

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Institutt for kjemi, bioteknologi og
matvitenskap

Masteroppgave 2014
60 stp

Nedbrytning av utvalgte pesticider i norsk jordsmonn

Mads Alexander Haneborg

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Bioforsk PlanteHelse i Ås og inngikk som del av mitt masterstudium i kjemi ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU).

Jeg ønsker å takke min hovedveileder professor Roland Kallenborn for hans hjelp og støtte under skrivingen av denne oppgaven. Jeg vil også takke min eksterne veileder ved Bioforsk, forsker Marit Almvik, for opplæring i laboratoriearbeidet og hjelp med beregningene som inngikk i oppgaven. Min tilleggsveileder ved NMBU var førsteamanuensis Dag Ekeberg.

Overingeniør Sven Roar Odenmarck ved Bioforsk PlanteHelse fortjener også takk for den vennlige hjelpen han har gitt meg med bruken av LC-MS/MS-instrumentet.

Ås, 15.12.2014

Mads Alexander Haneborg

Abstract

The purpose of this Master's Thesis have been to create models of the degradation of selected pesticides tested on two Norwegian field sites in Stjørdal and Klepp with different climatic conditions and soil composition. Soil samples was taken at both field sites over a time period of one year after spraying, in the period from May 2012 to June 2013.

The soil samples were analysed by using LC-MS/MS after sample preparation with liquid extraction. Internal standard method was used for quantification of every pesticide. The concentration of pesticide in soil was calculated for every sampling date, and used to make a data series showing the degradation of pesticide over the time period.

A computer program was used to create mathematical models of degradation kinetics. Four different kinetic models (SFO, FOMC, DFOP and HS) were tested on the data series of each pesticide. One preferred kinetic model was chosen for each pesticide by comparing statistical agreement with the original data series. Values for DT50 and DT90 were calculated by using the chosen kinetic model for each pesticide.

There was not found a clear link between the considerable higher level of total organic carbon (TOC) in the soil at Klepp and faster degradation of all the pesticides. Higher levels of TOC can cause more rapid microbial degradation of pesticides. For fenpropimorph and propiconazol the values of DT50 was much lower in Klepp than in Stjørdal. For trifloxystrobin, the value of DT50 was much lower in Stjørdal than in Klepp. The difference in DT50 for the other pesticides was small.

The kinetic values DT50 and DT90 were compared with values from a similar degradation experiment conducted on the field sites Stjørdal and Klepp in the time period 2011-2012, and with intervals of values from the Pesticide Properties DataBase (PPDB). For all pesticides except boscalid the values of DT50 found in this Master's Thesis was inside the interval of values from PPDB or close to this interval. The results of the analyses indicate that the accuracy of future field studies may be improved by taking more soil samples at each sampling time.

Sammendrag

Denne masteroppgaven har hatt som formål å modellere nedbrytningen av et utvalg sprøytemidler som ble testet på to norske forsøksfelt, i Stjørdal og Klepp med ulike klimatiske forhold og jordsmonn. For begge forsøksfelt ble det foretatt uttak av jordprøver over en periode på ett år fra sprøytingen, i tidsrommet fra mai 2012 til juni 2013.

Jordprøvene ble analysert ved bruk av LC-MS/MS etter prøveopparbeiding med væskeekstraksjon. Intern standard metode ble benyttet til kvantifisering av hvert pesticid. Konsentrasjonen av pesticid i jordsmonnet for hver uttaksdato ble beregnet, og benyttet til å lage en dataserie over nedbrytningen i tidsperioden.

Matematisk modellering av nedbrytningskinetikk med software-verktøy ble utført. Ved denne modelleringen ble dataserien for hvert pesticid testet fire ulike kinetiske modeller (SFO, FOMC, DFOP, HS). En foretrukket kinetisk modell ble valgt for hvert pesticid ut fra statistiske beregninger for overensstemmelse med den opprinnelige dataserien. Verdier for DT50 og DT90 ble beregnet ut fra de valgte kinetiske modeller for hvert pesticid.

Det ble ikke funnet noen klar sammenheng mellom det vesentlig høyere innhold av totalt organisk karbon (TOC) i jordsmonnet på Klepp og raskere nedbrytning av pesticider. Et høyere nivå av TOC kan medføre raskere mikrobiell nedbrytning av pesticider. For fenpropimorf og propikonazol var DT50-verdiene vesentlig lavere i Klepp enn i Stjørdal. For trifloksystrobin var DT50 mye lavere i Stjørdal enn i Klepp. For de øvrige pesticidene var forskjellen i DT50 liten.

De kinetiske verdiene DT50 og DT90 ble sammenlignet med foreløpige data fra et tilsvarende nedbrytningsforsøk gjennomført på forsøksfeltene Stjørdal og Klepp i perioden 2011-2012, og med et intervall av verdier hentet fra Pesticide Properties DataBase (PPDB). For alle pesticider unntatt boskalid var verdiene for DT50 funnet i denne masteroppgaven innenfor intervallet av verdier hentet fra PPDB eller i nærheten av dette intervallet. Resultatene av analysene tyder på at nøyaktigheten av videre feltforsøk kan forbedres ved å ta flere jordprøver ved hver uttaksdato.

Innholdsfortegnelse

Forord.....	1
Abstract	2
Sammendrag	3
Forkortelser	1
Nomenklatur	2
1 Innledning.....	4
2 Teori.....	5
2.1 Plantevernmidler.....	5
2.1.1 Generelt om plantevernmidler.....	5
2.1.2 Om plantevernmidlene benyttet i nedbrytingsforsøket	7
2.1.3 Nedbrytning av plantevernmidler i jord.....	10
2.1.4 Modeller for nedbrytning.....	12
2.2 Forsøksfeltene på Stjørdal og Klepp.....	17
2.3 Prøveopparbeiding	23
2.4 LC-MS/MS.....	24
2.4.1 Væskekromatografi (HPLC)	24
2.4.2 Massespektrometri	26
2.4.3 Ionekilder i massespektrometri.....	28
2.4.4 Tandem massespektrometri (MS/MS)	30
2.4.5 Identifisering av forbindelser med MS/MS	32
2.5 Kvantifisering av analytter.....	34
2.6 Kvalitetssikring	36
3 Material og metode.....	38
3.1 Materialer.....	38
3.1.1 Kjemikalier	38
3.1.2 Laboratorieutstyr og LC-MS/MS-instrument.....	41
3.2 Metode	43
3.2.1 Spraying av forsøksfelt og uttak av jordprøver	43
3.2.2 Opparbeiding av jordprøver	46
3.2.3 Tillaging av kalibreringsstandarder	48
3.2.4 Analyse med LC-MS/MS	49
4 Resultater	52
4.1 Kjemisk analyse	52

4.1.1 Identifisering og integrering av topper	52
4.1.2 Kalibreringskurver	54
4.1.3 Estimering av LOD og LOQ.....	56
4.1.4 Kontrollprøver	57
4.1.5 Plantevernmiddekkonsentrasjoner i jordsmonnet	58
4.1.6 Transformasjonsprodukter.....	62
4.2 Modellering av nedbrytningskinetikk.....	65
5 Diskusjon	73
5.1 Kvalitetskontroll	73
5.2 Jordkonsentrasjoner av pesticider	73
5.3 Om modellering av nedbrytningskinetikk	74
5.4 De foretrukne kinetiske modeller	76
5.5 Transformasjonsprodukter.....	78
5.6 Sammenligning av modelldata	79
6 Konklusjon	82
7 Litteraturliste.....	83
8 Appendiks	85
APPENDIKS 1 – Data for LC-MS/MS-analyse	
APPENDIKS 2 - Kalibreringskurver	

Forkortelser

CAS-nummer	nummerkode for databasen Chemical Abstracts Service (CAS), laget av American Chemical Society.
CID	Collision-Induced Dissociation [10]
DFOP	Double-First-Order in Parallell model (også betegnet bi-eksponentiell modell) [1]
DT50	halveringstiden for nedbrytningen av et stoff, tiden det tar før 50 % av stoffet er nedbrutt i forhold til startkonsentrasjonen [1]
DT90	ved nedbrytningen av et stoff er DT90 tiden det tar før 90 % er nedbrutt, det vil si at 10 % av startkonsentrasjonen er igjen [1]
ESI	elektrosprayionisering [10]
FOMC	First-Order Multi-Compartment model (også betegnet Gustafson og Holden-modellen) [1]
HS	Hockey-stick model (Hockeykølle-modellen) [1]
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry. Fastsetter reglene for navnsetting av kjemiske forbindelser.
k	ratekonstant i ligningen for en kinetisk modell av kjemisk nedbrytning [1]
K _{oc}	Fordelingskoeffisient karbon-vann i jord. Soil Organic Carbon-Water Partitioning Coefficient. [4]
LOD	deteksjonsgrense (Limit of Detection) [2]
LOQ	kvantifikasjonsgrense (Limit of Quantification) [2]
M	konsentrasjon av forbindelse i en kinetisk modell [1]
M ₀	startkonsentrasjon av en forbindelse i en kinetisk modell [1]
MS/MS	Tandem massespektrometri med 2 trinn av masseanalyse [5]
PPDB	Pesticide Properties DataBase, en database over fysiske, kjemiske og økotoksikologiske data for pesticider (tilhører Universitetet i Hertfordshire) [13]
RSS	Residual Sum of Squares [1]
S/N	signal-støy-forhold (Signal-to-noise) [2]
SFO	Single First-Order kinetics (Første ordens kinetikk) [1]
SRM	Selected Reaction Monitoring [5]
α	parameter i FOMC-modellen [1]
β	parameter i FOMC-modellen [1]
χ^2 avvik	chi-kvadrat-avvik [1]

Nomenklatur

bi-fasisk kinetikk	en nedbrytningsprosess som foregår i to faser med ulik nedbrytningsrate [1]
bioakkumulasjon	innebærer at en miljøgift tas opp i en organisme, enten direkte som følge av eksponering til et forurenset medium, eller som følge av at den spiser mat som inneholder miljøgiften [8]
biokonsentrasjon	betyr at et stoff akkumuleres i en organisme gjennom direkte opptak fra mediet organismen er eksponert for [8]
biomagnifikasjon	innebærer at konsentrasjonen av en miljøgift i vevet til organismer øker fra et trofisk nivå til det neste i næringskjeden [8]
chi-kvadrat-error (χ^2)	en statistisk verdi for avviket mellom observert og beregnet verdi i forhold til målingenes usikkerhet [1]
Collision-Induced Dissociation (CID)	teknikk ved massespektrometri der ioner treffer molekyler av en inert gass og fragmenterer [10]
cone voltage	spenningen mellom kapillærrøret og skimmer cone ved elektroprayionisering, bestemmer graden av fragmentering [10]
deteksjonsgrense (LOD)	den laveste mengde av en analytt som kan detekteres, men ikke nødvendigvis kvantifisert som en nøyaktig verdi [2]
elektropray-ionisering	ionekilde i massespektrometri som fungerer ved at et elektrisk felt ioniserer dråpene som dannes ved nebulisering av væsken fra den kromatografiske kolonnen [10]
fordelingskoeffisient karbon-vann i jord (K_{oc})	Soil Organic Carbon-Water Partitioning Coefficient (K_{oc}). Forholdet mellom mengden av et kjemikalie som adsorberes per masseenhet av organisk karbon i jorden og konsentrasjonen av kjemikaliet i løsningen ved likevekt. K_{oc} er et mål på adsorpsjonen av kjemikaliet i jordsmonn [4]
fotodegradering	nedbrytning av en kjemisk forbindelse som følge av eksponering for lys [9]
fragmention	ion dannet ved fragmentering av et prekursor-ion.[5]
fungicider	fungicider [7]
gradient-eluering	kromatografisk eluering der løsemiddelstyrken økes under analysen [3]
herbicider	ugressmidler [7]
insekticider	insekticider [7]
ioneratio	forholdet mellom kvantifiseringsion (quantifier) og sekundært ion (qualifier) [11]
isokratisk eluering	kromatografisk eluering der løsemiddelkomposisjonen er den samme under hele analysen [3]
kinetisk modell	en matematisk modell for reaksjonsraten i en kjemisk reaksjon som beskriver konsentrasjonsendringen for en forbindelse som inngår i reaksjonen [1]
kollisjonsenergi	den kinetiske energien i ionenes kollisjoner med gassmolekyler ved Collision-Induced Dissociation (CID) [5]
kvadrupol	massespektrometer som separerer ioner ved å passere dem gjennom fire metalliske sylindere med et oscillerende elektrisk felt, der kun ioner med et bestemt m/z-forhold kan passere [12]
kvantifikasjonsgrense (LOQ)	den laveste mengde av en analytt som kan kvantifiseres som en nøyaktig verdi [2]
kvantifiseringsion	ion brukt til kvantifisering av en analytt (quantifier) [11]
molluskicider	sneglemidler [7]
nebulisering	omdannelsen av en væske til en spray av svært små dråper [10]
normal-fase	kromatografisk teknikk der stasjonærfasen er polar og mobilfasen upolar [15]

omvendt fase	kromatografisk teknikk der stasjonærfasen er upolar og mobilfasen polar [15]
prekursor-ion	ethvert ion som fragmenterer eller endrer ladning i massespektrometri Betegnes også forelder-ion (parent-ion) [5]
produksjon	ion som dannes når et prekursor-ion fragmenteres eller endrer ladning i massespektrometri. Betegnes også datterion (Daughter ion). Et produkt som er et fragment av prekursor-ionet kan også betegnes fragmention. [5]
radikalion	en kjemisk species som har et uparet elektron (er en fri radikal) og bærer en ladning [16]
relativ mengde (relative abundance)	i et massespekter beregnes den relative mengden for en topp som prosentandel av den største toppen (base peak) [17]
Residual Sum of Squares (RSS)	summen av kvadrerte avvik mellom observert og beregnet verdi for en kinetisk modell [1]
responsfaktor	en detektors relative respons til analytt og intern standard, uttrykt i ligning 7 [6]
sekundært ion	ion brukt til identifisering av en analytt (qualifier) [11]
Selected reaction monitoring	teknikk ved MS/MS der en bestemt fragmenteringsreaksjon velges ut. Første MS velger ut et prekursor-ion som fragmenteres, og den andre MS velger ut et bestemt produkt-ion ut fra fragmentene som dannes. [5]
signal-støy-forhold (S/N)	forholdet mellom signalet til en topp og støyen ved grunnlinjen [2]
skimmer cone	den kjegleformede motelektroden til kapillærrøret i elektropray-ionisering [10]
SRM-overgang	m/z-forholdene for det selekterte prekursor-ionet og det selekterte produktet ved Selected reaction monitoring (SRM) [5]
t-test	test av hvorvidt en parameter i en kinetisk modell er signifikant forskjellig fra null ved det valgte signifikansnivået. Dersom den ikke er det, er parameteren svært usikker [1]
væskekstraksjon	ekstraksjon av en analytt fra en fast fase til en væskefase [14]

1 Innledning

Avlinger er utsatt for mange former for skadedyr og ugress, noe svekker produksjonen innen landbruket. Skadedyr kan også overføre smittsomme sykdommer til husdyr og mennesker. For å bekjempe ugress og skadedyr brukes kjemiske plantevernmidler (pesticider). Siden 1940-tallet har det blitt utviklet mange syntetiske organiske pesticider som er svært effektive, og bruken av disse i landbruket har økt svært sterkt. Dette har hatt den store fordel at matproduksjonen har økt, men samtidig har den overdrevne bruken av plantevernmidler medført betydelig forurensning av miljøet i mange land [18,7].

Et plantevernmiddels påvirkning på miljøet vil avhenge av stoffets giftighet, nedbrytningshastighet og muligheten for at det kan inntreffe bioakkumulasjon (økning av konsentrasjon over tid) av stoffet i levende organismer. Bruken av plantevernmidler er i Norge regulert av Mattilsynet [18,7].

Formålet med denne masteroppgaven er å studere nedbrytningen av et utvalg på 7 plantevernmidler i to norske forsøksfelt (Stjørdal og Klepp). De utvalgte stoffene omfatter flere soppmidler, ett insektmiddel og ett ugressmiddel. Begge forsøksfelt ble sprayet med plantevernmidlene i mai 2012, og det ble gjennomført uttak av jordprøver over en forsøksperiode i ett år, fram til mai 2013.

Ved prøveopparbeidingen av jordprøvene brukes væskeekstraksjon og filtrering. Analysen utføres med LC-MS/MS. Intern standard metode benyttes til kvantifisering, og kontrollprøver brukes til å validere metoden. Datamaterialet fra jordprøvene brukes til å modellere nedbrytningen av plantevernmidlene ved bruk av ModelMaker-software. Statistiske verktøy brukes til å finne den mest riktige nedbrytningsmodellen for hvert enkelt stoff. De beregnede verdier for halveringstiden (DT50) og tiden for 90 % reduksjon av stoffmengde (DT90) sammenlignes med verdier funnet ved tidligere forsøk utført av Bioforsk.

2 Teori

2.1 Plantevernmidler

2.1.1 Generelt om plantevernmidler

Innen landbruket er ulike nytteplanter utsatt for mange ulike typer skadedyr, blant annet insekter, sopp, snegler, midd, nematoder og ulike gnagerarter. I tillegg må nytteplantene konkurrere om næringen i jorden med ulike former for ugress, noe som også svekker produktiviteten i landbruket. Det har blitt utviklet svært effektive kjemiske plantevernmidler siden slutten av den andre verdenskrig, og bruken av disse har blitt svært omfattende innen landbruket i store deler av verden. Dette har medført en svært stor økning i landbrukets evne til å produsere billig mat til en stadig økende verdensbefolkning. I tillegg har den økte effektiviteten innen landbruket som følge av bruken av plantevernmidler medført at det har vært mulig å bevare verdifulle naturområder som ellers ville måtte brukes til jordbruk [7,19].

Alle plantevernmidler er giftige, og bruken av dem kan skade andre organismer enn skadedyret eller ugresset de er rettet mot. Bruken av plantevernmidler kan medføre forurensning av jord og vann, og rester kan ende opp i mat og andre jordbruksprodukter. Av disse grunnene er bruken av plantevernmidler regulert av myndighetene, i Norge reguleres de av Mattilsynet. For at et plantevernmiddel skal bli godkjent til bruk i landbruket må mange sider ved stoffet og dets miljøpåvirkning undersøkes. Dette omfatter biologisk effektivitet i bekjempelsen av skadedyret eller ugresset, middelets akutte og kroniske giftighet, nedbrytningshastigheten, muligheten for bioakkumulasjon i levende organismer og giftigheten for nytteinsekter som for eksempel bier og andre organismer i miljøet [7].

Plantevernmidler er miljøfremmede stoffer, noe som betyr at det er et syntetisk stoff som ikke hører hjemme i naturen. At et miljøfremmed stoff er persistent i miljøet innebærer at det brytes svært sakte ned. Dette medfører en mulighet for biokonsentrasjon, noe som betyr at stoffets akkumulerer i en organisme på grunn av direkte opptak fra mediet det er eksponert for[8,20]. Et beslektet begrep er bioakkumulasjon, som omfatter akkumulasjonen av et stoff i en organisme både gjennom direkte opptak fra miljøet rundt (biokonsentrasjon) og ved at organismen spiser mat som inneholder stoffet. Denne prosessen kan medføre biomagnifikasjon, noe som innebærer at konsentrasjonen av stoffet i organismenes vev øker fra et trofisk nivå til det neste oppover i næringskjeden[8]. Da kan konsentrasjonene i dyrene på toppen av næringskjeden bli så høye at det får svært skadelige konsekvenser. Eksempler på slike persistente plantevernmidler som forårsaker biomagnifikasjon og skadelige virkninger i naturen er DDT, dieldrin og alkylkvikksølv. Disse er i dag forbudt i Norge og

mange andre land. På grunn av denne forurensningsfaren benyttes det i dag mest plantevernmidler som nedbrytes hurtig [7]. I tillegg drives det forskning for å finne gode alternativer til bruk av plantevernmidler til bekjempelse av skadedyr, som biologisk bekjempelse og integrert bekjempelse. Biologisk bekjempelse innebærer å bruke levende organismer for å bekjempe skadedyr. Disse organismene kan være insekter, midd, virus, bakterier eller sopp som er naturlige fiender av skadedyret man ønsker å bekjempe. Betegnelsen integrert bekjempelse innebærer en form for plantevern der alle metoder for bekjempelse av skadedyr kan benyttes utifra en forståelse av skadedyrets økologi. I et slikt plantevern inngår bruk av skadedyrets naturlige fiender, signalstoffer (feromoner) som påvirker skadedyrets adferd samt vekstskifte og andre tiltak for å øke plantenes motstandsdyktighet. Ved integrert bekjempelse brukes kjemiske plantevernmidler kun som siste utvei [21,22].

Kjemiske plantevernmidler deles opp i ulike grupper ut fra hvilken type skadelig organisme de bekjemper. De ulike typene kalles ugressmidler (herbicider), insektmidler (insekticider), soppmidler (fungicider), sneglemidler (molluskicider), middmidler (akaricider), nematodemidler (nematicider) og gnagermidler (rodenticider) [7].

2.1.2 Om plantevernmidlene benyttet i nedbrytingsforsøket

På forsøksfeltene i Klepp og Stjørdal ble det sprayet med 5 sprøytemiddelpreparater, som til sammen inneholdt 7 plantevernmidler. En oversikt over sprøytemiddelpreparatene, deres innhold av plantevernmidler, bruksområde og hvilke plantekulturer de benyttes på er vist i tabell 1.

En oversikt over klassifisering, fysiske og kjemiske egenskaper og nedbrytningsdata hentet fra Pesticide Properties DataBase [13] for de 7 plantevernmidlene er vist i tabell 2. Molekylstrukturen til hver av forbindelsene er vist i tabell 3. IUPAC-navn for hvert plantevernmiddel og opplysninger om produsenten av plantevernmidlene benyttet til laboratorieanalysen er vist i tabell 6.

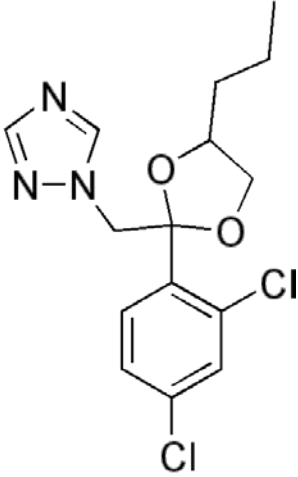
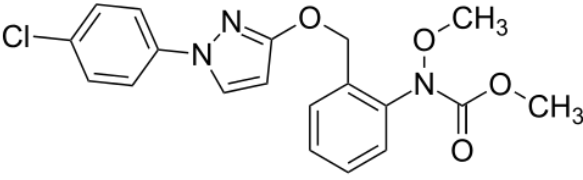
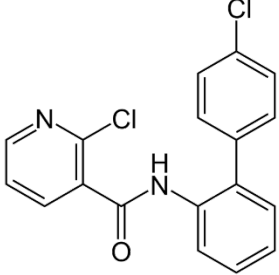
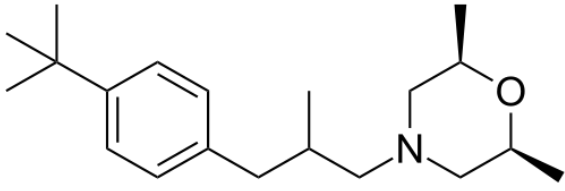
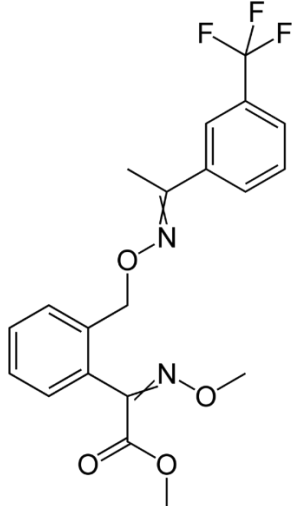
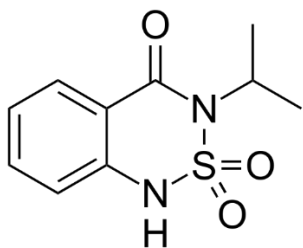
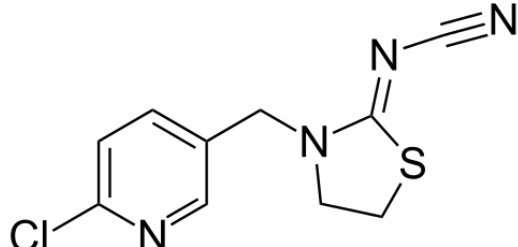
Tabell 1. En oversikt over de 5 sprøytemiddelpreparatene som ble benyttet under feltforsøkene, og deres innhold av plantevernmidler og bruksområde [23].

Sprøytemiddel-preparat	Type	Plantevernmidler	Brukes på følgende plantekulturer:
Signum	Soppmiddel	Boskalid	Kirsebær, bærbusker, jordbær, kepaløk, sjalottløk, salat, ruccola, plomme, blomkål, brokkoli, hodekål, kålrot, nepe, vårløk, gulrot, rotpersille, pastinakk, kruspersille, ert, rosenkål, bønne
		Pyraklostrobin	
calypso sc 480	Insektmiddel	Tiakloprid	Kjernefrukt, steinfrukt, bær, hodekål, rosenkål, blomkål, brokkoli, kinakål, grønnkål, salat
Stratego EC 250	Soppmiddel	Trifloksystrobin	Bygg, havre, høst- og vårhvete, rug, rughvete, gras i grøntanlegg
		Propikonazol	
Forbel 750	Soppmiddel	Fenpropimorf	Korn
Basagran SG	Ugressmiddel	Bentazon	Ert, bønne, frøeng av rødkløver og timotei

Tabell 2. En oversikt over plantevernmidlenes klassifisering, fysiske og kjemiske egenskaper og data fra feltforsøk hentet fra Pesticide Properties DataBase[13].

Norsk navn	Pesticid-type	Stoffgruppe	Kjemisk formel	Molekyl-masse (g/mol)	Løselighet i vann ved 20 °C (mg/L)	Fordelingskoeffisient karbon-vann i jord K_{oc} (mg/L)	DT50 i feltforsøk PPDB (dager)	DT90 i feltforsøk PPDB (dager)
Tiakloprid	Insekticid, molluskicid	Neonicotinoid	$C_{10}H_9ClN_4S$	252,72	184	393-870	9-27	31-91
Propikonazol	Fungicid	Triazol	$C_{15}H_{17}Cl_2N_3O_2$	342,22	150	382-1789	17-411	192-2099
Pyraklostrobin	Fungicid	Strobilurin	$C_{19}H_{18}ClN_3O_4$	387,8	1,9	6000-16000	8-55	83-230
Bentazon	Herbicid	Benzothiazinon	$C_{10}H_{12}N_2O_3S$	240,3	570	13-176	4-21	-
Boskalid	Fungicid	Carboxamid	$C_{18}H_{12}Cl_2N_2O$	343,21	4,6	507-1110	28-208	365
Fenpropimorf	Fungicid	Morpholin	$C_{20}H_{33}NO$	303,48	4,32	2772-5943	8,8-50,6	-
Trifloksystrobin	Fungicid	Strobilurin	$C_{20}H_{19}F_3N_2O_4$	408,37	0,61	1642-3745	2-12	15-41

Tabell 3. Bruksområde og molekylstruktur for de 7 plantevernmidlene benyttet til nedbrytningsforsøket.

Soppmidler (fungicider)		
<p>Propikonazol</p> 	<p>Pyraklostrobin</p> 	<p>Boskalid</p> 
<p>Fenpropimorf</p> 	<p>Trifloksystrobin</p> 	
<p>Ugressmiddel (herbicid)</p>	<p>Insektmiddel (insekticid)</p>	
<p>Bentazon</p> 	<p>Tiakloprid</p> 	

Samtlige molekylstrukturer er hentet fra Wikipedia Commons, og er i public domain [24].

2.1.3 Nedbrytning av plantevernmidler i jord

Når et plantevernmiddel er sprayet på en åker, vil stoffet gradvis brytes ned over tid som følge av mikrobiell nedbrytning, kjemiske reaksjoner og fotodegradering. Ved nedbrytningen dannes det ulike transformasjonsprodukter. Nedbrytningshastigheten avhenger av pesticidets kjemiske egenskaper og miljøforholdene på stedet, blant annet jordtype, pH og temperatur [9].

Mikrobiell nedbrytning skyldes mikroorganismer som sopp og bakterier, og vil øke dersom disse har gode vekstbetingelser i jorden. Denne type nedbrytning vil derfor øke dersom jordsmonnet har høy temperatur, gunstig pH, tilstrekkelig fuktighet, oksygeninnhold og næringsinnhold [9].

Kjemiske reaksjoner vil også bryte ned plantevernmidler i jordsmonnet. Hvilke kjemiske reaksjoner som inntreffer og hastigheten av disse avhenger av hvor sterkt plantevernmiddelet er bundet til jorden, og av jordtype, temperatur og pH [9].

Fotodegradering innebærer at plantevernmiddelet brytes ned som følge av det blir eksponert for sollys. Det er først og fremst den ultrafiolette strålingen i sollyset som er årsaken til dette, og alle plantevernmidler er utsatt for fotodegradering i større eller mindre grad. Plantevernmidler som sprayes på overflaten av planter er mye mer utsatt for fotodegradering enn plantevernmidler som inngår i jordsmonnet, og dermed skjermes for sollys. Nedbrytningshastigheten som følge av fotodegradering vil avhenge av plantevernmiddelets kjemiske egenskaper og sollysets styrke og spektrum. I tillegg vil nedbrytningshastigheten avhenge av hvor lenge plantevernmidlet blir eksponert for sollyset, siden dagslysets lengde avhenger av geografisk plassering [9].

I tillegg til disse nedbrytningsprosessene kan jordens innhold av plantevernmidler reduseres over tid som følge av utlekking. Ved utlekking blir plantevernmiddelet ført bort fra jordsmonnet av flytende vann fra nedbør og vanning. Dette er et betydelig forurensningsproblem siden det kan føre til at plantevernmidler ender opp i grunnvannet, og i bekker, elver og innsjøer hvor de kan skade organismene som lever der. Under normale betingelser vil under 1 % av sprøytede plantevernmidler fjernes ved utlekking, men ved spesielle omstendigheter kan opptil 5 % utlekkes [25].

Utlekkingen av et plantevernmiddel avhenger av stoffets binding til jorden, og jordtypens struktur og innhold av partikler og organiske stoffer. Nedbørsmengden i området har stor betydning for omfanget av utlekking, og drenering og jordbearbeiding har også betydning [25]. Fordelingskoeffisienten for karbon-vann i jord (K_{oc}) er et mål på hvor sterkt et stoff adsorberes til jordsmonnet[4]. Stoffets løselighet i vann vil også ha betydning for graden av utlekking. For pesticidene benyttet i dette nedbrytningsforsøket er K_{oc} og løseligheten i vann vist i tabell 2.

På grunn av forurensningsfaren krever myndigheter i Europa, USA og mange andre land at omfanget av utlekking av et plantevernmiddel og dets transformasjonsprodukter blir undersøkt før det kan godkjennes for bruk i landbruket [25].

Både nedbrytning og utlekking av plantevernmidler vil derfor være avhengig av klimaforhold. Norge ligger langt mot nord og har derfor kalde temperaturer, frysing og tining av jord, snø om vinteren og store nedbørsmengder om våren og om høsten. Disse spesielle miljøfaktorene gjør at nedbrytning og utlekking av plantevernmidler vil være annerledes i Norge enn lenger sør i Europa. Faren for utlekking av plantevernmidler er større i Norge enn lenger sør i Europa [26].

2.1.4 Modeller for nedbrytning

De kjemiske reaksjonene og mikrobielle nedbrytningsprosessene som bryter ned et plantevernmiddel vil avhenge både av stoffets kjemiske egenskaper, og av mange miljøfaktorer som klima, jordtype, fuktighet og pH. Det er nødvendig med feltforsøk for å undersøke nedbrytningshastigheten under ulike omstendigheter [9].

Jordsmonnets konsentrasjon av plantevernmiddelet vil synke gradvis etter sprøyting, og analyse av jordprøver tatt med jevne mellomrom kan brukes til å finne en best mulig kinetisk modell for nedbrytningen. En kinetisk modell er en matematisk modell som gir en beskrivelse av det eksperimentelle datamaterialet [1].

De viktigste verdiene ved en kinetisk modell for plantevernmidler er DT50 og DT90. DT50 er tiden det tar før startkonsentrasjonen av stoffet er halvert. DT90 er tiden det tar før startkonsentrasjonen er redusert med 90 %, det vil si at kun 10 % av startkonsentrasjonen er igjen i jorden. Disse verdiene har stor betydning for vurderingen av plantevernmiddelets persistens i jordsmonnet og muligheten for negativ miljøpåvirkning på lengre sikt [1].

Det finnes et stort antall ulike kinetiske modeller for å beskrive plantevernmiddelnedbrytning. I denne masteroppgaven er nedbrytningsdata for hvert plantevernmiddel testet med 4 kinetiske modeller som er anbefalt i FOCUS-rapporten[12] for bruk i EUs godkjenningssprosess for plantevernmidler. De fire modellene er første ordens kinetikk (SFO), Gustafson og Holden-modellen (FOMC), bi-eksponentiell modell (DFOP) og hockey-køllemodellen (HS). SFO-modellen innebærer en jevn eksponentiell nedbrytning av plantevernmiddelet i jorden, og er en foretrukket modell som beskriver nedbrytningsprosessen for mange plantevernmidler. De tre andre modellene (FOMC, DFOP og HS) er bi-fasiske modeller. Bi-fasisk kinetikk beskriver en prosess der nedbrytningen av plantevernmiddelet skjer raskt i den første perioden etter sprøytingen, men deretter går mye saktere. Årsaken til at nedbrytningsprosessen skjer på denne måten kan være mange forhold [1].

Første ordens kinetikk (Single first-order kinetics, SFO)

Første ordens kinetikk (Single first-order kinetics, forkortet SFO) er en eksponentiell ligning som vist i ligning 1.

$$M = M_0 e^{-kt} \quad (1)$$

der:

M : total mengde av stoff ved tiden t

M_0 : total mengde av stoff ved tiden $t = 0$

k : ratekonstanten

t : tid

I SFO-modellen er endringshastigheten i konsentrasjonen av plantevernmiddelet proporsjonal med konsentrasjonen av stoffet i jordsmonnet. Denne modellen passer godt dersom antallet plantevernmolekyler er lite i forhold til antallet mikroorganismer som bryter dem ned, eller antallet vannmolekyler i jorden dersom den kjemiske nedbrytningen skjer gjennom hydrolyse. SFO-modellen brukes ofte til å beskrive nedbrytningsprosessen for plantevernmidler [1].

En viktig egenskap ved SFO-modellen er at tiden det tar for at konsentrasjonen av stoffet skal reduseres med en bestemt prosentandel er den samme for hele nedbrytningsprosessen, og er uavhengig av startkonsentrasjonen. Av denne grunnen vil DT50 og DT90 for et stoff være enkelt å finne med denne modellen, noe som gjør at den er foretrukket å bruke. Startkonsentrasjonen M og ratekonstanten k bestemmes ved matematisk optimalisering ut fra datamaterialet for nedbrytningsprosessen[1].

Gustafson og Holden-modellen (First-Order Multi-Compartment model, FOMC)

FOMC-modellen er en bi-fasisk modell opprinnelig lansert av Gustafson og Holden (1990), og siden endret. Den er basert på at jordsmonnet har en heterogen sammensetning, slik at nedbrytningen vil skje i ulik hastighet i ulike områder av jorden. I modellen beskrives dette ved å inndelegge jorden i et stort antall deler der hver del har ulik verdi for konstanten i en første ordens nedbrytningsprosess. Ligningen for FOMC-modellen er vist som ligning 2. Ved matematisk optimalisering ut fra nedbrytningsdata bestemmes startkonsentrasjonen M og de to parametrene α og β [1].

$$M = \frac{M_0}{\left(\frac{t}{\beta} + 1\right)^\alpha} \quad (2)$$

der:

M : total mengde av stoff ved tiden t

M_0 : total mengde av stoff ved tiden $t = 0$

α : parameter bestemt av variasjonskoeffisienten for k -verdier for første ordens nedbrytningskinetikk i de enkelte delene av jorden.

β : stedsparameter

t : tid

Bi-eksponentiell modell (Double-First-Order in Parallell model, DFOP)

Denne nedbrytningsmodellen bygger på en inndeling av jorden i to deler (1 og 2) med hver sin første ordens nedbrytningskinetikk. Ligningen for DFOP-modellen er vist som ligning 3. I tillegg til startkonsentrasjonen M_0 er det 3 parametre (g , k_1 , k_2) som må finnes ved optimalisering av denne modellen slik at den passer nedbrytningsdata best mulig [1].

$$M = M_0(g e^{-k_1 t} + (1 - g) e^{-k_2 t}) \quad (3)$$

der:

M : total mengde av stoff ved tiden t

M_0 : total mengde av stoff i begge delene ved tiden $t = 0$

g : brøkdelen av M_0 som er i del 1

k_1 : ratekonstanten i del 1

k_2 : ratekonstanten i del 2

t : tid

For denne modellen kan ikke DT50 og DT90 beregnes gjennom en ligning, men må beregnes gjennom en iterasjonsprosedyre som tar utgangspunkt i data fra den beregnede kurven til modellen [1].

Hockeykølle-modellen (Hockey-stick model, HS)

Hockeykølle-modellen er ikke jevn, men har form som en hockey-kølle (derav navnet). Den består av to forskjellige første ordens eksponentielle kurver med ulik ratekonstant. Konsentrasjonen brytes først ned med ratekonstanten k_1 . Ved et tidspunkt, bruddpunktet, endres ratekonstanten til k_2 og kurven får en brå endring. HS-modellen beskrives gjennom de to ligningene 4 og 5 [1].

$$M = M_0 e^{-k_1 t} \quad \text{for } t \leq t_b \quad (4)$$

$$M = M_0 e^{-k_1 t_b} e^{-k_2 (t - t_b)} \quad \text{for } t > t_b \quad (5)$$

der:

M : total mengde av stoff ved tiden t

M_0 : total mengde av stoff i begge delene ved tiden $t = 0$

k_1 : ratekonstant til $t = t_b$

k_2 : ratekonstant fra $t = t_b$

t_b : bruddpunkt (tiden der ratekonstanten endres)

t : tid

2.2 Forsøksfeltene på Stjørdal og Klepp

Nedbrytningsforsøkene ble utført ved Bioforsks forsøksfelt på Kvithamar i Stjørdal kommune i Nord-Trøndelag og på Særheim i Klepp kommune i Rogaland, i tidsperioden mai 2012 til mai 2013. Den geografiske plasseringen av de to forsøksfeltene er vist på figur 1. Fotografier av forsøksfeltene i Stjørdal og Klepp er vist som henholdsvis figur 2 og figur 3.

Det er betydelig forskjell på de klimatiske forholdene der de to forsøksfeltene ligger. Klepp ligger nær havet og har et maritimt klima med mye nedbør, kjølige vintre og somre som kan være varme. Klimaet i Stjørdal er kontinentalt og subarktisk, med lite nedbør, kjølige og lange vintre og somre som er kortvarige og varme [23,27].

Begge forsøksfeltene består av svart siltig sandjord. Jordsmonnet på forsøksfeltet i Klepp inneholder mer sand og dobbelt så mye organisk materiale som forsøksfeltet på Stjørdal. Ingen av feltene har vært gjødslet. Fordelingen av kornstørrelser (sand, silt og leire) og innholdet av organisk materiale (målt som totalt organisk karbon, TOC) i det øverste jordsjiktet på 0-20 cm i de to forsøksfeltene er vist i tabell 4 [23,27].



Figur 1. Kart over som viser plasseringen av forsøksfeltene Stjørdal og Klepp. ©Mads A. Haneborg

Tabell 4. Fordeling av kornstørrelser (sand, silt og leire), innholdet av organisk materiale (karbon) og volumvekt av det øverste jordsjiktet på 0-20 cm i de to forsøksfeltene på Klepp og Stjørdal. Analysen ble utført i 2010 [23].

Egenskaper	Enhet	Klepp (Særheim)	Stjørdal (Kvithamar)
Totalt karbon	% av tørrstoff	3,3	1,8
Totalt organisk karbon (TOC)	g/100g tørrstoff	3,2	1,6
Volumvekt	kg/L	1,3	1,4
0-20 cm sjiktet består av:		Siltig sand	Siltig sand
Total sand	%	57	45
Total silt	%	32	49
Total leir	%	11	7



Figur 2. Fotografi av forsøksfeltet i Kvithamar på Stjørdal. Fotografiet er tatt av Lasse Weiseth ved Bioforsk. ©Bioforsk



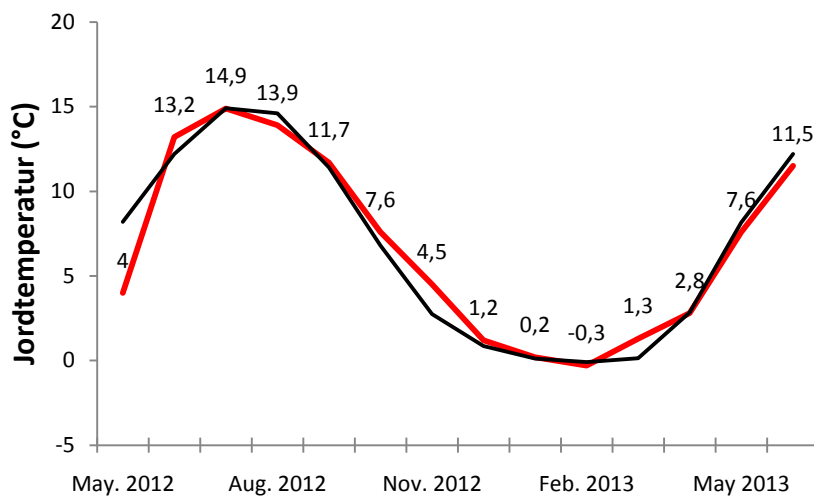
Figur 3. Fotografi av forsøksfeltet i Særheim på Klepp. Fotografiet er tatt av Isak Drozdik ved Bioforsk. ©Bioforsk

For å holde forsøksfeltene frie for plantevekst under nedbrytningsforsøket blir de sprøytet med Roundup. Jordbearbeiding av begge forsøksfelt skjedde ved pløying og harving før og etter sprøyting. På Klepp skjer vårpløying i april, på Stjørdal skjer vårpløying i mai. Datoer for sprøyting var 22. juni 2012 for Stjørdal og 23. mai 2012 for Klepp [23].

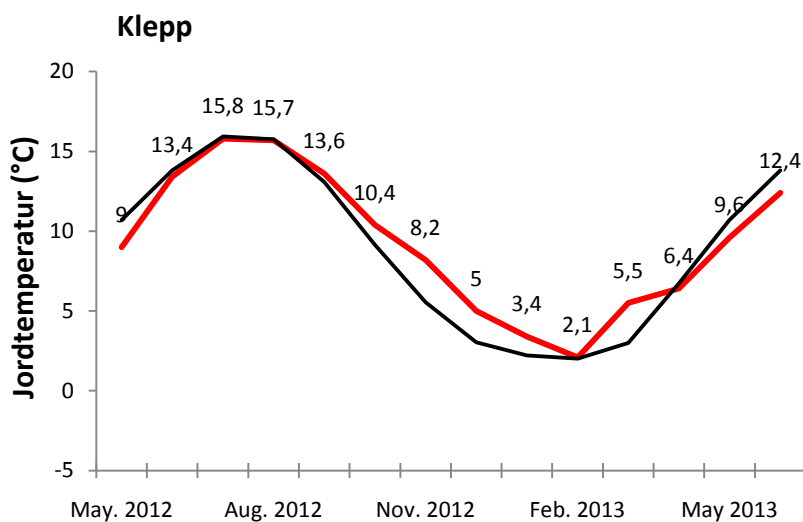
Nedbrytningsforsøkene i Stjørdal og Klepp foregikk i tidsperioden fra mai 2012 til juni 2013, og en oversikt over temperaturen målt ved en dybde på 10 cm og nedbøren i denne perioden på de to stedene er vist i tabell 5. Figur 4 og 5 viser grafer over jordtemperaturen over forsøksperioden for henholdsvis Stjørdal og Klepp. Diagrammer over nedbøren i forsøksperioden for Stjørdal og Klepp er vist i figurene 6 og 7.

Tabell 5. En oversikt over jordtemperatur ved 10 cm dybde og nedbør per måned i de to forsøksfeltene Stjørdal og Klepp over forsøksperioden fra mai 2012 til juni 2013. Gjennomsnittlig jordtemperatur i hvert av de to forsøksfeltene over tidsperioden 1990-2012 er oppgitt for hver måned. For hver av de to forsøksfeltene er gjennomsnittlig nedbør for tidsperioden 1961-1990 oppgitt for hver måned. Tabell laget av Halvard Hole, Bioforsk Plantehelse.

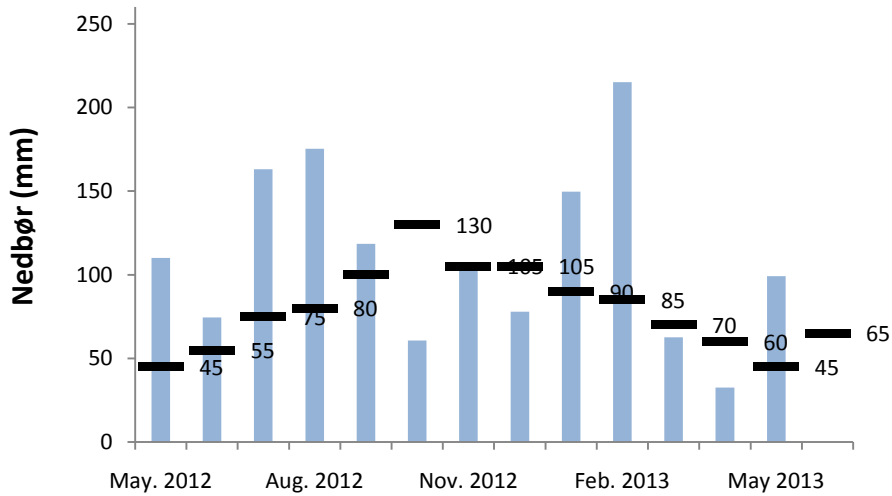
	Stjørdal				Klepp			
	Jordtemperatur ved 10 cm (°C)	Gjennomsnittlig jordtemperatur 1990-2012	Nedbør (mm)	Gjennomsnittlig nedbør 1961-1990 (mm)	Jordtemperatur ved 10 cm (°C)	Gjennomsnittlig jordtemperatur 1990-2012	Nedbør (mm)	Gjennomsnittlig nedbør 1961-1990 (mm)
Mai 2012	4	8,2	110	45	9	10,7	60	70
Juni 2012	13,2	12,2	75	55	13,4	13,8	136	75
Juli 2012	14,9	14,9	163	75	15,8	15,9	190	95
August 2012	13,9	14,6	175	80	15,7	15,7	127	125
September 2012	11,7	11,4	118	100	13,6	13,1	202	160
Oktober 2012	7,6	6,8	61	130	10,4	9,2	157	160
November 2012	4,5	2,7	103	105	8,2	5,5	94	150
Desember 2012	1,2	0,9	78	105	5	3,0	256	125
Januar 2013	0,2	0,1	150	90	3,4	2,2	168	105
Februar 2013	-0,3	-0,1	215	85	2,1	2,0	141	75
Mars 2013	1,3	0,1	63	70	5,5	3,0	75	80
April 2013	2,8	2,8	33	60	6,4	6,7	76	60
Mai 2013	7,6	8,2	99	45	9,6	10,7	71	70
Juni 2013	11,5	12,2		65	12,4	13,8	53	75
Gjennomsnitt	6,7	6,8	111,0	79,3	9,3	9,0	129	102



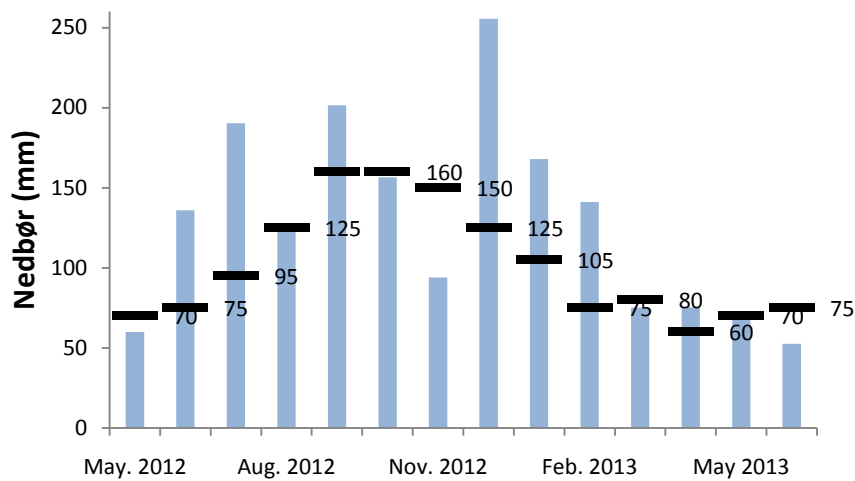
Figur 4. En graf over jordtemperaturen ved en dybde på 10 cm over nedbrytningsperioden for forsøksfelt Stjørdal er vist som en rød linje. Den svarte linjen viser den gjennomsnittlige jordtemperaturen i tidsperioden 1990-2012. Figuren er laget av Halvard Hole, Bioforsk PlanteHelse.



Figur 5. En graf over jordtemperaturen ved en dybde på 10 cm over nedbrytningsperioden for forsøksfelt Klepp er vist som en rød linje. Den svarte linjen viser den gjennomsnittlige jordtemperaturen i tidsperioden 1990-2012. Figuren er laget av Halvard Hole, Bioforsk PlanteHelse.



Figur 6. Et diagram for forsøksfelt Stjørdal der nedbøren i forsøksperioden er vist som blå stolper. De svarte strekene viser den gjennomsnittlige nedbøren for hver av månedene i tidsperioden 1961-1990. Figuren er laget av Halvard Hole, Bioforsk Plantehelset.



Figur 7. Et diagram for forsøksfelt Klepp der nedbøren i forsøksperioden er vist som blå stolper. De svarte strekene viser den gjennomsnittlige nedbøren for hver av månedene i tidsperioden 1961-1990. Figuren er laget av Halvard Hole, Bioforsk Plantehelset.

2.3 Prøveopparbeiding

Ved prøveopparbeiding omdannes prøven slik at den egner seg for analyse. Jordprøvene inneholder en matrix av sand, silt og leir, som vist i tabell 4. For å skille analyttene (pesticider) fra de øvrige forbindelsene i matrix er det nødvendig med ekstraksjon og opprensning. Ved prøveopparbeiding av prøver med pesticider er det mulig å benytte en rekke forskjellige ekstraksjonsteknikker. De inkluderer væskeekstraksjon, Soxleth-ekstraksjon, superkritisk væskeekstraksjon (Supercritical fluid extraction, SFE), mikrobølgeassistert ekstraksjon (Microwave-assisted extraction, MAE), solid-fase ekstraksjon (SFE) og andre teknikker [28,29,14].

I denne masteroppgaven benyttes væskeekstraksjon med aceton som løsemiddel. Risting av prøven over en periode på 30 minutter benyttes til å ekstrahere pesticidene over i væskefasen. Den faste fasen med jord sedimenteres ved sentrifugering, slik at mest mulig av de faste partiklene fjernes fra væskefasen. Væskefasen helles deretter av i et nytt rør. Samme volum nytt løsemiddel tilsettes den faste fasen med jord, som ekstraheres på nytt på samme måte. De to ekstraktene med væskefase blandes.

For opprensning av væskeekstraktet benyttes sprøytefilteret Phenomenex 0,45 µm. Dette filteret fjerner faste partikler som kunne satt seg fast under analysen med LC-MS/MS-instrumentet.

2.4 LC-MS/MS

2.4.1 Væskekromatografi (HPLC)

Innen analytisk kjemi brukes kromatografi som en teknikk for separasjon av forbindelser i en prøve. Separasjonen foregår ved at prøven injiseres i en mobilfase (væske eller gass) som passerer gjennom en kolonne med en stasjonærfase. Ulike forbindelser har ulik molekylstruktur og dermed ulik affinitet til mobilfasen og stasjonærfasen. Tiden som en forbindelse bruker på å passere gjennom kolonnen (eluering) betegnes retensjonstid. Forbindelser med større affinitet til stasjonærfasen vil ha større retensjonstid. Ved å bruke en detektor ved kolonnens utløp som registrerer forbindelsene når eluerer, kan det lages et kromatogram der hver forbindelse utgjør en topp. Dette forutsetter at forbindelsene er tilstrekkelig separert [30].

HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) er væskekromatografi der væsken presses gjennom kolonnen med høyt trykk, noe som har en rekke store fordeler. Disse fordelene er høy hastighet på analysene, høy resolusjon (evne til å skille forbindelser fra hverandre), høy sensitivitet (lave deteksjonsgrenser), høy nøyaktighet og automatiserte systemer, som sparer arbeidstid [31].

I et HPLC-instrument består stasjonærfasen av tettpakkede og ensformige partikler med en diameter på $\leq 10 \mu\text{m}$. Partiklene er silika med funksjonelle grupper bundet til overflaten. Slike funksjonelle grupper er grupperinger av atomer med ulike kjemiske egenskaper og affinitet til ulike typer analyttmolekyler. Det er nødvendig med høyt trykk (opp til 5000 psi) for at mobilfasen skal passere gjennom den tettpakkede kolonnen, og en høytrykks-pumpe er derfor nødvendig. I tillegg er det nødvendig med en spesiell injektor som overfører prøve fra det omgivende normaltrykket til mobilfasen under høyt trykk [31,3].

Mange ulike mobilfaser og stasjonærfaser kan brukes i et HPLC-system, avhengig av hva slags analytter som skal analyseres. Eluering skyldes at løsemiddelet (mobilfasen) fortrenger analyttene som er adsorbent på stasjonærfasen, og hastigheten på denne prosessen avhenger av analyttens affinitet til mobilfase og stasjonærfase. Det er to fase-polariteter som kan brukes: normal-fase og omvendt-fase. I normal-fase er stasjonærfasen polar og mobilfasen er upolar. Ved omvendt-fase er stasjonærfasen upolar mens mobilfasen er polar. I dag er omvendt-fase det mest vanlige innen HPLC. En svært utbredt stasjonærfase ved omvendt-fase HPLC er C18-silikapartikler. På slike partikler er lange kjeder med oktadekyl-grupper (C18) bundet til silikaoverflaten. Oktadekyl-gruppene er upolare og har stor affinitet til de upolare delene av analyttmolekyler, som alkyl-grupper og aromatiske ringer. Ved

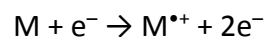
omvendt-fase HPLC brukes polare løsningsmidler som mobilfase, som regel vann blandet med mindre polare og vannløselige løsningsmidler som metanol og acetonitril [3,15].

Elueringen kan foregå på to måter. Ved isokratisk eluering er løsemiddelsammensetningen konstant under en analyse. Gradient-eluering innebærer at løsemiddelstyrken økes under analysen, ved å endre blandingsforholdet mellom løsemidler slik at mobilfasens polaritet endres. Løsemiddelstyrke betegner et løsemiddels evne til å eluere analytter fra stasjonærfasen i kolonnen. Ved normal-fase kromatografi vil et mer polart løsemiddel ha større løsemiddelstyrke, mens ved omvendt-fase kromatografi vil et mer upolart løsemiddel ha større løsemiddelstyrke. På denne måten kan elueringen av de ulike analyttene optimaliseres slik at det oppnås tilstrekkelig separasjon mellom toppene for hver analytt, samtidig som analysetiden gjøres minst mulig. Dette er viktig av hensyn til effektiviteten [3,15].

2.4.2 Massespektrometri

Massespektrometri (forkortet MS) er en analytisk teknikk der molekyler i gassfasen blir ionisert og splittet opp i molekylfragmenter som blir akselerert av et elektrisk felt og separert ut fra forholdet mellom masse og ladning (m/z-forhold). Massespektrografi er en enestående detektor for kromatografi som gir både kvantitativ og kvalitativ informasjon, har høy sensitivitet og kan skille mellom ulike forbindelser med den samme retensjonstiden. Teknikken kan brukes til å måle isotopforhold i ulike materialer og finne strukturen til organiske molekyler. De analytiske anvendelsene av teknikken er svært mange, og massespektrometri brukes ofte innen forurensningsmåling, matvarekontroll, rettsmedisin, kvalitetskontroll av legemidler og ved overvåking av prosesser innen kjemisk industri. Innenfor biokjemi brukes massespektrometri til kartlegging av proteomet og metabolomet i celler, og i letingen etter stoffer i naturen med farmakologiske egenskaper [32,17].

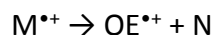
Ved analyse med massespektrometri må forbindelsene først overføres til gassfase (hvis de ikke allerede er i gassfase fordi de kommer fra en GC-kolonne) og deretter omdannes til ioner. Dette kan skje ved at molekylet (M) omdannes til et molekylion (M^{•+}) gjennom elektronionisering, som vist under[17]. Molekylionet er et radikalion. Et radikalion er en kjemisk species som har et uparet elektron (er en fri radikal) og har en ladning[16].



Molekylionet som dannes i prosessen, vil vanligvis fragmentere videre. Siden det er et kation-radikal med et oddetall av elektroner kan det derfor fragmentere gjennom to ulike typer reaksjoner. Den første typen reaksjon innebærer at molekylionet fragmenterer i ett radikal (R[•]) og ett ion med et partall elektroner (EE⁺), som vist under[17].



Ved den andre typen reaksjon vil molekylionet fragmentere i et nytt molekyl (N) og et nytt kation-radikal (OE^{•+}) med et oddetall elektroner, som vist under [17].



De kjemiske egenskapene til ioner med et partall elektroner (EE⁺) og ioner med et oddetall elektroner (OE^{•+}) er ulike. Disse ionene betegnes primærproduksjoner, og kan fragmentere videre. I massespektrometeret vil ionene separeres ut fra forholdet mellom masse og ladning (m/z-forhold), og mengden ioner registreres i detektoren. I et massespekter er m/z-forholdet vist på x-aksen, og relativ mengde (relative abundance) er vist på y-aksen. Ioner er vist som topper i massespekteret. Den største toppen betegnes base peak, og har per definisjon en relative abundance på 100 %. De andre toppenes relative abundance beregnes som prosentandel av base peak [17].

Ladningen til et ion vises som antallet av elektronladninger (e) som ionet har fått eller mistet. Ioner som har mistet en eller flere elektroner er positive ioner. De aller fleste positive ioner har mistet ett elektron, og har dermed en ladning på +1. For større molekyler kan det være flere ladninger på ionet som dannes. Den totale ladningen for et ion betegnes q og er vist i ligning 6 [32,17].

$$q = z \cdot e \tag{6}$$

der:

z : antall ladninger på ionet

e : elektronladningen. $e = 1,602177 \cdot 10^{-19}$ C

2.4.3 Ionekilder i massespektrometri

Molekylene i de analyserte prøvene ioniseres i ionekilden før de analyseres i massespektrometeret. Innen massespektrometri finnes det en rekke ulike teknikker for ionisering, som varierer i mengden intern energi som overføres til analyttmolekylene under ioniseringsprosessen. Mengden av intern energi som overføres har stor betydning for hvor mye analyttmolekylene fragmenterer. De fysiske og kjemiske egenskapene til analyttmolekylene vil også ha stor betydning for hvor mye de fragmenteres etter ionisering. Svært energetiske ioniseringsteknikker forårsaker sterk fragmentering av analyttmolekylene, mens mykere teknikker med lavere energi kun danner molekylioner, uten fragmentering [33].

Et massespektrometer benyttet som detektor ved væskechromatografi (HPLC) eller gasschromatografi (GC) vil motta analyttmolekyler i henholdsvis væske- og gassfase. Ionekilder som elektronionisering (EI), kjemisk ionisering (CI) og feltionisering (FI) kan kun brukes til ionisering av molekyler i gassfase, og bruken av disse ionekildene egner seg kun til molekyler som er tilstrekkelig flyktige og termisk stabile til å analyseres med gasschromatografi [33].

Enkelte molekyler egner seg ikke til gasschromatografi, fordi de ikke er termisk stabile eller fordi de har et damptrykk som er for svakt ved GC-kolonnens temperatur. For disse molekylene må det benyttes direkte ionekilder. Direkte ionekilder som ekstraherer molekyler direkte fra væskefase eller fast fase betegnes henholdsvis væskefase-ione kilder og fastfase-ione kilder. Væskefase-ione kilder omfatter elektro sprayionisering (ESI), atmosfæretrykk-kjemisk ionisering (APCI) og atmosfæretrykk-fotoionisering (APPI). Ved bruk av væskefase-ione kilder foreligger analyttmolekylene oppløst i væske, og de føres inn i ionekilden ved at væsken omdannes til dråper ved nebulisering. Inne i ionekilden omdannes analyttmolekylene til ioner ved atmosfærisk trykk, og overføres til massespektrometeret gjennom flere trinn med vakuumpumping [33].

Fastfase-ione kilder omfatter matriseassistert laserdesorpsjon (MALDI), sekundærion-massespektrometri (SIMS), plasmadesorpsjon (PD), feltdesorpsjon (FD) og Fast Atom Bombardment (FAB). Ved bruk av fastfase-ione kilder befinner analyttmolekylene seg i en avleiring som ikke er flyktig. Denne avleiringen kan lages på ulike måter, som ofte innebærer å tilføre en matrise som er enten et fast stoff eller en viskøs væske. Denne avleiringen bestråles med partikler eller fotoner med høy energi, som desorberer ioner nær overflaten. Et elektrisk felt ekstraherer disse ionene og sender dem mot masseanalytoren [33].

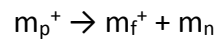
Ionekilden benyttet i massespektrometer-analysen i denne oppgaven er elektropray-ionisering (ESI). Elektropray-ionisering har svært høy sensitivitet og kan lett kobles til et HPLC-instrument. Elektroprayionisering fungerer ved at en væske passerer gjennom et kapillærrør adskilt fra en motelektrode med et sterkt elektrisk felt mellom dem. Ved elektroprayionisering er det lav volumstrøm (vanligvis 1-10 $\mu\text{L}/\text{min}$) på væsken, og prosessen skjer ved atmosfærisk trykk [33].

Avstanden fra kapillærrøret til motelektroden varierer mellom 0,3 og 2 cm, og potensialforskjellen er 3-6 kV. Det elektriske feltet mellom kapillærrøret og motelektroden ligger i størrelsesordenen 10^6 V m^{-1} . Ved enden av kapillærrøret akkumuleres det en ladning på væskeoverflaten, som danner ladde væskedråper. Disse akselereres av det elektriske feltet mot masseanalysatoren. Underveis fordamper løsemiddelet i dråpene, som skrumper i størrelse. Siden ladningen på den skrumpende dråpen ikke endres, øker ladning per volumenhet inntil dråpen brytes opp i mindre dråper. Denne prosessen fortsetter videre, slik at dråpene deles opp i stadig mindre. Det elektriske feltet på overflaten av dråpen blir etter hvert så sterkt at det inntreffer desorpsjon av ioner. Små molekyler, med en masse på under omtrent 1000 dalton, vil danne ioner med én ladning. Større molekyler kan danne ioner med høyere ladning. Elektroprayionisering kan gi positive eller negative ioner, avhengig av om valgt ionemodus er positiv (ESI+) eller negativ (ESI-) [33].

Ved elektroprayionisering vil det inntreffe lite fragmentering av analytten under ioniseringen. For å øke graden av fragmentering kan det benyttes en inert gass i mellomrommet mellom kapillærrøret og skimmer cone, som er en metallkjegle med åpning mot kapillærrøret. Skimmer cone bidrar til å fokusere strømmen av ioner på veien inn til masseanalysatoren. Fragmentering av ionene gjennom kollisjon med molekyler av inert gass betegnes Collision-Induced Dissociation (CID). Mellom kapillærrøret og skimmer cone er det en spenningsforskjell, som betegnes cone voltage (målt i V). Dersom cone voltage er liten vil det dannes mest molekylioner. Jo større cone voltage, jo større fragmentering av ionet gjennom CID. Graden av fragmentering av ionene kan dermed justeres ved å justere cone voltage, slik at intensiteten av et ion med en bestemt m/z-forhold kan økes. Den kinetiske energien til ionene ved kollisjon med gassmolekyler betegnes kollisjonsenergi (målt i elektronvolt, eV). Justering av cone voltage og kollisjonsenergi brukes ved utviklingen av en passende MS-analysemetode for en analytt [10,5].

2.4.4 Tandem massespektrometri (MS/MS)

Tandem massespektrometri er en metode der det benyttes minst to trinn av masseanalyse. En vanlig form for tandem massespektrometri fungerer ved at det første massespektrometeret isolerer et prekursorion. Dette fragmenterer videre, enten av seg selv (spontant) eller ved aktivering. Fragmenteringen av prekursorionet (m_p^+) medfører en danning av produksjoner (m_f^+) og nøytrale fragmenter (m_n), som vist nedenfor [5].



Produksjonene analyseres deretter av et annet massespektrometer. Spekteret for produksjonen vil ikke vise topper for ulike isotoper dersom den valgte verdien for m/z-forhold for prekursorionet kun inneholder én isotop av hvert grunnstoff. Dette er det mest vanlige. Ved tandem massespektrometri kan antallet trinn økes til tre, noe som betegnes MS/MS/MS eller MS³. Ved MS³ vil det først velges ut ioner med en første masse, deretter velges det ut ioner av en andre masse fra fragmentene som oppnås i første MS, deretter analyseres fragmentene av de sist utvalgte ionene. Det er mulig å øke antallet trinn i tandem massespektrometri ytterligere, da betegnes metoden MSⁿ der n er antallet generasjoner av ioner som analyseres [5].

Tandem massespektrometri kan gjøres på to ulike måter. Den første måten innebærer at to adskilte massespektrometer-instrument blir koblet sammen, her er adskillelsen i rom. Den andre måten innebærer at analysene adskilles i tid, ved at ionene oppbevares i en ionelagringskammer mellom analysene. En vanlig form for tandem massespektrometri er MS/MS-instrumenter der det brukes to separate masseanalytatorer [5].

Det kan benyttes en rekke ulike masseanalytatorer til ulike formål, hver med sine fordeler og ulemper. Felles for alle masseanalytatorer er at de separerer ioner ut fra m/z-verdi ved hjelp av en kombinasjon av magnetiske og elektriske felter som kan være enten statiske eller dynamiske. De ulike typene masseanalytatorer kan deles opp i to grupper. Den ene gruppen masseanalytatorer kalles scanning-masseanalytatorer. Disse fungerer ved å endre den valgte m/z-verdien over tid, slik at ioner med ulik m/z-verdi overføres suksessivt til detektoren. Gruppen med scanning-masseanalytatorer kan deles opp i to typer. Den ene typen er kvadrupoler, og den andre typen er magnetsektor-instrumenter med en flight tube i det magnetiske feltet. Denne tillater kun ioner med en bestemt m/z-verdi å passere gjennom ved et bestemt tidspunkt [34].

Den andre gruppen masseanalytatorer overfører alle ioner samtidig. Denne gruppen omfatter dispersive magnetanalytatorer, Time-of-flight-masseanalytatorer (TOF) og trapped-ion masseanalytatorer av ulike typer, deriblant ionefelle, ion cyclotron resonance og orbitrap [34].

I denne oppgaven benyttes tandem massespektrometri av typen MS/MS, med to kvadrupoler. En kvadrupol er en masseanalytator som benytter stabiliteten til ionenes baner gjennom et oscillerende elektrisk felt til å separere ionene ut fra m/z -forhold. Kvadrupoler er bygget opp av fire staver som har et sirkelformet eller hyperbolsk tverrsnitt. Sistnevnte er den mest ideelle formen. De fire stavene må være fullstendig parallelle i forhold til hverandre. Mellom stavene er det både en konstant elektrisk spenning og en oscillerende spenning med radio-frekvens. Når et ion kommer inn i rommet mellom stavene i kvadrupolen, vil det bli trukket mot en av stavene med motsatt ladning. Ionet kan treffe staven og bli utladet. Dersom ladningen på staven endres før ionet treffer den, vil ionets retning endres og trekkes mot en stav som nå har motsatt ladning. Det oscillerende elektriske feltet gjør at ionene vil følge komplekse baner før de når detektoren. Kun ioner med en utvalgt m/z -verdi vil kunne passere gjennom. Ioner med andre m/z -forhold vil kollideres med stavene underveis, og når derfor ikke detektoren. Disse ionene betegnes ikke-resonante ioner. Spenningen mellom stavene varierer svært hurtig, slik at den utvalgte m/z -verdien også endres raskt. Dette gjør det mulig for detektoren å måle ulike ioner i rask rekkefølge [34,12].

2.4.5 Identifisering av forbindelser med MS/MS

Tandem massespektrometri (MS/MS) fungerer ved at prekursor-ionene valgt ut av det første massespektrometeret fragmenterer videre i en kollisjonscelle gjennom Collision-Induced Dissociation (CID). I kollisjonscellen befinner det seg en inert gass som prekursor-ionene kolliderer med. Det andre masse-spektrometeret analyserer produktionene fra fragmenteringen i kollisjonscellen. CID øker andelen prekursor-ioner som fragmenterer og antallet fragmenterings-veier fordi kollisjonen med molekylene av den inerte gassen øker den interne energien til ionet [5].

Ved bruk av tandem massespektrometri finnes det mange ulike måter å utføre et scan av ioner på. De fire viktigste typer scan er Product ion scan, Precursor ion scan, Neutral loss scan og Selected reaction monitoring (SRM) [5].

Product ion scan betegnes også datter-scan, og innebærer at et prekursor-ion (eller forelder-ion) med en bestemt m/z -verdi velges ut. Når prekursor-ionene treffer molekylar av en inert gass som er til stede i kollisjonscellen, vil de fragmentere og danne produkt-ioner (datter-ioner). Denne fragmenteringen betegnes Collision-induced dissociation (CID). Ved product ion scan blir alle disse produkt-ionene bestemt. Dersom en reaktiv gass benyttes i kollisjonscellen, vil den reagere med prekursor-ionene og danne produkter av typen collision-activated-reaction (CAR). Product ion scan kan også betegnes fragment ion scan dersom det kun dannes fragmentioner i kollisjonene [5].

Precursor ion scan kalles også forelder-scan. Det innebærer å bestemme prekursor-ionene (forelder-ionene) til et utvalgt produkt-ion (datter-ion). Denne typen scan utføres ved at det andre massespektrometeret i MS/MS-instrumentet er innstilt på et utvalgt ion, mens det første massespektrometeret skanner gjennom ulike m/z -verdier. På denne måten detekteres alle prekursor-ionene som danner det bestemte produkt-ionet gjennom reaksjoner eller fragmentering. For tandem massespektrometri der adskillelsen av analysene skjer i tid, er det ikke mulig å bruke precursor ion scan [5].

Neutral loss scan innebærer å velge ut et nøytralt fragment og bestemme alle fragmenteringene som fører til tapet av dette nøytrale fragmentet. Denne typen scan foregår ved at begge massespektrometere skanner samtidig, men ved en konstant forskjell i masse mellom de to. Et ion med en gitt masse passerer gjennom det første massespektrometeret og fragmenteres i kollisjonscellen, slik at det dannes fragment-ioner

som går inn i det andre massespektrometeret. Dersom forskjellen mellom massen til det første ionet og fragment-ionet er lik den utvalgte masseforskjellen til det nøytrale fragmentet, vil det detekteres. På denne måten er det mulig å finne alle fragmenteringer som leder til tapet av dette nøytrale fragmentet. Neutral loss scan kan ikke brukes ved instrumenter der tandem massespektrometri skjer ved adskillelse i tid [5].

Selected reaction monitoring (SRM) innebærer å velge ut en bestemt fragmenteringsreaksjon ved at begge massespektrometere blir innstilt på et bestemt m/z -forhold. Ved bruk av SRM skjer det derfor ingen skanning. Ionene som blir utvalgt av det første massespektrometeret (prekursor-ionet) blir kun detektert dersom de fragmenterer og danner et utvalgt produkt-ion som bestemmes i det andre massespektrometeret. På denne måten er det mulig å velge ut en bestemt fragmenterings-reaksjon, som kan brukes til å påvise en bestemt analytt. De to m/z -forholdene for det selekterte prekursor-ionet og det selekterte produktet betegnes en SRM-overgang (prekursor-ion>produkt). SRM er den teknikken i tandem masse-spektrometri som tilsvarer Selected ion monitoring (SIM) i standard massespektrometri. Sensitiviteten er høy for SRM fordi fraværet av skanning gjør det mulig for massespektrometere å fokusere på prekursor-ionet og produktet over lengre tid. En fordel med bruk av SRM er at den er svært selektiv med hensyn på å påvise en bestemt analytt. I denne masteroppgaven er det Selected reaction monitoring som brukes til å påvise analyttmolekylene i prøvene. [5]. Det benyttes to ioner med hver sin SRM-overgang for hver analytt, disse betegnes kvantifiseringsion (quantifier) og sekundært ion (qualifier). Kvantifiseringsionet har størst intensitet og benyttes til kvantifisering av analytten, mens det sekundære ionet brukes til identifisering av analytten. Forholdet mellom kvantifiseringsion og sekundært ion betegnes ioneratio. Sammenligning av ioneratio brukes også til identifisering av analytten [11].

2.5 Kvantifisering av analytter

Innen analytisk kjemi kan analytter kvantifiseres gjennom tre ulike metoder. Ekstern standard metode, intern standard metode og standard tilsetning metode. I denne masteroppgaven ble det benyttet intern standard metode. Ved intern standard metode benyttes en eller flere interne standarder. Hver analytt tildeles en intern standard, som må være en forbindelse som er ulik analytten men bør ha en molekylstruktur og kjemiske og fysiske egenskaper som ligner mest mulig [6,35].

Ved bruk av intern standard metode lages det først en rekke kalibreringsløsninger med interne standarder og analytter. I kalibreringsløsningene er konsentrasjonen av de interne standardene konstant og konsentrasjonene av analyttene varierer over et konsentrasjonsområde som dekker de konsentrasjonsverdiene av analyttene som er forventet i prøvene. Disse kalibreringsløsningene analyseres. I kromatogrammet dannet etter hver analyse utgjør analyttene og de interne standardene topper med ulike toppareal. Topparealet for hver forbindelse er proporsjonal med konsentrasjonen av forbindelsen i prøven. Men responsen for hver forbindelse i detektoren er ulik. Responsfaktoren er detektorens relative respons for analytt og intern standard, og er vist som ligning 7. En intern standard-kalibreringskurve lages ved å plote arealforholdet mellom analytt og intern standard som funksjon av konsentrasjonsforholdet mellom dem [6,35].

$$\frac{A_{\text{analytt}}}{C_{\text{analytt}}} = F \cdot \frac{A_{\text{is}}}{C_{\text{is}}} \quad (7)$$

der:

A_{analytt} : topparealet for analytten

A_{is} : topparealet for intern standard

C_{analytt} : konsentrasjonen av analytten

C_{is} : konsentrasjonen av intern standard

F : responsfaktor

En kjent konsentrasjon av de interne standardene tilsettes hver prøve før prøveopparbeidingen starter. Ligningen for kalibreringskurven til hver analytt kan brukes til å finne konsentrasjonen av analytten i prøven ved å finne arealforholdet mellom analytten og dens interne standard i prøven. Tapet av analytt og intern standard under prøveopparbeidingen vil være tilnærmet like stort fordi deres kjemiske og fysiske egenskaper ligner hverandre. Av den grunn vil forholdet mellom dem være tilnærmet konstant [6,35].

Intern standard metode kan derfor kompensere for tap av analytter under prøveopparbeidingen i betydelig grad. Både under ekstraksjonen fra jordprøven og ved filtreringen av væskeekstraktet er det stor mulighet for tap av pesticider, og intern standard metode egner seg derfor for analysene i denne masteroppgaven. Beregningen av intern standardkalibreringskurver og konsentrasjonsverdier ble utført ved bruk av dataprogrammet QuanLynx V4.0 (Micromass[®] Ltd) i denne masteroppgaven [6,25].

2.6 Kvalitetssikring

Analysene av jordprøvene ble utført ved laboratoriet i Bioforsk Plantehelse i Ås, som er akkreditert for analyse av pesticider. Metoden som er benyttet i denne oppgaven ble utviklet på Bioforsk i 2010 for laboratoriestudier og feltstudier med pesticidene boskalid, pyraklostrobin, bentazon, propikonazol, fenpropimorf og tiakloprid og trifloksystrobin og 4 transformasjonsprodukter [26].

Kvalitetssikring av metoden ble utført ved å inkludere 2 kontrollprøver (K1 og K2) og 2 blankprøver (B1 og B2) for hvert sett med jordprøver som ble analysert. Blankprøvene ble laget av jordprøver tatt før spraying med sprøytemidler, som vist i første rad av tabell 12.

For å sikre at kontrollprøvene hadde samme matrix som jordprøvene og kalibreringsstandardene, ble de laget ved tilsetning av en løsning med alle pesticider og transformasjonsprodukter til en prøve med jord tatt ut før sprøyting. Kontrollprøvene og blankprøve B1 gjennomgikk den samme prøveopparbeiding som jordprøvene. Blankprøve B2 ble ikke tilsatt interne standarder, og ble ikke analysert. Den ble benyttet ved tillaging av kalibreringsstandarder, slik at disse fikk samme matrix som prøvene. Den nominelle konsentrasjonen av pesticider og transformasjonsprodukter i de ferdige kontrollprøvene var 0,05025 µg/mL ved 100 % gjenfinning.

I et kromatogram vil det være støy ved grunnlinjen som følge av små tilfeldige signaler fra detektoren. Dette har mange årsaker, som tilfeldige svingninger i elektroniske komponenter, forurensning av prøven og elektriske forstyrrelser fra miljøet. For å skille mellom støy og en topp for en forbindelse, brukes begrepene deteksjonsgrense (Limit of Detection, LOD) og kvantifikasjonsgrense (Limit of Quantification, LOQ). Deteksjonsgrensen (LOD) er den laveste konsentrasjonen av en analytt som kan detekteres, men ikke nødvendigvis kvantifiseres som en nøyaktig verdi. Kvantifiseringsgrensen (LOQ) er den laveste konsentrasjonen av en analytt som kan kvantifiseres som en nøyaktig verdi. Det finnes flere ulike måter å beregne LOD og LOQ på. En måte er ved å bruke signal-støy-forholdet (Signal-to-noise, S/N), som er forholdet mellom signalet til en topp og støyen ved grunnlinjen. Det er vanlig å sette grensen for LOD som et S/N-forhold på 3 og grensen for LOQ som et S/N-forhold på 10 [2,36].

I denne oppgave beregnet dataprogrammet QuanLynx V4.0 (Micromass® Ltd) automatisk S/N-forholdet for alle top Estimeringen av LOD og LOQ ble utført med ligningene 8 og 9, hentet fra [37]. Kalibreringsstandarder som hadde en konsentrasjon av analytt nærmest LOD (definert som $S/N = 3$) ble benyttet til beregningen av LOD og LOQ for hvert enkelt pesticid og transformasjonsprodukt.

$$LOD = C_{analytt} \cdot \frac{3}{S/N_{analytt}} \quad (8)$$

$$LOQ = C_{analytt} \cdot \frac{10}{S/N_{analytt}} \quad (9)$$

$C_{analytt}$: konsentrasjonen i kalibreringsstandarden nærmest LOD for analytten

$S/N_{analytt}$: S/N-forholdet for analyttens topp i kalibreringsstandarden nærmest LOD for analytten

3 Material og metode

3.1 Materialer

3.1.1 Kjemikalier

Ved tillaging av kalibreringsstandarder ble det benyttet plantevernmidlene vist i tabell 6.

Tabell 6. Oversikt over plantevernmidler med kjemisk formel, molekylmasse, IUPAC-navn, renhet, produsent, katalognummer og CAS-nummer. Opplysninger hentet fra produsent, PPDB og ChemSpider [13,38].

Plantevernmidler	Kjemisk formel	Molekylmasse (g/mol)	IUPAC-navn	Renhet (%)	Produsent	Kat.nr.	CAS-nr.
Tiakloprid	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ S	252,73	(Z)-3-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-1,3-thiazolidin-2-ylidenecyanamide	98,0	Dr. Ehrenstorfer GmbH D-86199 Augsburg, Germany	17451000	111988-49-9
Propikonazol	C ₁₅ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₂	342,2	1-[2-(2,4-Dichlorophenyl)-4-propyl-1,3-dioxolan-2-ylmethyl]-1H-1,2,4-triazole	98,0	Dr. Ehrenstorfer GmbH D-86199 Augsburg, Germany	1648000	60207-90-1
Pyraklostrobin	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₄	387,82	Methyl [2-({[1-(4-chlorophenyl)-1H-pyrazol-3-yl]oxy)methyl]phenyl]methoxycarbamate	-	Fluka Analytical, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Riedstrasse 2, D-89555 Steinheim, Germany	Sigma- Aldrich 33696- 100MG-R	175013-18-0
Bentazon	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₃ S	240,28	3-Isopropyl-1H-2,1,3-benzothiadiazin-4(3H)-one 2,2-dioxide	98,0	Dr. Ehrenstorfer GmbH D-86199 Augsburg, Germany	105100	25057-89-0
Boskalid	C ₁₈ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	343,21	2-chloro-N-(4'-chlorobiphenyl-2-yl)nicotinamide	98,4	Dr. Ehrenstorfer GmbH D-86199 Augsburg, Germany	10663000	188425-85-6
Fenpropimorf	C ₂₀ H ₃₃ NO	303,5	cis-4-[3-(4-tert-Butylphenyl)-2-methylpropyl]-2,6-dimethylmorpholine	92,5	Dr. Ehrenstorfer GmbH D-86199 Augsburg, Germany	13540000	67564-91-4
Trifloksystrobin	C ₂₀ H ₁₉ F ₃ N ₂ O ₄	408,4	Methyl (E)-methoxyimino-((E)-alpha-[1-(a,a,a-trifluoromtolyl)ethylideneamino oxy]-o-tolyl]acetate	98,8	Dr. Ehrenstorfer GmbH D-86199 Augsburg, Germany	17842000	141517-21-7

Transformasjonsprodukter av plantevernmidler som ble benyttet til å lage kalibreringsstandardene er vist i tabell 7. De interne standardene som ble brukt i oppgaven er vist i tabell 8.

Tabell 7. Oversikt over plantevernmiddel-transformasjonsprodukter med kjemisk formel, molekylmasse, IUPAC-navn, renhet og produsent. Opplysninger hentet fra produsent, PPDB og ChemSpider [13,38].

Plantevern-midler	Kjemisk formel	Molekylmasse (g/mol)	IUPAC-navn	CAS-navn	Renhet (%)	Produsent
M02 (Tiaklopidriformasjonsprodukt)	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄ OS	270,74	[3-(6-Chloro-pyridin-3-ylmethyl)-thiazolidin-(2Z)-ylidene]-urea	-	97,5	Bayer CropScience AG Alfred-Nobel-Str. 50 40789 Monheim am Rhein
CGA 321113 (Trifloxystrobin-formasjonsprodukt)	-	394,0	-	((E,E)-methoxyimino-[2-[1-(3-trifluoromethylphenyl)-ethylideneaminoxymethyl]-phenyl]acetic acid)	96,3	Bayer CropScience AG Alfred-Nobel-Str. 50 40789 Monheim am Rhein
BF 421-2, CGA 294975 (Fenpropimorformasjonsprodukt)	C ₂₀ H ₃₁ NO ₃	333,5	2-(4-{3-[(2R,6S)-2,6-Dimethyl-4-morpholinyl]-2-methylpropyl}phenyl)-2-methylpropanoic acid	2-methyl-2-[4-[2-methyl-3-(cis-2,6-dimethylmorpholin-4-yl)propyl]phenyl]propionic acid	99,8	BASF Crop Protection, Speyerer Straße 2 67117 Limburgerhof
BF500-6 (Pyraklostrobin-formasjonsprodukt)	-	-	-	-	99,2	BASF Crop Protection, Speyerer Straße 2 67117 Limburgerhof

Tabell 8. De interne standardene med kjemisk formel, molekylmasse, IUPAC-navn, renhet, produsent, katalognummer og CAS-nummer. Hentet fra ChemSpider [38].

Plantevern-midler	Kjemisk formel	Molekylmasse (g/mol)	IUPAC-navn	Renhet (%)	Produsent	Kat.nr.	CAS-nr.
Metconazole	C ₁₇ H ₂₂ ClN ₃ O	319,829	5-(4-Chlorobenzyl)-2,2-dimethyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)cyclopentanol	-	Dr. Ehrenstorfer GmbH D-86199 Augsburg, Germany	14955000	125116-23-6
Bentazone-D6	C ₁₀ H ₆ N ₂ O ₃ SD ₆	246,28	3-(Isopropyl-1,1,1,3,3,3-D6)-1H-benzo-2,1,3-thiadiazin-4-one 2,2-dioxide	98,0	Dr. Ehrenstorfer GmbH D-86199 Augsburg, Germany	10510100	-

De øvrige kjemikalier som ble brukt i laboratoriearbeidet er vist i tabell 9.

Tabell 9. Kjemikalier med kjemisk formel, renhet, produsent, katalognummer og CAS-nummer.

Øvrige kjemikalier	Kjemisk formel	Renhet	Produsent	Produsentens katalognummer	Cas-nr.
Metanol (Methanol for pesticide residue analysis)	CH ₄ O	≤0.0005% ikke-flyktig stoff	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Riedstrasse 2, D-89555 Steinheim, Germany	Sigma-Aldrich 34485-2.5L	67-56-1
Maursyre (Formic acid for pesticide residue analysis)	HCOOH	≥98 %	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Riedstrasse 2, D-89555 Steinheim, Germany	Sigma-Aldrich 33015-2.5L	64-18-6
Aceton (Acetone for pesticide residue analysis)	C ₃ H ₆ O	≤0.0005% ikke-flyktig stoff	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Riedstrasse 2, D-89555 Steinheim, Germany	Sigma-Aldrich 34480-2.5L	67-64-1
Argongass, komprimert	Ar	Grad 5.0 >99.999%	AGA AS Gjerdrumsveien 8 0409 Oslo, Norge	Varenr. 100921	7440-37-1

3.1.2 Laboratorieutstyr og LC-MS/MS-instrument

En oversikt over LC-MS/MS-instrumentet og laboratorieutstyret som ble benyttet i oppgaven er vist i tabell 10.

Tabell 10. Oversikt over LC-MS/MS-instrumentet og laboratorieutstyret.

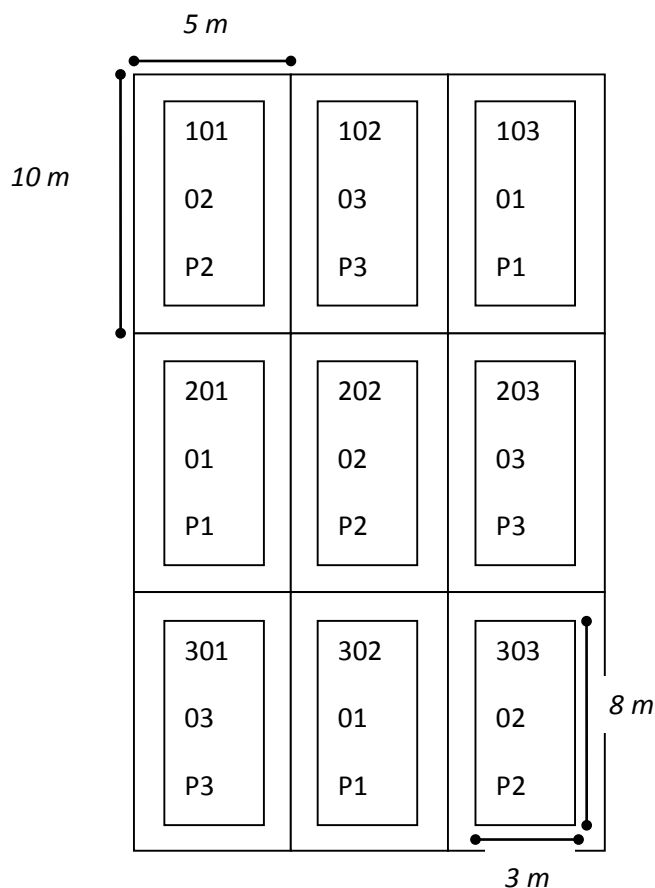
Utstyr	Produsent
Kromatografisk separator, Waters 2695 Separations Module HPLC	Waters 34 Maple Street, MA 01757
Massespektrometer, Waters Quattro Ultima Pt MS/MS	Micromass® Ltd Atlas Park, Simonsway Manchester Greater Manchester
Kolonne, Alltima™ C18 5u, lengde 150 mm, ID 2,1 mm.	Grace Davison Discovery Sciences 2051 Waukegan Road Deerfield, Illinois 60015-1899
Waters Alliance 2695 Autosampler	Waters 34 Maple Street, MA 01757
MassLynx V4.0 og QuanLynx V4.0, dataprogrammer	Micromass® Ltd Atlas Park, Simonsway Manchester Greater Manchester
50 mL teflon-sentrifugerør	-
Knivmølle, Retsch Grindomix GM200	Retsch GmbH Retsch-Allee 1-5, 42781, Germany
Glassdigler	-
50 mL pipette, Thermo Scientific Finnpiquette®	Thermo Fisher Scientific Inc 81 Wyman Street Waltham, MA 02454, USA
5 mL eppendorf-pipette	Eppendorf Nordic ApS Slotsmarken 12 DK-2970 Hørsholm, Danmark
20-200 µL Eppendorf-pipette, med Eppendorf-pipettespisser	Eppendorf Nordic ApS Slotsmarken 12 DK-2970 Hørsholm, Danmark
100-1000 µL Eppendorf Research Plus-pipette, med Eppendorf-pipettespisser	Eppendorf Nordic ApS Slotsmarken 12 DK-2970 Hørsholm, Danmark
Ristemaskin, Edmund Bühler SM	Edmund Bühler GmbH Am Ettenbach 6 D-72379 Hechingen, Germany
Sentrifuge, Eppendorf Centrifuge 5810R	Eppendorf AG, 22331 Hamburg, Germany

Sprøytefilter, Phenomenex 0,45 µm	Phenomenex® Birketoften 13 3500 Værløse, Denmark
Glassrør, 8 mL Sample vial in LABFILE™ (Amber without cap)	WHEATON 1501 North 10 th Street Millville, NJ 08332-2038, USA
Overskålsvekt, Sartorius BP2100S	Sartorius AG Weender Landstr. 94-108 37075 Goettingen, Germany
Varmeskap, WTE Binder	BINDER GmbH – Headquarters Im Mittleren Ösch 5 78532 Tuttlingen, Germany
Vannrenseapparat, MilliQ Gradient A10, Q-Gard 1 Filter for vannuttak: MILLIPAK® 0,22 µm	Merck Millipore Headquarters 290 Concord Road Billerica, MA 01821 978.715.4321, USA
LC-vials, 2 mL clear wide opening crimp vial, med 11 mm cap	Agilent Technologies 5301 Stevens Creek Blvd Santa Clara CA 95051, USA

3.2 Metode

3.2.1 Sprøyting av forsøksfelt og uttak av jordprøver

Før sprøyting av forsøksfelt ble det tatt ut jordprøver, som vist i tabell 12. Sprøyting av forsøksfeltene Stjørdal og Klepp ble utført henholdsvis 22.juni 2012 og 23. mai 2012. Etter sprøyting ble forsøksfeltene harvet. Både sprøyting og uttak av jordprøver ble utført i henhold til Feltforsøksplanen 1-2012 Særheim-Kvithamar [23]. Hvert forsøksfelt bestod av 9 ruter, som vist i figur 8. De 9 rutene var inndelt i P1, P2 og P3, hver med tre ruter hver. P1 ble ikke sprøytet. P1 og P3 ble sprayet med henholdsvis pesticidblanding 2 og pesticidblanding 3, med et innhold av pesticider som vist i tabell 11.



Figur 8. Et feltkart med inndelingen av forsøksfeltene i ruter. P1 er usprøytet, P2 er sprøytet med pesticidblanding 2 og P3 er sprøytet med pesticidblanding 3. De usprøytete rutene har leddnummer 01, ruter sprøytet med P2-blanding har leddnummer 02, mens ruter sprøytet med P3-blanding har leddnummer 03. Figur er hentet fra Feltforsøksplanen 1-2012 Særheim-Kvithamar [23]. ©Bioforsk

Tabell 11. En oversikt over innholdet i de to pesticidblandingene 2 og 3. Den beregnede mengden av plantevernmiddel-produkt og pesticider per arealenhet på de sprayede jordrutene er oppgitt [23].

Pesticid-blanding	Plantevern-middel-produktnavn	Bruksområde	Normert arealdose av produkt, NAD	Pesticid	Pesticid-innhold i produkt	Mengde pesticid/dekar (g/daa)
2	Signum	Soppmiddel	100 g/daa	Boskalid	267 g/kg	26,7
				Pyraklostrobin	67 g/kg	6,7
	caLypso sc 480	Insektmiddel	20 mL/daa	Tiaklopid	480 g/L	9,6
3	Stratego EC250	Soppmiddel	100 mL/daa	Trifloksystrobin	125 g/L	12,5
				Propikonazol	125 g/L	12,5
	Forbel 750	Soppmiddel	100 mL/daa	Fenpropimorf	750 g/L	75
	Basagran SG	Ugrasmiddel	160 g/daa	Bentazon	870 g/kg	139,2

Det ble gjennomført prøveuttak over en forsøksperiode som varte omtrent 1 år (314 dager for Stjørdal og 363 dager for Klepp), en oversikt over tidspunktet og omfanget av hvert prøveuttak i forsøksperioden er vist i tabell 12. For de fleste uttak ble det tatt prøver fra 3 ulike jordsjikt (0-10 cm, 10-30 cm, 30-50 cm) i hver rute, med 3 stikk for hvert jordsjikt, som vist i tabell 12 [23]. Prøvene ble fryst ned og transportert til Bioforsk i Ås, hvor de ble oppbevart i fryserom fram til prøveoppbehandling.

Tabell 12. Oversikt over uttak av jordprøver i forsøksfeltene Stjørdal og Klepp.

Stjørdal			Klepp		
Dato for uttak	Tid (dager)	Prøver tatt ut	Dato for uttak	Tid (dager)	Prøver tatt ut
22.06.2012 (før sprøyting)	0	27 prøver, P1 (0-10 cm, 10-30 cm, 30-50 cm)	21.05.2012 (før sprøyting)	0	27 prøver, P1 (0-10 cm, 10-30 cm, 30-50 cm)
22.06.2012 (etter sprøyting)	0	27 prøver P1, P2, P3 (0-10 cm)	23.05.2012 (etter sprøyting)	0	27 prøver P1, P2, P3 (0-10 cm)
06.07.2012	14	27x2 prøver P2, P3 (0-10 cm, 10-30 cm, 30-50 cm)	06.06.2012	14	27x2 prøver P2, P3 (0-10 cm, 10-30 cm, 30- 50 cm)
06.08.2012	45	27x2 prøver P2, P3 (0-10 cm, 10-30 cm, 30-50 cm)	06.07.2012	44	27x2 prøver P2, P3 (0-10 cm, 10-30 cm, 30-50 cm)
06.09.2012	76	27x2 prøver P2, P3 (0-10 cm, 10-30 cm, 30-50 cm)	08.08.2012	77	27x2 prøver P2, P3 (0-10 cm, 10-30 cm, 30-50 cm)
09.10.2012	109	27x2 prøver P2, P3 (0-10 cm, 10-30 cm, 30-50 cm)	06.09.2012	106	27x2 prøver P2, P3 (0-10 cm, 10-30 cm, 30-50 cm)
02.05.2013	314	27x3 prøver P1,P2, P3 (0-10 cm, 10-30 cm, 30-50 cm)	04.10.2012	134	27x2 prøver P2, P3 (0-10 cm, 10-30 cm, 30-50 cm)
			21.05.2013	363	27x2 prøver P1,P2, P3 (0-10 cm, 10-30 cm, 30-50 cm)

3.2.2 Opparbeiding av jordprøver

Jordprøveposene ble tatt ut av fryserommet og tint ved romtemperatur. Hver pose ble veid, og steinene ble fjernet og veid for hver pose. De tre stikk som var tatt fra samme rute og samme jordsjikt ble blandet.

Det ble overført 10 g jord fra hver av disse blandprøvene til et 50 mL teflon-sentrifugerør, og 4-5 g jord fra blandprøven ble overført til en glassdigel for bestemmelse av vanninnhold. Bestemmelsen av vanninnholdet ble utført ved å veie digelen med jord før og etter tørking i varmeskap over natten. For hvert uttak med jordprøver ble det laget 2 kontrollprøver og 2 blankprøver, disse ble laget ut fra usprøyta jord. Sentrifugerørene med jord ble fryst ned og ekstrahert dagen etter.

Hvert sentrifugerør ble tilsatt 5 mL aceton. Sentrifugerørene ble tilsatt 26,8 µL av mellomstandard med en konsentrasjon av 25 µg/mL av pesticider og transformasjonsprodukter vist i tabell 13.

Tabell 13. Plantevernmidler og transformasjonsprodukter i mellomstandard. Konsentrasjonen av alle forbindelsene var 25 µg/mL.

Plantevernmidler	Transformasjonsprodukter
Boskalid	M02 (Tiaklopid-transformasjonsprodukt)
Pyraklostrobin	CGA 321113 (Trifloksystrobin-transformasjonsprodukt)
Tiaklopid	BF 421-2 (Fenpropimorf--transformasjonsprodukt)
Bentazon	BF500-6 (Pyraklostrobin--transformasjonsprodukt)
Fenpropimorf	
Propikonazol	
Trifloksystrobin	

Alle prøver med unntak av blankprøve B2 ble tilsatt 66,8 µL av en løsning med de interne standardene metkonazol og bentazon-D6. Prøvene ble ekstrahert ved på ristemaskin i 30 minutter, og sentrifugert ved 3000 rpm i 5 minutter. Væskefasen med ekstrakt i prøvene ble overført til hvert sitt glassrør.

Sentrifugerørene med jordprøver ble tilsatt 5 mL aceton, ristet manuelt og satt på ristemaskin i 30 minutter. Prøvene ble sentrifugert ved 3000 rpm i 5 minutter, og væskefasen med ekstrakt ble overført til glassrørene med første ekstrakt. Glassrørene ble ristet, og overført til LC-vials med sprøytefilteret Phenomenex 0.45 µm. Det ble overført 600 µL av hver filtrerte prøve over til en ny LC-vial med 200 µL metanol. Prøven ble påsatt kork og ristet.

Det ble filtrert 10 mL (med sprøytefilteret Phenomenex 0.45 µm) av den blanke jordprøven uten tilsatt intern standard over til et begerglass, dette ble tatt vare på og benyttet til kalibreringsstandardene.

3.2.3 Tillaging av kalibreringsstandarder

For hvert sett av prøver fra samme uttak, ble det laget et sett med 9 kalibreringsstandarder i LC-vials med stigende konsentrasjon av plantevernmidler og transformasjonsprodukter. To separate sett av 8 standardløsninger med blandinger av henholdsvis 7 plantevernmidler og 4 transformasjonsprodukter, en intern standard-løsning (metkonazol og bentazon-d6, hver med konsentrasjon 2 µg/mL) og det filtrerte ekstraktet av blank jordprøve B2 (uten intern standard) ble benyttet til å lage kalibreringsstandardene. De overførte volumene ved tillagingen av kalibreringsstandarder er vist i tabell 14. Standard 0 ble laget ved å blande 750 µL filtrert ekstrakt av blank jordprøve, 200 µL metanol og 50 µL intern standardløsning (metkonazol og bentazon-D6, konsentrasjon 2 µg/mL) som vist i tabell 14. Alle LC-vials ble påført kork og blandet.

Tabell 14. Overførte volumer av løsninger ved tillaging av kalibreringsstandarder med plantevernmidler og transformasjonsprodukter.

Standard-nr.	Kons. (µg/mL)	Volum av standard med 7 plantevernmidler (µL)	Volum av standard med 4 transformasjonsprodukter (µL)	Volum av IS-løsning (metkonazol + bentazon-d6) (kons. 2 µg/mL) (µL)	Volum av filtrert ekstrakt av blank jordprøve (µL)	Totalt volum (µL)
0*	0	0	0	50	750	1000
1	0,0005	100	100	50	750	1000
2	0,001	100	100	50	750	1000
3	0,005	100	100	50	750	1000
4	0,01	100	100	50	750	1000
5	0,05	100	100	50	750	1000
6	0,1	100	100	50	750	1000
7	0,5	100	100	50	750	1000
8	1,0	100	100	50	750	1000

*Standard 0 ble tilsatt 200 µL metanol for å få samme løsemiddelsammensetning som de øvrige kalibreringsstandardene.

3.2.4 Analyse med LC-MS/MS

Prøvene og kalibreringsstandardene ble analysert på en Waters 2695 Separations Module HPLC tilkoblet en Waters Quattro Ultima Pt MS/MS. Kolonnen var en Alltima™ C18 5u silikakolonne med lengde 150 mm og ID: 2,1 mm. Instrumentet ble styrt ved bruk av dataprogrammet MassLynx V4.0 (Micromass® Ltd). Analysemetoden var optimalisert for de utvalgte 7 pesticider og 4 transformasjonsprodukter av forsker Marit Almvik ved Bioforsk. Innstillingene for autosampler, kolonne og MS/MS-instrument under analysene er vist i tabell 29 i appendiks 1.

Det ble benyttet to mobilfaser, den første var 5 mM maursyre (HCOOH) i MilliQ-vann og den andre var ren metanol. Før analyse ble kolonnen skylt i 3 min med 100 % 5mM HCOOH med en volumstrøm på 7 mL/min, og deretter skylt i 3 min med 100 % metanol med en volumstrøm på 7 mL/min. Ved hjelp av dataprogrammet MassLynx V4.0 (Micromass® Ltd) ble det satt opp en sekvens for analyse av hvert sett med prøver, kontrollprøver, blindprøver og kalibreringsstandarder. Rekken med kalibreringsstandarder ble analysert før prøvene og deretter en gang til etter prøvene for bedre nøyaktighet av kalibreringskurven. Prøvene ble injisert med Waters Alliance 2695 Autosampler, og injeksjonsvolumet var 5 µL. Ved analysen av prøvene var volumstrømmen 0,30 mL/min og kolonnetemperaturen 30 °C. Gradientprogrammet for analysen er vist i tabell 15.

Tabell 15. Gradientprogram for analysen med LC-MS/MS.

Tid (min)	Mobilfase 1: 5 mM HCOOH (%)	Mobilfase 2: Metanol (%)
0,00	75	25
7,00	5	95
11,00	5	95
11,10	75	25
15,00	75	25

MS/MS-instrumentet benyttet Selected reaction monitoring (SRM) med elektroprayonisering (ESI) som ionekilde. Elektroprayonisering ble utført med positiv og negativ ionemodus for ulike analytter som vist i tabell 17. Kollisjonsgassen i MS/MS var argon med en renhetsgrad på 5.0. Innstillingene for MS/MS med ESI var en kapillærspenning på 3,0 kV, en kildetemperatur på 120 °C, en desolvation-temperatur på 350 °C, en cone-gasstrøm på 95 L/h og desolvation-gasstrøm på 624 L/h

Produktionet med størst intensitet etter fragmentering av prekursor-ionet fra hver analytt ble benyttet til kvantifisering, og betegnes kvantifiseringsion. I tillegg ble et annet ion målt for hver analytt for sikker påvisning av analytten, dette ionet ble betegnet sekundært ion. Det ble benyttet optimaliserte verdier for cone voltage og kollisjonsenergi for å oppnå den fragmenteringen av analytten som ga størst intensitet for de valgte SRM-overganger for analyttens kvantifiseringsion og sekundærion, som vist i tabell 17. En analytts retensjonstid og ioneratio i prøve og kalibreringsstandard ble også sammenlignet for identifisering, og er vist i tabell 17.

Tabell 17. Retensjonstid, ioneratio og ionemodus ved ESI for forbindelsene og SRM-overganger, cone voltage og kollisjonsenergi for kvantifiseringsioner og sekundære ioner.

Forbindelse	Retensjonstid (min)	Ioneratio	Ione-modus ESI	SRM-overgang kvantifiseringsion (Prekursor-ion > produksjon)	SRM-overgang sekundært ion (Prekursor-ion > produksjon)	Cone voltage kvant. ion (V)	Cone voltage sekundært ion (V)	Kollisjonsenergi kvant. ion (eV)	Kollisjonsenergi sekundært ion (eV)
Plantevernmidler									
Tiakloprid	6,8	2,6	ESI +	253 > 126,1	255 > 128,1	42	42	20	20
Propikonazol	10,6	1,3	ESI +	342,12 > 158,99	342,12 > 69,18	64	64	25	20
Pyraklostrobin	10,6	2,2	ESI +	388,1 > 194,1	388,1 > 163,1	67	67	12	24
Bentazon	7,9	2,6	ESI -	239,1 > 175,09	239,1 > 196,98	113	113	16	16
Boskalid	9,6	3,5	ESI +	343,07 > 307,16	343,07 > 271,17	75	75	20	30
Fenpropimorf	8,7	7,1*	ESI +	304,32 > 147,13	304,32 > 116,14	64	64	25	25
Trifloksystrobin	10,8	2,6	ESI +	409,16 > 186,03	409,16 > 206,11	35	35	20	15
Transformasjonsprodukter									
M02 (Tiakloprid-transformasjonsprodukt)	5,4	0,4	ESI +	271,03 > 228,1	271,03 > 125,99	56	56	12	20
CGA 321113 (Trifloksystrobin-transformasjonsprodukt)	10,4	4,8	ESI +	395,13 > 186,03	395,13 > 145,02	42	42	23	35
BF 421-2 (Fenpropimorf-transformasjonsprodukt)	6,6	29,3	ESI +	334,25 > 107,05	334,25 > 117,05	70	70	32	28
BF500-6 (Pyraklostrobin-transformasjonsprodukt)	13,5-13,6	1,9	ESI +	634,4 > 216,24	634,4 > 440,44	85	85	29	29
Interne standarder									
Metkonazol	10,7	-	ESI +	320,19 > 70,13	-	49	-	20	-
Bentazon-d6	7,9	-	EIS -	245,01 > 131,95	-	59	-	24	-

*Fenpropimorf hadde svært varierende ioneratio, fordi topparealet for sekundært ion varierer mye. Dette skyldes interferens.

4 Resultater

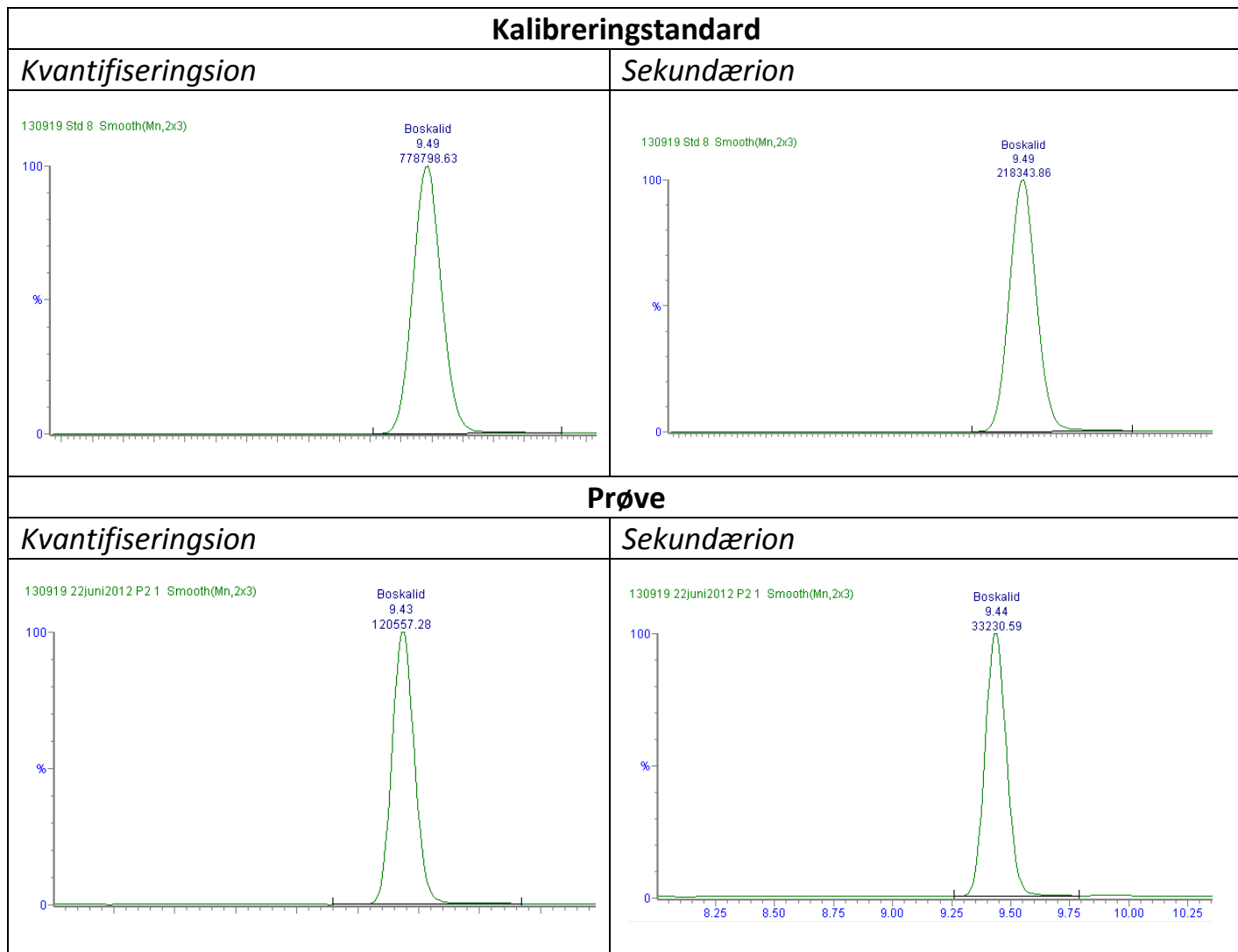
4.1 Kjemisk analyse

4.1.1 Identifisering og integrering av topper

Topper for plantevernmidler, transformasjonsprodukter og interne standarder ble identifisert ved bruk av bestemte SRM-overganger ved Selected reaction monitoring (SRM) i MS/MS-instrumentet som vist i tabell 17. Retensjonstider, ioneratio og toppene for kvantifiseringsion og sekundært ion for hver analytt ble sammenlignet. En oversikt over retensjonstider for forbindelsene, ioneratio, SRM-overganger for kvantifiseringsioner og sekundære ioner er vist i tabell 17. Et eksempel på sammenligning av toppene for kvantifiseringsion og sekundært ion for samme analytt i henholdsvis prøve og kalibreringsstandard er vist i tabell 18.

Integrering av toppene for å beregne toppareal ble utført ved hjelp av programmet QuanLynx V4.0 (Micromass® Ltd). Integreringen av hver forbindelse i hvert kromatogram ble undersøkt manuelt for å sjekke at integreringen var utført på en korrekt måte av programmet. Feilaktig integrerte topper ble rettet opp.

Tabell 18. Et eksempel på sammenligningen av topper for kvantifiseringsion og sekundært ion i en kalibreringsstandard og en prøven ved bruk av Selected reaction monitoring (SRM). Disse toppene er for boskalid.



4.1.2 Kalibreringskurver

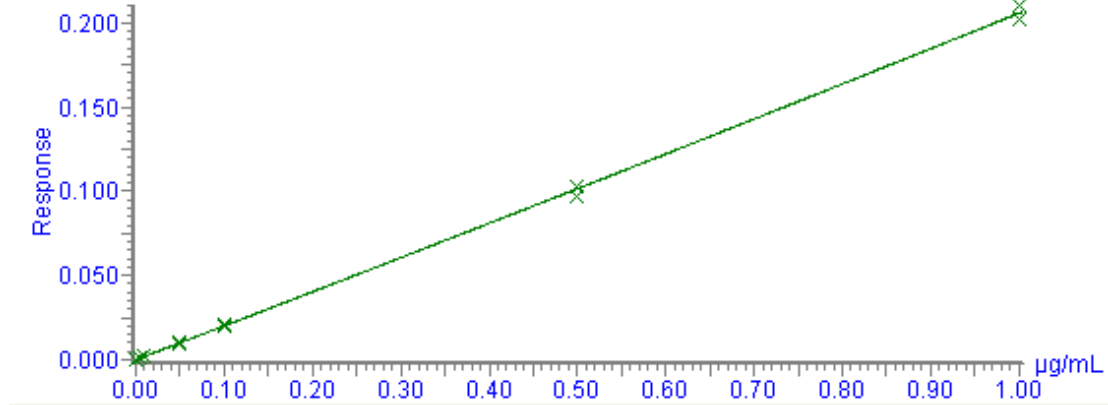
Hvert av de 7 plantevernmidlene og 4 transformasjonsproduktene i kalibreringsstandardene fikk tildelt sin interne standard, som vist i tabell 19.

Tabell 19. Oversikt over tildelt intern standard for alle plantevernmidler og transformasjonsprodukter.

Forbindelse	Intern standard
<i>Plantevernmidler</i>	
Tiaklopid	Metkonazol
Propikonazol	Metkonazol
Pyraklostrobin	Metkonazol
Bentazon	Bentazon-d6
Boskalid	Metkonazol
Fenpropimorf	Metkonazol
Trifloksystrobin	Metkonazol
<i>Transformasjonsprodukter</i>	
M02 (Tiaklopid-transformasjonsprodukt)	Metkonazol
CGA 321113 (Trifloksystrobin- transformasjonsprodukt)	Metkonazol
BF 421-2 (Fenpropimorf- transformasjonsprodukt)	Metkonazol
BF500-6 (Pyraklostrobin- transformasjonsprodukt)	Metkonazol

Konstruksjon av kalibreringskurver for hvert stoff og beregning av prøvenes konsentrasjoner ble utført med dataprogrammet QuanLynx V4.0 (Micromass® Ltd). For hver enkelt av analyttene (pesticider og transformasjonsprodukter) og dens tilhørende interne standard ble responsfaktoren beregnet for hver kalibreringsstandard, som vist i ligning 7. Det ble laget kalibreringskurver der responsfaktoren ble plottet som en funksjon av konsentrasjon i for alle de 7 pesticidene og 4 transformasjonsproduktene, vist som figurene 31-41 i appendiks 2. Et eksempel på en kalibreringskurve er vist som figur 9.

Compound name: Tiakloprid
Coefficient of Determination: $R^2 = 0.999244$
Calibration curve: $0.00530578 * x^2 + 0.200396 * x + 4.60737e-006$
Response type: Internal Std (Ref 13), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: $1/x$, Axis trans: None



Figur 9. Et eksempel på en kalibreringskurve, der responsfaktoren er plottet som funksjon av konsentrasjon. Denne kalibreringskurven er for analytten tiakloprid, med metkonazol som intern standard. Den hører til prøvesettet for uttaket 06.09.2012 i Stjørdal.

4.1.3 Estimering av LOD og LOQ

For å estimere LOD og LOQ for hver av pesticidene og transformasjonsproduktene, ble ligning 8 og 9 benyttet. Grunnlaget for beregningene var en bestemt kalibreringsstandard for hver analytt med den konsentrasjonen av analytt som lå nærmest LOD (definert som en topp med $S/N = 3$). Kalibreringsstandardene analysert sammen med prøveuttaket i Stjørdal 06.09.2012 ble brukt til beregningene, som er vist i tabell 20. Denne metoden for beregning av LOD og LOQ gir et omtrentlig resultat. Transformasjonsproduktet BF500-6 har en mye høyere verdi for LOQ enn de andre, og det var problemer med å måle stoffet i jordprøvene og i de laveste kalibreringsstandardene.

Tabell 20. Estimering av LOD og LOQ for hver av plantevernmidlene og transformasjonsproduktene ut fra S/N for en utvalgt kalibreringsstandard med konsentrasjonen nærmest LOD. Kalibreringsstandardene ble analysert både før og etter prøvene, og det ble valgt en standard for hver av dem. LOD og LOQ er beregnet som gjennomsnitt av de to toppenes estimerte verdier for LOD og LOQ.

Plantevernmiddel	Første analyse av standardrekke			Andre analyse av standardrekke			Gjennomsnittlig resultat	
	Kalib.-standard	Beregnet konsentrasjon ut fra kalibreringskurve ($\mu\text{g/mL}$)	S/N	Kalib.-standard	Beregnet konsentrasjon ut fra kalibreringskurve ($\mu\text{g/mL}$)	S/N	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Bentazon	2	0,00073	36	1	0,00049	43	0,048	0,16
Fenpropimorf	1	0,00074	142	2	0,00008	13	0,017	0,057
Propikonazol	1	0,00034	668	1	0,00052	398	0,0027	0,0091
Pyraklostrobin	1	0,00036	13	1	0,00031	29	0,058	0,192
Tiakloprid	1	0,00043	66	1	0,0005	51	0,024	0,082
Trifloksystrobin	1	0,00051	51	1	0,00046	80	0,024	0,079
Boskalid	1	0,00062	14	1	0,00037	13	0,11	0,36
Transformasjonsprodukter								
M02	2	0,00103	21	1	0,00066	13	0,15	0,50
CGA 321113	1	0,00068	89	1	0,00048	44	0,028	0,093
BF 421-2	1	0,00034	158	1	0,00038	216	0,006	0,020
BF500-6	4	0,01033	11	4	0,01221	12	2,9	9,8

4.1.4 Kontrollprøver

For hvert sett med prøver fra en uttaksdato ble det analysert 2 kontrollprøver. Etter analyse på LC-MS/MS ble konsentrasjonen av disse forbindelsene i kontrollprøvene beregnet ved hjelp av kalibreringskurvene for hver forbindelse. Den gjennomsnittlige konsentrasjonen for hvert plantevernmiddel og hvert transformasjonsprodukt for alle kontrollprøvene for begge forsøksfeltene Stjørdal og Klepp er vist i tabell 21. Gjenfinningen ble beregnet som vist i tabell 20 basert på den nominelle konsentrasjonen 0,05025 µg/mL av alle plantevernmidler og transformasjonsprodukter i kontrollprøvene. Som vist i tabell 21 er gjenfinningen høyere enn 100 % for alle analytter bortsett fra BF 421-2.

Tabell 21. Beregnede gjennomsnittlige konsentrasjoner og gjenfinning for alle kontrollprøver med plantevernmidler og transformasjonsprodukter. Nominell konsentrasjon ved 100 % gjenfinning er 0,05025 µg/mL.

Forbindelse	Gjennomsnittlig konsentrasjon (µg/mL)	Gjenfinning (%)
Plantevernmidler		
Tiaklopid	0,059	117
Propikonazol	0,058	116
Pyraklostrobin	0,062	123
Bentazon	0,058	116
Boskalid	0,062	124
Fenpropimorf	0,057	114
Trifloksystrobin	0,063	126
Transformasjonsprodukter		
M02 (Tiaklopid-transformasjonsprodukt)	0,055	109
CGA 321113 (Trifloksystrobin-transformasjonsprodukt)	0,052	103
BF 421-2 (Fenpropimorf-transformasjonsprodukt)	0,040	79
BF500-6 (Pyraklostrobin-transformasjonsprodukt)	0,053	105

4.1.5 Plantevernmiddelkonsentrasjoner i jordsmonnet

For begge forsøksfeltene i Stjørdal og Klepp ble de tre rutene markert P2 (vist i figur 8) sprayet med pesticidmiks 1, som inneholdt pesticidene boskalid, pyraklostrobin og tiakloprid (se tabell 11). De tre rutene markert P3 ble sprayet med pesticidblanding 2, som inneholdt bentazon, fenpropimorf, propikonazol og trifloksystrobin (se tabell 11). I tillegg var det tre ruter markert P1 som ikke ble sprøytet. For hver av de 9 rutene i hvert forsøksfelt, ble det tatt ut 3 stikk fra hver av 3 dybder i jorden: 0-10 cm, 10-30 cm og 30-50 cm. I forkant av prøveopparbeidingen i laboratoriet ble de 3 stikk fra samme dybde blandet, og utgjorde én prøve.

Prøvesettet fra hver uttaksdato ble analysert sammen med et sett med standardløsninger. For hvert pesticid ble det laget en kalibreringskurve ved bruk av standardløsningene, gjennom bruk av programmet QuanLynx V4.0 (Micromass® Ltd). Kalibreringskurvene var intern standard-kalibreringskurver, der arealforholdet mellom toppen for analytt og toppen for intern standard var plottet mot konsentrasjonsforholdet mellom analytt og intern standard. Konsentrasjonene av de ulike pesticidene i hver prøve ble beregnet ved bruk av kalibreringskurvene laget i det samme programmet, og ble angitt i enheten $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Ved tillaging av prøvene med ekstrahert jord ble vekten av innveid jord notert. Prosentandelen vann i jorden i hver prøve ble beregnet ved å veie en egen prøve med samme jord i en digel før og etter tørking i varmeskap. Ved hjelp av jordvekten i hver prøve og den beregnede prosentandelen vann ble konsentrasjonen av hver forbindelse i tørr jord beregnet, angitt i enheten $\mu\text{g}/\text{g}$. Summen av jordmassene i de tre posene med stikk fra samme dybde som ble blandet før prøveopparbeidingen, ble benyttet til å beregne jordtettheten. Jordtettheten er et mål på massen av jord per arealenhet, angitt i enheten kg/dm^3 .

Den beregnede jordtettheten (enhet kg/dm^3) og den beregnede konsentrasjonen av hvert pesticid i tørr jord (enhet $\mu\text{g}/\text{g}$) ble brukt til å beregne konsentrasjonen av pesticid per arealenhet, angitt i $\mu\text{g}/\text{dm}^3$. Forsøksfeltet var inndelt i 9 ruter, hvorav 3 var merket P2 og 3 var merket P3. For hver rute merket P2 og P3 i forsøksfeltet ble det tatt prøver fra 3 dybder (0-10 cm, 10-30 cm og 30-50 cm) og konsentrasjonen av pesticid per arealenhet ($\mu\text{g}/\text{dm}^3$) for hver av de 3 dybdene ble summert. For hvert pesticid ble det dermed 3 konsentrasjonsverdier for hver uttaksdato for P2 og 3 konsentrasjonsverdier for hver uttaksdato for P3.

Det ble brukt ulik blanding med sprøytemidler til P2 og P3. De beregnede konsentrasjonsverdiene fra rutene som ble sprayet med det aktuelle pesticidet, ble benyttet til å lage en serie med datapunkter som ble brukt ved modelleringen av nedbrytningskinetikk. I denne dataserien var det dermed 3 konsentrasjonsverdier (enhet $\mu\text{g}/\text{dm}^3$) for hver uttaksdato. Prøvene fra uttaket før sprøyting ble ikke inkludert i dataserien.

For noen pesticiders dataserier ble enkelte punkter fjernet før modelleringen ble utført. Dette skyldes at de sterkt avvek fra de øvrige punktene og hadde en svært negativ påvirkning på de kinetiske modellenes samsvar med dataserien. Dataseriene for de ulike pesticidene er vist i tabell 22 for forsøksfelt Stjørdal og tabell 23 for forsøksfelt Klepp.

Tabell 22. De beregnede dataserier for alle pesticider i forsøksfelt Stjørdal, med tre konsentrasjonsverdier ($\mu\text{g}/\text{dm}^3$) for hver uttaksdato. Datapunkter som ble fjernet før modellering av nedbrytningskinetikk er uthevet og understreket.

Dato	Tid (dager)	P2			P3			
		Boskalid	Pyraklostrobin	Tiakloprid	Bentazon	Fenpropimorf	Propikonazole	Trifloksystrobin
22.06.2012	0	197,74	47,29	63,60	715,21	350,65	55,11	55,68
22.06.2012	0	138,36	32,46	47,03	702,13	361,94	52,77	55,63
22.06.2012	0	187,44	45,97	63,16	1416,02	719,79	121,78	115,74
06.07.2012	14	145,71	27,35	7,99	581,09	327,23	54,55	2,56
06.07.2012	14	201,49	37,88	8,15	553,01	273,60	46,97	2,04
06.07.2012	14	303,45	55,27	13,52	489,88	605,82	114,35	6,36
06.08.2012	45	127,30	15,43	1,99	177,28	449,00	106,48	<u>8,70</u>
06.08.2012	45	81,98	11,51	2,26	296,90	381,55	89,12	2,30
06.08.2012	45	135,25	15,14	2,10	256,39	327,10	68,54	1,44
06.09.2012	76	138,95	9,72	1,37	59,51	600,56	147,20	2,00
06.09.2012	76	141,76	12,33	1,79	30,53	107,22	16,34	0,28
06.09.2012	76	116,37	11,26	1,13	51,52	224,54	47,84	0,49
09.10.2012	109	80,08	6,03	0,80	13,61	171,41	44,46	0,00
09.10.2012	109	91,07	6,54	0,85	20,49	147,86	40,76	0,04
09.10.2012	109	225,94	22,95	<u>2,24</u>	18,15	156,74	41,46	0,00
02.05.2013	314	231,61	19,60	<u>2,42</u>	14,97	224,67	82,77	1,57
02.05.2013	314	265,50	33,57	<u>3,72</u>	18,11	142,70	41,61	1,41
02.05.2013	314	146,84	10,91	<u>2,12</u>	18,48	304,93	<u>124,06</u>	1,20

Tabell 23. De beregnede dataserier for alle pesticider i forsøksfelt Klepp, med tre konsentrasjonsverdier ($\mu\text{g}/\text{dm}^3$) for hver uttaksdato. Datapunkter som ble fjernet før modellering av nedbrytningskinetikk er uthevet og understreket.

Dato	Tid(dager)	P2			P3			
		Boskalid	Pyraklostrobin	Tiakloprid	Bentazon	Fenpropimorf	Propikonazole	Trifloksystrobin
23.05.2012	0	121,33	28,59	37,04	<u>2600,20</u>	886,76	202,16	122,84
23.05.2012	0	507,22	118,10	154,00	1878,33	633,51	161,69	95,91
23.05.2012	0	159,74	41,48	49,32	1723,63	688,96	148,69	88,47
06.06.2012	14	230,49	44,40	20,56	1041,87	565,72	115,64	24,28
06.06.2012	14	78,47	10,89	9,28	<u>3227,54</u>	1232,76	239,20	57,95
06.06.2012	14	532,56	105,39	55,58	1743,17	620,10	137,53	28,52
06.07.2012	44	283,83	51,28	12,69	370,29	351,36	99,53	7,33
06.07.2012	44	89,31	13,46	3,10	386,44	841,32	176,98	10,72
06.07.2012	44	230,75	33,24	5,78	149,85	229,22	59,67	2,08
08.08.2012	77	75,21	6,47	0,86	281,15	822,61	<u>307,22</u>	5,13
08.08.2012	77	431,61	43,44	3,79	245,52	542,40	187,22	3,60
08.08.2012	77	156,66	19,65	2,03	94,19	485,29	142,57	2,97
06.09.2012	106	96,87	6,20	0,63	22,89	297,48	108,22	1,85
06.09.2012	106	156,45	7,78	0,73	35,10	346,26	164,59	2,97
06.09.2012	106	244,33	15,00	0,91	9,97	231,45	92,76	1,38
04.10.2012	134	196,34	8,52	0,57	3,83	98,70	27,98	0,00
04.10.2012	134	210,47	11,36	0,84	0,40	46,36	15,55	0,00
04.10.2012	134	182,19	9,02	0,55	4,28	218,53	55,07	0,80
21.05.2013	363	250,67	6,88	0,63	13,32	284,44	134,21	2,19
21.05.2013	363	<u>338,49</u>	14,56	1,52	4,36	98,28	41,63	1,33
21.05.2013	363	230,62	8,71	0,62	3,30	56,97	24,07	0,00

4.1.6 Transformasjonsprodukter

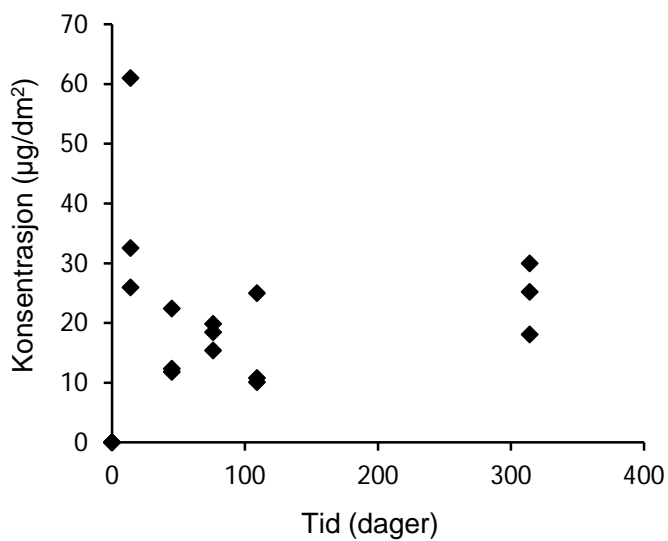
Transformasjonsproduktene BF500-6, M02, BF421-2 og CGA321113 inngikk i standard-løsningene, og det ble laget intern standard-kalibreringskurver for disse på samme måte som for pesticidene. Konsentrasjonene av disse 4 transformasjonsprodukter i prøvene ble beregnet ved bruk av intern standard-kalibreringskurvene. Beregningen av konsentrasjon per arealenhet (enhet $\mu\text{g}/\text{dm}^3$) for transformasjonsproduktene ble utført på samme måte som for pesticidene, og det ble laget dataserier med konsentrasjonsverdier for alle uttakene. Dataseriene for transformasjonsproduktene for både forsøksfelt Stjørdal og forsøksfelt Klepp er vist i tabell 24.

Tabell 24. De beregnede dataserier for de fire transformasjonsproduktene i både forsøksfelt Klepp og forsøksfelt Stjørdal, med tre konsentrasjonsverdier ($\mu\text{g}/\text{dm}^3$) for hver uttaksdato.

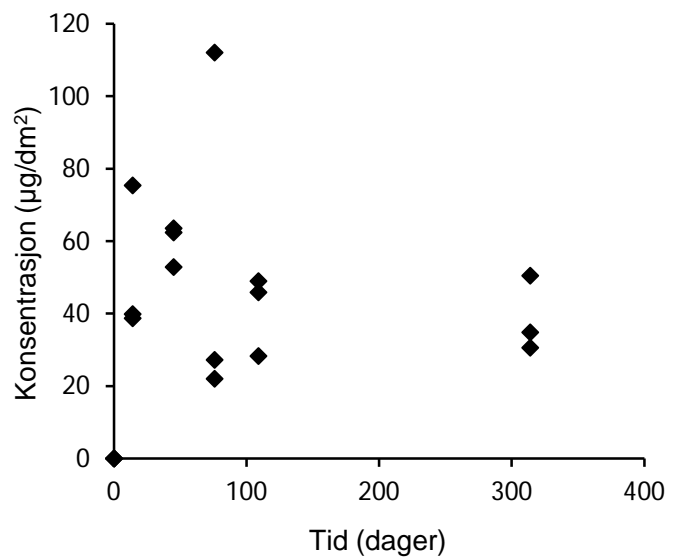
Stjørdal						Klepp					
		P2		P3				P2		P3	
Dato	Tid (dager)	BF500-6	M02	BF421-2	CGA321113	Dato	Tid (dager)	BF500-6	M02	BF421-2	CGA321113
22.06.2012	0	0,00	0,00	0,00	0,00	23.05.2012	0	0,00	3,93	0,78	91,08
22.06.2012	0	0,00	0,00	0,00	0,00	23.05.2012	0	0,00	20,16	0,85	71,19
22.06.2012	0	0,00	0,00	0,00	0,00	23.05.2012	0	0,00	4,73	0,66	66,74
06.07.2012	14	0,00	25,95	1,59	39,84	06.06.2012	14	0,00	37,35	1,89	79,42
06.07.2012	14	0,00	32,57	1,66	38,65	06.06.2012	14	0,00	12,56	5,38	180,00
06.07.2012	14	0,00	60,99	7,71	75,38	06.06.2012	14	0,00	105,11	3,14	91,66
06.08.2012	45	0,00	11,79	4,26	62,38	06.07.2012	44	0,00	55,84	2,18	54,44
06.08.2012	45	0,00	12,31	7,39	63,51	06.07.2012	44	0,00	15,86	6,06	120,91
06.08.2012	45	0,00	22,44	6,41	52,87	06.07.2012	44	0,00	51,12	2,63	45,63
06.09.2012	76	0,00	18,46	9,93	112,03	08.08.2012	77	0,00	7,19	12,91	211,76
06.09.2012	76	0,00	19,85	1,89	21,98	08.08.2012	77	0,00	62,23	11,66	140,33
06.09.2012	76	0,00	15,39	4,49	27,23	08.08.2012	77	0,00	18,13	6,79	119,70
09.10.2012	109	0,00	10,07	1,95	45,90	06.09.2012	106	0,00	5,57	9,52	69,47
09.10.2012	109	0,00	10,77	3,94	48,93	06.09.2012	106	0,00	10,34	12,59	143,62
09.10.2012	109	0,00	24,97	4,31	28,30	06.09.2012	106	14,49	14,82	6,08	53,71
02.05.2013	314	0,00	25,20	4,18	30,53	04.10.2012	134	0,00	15,72	2,78	17,65
02.05.2013	314	0,00	29,99	6,50	34,82	04.10.2012	134	16,96	12,40	0,99	20,65
02.05.2013	314	0,00	18,09	11,0	50,45	04.10.2012	134	0,00	10,73	4,29	47,28
						21.05.2013	363	0,00	11,79	5,23	13,32
						21.05.2013	363	28,75	10,57	1,77	4,36
						21.05.2013	363	19,47	7,18	1,72	3,30

For transformasjonsproduktene ble det ikke utført modellering av nedbrytningskinetikk. Grafer over endringen i konsentrasjon av M02, CGA321113 og BF421-2 i forsøksfelt Stjørdal er vist i figurene 10, 11 og 12. Det ble ikke detektert BF500-6 under forsøksperioden i Stjørdal. For forsøksfelt Klepp er endringen i konsentrasjon for transformasjonsproduktene M02, CGA321113, BF421-2 og BF500-6 vist i figurene 13, 14, 15 og 16.

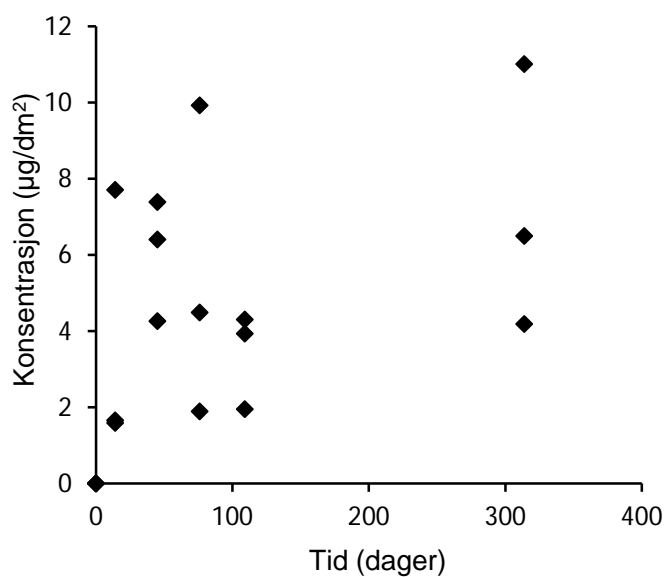
Transformasjonsprodukter i forsøksfelt Stjørdal



Figur 10. En graf for de målte konsentrasjonsverdiene av transformasjonsproduktet M02 i forsøksfelt Stjørdal.

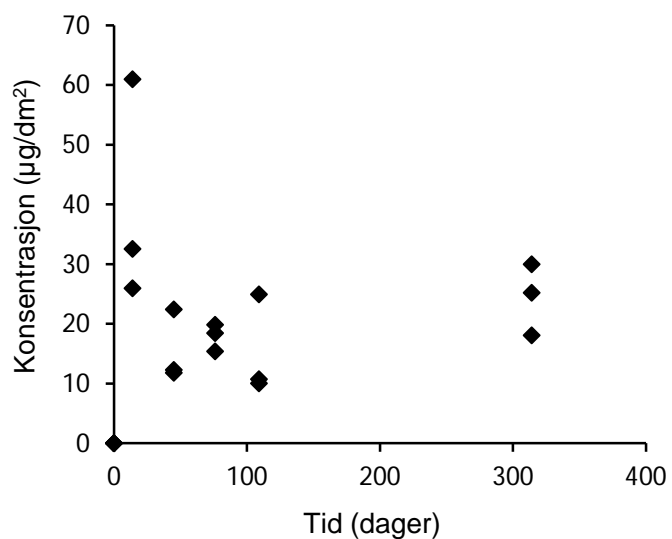


Figur 11. En graf for de målte konsentrasjonsverdiene av transformasjonsproduktet CGA321113 i forsøksfelt Stjørdal.

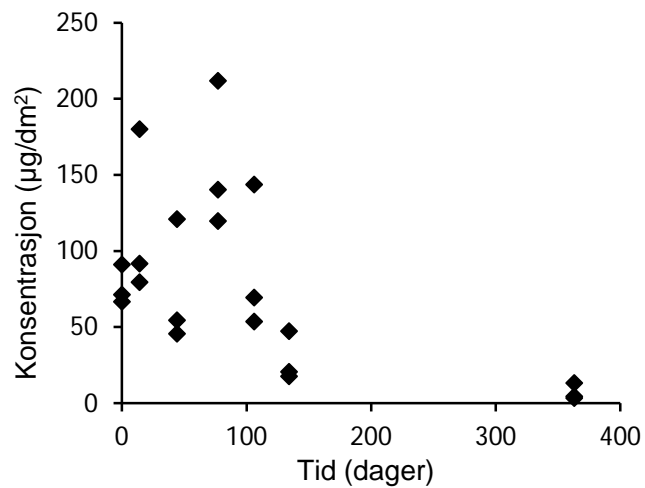


Figur 12. En graf for de målte konsentrasjonsverdiene av transformasjonsproduktet BF421-2 i forsøksfelt Stjørdal.

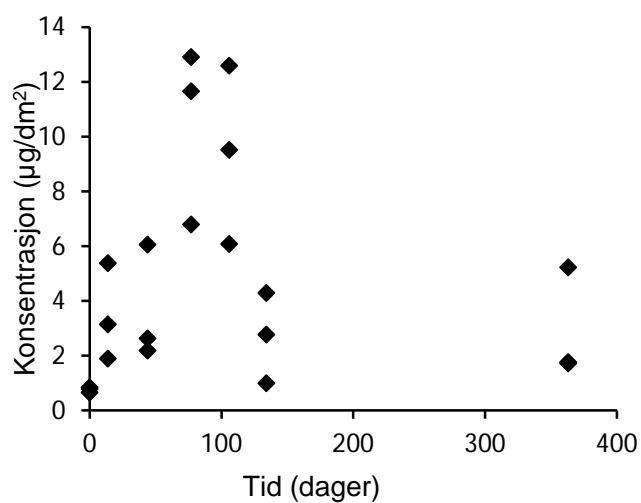
Transformasjonsprodukter i forsøksfelt Klepp



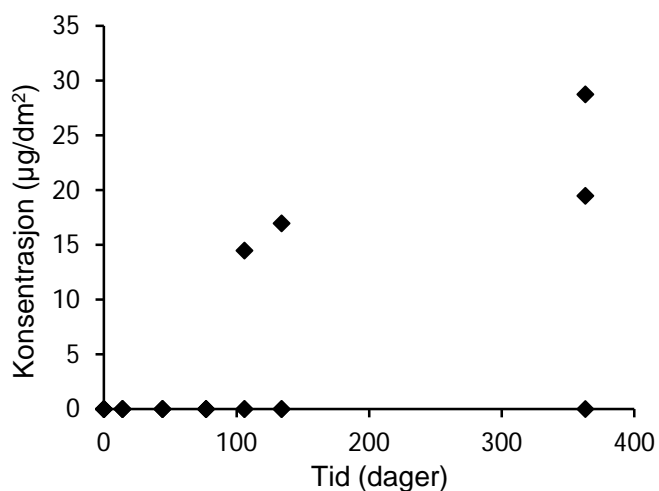
Figur 13. En graf for de målte konsentrasjonsverdiene av transformasjonsproduktet M02 i forsøksfelt Klepp.



Figur 14. En graf for de målte konsentrasjonsverdiene av transformasjonsproduktet CGA321113 i forsøksfelt Klepp.



Figur 15. En graf for de målte konsentrasjonsverdiene av transformasjonsproduktet BF421-2 i forsøksfelt Klepp.



Figur 16. En graf for de målte konsentrasjonsverdiene av transformasjonsproduktet BF500-6 i forsøksfelt Klepp.

4.2 Modelling av nedbrytningskinetikk

For hvert pesticid ble de beregnede dataseriene vist i tabell 22 for forsøksfelt Stjørdal og tabell 23 for forsøksfelt Klepp overført til ModelMaker-software. Enkelte sterkt avvikende datapunkter ble fjernet fra dataseriene, disse er markert i tabell 22 og tabell 23. Hver av de 4 kinetiske modellene brukt i oppgaven (SFO, FOMC, DFOP, HS) ble forsøkt tilpasset nedbrytningsdata for hvert plantevernmiddel. Verdiene for parametrene i hver modell ble bestemt gjennom optimalisering. I en del tilfeller var det ikke mulig å få en bestemt kinetisk modell til å passe dataserien for et pesticid gjennom optimalisering. Det ble beregnet standardavvik for alle parametre og en regresjonskoeffisient (r^2) for hver optimalisert kinetisk modell.

Verdier og standardavvik for parametrene og beregnet regresjonskoeffisient (r^2) for hver kinetisk modell ble overført til et Excel-ark for statistisk bearbeiding. For hver av de kinetiske modellene ble det laget en kurve for nedbrytningen av pesticidet ut fra de optimaliserte parametrene. Chi-kvadrat-avvik (χ^2 avvik) og Residual Sum of Squares (RSS) ble beregnet for hver kinetisk modell. For mange pesticider var det ikke mulig å danne en optimalisert kinetisk modell for alle de fire typene modell (SFO, FOMC, DFOP, HS).

I de kinetiske modellene SFO, DFOP og HS inngår beregnede k-verdier, én k-verdi for SFO-modellen og to k-verdier for modellene DFOP og HS. For den kinetiske modellen FOMC inngår parameterne α og β . HS-modellen har et bruddpunkt der kurven endrer helning, denne betegnes med verdien t_b . Alle de kinetiske modellene har en startverdi for konsentrasjonen av pesticidet, betegnet M_0 . Det ble utført en t-test for k-verdiene til modellene SFO, DFOP og HS, der verdien og standardavviket for k ble benyttet til å bestemme om verdien er signifikant.

For hvert pesticid ble det valgt en foretrukket modell for nedbrytningskinetikk. Ved valg av foretrukket modell ble det foretatt en helhetlig vurdering av de ulike modellenes egnethet til å beskrive de målte data for nedbrytning. I denne vurderingen ble det sett på den beregnede kurven for hver kinetisk modell og hvor godt den stemte overens med datapunktene. I tillegg ble standardavviket for parameterne til hver kinetisk modell og resultatene av t-testen for hver k-verdi vurdert.

Et eksempel på valg av foretrukket kinetisk modell for et pesticid er vist i tabell 25, som viser de statistiske data for de ulike kinetiske modeller laget for fenpropimorf i forsøksfeltet Klepp. Som vist i tabell 25 kunne ikke modell DFOP optimaliseres for dataserien, og ble derfor utelukket som alternativ. For modell HS fungerte ikke t-testen for k_2 , og dermed ble denne også utelukket. I valget mellom modellene SFO og FOMC ble det vektlagt at Chi-kvadrat-avvik (χ^2 avvik) og Residual Sum of Squares (RSS) er lavere for SFO, noe som indikerer at SFO-modellen passer best til dataserien. Modell SFO ble derfor valgt som foretrukket modell i dette tilfellet. En oversikt over de foretrukne kinetiske modellene for alle pesticider er vist i tabell 26, en kinetisk modell er valgt for hver av dataseriene fra forsøksfeltene i Stjørdal og Klepp.

Tabell 25. Et eksempel på valg av foretrukket kinetisk modell ved sammenligning av de statistiske verdiene for de fire kinetiske modellene SFO, FOMC, DFOP og HS. Dette eksempelet gjelder dataserien for fenpropimorf i forsøksfeltet Klepp. Modell SFO ble valgt.

Kinetisk modell	Parameter	Optimalisert verdi	Standardavvik	t-test $k \neq 0$	DT50	DT90	Regresjonskoeffisient r^2	Chi-kvadrat-avvik (χ^2 avvik)	Residual Sum of Squares (RSS)
SFO	M_0	815,1	87,06	ja	56,14	186,5	0,6661	15,70	53790
	k	0,01235	0,002897						
FOMC	M_0	825,0	100,4		52,66	234,5	0,6686	20,13	69570
	α	2,974	8,225						
	β	200,7	673,6						
DFOP*	M_0								
	g								
	K_1								
	K_2								
HS	M_0	800,4	94,89	ja	63,03	153,1	0,6699	20,83	63828
	K_1	0,01100	0,004053						
	K_2	0,01914	0,04086	nei					
	tb	76,995	193,2						

*Modellen kunne ikke optimaliseres, og fungerer ikke.

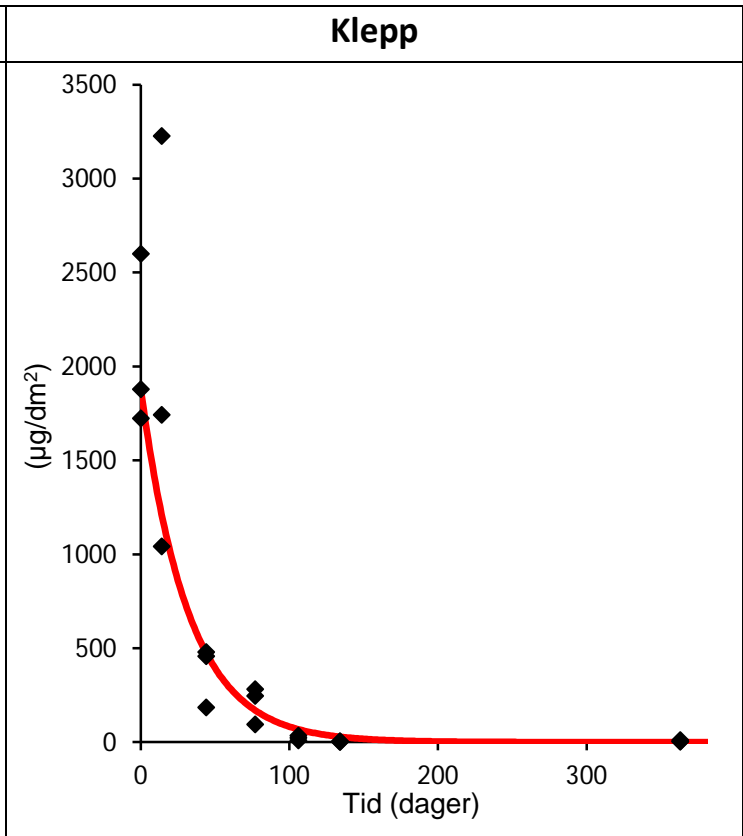
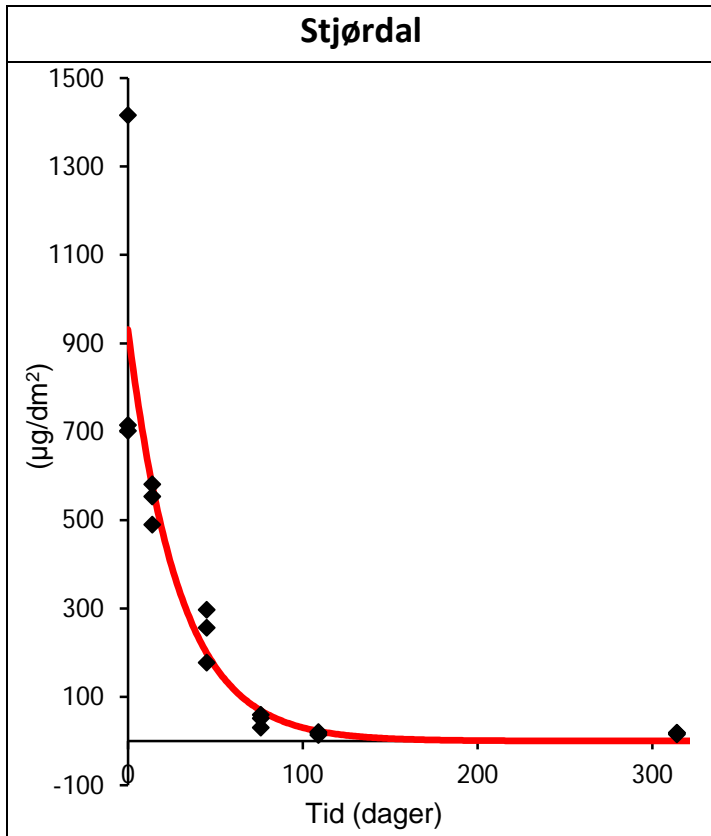
Tabell 26. Oversikt over parametre og statistiske verdier for de optimaliserte kinetiske modellene. I tabellen er vist startkonsentrasjon M_0 , ratekonstanten k (for SFO), verdiene av α og β (for FOMC), kvadrert regresjonskoeffisient (r^2), chi-kvadrat-avvik (χ^2 -avvik) og Residual Sum of Squares (RSS).

Plantevernmiddel	Felt	Kinetisk modell	Parametre	Standardavvik	$k \neq 0$	r^2	χ^2 avvik	RSS
Bentazon	Stjørddal	SFO	M_0 930,979 k 0,034286	81,271600 0,007337	ja	0,8536	6,93	4153
	Klepp	SFO	M_0 1880,7 k 0,0312711	106,021 0,00366043	ja	0,9413	14,13	52601
Fenpropimorf	Stjørddal	SFO	M_0 429,406 k 0,0037794	59,3143 0,00192101	ja	0,2514	16,49	27492
	Klepp	SFO	M_0 815,137 k 0,012347	87,0641 0,00289699	ja	0,6661	15,70	53790
Propikonazol	Stjørddal	SFO	M_0 75,3912 k 0,0011962	12,2924 0,00164532	nei	0,0368	14,64	966
	Klepp	SFO	M_0 164,932 k 0,0042922	20,5603 0,00171311	ja	0,3568	18,73	6723
Pyraklostrobin	Stjørddal	SFO	M_0 43,4177 k 0,0161601	6,276 0,00537249	ja	0,3395	32,48	548
	Klepp	SFO	M_0 62,9309 k 0,0143367	11,5668 0,00566737	ja	0,4176	5,00	28,79
Tiaklopid	Stjørddal	FOMC	M_0 57,9316 α 1,51335 β 6,34005	2,45551 1,29297 9,69026		0,9726	1,11	0,1756
	Klepp	FOMC	M_0 87,6311 α 2,51738 β 25,0997	14,9917 7,2752 96,5727		0,6054	2,40	2,134
Trifloksystrobin	Stjørddal	FOMC	M_0 75,682 α 0,729691 β 0,226889	7,59939 2,38562 3,37014		0,8486	3,28	1,799
	Klepp	FOMC	M_0 181,532 α 2,03336 β 11,781	7,08392 1,69797 14,8642		0,9672	1,82	4,083
Boskalid	Stjørddal	Ingen modell fungerte						
	Klepp	SFO	M_0 231,426 k 0,00043	42,2154 0,00144703	nei	0,0044	10,39	7523

De valgte modellene for nedbrytningskinetikk ble benyttet til å beregne halveringstiden for pesticidene, betegnet DT50. I tillegg ble det beregnet DT90, som er tidspunktet der 90 % av pesticidet var blitt nedbrutt, med andre ord at 10 % av den opprinnelige konsentrasjonen var igjen. En oversikt over de beregnede verdier for DT50 og DT90 for pesticidforsøkene er vist i tabell 27. Grafene for de valgte kinetiske modellene for de 7 pesticidene i begge forsøksfelt er vist i figurene 17-30.

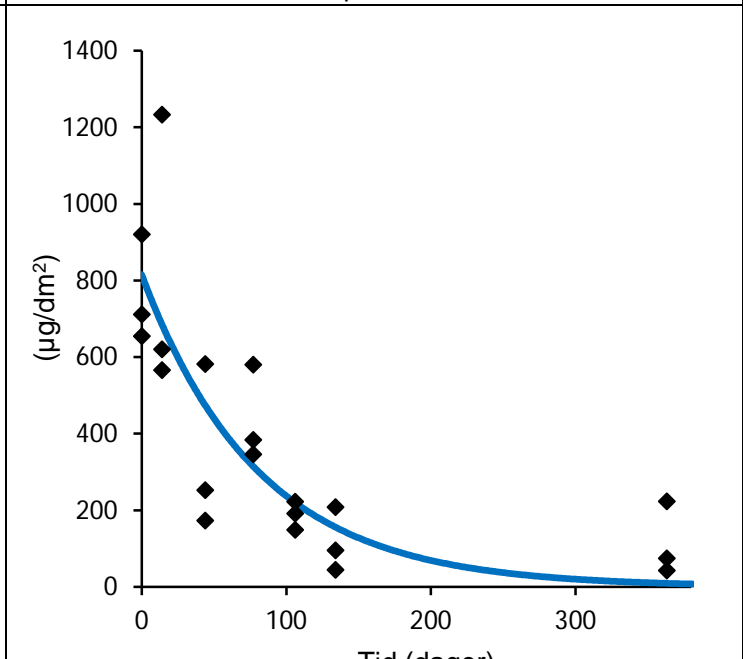
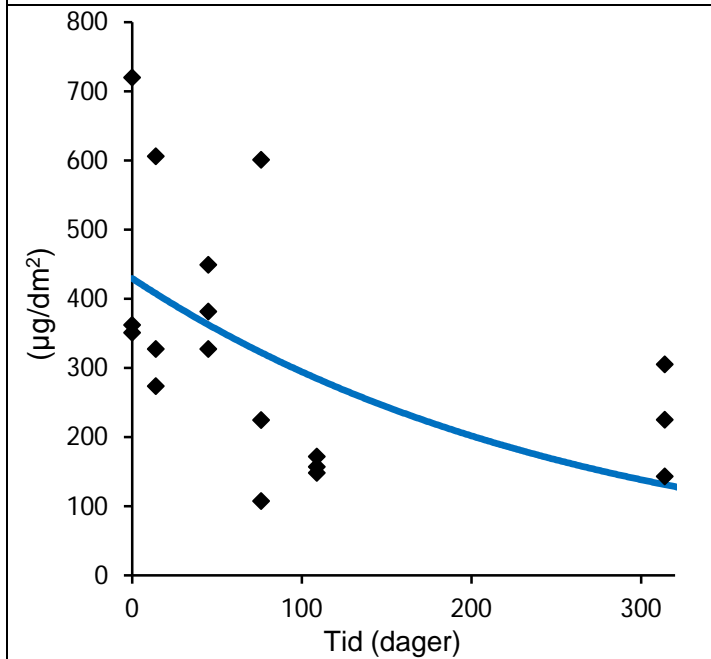
Tabell 27. Halveringstider (DT50) og tiden der 90 % av stoffet har blitt nedbrutt (DT90) beregnet ut fra de kinetiske modellene for hvert plantevernmiddel testet i Stjørdal og Klepp i tidsperioden 2012-2013.

Plantevernmiddel	Felt	DT50	DT90
Bentazon	Stjørdal	20	67
	Klepp	22	74
Fenpropimorf	Stjørdal	183	609
	Klepp	56	186
Propikonazol	Stjørdal	579	1925
	Klepp	161	536
Pyraklostrobin	Stjørdal	43	142
	Klepp	48	161
Tiaklopid	Stjørdal	3,7	23
	Klepp	8,0	38
Trifloksystrobin	Stjørdal	0,36	5,1
	Klepp	4,8	25
Boskalid	Stjørdal	Ingen modell fungerer	
	Klepp	1612	5355



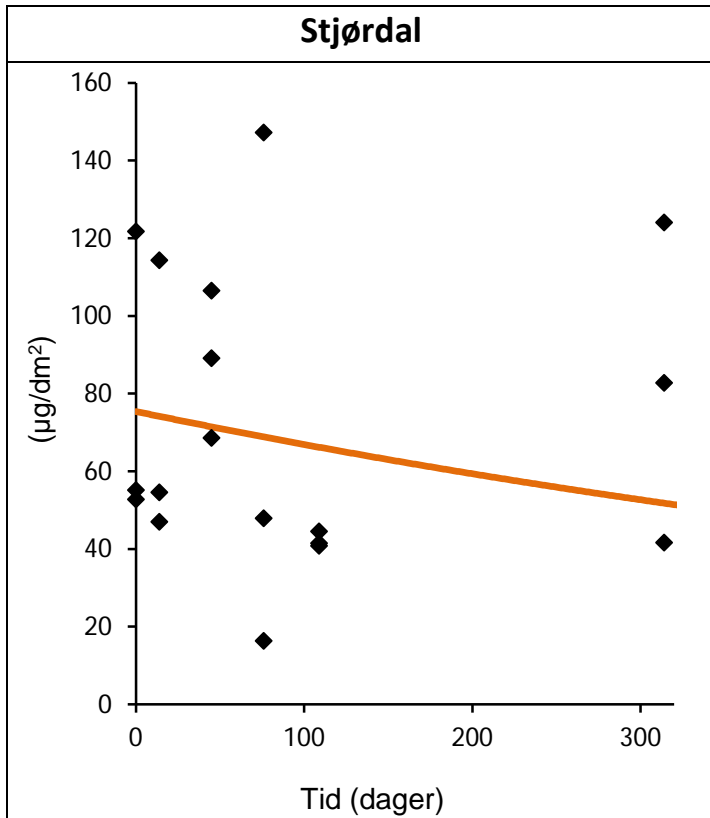
Figur 17. Den valgte kinetiske modellen SFO for bentazon i Stjørdal er vist som rød graf. De målte konsentrasjonsverdiene er vist som svarte punkter.

Figur 18. Den valgte kinetiske modellen SFO for bentazon i Klepp er vist som rød graf. De målte konsentrasjonsverdiene er vist som svarte punkter.

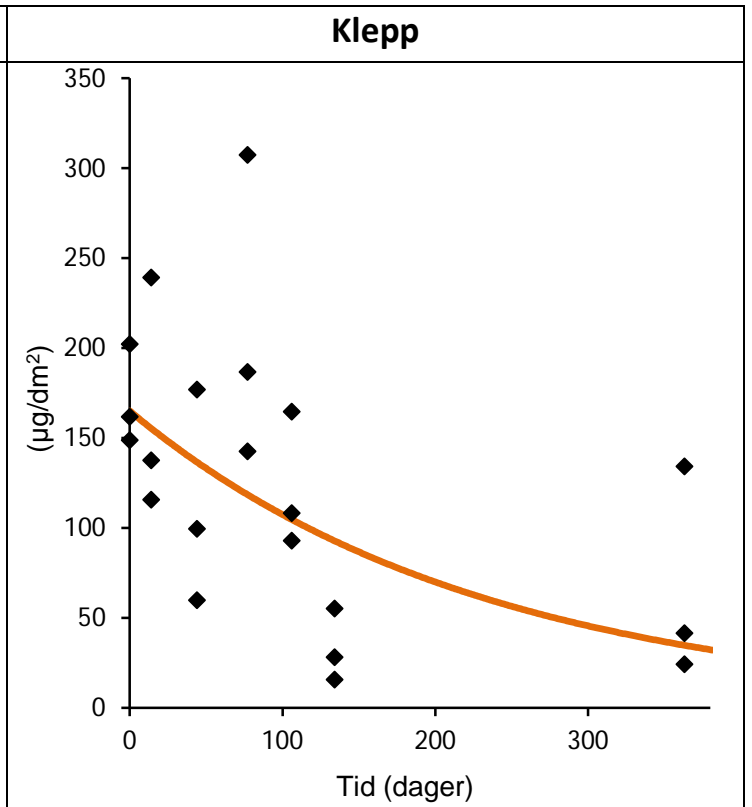


Figur 19. Den valgte kinetiske modellen SFO for fenpropimorf i Stjørdal er vist som blå graf. De målte konsentrasjonsverdiene er vist som svarte punkter.

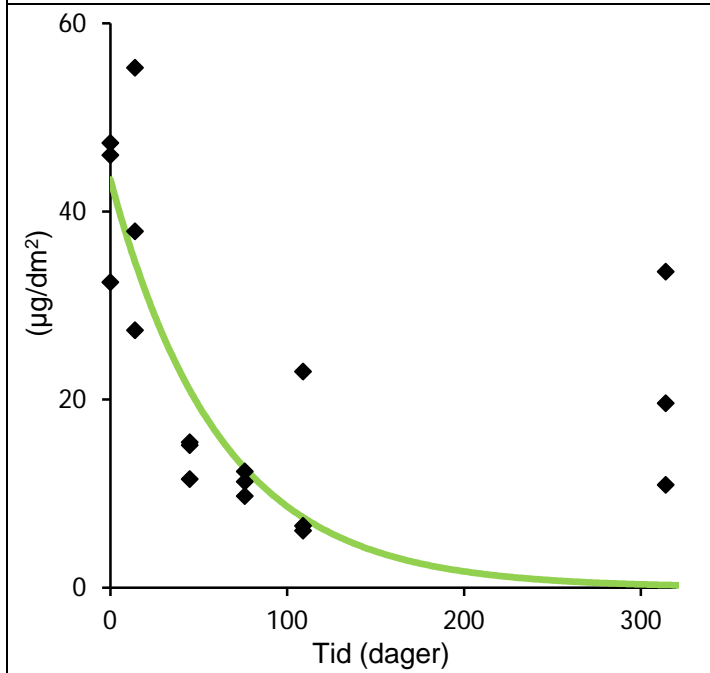
Figur 20. Den valgte kinetiske modellen SFO for fenpropimorf i Klepp er vist som blå graf. De målte konsentrasjonsverdiene er vist som svarte punkter.



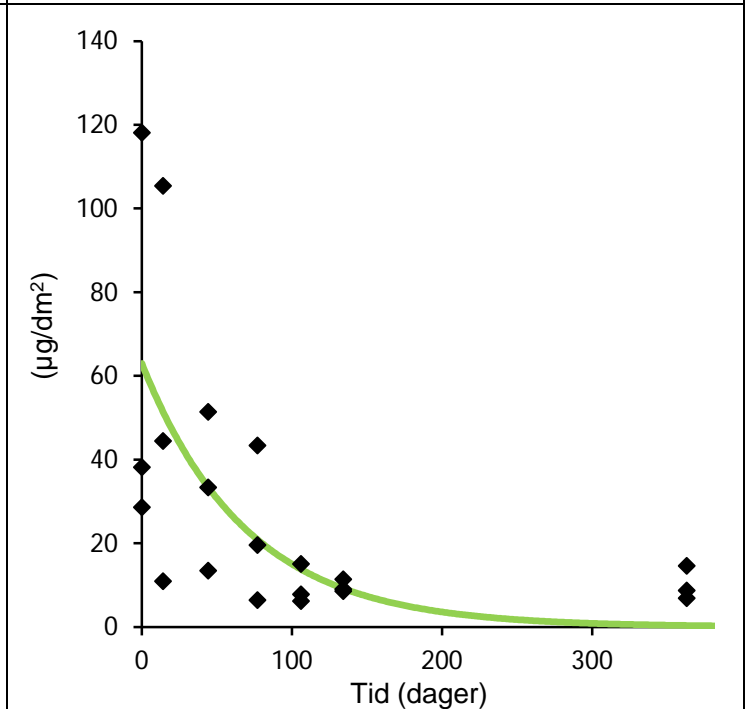
Figur 21. Den valgte kinetiske modellen SFO for propikonazol i Stjørddal er vist som oransje graf. De målte konsentrasjonsverdiene er vist som svarte punkter.



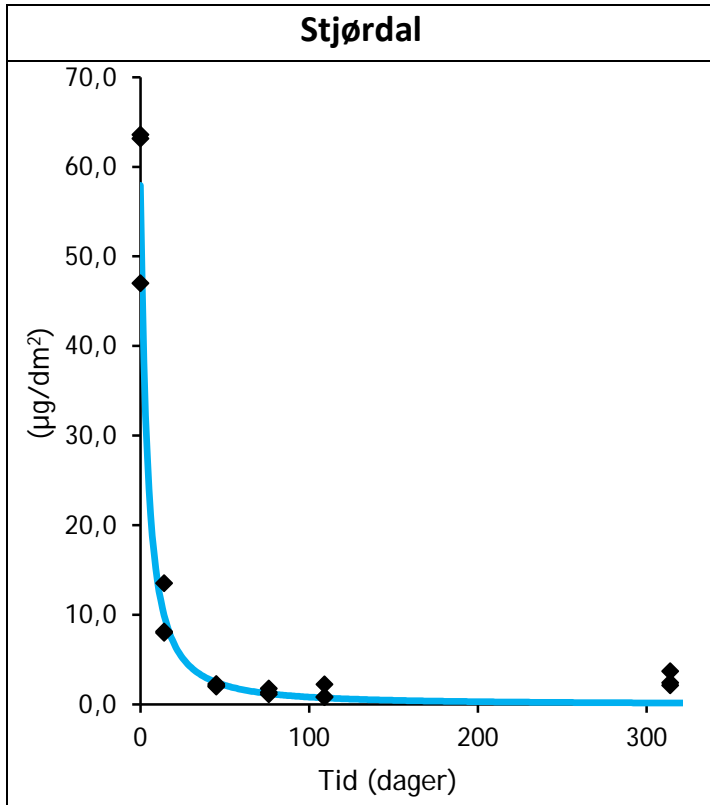
Figur 22. Den valgte kinetiske modellen SFO for propikonazol i Klepp er vist som oransje graf. De målte konsentrasjonsverdiene er vist som svarte punkter.



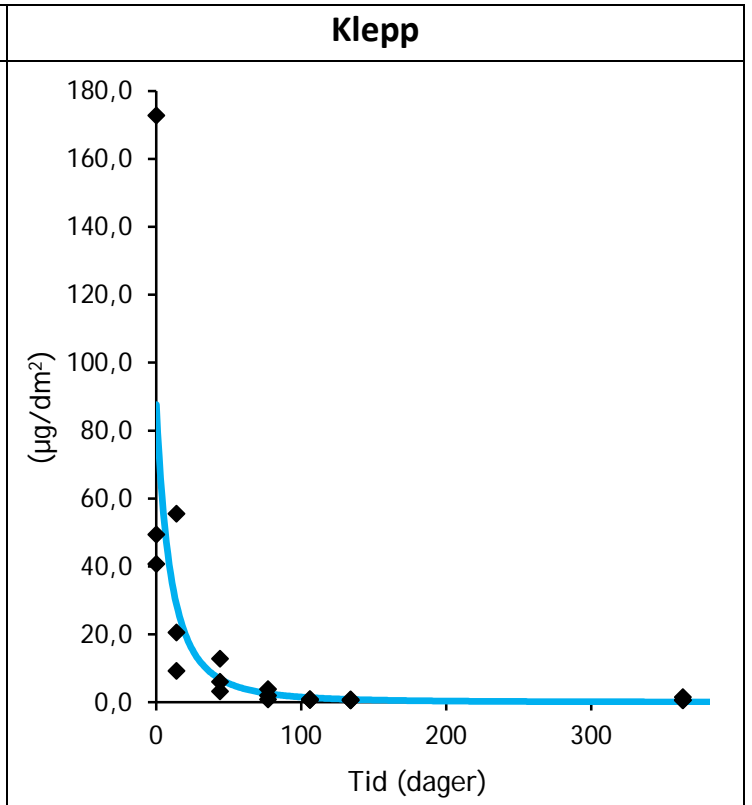
Figur 23. Den valgte kinetiske modellen SFO for pyraklostrobin i Stjørddal er vist som grønn graf. De målte konsentrasjonsverdiene er vist som svarte punkter.



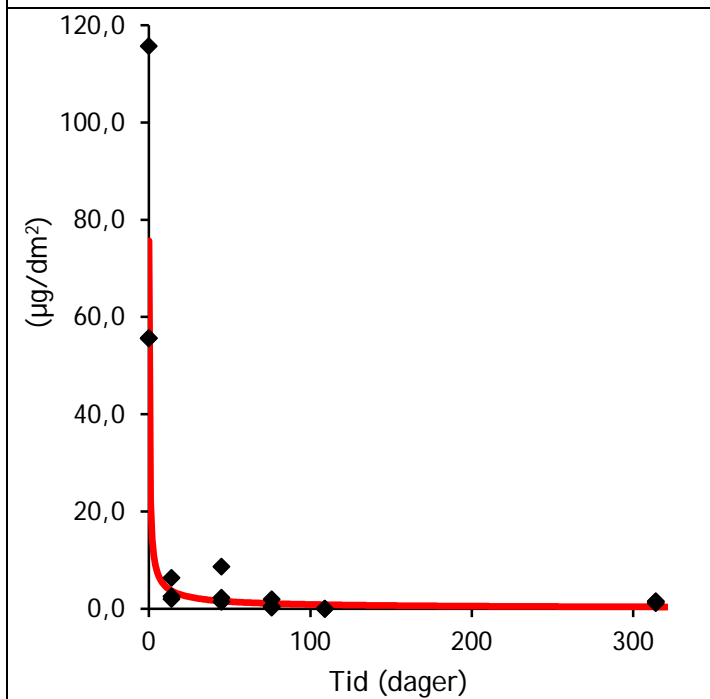
Figur 24. Den valgte kinetiske modellen SFO for pyraklostrobin i Klepp er vist som grønn graf. De målte konsentrasjonsverdiene er vist som svarte punkter.



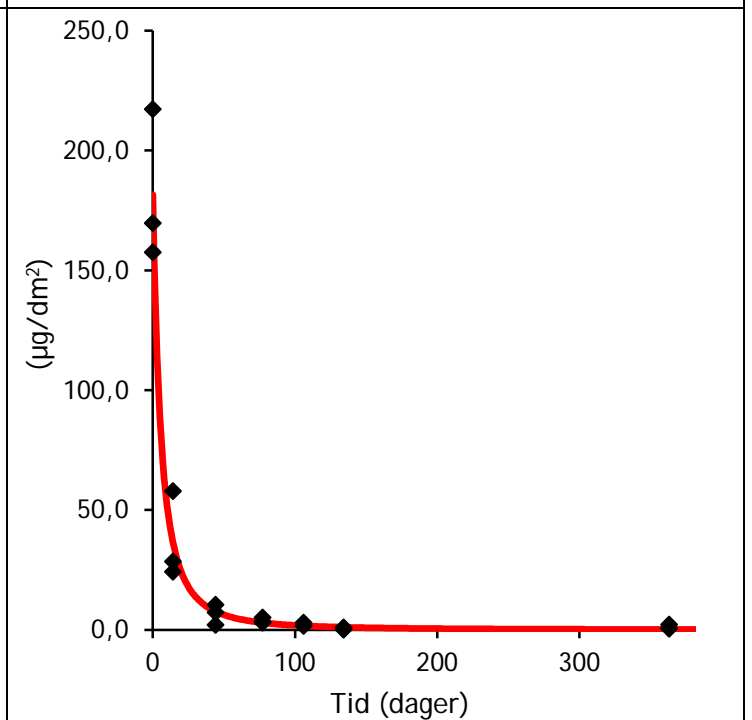
Figur 25. Den valgte kinetiske modellen FOMC for tiakloprid i Stjørødal er vist som blå graf. De målte konsentrasjonsverdiene er vist som svarte punkter.



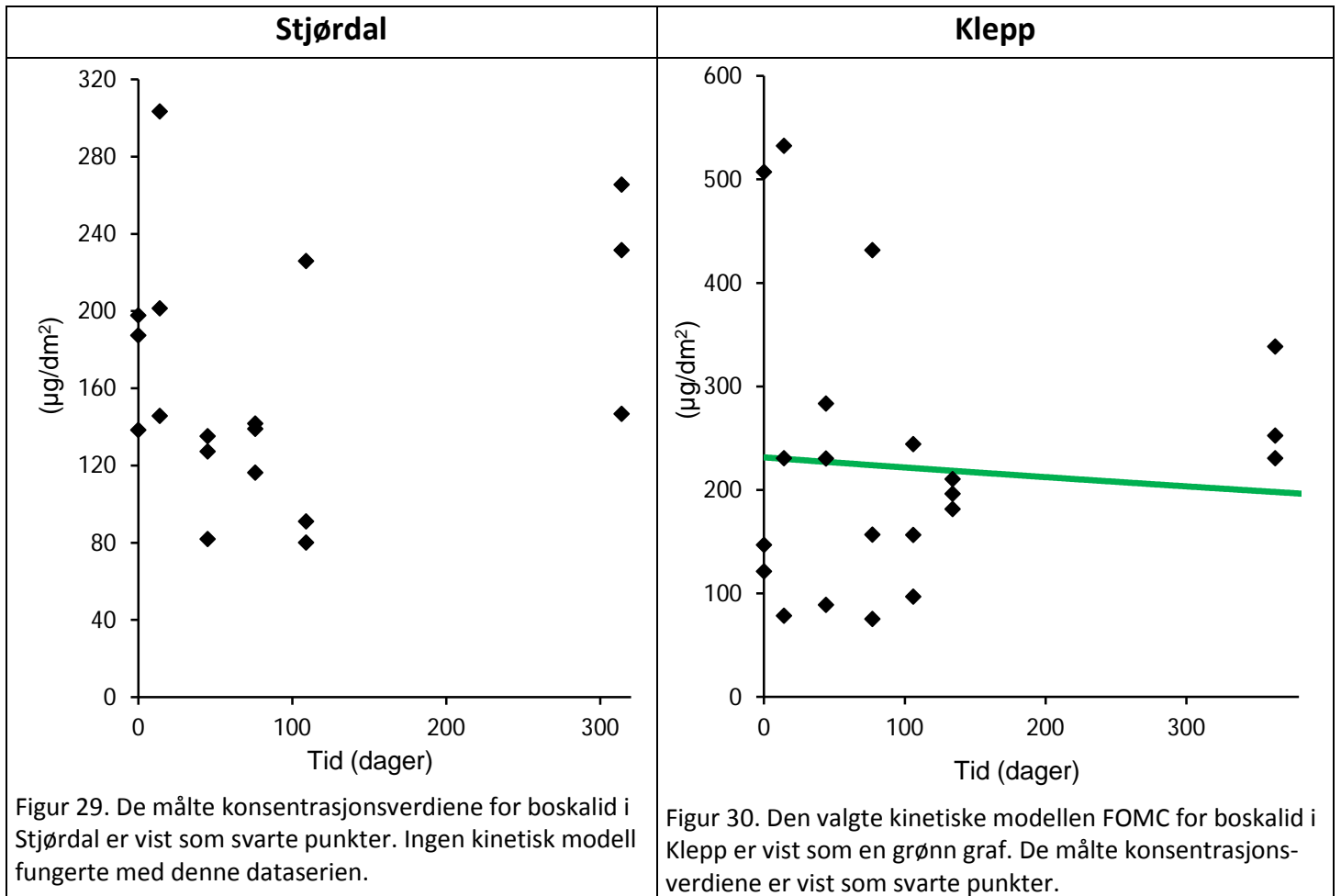
Figur 26. Den valgte kinetiske modellen FOMC for tiakloprid i Klepp er vist som blå graf. De målte konsentrasjonsverdiene er vist som svarte punkter.



Figur 27. Den valgte kinetiske modellen FOMC for trifloksystrobin i Stjørødal er vist som rød graf. De målte konsentrasjonsverdiene er vist som svarte punkter.



Figur 28. Den valgte kinetiske modellen FOMC for trifloksystrobin i Klepp er vist som grøn graf. De målte konsentrasjonsverdiene er vist som svarte punkter.



5 Diskusjon

5.1 Kvalitetskontroll

Som vist i tabell 21 har alle forbindelsene med unntak av BF 421-2 en gjenfinning som er høyere enn 100 %. Samtlige forbindelser har en gjenvinning lavere enn 130 %, og spredningen i verdien for gjenvinning mellom forbindelsene er liten. Det tyder på at tapene av forbindelser ved binding til matrix i jordprøvene har vært små. At gjenfinningen var over 100 % for alle analytter enn BF 421-2 skyldes antakelig at metkonazol (som var intern standard for alle analytter bortsett fra bentazon) har hatt en annen gjenfinning enn analyttene, slik at analyttenes konsentrasjon har vært beregnet for høyt. En eventuell liten systematisk feil vil ha svært liten betydning for den matematiske modelleringen av nedbrytningskinetikk, siden alle konsentrasjonsverdier over forsøksperioden vil bli påvirket i omtrent samme grad.

5.2 Jordkonsentrasjoner av pesticider

For hver uttaksdato ble det beregnet 3 verdier for jordkonsentrasjoner ($\mu\text{g}/\text{dm}^2$) av hvert pesticid, en for hver sprayet rute. Som vist i tabell 21 og 22 var variasjonen svært forskjellig fra ett pesticid til ett annet. Denne variasjonen hadde stor betydning for resultatet av den kinetiske modelleringen og den statistiske usikkerheten ved denne. Pesticidene bentazon (figur 17 og 18), tiakloprid (figur 25 og 26) og trifloksystrobin (figur 27 og 28) viser lav variasjon og tydelig og rask nedbrytning over tid. For fenpropimorf (figur 19 og 20), propikonazol (figur 21 og 22), og pyraklostrobin (figur 23 og 24) er variasjonen stor og nedbrytningen saktere. Boskalid (figur 29 og 30) har svært stor variasjon, samtidig som nedgangen over tid ser ut til å være svært liten.

Antallet prøver per uttaksdato har betydning for variasjonen i konsentrasjonsverdier for et pesticid, og en økning i dette antallet vil kunne gi redusert usikkerhet i den kinetiske modelleringen. De tre stikk fra samme jordsjikt ble blandet før prøveopparbeiding, og utgjorde én prøve. Denne blandingen bidrar også til større usikkerhet, og ved å ikke gjøre dette kunne variasjonen mest sannsynlig vært minket.

5.3 Om modellering av nedbrytningskinetikk

Ved modelleringen av nedbrytningskinetikk ble det benyttet fire ulike kinetiske modeller: SFO, FOMC, DFOP og HS. Alle dataseriene med nedbrytningsdata fra alle de 7 pesticidene ble testet med hver av de fire modellene.

Det ble prøvd ut ulike verdier av hver parameter, og deretter kjørt en simulering av den kinetiske modellen. Den simulerte grafen ble sammenlignet med datapunktene for dataserien med beregnede konsentrasjonsverdier. Ved grundig utprøving av ulike parameterverdier ble det i de fleste tilfeller funnet en graf som passet visuelt med datapunktene. Deretter ble det kjørt en optimalisering der ModelMaker-programmet forsøkte å finne optimale verdier for hver parameter ved gradvis endring av den foreslåtte kinetiske modellen. Optimaliseringen siktet mot lavest mulig regresjonskoeffisient (r^2), et mål på avviket mellom kurven for den kinetiske modellen og datapunktene.

I enkelte tilfeller var det ikke mulig å danne noen optimalisert modell tross mange forsøk, og den aktuelle kinetiske modellen ble derfor ikke med i vurderingen av hvilken kinetisk modell som passet best til nedbrytningsdata for et pesticid. Hockeystick-modellen (HS) antar at nedbrytningsraten endres skarpt ved et bestemt tidspunkt, som betegnes bruddpunktet (tb). For de fleste av dataseriene var det en jevn nedbrytning av pesticidet over tid. I mange tilfeller klarte derfor ikke programvaren å finne en optimalisert HS-modell, siden det ikke var mulig å identifisere noe bruddpunkt.

De uventet høye konsentrasjonsverdiene for det siste prøveuttaket for fenpropimorf (se figur 19 og 20), propikonazol (se figur 21 og 22) og pyraklostrobin (se figur 23 og 24) skapte problemer ved modellering av nedbrytningskinetikk. Dette uttaket var den 21. mai 2013 for forsøksfelt Klepp og den 2. mai 2013 for forsøksfelt Stjørdal. På dette tidspunktet hadde det gått omtrent ett år etter sprøyting. For disse tre pesticidene var den målte konsentrasjonsverdien på dette tidspunktet høyere enn ved flere av uttakene høsten 2012. Dette er vanskelig å finne en god forklaring på, men det kan skyldes at endring av årstid har påvirket de kjemiske forholdene i jordsmonnet slik at mer av pesticidet var tilgjengelig for analyse.

For SFO-modellen er den eksponentielle nedbrytningsraten konstant, og dermed vil de siste datapunktene med uventet høy verdi ha liten betydning for den optimaliserte verdien for nedbrytningsraten k . Når det gjelder modellene DFOP og HS har disse to ulike konstanter for nedbrytningsraten (k_1 og k_2) for to adskilte tidsperioder av nedbrytningen. Ved optimalisering vil de siste datapunktene med høy verdi medføre at den andre nedbrytningsraten (k_2) ofte blir negativ, fordi den målte konsentrasjonen av pesticid stiger i den andre halvdel av forsøksperioden. Siden en negativ nedbrytningsrate er umulig, ble den kinetiske modellen i slike tilfeller forkastet.

En visuell sammenligning av de ulike modellenes grafer inngikk i valget av foretrukket modell for nedbrytningen av et pesticid, men hadde ikke avgjørende betydning. Grafene til de optimaliserte kinetiske modellene lå for bentazon (se figur 17 og 18), tiaklopid (se figur 25 og 26) og trifloksystrobin (se figur 27 og 28) tett opp til de målte datapunktene, for de øvrige pesticidene var avviket mye større.

Startkonsentrasjonen M_0 kunne variere betydelig fra en kinetisk modell til en annen, og en viktig årsak til det er at de 3 beregnede konsentrasjonsverdiene for det første prøveuttaket ofte viste stor variasjon. Av den grunn ble det ikke lagt vekt på verdien av parameter M_0 og standardavviket på denne ved valg av foretrukket kinetisk modell. Av størst betydning var sammenlikning av standardavviket for de øvrige parametrene, og verdiene for korrelasjonskoeffisienten r^2 , chi-kvadrat-avvik (χ^2) og Residual Sum of Squares (RSS). For tiaklopid og trifloksystrobin ble FOMC valgt som foretrukket kinetisk modell, for alle de øvrige pesticidene ble SFO-modellen foretrukket.

5.4 De foretrukne kinetiske modeller

Grafer over de foretrukne kinetiske modeller for de 7 pesticidene er vist som figurene 17-30. Parametre og statistiske verdier for de foretrukne kinetiske modellene er vist i tabell 26, og beregnede verdier for halveringstiden (DT50) og tiden for 90 % nedbrytning (DT90) er vist i tabell 27.

Som vist i figur 17 og 18 er de kinetiske modellene for bentazon i både Stjørdal og Klepp i svært god samsvar med de målte datapunktene, som viser liten variasjon. Regresjonskoeffisienten er nær 1 for både Stjørdal ($r^2 = 0,8536$) og Klepp ($r^2 = 0,9413$). DT50 er 20 dager for Stjørdal og 22 dager for Klepp, og ligger dermed svært nær hverandre.

For fenpropimorf er variasjonen i de målte datapunktene stor som vist i figur 19 og 20, med en mye større variasjon i Stjørdal enn i Klepp. For Stjørdal er regresjonskoeffisienten svært lav ($r^2 = 0,2514$), og overensstemmelsen med målte datapunkter er dermed veldig dårlig. Overensstemmelsen er bedre i Klepp, med $r^2 = 0,6661$. Dette har medført at de kinetiske modellene har blitt veldig forskjellige, noe som gir en mye raskere nedbrytning i Klepp. For Klepp har DT50 en verdi på 56 dager, mens den i Stjørdal er 183 dager.

Variasjonen i målte datapunkter er svært høy for propikonazol som vist i figur 21 og 22. Dette har medført lave regresjonskoeffisienter for modellene for både Stjørdal ($r^2 = 0,0368$) og Klepp ($r^2 = 0,3568$). I tillegg er de målte verdiene ved slutten av forsøksperioden veldig høye, noe som også bidro til å gjøre modelleringen vanskelig og resultatet usikkert. Forskjellen i DT50-verdi for de to forsøksfeltene er stor, med 579 dager for Stjørdal og 161 dager for Klepp.

De kinetiske modellene for pyraklostrobin er vist i figur 23 og 24. I begge forsøksfeltene viser de målte datapunktene en klar og tydelig nedbrytning. De to modellene er også svært like, med DT50-verdier på 43 dager for Stjørdal og 48 dager for Klepp. De uventet høye verdiene for datapunktene ved slutten av forsøksperioden i Stjørdal (vist i figur 23) passer dårlig med den kinetiske modellen, og bidrar til at regresjonskoeffisienten for Stjørdal ($r^2 = 0,3395$) er lavere enn for Klepp ($r^2 = 0,4176$).

Nedbrytningen av tiaklopid er hurtig i begge forsøksfelt, som vist i figur 25 og 26. De kinetiske modellene passer godt, med høye regresjonskoeffisienter for både Stjørdal ($r^2 = 0,9726$) og Klepp ($r^2 = 0,6054$). Forskjellen i DT50 for de to forsøksfelt er betydelig, verdien er 3,7 dager for Stjørdal og 8,0 dager for Klepp.

For trifloksystrobin er nedbrytningen særdeles rask for begge forsøksfelt (vist i figur 27 og 28). Samsvaret mellom målte datapunkter og den kinetiske modellen er god, med regresjonskoeffisienter for Stjørdal på $r^2 = 0,8486$ og for Klepp på $r^2 = 0,9672$. Den raske nedbrytningen gjør at konsentrasjonsverdiene blir svært lave etter bare noen dager. Dette har medført at bestemmelsen av halveringstiden DT50 blir ganske usikker, med veldig stor forskjell på Stjørdal (DT50 = 0,36 dager) og Klepp (DT50 = 4,8 dager).

De målte datapunktene for boskalid (vist i figur 29 og 30) viser en mye større variasjon enn de andre pesticidene, og det er vanskelig å se noen klar nedgang i konsentrasjonen over forsøksperioden. Dette gjorde det vanskelig å modellere nedbrytningen, og kun for dataserien for Klepp var det mulig å finne en optimalisert kinetisk modell. Modellen i Klepp har svært lav regresjonskoeffisient ($r^2 = 0,0044$) på grunn av den store variasjonen. Halveringstiden DT50 ble beregnet til 1612 dager, dette er flere ganger så lenge som forsøksperioden på 363 dager og må anses som et svært usikkert resultat.

5.5 Transformasjonsprodukter

De fire transformasjonsproduktene M02, CGA321113, BF421-2 og BF500-6 ble målt, men det ble ikke gjort en matematisk modellering av disse. Dannelsen av transformasjonsprodukter skjer ved nedbrytningen av pesticider, så det er forventet at konsentrasjonen av dem vil øke i begynnelsen av forsøksperioden. Men også transformasjonsproduktene vil nedbrytes over tid som følge av mikrobiologisk aktivitet. Grafer over de målte konsentrasjonsverdiene for M02, CGA321113, BF421-2 og BF500-6 er vist i figurene 10, 11 og 12 for forsøksfelt Stjørdal og figurene 13, 14, 15 og 16 for forsøksfelt Klepp.

Den første målingen av trifloksystrobin-transformasjonsproduktet CGA321113 i forsøksfelt Klepp gir konsentrasjonsverdier på ca. 70-90 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$. Denne jordprøven ble tatt ut 23. mai 2012, etter at forsøksfeltet var sprayet med pesticidblanding tidligere samme dag. Det er vanskelig å forstå hvordan det kan ha blitt dannet så mye CGA321113 i løpet av denne korte tiden. Den første målte konsentrasjonsverdien av de øvrige transformasjonsproduktene er null eller tilnærmet null, noe som er rimelig ut fra tiden det tar før pesticidene nedbrytes.

Den store variasjonen i målte konsentrasjonsverdier de første 100 dager for alle de 4 transformasjonsproduktene gjør det vanskelig å se en klar utvikling. Det er tydelig at det har skjedd en stabilisering av konsentrasjonsnivået i mai 2013, ett år etter spraying med pesticider. Det tyder på at transformasjonsproduktene nedbrytes saktere enn pesticidene, og blir værende i jordsmonnet i vesentlig lengre tid.

5.6 Sammenligning av modelldata

Som vist i tabell 4 er det stor forskjell på innholdet av totalt organisk karbon (TOC) i jordsmonnet i Klepp og Stjørdal. Jorden på forsøksfelt Klepp inneholder 320 gram TOC per 100 g tørrstoff, mens jorden på Stjørdal inneholdt 160 gram TOC per 100 g tørrstoff. Mengden totalt organisk karbon (TOC) i jorden vil bestemme mengden med mikroorganismer. Jo større tetthet av mikroorganismer i jorden, jo raskere blir den mikrobiologiske nedbrytningen av pesticidene. Siden mengden TOC er nesten dobbelt så stor i forsøksfeltet Klepp som i forsøksfeltet Stjørdal, virker det rimelig å forvente at den mikrobiologiske nedbrytningen av pesticider skjer raskere i Klepp.

En sammenligning av den gjennomsnittlige jordtemperaturen over forsøksperioden fra mai 2012 til juni 2013 som vist i tabell 5, viser at gjennomsnittlig jordtemperatur er 6,7 °C for forsøksfelt Stjørdal og 9,3 °C for forsøksfelt Klepp. Forskjellen i nedbør og jordtemperatur i Stjørdal og Klepp synes å variere mellom månedene, og det er vanskelig å se noen klar sammenheng til de nedbrytningsmodellene som er funnet i denne oppgaven.

Som vist i tabell 28 er DT50 for fenpropimorf og propikonazol mye lavere i Klepp enn for Stjørdal. For fenpropimorf er DT50 i 183 dager i Stjørdal og 56 dager i Klepp. Når det gjelder propikonazol er DT50 på 579 dager i Stjørdal og på 161 dager i Klepp. For trifloksystrobin er DT50 kun 0,36 dager i Stjørdal og 4,8 dager i Klepp, men modelleringen av dette pesticidet var usikker på grunn av at den svært raske nedbrytningen gjorde at konsentrasjonsverdiene raskt ble svært lave. For de øvrige pesticider i tabell 28 er forskjellen i DT50 liten.

I perioden 2011-2012 ble det gjennomført nedbrytningsforsøk på forsøksfeltene Stjørdal og Klepp med de samme blandinger av pesticider som i nedbrytningsforsøkene i perioden 2012-2013 som inngår i denne masteroppgaven. Forsker Marit Almvik [39] ved Bioforsk Plantehelse har gjennomført foreløpige beregninger for forsøkene 2011-2012 i Stjørdal og Klepp, og med hennes tillatelse er disse data vist i tabell 28. I tabell 28 er også vist verdiene for DT50 og DT90 funnet ved feltforsøk gjennomført for EU som er hentet fra Pesticide Properties DataBase (PPDB) [13]. Som vist i tabell 28 utgjør verdiene for DT50 og DT90 for pesticidene hentet fra Pesticide Properties DataBase (PPDB) intervaller med stor spredning, på grunn av variasjonen i klima og jordsmonn for de mange feltforsøk som dataene er basert på.

Tabell 28. En oversikt over de beregnede verdier for DT50 og DT90 for forsøksfeltene Stjørdal og Klepp i de to forsøksperiodene 2011-2012 og 2012-2013. Intervall av verdier for DT50 og DT90 hentet fra Pesticide Properties DataBase (PPDB) [13] for tidligere feltforsøk er vist for sammenligning. Verdiene funnet i denne oppgaven er uthevet. Verdiene for perioden 2011-2012 er foreløpige data gjengitt med tillatelse av Marit Almvik [39] ved Bioforsk Plantehelse.

Plantevernmiddel	DT50					DT90				
	Stjørdal		Klepp		Feltforsøk PPDB	Stjørdal		Klepp		Feltforsøk PPDB
	2011- 2012	2012- 2013	2011- 2012	2012- 2013		2011- 2012	2012- 2013	2011- 2012	2012- 2013	
Bentazon	31	20	16	22	4-21	103	67	52	74	-
Fenpropimorf	218	183	60	56	8,8-50,6	724	609	199	186	-
Propikonazol	1570	579	241	161	17-411	5214	1925	799	536	192-2099
Pyraklostrobin	92	43	55	48	8-55	304	142	182	161	83-230
Tiaklopid	5,2	3,7	6,9	8,0	9-27	17	23	23	38	31-91
Trifloksystrobin	3,8	0,36	6,7	4,8	2-12	13	5,1	22	25	15-41
Boskalid	693	-	157	1612	28-208	2302	-	520	5355	365

En sammenligning av DT50-verdiene for alle pesticider viser at variasjonen for bentazon, pyraklostrobin og tiaklopid er liten. For disse fire forbindelsene er forskjellen mellom DT50 funnet i Stjørdal og Klepp liten, og det er også liten forskjell mellom de to forsøksperiodene. DT50-verdiene for disse forbindelsene viser en stor grad av samsvar med intervallet av verdier hentet fra PPDB.

For forbindelsene propikonazol, trifloksystrobin og boskalid er variasjonen i DT50-verdier svært stor, både mellom forsøksfeltene Stjørdal og Klepp og mellom de to forsøksperiodene. Verdiene for DT50 for forsøkene med propikonazol og trifloksystrobin i forsøksfelt Klepp funnet i perioden 2012-2013 viser et betydelig samsvar med verdiene funnet i perioden 2011-2012, og verdiene ligger på eller nær intervallet av DT50-verdier hentet fra PPDB.

I denne oppgaven var det kun mulig å finne en kinetisk modell for boskalid for nedbrytningsdata fra forsøksfelt Klepp. Den beregnede DT50-verdien for perioden 2012-2013 for forsøksfelt Klepp er på 1612 dager. Dette er over 10 ganger høyere enn DT50-verdien for boskalid i Klepp funnet i forsøksperioden 2011-2012, som var 157 dager. Verdien på DT50 på 157 for perioden 2011-2012 dager ligger innenfor intervallet av verdier hentet

fra PPDB for boskalid, som er 28-208. Verdien på 1612 dager funnet i denne oppgaven faller utenfor intervallet av verdier hentet fra PPDB. Den store variasjonen og lange halveringstiden gjør modelleringen av boskalids nedbrytningskinetikk i denne masteroppgaven veldig usikker.

Det ser ikke ut å være noen klar sammenheng mellom forskjellen i TOC-innhold av jordsmonnet i Stjørdal og Klepp og nedbrytningshastigheten av samtlige pesticider som er undersøkt i denne oppgaven. For fenpropimorf og propikonazol er DT50 mye lavere i Klepp enn i Stjørdal (som vist i tabell 28), og dette kan skyldes hurtigere mikrobiell nedbrytning i Klepp på grunn av større TOC-innhold.

6 Konklusjon

Pesticidene bentazon, fenpropimorf, propikonazol, pyraklostrobin, tiakloprid, trifloksystrobin og boskalid ble benyttet ved nedbrytningsforsøk på to forsøksfelt i henholdsvis Stjørdal og Klepp i forsøksperioden mai 2012 til juni 2013. Analyse av prøveuttak foretatt over forsøksperioden viste nedbrytning for alle pesticider. Det ble også målt konsentrasjonen av de 4 transformasjonsproduktene M02, CGA321113, BF421-2 og BF500-6, som vist i figurene 10-16. Resultatene av kvalitetskontrollen viser at alle forbindelser (med unntak av transformasjonsproduktet BF 421-2) har hatt en gjennomsnittlig gjenfinning over 100 %. Dette skyldes mest sannsynlig at metkonazol (intern standard for alle analyttene med unntak av bentazon) har hatt en noe annen gjenfinning enn de øvrige analyttene.

Ved matematisk modellering ble det laget optimaliserte modeller for nedbrytningskinetikk for hver av de 7 pesticidene som vist i tabell 26 og grafene 17-30. De kinetiske modellene ga verdier for DT50 og DT90, vist i tabell 27. Jordsmonnet i forsøksfelt Klepp har mye større innhold av totalt organisk karbon (TOC) enn jordsmonnet i Stjørdal, noe som kan gi raskere mikrobiell nedbrytning av pesticider. For fenpropimorf og propikonazol er DT50 mye lavere i Klepp enn i Stjørdal. DT50 for fenpropimorf er 183 dager i Stjørdal og 56 dager i Klepp. For propikonazol er DT50 på 579 dager i Stjørdal og på 161 dager i Klepp. For trifloksystrobin er forskjellen motsatt, der er DT50 på 0,36 dager i Stjørdal og 4,8 dager i Klepp. På grunn av den svært raske nedbrytningen av trifloksystrobin er modelleringen av dette stoffet noe usikker. Forskjellene i DT50 mellom de to forsøksfeltene er små for de øvrige pesticidene. Det er vanskelig å se en klar sammenheng mellom forskjellen i DT50-verdier og forskjellen i TOC-innhold i jordsmonnet for de to forsøksfeltene. Men denne forskjellen kan være årsaken til de mye lavere verdiene av DT50 for fenpropimorf og propikonazol i Klepp. Nedbrytningstakten for boskalid er så lav og variasjonen i datapunktene så stor at modelleringen blir svært usikker og DT50-verdiene upålitelige.

Verdiene for DT50 og DT90 funnet i denne masteroppgaven ble sammenlignet med data fra Pesticide Properties DataBase (PPDB) og foreløpige data for nedbrytningsforsøk i Stjørdal og Kleppi i perioden 2011-2012 beregnet av forsker Marit Almvik ved Bioforsk. For alle pesticider utenom boskalid passer DT50- og DT90-verdiene funnet i denne oppgaven godt med intervallene av verdier hentet fra PPDB. For å redusere spredningen i konsentrasjonsverdier og minke den statistiske usikkerheten, ville det være en fordel å ta flere prøver per uttaksdato og ikke blande sammen stikk fra samme jordsjikt i forkant av prøveopparbeidingen.

7 Litteraturliste

1. FOCUS (2006) *Guidance Document on Estimating Persistence and Degradation Kinetics from Environmental Fate Studies on Pesticides in EU Registration*. Report of the FOCUS Work Group on Degradation Kinetics, EC Document Reference Sanco/10058/2005 version 2.0.
2. Miller, J.M. (2005) *Chromatography. Concepts & Contrasts*. 2. utgave. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey. s. 285-294.
3. Miller, J.M. (2005) *Chromatography. Concepts & Contrasts*. 2. utgave. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey. s. 184-193.
4. United States Environmental Protection Agency. (s.a.) *Technical Appendix B. Physicochemical Properties for TRI Chemicals and Chemical Categories*. Risk-Screening Environmental Indicators (RSEI). Washington D.C. [online] URL: http://www.epa.gov/opptintr/rsei/pubs/technical_appendix_b_pchem_v2_3_2.pdf
5. Hoffmann, E. de, Stroobant, V. (2007) *Mass Spectrometry. Principles and Applications*. 3. utgave. John Wiley & Sons, Inc. Chichester, England. s. 189-213.
6. Harris, D.C. (2010) *Quantitative Chemical Analysis*. 8. utgave. W.H. Freeman and Company. New York. s. 109.
7. Hofsvang, T. (2009) Store Norske Leksikon, artikkel: Plantevernmidler. [online] URL: <https://snl.no/plantevernmidler> (publisert på nett 14.02.2009)
8. United States Environmental Protection Agency. (2012) *Waste and Cleanup Risk Assessment Glossary*. Washington D.C. [online] URL: <http://www.epa.gov/oswer/riskassessment/glossary.htm#b>
9. Nollet, L.M.L., Rathore, H.S. (2010) *Handbook of Pesticides. Methods of Pesticide Residues Analysis*. CRC Press, Taylor & Francis Group. USA. s. 55.
10. Harris, D.C. (2010) *Quantitative Chemical Analysis*. 8. utgave. W.H. Freeman and Company. New York. s. 519-521.
11. Schreiber, A., Pace, N. (2010) LC-MS-MS-Based Strategies for the Targeted and Nontargeted Screening of Contaminants in Food, Environmental, and Forensic Samples. *Spectroscopy*. March 01, 2010. [online] URL: <http://www.spectroscopyonline.com/node/217526?id=&pageID=1&sk=&date=>
12. Harris, D.C. (2010) *Quantitative Chemical Analysis*. 8. utgave. W.H. Freeman and Company. New York. s. 513-517.
13. University of Hertfordshire. *Pesticide Properties DataBase*. [online] URL: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm>.
14. Harris, D.C. (2010) *Quantitative Chemical Analysis*. 8. utgave. W.H. Freeman and Company. New York. s. 710-713.
15. Harris, D.C. (2010) *Quantitative Chemical Analysis*. 8. utgave. W.H. Freeman and Company. New York. s. 602-606
16. Hoffmann, E. de, Stroobant, V. (2007) *Mass Spectrometry. Principles and Applications*. 3. utgave. John Wiley & Sons, Inc. Chichester, England. s. 442
17. Hoffmann, E. de, Stroobant, V. (2007) *Mass Spectrometry. Principles and Applications*. 3. utgave. John Wiley & Sons, Inc. Chichester, England. s. 1-3
18. Nollet, L.M.L., Rathore, H.S. (2010) *Handbook of Pesticides. Methods of Pesticide Residues Analysis*. CRC Press, Taylor & Francis Group. USA. s. 1.
19. Brooks, G.T., Roberts, T.R. (1999) *Pesticide Chemistry and Bioscience. The Food-Environment Challenge*. The Royal Society of Chemistry. Cambridge. s. 313-315.

20. Nichols, J.W., Bonnell, M., Dimitrov, S.D., Escher, B.I., Han X., Kramer, N.I. (2009) Bioaccumulation Assessment Using Predictive Approaches. *Integrated Environmental Assessment and Management*. v. 5, nr 4. s. 577-597.
21. Hofsvang, T., Sletten, A. (2009) Store Norske Leksikon, artikkel: *Biologisk bekjempelse*. [online] URL: https://snl.no/biologisk_bekjempelse (publisert på nett 14.02.2009)
22. Hofsvang, T. (2009) Store Norske Leksikon, artikkel: *Integrert bekjempelse*. [online] URL: https://snl.no/integrert_bekjempelse (publisert på nett 14.02.2009)
23. Bioforsk (2012). *Feltforsøksplan. Studier av nedbryting og utlekking av persistente plantevernmidler i norsk jord og klima: Særheim og Kvithamar. Plan nr: 01/2012, utgave 1. Prosjektnr.: 1110417 Plantevernmidlers nedbryting under norske forhold*. Bioforsk Plantehelse, seksjon pesticidkjemi. Ås.
24. Wikipedia Commons. [online] URL: <http://commons.wikimedia.org/wiki/Hovedside>.
25. Brooks, G.T., Roberts, T.R. (1999) *Pesticide Chemistry and Bioscience. The Food-Environment Challenge*. The Royal Society of Chemistry. Cambridge. s. 291-293.
26. Almvik, M., Bolli, R., Christiansen, R., Odenmarck, S., Prestmoen, K. (2010) *Nedbryting og utvasking av persistente pesticider i norske jordtyper (1110417)*. Bioforsk Plantehelse, seksjon for pesticidkjemi. Ås. [online] URL: http://www.bioforsk.no/ikbViewer/page/tjenester/prosjekt?p_document_id=71943
27. Almvik, M., Bolli, R., Christiansen, R., Eklo, O.M., Holten, R., Senneset, G.V., Wærnhus, K. (2014) *Nedbryting av soppmidler i norsk klima*. Bioforsk TEMA vol 9 nr 4. Bioforsk Plantehelse. Ås.
28. Brooks, G.T., Roberts, T.R. (1999) *Pesticide Chemistry and Bioscience. The Food-Environment Challenge*. The Royal Society of Chemistry. Cambridge. s. 351-353.
29. Nollet, L.M.L., Rathore, H.S. (2010) *Handbook of Pesticides. Methods of Pesticide Residues Analysis*. CRC Press, Taylor & Francis Group. USA. s. 20-21.
30. Miller, J.M. (2005) *Chromatography. Concepts & Contrasts*. 2. utgave. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey. s. 41-45.
31. Harris, D.C. (2010) *Quantitative Chemical Analysis*. 8. utgave. W.H. Freeman and Company. New York. s. 596-600.
32. Harris, D.C. (2010) *Quantitative Chemical Analysis*. 8. utgave. W.H. Freeman and Company. New York. s. 502-511.
33. Hoffmann, E. de, Stroobant, V. (2007) *Mass Spectrometry. Principles and Applications*. 3. utgave. John Wiley & Sons, Inc. Chichester, England. s. 15-72.
34. Hoffmann, E. de, Stroobant, V. (2007) *Mass Spectrometry. Principles and Applications*. 3. utgave. John Wiley & Sons, Inc. Chichester, England. s. 85-91.
35. Miller, J.M. (2005) *Chromatography. Concepts & Contrasts*. 2. utgave. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey. s. 303-304.
36. Harris, D.C. (2010) *Quantitative Chemical Analysis*. 8. utgave. W.H. Freeman and Company. New York. s. 103-105.
37. Ræder, E.M. (2013) *Development of a method for identification and quantification of polycyclic musks in sewage water*. M.Sc.-oppgave, Norges miljø- og biovitenskapelige universitet. Ås. s. 14.
38. Royal Society of Chemistry (2014) *ChemSpider*. Cambridge, England. [online] URL: <http://www.chemspider.com/>
39. Personlig kommunikasjon fra Marit Almvik ved Bioforsk (12.12.2014)

8 Appendiks

APPENDIKS 1 – Data for LC-MS/MS-analyse

Tabell 29. En oversikt over innstillingene som ble benyttet for LC-MS/MS-instrumentet for analysene av pesticider.

Komponenter i LC-MS/MS-instrumentet

Kromatografisk separator	Waters 2695 Separations Module HPLC
Massespektrometer	Waters Quattro Ultima Pt MS/MS
Kolonne	Alltima™ C18 5u, lengde 150 mm, ID 2,1 mm.
Autosamplere	Waters Alliance 2695 Autosampler

Autosamplere

Prøvetemperatur	4 °C
Injeksjonsvolum	5 µL

Kolonne

Kolonnetemperatur	30 °C
Mimimumstrykk	0 bar
Maksimumstrykk	345 bar
Mobilfase	Mobilfase 1: 5 mM HCOOH i MilliQ-vann Mobilfase 2: Metanol
Vaskeløsning	50 % metanol og 50 % MilliQ-vann
Degasser	Kontinuerlig
Pumpeslagvolum	50,0 µL
Volumstrøm	0,30 mL/min

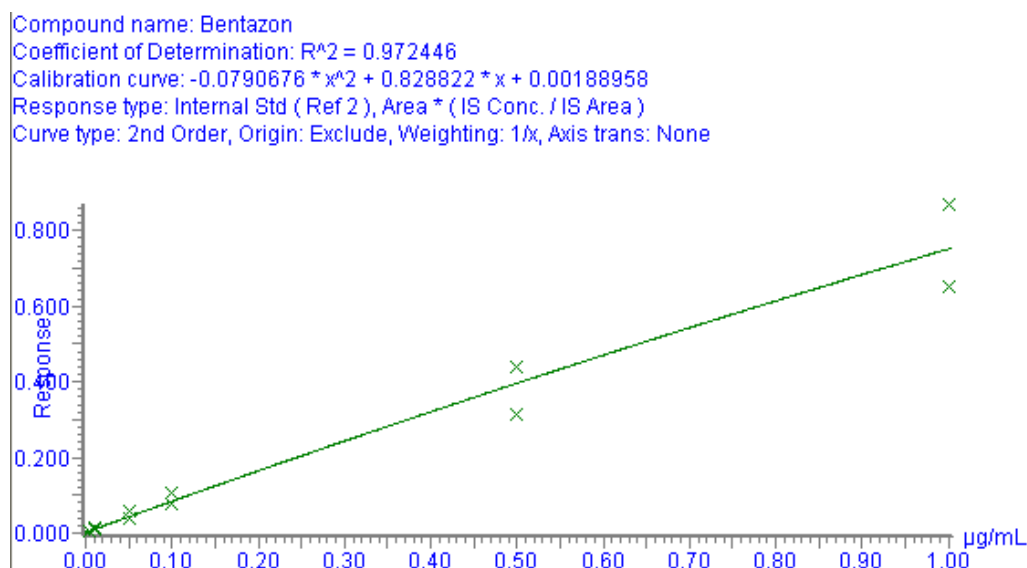
Massespektrometer

Ioniseringstype	Elektrospray (ESI). Både positiv og negativ ionemodus ble brukt, se tabell 17.
Spennning i kapillær	3,0 kV
Cone voltage	Optimalisert for hver analytt, se tabell 17.
Kollisjonsenergi	Optimalisert for hver analytt, se tabell 17.
Kildetemperatur	120 °C
Desolvation-temperatur	350 °C
Desolvation-gasstrøm	624 L/h
Cone-gasstrøm	95 L/h
Trykk i kollisjonscelle	$5,92 \cdot 10^{-3}$ mbar
Kollisjons-gass	Argon, renhetsgrad 5.0

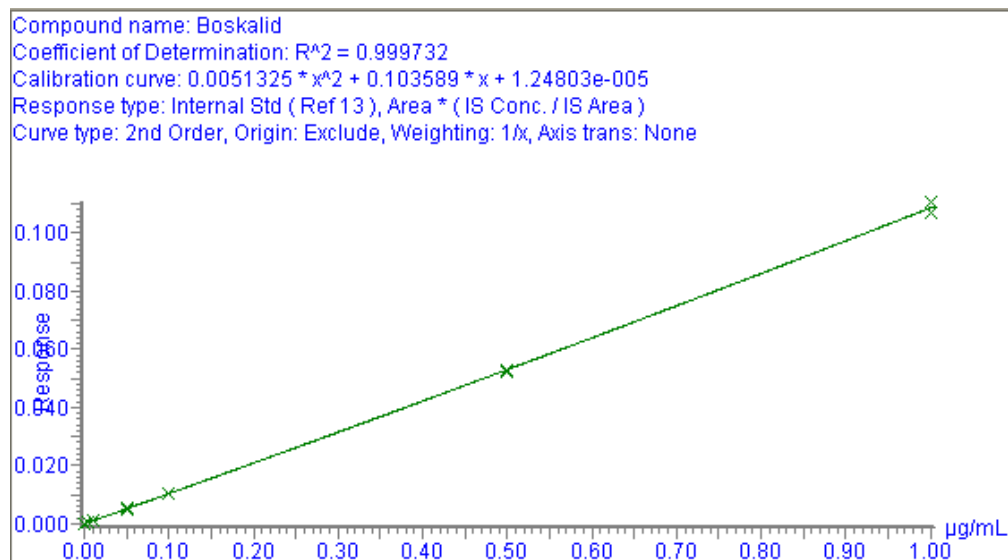
APPENDIKS 2 - Kalibreringskurver

Intern standard-kalibreringskurver for de 7 pesticidene og 4 transformasjonsproduktene analysert i oppgaven er vist nedenfor. Disse kurvene ble laget med kalibrerings-standardene til prøvesettet fra uttaket i forsøksfelt Stjørdal 06.07.2012.

Pesticider

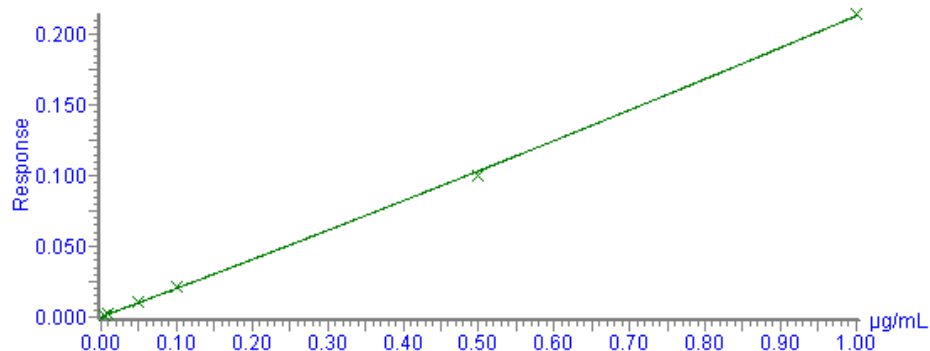


Figur 31. Graf for kalibreringskurven til bentazon, med bentazon-d6 som intern standard. Responsfaktor er plottet som funksjon av konsentrasjon.



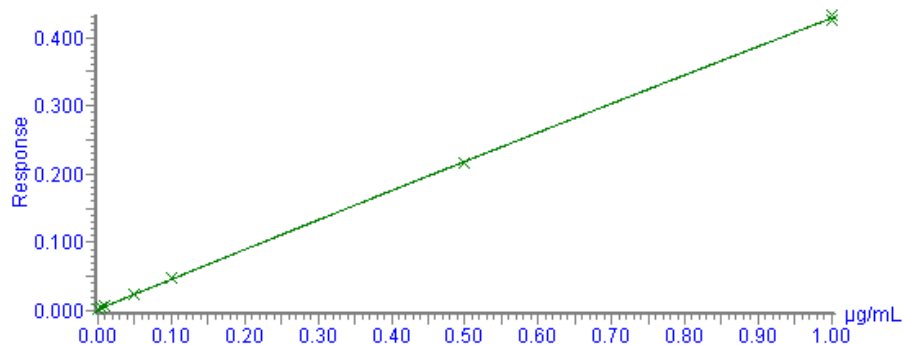
Figur 32. Graf for kalibreringskurven til boskalid, med metkonazol som intern standard. Responsfaktor er plottet som funksjon av konsentrasjon.

Compound name: Fenpropimorf
Coefficient of Determination: $R^2 = 0.999313$
Calibration curve: $0.0129782 * x^2 + 0.199996 * x + 0.000219256$
Response type: Internal Std (Ref 13), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



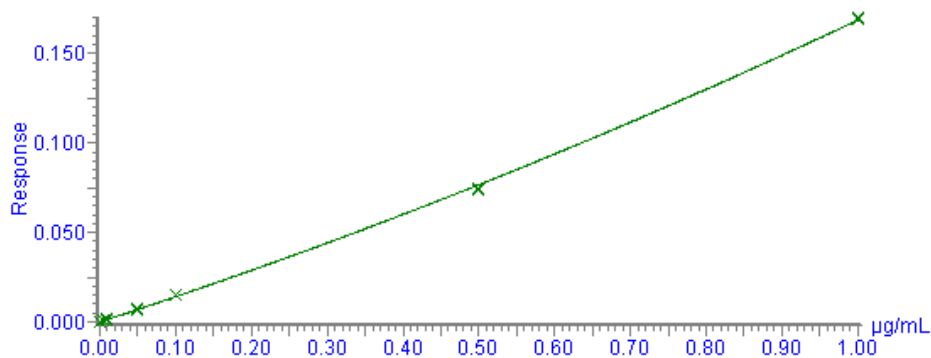
Figur 33. Graf for kalibreringskurven til fenpropimorf, med metkonazol som intern standard. Responsfaktor er plottet som funksjon av konsentrasjon.

Compound name: Propikonazol
Coefficient of Determination: $R^2 = 0.999731$
Calibration curve: $-0.0131006 * x^2 + 0.439295 * x + 0.00219267$
Response type: Internal Std (Ref 13), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



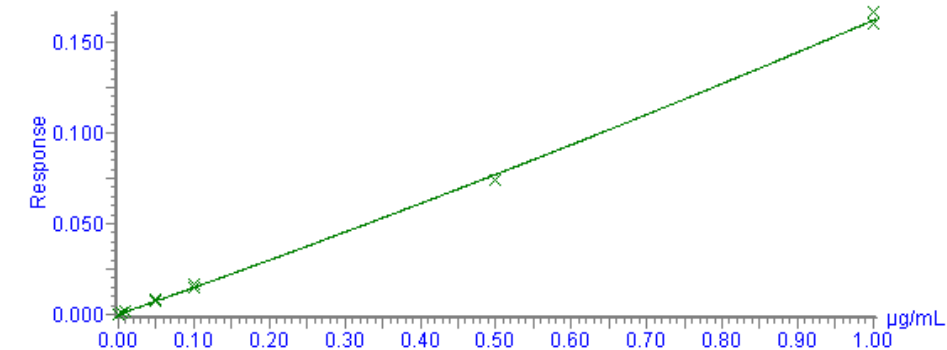
Figur 34. Graf for kalibreringskurven til propikonazol, med metkonazol som intern standard. Responsfaktor er plottet som funksjon av konsentrasjon.

Compound name: Pyraklostrobin
Coefficient of Determination: $R^2 = 0.999507$
Calibration curve: $0.0307406 * x^2 + 0.137857 * x + 1.36688e-005$
Response type: Internal Std (Ref 13), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



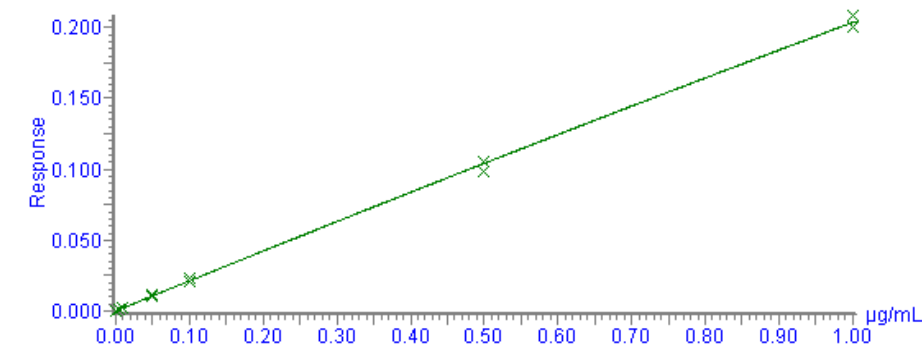
Figur 35. Graf for kalibreringskurven til pyraklostrobin, med metkonazol som intern standard. Responsfaktor er plottet som funksjon av konsentrasjon.

Compound name: Tiaklopid
Coefficient of Determination: $R^2 = 0.998570$
Calibration curve: $0.0155632 * x^2 + 0.146372 * x + 2.89214e-005$
Response type: Internal Std (Ref 13), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Figur 36. Graf for kalibreringskurven til tiaklopid, med metkonazol som intern standard. Responsfaktor er plottet som funksjon av konsentrasjon.

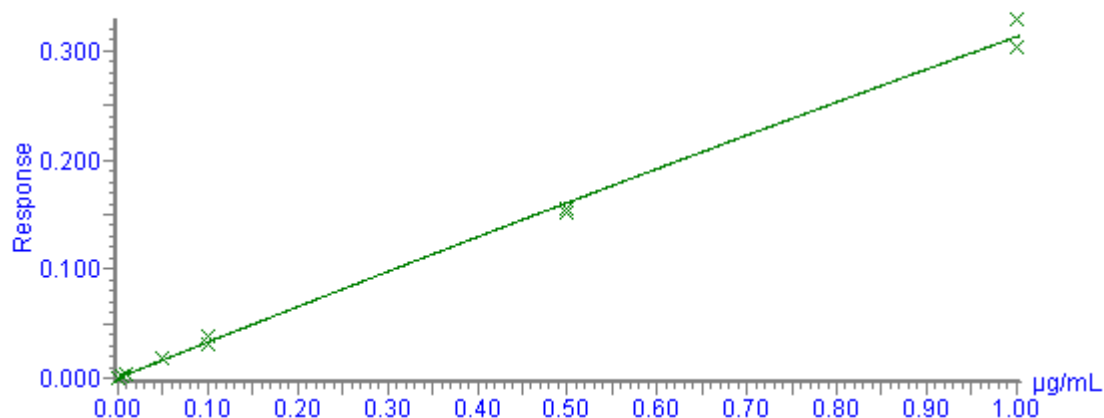
Compound name: Trifloksystrobin
Coefficient of Determination: $R^2 = 0.998985$
Calibration curve: $-0.0095226 * x^2 + 0.213009 * x + 7.97438e-005$
Response type: Internal Std (Ref 13), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Figur 37. Graf for kalibreringskurven til trifloksystrobin, med metkonazol som intern standard. Responsfaktor er plottet som funksjon av konsentrasjon.

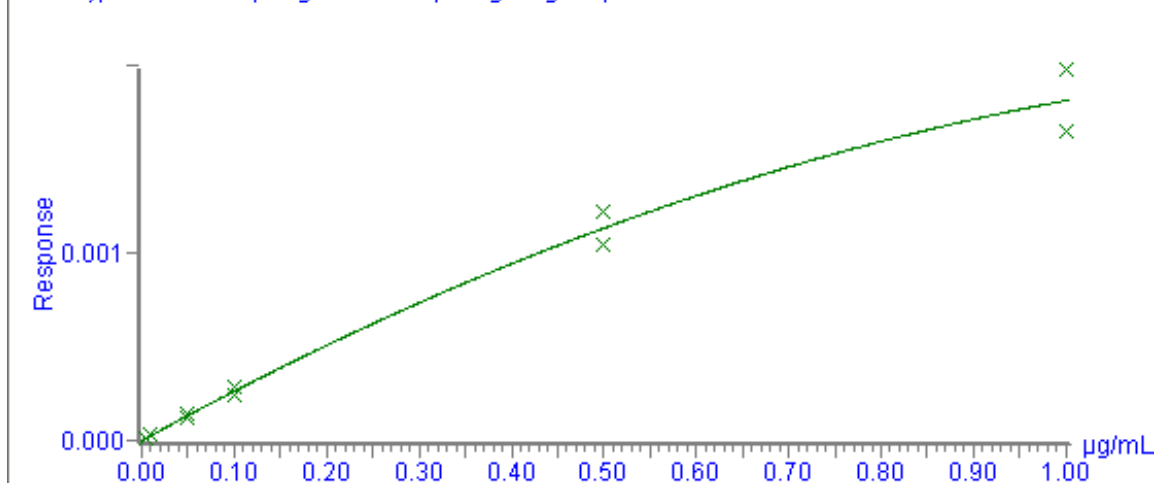
Transformasjonsprodukter

Compound name: Fenpropimorf-met (BF421-2)
Coefficient of Determination: $R^2 = 0.996776$
Calibration curve: $-0.0170955 * x^2 + 0.32992 * x + 0.000176069$
Response type: Internal Std (Ref 13), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



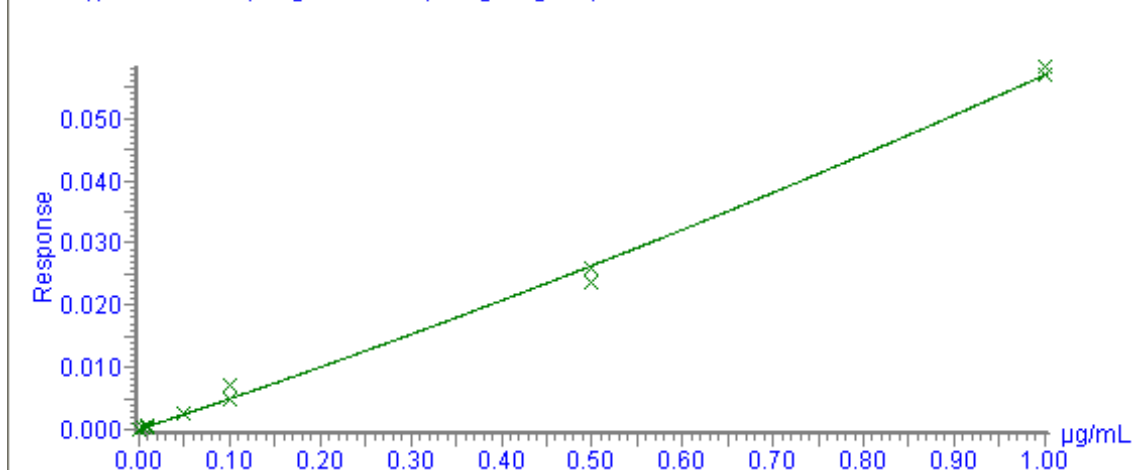
Figur 38. Graf for kalibreringskurven til BF421-2 (Fenpropimorf-transformasjonsprodukt), med metkonazol som intern standard. Responsfaktor er plottet som funksjon av konsentrasjon.

Compound name: Pyraklostrobin-met (BF500-6)
Coefficient of Determination: $R^2 = 0.991291$
Calibration curve: $-0.000901664 * x^2 + 0.00271023 * x + 1.26122e-007$
Response type: Internal Std (Ref 13), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



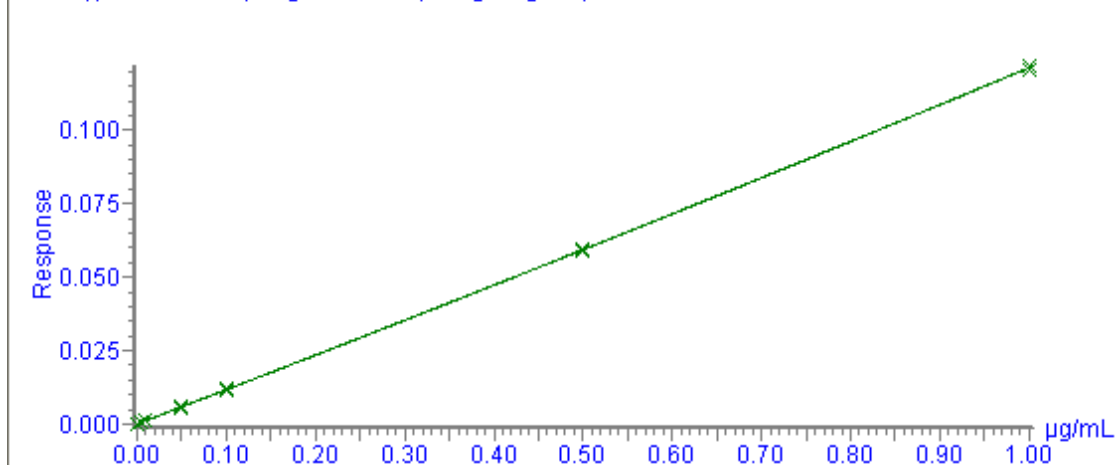
Figur 39. Graf for kalibreringskurven til BF500-6 (Pyraklostrobin-transformasjonsprodukt), med metkonazol som intern standard. Responsfaktor er plottet som funksjon av konsentrasjon.

Compound name: Tiaklopid-met (M02)
Coefficient of Determination: $R^2 = 0.993749$
Calibration curve: $0.00874522 * x^2 + 0.0482228 * x + 4.03605e-005$
Response type: Internal Std (Ref 13), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Figur 40. Graf for kalibreringskurven til M02 (Tiaklopid-transformasjonsprodukt), med metkonazol som intern standard. Responsfaktor er plottet som funksjon av konsentrasjon.

Compound name: Trifloksystrobin metabolitt
Coefficient of Determination: $R^2 = 0.999906$
Calibration curve: $0.00526097 * x^2 + 0.115853 * x + 0.000113404$
Response type: Internal Std (Ref 13), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Figur 41. Graf for kalibreringskurven til CGA 32113 (Trifloxystrobin-transformasjonsprodukt), med metkonazol som intern standard. Responsfaktor er plottet som funksjon av konsentrasjon.



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no