

UNIVERZA V NOVI GORICI  
VISOKA ŠOLA ZA VINOGRADNIŠTVO IN VINARSTVO

**STABILNOST KLORANTRANILIPROLA V VINOGRADU**

DIPLOMSKO DELO

**Sašo GABRŠČEK**

Mentor: Prof. dr. Mladen Franko

Nova Gorica, 2012



## **ZAHVALA**

Za pomoč pri izdelavi diplomske naloge bi se najprej zahvalil svojemu mentorju Prof. dr. Mladenu Franku, ki me je s svojim znanjem in izkušnjami vodil ter mi pomagal. Zahvalil bi se tudi vsem sodelavcem na Univerzi v Novi Gorici, ki so mi kadarkoli nudili pomoč. Velika zahvala pa gre tudi mojim domačim za spodbudo med samim študijem in v času pisanja diplomskega dela. Najlepša hvala vsem.

## POVZETEK

Diplomska naloga temelji na preučevanju obstojnosti pesticida z zaščitnim imenom Rynaxypyr® v katerem je aktivna substanca klorantraniliprol, ki jo v vinogradniški tehnologiji uporabljamo za zatiranje grozdnih sukačev. Zaradi vse večjega prehoda kmetovalcev iz konvencionalne in integrirane pridelave na okolju bolj prijazno ekološko-BIO vinogradništvo nas je zanimalo ali se v prehodnem obdobju, v katerem že veljajo omejitve za ekološko pridelavo in traja za trajne nasade (v katerega uvrščamo tudi vinograd) 3 leta, proučevana aktivna substanca CAP popolnoma razgradi oz. odstrani iz vinograda. Po pregledu literature smo ugotovili, da najdemo zelo malo podatkov, ki so si pogosto tudi nasprotujoči. Tako smo v realnih pogojih vinograda zastavili eksperiment, pri katerem smo CAP nanесли na zemljo in travo, ki smo ju enkrat mesečno vzorčili. Zbrane vzorce smo posušili, jim izmerili vlažnost, jih homogenizirali in skladiščili v zamrzovalni skrinji na -21 °C do same analize. S preliminarnimi metodami za izbiro topila za ekstrakcijo, količino topila, količino vzorca in potek same analize smo ugotovili, da je za ekstrakcijo učinkovitejše topilo acetonitril s katerim smo pri zemlji dosegli 63,1 % ekstrakcijo CAP in pri travi 50,3 % ekstrakcijo CAP. Vse vzorce smo analizirali na kromatografu HPLC in po izračunih prišli do zaključkov, da se CAP iz okolja v triletnem prehodnem obdobju popolnoma odstrani oz. se v tem času popolnoma razgradi. V zemlji že pri drugem vzorčenju nismo zaznali CAP, kar pomeni, da se je v enem mesecu razgradilo oz. odstranilo iz okolja več kot 90 % CAP. Temu naj bi botrovale pretežno padavine in posledično izplakovanje CAP v bližnjo okolico. Pri travi pa se je 98 % CAP razgradilo in odstranilo iz okolja šele pri petem vzorčenju. Ocenjujemo, da k temu prispeva predvsem foto razgradnja CAP v zelenih delih rastline. Večja obstojnost CAP v rastlini je bila posledica prehajanja CAP v samo rastlino, kar povzroči večjo obstojnostjo na izpiranje in tudi zmanjša izpostavljenost foto razgradnji. Za natančnejše zaključke bi morali zemljo, pa tudi travo vzorčiti pogosteje.

Ključne besede: aktivna substanca klorantraniliprol, realni pogoji vinograda, analiza na HPLC kromatografu, izplakovanje CAP, foto razgradnja CAP.

## SUMMARY

The thesis is based on researching the resistance of a pesticide with a protected name Rynaxypyr® containing an active substance clorantaniliprol which is used to suppress the European Grapevine Moth (*Lobesia Botrana*) and the Vine Moth (*Eupoecilia ambiguell*). Due to increased farming transition from conventional and integrated production to more environmentally, ecologically friendly or bio viticulture, we have been interested in whether the studied active substance completely disintegrates and/or it is removed during the three-year transitional period for permanent plantations including vineyards for which the regulations and restraints for ecological cultivation are already valid. After we had examined and studied the existing literature, we came to a conclusion that there is little information which is also often contradictive. Therefore we have set an experiment in real conditions of a vineyard where we have applied the CAP on the ground and grass which have been sampled on a monthly basis. Collected samples had been dried out, moisture measured, homogenised and stored in a freezer at  $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$  until they were analysed. By preliminary experiments for the choice of solvent for extraction, the amount of the solvent, the amount of the sample and the course of the analysis itself we have determined that the acetonitrile solvent is the most efficient. By the use of it we have achieved 63,1 % extraction of the CAP from the soil and 50,3 % extraction of the CAP from the grass. Each sample has been analysed with the HPLC chromatograph. After we had made the calculations, we came to the conclusion that the CAP is completely removed and/or disintegrates entirely in the three-year transitional period. Already at the second sampling there was no CAP detected in the ground meaning that more than 90 % of the CAP has been removed from the environment. This is attributed to precipitations and consequently washing off of the CAP into the immediate environment. 98 % of the CAP has dissolved and has been removed from the grass only after the fifth sampling. We estimate that this is due to the photodegradation process in the green parts of the plant. Higher resistance of the CAP in the plant is a result of the transition of the CAP into the plant itself which causes higher resistance to elution and decreases the exposure to photodegradation. More frequent sampling of the ground and grass is needed for more accurate conclusions.

Key words: active substance clorantaniliprol, in real conditions of a vineyard, analysed with the HPLC chromatograph, removed and/or disintegrates CAP, photodegradation CAP.

## KAZALO VSEBINE

ZAHVALA .....	III
KAZALO VSEBINE .....	VII
SEZNAM TABEL.....	IX
SEZNAM SLIK.....	X
OKRAJŠAVE.....	XI
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2 TEORETIČNE OSNOVE.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Tehnični podatki za insekticid Coragen .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2 Delovanje aktivne snovi CAP .....</b>	<b>4</b>
<b>2.3 Uporaba v vinogradništvu .....</b>	<b>6</b>
<b>3 EKSPERIMENTALNI DEL .....</b>	<b>8</b>
<b>3.1 Priprava eksperimentalne površine .....</b>	<b>8</b>
<b>3.2 Potek vzorčenja.....</b>	<b>9</b>
<b>3.3 Priprava vzorcev za analizo.....</b>	<b>11</b>
3.3.1 Vzorci zemlje.....	11
3.3.1.1 Sušenje zemlje.....	11
3.3.1.2 Homogenizacija vzorcev zemlje .....	11
3.3.1.3 Določanje vlage v vzorcih zemlje .....	12
3.3.1.4 Analiza zemlje.....	12
3.3.2 vzorci trave .....	12
3.3.2.1 Sušenje trave .....	12
3.3.2.2 Homogenizacija trave.....	12
3.3.2.3 Določanje vlage v vzorcih trave.....	13
3.3.2.4 Analiza trave .....	13
<b>3.4 Reagenti, raztopine, pripomočki in aparature.....</b>	<b>13</b>
<b>3.5 Določanje koncentracije aktivne snovi CAP .....</b>	<b>14</b>
3.5.1 Priprava vzorcev z znano koncentracijo CAP .....	14
3.5.1.1 Priprava vzorcev zemlje.....	14
3.5.1.2 Priprava vzorcev trave.....	14

3.5.2	Ekstrakcija in merjenje na kromatografu HPLC .....	15
3.5.2.1	Izbira topila za učinkovitejšo ekstrakcijo.....	15
3.5.2.2	Potek analize na KROMATOGRAFU HPLC.....	15
3.5.2.3	Določanje izkoristka ekstrakcije z acetonitrilom .....	16
3.5.2.3.1	Zemlja .....	16
3.5.2.3.2	Trava .....	17
<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>18</b>
4.1	Določitev vlage v vzorcih.....	18
4.2	Izbira topila za ekstrakcijo .....	19
4.3	Določitev retencijskega časa CAP .....	19
4.4	Umeritvena premica za CAP.....	21
4.5	Določanje izkoristka ekstrakcije z acetonitrilom .....	22
4.6	Določanje LOD .....	22
4.7	Analize vzorcev zemlje s HPLC .....	24
4.8	Analize vzorcev trave s HPLC.....	26
4.9	Vremenski parametri .....	28
<b>5</b>	<b>DISKUSIJA.....</b>	<b>30</b>
5.1	Zemlja .....	30
5.2	Trava.....	30
<b>6</b>	<b>ZAKLJUČKI .....</b>	<b>32</b>
<b>7</b>	<b>VIRI .....</b>	<b>33</b>



## SEZNAM TABEL

Tabela 1:	Pogoji analize na kromatografu HPLC.....	16
Tabela 2:	Določanje vlage v vzorcih zemlje .....	18
Tabela 3:	Določanje vlage v vzorcih trave .....	18
Tabela 4:	Površine kromatografskih vrhov za skoncentrirane frakcije zaporednih ekstraktij z acetonom in acetonitrilom.....	19
Tabela 5:	Površine vrhov in izkoristek ekstrakcije iz zemlje .....	22
Tabela 6:	Površine vrhov in izkoristek ekstrakcije iz trave .....	22
Tabela 7:	Spodnja meja detekcije za CAP v zemlji in travi .....	24
Tabela 8:	Analize vzorcev zemlje s HPLC.....	24
Tabela 9:	Koncentracije CAP/g zemlje .....	25
Tabela 10:	Analize vzorcev trave s HPLC .....	27
Tabela 11:	Preračunavanje CAP/g trave.....	27

## SEZNAM SLIK

Slika 1:	Strukturna formula aktivne snovi CAP .....	4
Slika 2:	Sproščanje kalcijevih zalog zaradi delovanja CAP (Technical bulletin, 2008) .....	5
Slika 3:	Prehod aktivne snovi v notranje sloje rastline (Coragen®, 2010) .....	6
Slika 4:	Zračni posnetek posestva v Mančah z označeno eksperimentalno površino (Google-Slike, 2011) .....	8
Slika 5:	Prikaz razporeditve odvzetih vzorcev na raziskovalni ploskvi in poteka vzorčenja .....	10
Slika 6:	Primer kromatograma standardne raztopine CAP v acetonitrilu (20 µg/mL) .....	20
Slika 7:	Primer kromatograma za CAP po ekstrakciji iz vzorca trave .....	20
Slika 8:	Umeritvena premica za določanje naklona premice $y=kx+n$ .....	21
Slika 9:	Umeritvena premica za določanje LOD .....	23
Slika 10:	Razpadanje CAP po časovnih obdobjih .....	26
Slika 11:	Razpadanje CAP po časovnih obdobjih pri travi .....	28
Slika 12:	Vremenski parametri v obdobju poskusa .....	29

## **OKRAJŠAVE**

HPLC- tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti (high performance liquid chromatography)

SD- standardni odklon

LOD- spodnja meja detekcije (limit of detection)

CAP- klorantraniliprol

AS-aktivna snov

ACN- acetonitril

DT50- čas pri katerem razpade 50 % CAP (degradation time 50)

DT90- čas pri katerem razpade 90 % CAP (degradation time 90)

a.e.-arbitrarne enote



# 1 UVOD

Kot bodočega vinogradnika-vinarja me je vedno zanimala pridelava, ki je okolju prijaznejša in ima nanj čim manj nezaželenih učinkov. Prav zaradi tega smo se odločili raziskati kako uvajanje novih pripravkov za zaščito rastlin (rianooidinski pesticidi) vpliva na okolje, kako razpadajo in ali se pri prehodu iz konvencionalne oziroma integrirane pridelave na okolju bolj prijazno-ekološko vinogradništvo, dovolj hitro izločijo iz vinograda. Prehod na ekološko pridelavo za trajne nasade predvideva tri letno prehodno obdobje, v katerem pa se moramo držati navodil za ekološko-biološko pridelavo. V tem času naj bi se vse snovi, ki so nakopičene v vinogradu (trajnem nasadu) popolnoma razgradile oziroma odstranile iz vinograda. Zaradi slabe raziskanosti obstojnosti pesticidov tretje generacije bomo poskušali določiti razpad aktivne snovi klorantraniliprola (CAP), ki jo najdemo v fitofarmaceutvskem pripravku Coragen® (v nadaljevanju Coragen). V vinogradniški tehnologiji ga uporabljamo za zatiranje križastega in pasastega grozdnega sukača (*Lobesia botrana* in *Eupoecilia ambiguella*), ki napadeta grozdje v zgodnji fazi razvoja in s tem povzročata veliko izgubo pridelka. V literaturi pa najdemo le malo podatkov o razpadanju CAP v naravnem okolju, ki so si pogosto različni in nasprotujoči. Tako za rianooidinske insekticide najdemo podatke o karenci za vinsko grozdje 30 dni, za namizno pa le 3 dni (Technical bulletin, 2008). Za razpad v zemlji samo 15 dni, med tem ko je na listih zelja koncentracija padla pod mejo detekcije v šestih tednih (Mohapatra in sod., 2010). Foto razgradnja CAP je pogosto omenjena kot glavni dejavnik pri razgradnji CAP na ali v zemlji in s tem povezanimi izgubami v okolje. Omenjajo pa tudi privzem preko koreninskega sistema in kopičenje CAP v listih, kjer ga zaznamo še 30 dni po apliciranju na zemljo (Technical bulletin, 2008). Poleg foto razgradnje so med glavnimi dejavniki razgradnje tudi abiotična in aerobna razgradnja CAP ter od 0,2-8,8% izgube zaradi vezave CAP na zemljo oz. komponente v njej. Za DT50 navajajo razpad CAP pri 25°C od 233 do 886 dni ter pri obsevanju vzorca 12 ur na dan od 82 do 611 dni. Za DT90 pa je omenjen razpad CAP od 696 do 2940 dni. Zaradi velikega razpona med razpolovnimi dobami navajajo meritve kot nezanesljive (Kraggerud in sod., 2010). Velja pa omeniti študijo o dobri odpornosti CAP na izpiranje s

površine rastline ob padavinah, saj so v listih 18 ur po nanosu in izpostavljenosti 28,6 mm/m<sup>2</sup> padavin še vedno zaznali 80 % prisotnost nanesenega CAP (Coragen®, 2010). Na osnovi dostopnih podatkov tako vidimo, da je skoraj nemogoče napovedati primernost uporabe Coragena v konvencionalni in integrirani pridelavi ter možnosti kasnejšega prehoda na ekološko pridelavo ob upoštevanju razpada v triletnem prehodnem obdobju.

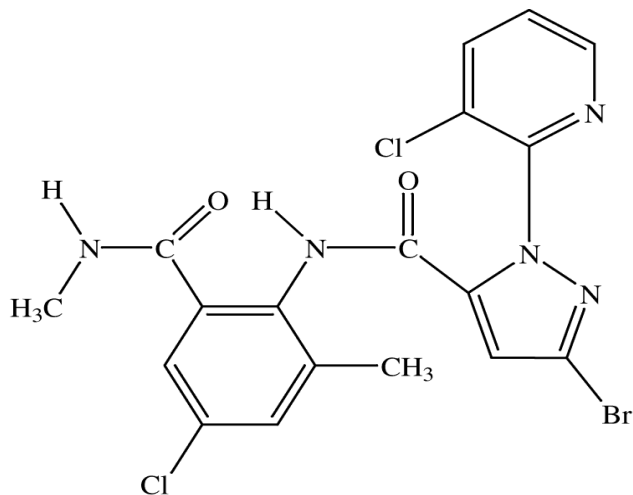
Zato bomo na podlagi poskusa, ki ga bomo izvedli na vinogradniškem posestvu Vilina, v realnih pogojih in z naravnimi meteorološkimi vplivi v vinogradu, preučevali stabilnost CAP iz pripravka Coragen. V odvzetih vzorcih trave in zemlje bomo opazovali obstojnost in morebiten transport CAP na travi in v različnih globinah tal. S pomočjo topila, ki ga bomo določili s predhodnimi analizami za delež ekstrakcije, bomo ekstrahirali CAP iz vzorcev in nato preverjali koncentracijo CAP s pomočjo naprave HPLC. Tekom poskusa tako pričakujemo upadanje CAP v vzorcih iz različnih vzrokov. V primeru zemlje so lahko najpogostejši razlog padavine, ki povzročijo izpiranje CAP v globlje sloje in okolico, pri rastlinah pa neposredna izpostavljenost sončni svetlobi. S pomočjo zbranih rezultatov bomo lahko potrdili ali ovrgli navedbe v literaturi. Iz eksperimentalnih podatkov bomo tudi ocenili obstojnost te skupine insekticidov v naravnem okolju in s tem primernost v triletnem prehodu na ekološko pridelavo pri trajnih nasadih oz. v našem primeru v vinogradu.

## 2 TEORETIČNE OSNOVE

### 2.1 Tehnični podatki za insekticid Coragen

Za eksperiment smo uporabili insekticid Coragen, v katerem najdemo aktivno substanco CAP, ki je fina raztopina bele barve z zelo nizkim parnim tlakom in temperaturo uničenja 200 °C. CAP je relativno netopen v večini topil in ima zelo slabo topnost v vodi (0,880 mg/L (20 °C, pH 7)). Je pa dobro obstojen v kislem in slabše v bazičnem okolju. Nekaj podatkov za ta insekticid si lahko ogledamo spodaj (Evaluation report: Chlorantraniliprol, 2008).

- Polno ime: 3-bromo-4`-kloro-1(3-kloro-2-piridil)-2`-metil-6`-(metilkarbamoil)pirazol-5-karboksanilid (IUPAC)
- Strukturna formula: ogledamo si jo lahko na spodnji sliki 1
- Molekularna formula:  $C_{18}H_{14}BrCl_2N_5O_2$
- Molekulska masa: 483,15 g/mol
- Zaščiteno ime: Rynaxypyr®
- ISO ime: Klorantraniliprol
- Kemična skupina: antranilni diamidi
- Vsebnost aktivne snovi: 200 g/L
- Formulacija: v obliki koncentrirane suspenzije (SC)

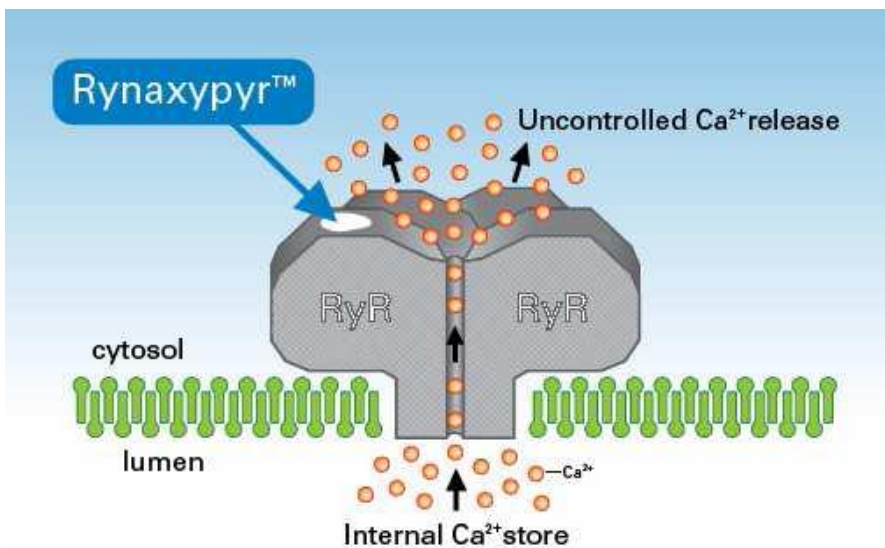


*Slika 1: Strukturna formula aktivne snovi CAP*

## 2.2 Delovanje aktivne snovi CAP

Coragen z aktivno substanco CAP je dokaj nov pesticid, ki ga je proizvajalec DuPont na tržišču predstavil leta 2007. Uvršča se med insekticide, ki pripadajo novi skupini selektivnih antranilnih diamidnih insekticidov z novim načinom delovanja (skupina 28 v IRAC razvrstitvi). CAP deluje na jajčeca, jajčeca ob izleganju, larve in tudi na ličinke med njihovim hranjenjem s tretiranimi rastlinami. CAP prizadene rianodinske receptorje, ki jih aktivira ter tako stimulira sproščanje in izpraznitev celičnih kalcijevih zalog iz sarkoplazmatskega retikuluma mišičnih celic (Sattelle in sod., 2008). Shematski prikaz delovanja CAP je predstavljen tudi na spodnji sliki 2.

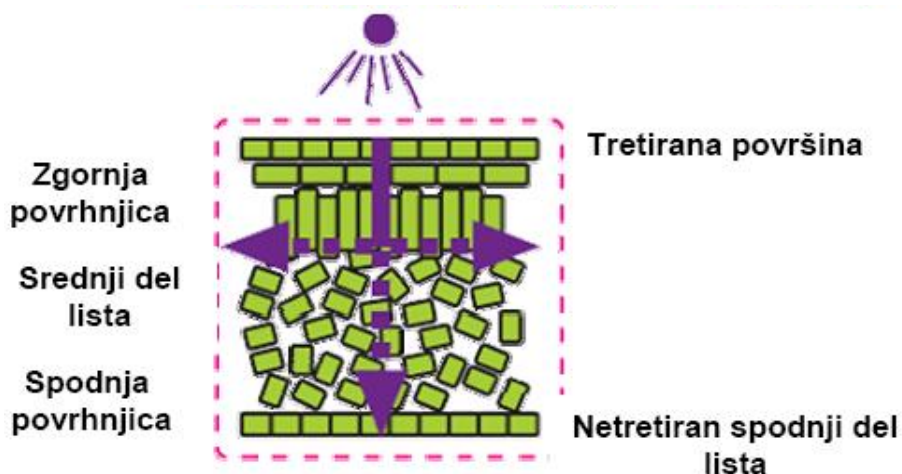




**Slika 2:** *Sproščanje kalcijevih zalog zaradi delovanja CAP (Tehnicial bulletin, 2008)*

S takšnim načinom delovanja oslabi mišično aktivnost členonožcev in jih posledično paralizira, kar vodi v smrt tretiranih in na CAP občutljivih vrst. Zaradi takšnega delovanja CAP deluje na insekte, ki so že razvili odpornost na vrsto drugih insekticidov. Lahko pa še povemo, da CAP prepozna razliko med rianodinskimi receptorji pri sesalcih in rianodinskimi receptorji pri členonožcih. S takšnim delovanjem ne učinkuje na sesalce in le v izjemno velikih količinah deluje na ose, pikapolonice, predatorske pršice, parazitoidne osice ter druge, pa tudi na čebele, kar je zelo pomembno za ohranjanje zaželenih vrst v naravnem okolju. Pri apliciranju CAP na liste le ta preide v samo rastlino in tako prepreči izpiranje s površine. Prehod CAP v rastlino si lahko ogledamo tudi na sliki 3. S tem dosežemo daljšo obstojnost in delovanje CAP na organizme, ki se hranijo z zelenimi deli rastline.

## Nanos CAP



Slika 3: Prehod aktivne snovi v notranje sloje rastline (Coragen®, 2010)

### 2.3 Uporaba v vinogradništvu

V vinogradniški tehnologiji uporabljamo pesticid Coragen za zatiranje križastega grozdnega sukača (*Lobesia botrana*) in pasastega grozdnega sukača (*Eupoecilia ambiguella*), ki nam povzročata zelo veliko škodo v času njune aktivnosti. Gosenice škodljivcev že v zgodnji fazi razvoja jagod napadejo grozde in poškodujejo jagode ter tako povzročijo veliko izgubo pridelka. Poškodovane jagode, ki se obdržijo na grozdu, lahko kasneje v fazi zorenja okuži še gliva *Botrytis cinerea*. Ta napade skozi poškodovane dele jagode, povzroči gnilobo grozdja in dodatno izgubo pridelka. Za zaščito pridelka lahko uporabimo sredstvo Coragen, ki je zagotovljeno učinkovito in obstojno proti tema dvema škodljivcema. Coragen lahko uporabimo samo enkrat v rastni sezoni vinske trte za pridelavo vinskega in namiznega grozdja, v času odlaganja jajčec škodljivca (ob prvem vzletu metuljčkov) oz. še pred njihovim izleganjem. Uporabljamo ga v odmerku 15 mL/hL,

kar pomeni 150 mL pripravka na 1 ha vinograda in je najvišji dovoljeni odmerek pri tretiranju vinograda s tem sredstvom. Moramo pa poudariti, da napadi teh škodljivcev v Sloveniji niso pogosti in se jih tretira le ob večji prisotnosti oz. v skladu z napovedjo opazovalno-napovedovalne službe. Pri uporabi tega pesticida je zelo dobro, da deluje le na specifične vrste in s tem ohranja neškodljive organizme v vinogradu, saj so zelo pomembni za naravno zatiranje škodljivcev. Pri biološkem vinogradništvu pa je zaradi zahteve po neuporabi spornih pesticidov, z izjemo omejene uporabe bakrovih pripravkov, žveplovih pripravkov in biološko nespornih pripravkov, še toliko bolj nujna prisotnost žuželk (naravni sovražniki), ki zatirajo škodljivce v vinogradniški tehnologiji.

### 3 EKSPERIMENTALNI DEL

#### 3.1 Priprava eksperimentalne površine

Priprava eksperimentalne površine je potekala 22.06.2011 med 16. in 19. uro na univerzitetnem posestvu v Mančah, ki je veliko 9 ha in zasajeno s sorto Merlot na vzgojni obliki Casarsa. Izbrali smo si del vinograda, ki je namenjen za obračanje vinogradniške mehanizacije. Ta se nam je zdel najprimernejši za izvedbo poskusa, ker je neposredno ob vinogradu (podobna sestava in struktura tal, poraslost s travinjem) ter ga lahko zaščitimo in preprečimo prehod mehanizacije neposredno čezenj. Del, ki smo ga izbrali je prikazan na sliki 4 in je označen z rdečo barvo. To območje nam je ustrezalo tudi zaradi bližine meteorološke postaje, ki jo ima KGZ Nova Gorica, na Slapu. Tako smo lahko kontinuirano in natančno spremljali meteorološke vplive v časovnem obdobju eksperimenta.



*Slika 4: Zračni posnetek posestva v Mančah z označeno eksperimentalno površino (Google-Slike, 2011)*

Najprej smo na izbranem delu vinograda odmerili tri kvadrate s površino 1,2 m<sup>2</sup> in dvema kvadratoma odstranili travno rušo. Na preostalem kvadratu pa smo le pokosili travo, da je bila enakomerno visoka (cca 5 cm). Na tako pripravljene podlage smo z vrvico označili kvadrate s površino 0,81 m<sup>2</sup>, v katerih smo ob jemanju vzorcev odmerili kvadratke s površino 225 cm<sup>2</sup>. En kvadrat z odstranjeno rušo nam je služil kot kontrolni vzorec, na ostala dva pa smo nanесли pesticid Coragen. Pesticid smo nanесли v dvojnem priporočenem odmerku (150 mL/ha), kar znaša 36 µL/1,2 m<sup>2</sup> in ga raztopili v cca 500 mL vode. Z ročno pršilko smo nato čim bolj enakomerno in natančno, z večkratnim križnim nanašanjem, nanесли pesticid na kvadrat z odstranjeno travno rušo in na kvadrat s travo. Pri delu smo pazili, da po nanosu pesticida nismo hodili po kvadratih ali na kak drugačen način raznašali pesticida s površine ali kontaminirali površine z nanesenim pesticidom. Predel, uporabljen za poskus smo nato še zaščitili s koli in vrvico ter pritrdili opozorilno tablo NE TIKAJ, EKSPERIMENT V TEKU!

### **3.2 Potek vzorčenja**

Že na dan nanosa (22.06.2011) smo odvzeli prve vzorce za analizo, in sicer z vsakega kvadrata po 3 vzorce, vsakega s površine 225 cm<sup>2</sup>. Pri tem smo travo porezali tik ob koreninah, pri vzorcih zemlje pa izkopalni sloj globine 5 cm. Vzorce zemlje smo odvezemali z ročno vrtno lopatko. Pri tem smo imeli vedno eno lopatko za kontrolni kvadrat in drugo za kvadrat z nanesenim pesticidom. Vzorce smo odvezemali posamično in pri tem pazili, da jih nismo kontaminirali ter zavili vsakega posebej v aluminijasto folijo, da smo preprečili vplive iz okolja med transportom do skladiščenja. Vzorce smo skrbno označevali in tudi med samo analizo pazili na njihovo sledljivost tako, da ni prišlo do zamenjave vzorcev med časovno različnimi vzorčenji. Drugo vzorčenje je sledilo čez mesec dni (25.07.2011), pri katerem pa smo zaradi padavin med vmesnim obdobjem odvzeli vzorce zemlje do globine 5 cm in tudi sloj od globine 5 cm do 10 cm, saj smo predvidevali, da se je nekaj CAP lahko izpralo tudi v nižje sloje tal. Sledilo je tretje vzorčenje (26.08.2011), četrto vzorčenje (26.09.2011) in peto vzorčenje (25.10.2011), pri katerih smo uporabili enak postopek kot pri drugem vzorčenju (od 0-5 cm in od 5-10 cm). Izvedli smo tudi šesto vzorčenje

(04.12.2011), pri katerem smo zaradi domnevnega izpiranja CAP v še nižje sloje zemlje in izplakovanja po eksperimentalni površini, vzorčili še zemljo na globini od 10-15 cm (vzorec 16) in zemljo, ki je bila naplavljena v prazne kvadratke predhodno pobranih vzorcev na globini od 5-10 cm (vzorec 17). Potek vzorčenja si lahko ogledamo tudi v shemi, ki jo prikazuje slika 5, na kateri po tri zaporedna števila predstavljajo vzorce odvzete med enim vzorčenjem, npr: števila 1, 2, 3 predstavljajo prvo vzorčenje, števila 4, 5, 6 predstavljajo drugo vzorčenje, ... itd. Števila v oklepajih ( 4'), (5'), (6'),... ) ravno tako po tri skupaj predstavljajo eno zaporedno vzorčenje, ki pa smo ga opravili na globini med 5-10 cm. Zelena barva predstavlja kontrolni kvadrat, modra površino s pesticidom nanesenim direktno na zemljo, oranžna barva pa površino s pesticidom nanesenim na travo.

1					10
	2			11	
		3	12		
		7	6		
	8	13	14	5	
9				15	4
4 (4')					10 (10')
	5 (5')			11 (11')	
		6 (6')	12 (12')		
		16	3		
		7 (7')			
	8 (8')	13 (13')	14 (14')	2	
9 (9')				15 (15')	1
10					4 (4')
	11			5 (5')	
		12	6 (6')		
		3	7		
	2	13	14	8	
1				15	9

**Slika 5:** Prikaz razporeditve odvzetih vzorcev na raziskovalni ploskvi in poteka vzorčenja

## **3.3 Priprava vzorcev za analizo**

### **3.3.1 VZORCI ZEMLJE**

#### **3.3.1.1 Sušenje zemlje**

Po odvzemu smo vzorce zemlje prepeljali v prostore Laboratorija za raziskave v okolju v Rožni Dolini, kjer smo jih tudi skladiščili in analizirali. Pred samim shranjevanjem smo vzorce odvzete v obdobju z več padavinami morali sušiti v posebej pripravljenem temnem prostoru s temperaturo med 20-25 °C. V takih pogojih smo vzorce zemlje sušili 2-3 dni, tako da so izgubili nekaj vlage, kar nam je olajšalo delo med pripravo vzorcev za analizo. Po končanem sušenju zemlje smo vzorce shranjevali v zamrzovalni skrinji na temperaturi -20 °C.

#### **3.3.1.2 Homogenizacija vzorcev zemlje**

Zemljo smo dan pred pripravo dali na sobno temperaturo, da se je odtalila. S sejanjem (sito velikosti 2 mm) smo zemljo ločili od primesi in delov večjih od 2 mm. Po sejanju smo imeli od vsakega vzorca cca 1 kg presejane zemlje, ker pa smo za analizo rabili manjše količine zemlje smo vzorce še četrtinili. Vzorec zemlje smo enakomerno nanegli v obliko stožca in ga nato enakomerno poravnali v obliko kroga, ki smo ga razdelili na štiri enake dele, od katerih smo diagonalno nasprotna si dela vzorca odstranili. Ostala dva smo še enkrat nanegli v obliko stožca, ga še enkrat poravnali in spet razdelili na štiri enake dele, od katerih smo dva nasprotna zavrgli, ostala dva pa združili in uporabili za analizo. S postopkom četrtinjenja smo tako dobili vzorec, ki je bil približno četrtina celotne količine vzorca (cca 250 g) in zaradi samega postopka, po strukturi in vsebnosti nanesenega CAP enak odvzetemu vzorcu. Takšen vzorec je bil zavrt v aluminijasto folijo in do analize shranjen v zamrzovalni skrinji.

### **3.3.1.3 Določanje vlage v vzorcih zemlje**

Opravili smo tudi določanje vlage saj smo ta podatek potrebovali za kasnejše določanje CAP/g analiziranega vzorca. Vzorce smo natančno tehtali (na 0,001 g), jih dali v sušilnik na temperaturo 105 °C in vsakih 45-60 min. preverjali maso vzorca dokler ta ni bila konstantna. Nato smo iz danih rezultatov izračunali delež vlage, ki so tabelarično predstavljeni v poglavju z rezultati.

### **3.3.1.4 Analiza zemlje**

Za analizo realnih vzorcev zemlje smo odtehtali 100 g zemlje pripravljene po postopku opisanem v poglavju 3.3.1.1 in 3.3.1.2 in jo ekstrahirali s 100 mL acetonitrila. Po 20 min. stresanja na stresalniku smo dekantirali acetonitril od vzorca ter 2-krat spirali s po 25 mL acetonitrila in vsakič dekantirali. Celoten postopek smo po prvi ekstrakciji vzorca ponovili in obe frakciji združili ter skoncentrirali na rotavaporju na končni volumen 5 mL. Nato smo za analizo na HPLC preko filtra za enkratno uporabo prefiltrirali cca. 1 mL skoncentriranega vzorca v stekleničko z gumijastim pokrovom in jo postavili v avtomatski vzorčevalnik kromatografa HPLC.

## **3.3.2 VZORCI TRAVE**

### **3.3.2.1 Sušenje trave**

Ravno tako kot zemljo smo tudi travo pred shranjevanjem sušili, da smo dosegli nižjo vsebnost vlage v samih vzorcih. Prostor za sušenje je bil zatemnjen in s temperaturo med 20 in 25 °C. Travo smo sušili 2-3 dni in jo nato dali na skladiščenje v zamrzovalno skrinjo (-20 °C).

### **3.3.2.2 Homogenizacija trave**

Za travo nismo uporabljali posebnih postopkov homogenizacije, saj smo jo samo narezali na približno 1 cm velike koščke in jo shranili v aluminijasto folijo ter dali v zamrzovalno skrinjo do same analize.



### 3.3.2.3 Določanje vlage v vzorcih trave

Vlago v vzorcih trave smo določali po enakem postopku kot pri zemlji in rezultate tabelarično podali v poglavju rezultati.

### 3.3.2.4 Analiza trave

Za analizo trave smo pri vzorcih 1, 2, 3 odtehtali 3 g vzorca, ki smo jih ekstrahirali po zgoraj navedenem postopku s 50 mL acetonitrila in dvakrat spirali s po 10 mL acetonitrila. Postopek smo po prvi ekstrakciji ponovili ter celotno količino vzorca koncentrirali na 5 mL. Pri ostalih vzorcih pa smo odtehtali 6 g trave, jo ekstrahirali s po 50 mL acetonitrila in vzorec dvakrat spirali s po 15 mL acetonitrila. Tudi v tem primeru smo postopek ponovili dvakrat in frakciji združili ter skoncentrirali na 5 mL. Od skoncentriranega ekstrakta smo za vsak vzorec cca. 1 mL filtrirali preko filtra za enkratno uporabo v stekleničko z gumijastim pokrovom in jo za analizo postavili v avtomatski vzorčevalnik na kromatografu HPLC .

## 3.4 Reagenti, raztopine, pripomočki in aparature

- Tehnica ABJ (KERN)
- Sušilnik binder (WTC)
- Tekočinski kromatograf HPLC (Hewlet Packard 1100)
- Kromatografska kolona LUNA C18
- Rotavapor LABORATA 4000 (Heidalph)
- Bučke za rotavapor (50 mL, 250 mL)
- Rotavapor miVac, duo pump (Genevac)
- Stresalnik VIBROMIX 313EVT (Tehnica-Železniki)
- Aceton 99,5 % (SIGMA-ALDRICH)
- Acetonitril 99,9 % (SIGMA-ALDRICH)
- Coragen z aktivno substanco CAP: 200 g/L (DuPont) .
- 2x deionizirana voda NANO PURE, ultrapure water system (Barnstead)
- Injekcije 2 mL
- Filtri za enkratno uporabo (velikost por 0,2 µm)

## **3.5 Določanje koncentracije aktivne snovi CAP**

Preden smo pričeli z analizo vzorcev smo morali določiti še pogoje analize, kot so: količina vzorca, topilo za ekstrakcijo in količino topila za ekstrakcijo. Na podlagi dosedanjih raziskav tovrstnih snovi, ki jih izvajajo v Laboratoriju za raziskave v okolju na Univerzi v Novi Gorici, smo se odločili, da bomo poskušali ekstrakcijo izvesti s pomočjo acetonitrila in acetona ter tako ugotovili katero topilo ima boljši izkoristek ekstrakcije in je bolj primerno za načrtovano analizo.

### **3.5.1 PRIPRAVA VZORCEV Z ZNANO KONCENTRACIJO CAP**

#### **3.5.1.1 Priprava vzorcev zemlje**

Za pripravo vzorcev zemlje z znano koncentracijo CAP smo uporabili zemljo iz kontrolnega kvadrata in nanjo nanesli natančno količino pripravka Coragen raztopljenega v acetonitrilu. Odtehtali smo 750 g zemlje s 15,93 % izmerjeno vlažnostjo ter nanjo nanesli pripravek Coragen, ki smo ga za enakomernejše nanašanje CAP na vzorec zemlje raztopili v cca 500 mL acetonitrila (količina je bila 3,17 µg CAP/g suhe zemlje). Ko smo raztopino acetonitrila in Coragena nanesli na zemljo, smo le to dobro premešali, da je bila zmes čim bolj homogena. Posodo z zmesjo smo nato postavili v eksikator, ki smo ga priključili na vodno črpalko ter tako dosegli podtlak s pomočjo katerega smo čez noč izparili acetonitril iz vzorca zemlje. Ko smo izparili acetonitril, smo zemljo dobro homogenizirali in večkrat četrtinili, tako da smo dobili štiri vzorce po cca. 50 g zemlje, ki so bili pripravljene za analizo.

#### **3.5.1.2 Priprava vzorcev trave**

Ravno tako smo na 17,6 g trave, ki smo jo predhodno narezali na približno 1 cm velike koščke, nanesli znano količino CAP raztopljenega v acetonitrilu. Travo s 300 mL topila in CAP smo 2 uri stresali v 500 mL bučki in jo nato dali na rotavapor, kjer smo izparili acetonitril tako, da je bila trava zopet suha. Predvidevali smo, da se je na stene bučke med samim procesom na rotavaporju absorbiralo nekaj CAP, zato smo stene bučke večkrat

sprali z acetonitrilom (cca. 20-30 mL), skoncentrirali na 10 mL ter koncentrat kasneje analizirali. Tako smo določili maso CAP, ki se je absorbirala na stene posode med pripravo vzorca za določanje izkoristka ekstrakcije. To smo upoštevali pri izračunu koncentracije CAP v vzorcu trave pripravljenem po gornjem postopku. Dejanska koncentracija CAP je bila 125 µg/g suhe trave.

### **3.5.2 EKSTRAKCIJA IN MERJENJE NA KROMATOGRAFU HPLC**

#### **3.5.2.1 Izbira topila za učinkovitejšo ekstrakcijo**

Pri preliminarni izbiri topila za ekstrakcijo CAP smo za zemljo odtehtali 50 g vzorca, ki smo ga ekstrahirali s 50 mL acetonitrila ob 20 min. stresanju na stresalniku. Nato smo vzorec filtrirali in 2-krat sprali s po 25 mL acetonitrila. Tako smo dobili 1. frakcijo, ki smo jo na rotavaporju skoncentrirali na 10 mL. Po enakem postopku smo isti vzorec še enkrat ekstrahirali (dobili 2. frakcijo) in ravno tako skoncentrirali na 10 mL. Obe frakciji smo ločeno analizirali na kromatografu HPLC. Z injekcijo smo približno 1 mL vsake frakcije filtrirali preko filtra (0,2 µm) v stekleničko, ki smo jo zaprli z gumijastim pokrovom in postavili v avtomatski vzorčevalnik kromatografa. Po enakem postopku smo določali izkoristek ekstrakcije za zemljo tudi z acetonom.

V primeru vzorcev trave smo odtehtali 1 g vzorca in ga ekstrahirali s 30 mL acetonitrila ob 20 min. stresanju na stresalniku. Nato smo vzorec filtrirali in 2-krat spirali s po 10 mL acetonitrila. Tako smo dobili 1. frakcijo, ki smo jo ravno tako skoncentrirali na 10 mL na rotavaporju. Po enakem postopku smo isti vzorec še enkrat ekstrahirali ter skoncentrirali na 10 mL (dobili 2. frakcijo). Prvo in drugo frakcijo smo ločeno analizirali po enakem postopku kot v primeru ekstrakcije zemlje. Po enakem postopku smo travo ekstrahirali tudi z acetonom.

#### **3.5.2.2 Potek analize na KROMATOGRAFU HPLC**

Analizo smo opravljali na kromatografu HPLC. Njegove specifikacije in potek analize so podani v tabeli 1.

**Tabela 1: Pogoji analize na kromatografu HPLC**

KROMATOGRAF	Hewlet Packard 1100
KOLONA	Luna 3u C18(2) 100 A Dimenzije: 150x4,6 mm, velikost delcev 3 µm
VOLUMEN INJICIRANJA	20 µL
PRETOK	1,000 mL/min
ELUCIJA	Izokratska
MOBILNA FAZA	Acetonitril 49 % 0,1 % očetna kislina v 2x deionizirani vodi
TRAJANJE METODE	10 min.
SPIRANJE	3 min.
TEMPERATURA	25 °C

Na podlagi predhodnih analiz smo pričakovali, da se CAP pojavi na kromatogramu kot vrh pri retencijskem času med 7,40-7,80 min., kar smo preverili tudi s standardnimi raztopinami z znanimi koncentracijami CAP. Po pregledu kromatogramov in primerjavi površin vrhov, ki smo jih z ročnim načinom integrirali pri iskanem retencijskem času smo ugotovili, da je acetonitril boljši ekstrahent kot topilo aceton. Zato smo za naše nadaljnje delo uporabili acetonitril.

### **3.5.2.3 Določanje izkoristka ekstrakcije z acetonitrilom**

#### **3.5.2.3.1 Zemlja**

Za določitev izkoristka ekstrakcije smo vzeli tri vzorce po 50 g zemlje z dodanim CAP. Vsakega posebej smo dali v 250 mL erlenmajerjevo steklenico ter prilili 50 mL acetonitrila. Tako pripravljene vzorce smo dali za 20 min. na stresalnik, nekoliko počakali, da so se večji delci polegli na dno ter dekantirali acetonitril od usedline. Vzorec zemlje smo nato še 2-krat sprali s po 25 mL acetonitrila, ki smo ga ravno tako dekantirali v isto steklenico za odparevanje na rotavaporju. Po enakem postopku smo še enkrat ekstrahirali vzorec zemlje in dobili 2. frakcijo, ki pa smo jo združili s 1. frakcijo in dobljeno količino skoncentrirali na 10 mL. S pomočjo injekcije smo nato cca. 1 mL vzorca preko filtra prefiltrirali v stekleničko za analizo na HPLC in jo postavili na avtomatski vzorčevalnik kromatografa HPLC.

### 3.5.2.3.2 *Trava*

Za določitev deleža ekstrakcije pri travi smo vzeli 3 vzorce trave po 6 g. Vsakega posebej smo dali v erlenmajevno steklenico, prilili 50 mL acetonitrila in dali na stresalnik za 20 min. Po končanem stresanju smo dekantirali acetonitril in vzorce trave še 2-krat sprali s po 15 mL acetonitrila ter tako dobili prvo frakcijo ekstrakcije. Postopek smo ponovili in zbrali še 2. frakcijo. Obe frakciji smo združili ter vse skupaj skoncentrirali na 5 mL. Od tega smo približno 1 mL skoncentriranega ekstrakta s pomočjo injekcije preko filtra prefiltrirali v stekleničko z gumijastim pokrovom in jo postavili na avtomatski vzorčevalnik kromatografa HPLC.

## 4 REZULTATI

### 4.1 Določitev vlage v vzorcih

Rezultati meritev vlage, ki smo jo določali s pomočjo sušilnika in avtomatske tehtnice so podani v spodnjih tabelah 2 in 3. Po zaporednih vzorčenjih vidimo, da se je vlaga v tleh in travi tekom poskusa precej spreminjala, kar pripisujemo spremenljivim vremenskim pogojem med poskusom in času sušenja, ki smo ga izvajali pred samo analizo vzorcev. Ugotovljena vlažnost vzorcev zemlje je bila med 8,9 in 31,4 %, pri vzorcih trave pa med 7,2 in 48,5 %, zato brez upoštevanja vlažnosti rezultati med posameznimi vzorčenji ne bi bili primerljivi.

**Tabela 2: Določanje vlage v vzorcih zemlje**

VZORČENJE	MASA ZATEHTANEGA VZORCA (g)	MASA PO SUŠENJU (g)	VLAGA (%)
22.06.2011	10	8,422	15,8
25.07.2011	10	7,921	20,8
26.08.2011	10	9,110	8,9
26.09.2011	10	8,210	17,9
25.10.2011	10	6,983	30,2
04.12.2011	10	6,861	31,4

**Tabela 3: Določanje vlage v vzorcih trave**

VZORČENJE	MASA ZATEHTANEGA VZORCA (g)	MASA PO SUŠENJU (g)	VLAGA (%)
22.06.2011	1	0,928	7,2
25.07.2011	3	1,545	48,5
26.08.2011	3	2,240	22,8
26.09.2011	3	2,080	27,6
25.10.2011	3	2,641	10,8

## 4.2 Izbira topila za ekstrakcijo

Pri analizi vzorcev trave z znanimi koncentracijami CAP po ekstrakciji v aceton in acetonitril s kromatografom HPLC smo določili površine kromatogramskih vrhov, ki so predstavljene v spodnji tabeli 4.

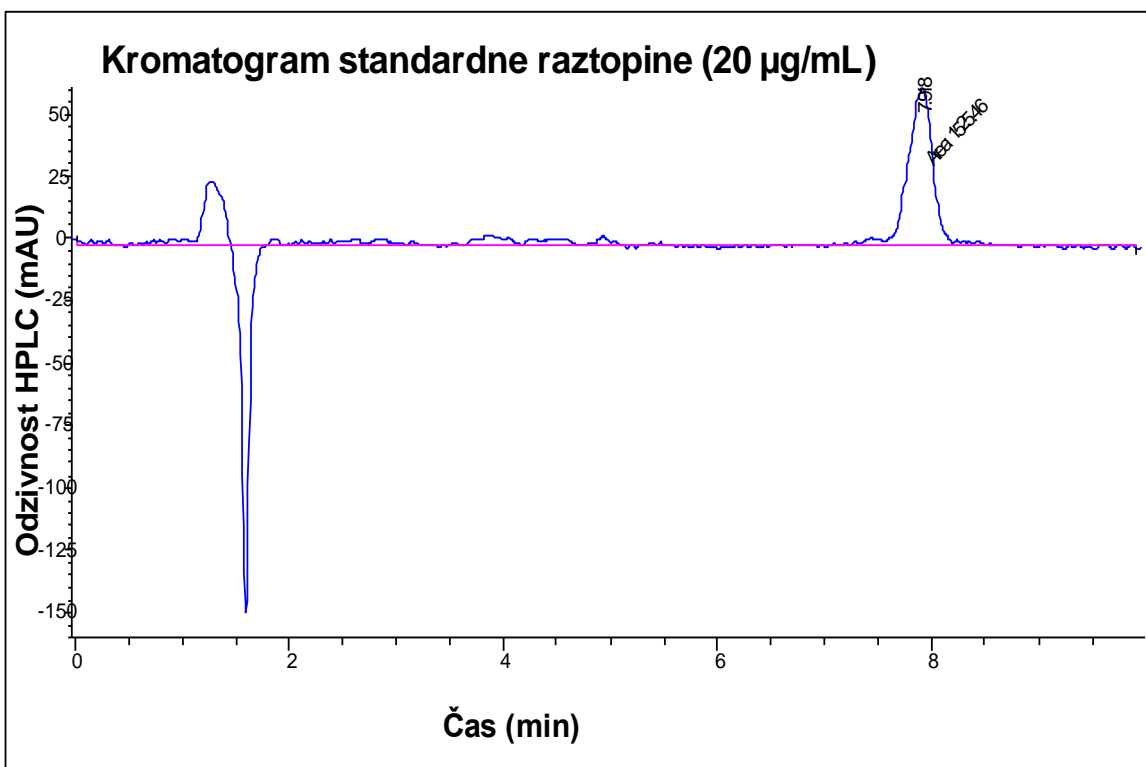
**Tabela 4:** *Površine kromatografskih vrhov za skoncentrirane frakcije zaporednih ekstraktij z acetonom in acetonitrilom*

VZOREC	TOPILO	POVRŠINA KROMATOGRAMSKEGA VRHA (a.e.)	Skupaj (a.e.)
1. frakcija	Aceton	466,758	631,201
2. frakcija	Aceton	164,443	
1. frakcija	Acetonitril	849,187	1093,764
2. frakcija	Acetonitril	244,577	

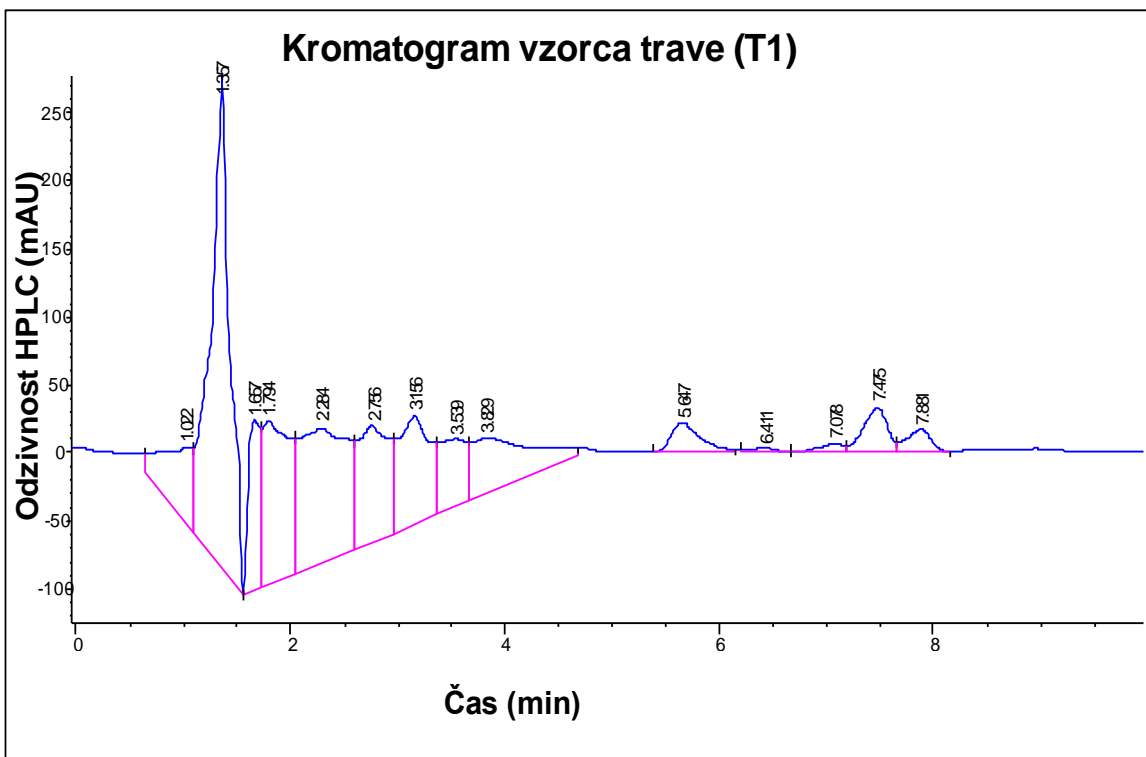
Glede na to, da je bila masa trave za analizo in s tem tudi masa CAP enaka za obe topili, lahko na osnovi površine kromatografskih vrhov ugotovimo, da je ekstrakcija z acetonitrilom skoraj 2-krat učinkovitejša. Seštevek površin kromatografskih vrhov 1. in 2. frakcije za topilo aceton je namreč bil 631,201 a.e., za topilo acetonitril pa kar 1093,764 a.e.,

## 4.3 Določitev retencijskega časa CAP

Pri analizi vzorcev na kromatografu HPLC smo dobili kromatogram na katerem je prikazana odzivnost detektorja v odvisnosti od časa. Pri analizi standardne raztopine CAP smo zaznali kromatografski vrh pri retencijskem času 7,47 min. (Slika 6), ki je značilen za CAP pri izbranih kromatografskih pogojih. Na sliki 7 pa je prikazan primer kromatograma realnega vzorca, ki smo ga dobili po analizi vzorca trave. Vidimo, da je kromatografski vrh CAP pri 7,48 min. dobro ločen od neznanih snovi v vzorcu, ki se tudi ekstrahirajo z acetonitrilom. Vendar pa te snovi po kromatografski ločbi določitve CAP ne motijo.



*Slika 6: Primer kromatograma standardne raztopine CAP v acetonitrilu (20 µg/mL)*

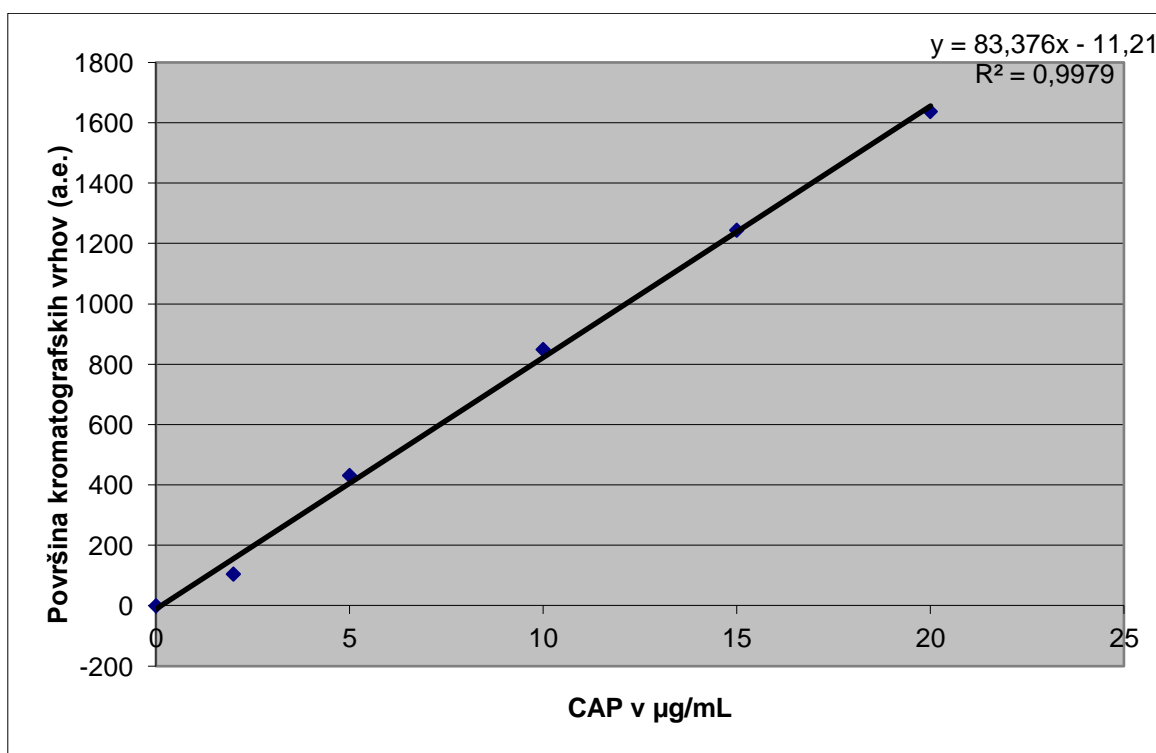


*Slika 7: Primer kromatograma za CAP po ekstrakciji iz vzorca trave*



#### 4.4 Umeritvena premica za CAP

Za določanje CAP v analiziranih vzorcih smo morali najprej umeriti kromatograf HPLC z analizami raztopin z znanimi koncentracijami CAP. Pripravili smo standardne raztopine s koncentracijami 2, 5, 10, 15 in 20 mg/L CAP in jih analizirali na HPLC. Iz površine kromatografskih vrhov za CAP, v odvisnosti od koncentracije, smo z metodo linearne regresije izračunali enačbo umeritvene premice  $A=kC + n$ , kjer je A površina kromatografskega vrha, k naklon premice, C koncentracija CAP, n pa odsek na ordinatni osi. Ta enačba nam je služila za določanje neznanih koncentracij CAP v analiziranih vzorcih zemlje in trave. Zanje smo s pomočjo površine vrhov in deleža ekstrakcije lahko preračunali koncentracijo CAP v analiziranih vzorcih. Umeritvena premica je prikazana na sliki 8.



Slika 8: Umeritvena premica za določanje naklona premice  $y=kx+n$

## 4.5 Določanje izkoristka ekstrakcije z acetonitrilom

Pri analizah zemlje in trave za določitev izkoristka ekstrakcije s HPLC smo dobili površine kromatografskih vrhov, ki so podane v tabelah 5 in 6. Iz podatkov v tabelah smo po spodnjem izračunu preračunali delež ekstrakcije, ki je za zemljo  $63,1 \pm 12,5$  % in za travo  $50,3 \pm 4,4$  %.

Izračun za preračunavanje deleža ekstrakcije:

$$W = (m_1/m_2) \times 100$$

W-delež ekstrakcije

m<sub>1</sub>-masa CAP dobljena po ekstrakciji

m<sub>2</sub>- znana masa CAP v vzorcu

**Tabela 5: Površine vrhov in izkoristek ekstrakcije iz zemlje**

VZOREC	MASA CAP/VZOREC (mg)	POVRŠINA VRHA (a.e.)	MASA EKSTRAHIRANEGA CAP (mg)	IZKORISTEK EKSTRAKCIJE (%)	POVPREČJE (%)	S.D. (%)
Z1	0,155	707,300	0,0862	55,60		
Z2	0,155	714,234	0,0870	56,10	63,1	12,5
Z3	0,155	985,700	0,1200	77,50		

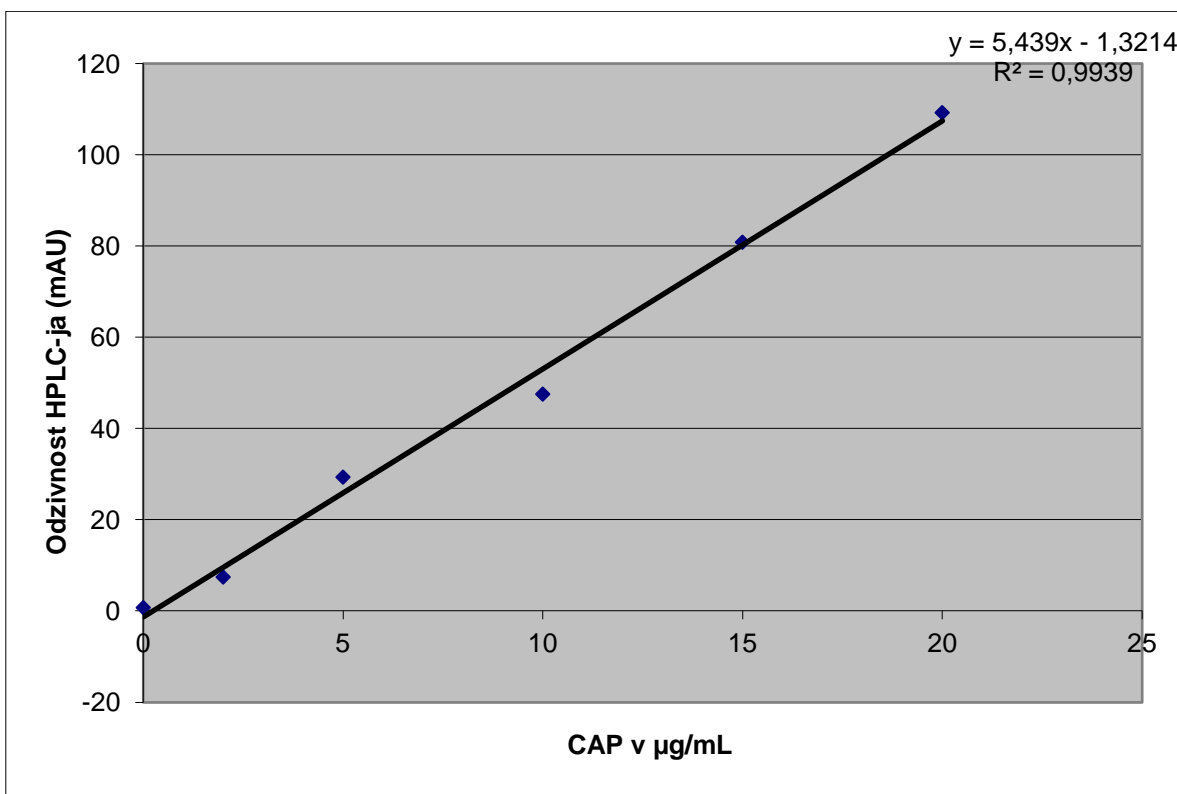
**Tabela 6: Površine vrhov in izkoristek ekstrakcije iz trave**

VZOREC	MASA CAP/VZOREC (mg)	POVRŠINA VRHA (a.e.)	MASA EKSTRAHIRANEGA CAP (mg)	IZKORISTEK EKSTRAKCIJE (%)	POVPREČJE (%)	S.D. (%)
T1	0,76	6957,975	0,418	55,0		
T2	0,76	6276,435	0,377	49,6	50,3	4,4
T3	0,76	5856,730	0,352	46,3		

## 4.6 Določanje LOD

LOD je spodnja meja detekcije. Podaja nam najnižjo koncentracijo, ki jo lahko še zaznamo s pomočjo izbrane analizne metode. Kromatografski vrh je pri tem še viden nad šumom ozadja in mu lahko določimo njegovo površino ali višino iz katere preračunamo

koncentracijo CAP. Pod mejo LOD je lahko CAP še vedno prisotna, a jo zaradi prenizke občutljivosti metode podamo kot  $\leq$  LOD. Za določitev LOD smo z analizami standardnih raztopin z znanimi koncentracijami CAP izračunali enačbo umeritvene premice. Pri tem pa smo namesto površine vrhov vzeli kar njihove višine, saj površine vrha pri bazni liniji kromatograma ( $C=0$ ) ne moremo določiti, lahko pa določimo velikost šuma signala in njegov standardni odklon. S pomočjo naklona umeritvene premice in standardnega odklona signala ozadja smo iz zveze  $LOD = 3SD_b/k$  določili spodnjo mejo detekcije ( $SD_b$  je standardni odklon signala bazne linije kromatograma, pri retencijskem času analita). Umeritvena premica za določitev LOD je prikazana na sliki 9. V tabeli 7 pa so podane spodnje meje detekcije za CAP v zemlji in travi, izražene v mg/g suhega vzorca. Pri izračunih smo upoštevali mase analiziranih vzorcev, izkoristke ekstrakcij in vlažnost vzorcev.



*Slika 9: Umeritvena premica za določanje LOD*

**Tabela 7: Spodnja meja detekcije za CAP v zemlji in travi**

VZOREC	SPODNJA MEJA DETEKCIJE ( $\mu\text{g/g}$ )
Zemlja	0,016
Trava	0,270

#### 4.7 Analize vzorcev zemlje s HPLC

Analize vzorcev zemlje z metodo HPLC smo opravili po enakem postopku in z isto kolono (LUNA C18) kot pri ugotavljanju topila z boljšo ekstrakcijo. Po končanih kromatografskih ločbah smo zaradi nizkih koncentracij CAP integrirali kromatografske vrhove z ročnim načinom pri retencijskem času značilnem za CAP. Dobili smo rezultate, ki so predstavljeni v tabeli 8. V tej tabeli so predstavljeni tudi izračuni standardnih odklonov (SD) za posamezne vzorce (dve ponovitvi) in za vse vzorce odvzete ob istem vzorčenju.

**Tabela 8: Analize vzorcev zemlje s HPLC**

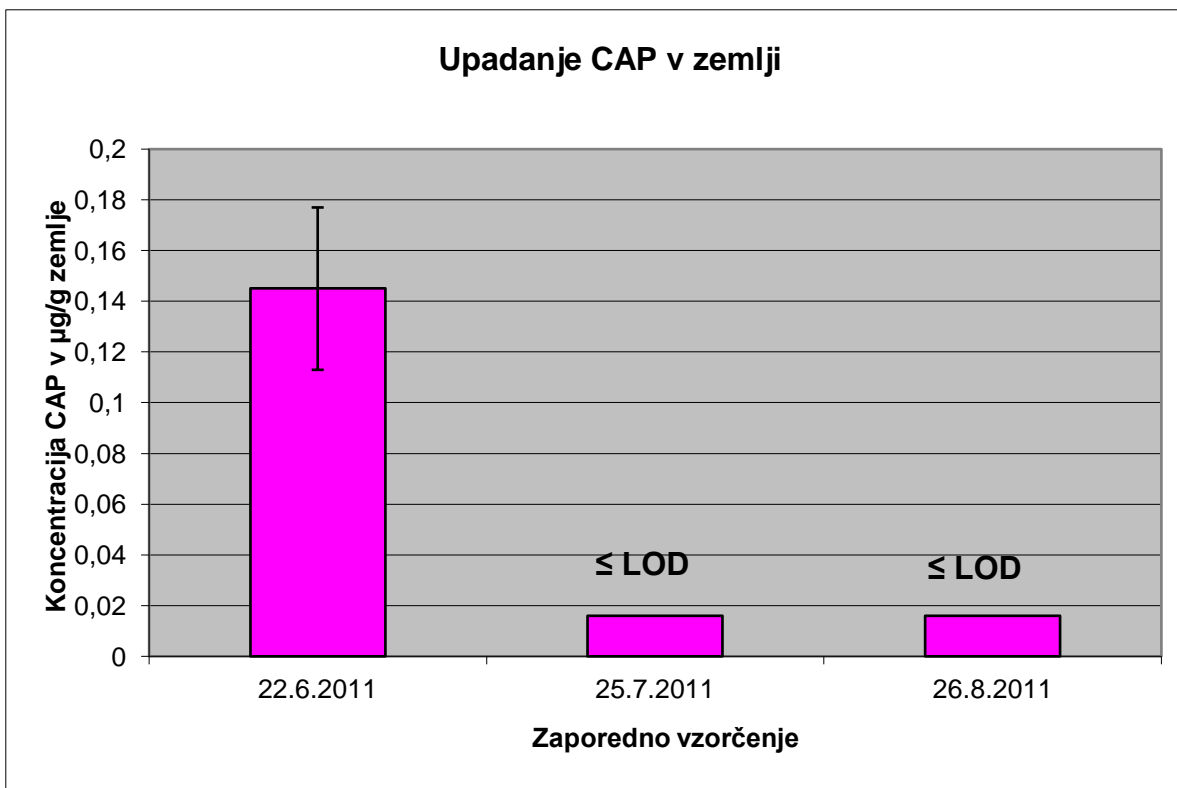
DATUM VZORČENJA	VZOREC	PRVA MERITEV (a.e.)	DRUGA MERITEV (a.e.)	POVPREČJE (a.e.)	SKUPNO POVPREČJE (a.e.)	S.D. (a.e.)
22.6.2011	1	102,774	105,725	104,25		
	2	140	141,475	140,738	117,537	20,163
	3	102,835	112,395	107,623		
27.7.2011	4	0				
	5	0		0	0	
	6	0				
	(4')	0				
	(5')	0		0	0	
	(6')	0				
4.12.2011	16	0		0	0	
	17	0				

Podatki za izračun in koncentracije CAP v vzorcih zemlje so zbrani v tabeli 9. Rezultati za CAP v zemlji so podani v  $\mu\text{g}$  CAP na g suhega vzorca. Pri tem smo upoštevali tudi % vlage v analiziranih vzorcih in delež ekstrakcije z acetonitrilom.

**Tabela 9: Koncentracije CAP/g zemlje**

VZORCI	ANALIZIRANA KOLIČINA (g)	MASA SUHEGA VZORCA (g)	POVRŠINA KROM. VRHA (a.e.)	conc. CAP v ekstraktu (µg/mL)	conc. CAP v zemlji (µg/g)	POVPREČNA conc. CAP (µg/g zemlje)	S.D. (µg/g)
1	100	84,2	104,25	1,38	0,130		
2	100	84,2	140,738	1,82	0,171	0,145	0,032
3	100	84,2	107,623	1,43	0,135		
4	100	79,2	0				
5	100	79,2	0			≤ 0,016	
6	100	79,2	0				
(4')	100	79,2	0				
(5')	100	79,2	0			≤ 0,016	
(6')	100	79,2	0				
16	100	68,6	0			≤ 0,016	
17	100	68,6	0			≤ 0,016	

Rezultati kažejo, da je ponovljivost meritev dobra, z odstopanjem posameznih ponovitev do največ  $\pm 8,5$  %. Standardni odklon med posameznimi odvzetimi vzorci pa je nekoliko večji in znaša  $\pm 17$  %. Največ k standardnemu odklonu prispeva slabša ponovljivost med posameznimi odvzetimi vzorci, ki je najverjetneje posledica neenakomerne nanosa CAP na površino tal. Rezultate razpadanja CAP smo podali na sliki 10. Na njej se lepo vidi, da že pri drugem vzorčenju s HPLC ne zaznamo več prisotnosti aktivne substance CAP v analiziranih vzorcih zemlje, oz. je ta pod pragom LOD. Na sliki so podani tudi standardni odkloni meritev pri vzorcih zemlje.



*Slika 10: Razpadanje CAP po časovnih obdobjih*

#### 4.8 Analize vzorcev trave s HPLC

Tudi pri analizah trave smo uporabili enak postopek, z isto kromatografsko kolono in integrirali kromatografski vrh pri iskanem retencijskem času z ročnim načinom. Rezultate si lahko ogledamo v tabeli 10, dejanske koncentracije CAP/g trave pa v tabeli 11.

**Tabela 10: Analize vzorcev trave s HPLC**

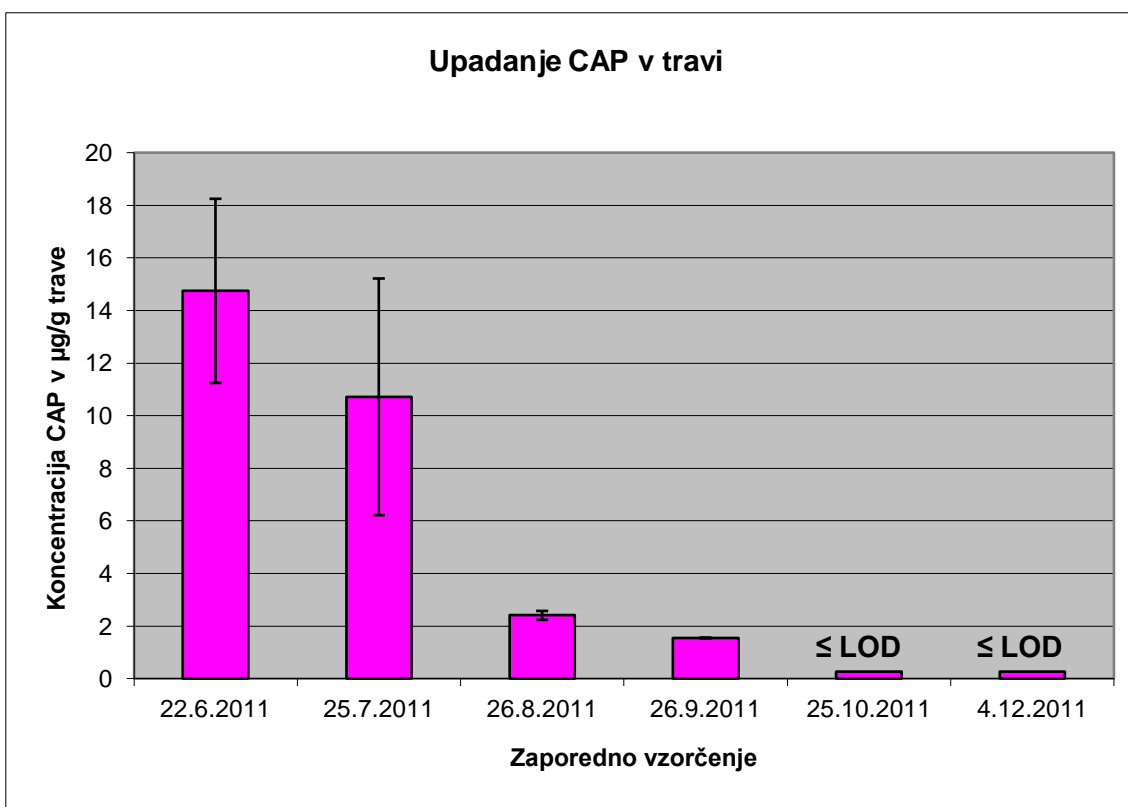
DATUM VZORČENJA	VZORCI	PRVA MERITEV (a.e.)	DRUGA MERITEV (a.e.)	POVPREČJE (a.e.)	POVPREČJE TREH (a.e.)	S.D. (a.e.)
22.6.2011	1	369,7	321,5	345,6		
	2	327,6	409,1	368,4	332,6	42,1
	3	299,9	267,9	283,9		
25.7.2011	4	312,1	280,7	269,4		
	5	439,7	324,7	382,2	266,7	116,9
	6	133,3	163,5	148,4		
26.8.2011	7	116,5	84,9	100,7		
	8	73,4	70,2	71,8	82,3	16
	9	73,3	75,4	74,4		
26.9.2011	10	46,1	55,9	51		
	11	46,3	42,7	44,5	45,7	8,1
	12	57,7	25,5	41,6		
25.10.2011	13	0				
	14	0		0	0	
	15	0				

**Tabela 11: Preračunavanje CAP/g trave**

VZORCI	ANALIZIRANA KOLIČINA (g)	Masa suhega vzorca (g)	POVRŠINA KROM. VRHA (a.e.)	conc. CAP po meritvi (µg/mL)	conc. CAP (µg/g trave)	POVPREČNA conc. CAP (µg/g trave)	S.D. (µg/g)
1	3	2,78	345,6	4,28	15,31		
2	3	2,78	368,4	4,55	16,28	14,8	3,5
3	3	2,78	283,9	3,54	12,66		
4	6	3,09	269,4	3,37	10,83		
5	6	3,09	382,2	4,72	15,18	10,7	4,5
6	6	3,09	148,4	1,91	6,15		
7	6	4,63	100,7	1,34	2,88		
8	6	4,63	71,8	0,996	2,14	2,41	0,17
9	6	4,63	74,4	1,03	2,21		
10	6	4,37	51	0,75	1,69		
11	6	4,37	44,5	0,67	1,52	1,55	0,0175
12	6	4,37	41,6	0,63	1,43		
13	6	5,35	0				
14	6	5,35	0			≤ 0,270	
15	6	5,35	0				

Podobno kot pri zemlji je ponovljivost meritev za posamezne vzorce večinoma znotraj  $\pm 15$  %, le za vzorec 12 je bila slabša s standardnim odklonom  $\pm 37$  %. Enako je primerljiva tudi

ponovljivostjo med vzorci in znaša  $\pm 12,6\%$  do  $\pm 19,5\%$ , razen pri enem vzorčenju (drugem), kjer smo ugotovili standardni odklon  $\pm 40\%$ . Predvidevamo, da največji delež k standardnemu odklonu prispeva neenakomeren nanos CAP na travo. Iz rezultatov lahko zaključimo, da CAP v vzorcih trave ostane veliko dlje kot pri vzorcih zemlje. Vidimo, da smo s HPLC zaznali CAP še pri četrtem zaporednem vzorčenju, to je štiri mesece po začetku poskusa. Za boljšo preglednost sprememb koncentracije CAP v travi smo rezultate podali tudi na sliki 11, kjer so predstavljeni tudi standardni odkloni pri meritvah vzorcev trave.



*Slika 11: Razpadanje CAP po časovnih obdobjih pri travi*

## 4.9 Vremenski parametri

Predvidevali smo, da ima na razpolovno dobo oz. razpad aktivne snovi CAP velik vpliv samo vreme, zato smo v eksperimentalnem obdobju natančno spremljali vremenske



parametre, ki si jih lahko ogledamo v spodnji tabeli 12. Vremenske parametre smo spremljali s pomočjo meteorološke postaje na Slapu v neposredni bližini zastavljenega poskusa.

***Slika 12: Vremenski parametri v obdobju poskusa***

OBDOBJE (dan)	ODVZETI VZORCI	KOLIČINA PADAVIN (mm/m <sup>2</sup> )	MIN. T (°C)	MAX. T (°C)	POVPR. T (°C)
dne 22.06.2011	1,2,3	0	12,8	30,3	22,1
22.06.2011- 25.07.2011	4,5,6 (4'),(5'),(6')	177,6	7,8	37,5	22,5
25.07.2011- 26.08.2011	7,8,9 (7'),(8'),(9')	71,4	12,5	38	23,4
26.08.2011- 26.09.2011	10,11,12 (10'),(11'),(12')	114	19,7	35,7	22,6
26.09.2011- 25.10.2011	13,14,15 (13'),(14'),(15')	233	1,8	30,9	13,7
25.10.2011- 04.12.2011	16,17	126	-5,5	22	9,3

## 5 DISKUSIJA

### 5.1 Zemlja

Naše meritve so pokazale, da se je koncentracija CAP v tleh znižala pod mejo detekcije že en mesec po nanašanju pripravka Coragen. To predstavlja več kot 90 % znižanje koncentracije CAP. Pri pregledu vremenskih parametrov smo ugotovili, da je v tem časovnem obdobju bilo 177,6 mm/m<sup>2</sup> padavin, kar bi lahko bil vzrok za izgubo CAP z izpiranjem. Pri vzorčenju smo odvzeli tudi globlji sloj zemlje (5-10 cm) in sloj naplavljenе zemlje v globljih kvadratih ter jih analizirali in prav tako nismo zaznali prisotnosti CAP. Možna razlaga je izpiranje CAP v še globlje sloje ali pa izpiranje po površini v okolico.

Po podatkih v literaturi lahko sklepamo, da se je najverjetneje nekaj CAP izgubilo s pomočjo foto razgradnje, večina CAP pa se je izprala. Le majhen delež je ostal na zemlji, ki pa je bil pod mejo detekcije in je tako nismo mogli zaznati s pomočjo kromatografa HPLC .

### 5.2 Trava

Pri travi lahko ugotovimo da je koncentracija CAP padla pod mejo detekcije šele po petem vzorčenju. Na sliki 11 se lepo vidi kako se je vsebnost CAP pri drugem vzorčenju znižala za cca. 28 %, najverjetneje zaradi foto razgradnje in zaradi padavin. Pri tretjem vzorčenju je padec CAP nekoliko večji (cca. 85 % od nanese količine). To naj bi bilo tudi posledica 71 mm/m<sup>2</sup> padavin, glavni delež pa lahko pripišemo foto razgradnji, saj je bila osončenost predvidoma veliko večja v tem časovnem obdobju. Pri četrtem vzorčenju lahko vidimo spet nekoliko manjši padec CAP, saj je bilo v tem obdobju veliko padavin (114 mm/m<sup>2</sup>) in posledično manj sonca. V vzorcih odvzetih pri petem vzorčenju pa je koncentracija CAP pod mejo detekcije.

Sklepamo lahko, da sta bila pri opravljeni raziskavi glavna dejavnika pri zmanjševanju koncentracije CAP foto razgradnja in v manjšem deležu izpiranje s padavinami, saj je iz grafov razvidno, da je bil padeč koncentracije CAP višji pri vzorcih iz obdobj z manj padavinami in večjo osončenostjo. To so obdobja med prvim in drugim vzorčenjem (med 22.06.2011-25.07.2011) ter obdobje med tretjim in četrtem vzorčenjem (med 26.08.2011-26.09.2011).

## 6 ZAKLJUČKI

Z zastavljenim poskusom in opravljenimi analizami smo prišli do zaključka, da CAP v vinogradu v danih pogojih relativno hitro razpade in se ne kopiči v vinogradu. Razpad oz. odstranjevanje CAP iz vinograda je bil hitrejši v tleh. Preko 90 % CAP se je odstranilo že v prvem mesecu po nanosu. Za CAP nanosen na travo je bil razpadni čas daljši (5 mesecev za > 98 % razpad), saj je aktivna snov CAP zaščitena pred zunanjimi vplivi zaradi prehoda v same rastline. Ocenjujemo, da je glavni razlog za znižanje koncentracije CAP v primeru zemlje predstavljalo izpiranje s padavinami. Kot glavni dejavnik pri rastlinah pa lahko predvidimo foto razgradnjo zaradi osončenosti listne površine. Za lažjo primerjavo in potrditev različnih navedb v literaturi bi morali za natančnejše podatke o razpadu CAP v naravnem okolju pogosteje vzorčiti in spremljati vremenske parametre. Med temi so predvsem pomembni podatki o osončenosti, ki pa za obdobje poskusa na meteorološki postaji na Slapu niso na razpolago. Vsekakor pa lahko sklepamo, da je Coragen dobra zaščita za vinsko trto, ki se dlje časa zadržuje v rastlini in jo tako ščiti pred napadom listnih zavijačev. Tudi glede triletnega prehodnega obdobja na ekološko pridelavo naj CAP po naših ugotovitvah ne bi bil sporen saj se do izteka tega obdobja popolnoma razgradi oz. odstrani iz vinograda.

## 7 VIRI

- Bavčar D. (2006). *Kletarjenje danes*. Ljubljana: Kmečki glas.
- Bavec F. in Bavec M. Organic production and use of alternative crops. (2007). *Taylor and Francis Group*. Pridobljeno 01.10.2011 s spletne strani: [www.crcnetbase.com/doi/pdfplus/10.1201/9781420017427.fmatt](http://www.crcnetbase.com/doi/pdfplus/10.1201/9781420017427.fmatt)
- Bentley S. K., Fletsher L. J., Woodward D. M. (2010). Chlorantraniliprole: An Insekticide of the Antranilic Diamide Class. *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*, str. 2231-2242
- Coragen® (2010). *Pinus*. Pridobljeno 20.11.2011 s spletne strani [www.pinus-tki.si](http://www.pinus-tki.si)
- Evaluation report: Chlorantraniliprol (2008). *Canada helth*. Pridobljeno 14.09.2011 s spletne strani [www.hc-sc.gc.ca/cps-spc/pubs/pest/\\_decisions/erc2008-03/index-eng.php](http://www.hc-sc.gc.ca/cps-spc/pubs/pest/_decisions/erc2008-03/index-eng.php)
- Gopal M., Mishra E. (2008). Analytical method of estimation of a new insecticide flubendiamide and its safety evaluation for usage in rice crop. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 81, str. 360-364.
- Kraggerud A., Abdellaue A., Lindberg V., Mehl A., Nesbakken S., Haraldsen T., Randall M., Spikkerud E. Evaluation of the plant protection product Coragen 20 SC – chlorantraniliprole (2010).. *Norwegian Scientific Committee on Food Safety*. Pridobljeno 18.10.2011 s spletne strani: [www.vkm.no/dav/1bddb1b125.pdf](http://www.vkm.no/dav/1bddb1b125.pdf)
- Lahm G.P., Cordova D., Barry D. J. (2009). New and selective ryanodine receptor activators for insect control. *Bioorganic and Medical Chemistry*, 17, str. 4127-4133.
- Lahm G.P., Selby T.P., Freudenberger J.H., Stevenson T.M., Myers B.J., Seburyamo G., Smith B.K., Flexner L., Clark C.E., Cordova B. (2005). Insecticidal antranilic diamides: A new class of potent ryanodine receptor activators. *Bioorganic and Medical Chemistry*, 15, str. 4898-4906.
- Mohapatra S., Ahuja A. K., Deepa M., Sharma D., Jagadish G. K., Rashmi N. (2010). Persistence and Dissipation of Flubendiamide and Des-iodo Flubendiamide in Cabbage (*Brassica oleracea* Linne) and Soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 85, str. 352–356.

- Pengjun Xu, Yue Ren, Zhiguang Zhou, Aimin Liu and Hongyan Zhang (2010). Determination of Chlorantraniliprole in Vegetables, Fruits and Grains by SPE Clean-Up and LC-UV. *Chromatographia*, 72, str. 763-766.
- Sattelle D. B., Cordova B., Cheek T. R. (2008). Insect ryanodine receptors: molecular targets for novel pest control chemicals. *Invertebrate Neuroscience*, 8(3), str. 107-19.
- Schwarz T., Snow T. A., Santee C. J., mulligan C. C., Class T., Wadsley M. P., Nanita S. C., (2011). Quechers multiresidue method validation and mass spectrometric assessment for the novel antranilic diamide insecticide chlorantraniliprole and ciantraniliprole, *J. Agricultural and Food Chemistry*, 59, str. 841-821.
- Tehnical bulletin. (2008). DuPont™ Coragen® insect control powered by RYNAXYPYR. Pridobljeno 25.09.2011 s spletne strani:  
[www2.dupont.com/Production\\_Agriculture/enUS/assets/downloads/pdfs/K-14833.pdf](http://www2.dupont.com/Production_Agriculture/enUS/assets/downloads/pdfs/K-14833.pdf)