

UNIVERZA V NOVI GORICI
FAKULTETA ZA ZNANOSTI O OKOLJU

Irena MEJAČ

**DOLOČANJE NEONIKOTINOIDOV V MEDU IN
CVETNEM PRAHU S HPLC-DAD IN TLS DETEKCIJO**

DIPLOMSKO DELO

Mentor: Mladen Franko

Nova Gorica, 2006

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Mladenu Franku, doc. dr. Polonci Trebše in mladim raziskovalcem Mojci, Azameli in Urhu Laboratorija za raziskave v okolju.

POVZETEK

Razvili smo kromatografsko metodo HPLC za določevanje nekaterih neonikotinooidov (imidakloprid, tiametoksam, acetamiprid in tiakloprid) v vzorcih medu in cvetnega prahu. Neonikotinoide smo iz vzorcev medu ekstrahirali z ekstrakcijo tekoče-tekoče v diklorometan, iz cvetnega prahu pa z ekstrakcijo trdno-tekoče v diklorometan:aceton. Z dodatkom standardnih raztopin neonikotinooidov vzorcem medu in cvetnega prahu pred ekstrakcijo smo pripravili umeritvene premice z visokimi regresijskimi koeficienti ($> 0,994$) v koncentracijskem območju 0,1–5 mg/kg. Vzorce smo analizirali na reverzno-fazni kromatografski koloni C_{18} ob uporabi izokratične metode elucije z acetonitrilom:10mM amonijevim acetatom (3:7, v/v) in pretoka 1 mL/min. Za detekcijo neonikotinooidov po kromatografski ločbi smo uporabili spektrofotometrično metodo z diodno matriko DAD in spektrometrijo s toplotnimi lečami TLS. Zaradi različnih absorpcijskih spektrov posameznih neonikotinooidov smo v primeru DAD določevali insekticide pri štirih valovnih dolžinah (254, 270, 245 in 242 nm), v primeru TLS pa smo lahko uporabili le valovno dolžino vzbujevalnega laserja 244 nm. Doseženi izkoristki ekstrakcij iz medu so bili med 76 in 83 % za acetamiprid, tiakloprid in tiametoksam ter 99 % za imidakloprid. Relativni standardni odkliki pri koncentraciji 1 mg/kg in petih ponovitvah so bili v območju 15–38 %. Meje zaznavnosti so bile 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ za imidakloprid, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ za tiametoksam in acetamiprid ter 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ za tiakloprid. Izkoristki ekstrakcij iz cvetnega prahu so bili občutno nižji, v območju 45–54 %, in so omogočali doseganje meje zaznavnosti 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ za vse štiri insekticide. Z metodo HPLC-TLS smo za primer standardnih raztopin neonikotinooidov dosegli meje zaznavnosti v območju 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ za acetamiprid do 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ za tiametoksam in imidakloprid in s tem znižanje vrednosti LOD v primerjavi s HPLC-DAD metodo.

ABSTRACT

A HPLC chromatographic method combined with liquid-liquid extraction into dichloromethane and solid-liquid extraction into acetone:dichloromethane was developed for simultaneous determination of some neonicotinoids (imidacloprid, thiamethoxam, acetamiprid and thiacloprid) in pollen and commercial honey samples. Calibration curves with high regression coefficients (> 0.994) were prepared in the 0.1–5 mg/kg concentration range by adding appropriate amounts of neonicotinoids to honey or pollen samples before the extraction. Samples were analyzed on a reverse-phase C_{18} chromatographic column using isocratic elution with acetonitrile:10 mM ammonium acetate (3:7, v/v) as eluent, and 1 mL/min flow rate. Detection of neonicotinoids was performed by DAD diode-array spectrophotometric method or by thermal lens spectrometry (TLS). Due to differences in absorption spectra of studied insecticides all chromatograms were recorded at four wavelengths (254, 270, 245 and 242 nm) in case of DAD. For TLS measurements only the wavelength of the excitation laser (244 nm) was used. Recoveries from honey were between 76 and 83 % for acetamiprid, thiacloprid, and thiamethoxam, and 99 % for imidacloprid. Relative standard deviations of five determinations in honey fortified at 1 mg/kg level were in the range of 15–38 % depending on the insecticide. The achieved limits of detection (LOD) were from 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for imidacloprid to 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for thiamethoxam and acetamiprid, and 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for thiacloprid. In case of pollen recoveries were significantly lower and ranged from 45–54 %, while the achieved LODs were at 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for all four insecticides. In case of HPLC-TLS only standard neonicotinoid solutions were analyzed, and the LOD values ranging from 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for acetamiprid up to 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for thiamethoxam and imidacloprid were achieved. This represents an improvement compared to the HPLC-DAD method.

KLJUČNE BESEDE

neonikotinoidi, ekstrakcija, HPLC-DAD, HPLC-TLS

KEY WORDS

neonicotinoids, extraction, HPLC-DAD, HPLC-TLS

KAZALO VSEBINE

1 UVOD	1
2 TEORETIČNE OSNOVE	3
2.1 NEONIKOTINOIDI	3
2.1.1 SINTEZA NEONIKOTINOIDOV	3
2.1.2 DELOVANJE	3
2.2 IMIDAKLOPRID	5
2.2.1 FIZIKALNO KEMIJSKE LASTNOSTI	5
2.2.2 POTI RAZGRADNJE IN METABOLITI	5
2.2.3 TOKSIČNOST	6
2.3 ACETAMIPRID	8
2.3.1 FIZIKALNO KEMIJSKE LASTNOSTI	8
2.3.2 POTI RAZGRADNJE IN METABOLITI	8
2.3.3 TOKSIČNOST	9
2.4 TIAKLOPRID	10
2.4.1 FIZIKALNO KEMIJSKE LASTNOSTI	10
2.4.2 POTI RAZGRADNJE IN METABOLITI	10
2.4.3 TOKSIČNOST	11
2.5 TIAMETOKSAM	11
2.5.1 FIZIKALNO KEMIJSKE LASTNOSTI	11
2.5.2 POTI RAZGRADNJE IN METABOLITI	12
2.5.3 TOKSIČNOST	12
2.6 KVANTITATIVNO IN KVALITATIVNO DOLOČANJE NEONIKOTINOIDOV	13
2.7 LASERSKA DETEKCIJA S TOPLOTNIMI LEČAMI	14
3 EKSPERIMENTALNI DEL	16
3.1 REAGENTI IN RAZTOPINE	16
3.2 POSTOPKI EKSTRAKCIJE NEONIKOTINOIDOV	17
3.2.1 EKSTRAKCIJA NA TRDNEM NOSILCU	17
3.2.2 EKSTRAKCIJA TEKOČE-TEKOČE	17
3.2.3 EKSTRAKCIJA TRDNO-TEKOČE	17
3.3 INSTRUMENTI IN OPREMA	18
3.4 KROMATOGRAFSKI POGOJI	18
3.5 POGOJI HPLC-TLS MERJENJA	18
4 REZULTATI	20
4.1 OPTIMIRANJE KROMATOGRAFSKIH POGOJEV ZA DOLOČEVANJE NEONIKOTINOIDOV S HPLC-DAD METODO	20
4.1.1 IZBIRA PRIMERNE KOLONE ZA LOČITEV NEONIKOTINOIDOV	20
4.1.2 IZBIRA MOBILNE FAZE IN METODE SPIRANJA	20
4.1.3 ODVISNOST POVRŠINE KROMATOGRAFSKEGA VRHA OD VOLUMNA VBRIZGANEGA VZORCA	22

4.2 OPTIMIRANJE PARAMETROV PRI HPLC-TLS DETEKCIJI	25
4.2.1 POSTAVITEV HPLC-TLS SISTEMA	25
4.2.2 VPLIV FREKVENCE NA OBČUTLJIVOST MERJENJA	25
4.2.3 VPLIV ČASOVNE KONSTANTE	26
4.2.4 VPLIV ČRPALKE NA STABILNOST BAZNE LINIJE	27
4.3 OPTIMIRANJE EKSTRAKCIJE NEONIKOTINOIDOV IZ MEDU	29
4.3.1 EKSTRAKCIJA NA TRDNEM NOSILCU S KOLONO EXTRELUT NT20	29
4.3.2 EKSTRAKCIJA TEKOČE-TEKOČE	30
4.4 OPTIMIRANJE EKSTRAKCIJE NEONIKOTINOIDOV IZ CVETNEGA PRAHU	31
4.4.1 EKSTRAKCIJA TEKOČE-TEKOČE	31
4.4.2 EKSTRAKCIJA TRDNO-TEKOČE	31
4.4.3 EKSTRAKCIJA NA TRDNEM NOSILCU S KOLONO EXTRELUT NT20	35
4.5 UMERITVENE PREMICE S STANDARDNIMI RAZTOPINAMI NEONIKOTINOIDOV	36
4.6 DOLOČANJE NEONIKOTINOIDOV S HPLC-DAD TEHNIKO	38
4.6.1 DOLOČANJE NEONIKOTINOIDOV V MEDU	38
4.6.1.1 UMERITVENE PREMICE ZA DOLOČANJE NEONIKOTINOIDOV V MEDU	39
4.6.2 DOLOČANJE NEONIKOTINOIDOV V CVETNEM PRAHU	43
4.6.2.1 UMERITVENE PREMICE ZA DOLOČANJE NEONIKOTINOIDOV V CVETNEM PRAHU	44
4.7 DOLOČANJE NEONIKOTINOIDOV S HPLC-TLS	48
5 ZAKLJUČEK	50
<hr/>	
6 VIRI	51

1 UVOD

Neonikotinoide 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. Delujejo na živčni sistem organizmov, in sicer z vezavo na postsinaptične nikotinske receptorje, kar vodi do akumulacije acetilholina in posledično do propada organizma (Suchail et al., 2000).

Neonikotinoidi predstavljajo skupino insekticidov, katerih prodaja v svetovnem merilu najhitreje narašča (Matsuda et al., 2001). Glede na njihovo vse večjo razširjenost se v okolju srečujemo z negativnimi posledicami njihove rabe, pri čemer je treba poudariti, da imajo negativne vplive prav tako razgradni produkti in koncentracije pesticidov v sledovih, kar kažejo tudi podatki iz literature, npr. za čebele (Iwasa et al., 2004). Kljub temu da je uporaba štirih neonikotinoidov, to je imidakloprida, acetamiprida, tiakloprida in tiametoksama, v članicah Evropske unije in ostalih državah dovoljena, postajajo predpisi o dovoljenih vrednostih vnosa posameznega insekticida v okolje vse strožji. Temu mora slediti tudi razvoj analiznih metod za določevanje in nadzor prisotnosti teh snovi v okolju, živilih in na drugih področjih.

Zaradi termične nestabilnosti in nizke hlapnosti neonikotinoidov je plinska kromatografija, kot najbolj razširjena analizna tehnika za določevanje pesticidov, neustrezna za določevanje neonikotinoidov. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) tako predstavlja najprimernejši način separacije in detekcije posameznih neonikotinoidov. Vrednosti LOD oz. meje zaznavnosti, ki jih dosežemo s HPLC-UV detekcijo, so v območju od 0,01 mg/kg (tiametoksam) do 0,1 mg/kg (imidaklopid) (Rossi et al., 2005).

V praksi se je izkazalo, da imajo neonikotinoidi tudi toksične učinke za različne netarčne živalske vrste, ki so se pokazali predvsem pri čebelah (Iwasa et al., 2004). Neonikotinoidi namreč lahko potujejo po rastlini navzgor. Tako kljub temu da jih uporabljamo za tretiranje semena, dosežejo tudi ostale dele rastlin, vključno z listi in cvetovi (Bonmatin et al., 2003). Koncentracije neonikotinoidov so zato v posameznih delih rastlin nizke (Bonmatin et al., 2003) in težko merljive s klasičnimi analiznimi tehnikami. Poleg tega so tudi vrednosti LD₅₀ za določene vrste organizmov nizke, npr. za čebele se gibljejo v območju od 40 do 100 ng/čebelo, v primeru kronične toksičnosti pa so do 10-krat nižje (Bonmatin et al., 2003). Posledično so meje zaznavnosti razpoložljivih analiznih metod za določevanje posameznih insekticidov pogosto previsoke za meritve neonikotinoidov v realnih vzorcih.

Zaradi nujnosti ugotavljanja učinkov kronične izpostavljenosti nizkim koncentracijam (npr. razlogi za pogine čebel), kot nasprotja akutnim obremenitvam (visoke koncentracije, na katerih temeljijo vrednosti LD₅₀), je potrebno razviti analizne metode za določanje nizkih koncentracij neonikotinoidov v različnih vzorcih.

V zadnjih dvajsetih letih je prišlo do razvoja občutljivih fototermičnih tehnik, kamor spada tudi spektrometrija TLS (Thermal Lens Spectrometry) oz. optotermična detekcija na osnovi spektrometrije s toplotnimi lečami. S tehniko TLS, ki omogoča tudi do 250-krat višje občutljivosti kot klasična spektrofotometrija (Franko et al., 1998; Luterotti et al., 2002) in za določevanje neonikotinoidnih insekticidov še ni razvita, bi lahko dosegli zelo nizke meje zaznavnosti za neonikotinoide v različnih bioloških in okoljskih vzorcih.

Glede na to da so čebele izpostavljene fitofarmaceutskim sredstvom z nabiranjem medene rose, cvetnega prahu in nektarja, smo želeli razviti visoko občutljivo metodo določanja neonikotinooidov v cvetnem prahu in medu kot produktu čebel, s katero bi lahko preverjali prisotnost neonikotinooidov v realnih vzorcih in proučevali obremenjenost čebel zaradi uporabe neonikotinooidnih insekticidov v kmetijstvu in s tem povezane negativne učinke nanje.

V ta namen smo si zadali naslednje cilje:

- Optimizirati postopek ekstrakcije neonikotinooidov iz medu in cvetnega prahu (izbira topila in metode ekstrakcije) za doseganje čim nižje meje zaznavnosti.
- Uvesti metodo določanja štirih neonikotinooidov (imidakloprida, acetamiprida, tiakloprida in tiametoksama) s tehniko HPLC-DAD in razviti metodo za določevanje neonikotinooidov s HPLC-TLS.

2 TEORETIČNE OSNOVE

2.1 Neonikotinoidi

Neonikotinoidni insekticidi so se pojavili na trgu v začetku devetdesetih let in 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) danes nadomeščajo organofosfatne insekticide.

V Republiki Sloveniji je bilo prvo sredstvo, ki vsebuje neonikotinoide, registrirano leta 1995, in sicer Confidor SL 200, ki vsebuje 20 % imidakloprida (Ocena tveganja imidakloprida za čebele, 2004: 4).

Poleg imidakloprida spadajo v skupino neonikotinoidov naslednji insekticidi: acetamiprid, nitenpiram, tiaklopid, tiametoksam in klotianidin, katerih glavne skupine so nitrometilska, nitroiminska ali cianoiminska skupina (**slika 1**) (Matsuda et al., 2001).

2.1.1 Sinteza neonikotinoidov

Študije aktivnosti, ki so temeljile na prototipu spojine, ki je vsebovala 2-(nitrometil)piridinski del, so vodile do odkritja 2-(nitrometilen)-tetrahydro-1,3-tiazina (nitiazin) (Soloway et al., 1979). Čeprav je le-ta kazal bistveno večjo aktivnost v primerjavi z 2-(nitrometil)piridinom, ga zaradi njegove nestabilnosti na svetlobi niso nadalje razvili v komercialne namene (Kagabu, 1997). Substitucija nitiazina na mestu 1 je vodila do nastanka 1-(3-piridilmetil)-2-nitrometilen-imidazolidina oz. PMNI, ki je kazal povečano aktivnost v primerjavi z nitiazinom in nadalje do razvoja imidakloprida, katerega je leta 1984 sintetiziral Kagabu. Imidaklopid in podobni nitroimini so na svetlobi bolj stabilni (Kagabu in Medej, 1995).

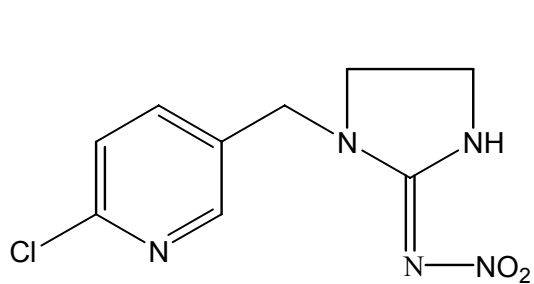
Komercialno pomembni neonikotinoidi, kot so imidaklopid, nitenpiram in acetamiprid, vsebujejo 6-kloro-3-piridilni del in so tako podobni nikotinu in epibatinu, ki delujeta na nikotinske acetilholinske receptorje (nAChR) (Liu et al., 1993).

Neonikotinoidi, kot so imidaklopid, tiametoksam in tiaklopid, imajo kloro-substituirano heterociklično skupino (kloropiridinil ali klorotiazolil) povezano z drugim heterocikličnim obročem. Neonikotinoidi, kot so acetamiprid, nitenpiram in klotianidin, imajo na mestu drugega heterocikličnega obroča aciklično skupino (Kagabu, 1999).

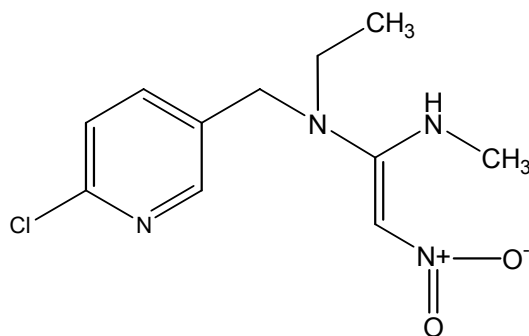
2.1.2 Delovanje

Zaradi svoje oblike, velikosti in naboja molekule se nikotin in neonikotinoidi prilegajo receptorju v živčnem sistemu. Neonikotinoidi imajo zaradi močno elektronprivlačnih skupin (nitro ali ciano skupina) delno pozitivni naboj in se tako vežejo na nikotinske acetilholinske receptorje oz. jih irreverzibilno blokirajo. Le-ti pri normalnem delovanju sprejemajo molekule acetilholina, ki prevaja impulze z ene na drugo živčno celico ali z živčne celice v tkivo. Za razliko od naravnega nevrottransmitterja, ki ga encim acetilholinesteraza zelo hitro razgradi, se neonikotinoidi razgradijo počasi, lahko pa se tudi ne razgradijo. Permanentno se vežejo na membrano živčne celice in povzročajo stalno stanje vzbujenosti, ki vodi do smrti organizma (Suchail et al., 2000).

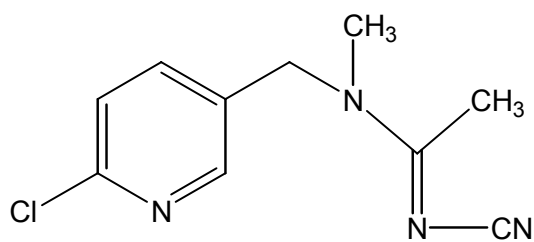
Pri insektih je afiniteta za vezavo na nikotinske acetilholinske receptorje bolj izražena kot pri sesalcih (Matsuda et al., 1998).



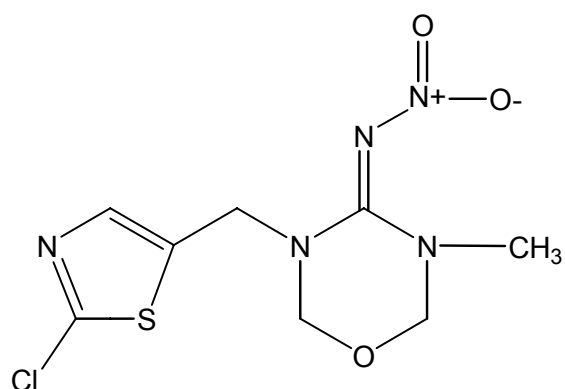
IMIDAKLOPRID



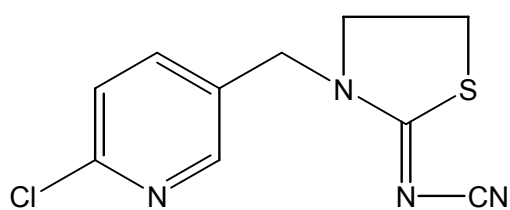
NITENPIRAM



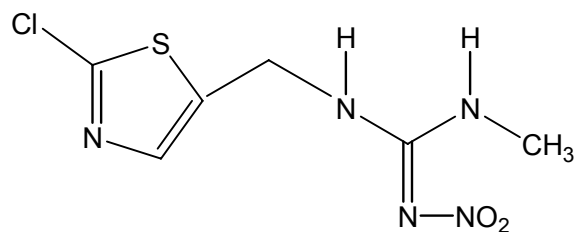
ACETAMPIRID



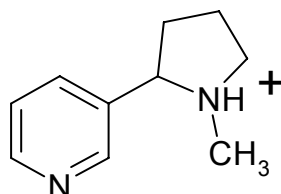
TIAMETOKSAM



TIAKLOPRID



KLOTIANIDIN



NIKOTIN

Slika 1: Kemijske strukturne formule neonikotinoidnih insekticidov in nikotina.

2.2 Imidaklopid

Imidaklopid (1-((6-kloro-3-piridinil)metil)-*N*-nitro-2-imidazolidinimin) je sistemski insekticid, ki ga uporabljamo za zatiranje škodljivcev na bombažnih poljih, kmetijsko-obdelovalnih površinah in v gospodinjstvih (Cox, 2001). Nanašamo ga na rastlinske liste, lahko pa ga uporabljamo tudi za tretiranje semen (Ocena tveganja imidakloprida za čebele, 2004: 6).

2.2.1 Fizikalno kemijske lastnosti

Imidaklopid je kristaliničen, brezbarven insekticid z molekulsko maso 255,7 g/mol in gostoto 1,542 g/L. Je polaren in nehlapen. Topen je v vodi (topnost v vodi je 610 mg/L), porazdelitveni koeficient med oktanolom in vodo – $\log P_{ow}$ znaša 0,57. Koeficient adsorpcije K_d v zemlji (koeficient adsorpcije pesticida v prsti) ima vrednosti od 0,96 do 4,18 mL/g, K_{oc} (koeficient adsorpcije pesticida na organski ogljik) pa od 132 do 310 mL/g. Parni tlak imidakloprida je izjemno nizek (4×10^{-12} Pa pri 20° C) in Henry-jeva konstanta znaša 2×10^{-10} Pa³/mol (Ocena tveganja imidakloprida za čebele, 2004: 6).

2.2.2 Poti razgradnje in metaboliti

Imidaklopid je hidrolitsko stabilen in dokaj obstojen v prsti (Roberts et al., 1999: 112). Kemijsko gledano je najučinkovitejša pot razgradnje imidakloprida fotorazgradnja. Pri valovni dolžini približno 270 nm prihaja do maksimalne absorpcije imidakloprida.

Pri študiji fotolize imidakloprida v vodni raztopini, ki je bila obsevana z UV-svetlobo valovne dolžine 290 nm, so ugotovili, da razgradnja približno ustreza prvemu redu kinetike s konstanto reakcijske hitrosti $1,6 \times 10^{-4}$ /s in razpolovnim časom 1,2 h. Po 4-ih urah obsevanja je prišlo do 90 % razgradnje imidakloprida in nastanka naslednjih glavnih metabolitov: 6-kloro-nikotinaldehid, *N*-metilnikotinamid, 1-(6-kloronikotinil)imidazolidon in 6-kloro-3-piridil-metiletildiamin. V vodni raztopini, ki je bila zaščitena pred svetlobo, do razgradnje imidakloprida ni prišlo (Moza et al., 1998).

Zheng in Liu (1999) sta raziskovala proces hidrolize neonicotinoidov v vodnih raztopinah, ki so bile med poskusom shranjene v temi. Ugotovila sta, da na razgradnjo vplivata predvsem pH in temperatura – visoke vrednosti obeh parametrov namreč povečata stopnjo hidrolize. Metabolit, ki pri razgradnji nastane, je 1-[(6-kloro-3-piridinil)metil]-2-imidazolidon. Pri nižjih vrednostih pH, to je v nevtralnih in kislih raztopinah, ni prišlo do razpada imidakloprida. Hidroliza tako predstavlja manj pomembno pot razgradnje.

Razgradnja v prsti

Pretvorbe imidakloprida v prsti delimo na kemijske in na tiste, ki potekajo s pomočjo mikroorganizmov, medtem ko na površju prihaja tudi do fotokemične razgradnje. Glavni način transporta imidakloprida v tleh je vertikalno prehajanje v nižje plasti, lahko celo do podtalnice (Gupta et al., 2002). Imidaklopid ima zaradi visoke topnosti v vodi in nizkega K_{ow} majhno sposobnost adsorpcije na delce zemlje. Organski ogljik, silikatne glinice in organska gnojila v prsti povečajo adsorpcijo in s tem razpolovni čas.

Vrednosti razpolovnih časov ($t_{1/2}$) za vlažno prst, ki je bila shranjena v anaerobnih pogojih, in sicer v temi pri 20° C za časovno obdobje do 366 dni, so v območju 188–997 dni. Kot posledica razgradnje je prišlo do nastanka 7-ih metabolitov. Ti so: ciklični

nitroguanidin, ciklični gvanidin in njegovi nitrozo ter nitro derivati, 6-kloronikotinska kislina ter 4- in 5-keto ciklična urea. V nadaljnjih poskusih so preverili vpliv rastja oz. odsotnosti le-tega na hitrost razgradnje imidakloprida in ugotovili, da je le-ta večja v primeru, ko prst ne vsebuje rastja ($t_{1/2}$ je 69 dni). V tem primeru, poleg že prej naštetih razgradnih produktov, nastane tudi 5-hidroksi-imidaklopid. Razgradnja v aerobnih pogojih poteka hitreje, vrednosti $t_{1/2}$ so v območju 30–162 dni (Roberts et al., 1999: 113–115).

Prav tako je bila izvedena študija fotorazgradnje imidakloprida v peščeno-glinenih tleh. Zemljo so obsevali s ksenonovo žarnico (uporaba filtra za valovno dolžino obsevanja – 290nm), tako da je bila intenziteta svetlobe 1,4-krat močnejša kot naravna svetloba ob 12-i uri na zemljepisni širini 40° N. Imidaklopid se je razgrajeval zelo hitro v prvih dveh dneh ($t_{1/2}$ je 4,7 dni), nato je bila razgradnja počasnejša (Roberts et al., 1999: 113–115).

Metabolične pretvorbe pri rastlinah

Glavni poti biotransformacije sta hidrosilacija imidazolidinskega obroča s posledično dehidracijo, kar privede do nastanka olefina, in hidroliza, ko nastane 6-kloronikotinska kislina z glicinom (Roberts et al., 1999: 112).

Koester (1992) je primerjal metabolne poti imidakloprida v različnih rastlinskih vrstah, med njimi tudi v soji in bombažu. Ugotovil je, da se metabolizem začne z monohidroksilacijo imazolidnega obroča in dehidracijo, ki vodi do nastanka olefina. Pri tem se tvorijo tudi manjše količine 6-kloronikotinske kisline, 6-kloropikolil alkohola in glukopiranozida.

Metabolične pretvorbe pri živalih

Živi organizmi akumulirajo snovi v maščobnih tkivih. Ker imidaklopid ni topen v lipidih, je bioakumulacija v prehranjevalni verigi majhna. Študije metabolizma na podganah so pokazale, da le-ta poteka v jetrih, ledvicah in žolču. Večina insekticida in njegovih metabolitov se izloči preko urina, tudi skozi iztrebke. Glavna metabolita v urinu sta 6-kloronikotinska kislina in njen glicinski konjugat. Količinsko manj pomembni metaboliti so olefin, glicinski konjugat 6-metiltionikotinske kisline in gvanidin (Roberts et al., 1999: 118–120).

Pri raziskavi metabolnih poti imidakloprida v primeru nesnih kokoši so ugotovili toksičen metabolit olefin v ledvicah, mišicah in koži živali. Koncentracija olefina v kokošjih jajcih je predstavljala 40 % vseh metabolitov (Roberts et al., 1999: 118–120).

2.2.3 Toksičnost

Testi akutne, subakutne in kronične toksičnosti so bili opravljeni na podganah.

Akutna toksičnost

Simptomi akutne (kratkotrajne) izpostavljenosti testnih živali imidaklopridu preko oralnega vnosa so: oteženo dihanje, apatičnost, izguba oz. zmanjšanje gibalnih sposobnosti in tresenje. Nekateri znaki trajajo do pet dni od dneva izpostavljenosti (U.S. EPA. Office of Pesticides and Toxic Substances, 1992).

Simptomi, ki se pojavijo ob izpostavljenosti pripravkom, ki vsebujejo imidaklopid (Gaucho, Confidor, itd.) in poleg čistega insekticida še inertne snovi, trajajo navadno dlje, tudi do 12 dni od dneva izpostavitve. Znaki izpostavljenosti se kažejo kot zmanjšana aktivnost, slaba koordinacija, tresenje, diareja, oteženo dihanje in bruhanje (U.S. EPA. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, 1994).

Subkronična in kronična toksičnost

O subkronični toksičnosti govorimo, kadar izpostavljenost traja nekaj časa, npr. približno 10 dni, medtem ko kronična toksičnost zajema dolgotrajno, lahko tudi življenjsko izpostavljenost.

V poskusih je prišlo v obeh primerih (krajši in dolgotrajni izpostavitvi) pri testnih organizmih do zmanjšanja mase. V primeru ugotavljanja kronične toksičnosti so ugotovili visoko občutljivost ščitnice na imidaklopid. Koncentracije imidakloprida, ki so jih dobili testni organizmi (oralna pot vnosa), so bile 10 mg/kg telesne mase dnevno za ugotavljanje subkronične toksičnosti in 17 (organizmi moškega spola) oz. 25 (organizmi ženskega spola) mg/kg telesne mase dnevno za ugotavljanje kronične toksičnosti (Cox, 2001).

Vpliv na reprodukcijo

Testi so bili narejeni na podganah (doza: 19 mg/kg dnevno) in zajcih (doza: 75 mg/kg dnevno) z oralnim vnosom insekticida. V primeru zajcev je prišlo do višje frekvence splavov in povečanja števila mladičev z abnormalnim okostjem, medtem ko je v primeru podgan prišlo do zmanjšanja mase novorojenih mladičev (Cox, 2001).

Vpliv na ptice

Akutna toksičnost imidakloprida (preko oralnega vnosa) se razlikuje glede na posamezno vrsto ptic. Med posebej občutljive vrste spadajo hišni vrabec (U.S. EPA. Office of Pesticide Programs, 1994), japonska prepelica, kanarček in golob, za katere je srednja vrednost LD₅₀ (doza, pri kateri je smrtnost testne populacije 50 %) nižja od 50 mg/kg (Cox, 2001).

Vpliv na ribe in druge vodne organizme

Akutna toksičnost se pri odraslih organizmih (npr. šarenki) pojavi pri dokaj visoki koncentraciji, to je nad 80 mg/kg, medtem ko je pri mladičih opazna zmanjšanje mase in števila preživelih pri koncentracijah 1,2 mg/kg (Cox, 2001).

Za nekatere vrste vodnih organizmov je imidaklopid toksičen pri zelo nizkih koncentracijah. LC₅₀ (koncentracija, pri kateri je smrtnost testne populacije 50 %) za sladkovodne rake vrste *Hyalella azteca* je 55 µg/kg, v primeru rakov vrste *Mysidopsis bahia* pa 37 µg/kg (Cox, 2001).

Vpliv na deževnike

V tipični prsti predstavljajo deževniki 80 % populacije. Pomembni so predvsem kot razgrajevalci organske snovi, s čimer pripomorejo k večji hranljivosti prsti. LC₅₀ za vrsto *Eisenia fetida* je med 2 in 4 mg/kg (Cox, 2001).

Toksičnost za čebele

Imidaklopid naj bi imel negativne vplive na čebele že v množinah reda velikosti nekaj nanogramov na čebelo. Telesna masa čebele je približno 100 mg. V literaturi se podatki o vrednostih LD₅₀ med seboj razlikujejo. Tako naj bi bila oralna LD₅₀ med 49 in 102 ng/čebelo (Nauen et al., 2001), 3,7 do 40,9 ng/čebelo (Schmuck et al., 2001) in 8 ng/čebelo (*Apis Mellifera*) (Suchail et al., 2000). Toksičnost insekticida je namreč močno odvisna od podvrste čebel in vnosa insekticida (oralno, preko kutikule). Pri vnosu (oralnem) imidakloprida v daljšem obdobju so vrednosti LD₅₀ v območju 0,01–1,0 ng/čebelo (Suchail et al., 2001).

LD₅₀ v primeru, ko pride čebela v stik z imidaklopidom preko kutikule ali ostalih delov telesa, je 24 ng/čebelo (*Apis Mellifera Mellifera*), in sicer po 24-ih do 48-ih urah

(Suchail et al., 2001) oz. 17,9 ng/čebelo po 24-ih urah (Iwasa et al., 2004). Nove raziskave so pokazale, da pride že pri subletalnih kontaminacijah hrane (koncentracija neonikotinoidov je reda velikosti $\mu\text{g}/\text{kg}$) do vpliva na nekatere pomembne funkcije čebel, kot npr. iskanje hrane.

2.3 Acetamiprid

Acetamiprid ((*E*)-*N*'-[(6-kloro-3-piridil)metil]-*N*²-ciano-*N*¹-metilacetamidin) je sistemski insekticid, ki ga apliciramo na prst in listje. Uporabljamo ga za zatiranje stenic (*Hemiptera*), resarjev (*Thysanoptera*) ter metuljev (*Lepidoptera*), in sicer na zelenjavi, sadju in čajevcih (Roberts et al., 1999: 107).

2.3.1 Fizikalno kemijske lastnosti

Acetamiprid je trden, bel insekticid v prahu z molekulsko maso 222,68 g/mol in relativno gostoto 1,330 (20° C). Topen je v vodi (topnost v destilirani vodi je 4250 mg/L, 25° C), porazdelitveni koeficient $\log P_{ow}$ znaša 0,8. Koeficienta adsorpcije v zemlji (K_d in K_{oc}) imata pri temperaturi 20° C vrednosti $K_d < 4,1 \text{ mL/g}$ in K_{oc} od 132 do 267 mL/g. Parni tlak acetamiprida je nižji od 1×10^{-6} pri 25° C in Henry-jeva konstanta znaša $< 5,3 \times 10^{-8} \text{ Pa m}^3/\text{mol}$ (25° C) (EPA. Pesticide Fact Sheet, 2002: 1–2).

2.3.2 Poti razgradnje in metaboliti

Acetamiprid je relativno stabilen za hidrolizo (stabilen v pufrskih raztopinah s pH 4, 5 in 7, pri pH 9 in temperaturi 45° C se razgrajuje počasi) in fotorazgradnjo pri sončni svetlobi (Tokieda et al., 1997). Razgrajuje se preko fotolize v vodi, in sicer je razpolovni čas 34 dni pri pH 7 in temperaturi 25° C. Fotoliza v prsti ne predstavlja pomembnejšega procesa razgradnje, posledično v literaturi ni veliko podatkov o razpolovnih časih oz. so le-ti nezanesljivi. Razgradnja acetamiprida poteka tudi v anaerobnem vodnem okolju. Razpolovni čas je 45 dni in glavni razgradni produkt, ki pri tem nastaja, je metil(6-kloro-3-piridil)metil amin. Glavni proces razpada acetamiprida je aerobna razgradnja v prsti z razpolovnimi časi < 1 do 8,2 dni (EPA. Pesticide Fact Sheet, 2002: 12–13).

Razgradnja v prsti

Vrednosti $t_{1/2}$ za acetamiprid v glineni oz. delno glineni prsti so v območju 1–2 dni. Glavno pot razgradnje v prsti predstavlja oksidacija acetamiprida, kar vodi do nastanka *N*-amidoamidin derivatov (Tokieda et al., 1998).

Metabolične pretvorbe v rastlinah

Metabolne poti v rastlinah so preučevali za vodotopni koncentrat acetamiprida in acetamiprida v granularni obliki. V prvem primeru (nanos vodotopnega koncentrata na osem vrst kulturnih rastlin) so bile količine metabolitov zanemarljive. Ob nanosu granularne oblike acetamiprida na štiri vrste kulturnih rastlin so bile količine acetamiprida in razgradnih produktov pod mejo detekcije (0,01 mg/kg). Kljub nizkim koncentracijam razgradnih produktov so kvalitativno določili glavno pot metabolizma acetamiprida v rastlinah. Začne se z *N*-demetilacijo acetamiprida, kar vodi do nastanka *N*-demetilnega derivata. Le-ta se cepi do 6-kloronikotinske kisline ali v manjšem

obsegu oksidira do 6-kloropikolil alkohola. 6-kloropikolil alkohol se nato konjugira z glukozo oz. metilira do metil 6-kloronikotinata (Tokieda et al., 1998).

2.3.3 Toksičnost

Testi akutne in kronične toksičnosti ter vpliva acetamiprida na reprodukcijo so bili opravljeni na podganah.

Akutna toksičnost

LD₅₀ pri oralnem vnosu insekticida je 417 mg/kg telesne mase za moški spol in 314 mg/kg telesne mase za ženski spol. Vrednosti LD₅₀ za vnos skozi kožo so višje od 2000 mg/kg telesne mase, vrednosti LC₅₀ za vnos insekticida z dihanjem pa višje od 1,15 mg/L zraka (European Commission, Health&Consumer protection Directorate, 2003: 9).

Kronična toksičnost

Pri doziranju 7 mg/kg telesne mase dnevno (preko oralnega vnosa) v dveletnem časovnem obdobju niso ugotovili karcinogenih učinkov (European Commission, Health&Consumer protection Directorate, 2003: 10).

Vpliv na reprodukcijo

Pri doziranju 6,5 mg/kg telesne mase dnevno (oralni vnos insekticida) ni prišlo do zmanjšanja mase novorojenih živali, prav tako ni bilo opaziti vpliva na preživetje. Pri večjem doziranju, to je 15 mg/kg telesne mase dnevno, ni bilo vidnih vplivov na razvoj mladičev (European Commission, Health&Consumer protection Directorate, 2003: 10).

Vpliv na ptice

V primeru kratkotrajne izpostavljenosti insekticidu je LD₅₀ 98 mg/kg telesne mase, medtem ko so vrednosti LD₅₀ pri vnosu s hrano višje od 741 mg/kg telesne mase dnevno. Kot testni organizmi so bile uporabljene divje race (European Commission, Health&Consumer protection Directorate, 2003: 20).

Vpliv na ribe

V primeru kratkotrajne izpostavljenosti insekticidu (96 ur) so vrednosti EC₅₀ (srednja koncentracija, pri kateri zasledimo učinke na 50 % živali) za smrtnost višje od 100 mg/L (*Oncorhynchis mykiss*), medtem ko pri daljši izpostavljenosti (35 dni) in koncentraciji 19,2 mg/kg ni opaznih vplivov (*Pimephales promelas*). Acetamiprid se v ribah ne akumulira (European Commission, Health&Consumer protection Directorate, 2003: 20).

Toksičnost za čebele

Acetamiprid naj bi imel negativne vplive na čebele pri koncentracijah velikostnega razreda mikrogram na čebelo. Pri nanosu insekticida na hrbtni del oprsja je LD₅₀ za acetamiprid 7,1 µg/čebelo (24 ur po nanosu insekticida), kar pomeni, da so vrednosti LD₅₀ za acetamiprid približno 400-krat višje kot za imidakloprid.

Glavni razgradni produkti acetamiprida v rastlinah (*N*-demetil acetamiprid, 6-kloro-piridilmetil alkohol in 6-kloro-nikotinska kislina) niso visoko toksični za čebele, saj pri doziranju 50 µg/čebelo (nanos insekticida na hrbtno stran oprsja) ni bilo povečane smrtnosti v primerjavi s kontrolno skupino (Iwasa et al., 2004).

2.4 Tiaklopid

Tiaklopid ((Z)-3-(6-kloro-3-piridilmetil)-1,3-tiazolidin-2-ilidencianamid) je bil kot insekticid prvič registriran v Braziliji leta 1999. Apliciramo ga na listje sadnih dreves, jagodičevja, bombaževcev, sladke pese in riža v količinah 48–216 g/ha. Uporabljamo ga kot sredstvo za zatiranje insektov, kot so moljevke, hrošči, metulji itd. (Tomlin, 2003: 958).

2.4.1 Fizikalno kemijske lastnosti

Tiaklopid je insekticid v obliki kristaliziranega prahu rumenkaste barve z molekulsko maso 252,7 g/mol in gostoto 1,46 g/cm³. Topen je v vodi (topnost v vodi je 185 mg/L pri 20° C). Koeficienta adsorpcije v zemlji imata vrednosti K_d od 1,14 do 5,76 mL/g in K_{oc} od 393 do 870 mL/g. Parni tlak tiakloprida je 3×10^{-10} Pa pri 20° C in Henry-jeva konstanta znaša $4,1 \times 10^{-10}$ Pa m³/mol (Tomlin, 2003: 958).

2.4.2 Poti razgradnje in metaboliti

Razgradnja v vodi

Pri pH 5–9 je tiaklopid stabilen za hidrolizo in fotokemijsko razgradnjo. Glavni proces razgradnje tiakloprida v vodi (kontrolirano okolje v laboratoriju) predstavlja mikrobní metabolizem z razpolovnim časom od 12 do 20 dni. Metaboliti, ki pri tem nastajajo, se v vodnem okolju ne akumulirajo, kajti ko dosežejo maksimalno koncentracijo (med 35. in 62. dnevom po vnosu insekticida), začne njihova koncentracija upadati. Pri razgradnji nastaja tudi ogljikov dioksid (4 %), kar kaže na možnost popolne mineralizacije nastalih metabolitov (Krohn, 2001).

Razgradnja v prsti

Rastje na površju pripomore k zmanjšanju vnosa tiakloprida v prst. Na razgradnjo tiakloprida v prsti vplivajo kemijski procesi, predvsem biokemijski, katalizirani z encimi, ki so prisotni v mikroorganizmih. Pri procesu metabolizma se insekticid razgrajuje preko delne oksidacije določenih atomov in razpada vezi, kar lahko posledično vodi do popolne mineralizacije, to je do ogljikovega dioksida. Tiaklopid razpada v prsti hitro, vrednosti $t_{1/2}$ so pri kontroliranih pogojih v laboratoriju med 1 in 5 dni, odvisno od tipa prsti. Na razgradnjo v prsti v veliki meri vpliva temperatura, saj so vrednosti $t_{1/2}$ pri kontroliranih pogojih višje kot pri realnih, ko so vrednosti $t_{1/2}$ med 9 in 27 dni v severni Evropi ter 10 in 16 dni v južni Evropi. Tiaklopid je v prsti dokaj slabo mobilan in tako ne predstavlja nevarnosti vnosa v podtalnico (Krohn, 2001).

Metabolične pretvorbe pri rastlinah

Pri preučevanju metabolizma v paradižnikih, jabolkah, bombažu, pšenici in rižu so bili dobljeni rezultati med seboj podobni. Glavne poti razgradnje so hidroliza, oksidacija in konjugacija primarnega insekticida, vendar je delež razgradnje nizek. Koncentracija izhodnega insekticida se ni bistveno zmanjšala v primerjavi s koncentracijo nanosa (Tomlin, 2003: 959).

Metabolične pretvorbe pri živalih

Kot testni organizmi so bile uporabljene podgane. Tiaklopid se je hitro in popolnoma absorbiral iz prebavnega trakta v organe in tkivo. Glavnina vnešenega tiakloprida se je izločila preko urina in iztrebkov. Akumulacija tiakloprida ni bila opazna. Poleg

primarnega insekticida je bilo v urinu identificiranih 26 metabolitov. Testi so bili narejeni tudi na kozah, kjer se je prav tako glavna vnešenega insekticida izločila preko urina, zelo majhna količina pa z mlekom (Tomlin, 2003: 958–959).

2.4.3 Toksičnost

Akutna toksičnost

Pri preučevanju toksičnosti so bili kot testni organizmi uporabljene podgane. LD₅₀ preko oralnega vnosa je 836 mg/kg za moški spol in 444 mg/kg za ženski spol. Vrednosti LD₅₀ pri vnosu insekticida skozi kožo so višje od 2000 mg/kg, pri vnosu z dihanjem (4 ure) pa višje od 2535 (organizmi moškega spola) oz. približno 1223 mg/m³ zraka (organizmi ženskega spola). Tiaklopid primarno nima karcinogenih vplivov (Tomlin, 2003: 958).

Vpliv na ptice

LD₅₀ preko oralnega vnosa insekticida ob kratkotrajni izpostavljenosti v primeru japonske prepelice je 49 mg/kg, medtem ko je LD₅₀ za virginijske jerebice 2716 mg/kg (Tomlin, 2003: 958).

Vpliv na ribe

Vrednost LC₅₀ (96 ur) za šarenko je 30,5 mg/L (Tomlin, 2003: 958).

Vpliv na deževnike

Vrednost LC₅₀ (14 dni, 20° C) za deževnike vrste *Eisenia foetida* je 105 mg/kg (Tomlin, 2003: 958).

Vpliv na čebele

Pri nanosu insekticida na hrbtni del oprsja je LD₅₀ za tiaklopid 14,6 µg/čebelo (24 ur po nanosu insekticida), kar pomeni, da so vrednosti LD₅₀ za tiaklopid približno 800-krat višje kot za imidaklopid (Iwasa et al., 2004). Iz literature so tudi podatki za LD₅₀ je 24,2 µg/čebelo (Elbert et al., 2000).

2.5 Tiametoksam

Tiametoksam (3-(2-kloro-1,3-tiazol-5-ilmetil)-5-metil-1,3,5-oksadiazinan-4-iliden(nitro)amin je bil kot insekticid prvič registriran v Novi Zelandiji leta 1997. Nanašamo ga na rastlinske liste ali prst (zeljnate rastline, krompir, riž, bombaževc, citrusi, tobak, soja), lahko pa ga uporabljamo tudi za tretiranje semen (koruza, kitajski sladkorni trs, sladkorna pesa, bombaž, fižol, grah, riž, krompir), in sicer ga apliciramo 10 do 200 g/ha. Uporabljamo ga kot sredstvo za zatiranje koloradskih hroščev, moljev, kobilic, metuljev itd. (Tomlin, 2003: 959).

2.5.1 Fizikalno kemijske lastnosti

Tiametoksam je insekticid v obliki kristaliziranega prahu z molekulsko maso 291,7 g/mol in relativno gostoto 1,57 g/cm³. Topen je v vodi (topnost v vodi je 4100 mg/L, 25° C), porazdelitveni koeficient log P_{ow} znaša -0,13 pri temperaturi 25° C. Parni tlak tiametoksama je 6,6×10⁻⁹ Pa pri 25° C in Henry-jeva konstanta znaša 4,7×10⁻¹⁰ Pa·m³/mol (25° C) (Tomlin, 2003: 959).

2.5.2 Poti razgradnje in metaboliti

Tiametoksam je pri pH 5 hidrolitsko stabilen, saj je njegov razpolovni čas med 200 in 300 dni. Pri pH 9 je razpad hitrejši z razpolovnim časom nekaj dni. V vodnem okolju prihaja do razgradnje insekticida pod alkalnimi pogoji, in sicer je bolj kot biološka razgradnja pomemben proces fotorazgradnje, saj znaša razpolovni čas približno 1 uro (sončna svetloba). V temnem vodno/sedimentnem okolju pa je $t_{1/2}$ od 24 do 44 dni pri anaerobnih pogojih oz. 8 do 16 dni pri aerobnih pogojih (Novartis, 1997).

Razgradnja v prsti

Tiametoksam in njegovi glavni razpadni produkti so v prsti zmerno mobilni ($\log P_{ow}$ znaša -0,13). V kontroliranih laboratorijskih pogojih tiametoksam razpada relativno počasi, vrednosti $t_{1/2}$ so med 34 in 75 dni, medtem ko je razgradnja v realnih sistemih z vrednostmi $t_{1/2}$ med 7 in 28 dni hitrejša (Novartis, 1997).

Metabolične pretvorbe pri rastlinah

Tiametoksam je sistemski insekticid, ki se preko semena (tretiranje semen z insekticidi) ali korenine distribuira v ostale dele rastline. Pri preučevanju metabolizma v rastlinah so bili poskusi narejeni na paradižnikih. Glavna vzroka zmanjševanja primarne koncentracije tiametoksama sta bila fotorazgradnja in odstranjevanje zaradi padavin. Tiametoksam se v rastlinah razgrajuje počasi in tako kot insekticid deluje dlje. Pri preučevanju metabolizma v koruzi, kumaricah in hruškah so ugotovili, da tiametoksam predstavlja glavnino ekstrakta iz rastlin (Novartis, 1997).

Metabolične pretvorbe pri živalih

Testi so bili opravljeni na podganah. Pri oralnem vnosu se tiametoksam hitro in skoraj povsem absorbira in tudi izloči, predvsem preko urina. Poleg podgan so kot testne organizme uporabili koze in kokoši in ugotovili podobnosti v metabolizmu. Večina tiametoksama se izloči v primarni obliki, nastaja le en količinsko pomembnejši razgradni produkt (Novartis, 1997).

2.5.3 Toksičnost

Testi toksičnosti so bili izvedeni na podganah. NOAEL (no observed adverse effect level oz. odmerek/koncentracija, pri kateri ni opaziti neželenih učinkov) koncentracija preko oralnega vnosa insekticida (90 dni) je znašala 1,74 mg/kg za organizme moškega spola in 92,5 mg/kg za organizme ženskega spola. LOAEL (lowest observed adverse effect level oz. najnižji odmerek/koncentracija, pri kateri je opaziti neželen učinek) vrednosti so višje, in sicer 17,64 mg/kg dnevno (organizmi moškega spola) ter 182,1 mg/kg dnevno (organizmi ženskega spola).

Koncentraciji NOAEL za vnos tiametoksama preko kože (28 dni) sta 250 mg/kg dnevno (moški spol) in 60 mg/kg dnevno (ženski spol), medtem ko sta vrednosti LOAEL 1000 in 250 mg/kg dnevno (U.S. EPA. Federal Register Environmental Documents, 2005).

Vpliv na reprodukcijo

Testi vpliva tiametoksama na reprodukcijo so bili izvedeni na podganah. Pri višjih koncentracijah vnešenega insekticida lahko prihaja do vplivov na razvoj zarodka, to je zmanjšanje mase, deformacije v okostju. Koncentracija NOAEL znaša 200 mg/kg dnevno, LOAEL pa 750 mg/kg dnevno (U.S. EPA. Federal Register Environmental Documents, 2005).

Vpliv na ptice

Tiametoksam je zmerno toksičen za ptice. Pri kronični izpostavljenosti insekticidu se leta hitro izloči, prav tako ne prihaja do akumulacije v živalih. LD₅₀ za virginijsko jerebico znaša 1552 mg/kg, za divjo raco pa 576 mg/kg. Podatkov o vrednostih LD₅₀ za ostale ptice v literaturi nismo našli (Syngenta Crop Protection, 2005).

Vpliv na ribe

V literaturi smo dobili podatke o vrednostih LC₅₀ za šarenko in pezdirka, in sicer so vrednosti LC₅₀ za šarenko višje od 100 mg/kg, za pezdirka pa višje od 111 mg/kg (Syngenta Crop Protection, 2005).

Vpliv na deževnike

Vrednosti EC₅₀ za deževnike so višje od 1000 mg/kg prsti (Syngenta Crop Protection, 2005).

Vpliv na čebele

Proizvajalec (Syngenta Crop Protection) navaja kot vrednost LD₅₀ pri kontaktu z insekticidom 24 ng/čebelo, medtem ko je LD₅₀ preko oralnega vnosa nižja, to je 5 ng/čebelo. V literaturi so si vrednosti LD₅₀ pri kontaktu z insekticidom med seboj podobne: 24 ng/čebelo (Senn et al., 1998) oz. 29,9 ng/čebelo (Iwasa et al., 2004).

2.6 Kvantitativno in kvalitativno določanje neonikotinooidov

V literaturi so podatki o različnih tehnikah analize neonikotinooidov v hrani, vodi in prsti. Med glavne uvrščamo tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti v kombinaciji s spektrometrijsko detekcijo v področju UV (HPLC-UV) (Tsamura et al., 1998; Fernandez-Alba et al., 1996; Rossi et al., 2005), tekočinsko kromatografijo z masno spektrometrijo (LC-MS) (Obana et al., 2003), plinsko kromatografijo z masno spektrometrijo (GC-MS) (Navalon et al., 1997; Rossi et al., 2005) in LC-MS na osnovi ionizacije z razprševanjem v visokem električnem polju (ESI) (Fidente et al., 2005).

S plinsko kromatografijo lahko določamo razgradne produkte neonikotinooidov, saj neonikotinoidi niso dovolj hlapni, da bi jih s to metodo lahko zaznali. Pred injiciranjem vzorca neonikotinooidov na kromatografsko kolono je potrebno insekticide iz matriksa izolirati, in sicer z ekstrakcijo na trdnem nosilcu 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 et al., 1997). Pri vzorcih, izoliranih iz biološkega matriksa, je uporaba detektorja z diodno matriko omejena z visoko mejo zaznavnosti in pojavom interferenc kot posledico biološkega izvora vzorcev (Blasco, 2002). Iz literature so poznane metode določanja neonikotinooidov v vzorcih medu, cvetnega prahu, zelenjave, sadja, vode in prsti z vrednostmi LOD od 0,01 do 0,1 mg/kg (med, cvetni prah), 0,01 mg/kg (sadje, zelenjava) in 0,005 mg/kg (prst).

Najbolj razširjeni postopki ekstrakcije neonikotinooidov so ekstrakcija tekoče-tekoče, ekstrakcija na trdnem nosilcu in ekstrakcija trdno-tekoče. Ekstrakcijo tekoče-tekoče uporabljamo predvsem v primerih, ko vzorci, ki jih želimo analizirati, niso v trdnem agregatnem stanju. Primerna topila za ekstrakcijo polarnih snovi, kot so neonikotinoidi, so: diklorometan, metanol, acetonitril in aceton (Ahmed, 2001).

Trdne vzorce lahko ekstrahiramo neposredno v organsko topilo (ekstrakcija trdno-tekoče), npr. v diklorometan. Pogosto je potrebno tako pridobljene ekstrakte vzorcev naknadno čistiti s kromatografskimi kolonami (Rossi et al., 2005).

Pri ekstrakciji na trdnem nosilcu uporabljamo kolone C₁₈ (Baskaran et al., 1997), Extrelut NT20 kolone (Fidente et al., 2005) in kolone LiChrolut (Seccia et al., 2005), kot elucijska topila pa metanol, diklorometan ter zmes etil acetat-metanol (1:1, v/v).

Znani so tudi prvi preliminarni rezultati določanja neonikotinoidov s HPLC-TLS detekcijo (Guzsvany et al., članek v tisku). 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, in sicer 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.

2.7 Laserska detekcija s toplotnimi lečami

Metode, ki za meritev izkoriščajo pretvorbo energije absorbiranega elektromagnetnega valovanja v toploto in s tem povezane spremembe lastnosti vzorca, imenujemo optotermične metode. Posamezne metode se med seboj razlikujejo po načinu zaznavanja optičnega pojava. Tako pri spektrometriji s toplotnimi lečami določamo koncentracije snovi posredno, to je preko sprememb lomnega količnika vzorca, ko je le-ta obsevan z laserskim žarkom. Sprememba lomnega količnika kot posledica povišanja temperature ustvari v vzorcu leči podoben optični element, tako imenovano toplotno lečo (Franko in Tran, 1996). Ta vpliva na povečanje radija tipalnega žarka, kar se odraža kot sprememba njegove intenzitete na detektorju (Franko in Tran, 1996). Matematično lahko to opišemo z enačbo

$$\frac{\Delta I}{I_0} = - \frac{2,303(\partial n/\partial T)PA}{\lambda k} \quad (1)$$

kjer je $\Delta I/I_0$ relativna sprememba intenzitete na osi žarka, P je vzbujevalna moč laserja, $\partial n/\partial T$ temperaturni koeficient lomnega količnika, A absorbanca vzorca, λ valovna dolžina tipalnega žarka in k toplotna prevodnost vzorca.

Iz enačbe (1) je razvidno, da se občutljivost tehnike z večjo močjo laserja in/ali izboljšanjem optotermičnih lastnosti vzorca (toplotna prevodnost in temperaturni koeficient lomnega količnika) poveča (Franko in Tran, 1996).

Prednosti spektrometrije s toplotnimi lečami v primerjavi s transmisijskim načinom merjenja absorbanca so naslednje:

- Toplota, ki se sprosti v vzorcu, je sorazmerna z močjo vzbujevalnega laserja, kar omogoča določitev koncentracij, katerih absorbanca ustrezajo redu velikosti 10⁻⁷.
- Je bistveno manj izpostavljena napakam, ki so posledica sipanja svetlobe. Le-to je namreč pogosto prisotno v vzorcih iz okolja in živil (Franko, 2001).

TLS je v primerjavi z običajno transmisijsko metodo veliko bolj občutljiva, in sicer omogoča meritve do 1000-krat nižjih absorbanca.

Pomanjkljivost spektrometrije s toplotnimi lečami je predvsem v slabši selektivnosti metode, saj običajno izvajamo meritve le pri eni valovni dolžini. V namen izboljšanja

selektivnosti TLS kombiniramo s separacijskimi tehnikami, kot sta kromatografija in kapilarna elektroforeza (Franko, 2001).

3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 Reagenti in raztopine

Uporabili smo naslednje kemikalije in reagente:

- (*EZ*)-1-((6-kloro-3-piridinil)metil)-*N*-nitro-2-imidazolidinimin (imidakloprid), prekristaliziran iz pripravka Confidor 70WG (Bayer); insekticid je bil prekristaliziran po metodi iz literature (Obana et al., 2003) in karakteriziran z ¹H NMR
- (*E*)-*N*¹-[(6-kloro-3-piridil)metil]-*N*²-ciano-*N*¹-metil (acetamiprid), 99,9 % čistost, Riedel de Haën
- (*EZ*)-3-(2-kloro-1,3-tiazol-5-ilmetil)-5-metil-1,3,5-oksadiazinan-4-iliden(nitro)amin (tiametoksam), prekristaliziran iz pripravka Actara 25WG (Syngenta Corp Protection) (Obana et al., 2003)
- (*Z*)-3-(6-kloro-3-piridilmetil)-1,3-tiazolidin-2-ilidencianamid (tiakloprid), prekristaliziran iz pripravka Calypso SC480 (Obana et al., 2003)
- acetonitril, ultra gradient HPLC, J.T. Baker
- metanol, 99,8 % čistost, J.T. Baker
- etil acetat, 99,5 % čistost, Fluka
- aceton, 99,8 % čistost, Carlo Erba
- diklorometan, 99,5 % čistost, J.T. Baker
- *n*-heksan, 95 % čistost, Carlo Erba
- natrijev sulfat, brezvodni, 99 % čistost, Riedel de Haën
- amonijev acetat, 96 % čistost, Merck
- deionizirana voda (Nanopure, Bernstaedt)
- polnilo za kolone Extrelut NT20, Merck

Standardne raztopine insekticidov smo pripravili po naslednjem postopku:

- 20 mg navedenih insekticidov ((*EZ*)-1-((6-kloro-3-piridinil)metil)-*N*-nitro-2-imidazolidinimin, (*E*)-*N*¹-[(6-kloro-3-piridil)metil]-*N*²-ciano-*N*¹-metil, (*EZ*)-3-(2-kloro-1,3-tiazol-5-ilmetil)-5-metil-1,3,5-oksadiazinan-4-iliden(nitro)amin, (*Z*)-3-(6-kloro-3-piridilmetil)-1,3-tiazolidin-2-ilidencianamid; v nadaljevanju insekticidi) smo vsakega posebej zatehtali v 100 mL merilno steklenico, raztopili v deionizirani vodi in dopolnili z vodo do oznake. Tako pripravljene osnovne raztopine smo v 10 mL merilnih steklenicah razredčevali z deionizirano vodo do ustreznih koncentracij 0,005 mg/L–5 mg/L
- 20 mg vsakega od zgoraj navedenih insekticidov smo ločeno zatehtali v 100 mL merilno steklenico in raztopili v etil acetatu. Tako pripravljene osnovne raztopine smo v 10 mL merilnih steklenicah razredčevali z etil acetatom do ustreznih koncentracij 0,005 mg/L–5 mg/L

Standardne raztopine neonicotinooidov smo do uporabe shranili v hladilniku pri 4° C, zaščitene pred svetlobo z aluminijevo folijo.

3.2 Postopki ekstrakcije neonikotinoïdov

3.2.1 Ekstrakcija na trdnem nosilcu

Vzorci smo ekstrahirali z uporabo kolone Extrelut NT20 (Merck) po postopku, opisanem v literaturi (Fidente et al., 2005). Extrelut NT kolone vsebujejo diatomejsko zemljo z velikim volumskim deležem por. Sestavni material je inerten in uporaben v območju pH med 1 in 13. Glede na njihovo kapaciteto lahko kolone NT20 sprejmejo 20 mL vodne raztopine brez prepuščanja vode.

Postopek ekstrakcije je bil naslednji: 20 mL vodne raztopine vzorca (5 g medu, 1–5 g cvetnega prahu) z dodanimi neonikotinoïdi smo kvantitativno prenesli na kolono in počakali, da se raztopina enakomerno porazdeli. Nato smo s tokom dušika približno 20 min prepihovali kolono, in sicer od spodaj navzgor. Kolono smo sprali s 5×20 mL topila (diklorometan, etil acetat, aceton, metanol). Eluent smo zbrali v 250 mL bučki in topilo odparili do suhega na rotavaporju. Suhi preostanek smo raztopili v 1 mL mobilne faze (acetonitril:10 mM amonijev acetat, 3:7 v/v) in stresali na stresalniku 30 min (300 rpm).

3.2.2 Ekstrakcija tekoče-tekoče

K 5 g vzorca (medu ali cvetnega prahu) smo dodali ustrezne volumne standardnih raztopin neonikotinoïdov v deionizirani vodi, tako da so znašale njihove koncentracije v vzorcih od 0,005 do 5 mg/kg. Nato smo dodali 20 mL deionizirane vode in mešali s stekleno paličico do homogenizacije. Homogeno raztopino smo kvantitativno prenesli v 250 mL bučko, dolili 100 mL topila (diklorometan, etil acetat) in stresali na stresalniku 20 min (400 rpm). Po stresanju smo vsebino bučke prelili v 250 mL lij ločnik ter počakali, da se fazi ločita. Ko se je topilo z ekstrahiranimi neonikotinoïdi (spodnja faza) ločilo od vodne raztopine, smo ga prefiltrirali skozi filter papir (črni trak). Po potrebi smo kot sušilno sredstvo dodali brezvodni natrijev sulfat. Na rotavaporju ($T = 40^{\circ} \text{C}$) smo topilo uparili, suhi preostanek pa raztopili v 1 mL mobilne faze in dali na stresalnik (30 min, 300 rpm).

3.2.3 Ekstrakcija trdno-tekoče

K 1 do 5 g cvetnega prahu smo dodali ustrezne volumne standardnih raztopin neonikotinoïdov v acetonitrilu, tako da so bile njihove koncentracije v vzorcih od 0,005 do 5 mg/kg. Počakali smo 30–45 min, da je acetonitril odhlapel in nato dolili 100 mL topila (diklorometan, etil acetat, diklorometan-metanol (1:1, v/v), diklorometan-metanol (1:3, v/v), diklorometan-aceton (1:1, v/v), heksan-aceton (1:1, v/v)) ter stresali na stresalniku 30 min (400 rpm). Topilo z ekstrahiranimi neonikotinoïdi smo skozi filter papir prelili v 250 mL bučko ter cvetni prah še enkrat ekstrahirali z 80 mL topila. Oba ekstrakta smo združili, odparili topilo na rotavaporju ($T = 40^{\circ} \text{C}$), suhi preostanek raztopili v 1 mL mobilne faze in stresali na stresalniku 30 min (300 rpm).

3.3 Instrumenti in oprema

V vseh primerih smo vzorce pred analizo prefiltrirali skozi teflonske filtre z velikostjo por 0,45 μm .

Vzorce smo analizirali na tekočinskem kromatografu Agilent 1100 s spektrofotometrijskim detektorjem z diodno matriko (diode array detektor – DAD).

Uporabili smo separacijski koloni:

- Restec Pinnacle ODS (250 × 4,6 mm, 5 μm); stacionarna faza je oktadecilsilil, C₁₈ (ODS) – na koloni smo analizirali ekstrakte vzorcev medu.
- Hypersil ODS (150 × 4,6 mm, 5 μm); stacionarna faza je oktadecilsilil, C₁₈ (ODS) – na tej koloni smo analizirali ostale vzorce.

V primeru tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z optotermično detekcijo na osnovi spektrometrije s toplotnimi lečami (HPLC-TLS) smo uporabili črpalko (Thermo Separation Products, Spectra System P400), za optotermični spektrometer pa Ar-ionski laser (Coherent, Sabre MotoFred, 244 nm, 80 mW), He-Ne laser (Uniphase, Model 1103P, 632,8 nm, 2 mW), silicijevo diodo (Laser Components, OSD 5-E) za zaznavanje intenzitete tipalnega žarka, fazno vpeti ojačevalnik (Stanford research, SR-830), mehansko prekinjalo (Scientific Instruments, Model 300) in osebni računalnik s programom v programskem jeziku TurboPascal za zajemanje podatkov.

3.4 Kromatografski pogoji

Kolona:

- Restec Pinnacle ODS z dimenzijami 250 mm × 4,6 mm in premerom delcev polnila 5 μm ali
- Hypersil ODS z dimenzijami 150 mm × 4,6 mm in premerom delcev polnila 5 μm .

Stacionarna faza: oktadecilsilil, C₁₈ (ODS)

Mobilna faza: 7:3 (v/v) 10 mM amonijev acetat: acetonitril

Pretok: 1 mL/min

Volumen injiciranja: 75 μL

Temperatura: 28° C

Detektor: spektrofotometrijski detektor z diodno matriko

Valovne dolžine merjenja: 242 nm za tiaklopid, 245 nm za acetamid, 254 nm za tiametoksam in 270 nm za imidaklopid

Temperatura 28° C (sobna temperatura) je bila izbrana zaradi čimvečje primerljivosti s HPLC-TLS detekcijo. Pri HPLC-TLS detekciji namreč nismo mogli nadzirati temperature.

3.5 Pogoji HPLC-TLS merjenja

Kolona: Restec Pinnacle ODS z dimenzijami 250 mm × 4,6 mm in premerom delcev polnila 5 μm

Stacionarna faza: oktadecilsilil, C₁₈ (ODS)

Mobilna faza: 7:3 (v/v) 10 mM amonijev acetat: acetonitril

Pretok: 1 mL/min

Volumen injiciranja: 100 μ L

Temperatura: sobna temperatura ($28 \pm 2^\circ \text{C}$)

Frekvenca vzbujanja: 80 Hz

Časovna konstanta ojačevalnika: 1 s

Detektor: silicijeva dioda

Valovna dolžina merjenja: 244 nm

4 REZULTATI

4.1 Optimiranje kromatografskih pogojev za določevanje neonikotinoidov s HPLC-DAD metodo

4.1.1 Izbira primerne kolone za ločitev neonikotinoidov

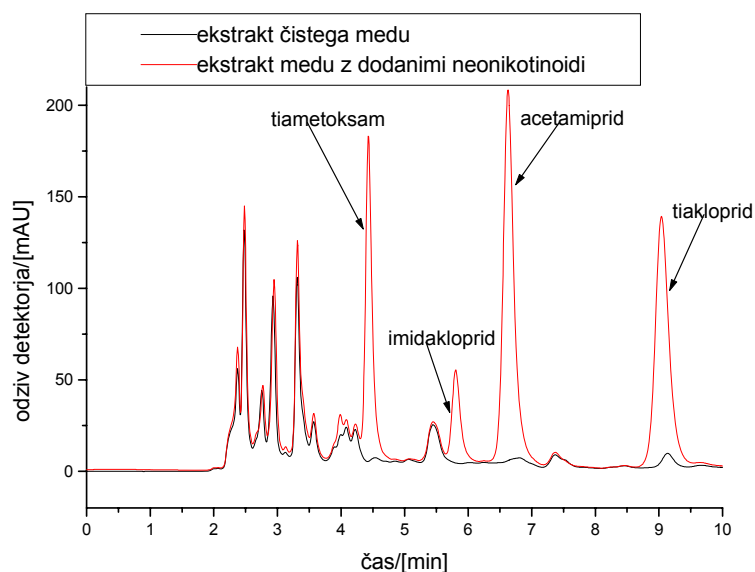
Izbira stacionarne faze je odvisna od polarnosti snovi, ki jih želimo analizirati. Napolarni analiti imajo večjo afiniteto do manj polarnih stacionarnih faz, medtem ko se polarni analiti močneje vežejo na polarno stacionarno fazo. Način separacije določa tudi hidrofobnost analita, in sicer poznamo normalno-fazno separacijo in reverzno-fazno separacijo. V reverzno-faznih separacijah je mobilna faza bolj polarna od stacionarne. Večji delež HPLC analiz je narejenih na reverzno fazni način, saj so preučevani analiti večinoma topni v mešanici vode in/ali polarnih organskih topil kot npr. metanol ali acetonitril.

Iz literature je razvidno, da se pri analizi pesticidov uporablja predvsem reverzno-fazne kolone s stacionarnimi fazami C₈ ali C₁₈, ciano, amino itd. (Ahmed, 2001) na nosilcu iz silicijevega dioksida. Koloni, ki smo ju uporabili v poskusu, imata enako stacionarno fazo (C₁₈), vendar se njune specifikacije nekoliko razlikujejo: kolona Pinnacle ODS je primerna za analizo nevtralnih do nizko bazičnih hidrofobnih analitov, kolona Hypersil ODS je primerna za analizo napolarnih oz. zmerno polarnih analitov, vključno s kislinami, nevtralnimi in lipofilnimi snovmi. Prav tako se koloni med seboj razlikujeta v dolžini, kar posledično vodi do različnih retencijskih časov.

4.1.2 Izbira mobilne faze in metode spiranja

Za HPLC separacijo neonikotinoidnih insekticidov običajno kot mobilno fazo uporabljamo mešanico acetonitrila in vode (Mandić et al., 2005; Rancan et al., 2006). Uvodoma smo vodi za pripravo mobilne faze dodali fosforno kislino (0,2 %), saj naj bi le-ta imela pozitiven vpliv na obliko kromatografskih vrhov, predvsem na njihovo širino (Mandić et al., 2005). V nadaljevalju pa smo za mobilno fazo namesto fosforne kisline uporabili 10 mM amonijev acetat. Pri uporabi vode z dodano fosforno kislino je namreč pri raztapljanju suhega preostanka ekstrakta prišlo do raztapljanja snovi, ki povzročajo interference pri detekciji tiakloprida (valovna dolžina merjenja je 242 nm) (**slika 2**), medtem ko pri signalih ostalih neonikotinoidov (valovne dolžine merjenja 245, 254, 270 nm) ni opaziti interferenc zaradi uporabe določenega topila.

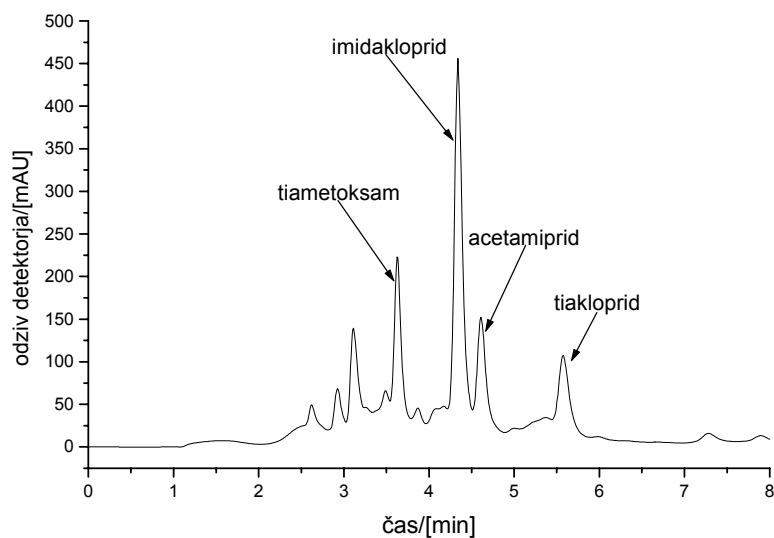
Na **sliki 2** je prikazan kromatogram ekstrakta medu s koncentracijo posameznih neonikotinoidov 5 mg/kg in valovno dolžino merjenja 242 nm. Kot mobilno fazo smo uporabili acetonitril:vodo z dodano fosforno kislino (3:7, v/v).



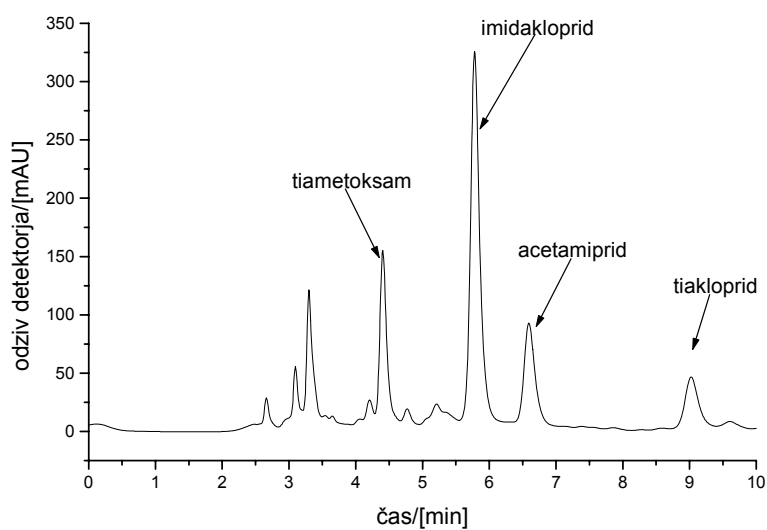
Slika 2: Kromatogram 4-ih neonikotinoidev v medu. Uporabljena mobilna faza je acetonitril:voda z dodano fosforno kislino (3:7, v/v).

Pri HPLC-TLS detekciji je bolj primerna uporaba izokratične elucije, saj v primeru gradientne elucije dobimo višje LOD vrednosti zaradi večjega šuma bazne linije kromatograma. To je posledica nepopolnega mešanja topil pri tem načinu elucije, kar povzroča nehomogenosti v sestavi in optotermičnih lastnostih mobilne faze ter nestabilnost merjenega signala (Kožar Logar et al., 2002). Za lažjo primerjavo preizkušanih metod smo tudi pri HPLC-DAD detekciji uporabili izokratično elucijo. Preverili smo različna razmerja acetonitrila in 10 mM amonijevega acetata (5:95, 10:90, 15:85, 20:80, 25:75, 30:70, 40:60). S stališča TLS detekcije je najugodnejša mobilna faza 4:6 (v/v) acetonitril:10 mM amonijev acetat, saj se z večjim deležem organskega topila poveča tudi občutljivost metode, in sicer zaradi nizke toplotne prevodnosti oz. visokega temperaturnega koeficienta lomnega količnika (1). Po drugi strani večji delež organskega topila zmanjšuje vrednost separacijskega koeficienta, kar posledično vodi do slabše ločbe nekaterih analitov (**sliki 3 in 4**). Separacija posameznih neonikotinoidev je bila nabolj učinkovita, ko sta acetonitril in 10 mM amonijev acetat v razmerju 3:7 v/v.

Na **sliki 3** in **sliki 4** sta prikazana kromatograma ekstrakta medu ob uporabi 4:6 (v/v) acetonitrila:10 mM amonijevega acetata in 3:7 (v/v) acetonitrila:10 mM amonijevega acetata kot mobilne faze. Valovna dolžina merjenja je 270 nm, koncentracija neonikotinoidev v medu pa 5 mg/kg.



Slika 3: Kromatogram ekstrakta medu ob uporabi 4:6 (v/v) acetonitrila:10 mM amonijevega acetata kot mobilne faze.



Slika 4: Kromatogram ekstrakta medu ob uporabi 3:7 (v/v) acetonitrila:10 mM amonijevega acetata kot mobilne faze.

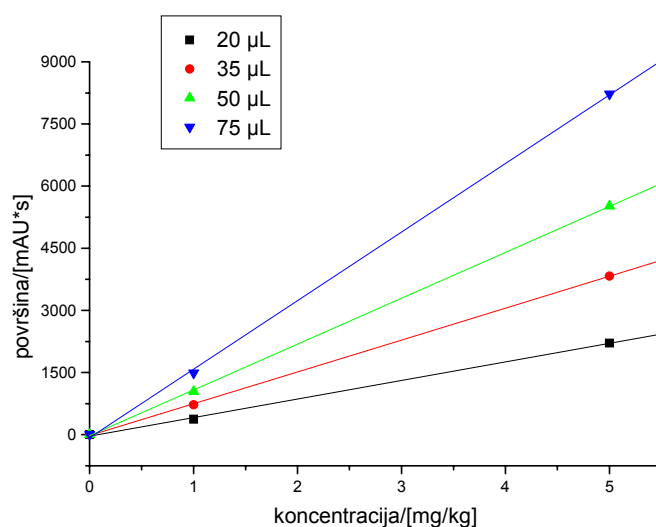
Iz kromatogramov je razvidno, da se imidaklopid in acetamiprid med seboj bolje ločita ob uporabi mobilne faze 3:7 (v/v) acetonitril:10 mM amonijev acetat, boljšo občutljivost pa daje mobilna faza s 40 % acetonitrila, kar je razvidno iz višine kromatografskih vrhov.

4.1.3 Odvisnost površine kromatografskega vrha od volumna vbrizganega vzorca

Pri kromatografskih pogojih iz točke 3.4 smo v tekočinski kromatograf vbrizgali različne volumne (20, 35, 50, 75 μL) ekstraktov vzorcev medu in cvetnega prahu. V literaturi najpogosteje uporabljen volumen injiciranja je 20 μL .

Za določane optimalnega volumna vbrizganega vzorca smo pripravili ekstrahirane vzorce medu in cvetnega prahu s koncentracijama 1 in 5 mg/kg.

Na **sliki 5** je prikazana odvisnosti površine kromatografskega vrha od volumna vbrizganega vzorca in koncentracije imidakloprida v ekstraktu medu pri različnih volumnih injiciranja. Odvisnosti površine kromatografskih vrhov od volumna vbrizganega vzorca in koncentracije so za ostale neonicotinoide v vzorcih medu in cvetnega prahu podobne. V vseh primerih površina kromatografskega vrha narašča sorazmerno z volumnom vbrizganega vzorca. Vrednosti površin kromatografskih vrhov za proučevane neonicotinoide v vzorcih medu in cvetnega prahu (1, 5 mg/kg) so prikazane v **tabelah 1 in 2**.



Slika 5: Odvisnost površine kromatografskega vrha od koncentracije imidakloprida v medu pri različnih volumnih vbrizganega ekstrakta. Vzorci so bili ekstrahirani z ekstrakcijo tekoče-tekoče ob uporabi diklorometana kot topila.

Tabela 1: Vrednosti površin kromatografskih vrhov posameznih neonicotinoidov v ekstraktu medu pri koncentracijah 1 in 5 mg/kg in različnih volumnih injiciranja (20, 35, 50, 75 μL). Vzorci so bili ekstrahirani z ekstrakcijo tekoče-tekoče, kot topilo smo uporabili diklorometan.

	koncentracija /[mg/kg]	volumen injiciranja				površina [mAU*s]
		20 μL	35 μL	50 μL	75 μL	
tiametoksam	1	364,97	570,68	807,804	1021,0	
	5	1491,0	2579,4	3836,4	5659,9	
imiadkloprid	1	374,00	721,28	1043,8	1484,8	
	5	2212,1	3826,7	5515,1	8221,5	
acetamiprid	1	595,93	1010,0	1549,4	2297,6	
	5	2634,0	4663,3	6798,5	10105	
tiakloprid	1	534,30	702,71	1190,5	1411,0	
	5	2036,9	3600,2	5586,9	7612,0	

Tabela 2: Vrednosti površin kromatografskih vrhov posameznih neonikotinooidov v ekstraktu cvetnega prahu pri koncentracijah 1 in 5 mg/kg in različnih volumnih injiciranja (20, 35, 50, 75 µL). Vzorci cvetnega prahu v granulah so bili ekstrahirani z ekstrakcijo trdno-tekoče, kot topilo smo uporabili diklorometan.

	koncentracija /[mg/kg]	volumen injiciranja				površina/[mAU*s]
		20 µL	35 µL	50 µL	75 µL	
tiametoksam	1	81,413	161,09	226,61	347,24	
	5	530,94	990,99	1432,7	2205,6	
imiadklopid	1	159,84	338,05	444,47	678,24	
	5	653,41	1203,1	1700,4	2571,0	
acetamiprid	1	120,16	250,10	392,33	667,72	
	5	688,32	1368,2	1962,5	3054,5	
tiaklopid	1	88,920	204,92	325,94	492,06	
	5	432,58	829,89	1303,6	1937,0	

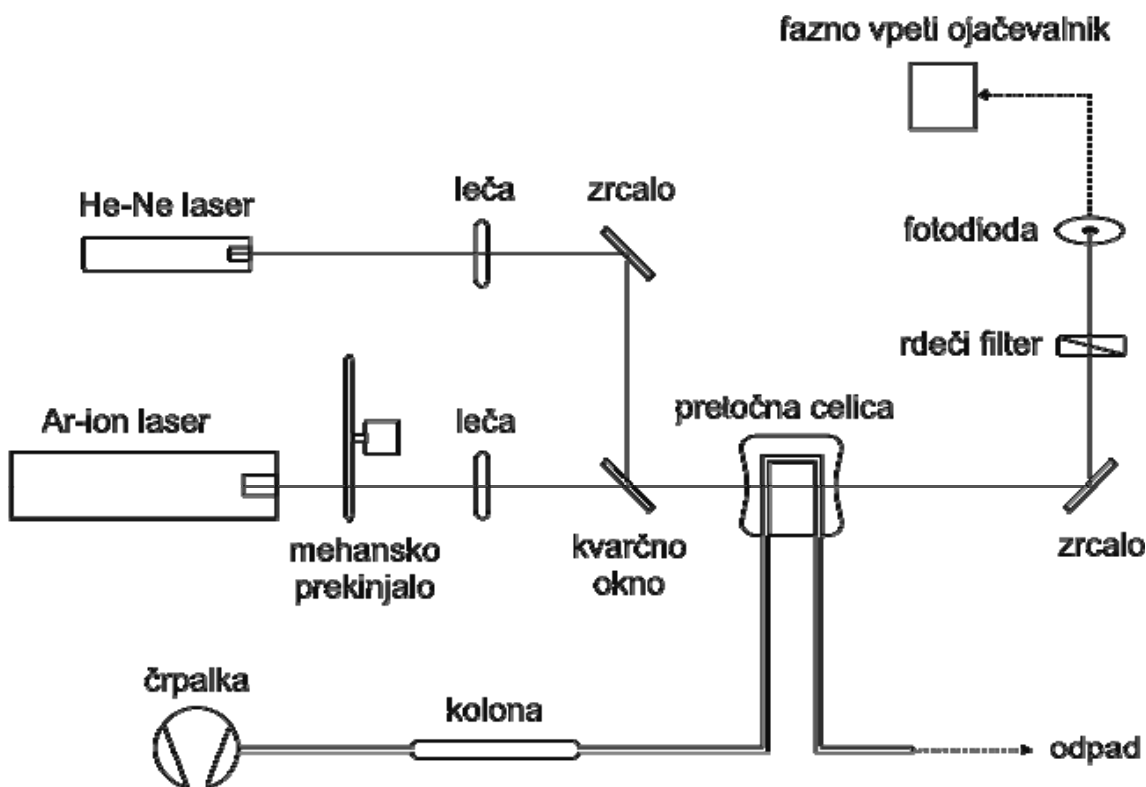
Na osnovi dobljenih rezultatov smo se odločili za vbrizgavanje 75 µL ekstrakta, saj smo tako dosegli večje občutljivosti. Pri tem je potrebno omeniti, da se z večjim volumnom injiciranja zviša tudi bazna linija, kar lahko vpliva na vrednost LOD oz. mejo zaznavnosti.

4.2 Optimiranje parametrov pri HPLC-TLS detekciji

4.2.1 Postavitev HPLC-TLS sistema

Poskus smo opravljali na dvožarkovnem (vzbujevalno/tipalni sistem) instrumentu: z enim laserskim žarkom vzorec vzbujamo (vzbujevalni žarek), z drugim pa zaznavamo nastale spremembe (tipalni žarek).

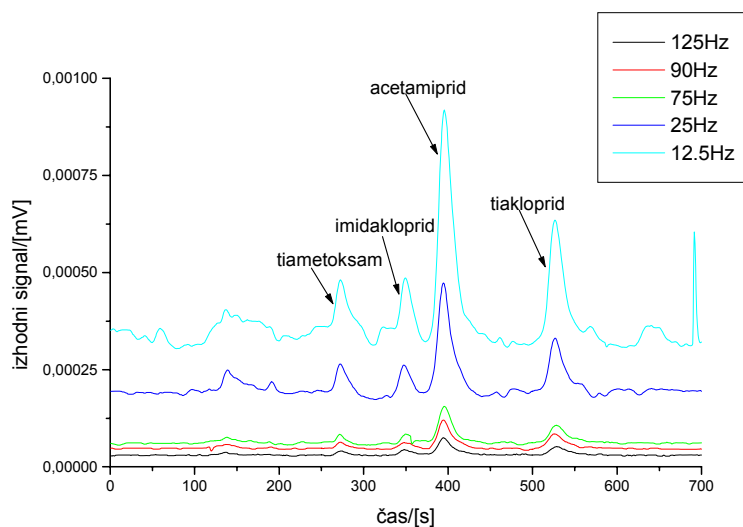
Za merjenje vzorcev s fototermično detekcijo smo prevzeli postavitev spektrometra iz preliminarnega poskusa (Guzsvany et al., 2006, članek v tisku), katerega shema je prikazana na **sliki 6**, zamenjali smo le prvotni tipalni laser He-Ne (2 mW) z močnejšim, to je 7 mW-nim. S tem smo želeli povečati intenziteto tipalnega žarka na fotodiodi in tako zmanjšati relativno napako meritve zaradi šuma tipalnega laserja.



Slika 6: Shema HPLC-TLS instrumenta.

4.2.2 Vpliv frekvence na občutljivost merjenja

S spreminjanjem frekvence modulacije vzbujevalnega žarka lahko optimiziramo razmerje signal/šum (S/N – signal/noise). Na **sliki 7** so prikazani kromatogrami posameznih neonicotinoidov, posnetih s TLS detekcijo pri različnih frekvencah modulacije.



Slika 7: Vpliv frekvence modulacije vzbujevalnega žarka na signal in razmerje signal/šum. Koncentracija posameznih neonicotinoidov je 0,25 mg/kg, P (moč vzbujevalnega laserja) znaša 80 mW, časovna konstanta pa 1 s.

Iz zgornjih kromatogramov je opazno, da se šum pri spreminjanju frekvence od 12,5 Hz do 125 Hz zmanjšuje. Prav tako je razvidno, da se s spreminjanjem frekvence (od 12,5 do 125 Hz) višina vrhov zmanjšuje, kar je logična posledica manjšega vzbujevalnega časa zaradi višjih frekvenc modulacije. V nadaljevanju poskusa smo vzorce analizirali pri frekvenci modulacije 80 Hz, razmerje signal/šum je namreč največje pri tej vrednosti. Vrednosti razmerij signal/šum so prikazane v **tabeli 3**. Ostali pogoji merjenja so bili v vseh primerih enaki (moč vzbujevalnega laserja 80 mW, časovna konstanta 1 s).

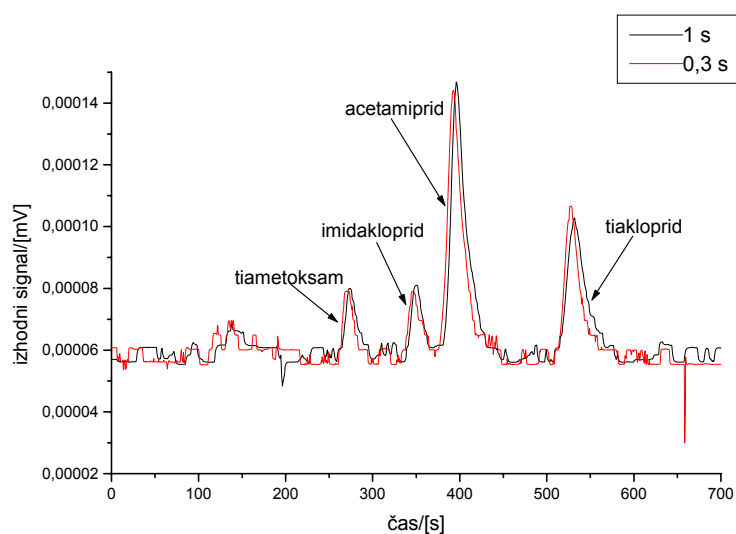
Tabela 3: Vrednosti razmerij signal/šum v odvisnosti od frekvence modulacije vzbujevalnega žarka.

frekvenca modulacije vzbujevalnega žarka/[Hz]	razmerje signal/šum
12,5	53,21
25	146,4
75	107,8
80	152,5
90	122,6
125	93,02

4.2.3 Vpliv časovne konstante

Poskusi so pokazali, da je pri daljših časovnih konstantah ojačevalnika šum signala manjši, in sicer zaradi daljših časovnih intervalov, v katerih se signal na ojačevalniku povpreči. Negativni vplivi daljših časovnih konstant se kažejo v razširitvi kromatografskih vrhov. Krajše časovne konstante (0,3 s) pripomorejo k boljši ločljivosti posameznih neonicotinoidov, vendar je posledično tudi šum večji.

Na podlagi primerjave kromatogramov, posnetih pri različnih časovnih konstantah in doseženih ločljivostih ter šuma (**slika 8**), smo se odločili, da v nadaljevanju uporabimo časovno konstanto 1 s.

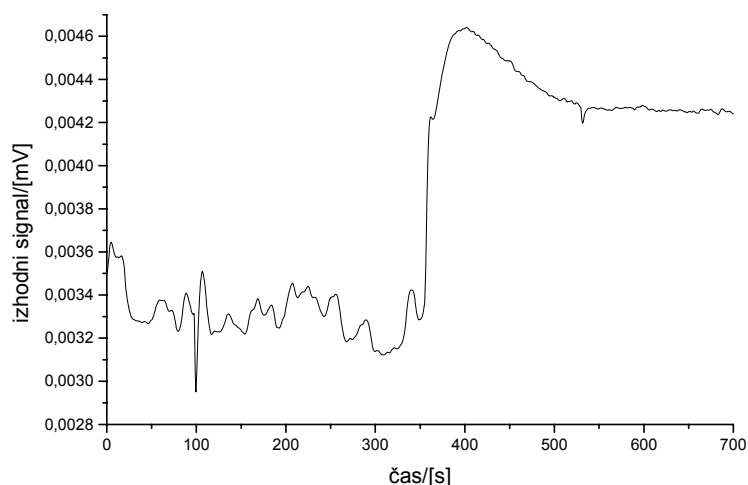


Slika 8: Vpliv časovne konstante na signal posameznih neonicotinoidnih insekticidov. Koncentracija je 0,25 mg/kg, P znaša 80 mW, časovni konsatnti pa 1 in 0,3 s.

4.2.4 Vpliv črpalke na stabilnost bazne linije

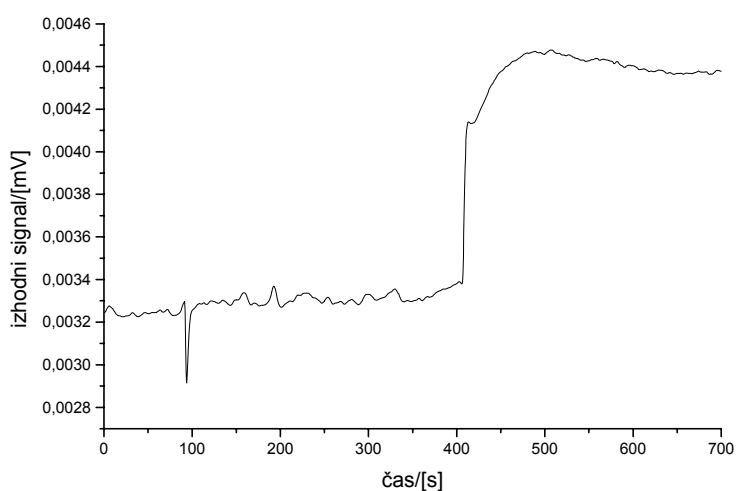
Zaradi nestabilne bazne linije smo preverili delovanje črpalke: postavitve sistema je podobna tisti na **sliki 6**, le da je žarek Ar-ionskega laserja blokiran in mehansko prekinjalo prestavljeno, tako da modulira frekvenco tipalnega žarka. Pri tej postavitvi sistema bi morali, ko potuje skozi pretočno celico mobilna faza, ob stabilnem pretoku in delovanju laserja dobiti tudi stabilen signal. V našem primeru signal niha in se stabilizira šele po ustavitvi črpalke.

Na **sliki 9** je prikazano spreminjanje intenzitete tipalnega žarka zaradi delovanja črpalke. Med delovanjem črpalke (0–350 s) je opazno tudi do 10-odstotno nihanje intenzitete tipalnega žarka na detektorju. Predvidevamo, da je to posledica nestabilnega pretoka mobilne faze skozi celico, ki vpliva na optično pot žarka med pretočno celico in detektorjem. Ob prekinitvi delovanja črpalke se zato izmerjena intenziteta žarka poviša in ustali.



Slika 9: Spreminjanje intenzitete tipalnega žarka med delovanjem črpalke (začetnih 350 s) in ob ustavitvi le-te (zadnjih 350 s). Časovna konstanta je 1 s.

Po zamenjavi prvotne črpalke (Shimadzu LC-10Ai) z novo (Thermo Separation Products, Spectra System P4000) smo ponovno preverili stabilnost signala (**slika 10**).



Slika 10: Spreminjanje intenzitete tipalnega žarka med delovanjem črpalke (začetnih 400 s) in ob ustavitvi le-te (zadnjih 300 s). Časovna konstanta je 1 s.

V tem primeru je stabilnost signala med delovanjem črpalke boljša in odstopanja ne presegajo 3 %, zato smo to črpalko izbrali za nadaljnje delo.

4.3 Optimiranje ekstrakcije neonikotinoidev iz medu

4.3.1 Ekstrakcija na trdnem nosilcu s kolono Extrelut NT20

Da bi ugotovili ponovljivost celotnega postopka ekstrakcije, smo opravili štiri ponovitve ekstrakcije za koncentraciji 5 mg/kg in 2 ponovitvi v primeru koncentracije 1 mg/kg. Dobljeni rezultati so prikazani v **tabeli 4**.

Tabela 4: Izkoristek ekstrakcije neonikotinoidev iz medu s kolono Extrelut NT20.

Neonikotinoide	Izkoristek (pri koncentraciji 1 mg/kg)	Izkoristek (pri koncentraciji 5 mg/kg)
Tiametoksam	/	25,9 ± 2,3 %
Imidakloprid	19,7 ± 2,6 %	29,7 ± 8,4 %
Acetamiprid	21,9 ± 3,7 %	25,2 ± 5,2 %
Tiakloprid	22,3 ± 4,1 %	25,0 ± 2,8 %

Izkoristek ekstrakcije za tiametoksam (koncentracija 1 mg/kg) ni podan, količina tiametoksama v ekstraktu medu je bila namreč pod mejo detekcije. Za ostale neonikotinoide so izkoristki ekstrakcij med seboj primerljivi in so v območju od 20 (imidakloprid) do 23 % (tiakloprid). Relativni standardni odmiki pa v območju od 14 % (imidakloprid) do 18 % (tiakloprid).

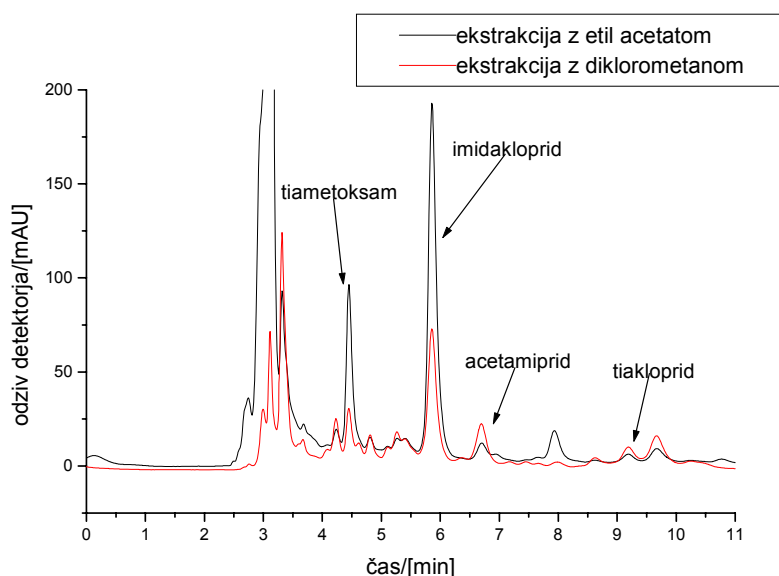
Med seboj primerljivi so tudi izkoristki ekstrakcij pri koncentraciji 5 mg/kg, ki so v območju od 25 % (tiakloprid) do 30 % (imidakloprid). Relativni standardni odmiki so v povprečju večji kot pri koncentraciji 1 mg/kg, in sicer je najvišji odmik 28 % (imidakloprid).

Diatomejska zemlja, ki sestavlja kolono Extrelut NT, je naravni material, kar posledično lahko vodi do določenih odstopanj v rezultatih. Proizvajalec (Merck) zagotavlja kontrolo surovega materiala in končnega produkta, zato smo predvidevali, da na ponovljivost rezultatov polnilo bistveno ne vpliva.

Preverili smo tudi vpliv različnih topil za izpiranje kolone na izkoristek ekstrakcije. Poleg diklorometana (polarnost – 3,4) smo uporabili tudi etil acetat (polarnost – 4,3), aceton (polarnost – 5,4), acetonitril (polarnost – 6,2) in metanol (polarnost – 6,6).

Primerne so bile le ekstrakcije medu, pri katerih smo za izpiranje kolone uporabili diklorometan in etil acetat. Pri izpiranju z ostalimi topili smo dobili emulzije, v primeru uporabe acetonitrila pa je v eluatu prišlo do ločbe dveh faz. Predvidevamo, da ta topila, poleg neonikotinoidev, ekstrahirajo tudi velik del matriksa, zato bi bilo pred HPLC analizo potrebno nadaljnje čiščenje.

Na **sliki 11** sta prikazana kromatograma ekstraktov medu, pripravljenih z različnima topiloma.



Slika 11: Kromatograma ekstraktov medu pri uporabi različnih topil. Koncentracija posameznih neonikotinoïdov je v obeh primerih 1 mg/kg, valovna dolžina merjenja pa 270 nm.

Opazimo lahko, da je učinkovitost ekstrakcije tiametoksama in imidakloprida večja ob uporabi etil acetata kot topila za izpiranje, medtem ko je ekstrakcija acetamiprida in tiakloprida bolj učinkovita ob uporabi diklorometana.

4.3.2 Ekstrakcija tekoče-tekoče

S ciljem izboljšanja izkoristka ekstrakcije vseh 4-ih neonikotinoïdov smo poskusili vzorce medu ekstrahirati z ekstrakcijo tekoče-tekoče in kot topilo uporabiti diklorometan.

Izkoristki narejenih ekstrakcij so zbrani v **tabeli 5**.

Tabela 5: Izkoristek ekstrakcije tekoče-tekoče. Rezultati predstavljajo povprečje dveh ponovitev. Koncentracija neonikotinoïdov v medu je 5 mg/kg.

neonikotinoïdi	izkoristek
tiametoksam	83,0 ± 13 %
imidakloprid	99,0 ± 1,4 %
acetamiprid	75,8 ± 9,6 %
tiakloprid	84,7 ± 6,3 %

Izkoristki tako narejenih ekstrakcij so bili zadovoljivi, prav tako relativni standardni odmiki, ki razen v primeru tiametoksama niso presegali vrednosti 10 %.

4.4 Optimiranje ekstrakcije neonikotinoidev iz cvetnega prahu

4.4.1 Ekstrakcija tekoče-tekoče

Glede na uspešnost ekstrakcije tekoče-tekoče na primeru medu smo poskusili na enak način ekstrahirati tudi vzorce cvetnega prahu. Kot topilo smo uporabili diklorometan in etil acetat. V obeh primerih je po stresanju prišlo do nastanka emulzije, katere ni bilo možno ločiti in nadalje obdelati.

Preverili smo vpliv dodatka natrijevega sulfata (0,2 g/mL H₂O) na ekstrakcijo tekoče-tekoče (kot topilo smo uporabili diklorometan). Z natrijevim sulfatom smo želeli zvečati ionske jakosti raztopin in s tem izkoristek (Fernandez et al., 2001). Postopek ekstrakcije je bil enak, kot je opisano v eksperimentalnem delu, poglavje 3.2.2, množina cvetnega prahu pa je bila 1 g. V primeru dodanega natrijevega sulfata lahko fazi po stresanju ločimo in topilo v organski fazi odparimo do suhega.

V **tabeli 6** so prikazani rezultati ekstrakcije, ko smo cvetnemu prahu dodali 20 % vodno raztopino natrijevega sulfata (20 mL).

Tabela 6: Izkoristek ekstrakcije tekoče-tekoče z dodanim natrijevim sulfatom. Rezultati predstavljajo povprečje dveh ponovitev. Koncentracija neonikotinoidev v cvetnem prahu je 5 mg/kg.

neonikotinoidev	izkoristek
tiametoksam	23,1 ± 1,8 %
imidakloprid	31,7 ± 9,8 %
acetamiprid	21,8 ± 3,4 %
tiakloprid	37,1 ± 3,0 %

Izkoristki ekstrakcij so med 22 in 37 %. Relativni standardni odmik v primeru acetamiprida je 16 %, pri ostalih neonikotinoidev pa relativni standardni odmik ne presega 10 %.

4.4.2 Ekstrakcija trdno-tekoče

Uvodoma smo ekstrakcijo trdno-tekoče delali po metodi iz literature (Rossi et al., 2005), vendar brez dodatka hidromatriksa (zdrobljena in prečiščena diatomejska zemlja, ki se uporablja tudi za polnilo kolon, proizvajalec – Varian). Ker tako dobljeni izkoristki (pod 50 %), niso bili primerljivi z rezultati, ki jih navaja članek (71–99 %), smo skušali postopek ekstrakcije optimirati.

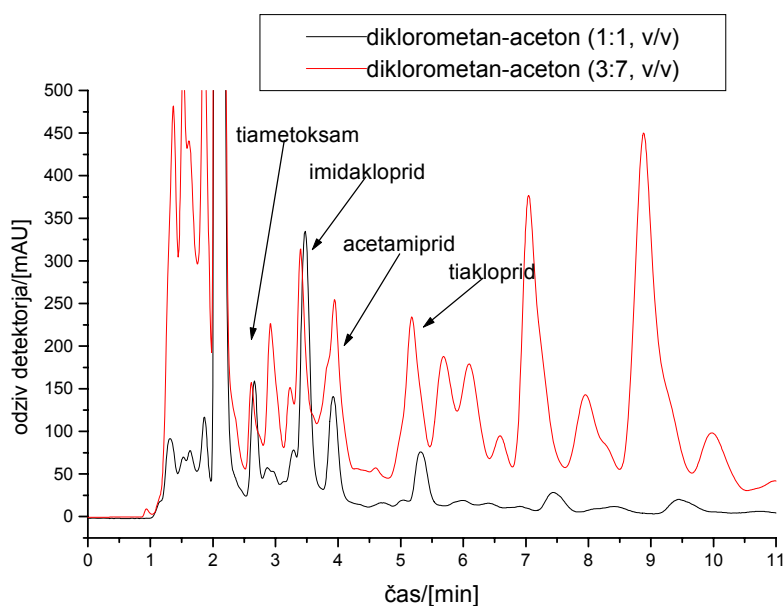
Vzorce cvetnega prahu smo ekstrahirali z organskimi topili. Postopek ekstrakcije je opisan v eksperimentalnem delu, poglavje 3.2.3. Pri ekstrakciji smo kot topila uporabili diklorometan in etil acetat ter zmesi diklorometan-metanol (1:1, v/v), diklorometan-metanol (1:3, v/v), diklorometan-aceton (1:1, v/v) in heksan-aceton (1:1, v/v). Ob uporabi etil acetata kot topila na posnetih kromatogramih (HPLC-DAD) ni bilo vidnih vrhov za posamezne neonikotinoide. Ekstrakte vzorcev, kjer smo uporabili kot topilo diklorometan-metanol in heksan-metanol, nismo analizirali, saj smo v obeh primerih dobili emulzije. Ostale ekstrakte smo analizirali s HPLC-DAD detekcijo. Dobljene vrednosti izkoristkov posameznih ekstrakcij so prikazane v **tabeli 7**.

Tabela 7: Vpliv topila na izkoristek ekstrakcije neonikotinooidov iz cvetnega prahu z organskimi topili. Masa cvetnega prahu je bila pri vseh vzorcih 2 g. Za vsak primer je bila narejena le ena ekstrakcija.

topilo (100mL)	neonikotinoidi	izkoristek
diklorometan	tiametoksam	44,0 %
	imidaklopid	42,2 %
	acetamiprid	39,4 %
	tiaklopid	48,1 %
heksan-aceton (1:1, v/v)	tiametoksam	52,6 %
	imidaklopid	51,8 %
	acetamiprid	47,4 %
	tiaklopid	44,0 %
diklorometan-aceton (1:1, v/v)	tiametoksam	75,2 %
	imidaklopid	68,4 %
	acetamiprid	66,0 %
	tiaklopid	65,4 %

Izkoristki ekstrakcij, ko kot topilo uporabimo diklorometan, so med 39 % za acetamiprid in 48 % za tiaklopid. Ob uporabi zmesi heksana in acetona (1:1, v/v) so izkoristki ekstrakcij med 44 % (tiaklopid) in 53 % (tiametoksam). Ko pri ekstrakciji uporabimo diklorometan-aceton (1:1, v/v), dobimo izkoristke ekstrakcij med 65 % (tiaklopid) in 74 % (tiametoksam). V nadaljevanju smo zato kot topilo uporabili diklorometan-aceton.

Preverili smo tudi učinkovitost ekstrakcij, za razmerja diklorometan-aceton 3:7 in 7:3. V prvem primeru (diklorometan-aceton 3:7) so površine vrhov posameznih neonikotinooidov na kromatogramu sicer večje, vendar je tudi bazna linija višja, kar smo potrdili z analizami ekstraktov čistega cvetnega prahu. Prav tako se za to razmerje topil zniža ločljivost kromatografskega postopka, saj so kromatografski vrhovi posameznih insekticidov slabše ločeni, poveča pa se tudi ekstrakcija sestavin matriksa, ki motijo določitev neonikotinooidov (*slika 12*). V primeru, ko za ekstrakcije uporabimo diklorometan-aceton v razmerju 7:3, je učinkovitost ekstrakcij primerljiva z vrednostmi v tabeli 6 (diklorometan-aceton (1:1, v/v)).



Slika 12: Kromatograma ekstrakcij z različnima razmerjema topil. Valovna dolžina merjenja je 270 nm, koncentracija neonikotinoidev v cvetnem prahu pa 5 mg/kg.

V nadaljevanju poskusa smo preverili, ali na ekstrakcijo vpliva drobljenje cvetnega prahu. Na trgu ga namreč prodajajo v obliki granul. Ob primerjavi kromatogramov vzorcev zdrobljenega in granularnega cvetnega prahu nismo opazili razlik. Prav tako ni bilo opaznih razlik, ko smo poleg topila cvetnemu prahu dodali diatomejsko zemljo, tj. polnilo v kolonah Extrelut NT20.

Ker je cvetni prah higroskopen, smo preverili tudi vpliv vlage na ekstrakcijo. Pred samim postopkom ekstrahiranja smo cvetni prah (zdrobljen) sušili v sušilniku pri 50° C približno 12 oziroma 24 h. Ko smo za ekstrakcije vzorcev uporabili tako obdelan cvetni prah, so se izkoristki ekstrakcij povečali, in sicer do 10 %.

Prav tako smo preverili vpliv dodanega sušila (brezvodnega natrijevega sulfata) posušenemu cvetnemu prahu (T sušenja = 50° C, čas sušenja = 12 h) in ugotovili, da ni opaznega vpliva na izkoristke ekstrakcij.

V namen optimiziranja ekstrakcij smo vzorce cvetnega prahu (5 g) s koncentracijo 5 mg/kg ekstrahirali v treh zaporednih ekstrakcijah, v 1. ekstrakciji smo uporabili 100 mL topila, v 2. in 3. ekstrakciji 80 mL. V **tabeli 8** so prikazani izkoristki druge in tretje ekstrakcije.

Tabela 8: Izkoristki 2. in 3. ekstrakcije za posamezne neonikotinoide. Rezultati predstavljajo povprečje dveh ponovitev celotnega postopka ekstrakcije.

	izkoristek 2. ekstrakcije	izkoristek 3. ekstrakcije
tiametoksam	8,1 ± 3,5 %	1,4 ± 1,4 %
imidaklopid	7,4 ± 4,2 %	1,2 ± 0,2 %
acetamiprid	9,4 ± 5,7 %	1,8 ± 0,1 %
tiaklopid	11 ± 9,2 %	1,5 ± 1,0 %

Na podlagi dobljenih vrednosti smo se odločili, da bomo vzorce cvetnega prahu ekstrahirali 2-krat.

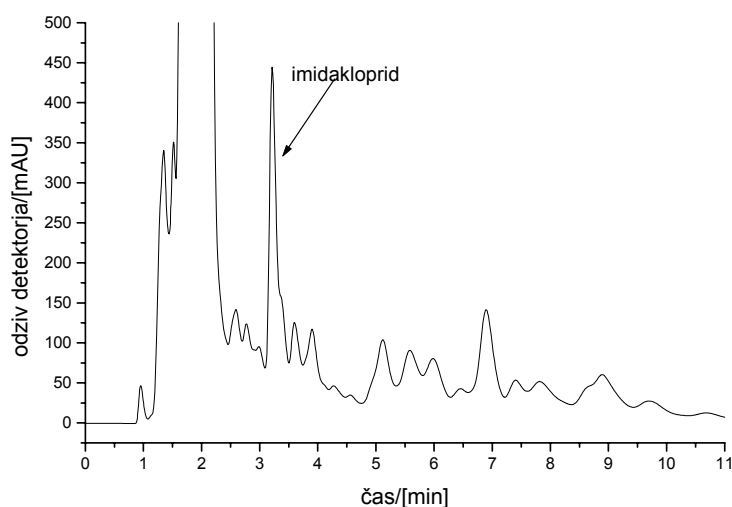
Pri ekstrakciji cvetnega prahu je potrebno omeniti, da so bile vrednosti izkoristkov ekstrakcij različne, ko smo vzeli 1 g, 2 g in 5 g vzorca in slabo ponovljive. Pri nižjih masah (1 in 2 g) smo dobili v povprečju tudi do 20 % boljše izkoristke ekstrakcij. Predvidevamo, da je vzrok temu način nanašanja neonikotinoidev na vzorce cvetnega prahu. Pri manjši množini vzorca je lahko prišlo do slabše adsorpcije standardne raztopine na cvetni prah ter do nehomogene porazdelitve neonikotinoidev v vzorcih. Največje razlike v izkoristkih ekstrakcij smo ugotovili, ko smo uporabili cvetni prah v granularni obliki, saj je zaradi majhne količine vzorca prihajalo do nanosa neonikotinoidev na steklo čaš. Tudi to je bil razlog, da smo v ekstrakcijah vzeli po 5 g cvetnega prahu, in tako zagotovili večjo ponovljivost postopka ekstrakcije.

Predvidevamo, da na slabo učinkovitost ekstrakcije v cvetnem prahu vpliva predvsem vsebnost vode v vzorcih, saj so izkoristki ekstrakcije pri uporabi cvetnega prahu, ki ga predhodno zdrobimo in sušimo v sušilniku pri 100° C za približno 1 h ter nato dodamo neonikotinoide, višji od 72 (5 g cvetnega prahu) oziroma 83 % (1 g cvetnega prahu) (**tabela 9**). S tem lahko tudi razložimo bistveno nižje izkoristke v primeru ekstrakcije tekoče-tekoče, ko smo iz cvetnega prahu najprej pripravili vodno emulzijo.

Tabela 9: Izkoristki ekstrakcij (ekstrakcija trdno-tekoče, kot topilo smo uporabili diklorometan-aceton, 1:1) zdrobljenega cvetnega prahu (1 in 5 g), ki smo ga predhodno sušili pri 100° C približno 1 h. Koncentracija neonikotinoidev v vzorcih je 5 mg/kg, za vsak primer je bila narejena le ena ekstrakcija.

Neonikotinoide	Izkoristek (za 1 g vzorca)	Izkoristek (za 5 g vzorca)
Tiametoksam	82,6 %	73,2 %
Imidakloprid	87,4 %	82,0 %
Acetamiprid	83,2 %	71,7 %
Tiakloprid	95,3 %	81,8 %

Za analizo realnih vzorcev, ki že vsebujejo neonikotinoide, pa sušenje pri 100° C ni primerno, saj neonikotinoide razpadajo. To dokazuje tudi primer, ko smo cvetnemu prahu (5 g) dodali neonikotinoide (5 mg/kg) pred sušenjem. Na kromatogramu HPLC-DAD je pri valovni dolžini merjenja 270 nm, dobro viden le imidakloprid (**slika 13**) s 30,8 % izkoristkom ekstrakcije.



Slika 13: Kromatogram ekstrakta cvetnega prahu, ki smo ga po dodanih neonikotinoidih sušili v sušilniku pri 100° C približno 1 h.

4.4.3 Ekstrakcija na trdnem nosilcu s kolono Extrelut NT20

V literaturi (Rossi et al., 2005) so pri ekstrakciji imidakloprida iz cvetnega prahu (2 g) poleg topila uporabili tudi hidromatriks. Hidromatriks deluje kot sušilno sredstvo in pri ekstrakcijah tekoče-tekoče pripomore, da ne pride do nastanka emulzije. Prav tako poveča ponovljivost ekstrakcij (Varian, tehnični opis produkta). Hidromatriks je pravzaprav prečiščena diatomejska zemlja, ki se uporablja tudi kot polnilo v kolonah za ekstrakcijo na trdnem nosilcu. Kolone Extrelut NT20 vsebujejo kot polnilo diatomejsko zemljo, zato smo preverili, kakšna je učinkovitost ekstrakcij pri uporabi le-teh.

Ekstrakcija vzorcev je potekala po enakem postopku, kot je opisano v poglavju 3.2.1. Neonikotinoide smo ekstrahirali iz 1 g ali zaradi večje občutljivosti metode iz 5 g cvetnega prahu. Pri ekstrakciji iz 5 g cvetnega prahu smo po dodatku 20 mL vode dobili zelo gosto raztopino. Le-ta se po koloni ni enakomerno raztopila in je zapolnila le zgornjo polovico kolone. Prav tako se je problem pojavil pri eluciji neonikotinoidov, saj je gošča na vrhu kolone tvorila neprepustno plast, katero smo morali ročno odstraniti, da je lahko prišlo do spiranja kolone s topilom.

Dobljene vrednosti izkoristka ekstrakcije so za obe količini vzorca prikazane v **tabeli 10**.

Tabela 10: Izkoristek ekstrakcije neonikotinoidov iz cvetnega prahu s kolono Extrelut NT20, koncentracija neonikotinoidov je 5 mg/kg. Prikazani rezultati predstavljajo povprečje dveh ponovitev.

Neonikotinoidi	Izkoristek (za 1g vzorca)	Izkoristek (za 5 g vzorca)
Tiametoksam	79,7 ± 0,9 %	55,5 ± 13,2 %
Imidaklopid	102 ± 1,7 %	54,8 ± 3,4 %
Acetamiprid	95,1 ± 2,4 %	56,0 ± 2,2 %
Tiaklopid	128 ± 2,8 %	42,8 ± 0,3 %

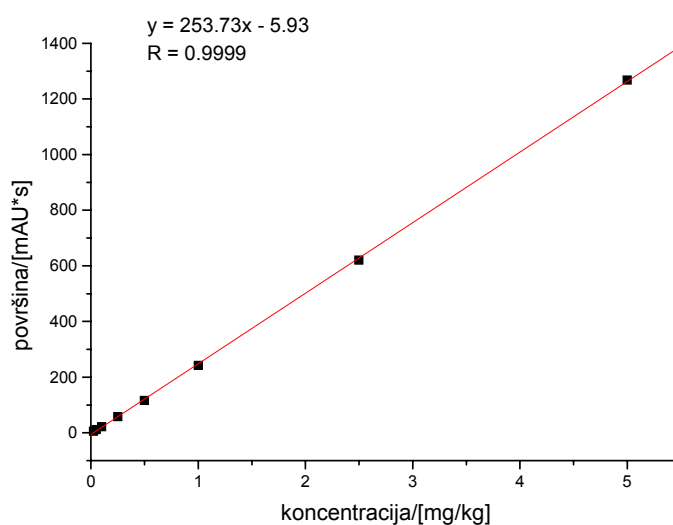
Pri uporabi 1 g cvetnega prahu je učinkovitost ekstrakcije nad 79 %, ponovljivost pa dobra, saj so vrednosti relativnega standardnega odmika pod 3 %. Zaradi majhne množine cvetnega prahu je občutljivost merjenja nižja. Metoda ekstrakcije z uporabo kolone Extrelut NT20 je torej primerna za mase vzorcev cvetnega prahu do 1 g (v teh primerih vodna raztopina ni pregosta) in pričakovane koncentracije neonikotinoidov v cvetnem prahu večje od 1 mg/kg.

Izkoristki ekstrakcij ob uporabi 5 g cvetnega prahu so med 43 % (tiaklopid) in 56 % (acetamiprid). V primeru tiametoksama je relativni standardni odmik 24 %, za ostale neonikotinoide so vrednosti pod 7 %.

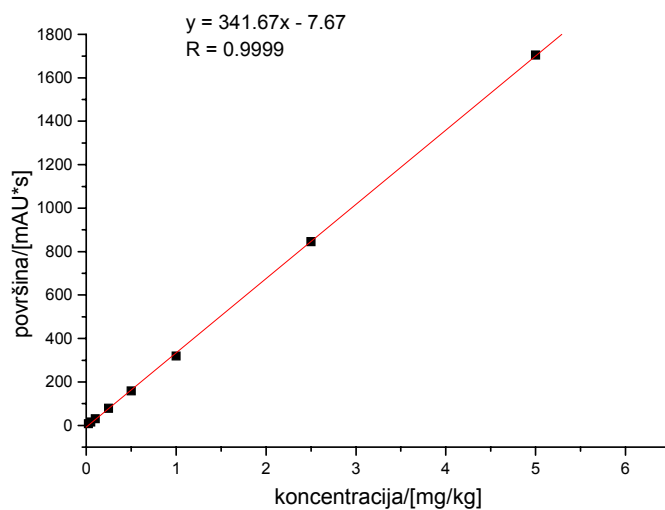
Glede na izkoristke posameznih ekstrakcij in enostavnosti postopka ekstrakcije smo kot najprimernejšo izbrali ekstrakcijo cvetnega prahu v organsko topilo (diklorometan-aceton, 1:1) (5 g cvetnega prahu, predhodno zdrobljenega in sušenega pri 50° C približno 12 h). Vzorce smo v nadaljnjem delu ekstrahirali po tem postopku.

4.5 Umeritvene premice s standardnimi raztopinami neonikotinoidov

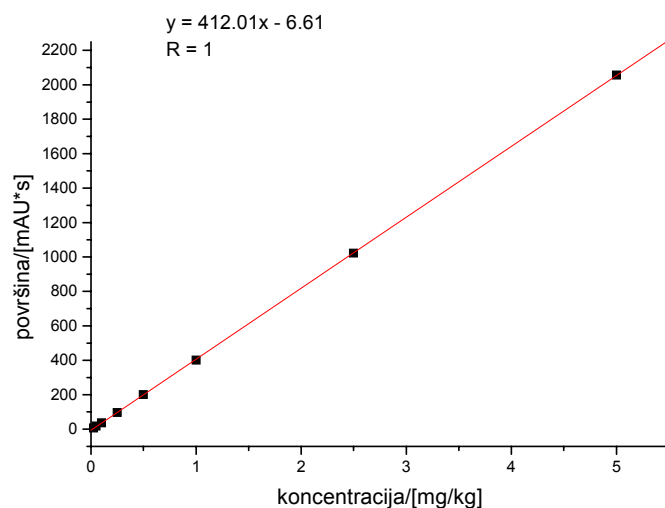
Standardne raztopine posameznih neonikotinoidov v deionizirani vodi (200 mg/kg) smo redčili do končnih koncentracij, to je od 0,005 do 5 mg/kg in jih nato analizirali s HPLC-DAD metodo. Na **slikah 14, 15, 16 in 17** so prikazane umeritvene premice za standardne raztopine neonikotinoidov.



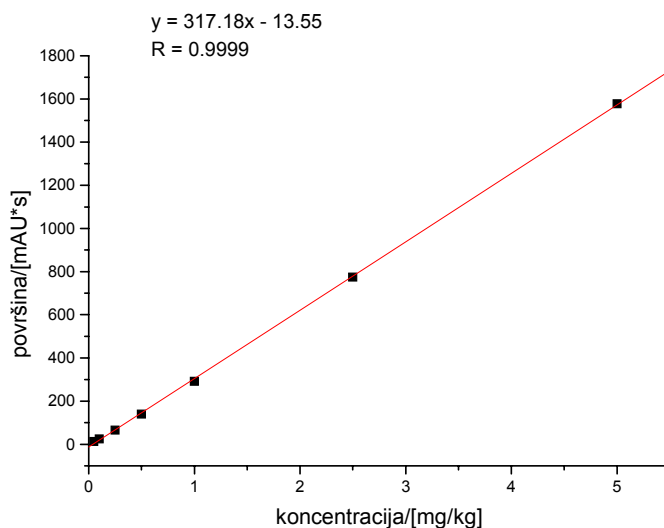
Slika 14: Umeritvena premica za določanje tiametoksama, pripravljena s standardnimi raztopinami v deionizirani vodi.



Slika 15: Umeritvena premica za določanje imidakloprida, pripravljena s standardnimi raztopinami v deionizirani vodi.



Slika 16: Umeritvena premica za določanje acetamiprida, pripravljena s standardnimi raztopinami v deionizirani vodi.



Slika 17: Umeritvena premica za določanje tiakloprida, pripravljena s standardnimi raztopinami v deionizirani vodi.

Kvalitativno določene meje zaznavnosti (LOD) so bile 0,025 mg/kg v primeru tiametoksama, imidakloprida in acetamiprida, medtem ko je bila za tiakloprid vrednost LOD 0,050 mg/kg. Vrednosti regresijskih koeficientov pa so bile v vseh primerih večje od 0,999.

Vrednosti LOD lahko izračunamo tudi po enačbi

$$LOD = (3 \times s_{bl})/k \quad (2)$$

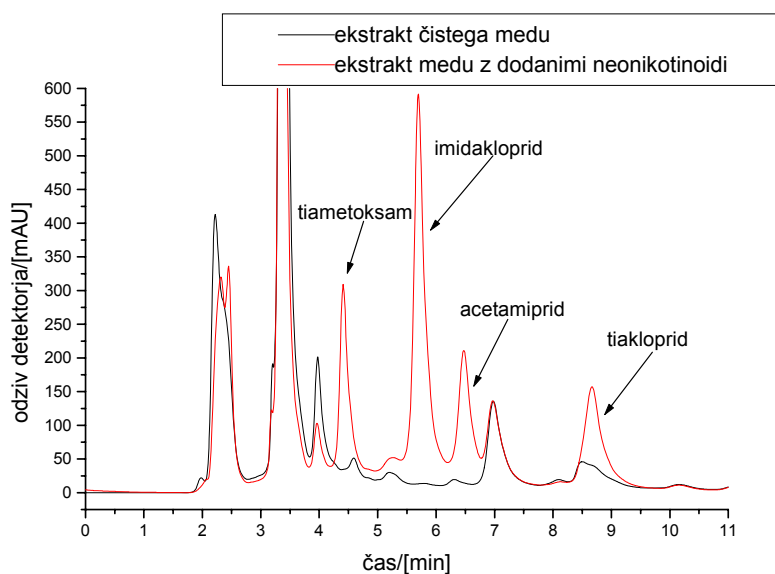
kjer je s_{bl} standardna deviacija bazne linije in k naklon umeritvene krivulje. Kvalitativno bi lahko LOD vrednost opisali kot najnižjo koncentracijo ali maso analita, ki jo še lahko z gotovostjo določimo (Skoog et al., 1998: 13–14).

4.6 Določanje neonikotinoïdov s HPLC-DAD tehniko

4.6.1 Določanje neonikotinoïdov v medu

Vzorci medu smo analizirali pri naslednjih valovnih dolžinah: 254, 270, 245 in 242 nm. Površino kromatografskega vrha smo nato izmerili pri valovni dolžini absorpcijskega maksimuma posameznega neonikotinoïda.

Na kromatogramu, ki ga prikazuje **slika 18**, so vidni naslednji neonikotinoïdi: tiametoksam (retencijski čas je 4,41 min), imidakloprid (5,70 min), acetamiprid (6,48 min) in tiakloprid (8,67 min).



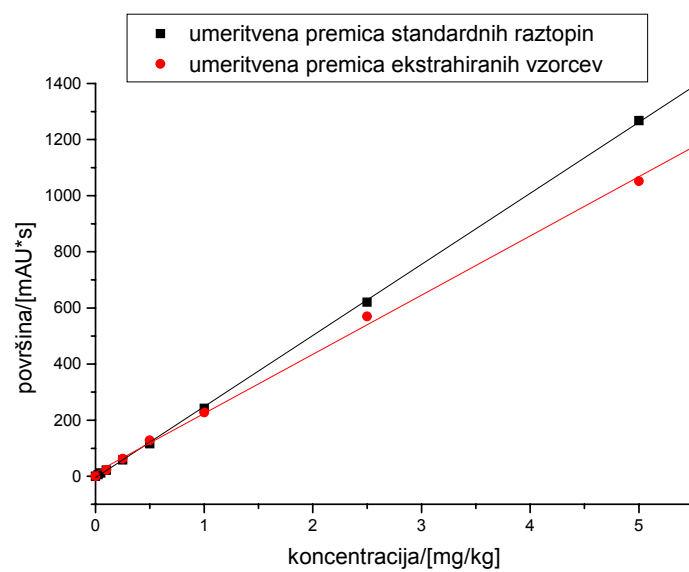
Slika 18: Kromatogram ekstrakta čistega medu in medu z dodano raztopino 4-ih neonikotinoidev. Koncentracija posameznih neonikotinoidev je 5 mg/kg (valovna dolžina merjenja: 270 nm).

Iz gornjega kromatograma lahko opazimo, da je ločljivost med posameznimi neonikotinoidi zadovoljiva, le v primeru imidakloprida in acetamiprida sta vrhova posameznih neonikotinoidev dokaj blizu, kar lahko vodi do manj natančnega določanja površin vrhov.

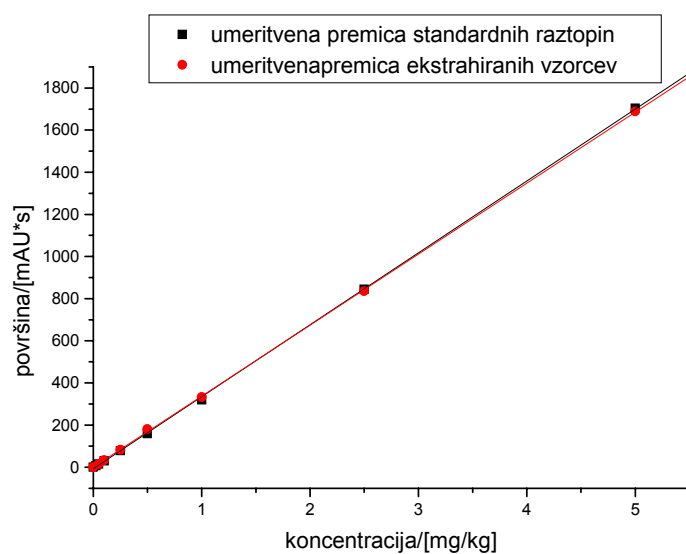
Pri valovni dolžini merjenja 270 nm (**slika 18**), kjer ima imidakloprid absorpcijski maksimum, ne prihaja do interferenc med sestavinami matriksa in insekticidi v ekstraktu vzorca. Prav tako ne prihaja do večjih interferenc pri ostalih valovnih dolžinah merjenja, to je 242, 245 in 254 nm: bazna linija ekstrahiranih vzorcev medu brez dodanih neonikotinoidev je sicer višja kot pri valovni dolžini merjenja 270 nm, vendar to na določanje neonikotinoidev v medu nima večjega vpliva.

4.6.1.1 Umeritvene premice za določanje neonikotinoidev v medu

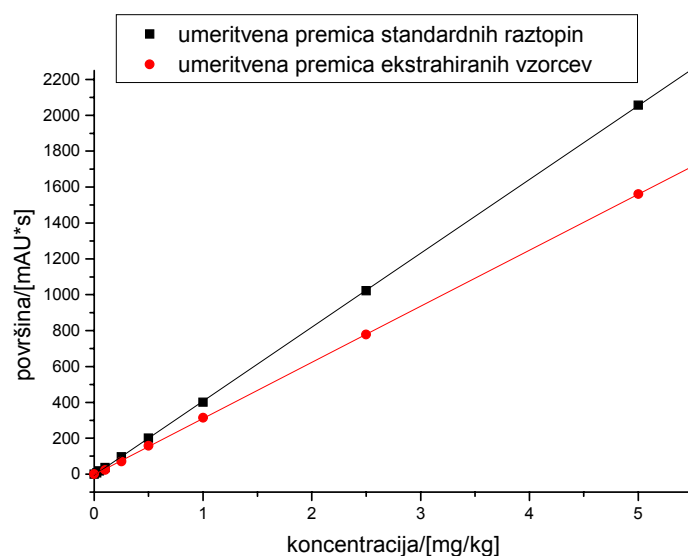
Za izdelavo umeritvenih premic smo pripravili ekstrakte vzorcev medu s koncentracijami od 0,05 do 5 mg/kg. Na **slikah 19, 20, 21 in 22** so prikazane umeritvene premice ekstraktov vzorcev v primerjavi z umeritvenimi premicami s standardnimi raztopinami neonikotinoidev. Vsi vzorci so bili tekom ekstrakcije 5-kratno koncentrirani, zato je potrebno pri določanju izkoristka ekstrakcije dobljene vrednosti površin kromatografskih vrhov deliti s pet.



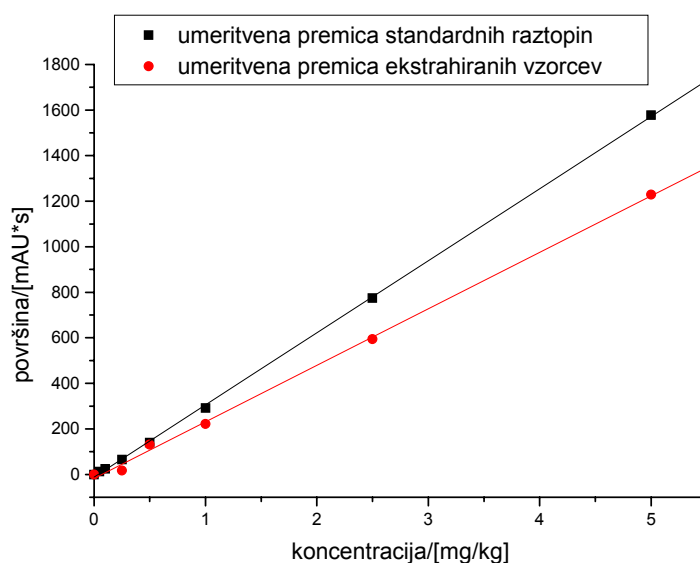
Slika 19: Umeritveni premici za določanje tiametoksama v medu.



Slika 20: Umeritveni premici za določanje imidakloprida v medu.



Slika 21: Umeritveni premici za določanje acetamiprida v medu.



Slika 22: Umeritveni premici za določanje tiakloprida v medu.

Enoto mg/kg lahko uporabimo v vseh primerih, saj so bile standardne raztopine neonikotinooidov narejene v deionizirani vodi, katere gostota je 1g/cm^3 .

Meje zaznavnosti so bile v območje od 0,05 mg/kg za imidakloprid do 0,25 mg/kg v primeru tiakloprida. Vrednosti regresijskih koeficientov so bile v vseh primerih večje od 0,999. Izkoristki vseh ekstrahiranih vzorcev delimo z naklonom umeritvene krivulje standardnih raztopin) so bili višji od 76 %, in sicer $82,7 \pm 1,6$ % (tiametoksam), $98,7 \pm 0,6$ % (imidakloprid), $76,0 \pm 0,3$ % (acetamiprid) ter $78,8 \pm 1,7$ % v primeru tiakloprida. Podrobneje so analizni parametri predstavljeni v **tabeli 11**.

RSD vrednosti, podane ob izkoristkih ekstrakcij, so bile izračunane po enačbi

$$(s_R/R)^2 = (S_{K-ST}/k_{ST})^2 + (S_{K-EKSTR}/k_{EKSTR})^2 \quad (3)$$

kjer je S_{K-ST} napaka naklona umeritvene krivulje standardnih raztopin, k_{ST} naklon umeritvene krivulje standardnih raztopin, $S_{K-EKSTR}$ napaka naklona umeritvene krivulje ekstrahiranih vzorcev in k_{EKSTR} naklon umeritvene krivulje ekstrahiranih vzorcev.

Tabela 11: Analizni parametri HPLC-DAD detekcije neonicotinoidev v medu.

neonicotinoide	naklon/[mAU/(mg/kg)]	regresijski koeficient	LOD/[mg/kg]	LOQ/[mg/kg]
tiametoksam	211,0	0,99915	0,100	0,333
imidakloprid	337,2	0,99995	0,050	0,167
acetamiprid	312,8	0,99997	0,100	0,333
tiakloprid	248,0	0,99920	0,250	0,833

LOQ vrednosti (limit of quantification) izračunamo po enačbi

$$LOQ = (10 \times s_{bl})/k \quad (4)$$

kjer je s_{bl} standardna deviacija bazne linije (blanka) in k naklon umeritvene krivulje.

Izkoristke ekstrakcij, izračunane iz naklona umeritvene premice za neonicotinoide v vodi in naklona umeritvene premice pri ekstrakciji iz medu, lahko primerjamo z izkoristki ekstrakcij, navedenimi za postopek optimizacije ekstrakcij (**tabela 5**). V primerjavi z rezultati izkoristka iz naklonov umeritvenih premic so le-ti popolnoma primerljivi za acetamiprid, imidakloprid in tiametoksam, medtem ko se v primeru tiakloprida razlikujejo za največ 6 % (višje vrednosti dobimo pri določevanju izkoristka na osnovi umeritvenih premic za neonicotinoide v vodi). Potrebno je omeniti, da pri izračunu RSD vrednostih iz naklonov umeritvenih premic nismo upoštevali vrednosti RSD za posamezne točke (velja za med in cvetni prah).

Kot je bilo omenjeno v eksperimentalnem delu naloge, smo ekstrahirali vzorce v dveh ponovitvah, le v primeru koncentracije 1 mg/kg smo delali v 5-ih ponovitvah. Realen pokazatelj ponovljivosti celotnega postopka analize so torej vrednosti površin za koncentracijo 1 mg/kg, katere so predstavljene v **tabeli 12**.

Tabela 12: Odvisnost površine kromatografskih vrhov od koncentracij posameznih neonicotinoidev v medu na primeru koncentracije 1 mg/kg.

neonicotinoide	tiametoksam	imidakloprid	acetamiprid	tiakloprid
1. ponovitev	248,0	339,9	300,8	166,1
2. ponovitev	191,0	285,7	226,1	/
3. ponovitev	144,8	269,3	271,6	122,7
4. ponovitev	273,7	369,7	353,3	256,4
5. ponovitev	280,8	402,8	416,4	342,3
povprečje	227,7	333,5	313,7	221,9
standardni odmik (RSD %)	52,11 (22,9 %)	50,14 (15,0 %)	65,90 (21,0 %)	84,60 (38,1 %)

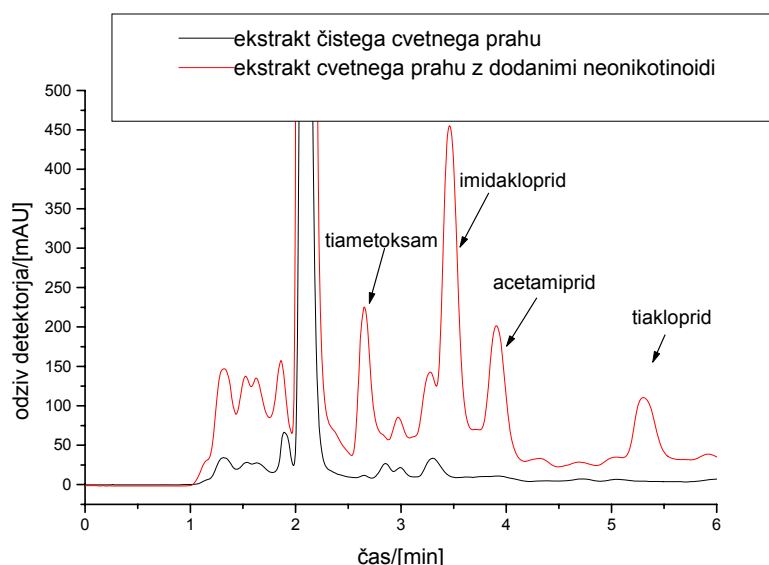
Glede na to, da se je uporabljeni postopek ekstrakcije na trdnem nosilcu razlikoval od navedenega v literaturi (Fidente et al., 2005) le v dveh parametrih (nenadzorovan pretok dušika skozi kolono in matriks), smo predvidevali, da je med njima vzrok slabših izkoristkov v našem primeru.

V članku (Fidente et al., 2005) navajajo od 76 do 99 % izkoristke, kar se ujema z našimi vrednostmi, ki so prav tako v območju med 76 in 99 %. Ponovljivost ekstrakcij po metodi iz literature je bila boljša, saj RSD vrednosti niso presegale 10 %, medtem ko so bile v našem primeru od 15 do 38 %. Kljub temu da napaka instrumenta (Tabela 15) lahko znaša tudi do 10 %, predvidevamo, da je glavni vzrok slabe ponovljivosti predvsem v postopku ekstrakcije.

LOD in LOQ vrednosti iz literature so, razen za imidaklopid (0,1 oziroma 0,3 mg/kg), nižje (vrednosti LOD so v območju od 0,01 do 0,1 mg/kg, medtem ko so vrednosti LOQ med 0,04 in 0,3 mg/kg) od navedenih v **tabeli 11**.

4.6.2 Določanje neonikotinoidov v cvetnem prahu

Na kromatogramu, ki ga prikazuje **slika 23**, so vidni naslednji neonikotinoidi: tiametoksam (retencijski čas je 2,66 min), imidaklopid (3,47 min), acetamiprid (3,91 min) in tiaklopid (5,30 min). Retencijski časi posameznih neonikotinoidov so nižji zaradi zamenjave kolone, in sicer smo pri poskusu s cvetnim prahom uporabljali kolono Hypersil ODS (5 μ m, 150 \times 4,6 mm) kolono.



Slika 23: Kromatogram raztopine štirih neonikotinoidov v cvetnem prahu. Koncentracija posameznih neonikotinoidov je 5 mg/kg (valovna dolžina merjenja: 270 nm).

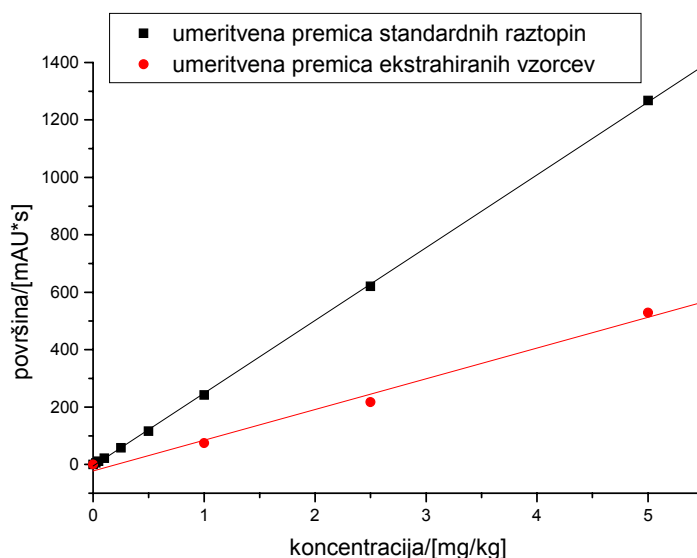
Iz gornjega kromatograma lahko opazimo, da je ločljivost med posameznimi neonikotinoidi zadovoljiva, le v primeru imidakloprida in acetamiprida sta si vrhova posameznih neonikotinoidov blizu, kar lahko vodi do napak pri določanju insekticidov. Pri valovnih dolžinah merjenja 270 nm (**slika 23**), kjer ima imidaklopid absorpcijski maksimum in 242 nm, kjer ima absorpcijski maksimum tiaklopid, prihaja do interferenc

med sestavinami matriksa in neonikotinoidea. Pri tiametoksamu in acetamipridu do interferenc z matriksom ne prihaja. Zaradi vpliva matriksa so bile napake pri določevanju vrednosti površin posameznih vrhov večje in posledično ponovljivost slabša. Vplive matriksa bi lahko zmanjšali oz. eliminirali, če bi vzorce ekstrakta cvetnega prahu dodatno obdelali oz. očistili (npr. uporaba kromatografskih kolon) pred HPLC-DAD analizo.

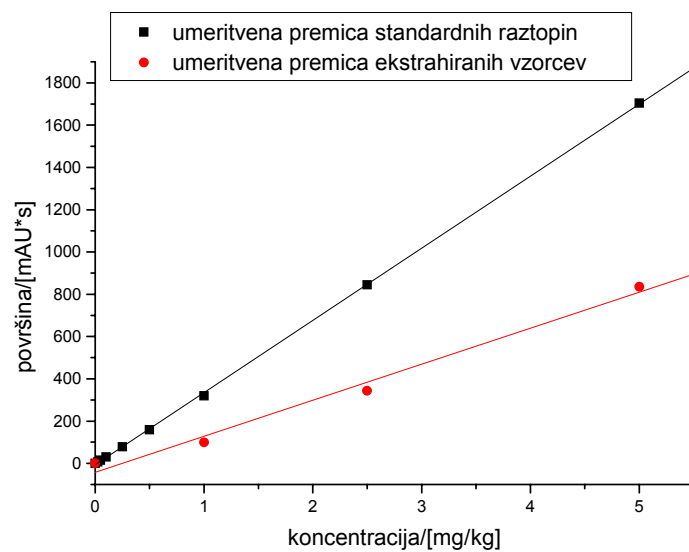
4.6.2.1 Umeritvene premice za določanje neonikotinooidov v cvetnem prahu

Za izdelavo umeritvenih premic smo pripravili ekstrakte vzorcev medu s koncentracijami od 0,5 do 5 mg/kg. Ugotovili smo, da so vzorci s koncentracijami 500 µg/kg že v območju vrednosti LOD. Ker je bila posledično napaka meritev pri teh vzorcih velika, jih v umeritvenih premicah nismo upoštevali.

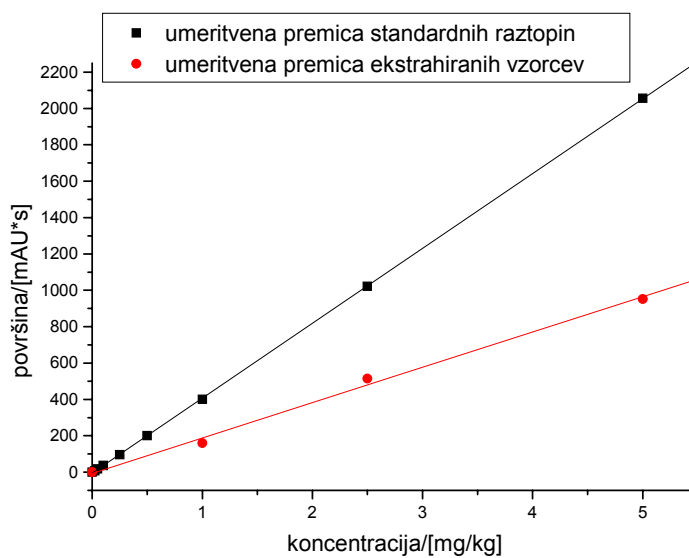
Na **slikah 24, 25, 26 in 27** so prikazane umeritvene premice ekstraktov vzorcev v primerjavi z umeritvenimi premicami s standardnimi raztopinami neonikotinooidov. Vsi vzorci so bili tekom ekstrakcije 5-kratno koncentrirani, zato je potrebno pri določanju izkoristka ekstrakcije dobljene vrednosti površin kromatografskih vrhov deliti s pet.



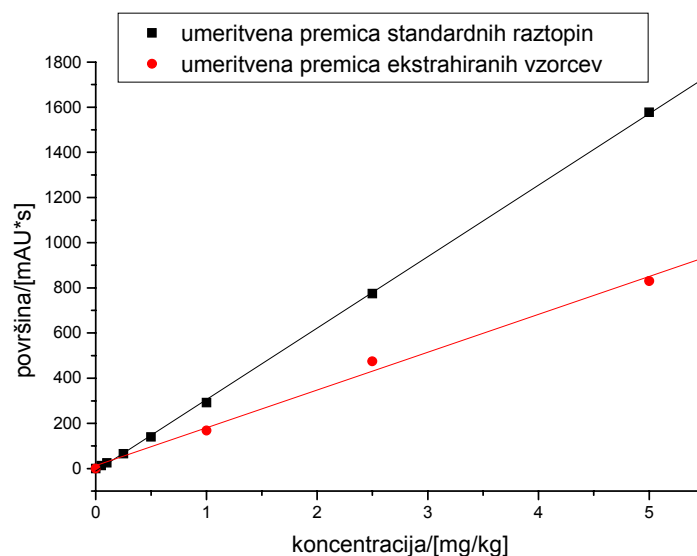
Slika 24: Umeritveni premici za določanje tiametoksama v cvetnem prahu.



Slika 25: Umeritveni premici za določanje imidakloprida v cvetnem prahu.



Slika 26: Umeritveni premici za določanje acetamiprida v cvetnem prahu.



Slika 27: Umeritveni premici za določanje tiakloprida v cvetnem prahu.

Meje zaznavnosti so bile v vseh primerih 0,5 mg/kg, izkoristki reakcij pa $45,2 \pm 3,2$ % za tiametoksam, $54,3 \pm 4,2$ % za imidakloprid, $47,6 \pm 2,2$ % za acetamiprid in $51,5 \pm 3,0$ % za tiakloprid. Vrednosti vseh regresijskih koeficientov so bile nad 0,994. Podrobneje so analizni parametri predstavljeni v **tabeli 13**.

Tabela 13: Analizni parametri HPLC-DAD detekcije neonikotinoidev v cvetnem prahu.

neonikotinoide	naklon/[mAU/(mg/kg)]	regresijski koeficient	LOD/[mg/kg]	LOQ/[mg/kg]
tiametoksam	107,0	0,99492	0,5	1,667
imidakloprid	170,6	0,99414	0,5	1,667
acetamiprid	194,0	0,99786	0,5	1,667
tiakloprid	167,6	0,99676	0,5	1,667

Enako kot na primeru medu smo za realen pokazatelj ponovljivosti ekstrakcij upoštevali vrednosti površin 5-ih ponovitev za koncentracijo 1 mg/kg. Vrednosti so zbrane v **tabeli 14**.

Tabela 14: Odvisnost površine kromatografskih vrhov od koncentracij posameznih neonikotinoidev v cvetnem prahu na primeru koncentracije 1 mg/kg.

neonikotinoide	tiametoksam	imidakloprid	acetamiprid	tiakloprid
1. ponovitev	56,10	77,24	99,25	136,6
2. ponovitev	83,19	109,3	138,9	186,8
3. ponovitev	77,24	108,2	185,5	202,1
4. ponovitev	75,91	103,1	212,5	235,9
5. ponovitev	79,15	99,63	160,2	169,0
povprečje	74,32	99,48	159,3	186,1
standardni odmik (RSD %)	9,438 (12,7 %)	11,66 (11,7 %)	38,84 (24,4 %)	33,10 (17,8 %)

Z analizami standardne raztopine neonikotinoidov s koncentracijo 5 mg/kg smo preverili tudi ponovljivost instrumenta. Standardno raztopino neonikotinoidov smo vbrizgali 10-krat. Vrednosti relativnega standardnega odmika za opisane meritve so prikazane v **tabeli 15**.

Tabela 15: Preverjanje ponovljivosti instrumenta HPLC-DAD na primeru standardne raztopine neonikotinoidov.

neonikotinoidi	relativni standardni odmik
tiametoksam	1,1 %
imidakloprid	0,2 %
acetamiprid	0,5 %
tiakloprid	0,3 %

Glede na to, da se pri analiziranju bioloških vzorcev srečujemo s kompleksnim matriksom, zaradi katerega lahko prihaja do večjih napak pri določevanju količine analita v vzorcu, smo se odločili preveriti še ponovljivost instrumenta HPLC-DAD na primeru ekstraktov medu in cvetnega prahu (**tabela 16**).

Tabela 16: Preverjanje ponovljivosti instrumenta na primeru ekstraktov medu in cvetnega prahu.

neonikotinoidi	RSD (med)	RSD (cvetni prah)
tiametoksam	6,2 %	6,2 %
imidakloprid	8,5 %	5,7 %
acetamiprid	7,7 %	5,1 %
tiakloprid	9,6 %	6,3 %

Ponovljivost ekstraktov na cvetnem prahu je boljša kot na medu, vrednosti relativnih standardnih odklikov se gibljejo med 12 % za imidakloprid in 24 % za acetamiprid. Če upoštevamo napako instrumenta (približno 6 %), potem je relativni standardni odmik samega postopka ekstrakcije približno 6 do 18 %.

Izkoristke ekstraktov med optimiranjem metode ekstrakcije neonikotinoidov iz cvetnega prahu smo preračunavali glede na umeritvene krivulje standardnih raztopin neonikotinoidov. V primerjavi z rezultati izkoristka, izračunanega iz naklonov umeritvenih premic, so le-ti največ do 5 % manjši.

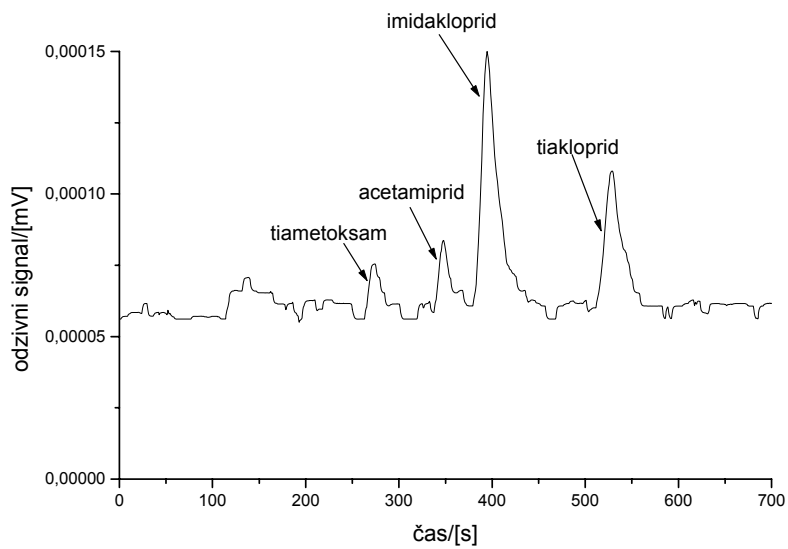
V postopku optimiranja ekstraktov smo preverili metodo določanja imidakloprida v cvetnem prahu iz literature (Rossi et al., 2005), in sicer v članku navajajo vrednosti izkoristkov od 71 do 99 % in mejo zaznavnosti 0,05 mg/kg. RSD vrednosti so v območju od 9 do 14 %. V primerjavi z našo ekstrakcijo ugotovimo torej 26 do 45 % višje vrednosti izkoristkov in posledično nižjo mejo zaznavnosti.

Pri metodi, opisani v literaturi, so cvetnemu prahu (2 g) z neonikotinoidi dodali hidromatriks, ki povzroči dehidracijo vzorcev. To potrjuje naša predvidevanja, da voda negativno vpliva na vrednosti izkoristkov ekstraktov v cvetnem prahu.

4.7 Določanje neonicotinoidov s HPLC-TLS

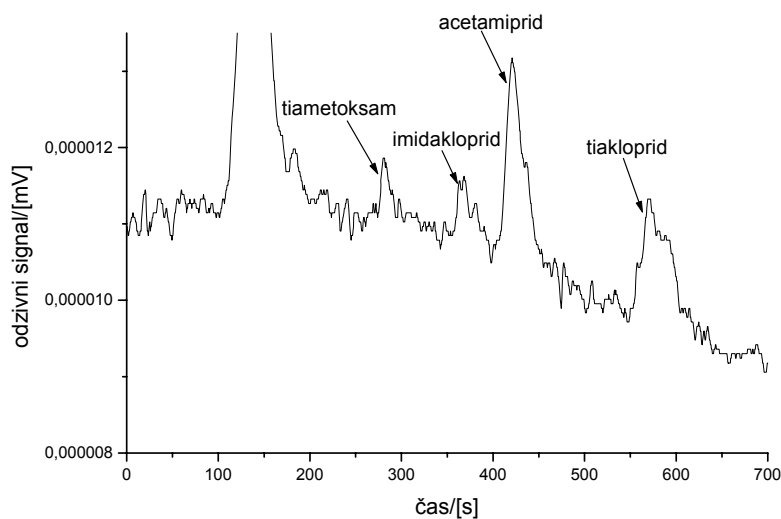
Vsi vzorci so bili analizirani na koloni Restec Pinnacle ODS z dimenzijami 250 mm × 4,6 mm.

Na kromatogramu, ki ga prikazuje **slika 28**, so vidni naslednji neonicotinoidi: tiametoksam (retencijski čas je 4,57 min), imidakloprid (5,79 min), acetamiprid (6,58 min) in tiakloprid (8,82 min).



Slika 28: Kromatogram standardne raztopine neonicotinoidov. Koncentracija je 0,25 mg/kg, P znaša 80 mW, časovna konstanta je 1 s.

Pri TLS detekciji lahko uporabljamo le eno valovno dolžino vzbujanja, in sicer 244 nm, kar zagotavlja večjo občutljivost metode za acetamiprid in tiakloprid, ki imata maksimuma absorpcije svetlobe pri 245 in 242 nm. Neonicotinoidi so med seboj sicer dobro ločeni, vendar je bazna linija nestabilna, kar je še bolj opazno pri nižjih koncentracijah (**slika 29**).



Slika 29: Kromatogram standardne raztopine neonicotinoïdov. Koncentracija je 0,025 mg/kg, P je 80 mW, časovna konstanta je 1 s.

Na **sliki 29** so vidni kromatografski vrhovi za vse štiri neonicotinoïde. Višina kromatografskega vrha za acetamiprid in tiakloprid je v primerjavi s tiametoksamom in imidaklopridom občutno višja. Z izjemo acetamiprida so kromatografski vrhovi posameznih insekticidov deformirani zaradi šuma meritve. Dosežene meje zaznavnosti za standardne raztopine imidakloprida in tiametoksama so 0,025 mg/kg. Glede na razmerje signal/šum so ocenjene meje zaznavnosti nižje za acetamiprid in tiakloprid, in sicer približno 0,010 mg/kg v primeru acetamiprida, katerega maksimum absorpcije svetlobe (242 nm) je najbližje valovni dolžini vzbujanja (244 nm). Kljub različnim volumnom vbrizganja (75 μ L pri HPLC-DAD detekciji in 100 μ L pri HPLC-TLS detekciji) so dobljene vrednosti LOD nižje v primerjavi z vrednostmi, ki jih dobimo s HPLC-DAD detekcijo (0,025–0,050 mg/kg).

Glede na predstavljene rezultate in v poglavju 4.2.4 opisane vplive neenakomernega pretoka eluenta na stabilnost bazne linije ter podatke iz preliminarnih meritev (Guzsvany et al., članek v tisku) predvidevamo, da bi ob uporabi ustrezne črpalke in zamenjavi pretočne celice, s HPLC-TLS detekcijo neonicotinoïdov lahko dosegli vrednosti LOD od 5 do 10 μ g/kg v realnih vzorcih medu in cvetnega prahu.

5 ZAKLJUČEK

V okviru diplomskega dela smo želeli razviti metodo za določevanje neonikotinoidov v medu in cvetnem prahu, s katero bi lahko preverjali prisotnost neonikotinoidov v realnih vzorcih.

Neonikotinoide smo iz vzorcev medu ekstrahirali z ekstrakcijo tekoče-tekoče. Najboljše izkoristke ekstrakcije smo dosegli z uporabo diklorometana. Iz vzorcev cvetnega prahu pa smo neonikotinoide najučinkoviteje ekstrahirali neposredno v organsko topilo, to je diklorometan-aceton (1:1, v/v).

Izkoristki ekstrakcij iz medu so bili med 76 % (acetamiprid) in 99 % (imidakloprid), vrednosti LOD za določevanje neonikotinoidov s HPLC-DAD pa od 0,05 mg/kg za imidakloprid do 0,25 mg/kg za tiakloprid. Vrednosti relativnih standardnih odmikov za celotni postopek analize so znašale od 15 % v primeru imidakloprida do 38 % v primeru tiakloprida. Izkoristki ekstrakcij so primerljivi s podatki iz literature (Fidente et al., 2005), vrednosti LOD in relativni standardni odmiki, ki smo jih dosegli, pa višji. V literaturi objavljene meje zaznavnosti so namreč v območju 0,01–0,1 mg/kg, medtem ko vrednosti relativnih standardnih odmikov ne presegajo 10 %.

Izkoristki ekstrakcij iz cvetnega prahu so bili v območju od 45 % (tiametoksam) do 54 % (imidakloprid). Meja zaznavnosti je bila v vseh primerih enaka, in sicer 0,5 mg/kg. Ponovljivost je bila v primerjavi z medom boljša – relativni standardni odmiki, razen v primeru acetamiprida (24 %), ne presegajo vrednosti 18 %. Podatki iz literature (Rossi et al., 2005) za primer imidakloprida navajajo 71–99 % izkoristke ekstrakcij in mejo zaznavnosti 0,05 mg/kg ter vrednosti relativnih standardnih odmikov med 9 in 14 %. Predvidevamo, da je razlika v rezultatih predvsem posledica dodanega hidromatriksa v metodi iz literature, medtem ko pri našem delu tega nismo uporabili.

S tehniko HPLC-TLS smo zaradi okvare pretočne celice uspeli opraviti le meritve standardnih raztopin neonikotinoidov. Pri tem smo za tiametoksam in imidakloprid dosegli vrednosti LOD 0,025 mg/kg, medtem ko smo na podlagi razmerja signal/šum ocenili nižje meje zaznavnosti za acetamiprid in tiakloprid, in sicer približno 0,010 mg/kg v primeru acetamiprida, katerega maksimum absorpcije svetlobe (242 nm) je najbližje valovni dolžini vzbujanja (244 nm). Kljub različnim volumnom vbrizganja (75 μ L pri HPLC-DAD in 100 μ L pri HPLC-TLS) pomenijo navedene vrednosti LOD za HPLC-TLS izboljšanje v primerjavi z LOD vrednostmi za HPLC-DAD detekcijo neonikotinoidov v standardnih raztopinah (0,025–0,050 mg/kg).

Zato lahko glede na rezultate tega dela in podatke iz preliminarnih poskusov (Guzsvany et al., članek v tisku) predvidevamo, da bi s HPLC-TLS detekcijo za neonikotinoide v realnih vzorcih medu in cvetnega prahu lahko dosegli vrednosti LOD od 5 do 10 μ g/kg, kar bi pomenilo pomembno izboljšanje tudi v primerjavi z metodami, objavljenimi v literaturi (Fidente et al., 2005; Rossi et al., 2005). Za doseg tega cilja bi morali še izboljšati učinkovitost in ponovljivost ekstrakcijskih postopkov ter optimizirati delovanje HPLC-TLS instrumenta (črpalka s stabilnejšim pretokom, ustrežnejša pretočna celica). Pri tem bi lahko koristno uporabili v tem delu opisane rezultate proučevanja vplivov stabilnosti pretoka eluenta na šum meritve in s tem na vrednosti LOD.

6 VIRI

- Ahmed E. F. Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks. *Trends in analytical chemistry* 20, 11 (2001) 649–661.
- Baskaran S., Kookana R. S., Naidu R. Determination of the insecticide imidacloprid in water and soil using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 787 (1997) 271–275.
- Blasco C. Simultaneous determination of imidacloprid, carbendazim, methiocarb, and hexythiazox in peaches and nectarines by liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica* 461 (2002) 109–116.
- Bonmatin J. M., Moineau I., Charvet R., Fleche C., Colin M. E., Bengsch E. R. A LC/APCI-MS/MS Method for Analysis of Imidacloprid in Soils, in Plants, and in Pollens. *Analytical Chemistry* 75, 9 (2003) 2027–2033.
- COUNCIL DIRECTIVE of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market (91/414/EEC), (OJ L 230, 19.8.1991, p. 1).
- Cox C. Insecticide factsheet: Imidacloprid. *Journal of Pesticide Reform* 21, 1 (2001) 15–21.
- Elbert C., Erdelen C., Kuehnhold J., Nauen R., Schmidt H. W., Hattori Y. Thiacloprid: a novel neonicotinoid insecticide for foliar application. Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases 2A-1 (2000) 21–26.
- European Commission, Health&Consumer protection Directorate, 2003. Acetamiprid SANCO/1392/2001-Final. Appendix I-II: Identity, physical and chemical properties. Pridobljeno s svetovnega spleta maja 2006: [www://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/newactive/acetamiprid.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/newactive/acetamiprid.pdf).
- Fernandez-Alba A. R., Valver A., Aguera A., Contreras M., Chiron S. Determination of imidacloprid in Vegetables by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *Journal of Chromatography A* 721 (1996) 97–105.
- Fernandez M., Padron C., Macroni L., Ghini S., Colombo R., Sabatini A.G., Girotti S. Determination of organophosphorus pesticides in honeybees after solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A* 922 (2001) 257–265.
- Fidente P., Seccia S., Vanni F., Morrica P. Analysis of nicotinoid insecticides residues in honey by solid matrix partition clean-up and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* (2005).
- Franko M., Tran C. D. Analytical thermal lens instrumentation. *Review of Scientific Instruments* 67, 1 (1996) 1–18.
- Franko M., Bovenkamp P. Van De, Bicanic D. Determination of trans-[beta]-carotene and other carotenoids in blood plasma using high-performance liquid chromatography and thermal lens detection. *Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications* 718 (1998) 47–54.
- Franko M. Recent applications of thermal lens spectrometry in food analysis and environmental research. *Talanta* 54 (2001) 1–13.
- Gupta S., Gajbhiye V. T., Agnihotri N. P. Leaching Behaviour of Imidacloprid Formulations in Soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 68 (2002) 502–508.
- Guzsvany V., Madžgalj A., Trebše P., Franko M. Determination of Some Neonicotinoid Insecticides by Liquid Chromatography with Thermal Lens Spectrometric Detection.
- Iwasa T., Motoyama N., Ambrose J. T., Roe R. M. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop protection* 23 (2004) 371–378.

- Kagabu S., Medej S. Stability comparison of imidacloprid and related compounds under simulated sunlight, hydrolysis conditions, and to oxygen. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 59 (1995) 183–198.
- Kagabu S. Chloronicotinyln insecticides – discovery, application and future perspective. *Revista de Toxicologia* 1 (1997) 75–129.
- Kagabu S. 1999. Discovery of chloronicotinyln insecticides. V: *Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor*. Yamamoto I., Casida J. E. (eds.). Tokyo, Springer: 21–26 str.
- Koester J. Proc. Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases 2 (1992) 901–906.
- Kožar Logar J., Šikovec M., Malej A., Franko M. The effects of eluent mixing on TLS detection in gradient elution HPLC. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 374 (2002) 323–328.
- Krohn J. Behaviour of thiacloprid in the environment. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 54, 2 (2001) 281–290.
- Liu M. Y., Landford J., Casida J.E. Relevance of [³H] imidacloprid binding site in house fly head acetylcholine receptor to insecticidal activity of 2-nitromethylene- and 2-nitroimino-imidazolidines. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 46 (1993) 200–206.
- Luterotti S., Franko M., Šikovec M., Bicanic D. Ultrasensitive assays of *trans*- and *cis*- β -carotenes in vegetable oils by high-performance liquid chromatography-thermal lens detection. *Analytica Chimica Acta* 460 (2002) 193–200.
- Mandić I. A., Lazić D. S., Ökresz N. Sz., Gaal F. F. Determination of the insecticide imidacloprid in potato (*Solanum tuberosum* L) and onion (*Allium cepa*) by high performance liquid chromatography with diode-array detection. *Journal of Analytical Chemistry* 60 (2005) 1134–1138.
- Matsuda K., Buckingham S. D., Freeman J. C., Squire M. D., Baylis H. A., Sattelle J. C. Effects of the α subunit on imidacloprid sensitivity of recombinant nicotinic acetylcholine receptors. *British Journal of Pharmacology* 123 (1998) 518–524.
- Matsuda K., Buckingham S. D., Kleier D., Rauh J. J., Grauso M., Sattelle D. B. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* 22, 11 (2001) 573–580.
- Moza P. N., Hustert K., Feicht E., Kettrup A. Photolysis of imidacloprid in aqueous solution. *Chemosphere* 36, 3 (1998) 467–502.
- Nauen R., Ebbinghaus-Kintscher U., Schmuck R. Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis Mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Pesticide Management Science* 57 (2001) 577–586.
- Novartis. Papers on A Novel Insect Control Compound, CGA 293,343. Novartis Crop Protection, Inc., Entomological Society of America (1997). V: Roberts T. R., Hutson D. H., Jewess P. J., Lee P. W., Nicholls P. H., Plimmer J. R. *Metabolic Pathways of Agrochemicals. Part 2: Insecticides and Fungicides*. Cambridge, The Royal Society of Chemistry: 107–120 str.
- Obana H., Okihashi M., Akutsu K., Kitagawa Y., Hori S. 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 (2003) 2501–2505.
- Ocena tveganja imidakloprida za čebele. 2004. Fitosanitarna uprava RS: 4–6 str.
- Rancan M., Sabatini G. A., Achilli G., Galletti C. G. Determination of imidacloprid and metabolites by liquid chromatography with an electrochemical detector and post column photochemical reactor. *Analytica Chimica Acta* 555 (2006) 21–26.

- Roberts T. R., Hutson D. H., Jewess P. J., Lee P. W., Nicholls P. H., Plimmer J. R. Metabolic Pathways of Agrochemicals. Part 2: Insecticides and Fungicides. Cambridge, The Royal Society of Chemistry: 107–120 str.
- Rossi S., Sabatini A. G., Cenciarini R., Ghini S, Girotti S. 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 (2005) 189–195.
- Schmuck R., Schöning R., Stork A., Schramel O. Risk posed to honeybees (*Apis Mellifera* L, Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. *Pesticide Management Science* 57 (2001) 225–238.
- Senn R., Hofer D., Hoppe T., Angst M., Wyss P., Brandl F., Maienfisch P. CGA 293,343: a novel broad-spectrum insecticide supporting sustainable agriculture worldwide. Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases 1 (1998) 27–36.
- Skoog D. A., Holler F. J., Nieman T. A. 1998. Principles of Instrumental Analysis. 5th edition. Thomson Learning Inc.: 13–14 str.
- Soloway S. B. et al. 1979. Nitromethylene insecticides. V: Advances in Pesticide Science (Part II). Geissbühler H. et al., (eds). 206 str.
- Suchail S., Guez D., Belzunces L. P. Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 7 (2000) 1901–1905.
- Suchail S., Guez D., Belzunces L. P. Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis Mellifera*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 11 (2001) 2482–2486.
- Syngenta Crop Protection. Envirofacts. 2005. Thiamethoxam. Pridobljeno s svetovnega spleta junija 2006: http://www.syngentacropprotection-us.com/enviro/futuretopics/ThiomethoxamEnvirofacts_7-19-05.pdf.
- Tokieda M., Ozawa M., Kobayashi S., Gomyo T. Method to Determination of Total Residues of the Insecticide Acetamiprid and Its Metabolites in Crops by Gas Chromatography. *Journal of Pesticide Science* 22 (1998) 77–83.
- Tomlin C. 2003. The Pesticide Manual. 13th edition. BCPC (British Crop Protection Council): 958–959.
- Tsumura Y., Nakamura Y., Tonogai Y., Kakimoto Y., Tanaka Y., Shibata T. Determination of neonicotinoid pesticide nitenpyram and its metabolites in agricultural products. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* 39 (1998) 127–134.
- U.S. EPA. Office of Pesticides and Toxic Substances. 1992. Request for experimental use permit 00315-EUP-ENG and 003125 EUP-ENR for NTN 33893 (Imidacloprid-proposed) a crystalline end-use formulation containing 0,62 % NTN 33893 active ingredient. Memo from M.S. Ottley, Health Effects Div., to D. Edwards, Registration Div. Washington, D.C., Mar. 24. V: Cox C. Insecticide factsheet: Imidacloprid. *Journal of Pesticide Reform* 21, 1 (2001) 15–21.
- U.S. EPA. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. 1994. Imidacloprid. Evaluation of toxicity data submitted and identification of outstanding toxicology data requirements. Memo from M.S.Ottley, Health Effects Div., to P. Jenkins and D. Edwards, Registration Div. Washington, D.C., June 8. V: Cox C. Insecticide factsheet: Imidacloprid. *Journal of Pesticide Reform* 21, 1 (2001) 15–21.
- U.S. EPA. Office of Pesticide Programs. 1994. Pesticide fact sheet: Imidacloprid. Washington, D.C., Mar.18. V: Cox C. Insecticide factsheet: Imidacloprid. *Journal of Pesticide Reform* 21, 1 (2001) 15–21.

- U.S. EPA. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. 2002. Pesticide fact sheet: Acetamiprid. Washington, D.C., Mar.15. Pridobljeno s svetovnega spleta maja 2006: <http://www.epa.gov/opprd001/factsheets/acetamiprid.pdf>.
- U.S. EPA. Federal Register Environmental Documents. 2005. Thiamethoxam: Pesticide Tolerance. Pridobljeno s svetovnega spleta maja 2006: <http://www.epa.gov/EPA-PEST/2005/January/Day-05/p089.htm>.
- Vilchez J. L. Determination of imidacloprid in water and soil samples by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* (1996) 389–294.
- Zheng W., Liu W. Kinetics and mechanism of the hydrolysis of imidacloprid. *Pesticide Science* 55 (1999) 482–485.