



UiT / NORGES ARKTISKE
UNIVERSITET

MASTEROPPGAVE I FARMASI

ANALYSE AV NEONICOTINOIDER VED HJELP AV LC-MS.

UTVIKLING OG ANVENDELSE AV METODE.

Jarle Henriksen

Mai 2015

Veileder: Professor Einar Jensen (IFA)

Ekstern veileder: Forsker/Prosjektleder Thomas Bøhn (GenØk)

FORORD

Denne oppgaven er gjennomført som et samarbeid mellom Institutt for farmasi (IFA) ved Universitetet i Tromsø – Norges arktiske universitet, og GenØk – Senter for biosikkerhet.

Det er først og fremst på sin plass med en stor takk til veilederne for oppgaven, Einar Jensen (IFA) og Thomas Bøhn (GenØk). Uten deres samarbeid, entusiasme, idéer, kunnskap og veiledning, ville oppgaven neppe eksistert.

Spesielt takk til Einar for mye hjelp med fremgangsmåter og fortløpende diskusjoner av resultater. Tid er en mangelvare i dagens samfunn, så det kan ikke alltid ha vært like lett å få plass til i en travel arbeidshverdag. Det settes pris på.

En stor takk til Thomas og andre involverte ved GenØk for anskaffelse av maisfrøprøver, og for hjelp til planting/høsting av disse.

Takk også til Terkel Hansen og Trude Anderssen ved IFA for hjelp med LC-MS. Deres hjelp sparte meg for en god del hodebry.

Ansatte ved IFA, forelesere og labledere: Dere gjør en fantastisk jobb, som ikke alltid får den takken den fortjener. Uten dere ville ikke denne utdanningen vært mulig. Takk.

Sist men ikke minst, medstudenter, både tidligere og nåværende: Uten dere ville dette bare vært en utdanning. Det har vært så mye mer. Lykke til.

Tromsø, mai 2015

Jarle Henriksen

INNHOLDSFORTEGNELSE

1. SAMMENDRAG	4
2. INTRODUKSJON	5
1. Bakgrunn for oppgaven	5
2. Neonicotinoider	5
3. Utvikling og virkningsmekanisme	6
4. Bruk	6
5. Bie-død	7
6. Mangel på kunnskap	8
7. Valg av metode	9
3. MATERIALER OG METODER	10
1. Kjemikalier og utstyr	10
2. LC-MS	10
3. Standarder	11
4. Isokratisk eluering	11
5. Konstruksjon av mobilfasegradient	11
6. Bestemmelse av sekundært ion for identifisering	12
7. $AUC_{\text{Molekylion}} / AUC_{\text{Sekundært ion}}$	13
8. Minste detekterbare mengde (LOD)	13
9. Minste kvantifiserbare mengde (LLOQ)	13
10. MRM (multiple reaction monitoring)	13
11. Internstandard	14
12. Standardkurver	15
13. Bruk av metode på maisfrø	15
14. Bruk av metode på maisplanter	17
4. RESULTATER	19
1. Isokratisk eluering	19
2. Bestemmelse av sekundært ion for identifisering	21
3. $AUC_{\text{Molekylion}} / AUC_{\text{Sekundært ion}}$	22
4. MRM	23
5. Internstandard	25
6. LOD og LLOQ	25
7. Standardkurver	28
8. Maisfrøprøver	30
9. Maisplanteprøver	32
5. DISKUSJON	33
1. Mobilfasegradient	33
2. SIR	33
3. MRM	33
4. LOD og LLOQ	34
5. Standardkurver	34
6. Maisfrøprøver	34
7. Maisplanteprøver	35
8. Konklusjon	36
6. REFERANSER	37
7. APPENDIKS	38
1. Kromatogram	38
2. MS-instillinger	42
3. Regneeksempler	43

1. SAMMENDRAG

Målet med oppgaven var utvikling av en analysemetode for neonicotinoider ved hjelp av LC-MS. Neonicotinoider er en relativt ny gruppe insektmidler, som har hatt en rask vekst, og har overtatt store markedsandeler fra eldre sprøytemidler. De har blitt koblet opp mot en bekymringsverdig økning i bie-død på verdensbasis.

Det ble utviklet en analysemetode for 5 av de 7 neonicotinoidene på verdensmarkedet ved hjelp av standarder for stoffene. Det ble utført forsøk med både SIR og MRM som metode, og MRM ble foretrukket.

Metoden ble benyttet på 7 maisfrøprøver fra Sør-Afrika. Det ble i tillegg kjørt prøver av maisplanter dyrket av frø fra de 3 prøvene der neonicotinoider ble funnet.

Maisfrøprøvene bekreftet at metoden kunne brukes på reelle prøver, og ga en indikasjon på at neonicotinoidene er rimelig uniformt fordelt på frøene. Et estimat av mengde neonicotinoid per gram frø ble beregnet ved hjelp av internstandard. Disse verdiene var for de 3 prøvene henholdsvis: 3,61µg/g Imidacloprid, 58,56µg/g Clothianidin og 1627,50µg/g Clothianidin.

Planteprøvene viste at en relativt enkel prosedyre kunne benyttes for å måle konsentrasjon neonicotinoider i plantematerialer. En videreutviklet metode, kunne i fremtiden benyttes for å sammenligne innhold av neonicotinoider i ulike stadier av plantens livssyklus.

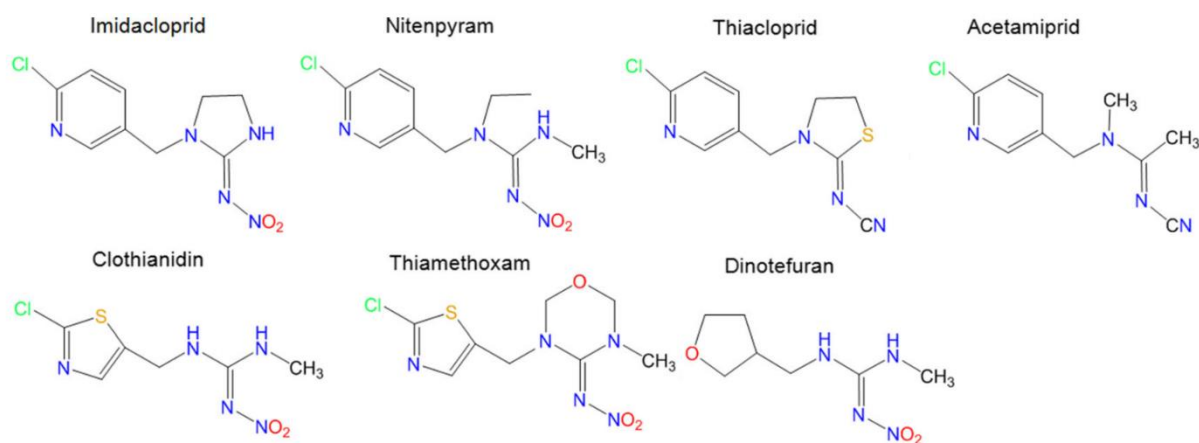
2. INTRODUKSJON

2.1 Bakgrunn For Oppgaven

Neonicotinoider er en relativt ny gruppe insektmidler, som har vært på verdensmarkedet siden 1991 (1). De har hatt en rask vekst, og har overtatt store markedsandeler fra eldre sprøytemidler (2). Dette i kombinasjon med at neonicotinoide har blitt koblet opp mot en bekymringsverdig økning i bie-død på verdensbasis (3), gjør at det er en gruppe som av mange årsaker burde overvåkes og forskes på i årene som kommer. For å kunne gjøre dette trengs det gode analysemetoder for deteksjon og kvantifisering av disse stoffene. Prosjektet har som mål å utvikle og anvende analysemetode for neonicotinoider ved hjelp av LC-MS.

2.2 Neonicotinoider

Det er 7 neonicotinoider på verdensmarkedet for øyeblikket: Imidacloprid (Bayer CropScience), Nitenpyram (Sumitomo Chemical), Thiacloprid (Bayer CropScience), Acetamiprid (Nippon Soda), Clothianidin (Sumitomo Chemical/ Bayer CropScience), Thiamethoxam (Syngenta) og Dinotefuran (Mitsui Chemicals) (2).

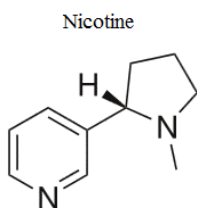


Figur 1. Strukturformler for Neonicotinoide på verdensmarkedet i dag. (4)

2.3 Utvikling Og Virkningsmekanisme

Det første neonicotinoidet, Imidacloprid ble oppdaget i 1985 av Shinzo Kagabu. Det ble utviklet fra forløperen Nithiazine som tidligere var oppdaget av Shell Development Co. i California, men som viste for lav potens og fotostabilitet til å kunne kommersialiseres i særlig grad (1, 5).

Navnet neonicotinoid ble gitt til Imidacloprid og lignende insektmidler pga. likhet i struktur med Nicotine, og en lik virkningsmekanisme som agonister på nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) (5). En viktig forskjell mellom neonicotinoidene og Nicotine (som til en viss grad har vært brukt som insektmiddel i mange århundrer) er at neonicotinoidene ikke er ioniserte under fysiologiske forhold og dermed lettere entrer det sentrale nervesystemet (CNS) hos insekter. I tillegg er det forskjeller mellom subenhetene i nAChR hos insekter og pattedyr som gjør neonicotinoidene svært selektive og dødelige for leddyr (som insekter) i forhold til virveldyr (som mennesker) (4, 5). En kontinuerlig stimulering av neuronene, i kombinasjon med mangel på effekt av acetylcholinesterase fører til paralysen og død (4).



Figur 2. Strukturformel for Nicotine.

2.4 Bruk

I 2009, under 20 år etter inntreden hadde neonicotinoidene overtatt en fjerdedel av markedet for insektmidler, og Imidacloprid, det første registrerte neonicotinoidet var godkjent for bruk på 140 ulike avlingstyper i 120 land (4). Det globale markedet for neonicotinoider var på U.S \$2.63 milliarder (2). Det ble estimert en produksjon på ca. 20 000 tonn Imidacloprid på verdensbasis i 2010 (4). Årsaken til denne raske veksten er sammensatt, men noen hovedpunkter kan trekkes frem:

-Som nevnt tidligere er neonicotinoidene sterkt selektive. Dette i kombinasjon med appliseringsmetode for neonicotinoidene, der ca. 60% av bruken er frø-coating og jord-

behandling i stedet for spray, gjorde at de ble lansert som et tryggere alternativ for jordbrukerne (4). Markedet for frø-coating vokste fra ca. 150 millioner Euro til ca. 950 millioner Euro fra 1990-2008 (2).

-På 1980-tallet hadde det utviklet seg noe resistens mot tradisjonelle insektmidler, men som følge av virkningsmekanismen for neonicotinoidene, var det ingen kryssresistens (2, 4).

-Neonicotinoidene har en langvarig og effektiv virkning. Dette mye pga. deres fysiokjemiske egenskaper. Neonicotinoidene har generelt moderat til høy løselighet i vann og klassifiseres gjerne som systemiske insektmidler, etter som de tas opp i plantematerialer og fordeles til alle deler av plantene (4, 6). Dette skjer uavhengig av applikasjonsmetode og gjør dem svært langvarig effektive mot skadedyr som spiser på plantene.

Veksten på verdensmarkedet har ikke vist tegn til å avta, og kan få en ekstra økning ved generisk konkurranse etter som patentene på alle neonicotinoidene på verdensmarkedet gikk ut i perioden 2005-2013 (2).

2.5 Bie-død

Av de 100 ulike typene avlinger som sørger for 90% av maten på verdensbasis, er det anslått at ca. 70% pollineres av bier (3). Åpenbart vil storskala bie-død kunne ha alvorlige konsekvenser. I løpet av de siste 10-15 årene har det blitt rapportert en økning i bie-død og kolonitap både i Europa og i USA, et fenomen som har fått navnet Colony Collapse Disorder (CCD) (3). Ingen enkeltårsak har blitt identifisert, men neonicotinoidene er en av mange risikofaktorer som undersøkes. Som følge av en rapport gjort av European Food Safety Authority (EFSA), ble det i EU fra 1. desember 2013 innført en 2 års restriksjon på bruken av de 3 bestselgende (på verdensbasis) neonicotinoidene: Imidacloprid, Thiometoxam og Clothianidin (7, 8). Denne restriksjonen gjelder avlinger som er attraktive for bier, og er ment for å gi myndighetene tid og data til å gjøre nye risikovurderinger.

Neonicotinoidene er kjent toksiske for bier, men mye av bruken er frø-coating og jordbehandling, som ble ansett som tryggere enn spray på grunn av redusert spredning (6, 9). Dette har vist seg å være en sannhet med modifikasjoner. Det er kjent at det ved planting av frø som har en neonicotinoid-coating, frigis en støvsky inneholdende neonicotinoid fra

plantemaskinen, som er akutt toksisk for bier (6, 9). Dette kan skyldes separering av noe insektmiddel fra frøene, som så forlater maskinen via svevestøv. I tillegg benyttes det gjerne smøremiddel i pulverform under planting. Dette blandes direkte med frøene, og rester av smøremidlet kan inneholde store mengder insektmiddel som følge av dette. Disse restene kan enten frigis under planting og forverre støvproblematikken, eller ved vasking av plantemaskinen (6). Mye av planting skjer i perioden når biene er mest aktive. Etter som konsentrasjonen insektmiddel i støvskyen kan være stor nok til å drepe en bie ved en enkel gjennomflyvning, og det benyttes så store mengder areal til dyrking av denne type behandlede frø, er bier i slike områder risikoutsatte (6). Introduksjon av deflektorer for støvskyen og forbedret smøremiddel er gjort i den senere tid, men problemet er fortsatt tilstede (6).

I tillegg til akutt toksisitet og død er det gjort studier på ikke-dødelige effekter av neonicotinoider etter som det er funnet rester av sprøytemidlene på bier og i kolonier, og det antas at mange bier er kronisk utsatte for ikke-dødelige doser (6). Det pekes på at blant annet bevegelse, metabolisme, læreevne, hukommelse og utvikling kan påvirkes negativt (9). Dette kan på lengre sikt medvirke til tap eller reduksjon av kolonier.

2.6 Mangel På Kunnskap

Neonicotinoidene er relativt nye, og har raskt blitt benyttet i stor skala. Effekten på bier er i fokus, men også her mangler man kunnskap for å kunne trekke klare konklusjoner, som illustrert ved de nåværende restriksjonene i EU. Mesteparten av forskningen er i tillegg gjort på bie-arter som forvaltes av mennesker. Det finnes mer enn 20 000 arter ville bier, og mange av disse bidrar til pollinering av avlinger og ville blomster, men lite er kjent om hvordan disse eventuelt påvirkes (6, 9).

Virvelløse dyr generelt antas å kunne påvirkes negativt, og dette inkluderer organismer som i utgangspunktet ikke er mål-organismer ved bruk av neonicotinoidene (9). Negative effekter på ikke-målorganismer kan føre til ukjente og uønskede biologiske og økologiske effekter. For de fleste arter mangler informasjon, og der informasjon er tilgjengelig er det gjerne resultater under laboratorie- og ikke naturlige-forhold, men resultatene kan tyde på at antagelsen om negativ påvirkning er korrekt (9).

For virveldyr er det også manglende informasjon, men det som er gjort av studier indikerer at neonicotinoid-konsentrasjonene de er utsatt for i all hovedsak er under dødelig dose (10). Effektene av kroniske ikke dødelige doser er lite studert. Et kritisk poeng her, er mulige indirekte effekter, for eksempel hvis neonicotinoidene er mer effektiv i å ta livet av virveldyrenes byttedyr enn de selv er. Hvilke arter dette gjelder eller hvilke konsekvenser dette kan ha er ikke klarlagt (10).

Uklarhetene i hvilke effekter neonicotinoidene kan ha øker behovet for videre studier. Dette forsterkes av studier som tyder på at stoffgruppen er lite nedbrytbar og kan vedvare lenge i jord (muligens også akkumuleres), og at de i stadig større grad finnes i overflatevann og grunnvann verden over (6). Disse faktorene kan forsterke eksponeringen for ikke-målorganismer. Sensitive analysemetoder trengs for å gjøre disse studiene.

2.7 Valg Av Metode

Neonicotinoidene har lavt potensiale for evaporasjon (6). Dette gjør GC vanskelig, og gjør LC mer hensiktsmessig. MS er svært selektiv som deteksjonssystem. Tidligere forsøk gjort for denne gruppen indikerer at LC-MS med C₁₈ kolonner er en foretrukket teknikk, både som følge av stoffenes fysiokjemiske egenskaper og på grunn av sensitivitet og selektivitet i deteksjon (11, 12). Metanol eller acetonitril har vært benyttet som organiske løsemidler i mobilfase, med en mulig fordel av å bruke acetonitril for enkelte prøvematrikser (11).

Det ble vurdert som sannsynlig å kunne utvikle en metode for analyse av neonicotinoider ved hjelp av LC-MS.

3. MATERIALER OG METODER

3.1 Kjemikalier Og Utstyr

Følgende kjemikalier fra Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Seelze, Tyskland) ble benyttet som standarder ved utvikling av metode: Imidacloprid, CAS: 138261-41-3, Lot: SZBE125XV, Clothianidin, CAS: 210880-92-5, Lot: SZBD053XV, Acetamiprid, CAS: 135410-20-7, Lot: SZBC110XV, Nitenpyram, CAS: 150824-47-8, Lot: SZBE036XV, Thiocloprid, CAS: 111988-49-9, Lot: SZBC180XV, Clothianidin-d₃, CAS: 1262776-24-8, Lot: 1438679V (for molekylstrukturer, se innledning).

I tillegg ble også disse kjemikaliene fra Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) benyttet: Methanol (Chromasolv 99,9%), CAS: 67-56-1 ble benyttet som løsemiddel, og som vaskemiddel i LC. Acetonitril (Chromasolv 99,9%), CAS: 75-05-8 og Formic acid (98%), CAS: 64-18-6 ble benyttet i mobilfase.

Vannet som ble benyttet kom fra et MILLIPORE Milli-Q system. Utveiling ble gjort på en Sartorius BP211D vekt. En IKA Vortex (M: V1) ble benyttet ved oppløsning og skylling av prøver.

Planteprøvene ble filtrert/renset gjennom en Ostro 96-well plate 25mg, ved hjelp av en Positive pressure-96 processor, og samlet i en 1ml round collection plate (Waters Corporation).

3.2 LC-MS

Et Waters Corporation (Milford, MA, USA) system ble benyttet. Dette bestod av: Acquity UPLC H-class Sample Manager FTN, Acquity UPLC H-class Quaternary Solvent Manager, Quattro Premier XE (MS) og MassLynx Software.

Det ble brukt en XBridge BEH Shield RP18 kolonne (Waters), 2,5µm, 100mm x 2,1mm ID, Part nr. 186006055, Bach: 114. Kolonnetemperatur var 30 C° for alle forsøk.

Til mobilfase ble følgende 2 væskeblandinger benyttet:

B: Vann (H₂O) + 0,1% maursyre (HCOOH)

C: Acetonitril (CH₃CN): Vann (H₂O) (95:5) + 0,1% maursyre (HCOOH).

3.3 Standarder

Stamløsninger ble laget ved å løse gitt mengde stoff i 10ml metanol.

Tabell 1: Konsentrasjon på stamløsningene.

Neonicotinoid	Veid ut (mg)	Konsentrasjon (mg/ml)
Imidacloprid	18,88	1,888
Clothianidin	20,95	2,095
Acetamiprid	20,20	2,020
Nitenpyram	19,68	1,968
Thiacloprid	20,79	2,079

3.4 Isokratisk Eluering

Fortynninger av stamløsningene ble kjørt i Scan modus ved mobilfase B: 40% og C:60%, for bekreftelse av molekylion ut fra beregnet monoisotopisk masse.

Tabell 2: Monoisotopisk masse og molekylion.

Neonicotinoid	Monoisotopisk masse	(M+H) ⁺
Imidacloprid	255,05	256
Clothianidin	249,01	250
Acetamiprid	222,07	223
Nitenpyram	270,09	271
Thiacloprid	252,02	253

Deretter ble gjort en isokratisk eluering (mobilfasesammensetning konstant) i SIR modus (single ion recording) for de respektive molekylionene, med mål om å vurdere retensjonstid og separasjon i ulik mobilfasesammensetning. Denne informasjonen ble brukt som bakgrunn for oppsett av mobilfasegradient. Det ble kjørt prøver med mobilfasekonsentrasjon C: 60-5% (B: 40-95%) med intervaller på 5. C: 20% ble ikke kjørt for Thiacloprid og C: 15-5% ble kun kjørt for Nitenpyram.

3.5 Konstruksjon Av Mobilfasegradient

Informasjonen fra den isokratiske elueringen ga et utgangspunkt for oppsett av en mobilfasegradient. Det ble kjørt en prøve bestående av alle de fem tilgjengelige

neonicotinoidene. Målet var tilstrekkelig retensjonstid ($k' > 8$) for stoffet med lavest retensjonstid, best mulig separasjon mellom toppene i kromatogrammet for de ulike stoffene og kortest mulig prøvetid. Det ble gjort endringer for å forbedre separasjonen og for å redusere tiden. Den endelige gradienten ble:

Tabell 3: Mobilfasegradient.

Time (min)	Flow (ml/min)	%B	%C	Curve
0	0,2	90	10	
3	0,2	90	10	6
4	0,2	82	18	6
10	0,2	82	18	6
12	0,2	60	40	6
16	0,2	60	40	6
17	0,2	90	10	6
25	0,2	90	10	6

3.6 Bestemmelse Av Sekundært Ion For Identifisering

I reelle prøver kan det koelueres stoffer med lik masse som molekylionet. Dette kan gi usikkerhet i forhold til identifisering og kvantifisering ved SIR. Ved å ha et sekundært ion (fragment av molekylion) kan identifiseringen gjøres sikrere. Ved å sammenligne $AUC_{\text{Molekylion}} / AUC_{\text{Sekundært ion}}$ (A/A) for standarder med A/A for prøven, kan man gjøre en vurdering på om det er andre stoffer som også måles, og om kvantifisering er mulig.

De ulike neonicotinoidene ble kjørt i Scan modus (100-320) ved CV (cone voltage) 30, 25, 20 og 15. Mobilfase var konstant for de enkelte, men varierte mellom de ulike prøvene for å gi en retensjonstid som ikke var for kort eller lang. Sekundærioner ble valgt for videre bruk i SIR modus. Det var liten fragmentering, og ionene valgt for Acetamiprid og Thiacloprid viste seg senere å ha liten respons ved SIR. Disse ionene ble også ved nærmere undersøkelse funnet i bakgrunnsstøy. Det ble kjørt Scan ved CV 40 for de to stoffene, og nye sekundærioner ble valgt. De endelige ionene ble:

Tabell 4: Molekylion og sekundært ion ved SIR, valgt ved gitt CV.

Neonicotinoid	Molekylion	Fragment ion	CV
Imidacloprid	256	210	30
Clothianidin	250	169	30
Acetamiprid	223	126	40
Nitenpyram	271	225	30
Thiacloprid	253	126	40

3.7 $AUC_{Molekylion} / AUC_{Sekundært\ ion}$

SIR for molekylion og sekundært ion ble kjørt for de ulike neonicotinoidene med den valgte mobilfasegradienten. Det ble utført prøver for fortyntinger med konsentrasjonene 2,5-5-10-20-40ng/μl med et injeksjonsvolum på 3μl. A/A forholdet ble beregnet som et gjennomsnitt av disse.

3.8 Minste Detekterbare Mengde (LOD)

Det ble kjørt fortyntinger ned til 0,25ng/μl (3μl inj. vol.). LOD ble beregnet som et S/N (signal/bakgrunnsstøy) forhold på 3, og forholdstallene ble beregnet i kromatogrammene ved bruk av MassLynx.

3.9 Minste Kvantifiserbare Mengde (LLOQ)

LLOQ ble beregnet som et S/N (signal/bakgrunnsstøy) forhold på 10, og forholdstallene ble beregnet i kromatogrammene ved bruk av MassLynx.

3.10 MRM (multiple reaction monitoring)

Det ble utført produktscan for alle neonicotinoidene (90-285) ved CV 30 og CE (collision energy) 25 og 35. Fragmenter ble valgt, 1ng/μl (3μl inj. vol.) ble kjørt med MRM for de enkelte standardene, og følgende MRM metode ble satt opp:

Tabell 5: MRM metode.

Neonicotinoid	MRM		CE	CV	Tid (min)
	256 →	209			
Imidacloprid	256 →	209	35	30	6-10,2
Clothianidin	250 →	132	35	30	6-10,2
Acetamiprid	223 →	126	35	30	10,2-13
Nitenpyram	271 →	225	35	30	2-6
Thiacloprid	253 →	126	35	30	13-16

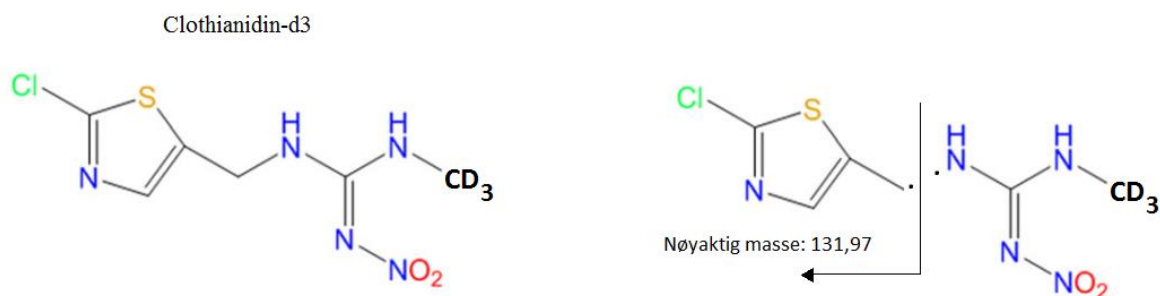
Det ble kjørt MRM med fortynninger ned til 4pg/μl (3μl inj. vol.). S/N ratioen gav fortsatt mulig kvantifisering. MRM ble brukt videre som metode pga. senkede grenser for LOD og LLOQ, og bedre selektivitet enn for SIR.

3.11 Internstandard

Clothianidin-d3 ble brukt som internstandard. Det ble laget en stamløsning i 10 ml metanol.

Tabell 6: Konsentrasjon på stamløsning internstandard.

Neonicotinoid	Veid ut (mg)	Konsentrasjon (mg/ml)
Clothianidin-d3	21,19	2,119



Figur 3. Strukturformel Clothianidin-d3 og mulig fragmentering.

Vekt av fragment inneholdende ringstruktur matchet vekten av fragmentet benyttet ved MRM for Clothianidin. Molekylionet er 3 atomenheter tyngre som følge av substitusjon, mens fragmentet er likt. En fortynning på 1ng/μl (3μl inj. vol.) ble kjørt i MRM modus for bekreftelse på signal. Internstandarden ble lagt til i MRM metoden.

Tabell 7: MRM metode internstandard.

Neonicotinoid	MRM		CE	CV	Tid (min)
Clothianidin-d3	253 →	132	35	30	6-10,2

3.12 Standardkurver

Det ble kjørt MRM for fortynninger bestående av alle 5 neonicotinoidene og internstandard. Konsentrasjonene var 5-10-20-40-80-160 pg/μl for neonicotinoidene og internstandarden var 20 pg/μl i alle prøvene. Injeksjonsvolumet var 2μl. AUC Neonicotinoid/AUC internstandard gir en lineær kurve som kan benyttes til kvantifisering i gitt område. 3 paralleller ble kjørt, og gjennomsnittlig verdi for AUC benyttet.

3.13 Bruk Av Metode På Maisfrø

7 ulike maisfrøprøver hentet i Sør-Afrika i 2013 ble testet for neonicotinoide ved bruk av MRM metoden. Det var ikke kjent om noen av disse var behandlet med neonicotinoide, men det er vanlig å bruke disse stoffene i Sør-Afrika. Frø som coates med insektmidler eller soppmidler blir ofte fargemerket i tillegg, for å forhindre forveksling med matprodukter.

Tabell 8: Maisfrøprøver.

Prøve	Type	Sample name	Fargestoff
1.1	OPV (nonBt)	ZM 512	
2.1	MON 89034	DKC 8012 BGEN	Rød
2.2	Conventional maize (isoline 2.1)	DKC 8010	
3.1	MON 810	PHB 30Y79B	Grønn
3.2	Conventional maize (isoline 3.1)	PHB 30Y83	Grønn
4.1	MON 810	DKC 7815B	Rød
4.2	Conventional maize (isoline 4.1)	CRN 3505	Rød



Figur 4. Maisfrøprøver (farger).



Figur 5. Nærbilde maisfrø med coating og fargestoff.

5 frø fra hver prøve ble skylt med ca. 10ml vann. Dette ble gjort i sterile, engangs plastprøverør m/lokk ved hjelp av vortexer (5min per prøve). 1ml vann ble overført til prøveglass og prøvene ble kjørt med 2 μ l injeksjonsvolum. Dette forsøket ble gjentatt med 5 nye frø, men denne gang ble frøene veid og volumet vann var nøyaktig 10ml.

Tabell 9: Vekt 5 maisfrø.

Prøve	1.1	2.1	2.2	3.1	3.2	4.1	4.2
Vekt (g)	2,1018	1,7178	1,7090	1,9889	1,5380	1,6035	1,8827

5 enkeltfrø fra hver av de 3 prøvene der neonicotinoider ble funnet, ble veid og skylt med 2ml vann. Prøvene ble kjørt som over. Det ble kjørt 3 paralleller.

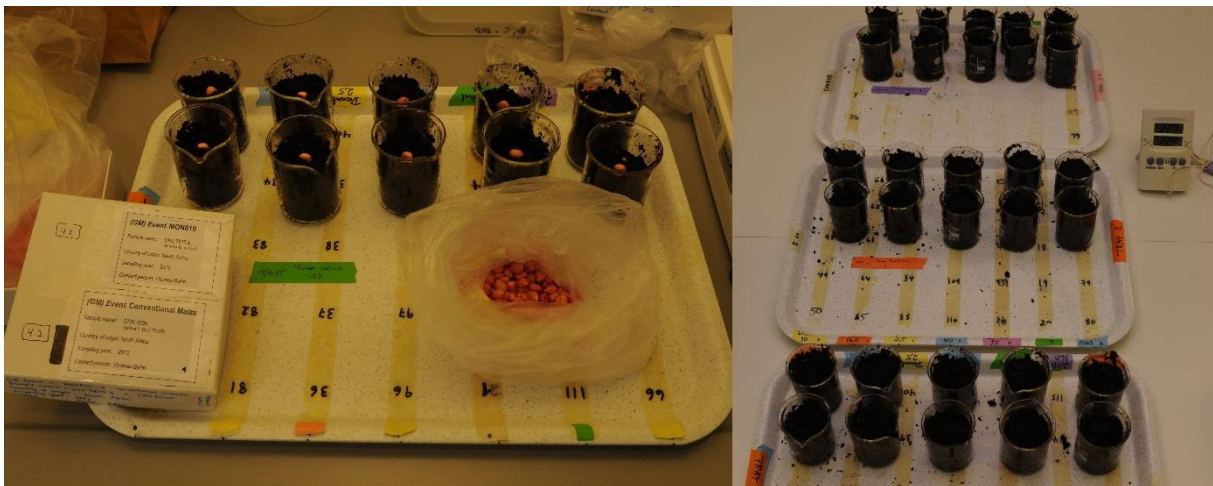
Tabell 10: Vekt 1 maisfrø.

Prøve	Vekt (g)				
	S1	S2	S3	S4	S5
2.1	0,3175	0,3477	0,3088	0,3366	0,3196
4.1	0,2739	0,2683	0,2880	0,3439	0,3086
4.2	0,4266	0,3710	0,3141	0,3513	0,3302

Maisfrøprøver (5 frø) ble kjørt med internstandard. Det ble kun kjørt for de prøvene der neonicotinoider var funnet. Det ble kjørt 3 paralleller. Mengde internstandard var 0,2ng/μl for prøve 4.2, 2ng/μl for 2.1 og 20ng/μl for 4.1 (10, 100 og 1000 x mer internstandard enn ved oppsett av standardkurve).

3.14 Bruk Av Metode På Maisplanter

For hver av de 3 prøvene der det var funnet neonicotinoider ble det plantet 10 maisfrø.



Figur 6. Planting av maisfrø.

Plantene ble høstet etter 9 dager, da de var blitt ca. 10cm høye. Det ble tatt prøver av plante, jord og rotsystem for alle frøene. Planteprovne bestod av hele planten som hadde vokst over jorden. Det resterende plantesystemet ble forsiktig trukket ut av begerglassene og jordprøvene ble skrapet av medfølgende jord. I hovedsak ble dette gjort 1-2cm fra rotsystem og rest av frø. Så mye jord som mulig ble skrapet av, og rest av frø ble separert.

Rotsystemprøvene bestod av hele resterende rotsystemet, og ble grovskyllet i et begerglass vann for å fjerne jord. Rent vann ble benyttet for hver av de tre prøvene. Alle prøvene ble veid.

For hver av de 3 settene med planteprøver ble det laget 1 prøve bestående av ca. 1cm plantemateriale klippet av toppen på alle 10 plantene (Med det åpenbare unntak av de få frøene som ikke hadde vokst, og med unntak av de plantene som var veldig små, og dermed kunne være interessante å bevare for mulig fremtidig sammenligning med større planter). De 3 prøvene ble grovknust i prøverør, ekstrahert med 2ml 50/50 metanol og vann. 500µl av prøvene ble filtrert/renset og kjørt i LC-MS med 2µl injeksjonsvolum.

4. RESULTATER

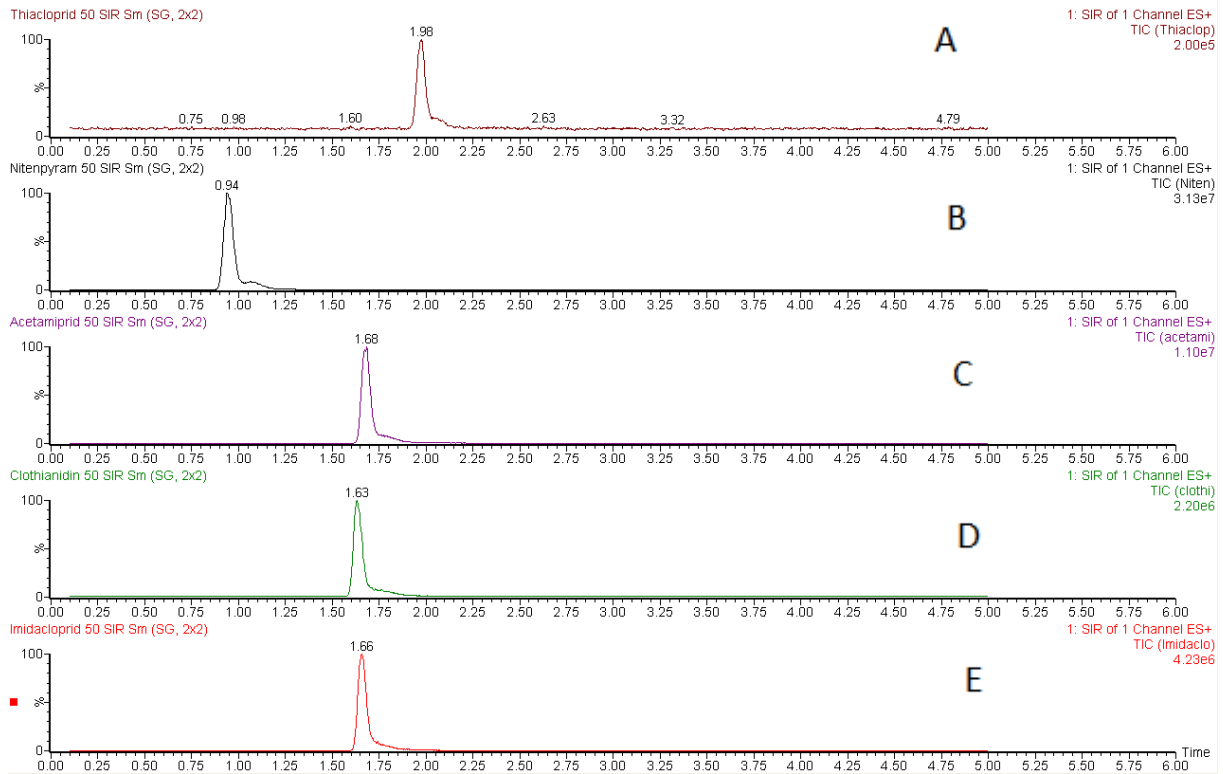
4.1 Isokratisk Eluering

Tabell 11: Retensjonstid (min) for de ulike neonicotinoidene ved isokratisk eluering.

Neonicotinoid	%C (Acetonitril) i mobilfase											
	60	55	50	45	40	35	30	25	20	15	10	5
Imidacloprid	1,44	1,54	1,66	1,80	2,00	2,31	2,81	3,69	5,30	-	-	-
Clothianidin	1,44	1,52	1,63	1,77	1,96	2,25	2,73	3,56	5,12	-	-	-
Acetamiprid	1,47	1,54	1,68	1,84	2,08	2,47	3,13	4,34	6,66	-	-	-
Nitenpyram	0,90	0,92	0,94	0,98	1,02	1,09	1,19	1,36	1,66	2,26	3,54	6,92
Thiacloprid	1,62	1,75	1,97	2,25	2,69	3,42	4,69	7,12	-	-	-	-

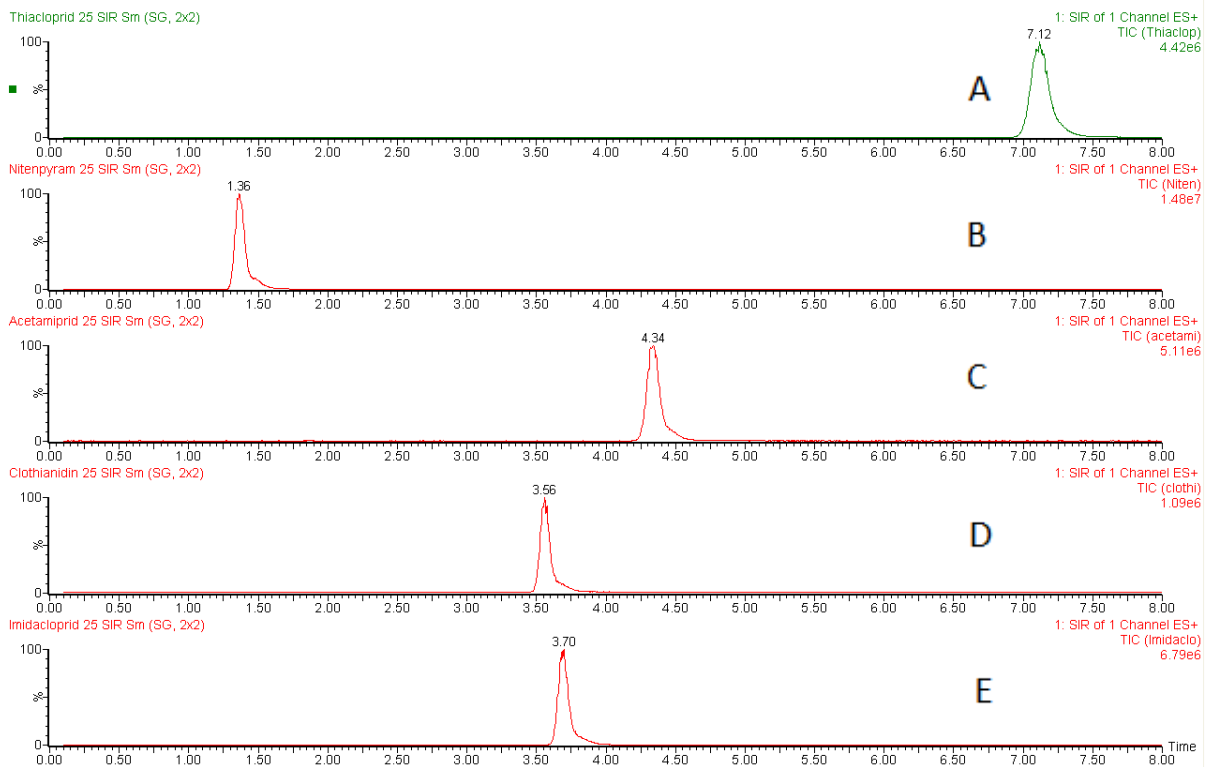
Tabell 12: Mobilfasegradient.

Time (min)	Flow (ml/min)	%B	%C	Curve
0	0,2	90	10	
3	0,2	90	10	6
4	0,2	82	18	6
10	0,2	82	18	6
12	0,2	60	40	6
16	0,2	60	40	6
17	0,2	90	10	6
25	0,2	90	10	6



Figur 7. Isokratisk eluering, SIR, 50% mobilfase C.

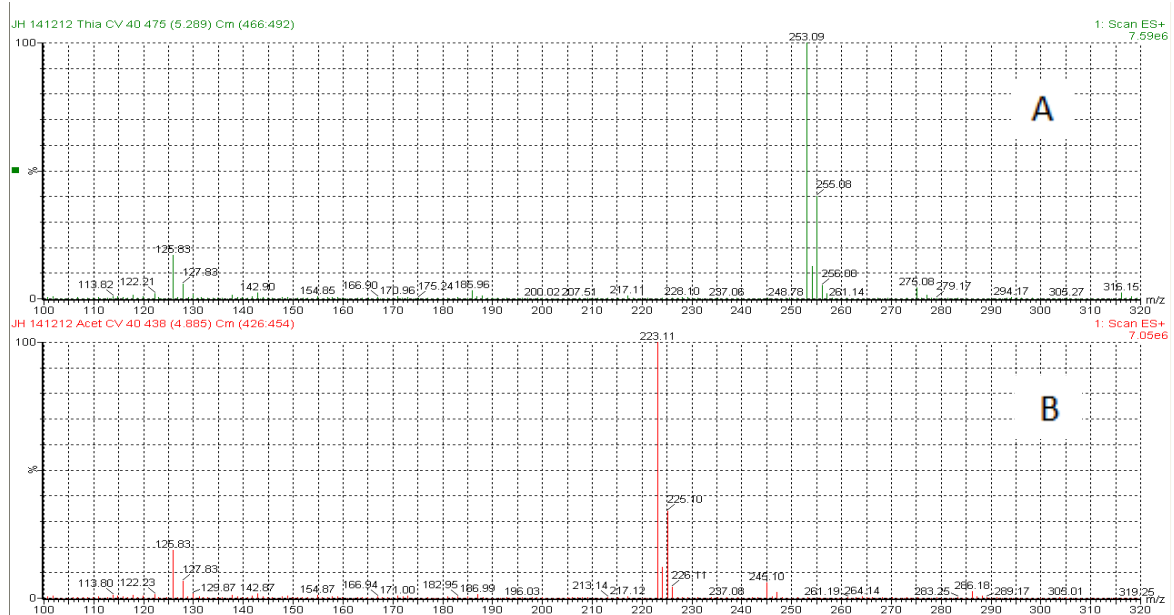
A: Thiocloprid, B: Nitenpyram, C: Acetamiprid, D: Clothianidin, E: Imidacloprid.



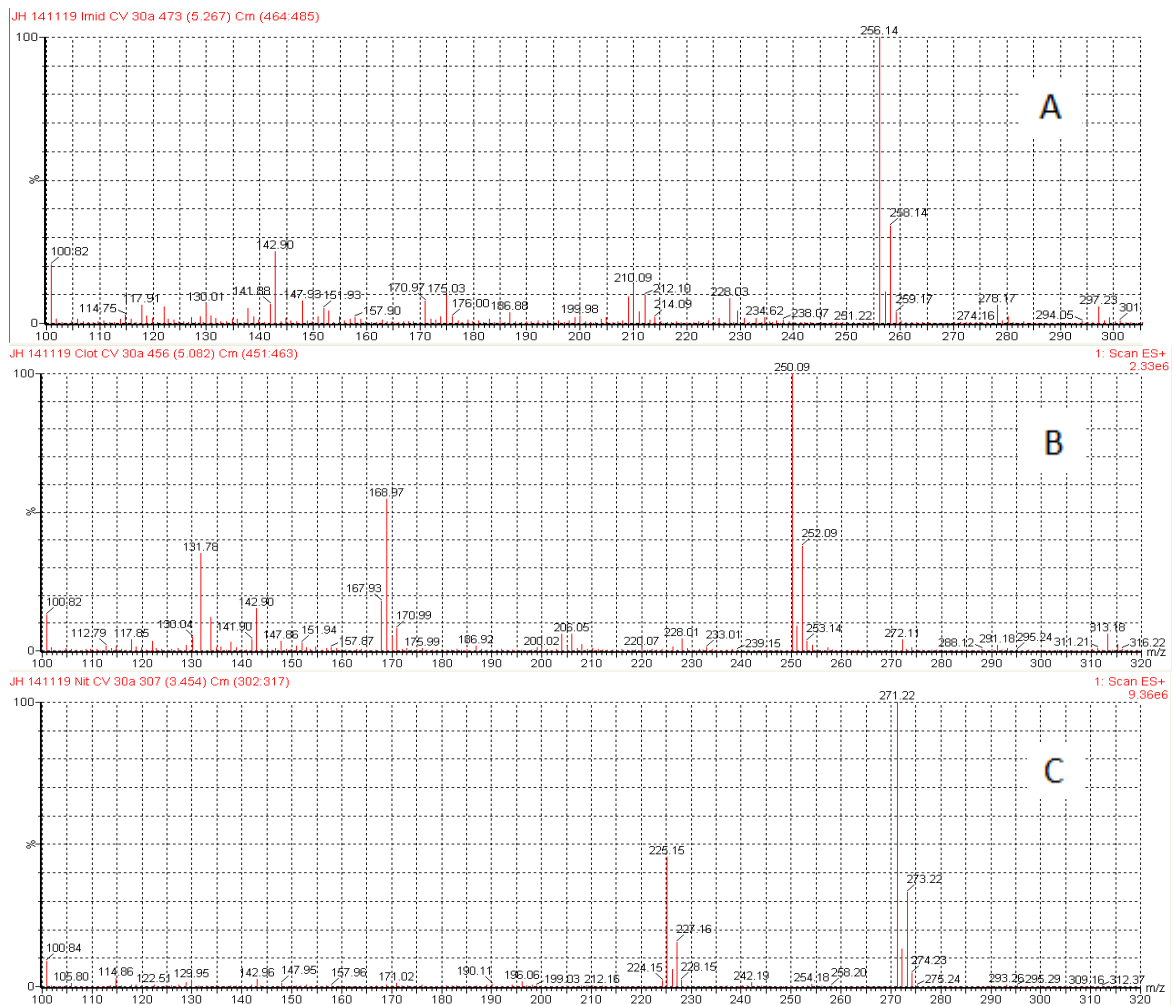
Figur 8. Isokratisk eluering, SIR, 25% mobilfase C.

A: Thiocloprid, B: Nitenpyram, C: Acetamiprid, D: Clothianidin, E: Imidacloprid.

4.2 Bestemmelse Av Sekundært Ion For Identifisering



Figur 9. Scan modus, CV 40. A: Thiocloprid, B: Acetamiprid.



Figur 10. Scan modus, CV 30. A: Imidacloprid, B: Clothianidin, C Nitenpyram.

Tabell 13: Molekylion og sekundært ion ved SIR, valgt ved gitt CV.

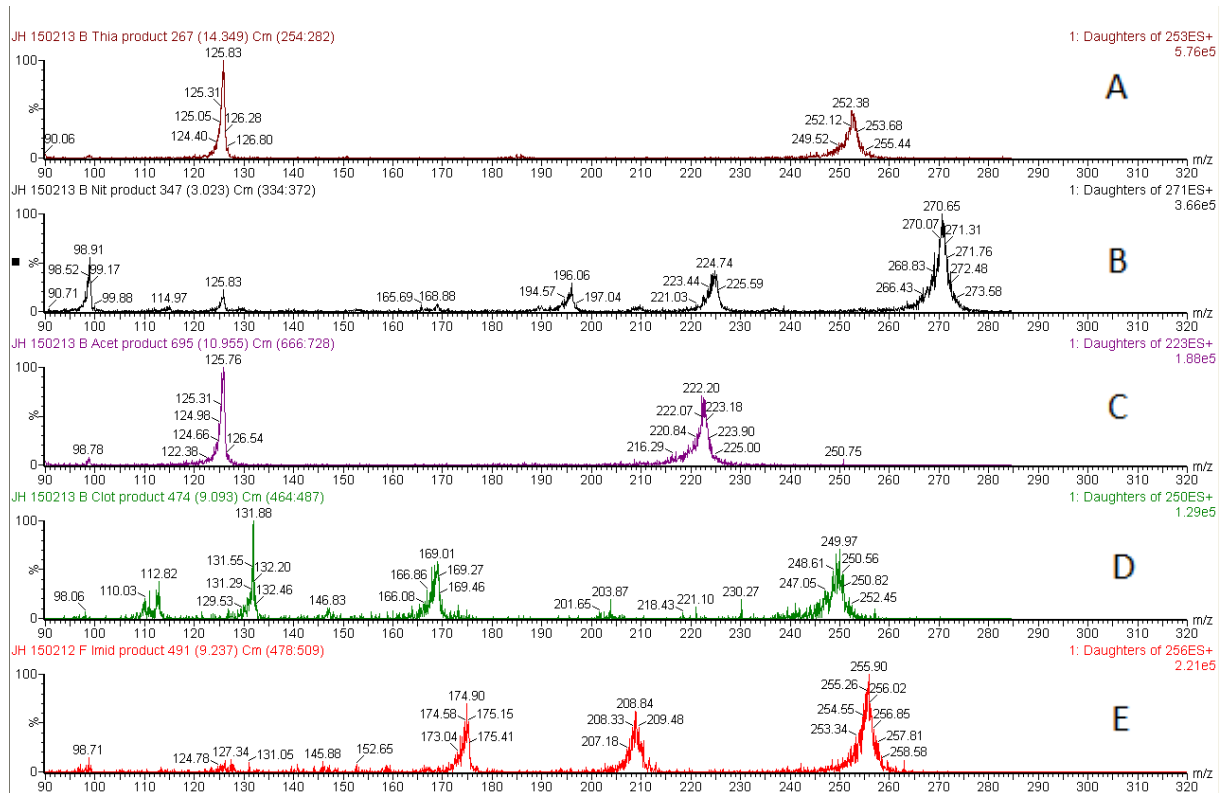
Neonicotinoid	Molekylion	Fragment ion	CV
Imidacloprid	256	210	30
Clothianidin	250	169	30
Acetamiprid	223	126	40
Nitenpyram	271	225	30
Thiacloprid	253	126	40

4.3 $AUC_{Molekylion} / AUC_{Sekundært\ ion}$

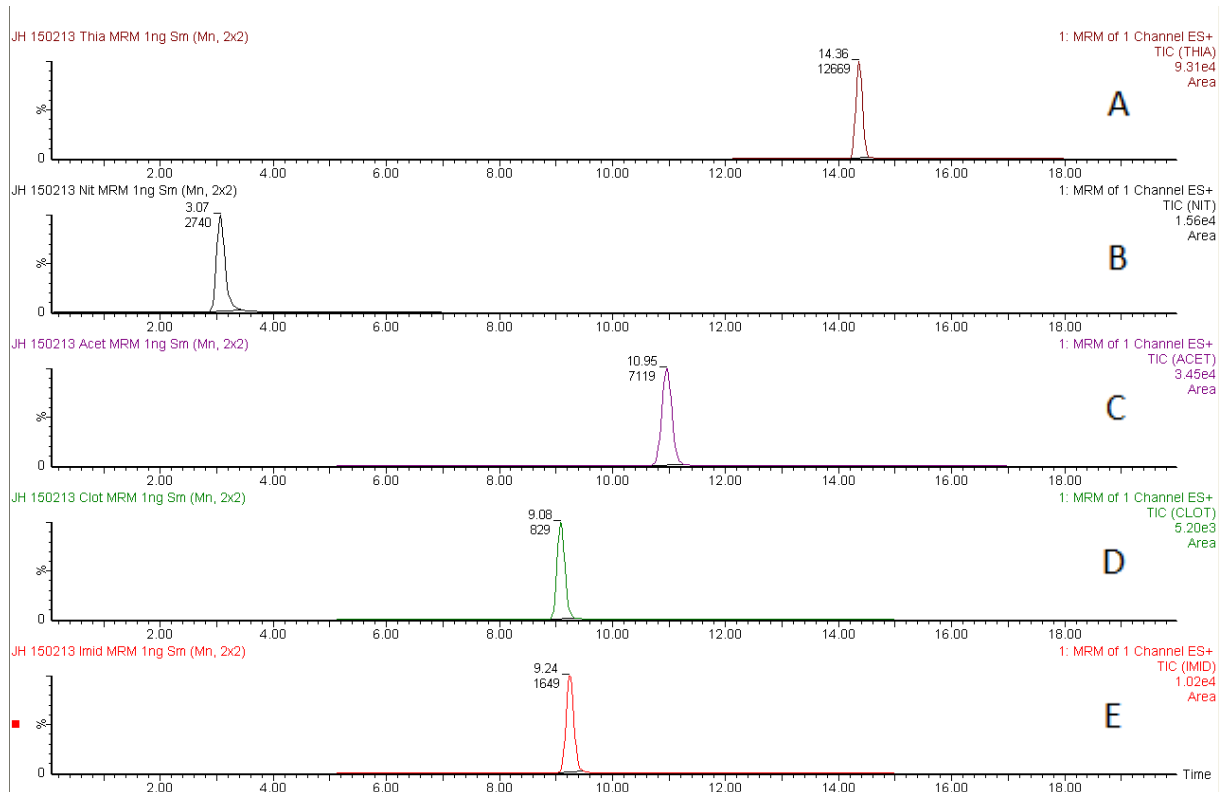
Tabell 14: AUC for molekylioner og fragmentioner ved ulike konsentrasjoner, SIR.

Neonicotinoid	AUC	Mengde stoff på kolonnen (ng)					A/A
		7,5	15	30	60	120	
Imidacloprid	A256	218 570	422 102	745 076	1 398 907	2 503 155	22,16
	A210	10 016	18 719	33 973	63 278	111 706	
	A256/A210	21,79	22,55	21,93	22,11	22,41	
Clothianidin	A250	111 818	215 574	413 860	783 261	1 300 416	4,12
	A169	27 144	54 005	100 474	190 750	307 057	
	A250/A169	4,12	3,99	4,12	4,11	4,24	
Acetamiprid	A223	351 243	608 659	617 983	1 016 440	1 356 395	8,91
	A126	40 748	80 498	61 371	108 487	151 514	
	A223/A126	8,62	7,56	10,07	9,37	8,95	
Nitenpyram	A271	519 431	965 349	1 867 096	3 454 795	6 114 661	6,35
	A225	79 893	152 011	295 921	548 283	975 895	
	A271/A225	6,50	6,35	6,31	6,30	6,27	
Thiacloprid	A253	130 220	277 171	463 241	745 201	1 399 397	9,72
	A126	13 013	27 931	47 661	78 910	146 809	
	A253/A126	10,01	9,92	9,72	9,44	9,53	

4.4 MRM



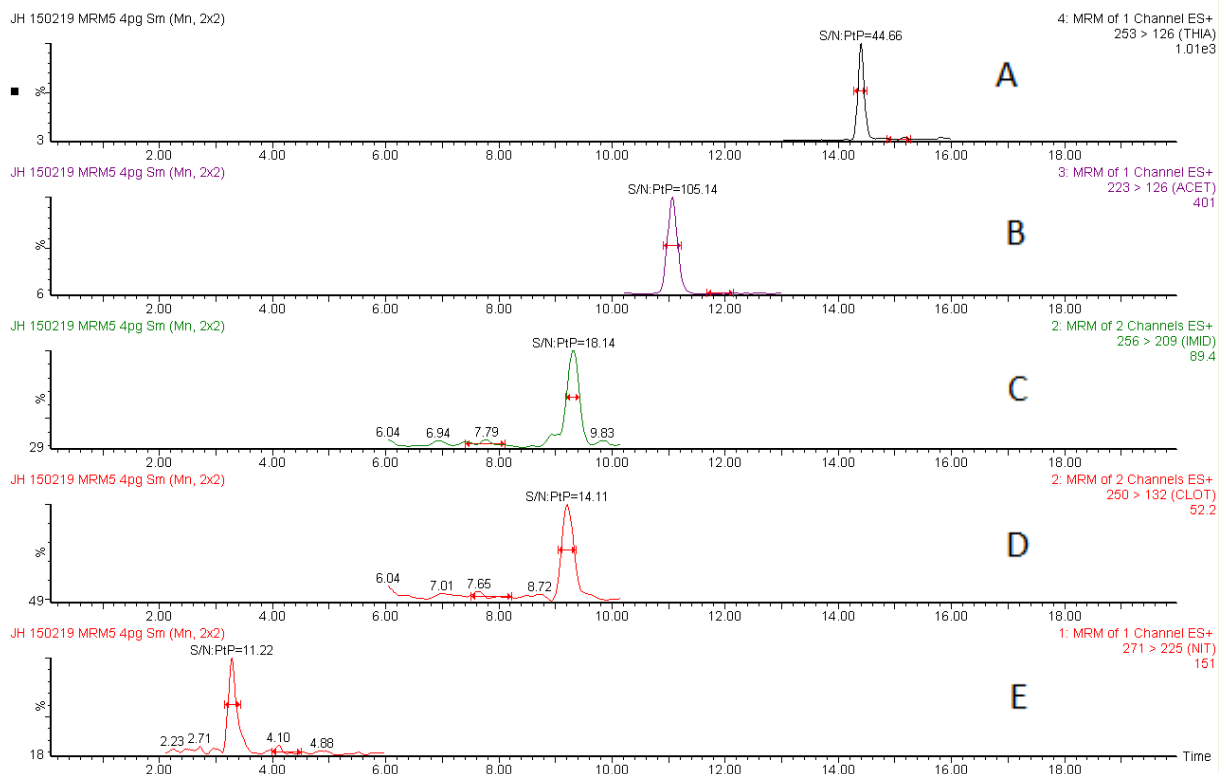
Figur 11. Produktscan, CE 35. A: Thiocloprid, B: Nitenpyram, C: Acetamiprid, D: Clothianidin, E: Imidacloprid.



Figur 12. MRM, 3ng på kolonne. A: Thiocloprid, B: Nitenpyram, C: Acetamiprid, D: Clothianidin, E: Imidacloprid.

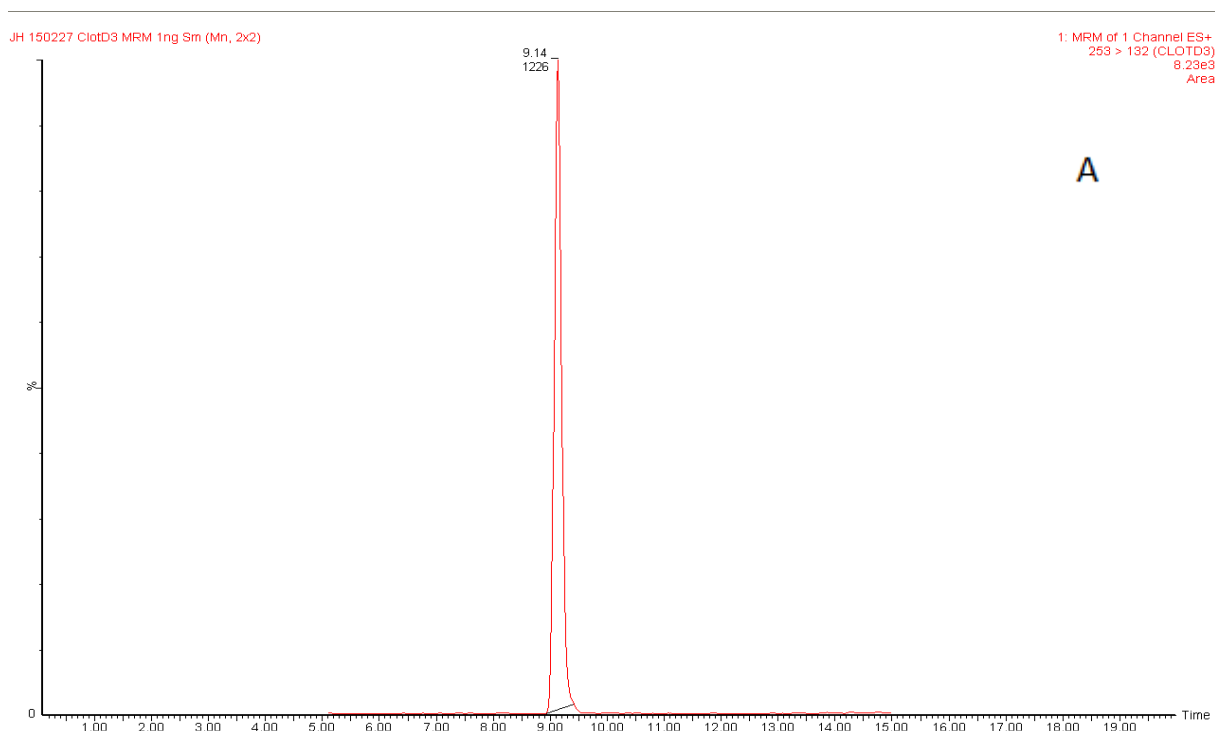
Tabell 15: MRM metode.

Neonicotinoid	MRM		CE	CV	Tid (min)
	256 →	209			
Imidacloprid	256 →	209	35	30	6-10,2
Clothianidin	250 →	132	35	30	6-10,2
Acetamiprid	223 →	126	35	30	10,2-13
Nitenpyram	271 →	225	35	30	2-6
Thiacloprid	253 →	126	35	30	13-16



Figur 13. MRM, 12pg på kolonne, S/N ratio. A: Thiachloprid, B: Acetamiprid, C: Imidacloprid, D: Clothianidin, E: Nitenpyram.

4.5 Internstandard



Figur 14. MRM, 3ng på kolonne. A: Clothianidin-d3.

Tabell 16: MRM metode internstandard.

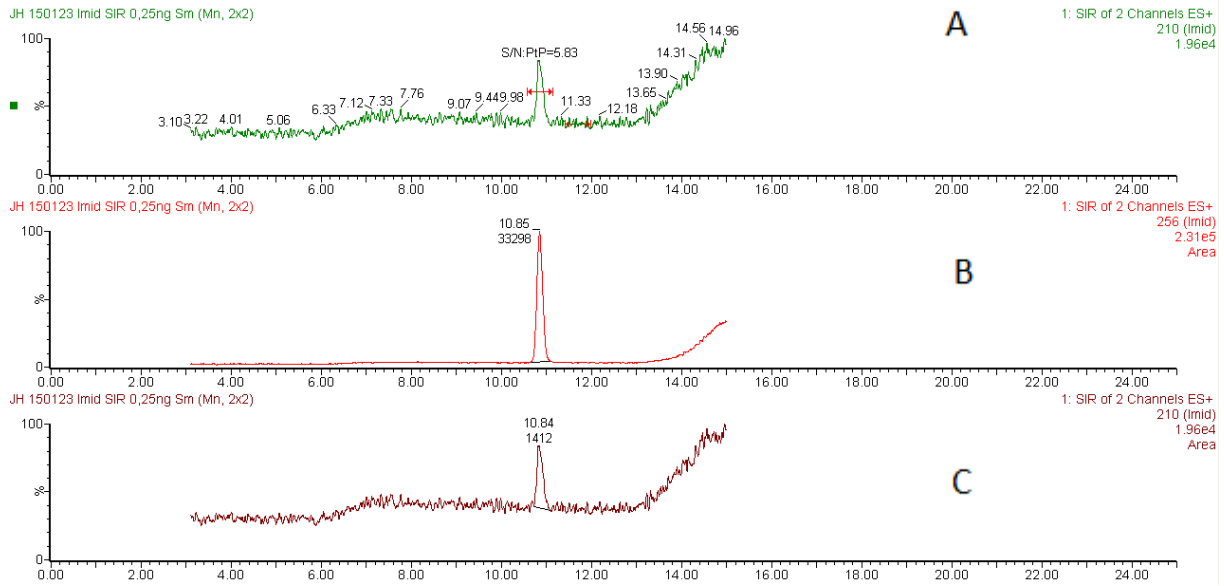
Neonicotinoid	MRM		CE	CV	Tid (min)
Clothianidin-d3	253 →	132	35	30	6-10,2

4.6 LOD og LLOQ

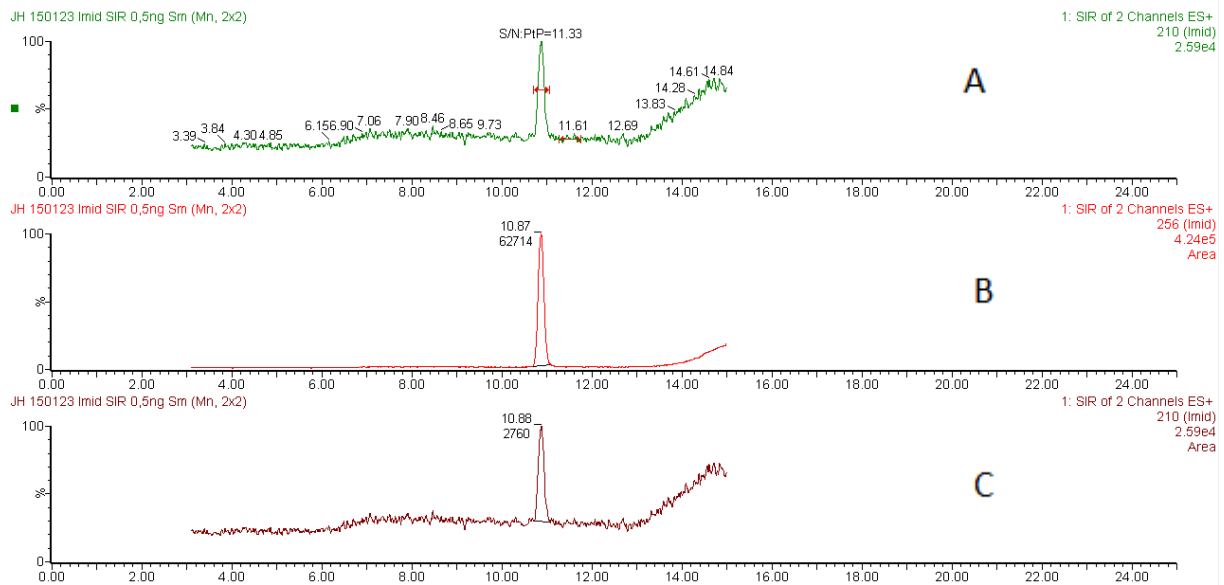
Samlede verdier for alle 5 neonicotinoidene. Dvs. alle hadde S/N ratio over tidligere nevnte grenser.

Tabell 17: Estimat av LOD og LLOQ ved SIR og MRM.

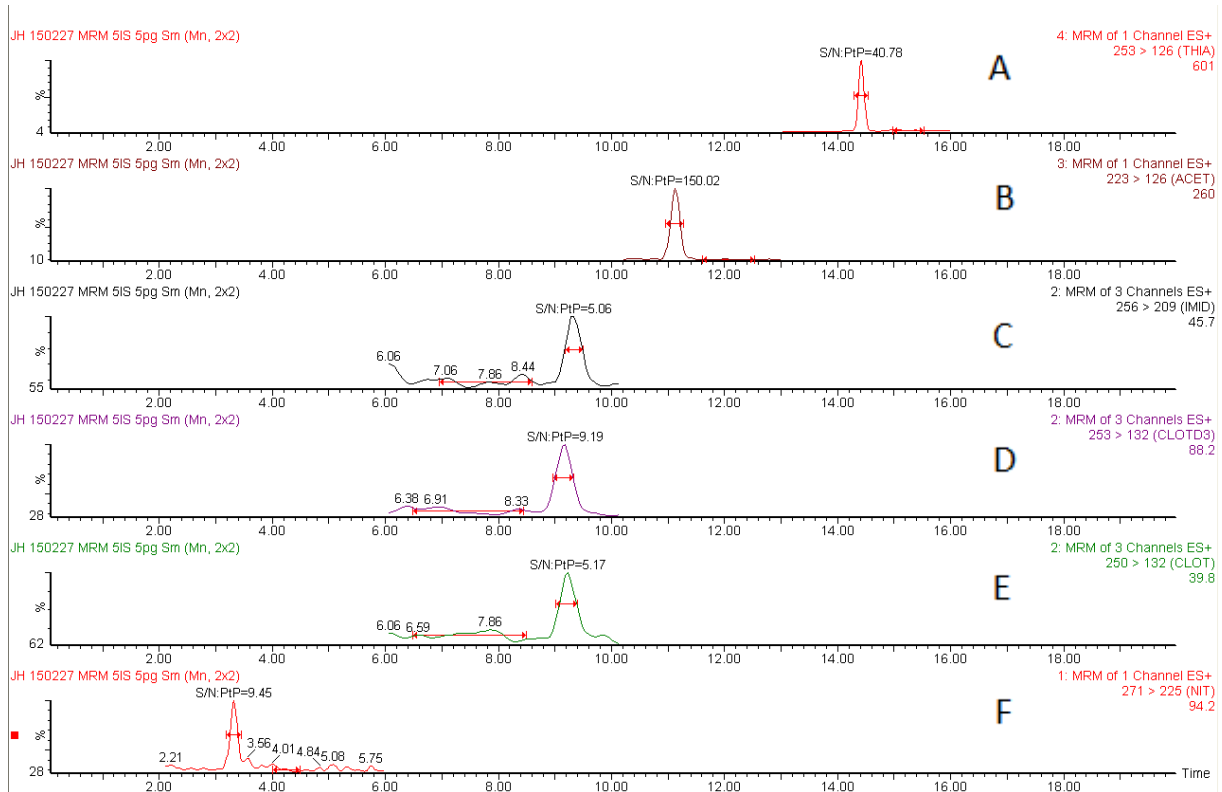
Metode	LOD (mengde på kolonne)	LLOQ (mengde på kolonne)
SIR	0,75 ng	1,5 ng
MRM	10 pg	20 pg



Figur 15. SIR, 0,75ng på kolonne, Imidacloprid. A: S/N ratio 210, B: Signal 256, C: Signal 210.

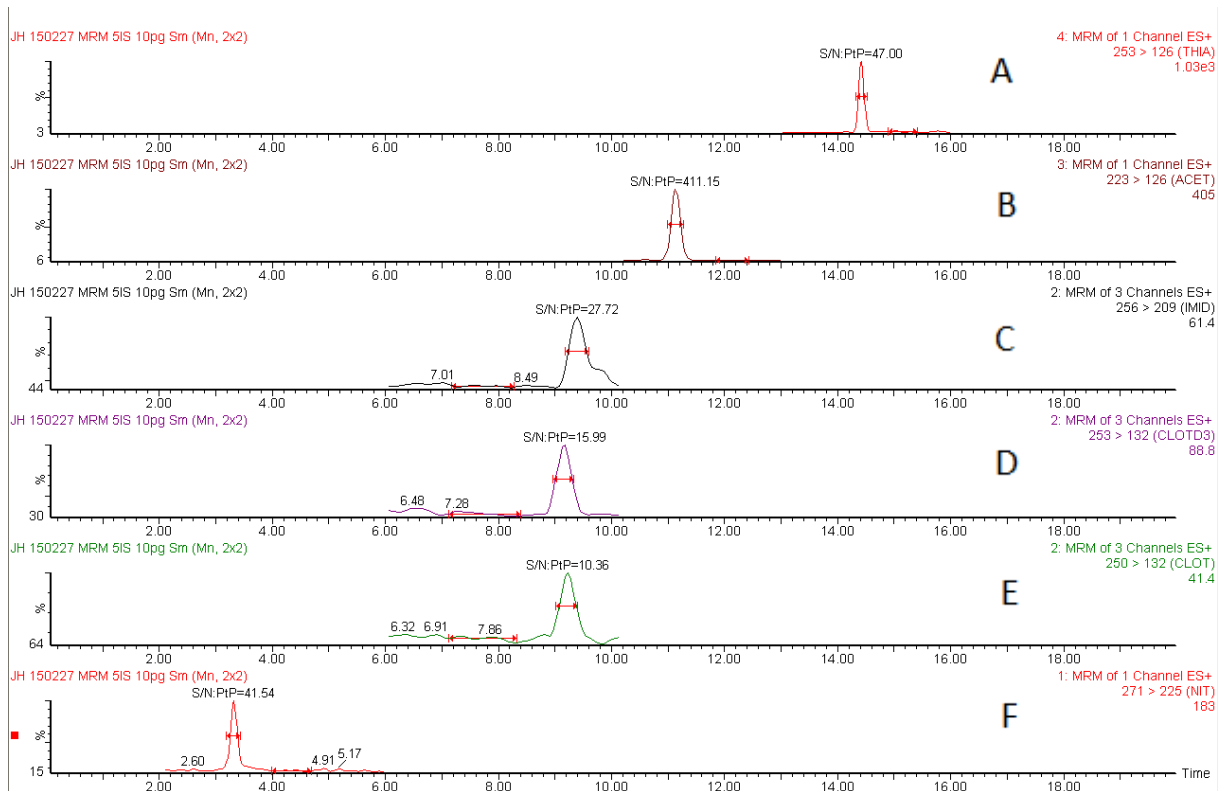


Figur 16. SIR, 1,5ng på kolonne, Imidacloprid. A: S/N ratio 210, B: Signal 256, C: Signal 210.



Figur 17. MRM, 10pg på kolonne, S/N ratio.

A: Thiocloprid, B: Acetamidrid, C: Imidacloprid, D: Clothianidin-d3, E: Clothianidin, F: Nitenpyram.



Figur 18. MRM, 20pg på kolonne, S/N ratio.

A: Thiocloprid, B: Acetamidrid, C: Imidacloprid, D: Clothianidin-d3, E: Clothianidin, F: Nitenpyram.

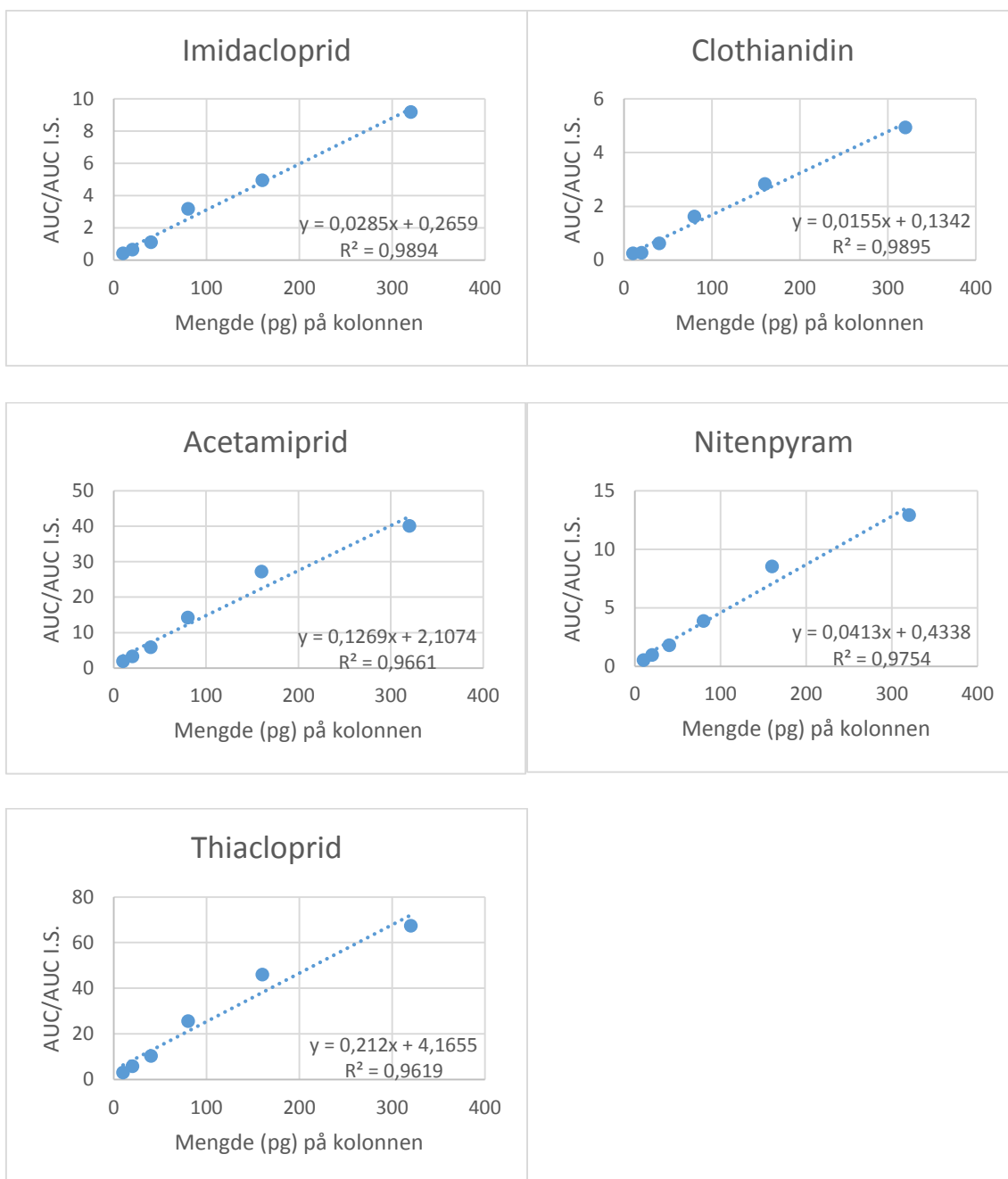
4.7 Standardkurver

Tabell 18: AUC (3 målinger og gjennomsnitt) for ulike konsentrasjoner neonicotinoider og I.S.

Neo	Mengde stoff på kolonnen (pg)											
	(40pg i alle prøver for Clot-d ₃)											
	10		20		40		80		160		320	
Nit	10		21		40		60		147		303	
AUC	12	11,67	20	21	40	41,67	68	68,33	174	162	306	310,33
	13		22		45		77		165		322	
Clot	6		4		14		20		42		91	
AUC	6	5,67	5	6	11	14,67	39	28,67	48	54	108	118,67
	5		9		19		27		72		157	
Imid	7		14		28		55		118		237	
AUC	12	9,33	17	14	22	26	55	56,33	76	94,33	248	220,67
	9		11		28		59		89		177	
Acet	44		72		127		252		518		981	
AUC	43	42,67	68	70,33	140	136,67	253	251,33	514	517,33	964	962,33
	41		71		143		249		520		942	
Thia	69		119		223		401		786		1445	
AUC	68	70	130	127,33	243	454	490	454	908	874	1702	1619
	73		133		263		471		928		1710	
Clot-d ₃	22		19		20		18		19		26	
AUC	26	22,33	20	21,67	29	23,33	16	17,67	18	19	25	24
	19		26		21		19		20		21	

Tabell 19: AUC Neonicotinoid/ AUC internstandard (se tabell 17).

Neo	Mengde stoff på kolonnen (pg)					
	(40pg i alle prøver for Clot-d ₃)					
	10	20	40	80	160	320
Nit	0,52	0,97	1,79	3,87	8,53	12,93
Clot	0,25	0,28	0,63	1,62	2,84	4,94
Imid	0,42	0,65	1,11	3,19	4,96	9,19
Acet	1,91	3,25	5,86	14,22	27,23	40,10
Thia	3,13	5,88	10,42	25,69	46,00	67,46



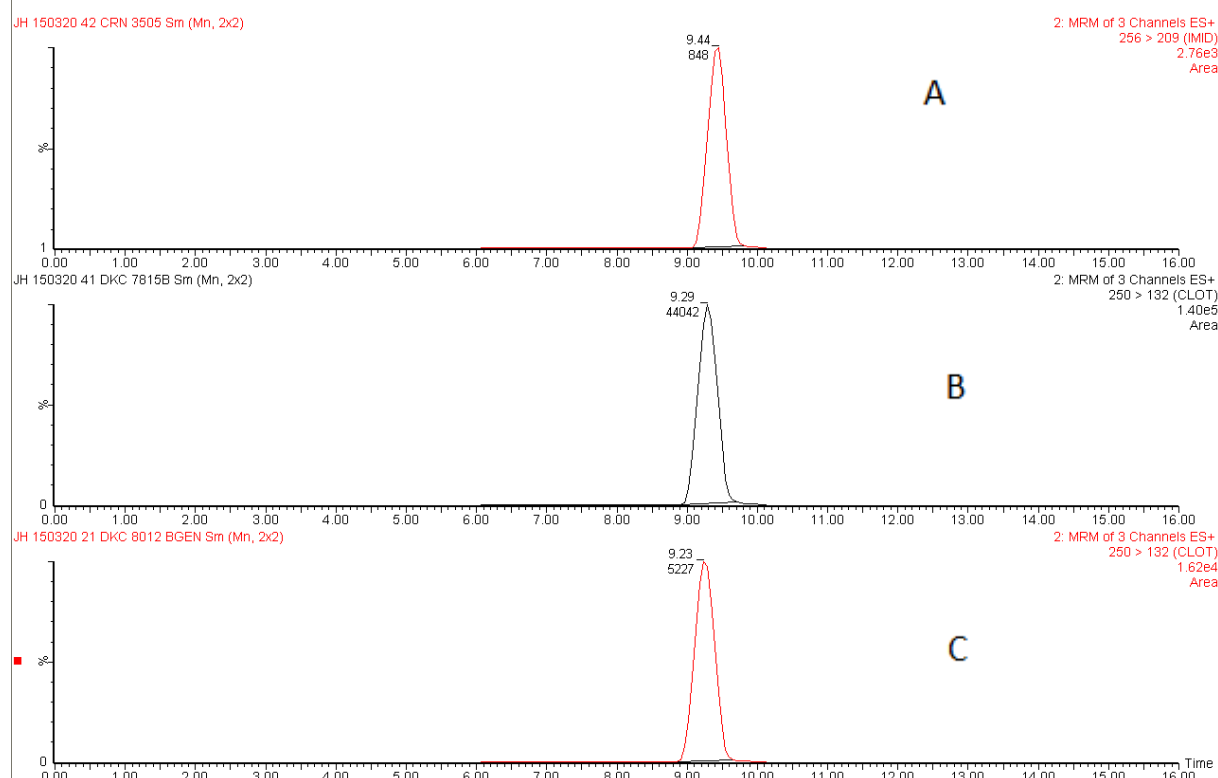
Figur 19. Standardkurver for neonicotinoidene.

4.8 Maisfrøprøver

Det ble funnet neonicotinoider i 3 av 7 maisfrøprøver (2.1, 4.1 og 4.2) ved bruk av MRM metoden.

Tabell 20: Maisfrøprøver (5 frø) der neonicotinoider ble funnet, AUC og type neonicotinoid.

Maisfrøprøve (5 frø)	AUC	Neonicotinoid
2.1	5227	Clothianidin
4.1	44 042	Clothianidin
4.2	848	Imidacloprid



Figur 20. MRM maisfrøprøve (5 frø). A: Prøve 4.2, Imidacloprid, B: Prøve 4.1, Clothianidin, C: Prøve 2.1, Clothianidin.

Målingene gjort av enkeltfrøprøver tydet på en rimelig uniform fordeling av neonicotinoider på frøene innad i de 3 ulike prøvene (2.1, 4.1 og 4.2).

Tabell 21: AUC for enkeltfrøprøver (3 målinger).

Maisfrøprøve (1 frø)	AUC				
	S1	S2	S3	S4	S5
2.1	5817	6848	6653	6586	6067
2.1	5854	5445	6433	6508	5464
2.1	5326	5384	6378	5085	5799
4.1	35 151	41 274	40 170	36 558	39 631
4.1	29 201	40 609	39 434	36 398	39 651
4.1	38 721	44 144	42 890	37 909	41 752
4.2	902	343	914	676	719
4.2	598	247	664	460	568
4.2	608	350	649	453	615

Tabell 22: AUC (3 målinger og gjennomsnitt) for maisfrøprøver (5 frø) med internstandard.
AUC/AUCinternstandard.

Maisfrøprøve (5 frø)	AUC						AUC/AUC IS
	Clothianidin		Imidacloprid		Clothianidin-d3		
2.1	4715		-	-	1503		3,12
2.1	5369	5648,33	-	-	2217	1805	
2.1	6861		-	-	1695		
4.1	42 871		-	-	5282		8,09
4.1	46 097	45 108,33	-	-	5878	5577,33	
4.1	46 357		-	-	5572		
4.2	-	-	655		168		3,86
4.2	-	-	678	653	116	169,33	
4.2	-	-	626		224		

Mengde neonicotinoid ble beregnet (se Appendiks 3):

Tabell 23: Estimat av mengde neonicotinoid per gram maisfrø.

Maisfrøprøve (5 frø)	Mengde (µg/g maisfrø)	
	Clothianidin	Imidacloprid
2.1	58,56	-
4.1	1627,50	-
4.2	-	3,61

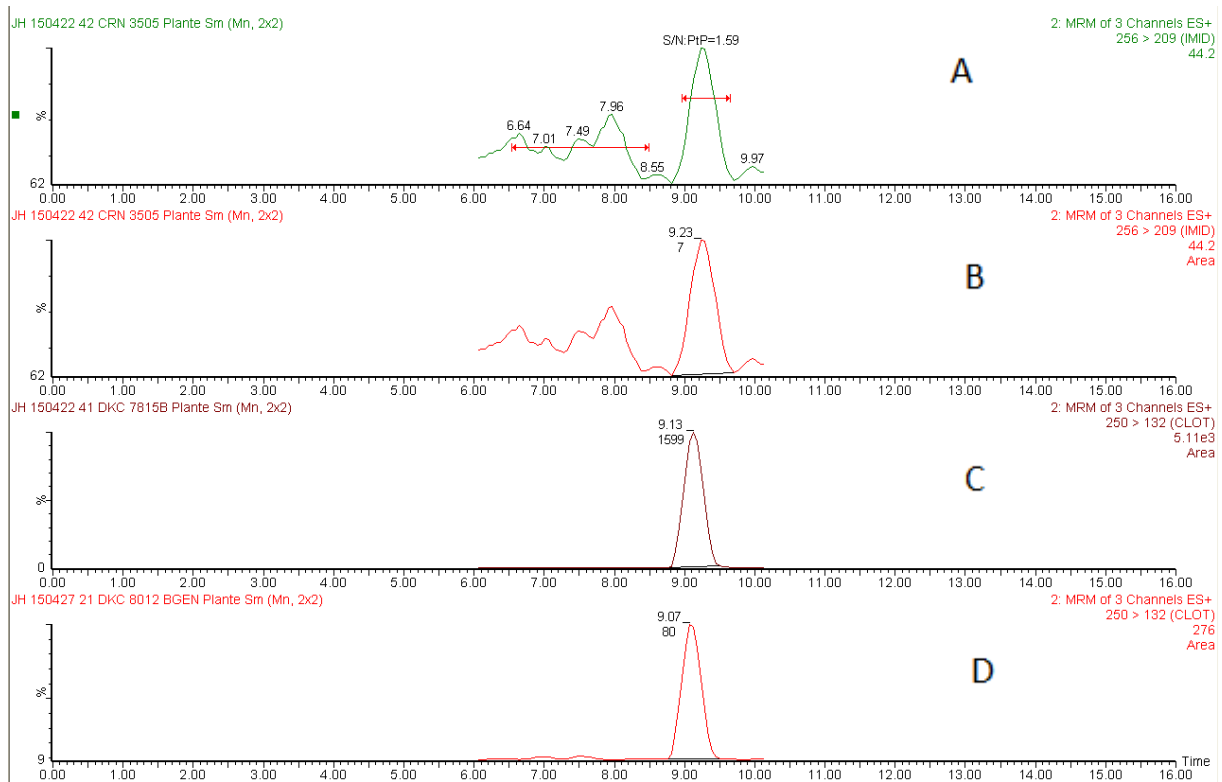
4.9 Maisplantepøver

Neonicotinoid ble funnet i plantepøvene.

Tabell 24: AUC Maisplantepøver.

Maisplantepøver	AUC	Neonicotinoid
2.1	80	Clothianidin
4.1	1599	Clothianidin
4.2	7*	Imidacloprid

*Under LOD



Figur 21. MRM maisplantepøver.

A: S/N ratio prøve 4.2, Imidacloprid, B: Prøve 4.2, Imidacloprid, C: Prøve 4.1, Clothianidin, D: Prøve 2.1, Clothianidin.

5. DISKUSJON

5.1 Mobilfasegradient

Den største utfordringen ved konstruksjon av mobilfasegradienten var å oppnå en rimelig separasjon av Imidacloprid og Clothianidin. Det ble gradvis foretatt endringer som bedret denne, frem til separasjonen ble ansett som akseptabel. Målet var å utvikle en så god som mulig mobilfasegradient, men det ble ikke brukt så mye tid på å finjustere den. Alle overgangene mellom mobilfasekonsentrasjonene var lineære. Gradienten kan helt sikkert forbedres med tanke på effektivitet (tid) og separasjon, ved endringer av kurven på overgangene og/eller tidsjustering av konsentrasjonene. Som det fremgår av figur 12 (4.4) er ikke separasjonen av Imidacloprid og Clothianidin optimal, men med bruk av MRM med ulike (M+H)⁺ ioner og fragmenter ble den ansett som tilstrekkelig.

5.2 SIR

En god del tid ble brukt på A/A, LOD og LLOQ beregning ved SIR. Dette var som følge av svært varierende signalrespons ved kjøring av standarder. Dette kompliserte nødvendigvis målinger der en stabil AUC er nødvendig. Med all sannsynlighet skyldtes dette problemer med MS, som det ble utført service på i perioden, eller en blokkering i systemet, muligens i inngang til MS. Etter service, vask av nål og priming av seal wash, kunne målingene foretas. Problemet ble ikke oppdaget igjen ved videre arbeid med MRM.

5.3 MRM

Som nevnt tidligere ble MRM foretrukket som metode pga. senket LOD og LLOQ (figur 15, 16, 17, 18, 4.6), og en bedre selektivitet ved MRM enn SIR. Også her kan helt sikkert metoden forbedres. Endring av CE, CV eller eventuelt endring av fragmentation, vil muligens kunne gi bedre sensitivitet. Tidsavgrensningen for de ulike Neonicotinoidene er i noen tilfeller ganske smale og tillater ikke store endringer i retensjonstid. Noe som ikke førte til store problemer under kjøring av prøvene med MRM metoden, men det var tidligere observert variasjoner i retensjonstid etter tekniske problemer med PC og LC, etter bruk av kolonne av andre, etter bytte av kolonne, og muligens som følge av at ulike personer tillaget mobilfase.

Tidsavgrensningene bør justeres til systemet som brukes, og smale vinduer er ikke nødvendigvis problematisk så lenge man er klar over dem. Retensjonstidene ble kontrollert før kjøring av prøver.

5.4 LOD og LLOQ

Verdiene presentert i resultatdelen er ikke absolutte. De er basert på relativt få målinger og et litt motvillig dataprogram for beregning av S/N ratio. Det bør også presiseres at de er samlede verdier for alle 5 neonicotinoidene, verdier der alle neonicotinoidene er over grensene, og at verdiene kan senkes noe for enkelte neonicotinoider både ved SIR og MRM. Verdiene vil variere noe avhengig av hvilket system man bruker, men estimatet presentert gir et godt bilde av hvilken mengde vi var i stand til å detektere ved bruk av de ulike metodene.

5.5 Standardkurver

Standardkurvene ble satt opp før vi hadde prøvemateriale. De ble satt opp i laveste detekterbare område, og litteraturen kunne tyde på at dette var hensiktsmessig, med tanke på forventede mengder, men det er selvsagt avhengig av hvilke prøver man har. Lineariteten gitt av R^2 verdien kunne muligens vært litt bedre, og man kunne vurdert å kjøre nye standarder, men dette er tidkrevende. Det kan nevnes at de to standardkurvene faktisk benyttet (Imidacloprid, Clothianidin) har R^2 verdier tett under 0,99.

5.6 Maisfrøprøver

De første prøvene med 5 frø ble kjørt for å se om vi kunne detektere neonicotinoider. Da det ble bekreftet ble forsøket gjentatt med veiing av frø og større nøyaktighet. I tillegg til MRM ble prøvene kjørt i scan modus. Det ble sett etter $(M+H)^+$ ionene for de to neonicotinoidene som ikke var en del av metoden. Kromatogram fra prøvene i MRM kombinert med fra prøvene kjørt i scan modus, førte til at det ble konkludert at Neonicotinoid var funnet i 3 av prøvene. Den tilsynelatende store mengden av disse (gitt av AUC) antyder at neonicotinoidene brukes i så store mengder, at det er usannsynlig at noen av de 5 neonicotinoidene som var en del av

metoden, var til stede i de andre prøvene. På den annen side det kan ikke utelukkes at de var det i en konsentrasjon lavere enn vi detekterte med vår prøveopparbeidelse og metode. Det kan ikke sies med sikkerhet hvorvidt de resterende to neonicotinoidene var tilstede. De ble ikke funnet ved kjøring av prøvene i scan modus.

Enkeltfrøprøvene gav både en indikasjon på at maisfrøene er coatet med en rimelig lik mengde neonicotinoid (innad i prøvene) og at metoden for skylling så ut til å gi relativt stabilt resultat i form av konsentrasjon (sammenligning innad og med 5 frø prøvene).

Målt AUC var godt over standardkurveområdet. Det ble vurdert å sette opp nye standardkurver i passende område for kvantifisering, men pga. spredning i verdier av AUC for prøvene ville det ideelle være 3 ulike standardkurver, men dette ville vært svært tidkrevende. Vi ønsket heller å forsøke å få med noen planteprøver i tillegg på den tiden som var igjen, i stedet for å fokusere på en helt nøyaktig kvantifisering. Eksisterende standardkurver ble dermed benyttet. Ekstrapolering av disse er i utgangspunktet ikke noe stort problem, når lineariteten er god, men mengdene benyttet ved oppsett av standardkurve var små, og feil her kan gi litt skjevhet i kurve som gir unøyaktighet i høyere mengdeområder. Mengdene beregnet er dermed litt usikre som følge av å ikke ligge innenfor standardkurveområdet. Det er også en usikkerhet i om alt av neonicotinoid ble løst ved skylling av frøene.

Mengden internstandard benyttet ble økt i prøvene for å gi et hensiktsmessig forhold AUC/AUC I.S. Dette var også særlig nødvendig for prøvene inneholdende Clothianidin, der det viste seg at prøvene også gav et lite utslag på MRM metoden for Clothianidin-d3. Dette skyldes mest sannsynlig at 2,7% av Clothianidin molekylene veier 252,01. Økende mengde Clothianidin gav større utslag. Ved å øke mengden internstandard fjernes denne påvirkningen av AUC I.S. vil ha på forholdstallet AUC/AUC I.S.

5.7 Maisplanteprøver

Tidsbegrensning gjorde det vanskelig å få gjort mye med plante, jord og rotprøvene etter høsting. Det ble vurdert at plantedelen var den umiddelbart mest interessante å se på. Samleprøvene ble laget for ikke å ødelegge enkeltprøver med tanke på mulig fremtidig bruk. Det var ut fra kjent informasjon om Neonicotinoidene forventet å finne de igjen i planten, men usikkert i hvilken mengde og om det enkle forsøket med prøveopparbeidelse ville gi god nok

ekstrahering og rensing for deteksjon. Resultatet gav identifikasjon av Clothianidin og en indikasjon på Imidacloprid, selv om denne strengt tatt var under LOD. Verdiene var naturlig nok lavere enn for maisfrøprøvene, ettersom kun en fraksjon av neonicotinoid kan forventes å bli tatt opp i planten, og det som tas opp fordeles. I tillegg var samleprøvene under gjennomsnittlig plantemasse for ett frø, og alle ble tatt fra toppen av plantene. Konsentrasjonen innad i planten kan muligens variere. Det er heller ikke lett å si noe om recovery fra planten ved ekstrahering.

5.8 Konklusjon

Til tross for flere usikre faktorer som kunne vært videre utviklet i metoden viser forsøket de første trinnene på en relativt enkel prosedyre som kan benyttes for å måle konsentrasjon neonicotinoider i plantematerialer. En videreutviklet metode, gjerne optimalisert med tanke på løsemiddelsammensetning for best mulig recovery, med tilsatt internstandard, kunne i fremtiden benyttes for å sammenligne innhold av neonicotinoider i ulike stadier av plantens livssyklus. Dette kunne være et bidrag til videre studier av neonicotinoiders rolle i agro-økosystemene der disse er i bruk. Med de enorme landområdene som benyttes til avlinger av for eksempel mais, vil Neonicotinoideene kunne ha viktige økologiske og biologiske effekter.

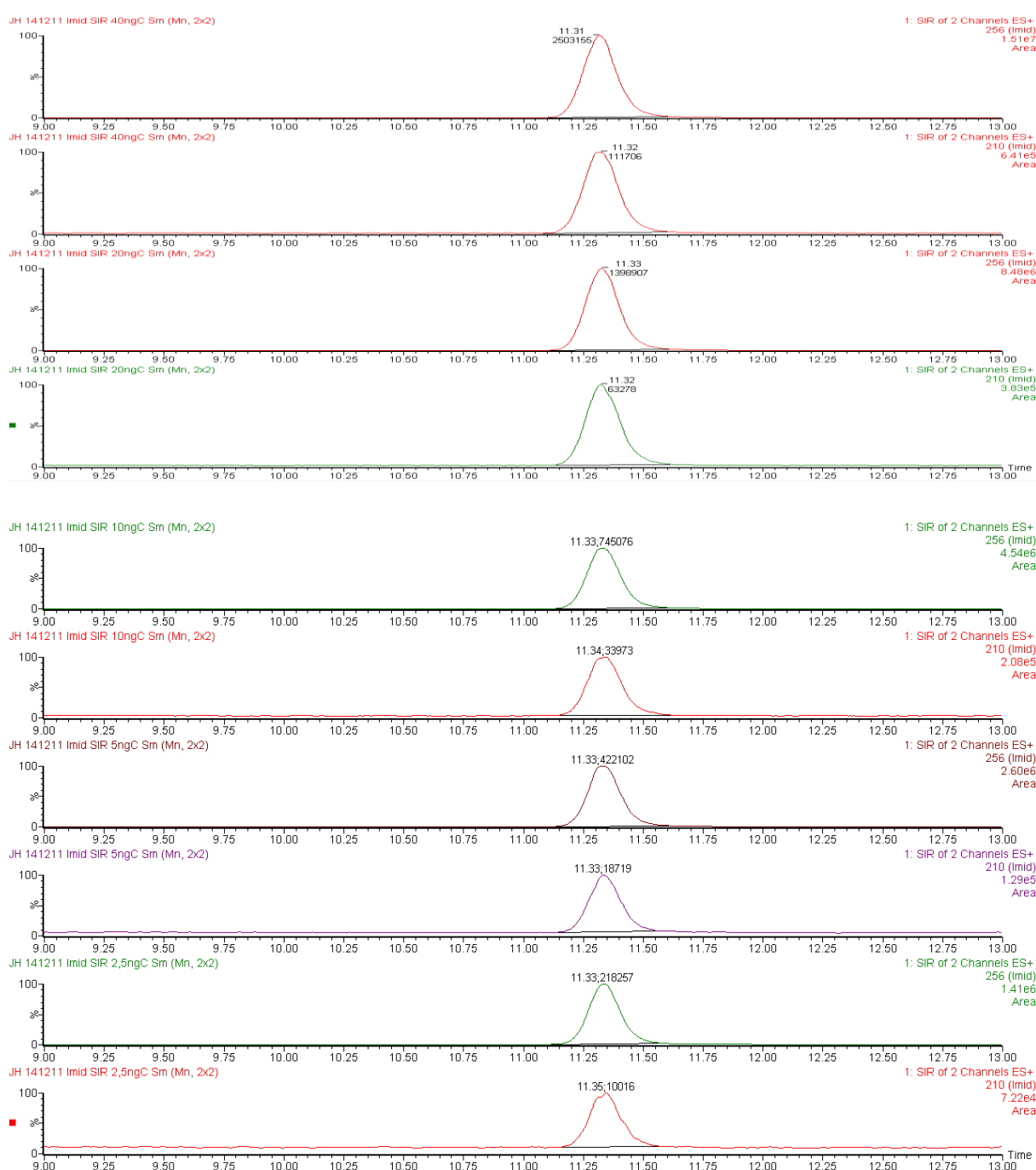
6. REFERANSER

1. Tomizawa M, Casida JE. Neonicotinoid insecticides: highlights of a symposium on strategic molecular designs. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2011;59(7):2883-6.
2. Jeschke P, Nauen R, Schindler M, Elbert A. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2011;59(7):2897-908.
3. EFSA: Bee health [cited 2014]. Available from: <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/beehealth.htm>.
4. Simon-Delso N, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bonmatin JM, Chagnon M, Downs C, et al. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental science and pollution research international*. 2014.
5. Tomizawa M, Casida JE. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annual review of entomology*. 2003;48:339-64.
6. Bonmatin JM, Giorio C, Girolami V, Goulson D, Kreutzweiser DP, Krupke C, et al. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environmental science and pollution research international*. 2014.
7. EFSA identifies risk to bees from neonicotinoids [cited 2014]. Available from: <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/130116.htm>.
8. EUROPA; Bees & Pesticides: Commission goes ahead with plan to better protect bees [cited 2014]. Available from: http://ec.europa.eu/food/archive/animal/liveanimals/bees/neonicotinoids_en.htm.
9. Pisa LW, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bonmatin JM, Downs CA, Goulson D, et al. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environmental science and pollution research international*. 2014.
10. Gibbons D, Morrissey C, Mineau P. A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environmental science and pollution research international*. 2014.
11. Yanez KP, Bernal JL, Nozal MJ, Martin MT, Bernal J. Determination of seven neonicotinoid insecticides in beeswax by liquid chromatography coupled to electrospray-mass spectrometry using a fused-core column. *Journal of chromatography A*. 2013;1285:110-7.
12. Kamel A. Refined methodology for the determination of neonicotinoid pesticides and their metabolites in honey bees and bee products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Journal of agricultural and food chemistry*. 2010;58(10):5926-31.

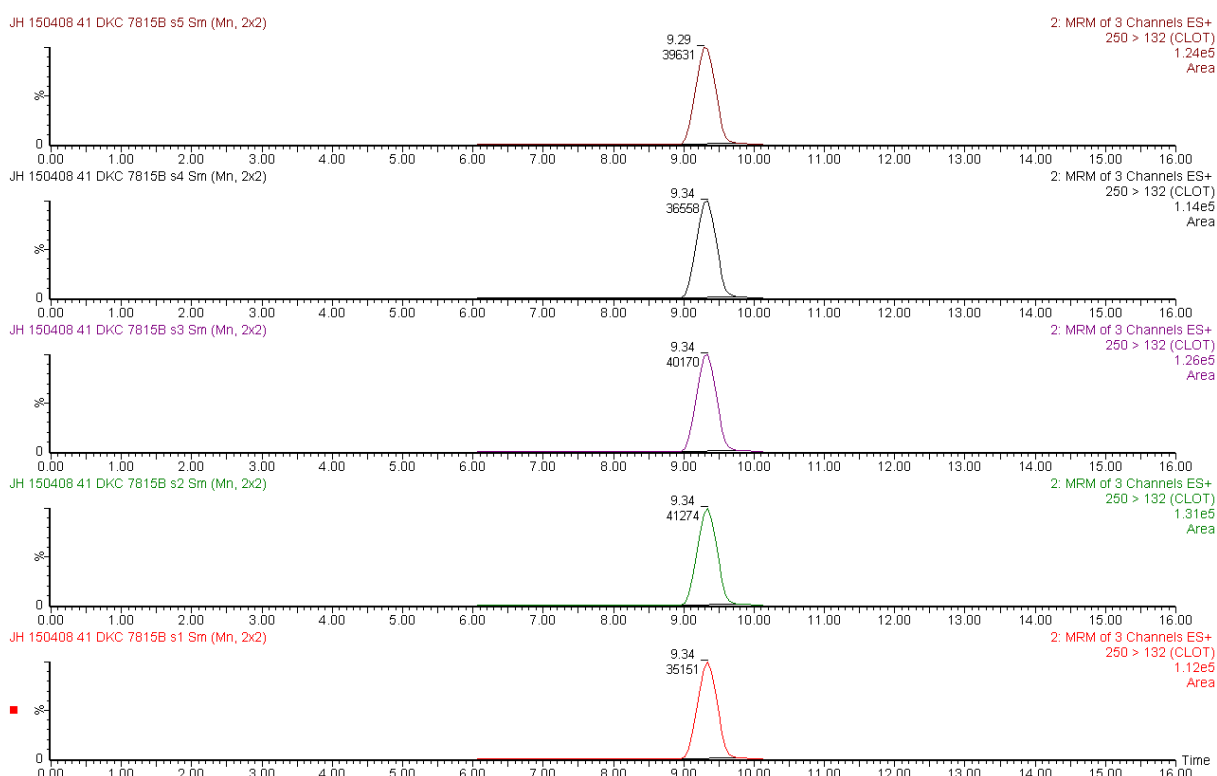
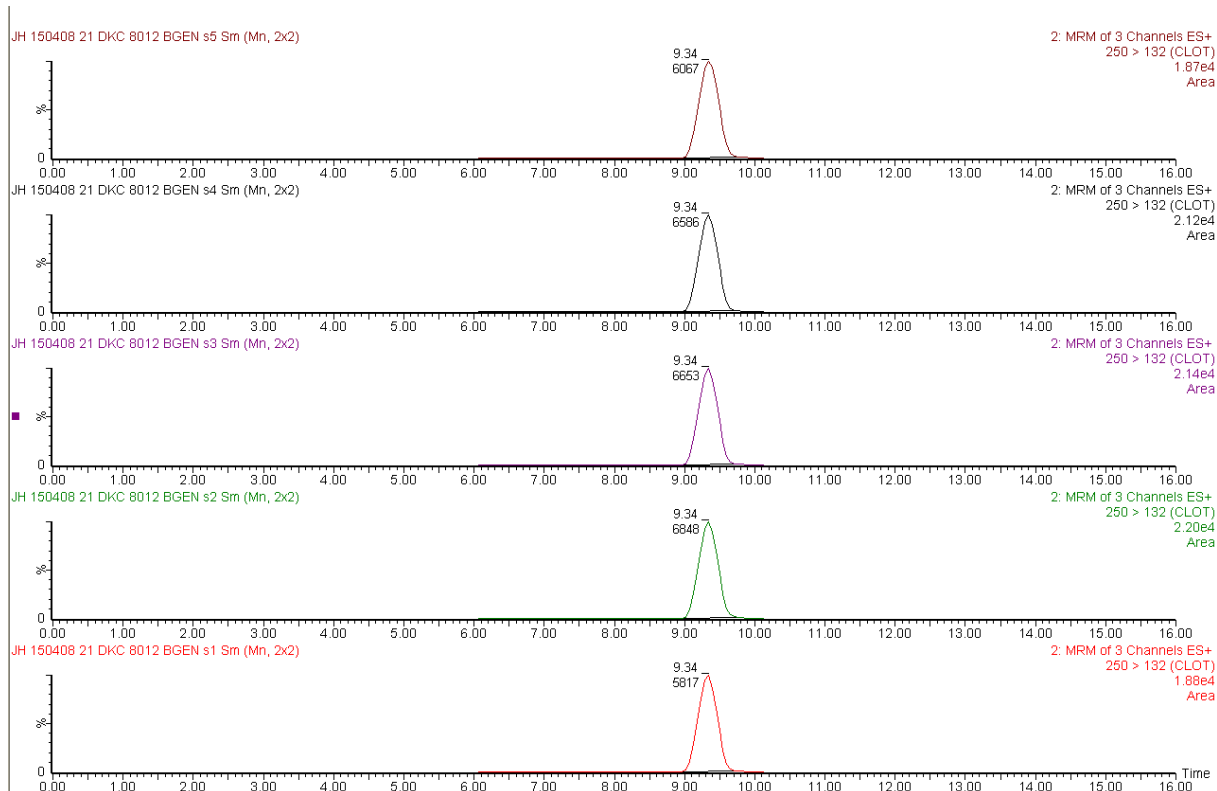
7. APPENDIKS

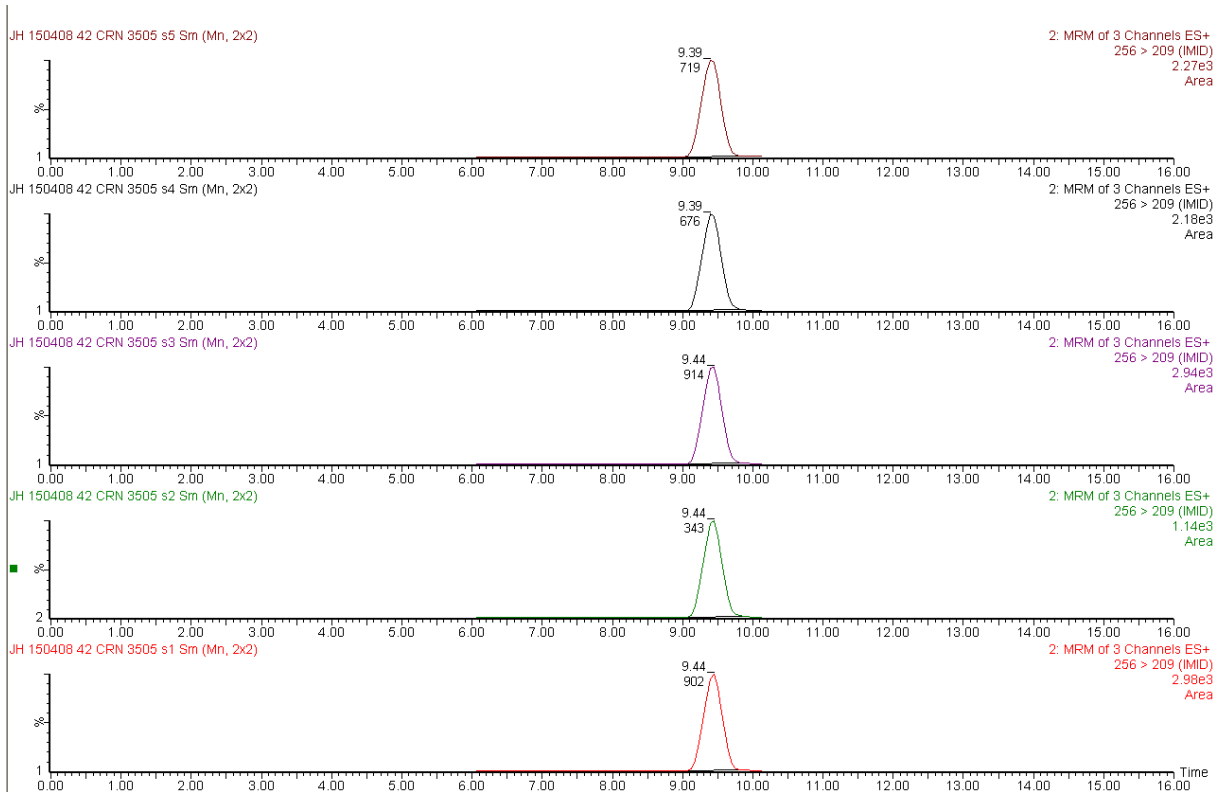
APPENDIKS 1: *Kromatogram*

A/A Imidacloprid

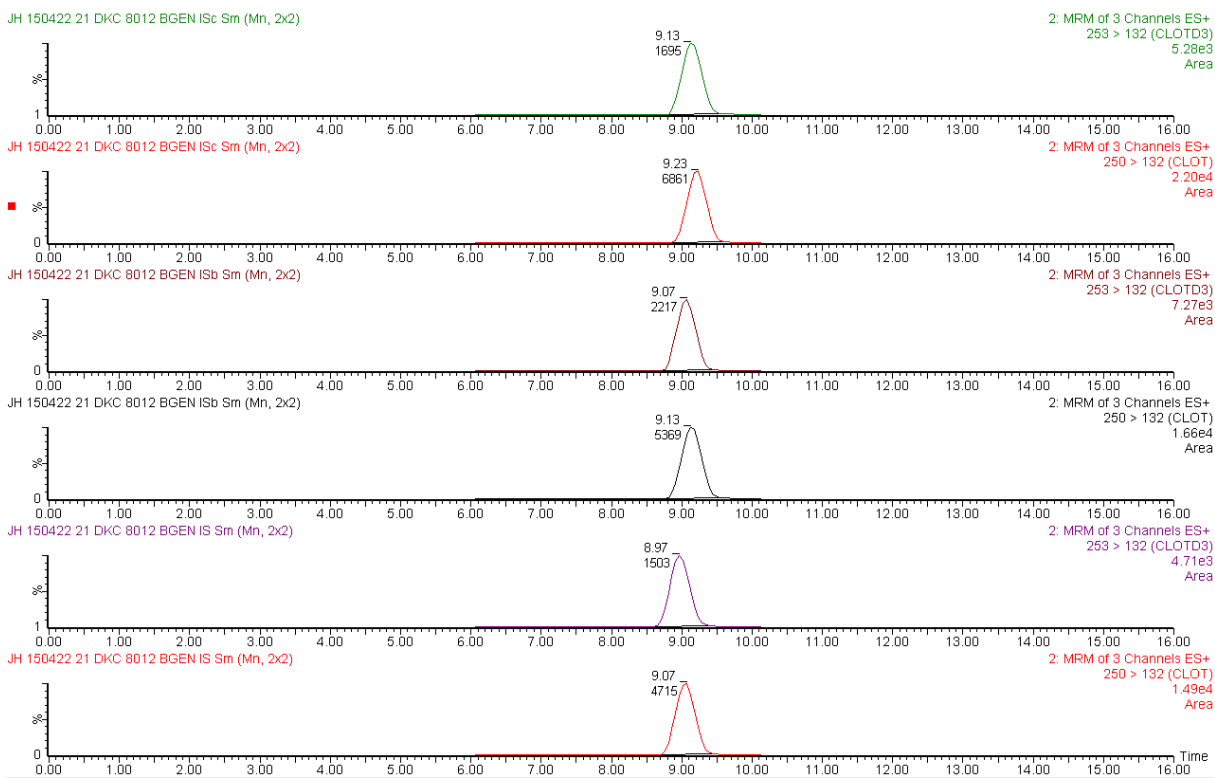


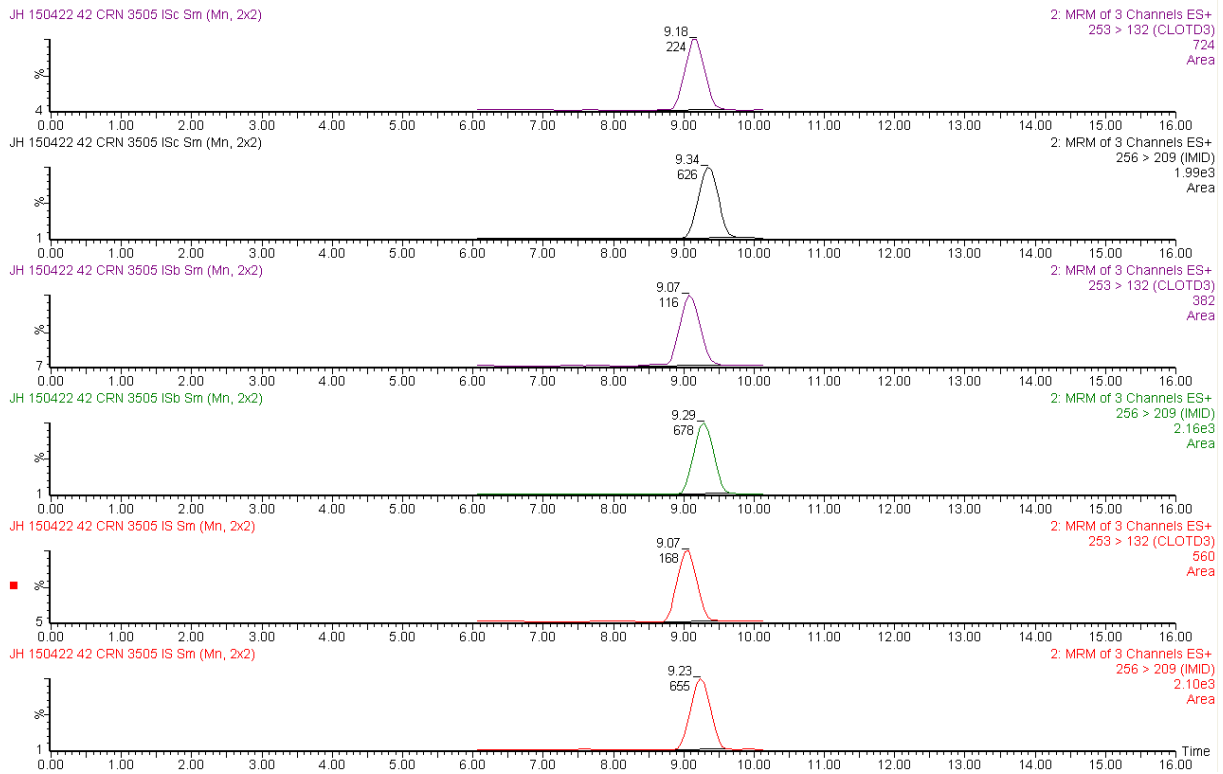
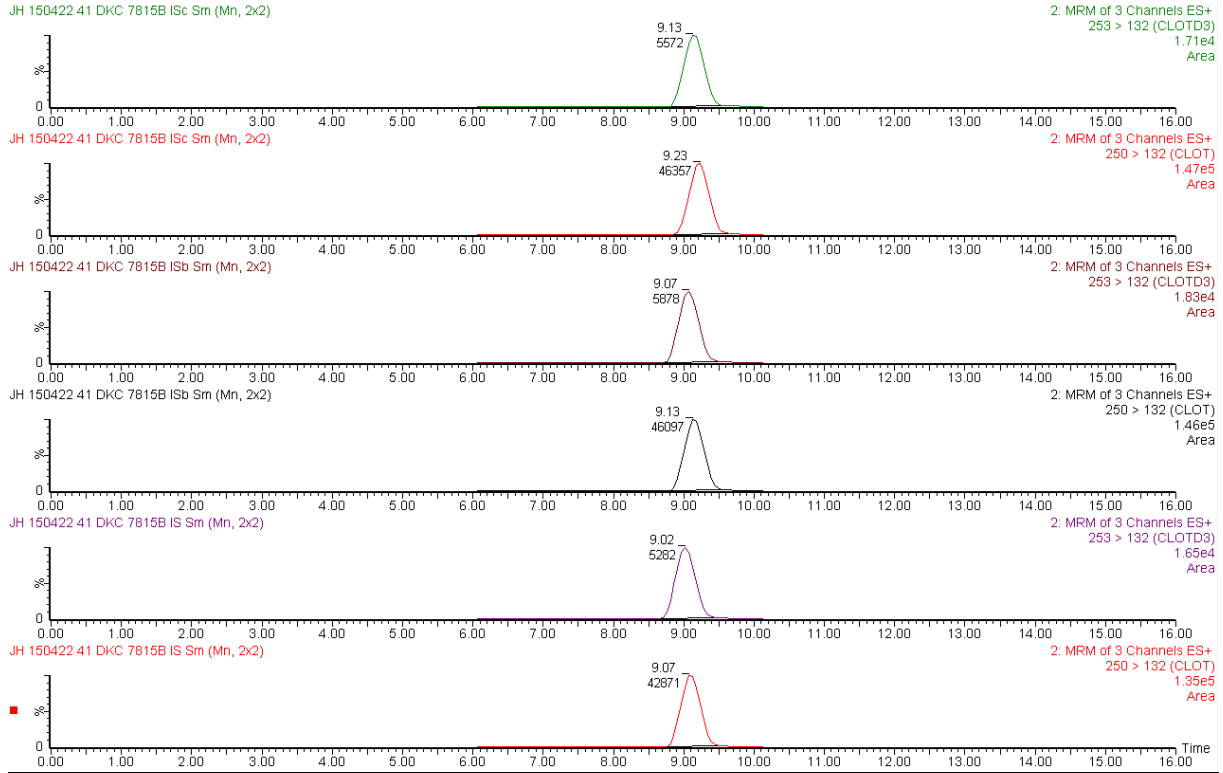
Maisfrøprøver (1 frø)





Maisfrøprøver (5 frø) med I.S.





APPENDIKS 2: MS-instillingen

Voltages

Capillary (kV)	3.00
Extractor (V)	3
RF Lens (V)	0.2

Temperature

Source Temp.(C°)	100
Desolvation Temp.(C°)	150

Gas Flow

Desolvation (L/hr)	400
Cone (L/hr)	60

Syringe

Pump Flow (µl/min)	10
--------------------	----

Analyser

LM Resolution 1, 2	15.0
HM Resolution 1, 2	15.0
Ion Energy 1	0.5
Ion Energy 2	1.0
Entrance	30
Collision	3
Exit	30.0
Multiplier	650
Collision Gas Flow (ml/min)	0.21

SIR

Ionization Mode	ES+
Span	0.1
Inter-Channel Delay	0.02
Inter-Scan Delay	0.05
Dwell	0.100

Produktscan

Ionization Mode	ES+
Scan Time	0.3
Inter-Scan Delay	0.2

MRM

Ionization Mode	ES+
Span	0
Inter-Channel Delay	0.02
Inter-Scan Delay	0.1
Dwell	1.000

APPENDIKS 3: Regneeksempler

Kvantifisering av maisfrøprøver

Standardkurvene er gitt ved:

$$Y = aX + b$$

$$\text{AUC} / \text{AUC I.S.} = aX + b$$

Mengden internstandard ble økt med en faktor f (10, 100 og 1000) for de reelle prøvene. Mengde på kolonne var dermed:

$$\text{AUC} / (\text{AUC I.S.} \times f) = (aX + b) \times 1 / f$$

$$Y = (aX + b) / f$$

$$X = (Y \times f - b) / a$$

$$X = (3,12 \times 100 - 0,1342) / 0,0155 = 20,12\text{ng på kolonne} \quad (\text{Prøve 2.1})$$

$$X = (8,09 \times 1000 - 0,1342) / 0,0155 = 521,93\text{ng på kolonne} \quad (\text{Prøve 4.1})$$

$$X = (3,86 \times 10 - 0,2659) / 0,0285 = 1,35\text{ng på kolonne} \quad (\text{Prøve 4.2})$$

2µl injeksjonsvolum ble benyttet. Konsentrasjonen i prøvene var dermed:

$$20,12\text{ng} / 2\mu\text{l} = 10,06\text{ng}/\mu\text{l} \quad (\text{Prøve 2.1})$$

$$521,93\text{ng} / 2\mu\text{l} = 260,97\text{ng}/\mu\text{l} \quad (\text{Prøve 4.1})$$

$$1,35\text{ng} / 2\mu\text{l} = 0,68\text{ng}/\mu\text{l} \quad (\text{Prøve 4.2})$$

10ml ble benyttet i skylling. Total mengde var:

$$10,06\text{ng}/\mu\text{l} \times 10\,000\mu\text{l} = 100,60\mu\text{g} \quad (\text{Prøve 2.1})$$

$$260,97\text{ng}/\mu\text{l} \times 10\,000\mu\text{l} = 2609,70\mu\text{g} \quad (\text{Prøve 4.1})$$

$$0,68\text{ng}/\mu\text{l} \times 10\,000\mu\text{l} = 6,80\mu\text{g} \quad (\text{Prøve 4.2})$$

Mengde per gram maisfrø:

$$100,60\mu\text{g} / 1,7178\text{g} = 58,56\mu\text{g}/\text{g} \quad (\text{Prøve 2.1})$$

$$2609,70\mu\text{g} / 1,6035\text{g} = 1627,50\mu\text{g}/\text{g} \quad (\text{Prøve 4.1})$$

$$6,80\mu\text{g} / 1,8827\text{g} = 3,61\mu\text{g}/\text{g} \quad (\text{Prøve 4.2})$$