 15, lahko vidimo, da je po 90 minutah obsevanja vzorca imidakloprid še vedno prisoten, poleg njega pa neznani razgradni produkti, ki so zelo polarni in so se eluirali z mobilno fazo. Primerjava kromatograma obsevanega vzorca s kromatogrami, posnetimi med fotorazgradnjo imidakloprida v vodi, je pokazala, da v vzorcu nisem detektirala produktov, ki so bili identificirani v primeru fotorazgradnje imidakloprida v vodi. Možna razlaga je, da omenjenih razgradnih produktov, kot je na primer 6-kloronikotinska kislina, s sistemom uporabljenih topil nisem ekstrahirala iz vzorca. V primeru fotorazgradnje imidakloprida v vodi sem namreč za analizo uporabila kar vodne vzorce.



## 5. ZAKLJUČEK

V eksperimentu sem spremljala fotokemično razgradnjo imidakloprida v prsti z uporabo aparata Suntest, ki sem ga uporabila kot vir UV-A svetlobe z intenziteto  $750 \text{ W/m}^2$ .

Vzorec zemlje, umetno onesnažene z imidaklopridom, mi je najprej služil za pripravo umeritvene krivulje. Pred obsevanjem vzorcev zemlje v aparatu Suntest sem pripravila umeritveno krivuljo tako, da sem ekstrahirala vzorce zemlje, ki sem jih pripravila z redčenjem kontaminirane zemlje (s koncentracijo imidakloprida  $20 \text{ mg/kg}$ ) z nekontaminirano zemljo. Vzorci zemlje so tako vsebovali različne koncentracije imidakloprida, od  $10 \text{ mg/kg}$ ,  $5 \text{ mg/kg}$ ,  $2,5 \text{ mg/kg}$  do najnižje  $1,25 \text{ mg/kg}$ . Za pripravo umeritvene krivulje sem najprej uporabila večjo količino ( $5 \text{ g}$ ) vzorca, ki sem ga ekstrahirala z  $10 \text{ mL}$  acetonitrila. Isto količino vzorca ( $5 \text{ g}$ ), kot sem jo uporabila za izdelavo umeritvene krivulje, sem nato enakomerno razporedila po petrijevki in jo obsevala v aparatu Suntest ter spremljala razgradnjo imidakloprida. Pri izpostavljenosti večje količine prsti, nanešene v petrijevki v aparatu Suntest ( $5 \text{ g}$ ), sem ugotovila, da je debelina plasti prevelika in zato razgradnja imidakloprida zelo neenakomerna oz. nemerodajna.

V drugem delu diplomskega dela sem tako obsevala manjšo količino vzorca  $100 \text{ mg}$ . Najprej sem po istem postopku kot pri večji količini izdelala umeritveno krivuljo. Vzorce ( $100 \text{ mg}$ ) sem nato enakomerno razporedila po petrijevki in jih obsevala v različnih časovnih intervalih ter spremljala fotorazgradnjo imidakloprida. Pri vzorcih sem pričakovala večjo fotorazgradnjo imidakloprida po daljšem časovnem obsevanju ( $9 \text{ h}$ ). Vendar so dobljeni rezultati pokazali, da največja fotorazgradnja poteče v prvi frazi obsevanja ( $45,42 \%$  razgradnja), nato pa se z daljšanjem obsevanja ne spreminja več, kar lahko razložimo s tem, da ni ves vzorec enakomerno osvetljen in zato se imidakloprid razgrajuje le na delih, ki jih svetloba doseže.

Za uspešno fotokemijsko razgradnjo imidakloprida oziroma kateregakoli drugega onesnažila v zemlji je najbolj pomembna debelina plasti obsevanega vzorca. Posledica predebele plasti kontaminirane 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.

## 6. VIRI

- Aguer J.P., Richard C. 1996. Transformation of fenuron induced by photochemical excitation of humic acid. *Pestic.* 46, 151–155
- 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, pridobljeno s svetovnega spleta: <http://www.cdpr.ca.gov/docs/empm/pubs/fatememo/imid.pdf>
- 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 Crop Science, pridobljeno s svetovnega spleta: <http://www.bayercropscience.com/> (22.7.2011)
- Blair A., Dosemeci M., Heineman E.F. 1993. Cancer and other causes of death among male and female farmers from twenty-three states. *Am.J. Ind. Med.* 23, 729
- Blair A., Malker H., Cantor K., Burmeister L., Wiklund K. 1985. Cancer among farmers. A review, *Scand.J.Work Environ. Health* 11, 397
- Bomann W. 1989. Study for acute oral toxicity to mice. Unpublished report from Bayer AG, report No. 18593, dated 15 December 1989, GLP, unpublished. Submitted to WHO by Bayer AG, Mannheim, Germany.
- Brewer, R. 1979. *Principles of Ecology.* Saunders College Publishing, Philadelphia. 249–258
- Burns S.E., Hasset J.P., Rossi M.V. 1997. Mechanistic implications of the intrahumic dechlorination of mirex. *Environ. Sci. Technol.* 31, 1365–1371
- Burrows H.D. Canle M.L., Santaballa J.A., Steenken S. 2002. Reaction pathways and mechanisms of photodegradation of pesticides. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 67, 71–108
- Canonica S., Freiburghaus M. 2001. Electron-rich phenols for probing the photochemical reactivity of freshwaters. *Environ. Sci. Technol.* 35, 690–695
- Chambers J.E., Levi P.E. 1992. *Organophosphates, Chemistry, Fate and Effects,* Academic Press, San Diego.
- Chao L. S., Casida J.E. 1997. Interaction of imidacloprid metabolites and analogs with the nicotinic acetylcholine receptor of mouse brain in relation to toxicity. *Pest. Biochem. Physiol.* 58, 77–88
- Clausen L., Fabricius I. 2002. Atrazine, isoproturon, mecoprop, 2,4-D, and bentazone adsorption onto iron oxides. *J. Environ. Qual.* 30 (3), 858–869
- Cox C. 2001. Insecticide factsheet: Imidacloprid. *Journal of pesticide reform.* 1, 15–21
- Cooper C.M. 1991. Insecticide concentration in ecosystem components of an intensively cultivated water shed in Mississippi. *J Freshw Ecol.* 6, 237–247

- De Jonge R.J., Breure A.M., van Andel J.G. 1996. Reversibility of adsorption of aromatic compounds onto powdered activated carbon (PAC). *Water Res.* 30 (4), 883–892
- 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
- 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
- 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, 2004. Ocena tveganja imidakloprida za čebele, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Fitosanitarna uprava RS, Ljubljana, pridobljeno s svetovega spleta junij 2004: <http://www.furs.si/svn/ffs/imidakloprid/imidaklopridjunij2004.pdf>
- Gao J.P., Maguhn J., Spitzauer P., Kettrup A. 1998. Sorption of pesticides in the sediment of the Teufelsweiher pond (Southern Germany). I: equilibrium assessments, effect of organic carbon content and pH. *Water Res.* 32 (5), 1662–1672
- Goncalves C., Dimou A., Sakkas V., Stpendurada 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
- 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
- Gray L.E., Ostby J.S., Kelcee W.R. 1994. Developmental effects of an environmental antiandrogen: The fungicide vinclozolin alters sex differentiation of the male rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*: 129, 46
- Hileman B. 1994. Environmental estrogens linked to reproductive abnormalities and cancer. *Chem. Eng. News*: 1, 19
- Imidacloprid, pridobljeno s svetovnega spleta: <http://extoxnet.orst.edu/pips/imidaclo.htm> (5.6.2011)
- Ishii Y., Kobori I., Araki Y., Kuroguchi S., Iwaya K., and Kagabu S. 1994. *J. Agric. Food Chem.* 42: 12, 2917
- Kah M., Brown C.D. 2006. Adsorption of ionisable pesticides in soils. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 188, 149–218
- Klein O. (1987) [<sup>14</sup>C]-NTN 33893: Biokinetic part of the 'General metabolism study' in the rat. Unpublished report from Bayer AG, report No. PF2889, dated 9 November 1987, GLP. Submitted to WHO by Bayer AG, Mannheim, Germany
- Kole R.K., Banerjee H., Bhattacharyya A., Chowdhury A., Adityachaudhury N. 1999. Phototransformation of some pesticides. *J. Indian Chem. Soc.* 76, 595–600
- 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.

- 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
- Milevoj L. 2007. Kmetijska entomologija: splošni del. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 182
- Moorman T.B., Jayachandran K., Reungsang A. 2001. Adsorption and desorption of atrazine in soils and subsurface sediments. *Soil Sci.* 166 (12), 921–929
- Moza P.N., Hustert K., Feicht E., Ketrup A. 1998. Photolysis of imidacloprid in aqueous solution. *Chemosphere* 36, 497–502
- Oi M. 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.* 1999, 47, 327-332
- 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
- Pimentel, D., Levitan, L., 1986. Pesticides: amounts applied and amounts reaching pests. *Bioscience* 36, 86–91
- Proenca P., Teixeira H., Castanheira F., Joaõ Pinheiro, Monsanto P.V., Estela P. Marques, Duarte Nuno Vieira. 2005. Two fatal intoxication cases with imidacloprid: LC/MS analysis. *Forensic Science International* 153; 75–80
- 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
- Ruiz de Erenchun N., Gomez de Balugera Z., Aranzazu Goicolea M., Ram & J., Barrio. 1997. Determination of imidacloprid and its major metabolite in soils by liquid chromatography with pulsed reductive amperometric detection. *Analytica Chimica Acta*. 349, 199-206
- Schmuck R. 1999. No causal relationship between Gaucho® seed dressing in sunflowers and French bee syndrome. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 52/99, 257–299
- SERA. 2005. Imidacloprid-Human Health and Ecological Risk Assessment –Final Report (Prepared for USDA, Forest service), SERA TR 05-43-24-03a
- Scholz K., Reinhard F. 1999. Photolysis of imidacloprid (NTN 33893) on the leaf surface of tomato plants, *Pestic. Sci.* 55; 633–675
- Solecki R. 2001. Toxicological evaluation – Imidacloprid, pridobljeno s svetovnega spleta: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2001pr07.htm> (29.6.2011)
- 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., De Sousa G., Rahmani R., Belzunces L.P. 2004. In vivo distribution and metabolisation of <sup>14</sup>C-imidacloprid in different compartments of *Apis mellifera* L. *Pest Manag. Sci.*, 60/11, 1056-1062

- Tanner R.W., Laangston J.W. 1990. Do environmental toxins cause parkinson's disease? A critical review, *Neurology* 40, 17
- 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
- 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 nicotinoid cation--pi interaction model. *Biochemistry*, 42, 7819–7827.
- Topp E., Vallaeyes 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
- 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
- Zheng W., Liu W. 1999. Kinetics and mechanism of the hydrolysis of imidacloprid. *Pestic. Sci.*, 55, 482–485
- 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
- Wamhoff H., Schneider V. 1999. Photodegradation of imidacloprid. *J. Agric. Food Chem.* 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

## PRILOGE (ANNEXES)

**Tabela 1A:** Odvisnost površine kromatografskega vrha od koncentracije imidakloprida (5 g onesnažene zemlje)

Koncentracija [mg/L]	1. frakcija	2. frakcija	Vsota	Povprečje
10-1	3331,4	1375,1	4706,5	<b>4645,48</b>
10-2	2970,9	1495,0	4465,9	
10-3	2973,8	1607,2	4581,0	
10-4	3043,6	1441,2	4484,8	
10-5	3143,7	1845,5	4989,2	
5-1	1555,0	566,2	2121,2	<b>2183,04</b>
5-2	1772,9	593,6	2366,5	
5-3	1747,9	642,3	2390,2	
5-4	1716,3	572,4	2288,7	
5-5	1258,7	489,9	1748,6	
2.5-1	853,5	421,2	1274,7	<b>1188,18</b>
2.5-2	886,0	394,2	1280,2	
2.5-3	825,2	416,6	1241,8	
2.5-4	779,6	369,2	1148,8	
2.5-5	557,7	437,7	995,4	
1.25-1	479,0	150,7	629,7	<b>644,1</b>
1.25-2	540,1	173,4	713,5	
1.25-3	455,8	137,4	593,2	
1.25-4	445,4	164,2	609,6	
1.25-5	528,8	147,3	676,1	

**Tabela 2A:** Odvisnost površine kromatografskega vrha od koncentracije imidakloprida v prsti (100 mg kontaminirane zemlje)

Koncentracija [mg/L]	1. frakcija + 2. frakcija	Povprečje
10-1	481,4	<b>425,1</b>
10-2	367,7	
10-3	426,3	
5-1	199,2	<b>173,9</b>
5-2	163,5	
5-3	159,1	
2.5-1	69,3	<b>76,7</b>
2.5-2	84,1	
2.5-3	113,7	
1.25-1	35,2	<b>45,4</b>
1.25-2	52,3	
1.25-3	48,8	

**Tabela 3A:** Površina kromatografskega vrha imidakloprida v zemlji (5 g) po obsevanju pri intenziteti 750 W/m<sup>2</sup>.

Čas obsevanja pod intenziteto 750 W/ m <sup>2</sup>	Koncentracija [mg/L]	1. frakcija	2. frakcija	Vsota	Povprečje	Razgradnja imidakloprida [%]
<b>1 h</b>	10-1	2098,1	900,7	2998,9	<b>2804,4</b>	<b>39,63</b>
	10-2	2350,2	259,7	2609,9		
<b>2 h</b>	10-1	800,8	474,3	1275,1	<b>1992,6</b>	<b>57,11</b>
	10-2	2237,4	472,7	2710,1		
<b>3 h</b>	10-1	2011,1	398,8	2409,9	<b>2665,9</b>	<b>42,61</b>
	10-2	2535,3	386,7	2922,0		
<b>6 h</b>	10-1	538,4	113,3	651,7	<b>620,5</b>	<b>86,64</b>
	10-2	348,6	240,8	589,4		
<b>9 h</b>	10-1	1139,3	1070,7	2210,0	<b>2347,05</b>	<b>49,48</b>
	10-2	1403,4	1080,7	2484,1		
<b>12 h</b>	10-1	727,7	1866,9	2594,6	<b>2936,1</b>	<b>36,80</b>
	10-2	974,7	2303	3277,7		

**Tabela 4A:** Površina kromatografskega vrha imidakloprida (100 mg zemlje) po obsevanju pri intenziteti 750 W/m<sup>2</sup>

Čas obsevanja pri intenziteti 750 W/m <sup>2</sup>	Koncentracija [mg/L]	1. frakcija + 2. frakcija	Povprečje	Razgradnja imidakloprida [%]
<b>15 min</b>	10-1	484,4	<b>421,7</b>	<b>0,79</b>
	10-2	348,2		
	10-3	432,7		
<b>30 min</b>	10-1	247,0	<b>322,95</b>	<b>24,03</b>
	10-2	325,5		
	10-3	320,4		
<b>1 h</b>	10-1	209,8	<b>232,03</b>	<b>45,42</b>
	10-2	247,8		
	10-3	238,5		
<b>120 min (2 h)</b>	10-1	230,6	<b>233,9</b>	<b>44,98</b>
	10-2	244,9		
	10-3	268,9		
<b>150 min</b>	10-1	236,0	<b>232,45</b>	<b>45,32</b>
	10-2	228,9		
	10-3	265,0		
<b>3 h</b>	10-1	227,5	<b>231,63</b>	<b>45,51</b>
	10-2	245,0		
	10-3	222,4		
<b>6 h</b>	10-1	239,4	<b>234,4</b>	<b>44,86</b>
	10-2	310,7		
	10-3	229,4		
<b>9 h</b>	10-1	218,3	<b>239,4</b>	<b>43,78</b>
	10-2	260,6		
	10-3	312,4		