

Projectnr.: 7151301

Projecttitel: Onderzoek naar micro-verontreinigingen in opdracht van derden

Projectleider: W.A. Traag

Rapport 2001. 001

januari 2001

Residuen van fungiciden in tarwestro in relatie tot de teelt van champignons

Deel 2

G.D. van Bruchem¹, W.A. Traag¹, Dr. F.J.M. Verhagen²

- 1 Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT)
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen
Postbus 230, 6700 AE Wageningen
Telefoon 0317-475400
Telefax 0317-417717
- 2 Proefstation voor de Champignoncultuur
Postbus 6042, 5960 AA Horst
Telefoon 0774647575
Telefax 0774641567

Copyright 2001, Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT).
Overname van de inhoud is toegestaan mits met duidelijke bronvermelding.

VERZENDLIJST

INTERN

Directeur

Programmaleiders

Public relations & secretarie (2X)

Bibliotheek (4X)

Auteurs

P.C.H. Hollman

EXTERN

Proefstation voor de Champignoncultuur te Horst, (Dr. F.J.M. Verhagen, Ing. J.G.M. Amsing en Prof.Dr. L.J.L.D. van Griensven)

Sectie Toxicologie, Departement Levensmiddelentechnologie en Voedingwetenschappen, L.U.W. te Wageningen (Dr. G.M. Alink)

Nutriënten Management Instituut NMI, afdeling Onderzoek LUW te Wageningen (Dr.Ir. G.L. Velthof)

Laboratorium voor Organische Chemie, Departement Biomoleculaire Wetenschappen, LUW te Wageningen (Dr. J.B.P.A. Wijberg en Ir. H. Swarts)

	Blz.
INHOUD	1
SAMENVATTING	3
1 INLEIDING	5
1.1 Onderzoek	5
1.2 Doel	5
1.3 Ontwikkeling methode	6
2 MATERIALEN EN METHODEN	6
2.1 Monstermateriaal	6
3 RESULTATEN	7
3.1 Identificatie	7
3.1.1 Gaschromatografisch criterium	7
3.1.2 Massaspectrometrisch criterium	7
3.2 Interpretatie GC-MS resultaten	7
3.3 Berekening gehalten op basis van externe standaardmethode	7
4 CONCLUSIES	11
5 LITERATUUR	11
BIJLAGEN	
Bijlage 1: Materialen en Methoden	
Bijlage 2: Doel en toepassingsgebied	

SAMENVATTING

Residuen van fungiciden in tarwestro in relatie tot de teelt van champignons
Deel 2

Rapport 2001.001

Januari 2001

W.A. Traag 1), G.D. van Bruchem 1), Dr.F.J.M. Verhagen 2)

- 1) Rijks-Kwaliteits Instituut voor Land- en Tuinbouwprodukten(RIKILT-DLO)
Afdeling natuurlijke inhoudsstoffen, residuen en contaminanten
Postbus 230, 6700 AE Wageningen (correspondentie adres)
- 2) Proefstation voor de Champignoncultuur
Postbus 6042, 5960 AA Horst

2 tabellen, 2 referenties, 12 bladzijden, 2 bijlagen

Het doel van dit deel (2) van het onderzoek was het ontwikkelen van methoden voor de bepaling van fungiciden in champost gemaakt van behandel stro en het uitvoeren van metingen in een aantal monsters. Dit verslag bevat de resultaten van de ontwikkeling van de analysemethode en van de bepaling van de drie fungiciden, azoxystrobine, epoxyconazool en kresoxim-methyl, in tarwestro. Het onderzoek is uitgevoerd in 38 monsters welke door het Proefstation voor de Champignoncultuur zijn genomen.

De ontwikkelde methode is goed geschikt voor de kwantitatieve bepaling van Kresoxim-methyl en Epoxyconazool. Voor Azoxystrobine is gezien de wisselende terugvindingen van de toegevoegde hoeveelheden de methode minder geschikt. Derhalve dienen de resultaten als indicatief te worden beschouwd. De gemeten gehalte zijn als volgt:

Gehalten in GSM (grondstoffenmengsel) is voor Azoxystrobine 1,06 mg/kg \pm 0,13, voor Epoxyconazool 6,75 \pm 1,72 en voor Kresoxim-methyl 6,68 \pm 0,22.

Gehalten in IVC (verse compost) is voor Azoxystrobine 5,65 mg/kg \pm 0,47, voor Epoxyconazool 4,48 mg/kg \pm 1,28 en voor Kresoxim-methyl <0,02 mg/kg.

Gehalten in EC (geënte compost) is voor Azoxystrobine 6,26 mg/kg \pm 0,33, voor Epoxyconazool 7,70 mg/kg \pm 2,72 (in deze monsters is naast Epoxyconazool ook Azoxystrobine aangetoond met een gehalte van 0,06 mg/kg \pm 0,02) en voor Kresoxim-methyl 0,06 mg/kg \pm 0,01.

Gehalten in DC (doorgroeide compost) is voor Azoxystrobine 9,71 mg/kg \pm 1,10, voor Epoxyconazool 5,79 mg/kg \pm 0,82 en voor Kresoxim-methyl <0,02 mg/kg

Kresoxim-methyl bleek in de tijd snel af te breken terwijl er voor Epoxyconazool geen afbraak in de tijd vastgesteld kon worden. Aangezien de methode voor Azoxystrobine niet kwantitatief is kan er geen eenduidige uitspraak worden gedaan. Wel lijkt er op dat er geen afbraak plaats vindt.

1 INLEIDING

In de tarweteelt worden sinds enige jaren enkele nieuwe fungiciden toegepast, die gebaseerd zijn op strobilurine. Het gaat hierbij vooral om de volgende twee produkten: Amistar van Zeneca en Allegro van BASF. Amistar bevat als werkzame stof 250 gram azoxystrobine per liter en Allegro bevat als werkzame stoffen 125 gram kresoxim-methyl en 125 gram epoxiconazol per liter. Deze middelen worden doorgaans toegepast tijdens het vlagbladstadium van het graan. Bij toepassing van deze middelen blijft het graan langer groen, maar het stro wordt uiteindelijk rijp geoogst. Onduidelijk is of dit behandelde stro moeilijker toegankelijk is voor bacteriën en schimmels, hetgeen een effect heeft op de afbreekbaarheid van het stro. Deze middelen hebben als fungicide een werkingsduur van ongeveer 5 weken.

In het eerste deel (Dr.F.J.M. Verhagen en W.A.Traag) van het onderzoek is de invloed van de toegepaste fungiciden bij de champignonteelt bestudeerd. Aan de producenten Zeneca en BASF is de vraag voorgelegd of bekend is hoeveel residu van de middelen achterblijft in het stro. Dit stro wordt immers weer gebruikt bij de productie van substraat voor champignonteelt. Zeneca noemt voor 1998 een getal van 0,8 mg azoxystrobine per kg droog stro. BASF geeft waarden van circa 1 mg kresoxim-methyl en circa 4 mg epoxiconazol per kg droog stro. Tijdens het bewaren van het stro nemen de concentraties van deze residuen af. Daarover zijn echter nog geen kwantitatieve gegevens beschikbaar. Residuen van fungiciden spelen mogelijk een rol bij de groei van schimmels in de champignonteelt. De invloed van het compostingsproces van stro op het residu-gehalte tijdens de productie van substraat voor de teelt van champignons is niet bekend. Uit de literatuur is wel bekend dat de groei van de champignon en schimmels die een rol spelen bij het compostingsproces door verschillende bestrijdingsmiddelen worden geremd bij overschrijding van bepaalde concentraties.

1.1 Onderzoek

Vastgesteld moet worden in welke mate residuen van deze fungiciden in tarwestro een probleem vormen bij de teelt van champignons. Er moet worden bekeken of er groeiremming van de champignon-schimmel door de fungicide-residuen optreedt. Tevens moet worden onderzocht of deze residuen worden opgenomen door de schimmel en in de champignons terecht komen. De ontwikkeling van modellen en de validatie van deze modellen, alsmede de bestudering van de toepassing van deze modellen voor andere nieuwe bestrijdingsmiddelen zal in verdere samenwerking met het RIKILT-DLO en andere groepen verbonden aan WUR moeten worden uitgevoerd.

1.2 Doel

Het doel van het project is om vast te stellen in welke mate residuen van de nieuwe typen fungiciden azoxystrobine en kresoxim-methyl (beiden behorend tot de strobilurines) in tarwestro een probleem vormen tijdens de teelt van champignons, die op een mengsel van tarwestro en paardenmest (ook voornamelijk tarwestro) worden geteeld.

Faciliteiten voor en ervaring met de teelt van champignons en oesterzwammen zijn aanwezig op het Proefstation voor de Champignoncultuur. Faciliteiten voor de analyses van de fungicide-residuen zijn voorhanden op het RIKILT-DLO of worden aldaar indien nodig ontwikkeld. Om deze reden is samenwerking tussen het RIKILT-DLO en het Proefstation voor de Champignoncultuur onontbeerlijk voor de uitvoering van een goed verloop van het project.

Het RIKILT-DLO is hierbij ingeschakeld voor de metingen van residu-concentraties en methode ontwikkeling voor azoxystrobin, epoxyconazol en kresoxim-methyl in champignoncompost(grondstoffenmengsel, verse compost, geënte en doorgroeide compost).

1.3 Ontwikkeling methode

Aan de hand van een beperkte literatuurstudie zijn twee methoden geselecteerd welke geschikt zouden moeten zijn voor de bepaling van de toegepaste fungiciden. De op papier meest voor de hand liggende methode (Cabras et al; JAOAC Int., vol. 81, no. 6, 1998) beschrijft een methode voor de bepaling van o.a. azoxystrobine en kresoxim-methyl in druiven, most en wijn met GC-MS detectie. Het monster wordt geëxtraheerd met aceton/hexaan 1/1 (V/V) en met een toevoeging van NaCl. Vervolgens wordt met natriumsulfaat het water aan de organische fase onttrokken. Aansluitend wordt een aliquot direct geanalyseerd op de GC-MS. De methode is nagewerkt en de aan een blanco monster toegevoegde middelen konden helaas niet terug gevonden worden. Het verlengen van de extractietijd van 1 uur naar 20 uur leverde geen verbetering op. Vervolgens is gekeken of variatie van de polariteit van het extractiemiddel een verbetering zou opleveren. Hiertoe zijn gespikte monsters met verschillende oplosmiddelen en mengsels van deze oplosmiddelen (aceton, dichloormethaan en petroleum-ether) geëxtraheerd. Met geen van de geteste oplosmiddelen of mengsels konden de bestrijdingsmiddelen kwantitatief geëxtraheerd worden. Vervolgens is de door de fabrikant van azoxystrobine (Fa.Zeneca) toegepaste methode voor de analyse van in o.a. rijststro is gevolgd. Bij deze methode wordt het monster geëxtraheerd met acetonitril/water 9/1 (v/v). Een aliquot wordt gedroogd met natriumsulfaat en geanalyseerd op de GC-MS.

Dit leverde recoveries op voor azoxystrobine 45%, epoxyconazol 40% en kresoxim-methyl van 20%.

Vervolgens is een experiment uitgevoerd waarbij het water vervangen is door methanol. Extractie van een blanco monster met toevoeging leverde recoveries op van respectievelijk 57, 53 en 28%. Om na te gaan of de recovery voor met name kresoxim-methyl nog wat verbeterd kon worden is een experiment uitgevoerd waarbij de verhouding acetonitril/methanol is gevarieerd. Dit leverde de volgende recoveries op:

	ACN/MeOH 9/1	ACN/MeOH 1/1	ACN/MeOH 1/9
Azoxystrobine	57%	46%	63%
Epoxyconazol	53%	87%	48%
Kresoxim-methyl	28%	49%	56%

Voor de bepaling van het gehalte aan de drie bestrijdingsmiddelen in de aangeleverde monsters is als extractiemiddel genomen ACN/MeOH 1/1. Na extractie volgt nog een filtratie over natriumsulfaat gevolgd door GC-MS analyse.

2 MATERIALEN EN METHODEN

2.1 Monstermateriaal

Om na te gaan of er afbraak plaats vindt van de drie bestrijdingsmiddelen is een voldoende grote hoeveelheid grondstoffenmengsel aangemaakt. Het betreft een mengsel van paardenmest, kippenmest, stro en gips. In eerste instantie is hiervan een monster (blanco GSM) genomen en naar het RIKILT gezonden en geanalyseerd. Vervolgens is het grondstoffenmengsel opgesplitst in drie batches van elk 50 kg. Elke batch is gespiked op een niveau van 25 mg/kg (op droge stof basis) met één van de te onderzoeken fungiciden. Van iedere batch is direct een monster genomen (t_0 = GSM). Het restant van iedere batch is vervolgens in drie uienzakken gedaan en ingegraven in tunnels bij de champost productiebedrijf van CNC te Moerdijk. Vervolgens zijn op verschillende tijdstippen van iedere batch één zak opgegraven en hiervan zijn drie subsamples genomen (t_1 = IVC; t_2 = EC en t_3 = DC). Per tijdstip zijn dus 9 monsters genomen en naar het RIKILT gezonden en geanalyseerd.

Ter validatie van de te gebruiken methode is naast de te onderzoeken monsters een aantal kwaliteitscontrolemonsters in bewerking genomen. Het betreft blanco oplosmiddelen waaraan een mengsel van de drie fungiciden is toegevoegd overeenkomen met 1 mg/kg. Verder is het blanco monster grondstoffenmengsel na toevoeging van het mengsel van de drie fungiciden op twee niveaus (0,1 en 1,0 mg/kg op productbasis) in vijfvoud in bewerking genomen.

Voor methode zie bijlage 1

3 RESULTATEN

3.1 Identificatie

Bij de identificatie van een bepaald component zijn er twee criteria waaraan voldaan moet worden voor een positieve identificatie, namelijk een chromatografisch criterium en een spectrometrisch criterium.

3.1.1 Gaschromatografisch criterium

Meet alle absolute retentietijden op basis van de kwantificeringsionen. De retentietijd, deze dient gelijk te zijn aan de retentietijd van de component in het standaardmengsel + of - $5s/RT_s$.

3.1.2 Massaspectrometrisch criterium

Bereken van de piek in het monster de relatieve intensiteiten, na achtergrond correctie, van de drie grootste ionen (6.6.1) in het massaspectrum. Deze dienen een overeenstemmende intensiteitsverhouding te hebben als de overéénkomende ionen van dezelfde component in de standaard. Dat wil zeggen, dat de identificatie positief is, als de fragmentionen uitgedrukt als fractie van het ion met de grootste intensiteit dezelfde intensiteitsverhouding ($\pm 30\%$ absoluut) hebben als de overéénkomstige fragmentionen van die component in de standaard.

Voor een ion met een relatieve intensiteit in het referentiespectrum van 50% mag de relatieve intensiteit van het overéénkomstige ion liggen tussen 20% en 80%.

Wanneer voldaan wordt aan bovenstaande criteria kan een positief resultaat worden afgegeven.

3.2 Interpretatie GC-MS resultaten

Injecteer respectievelijk 2 μl van de fungicidenmengsel-ijklijnoplossingen. Voer de analyse uit onder de condities vastgesteld in instellingen gaschromatograaf en massaspectrometer. Neem het gaschromatogram van de fungicidenmengsel-ijklijnoplossing 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ op. Bepaal aan de hand van dit gaschromatogram de retentietijden van de drie componenten en gebruik deze gegevens, samen met de massaspectrometrische grootheden te weten de piekoppervlakken, de kwantificeringsionen voor identificatie. Bepaal aan de hand van de piekoppervlakken van de drie componenten van de ijklijnoplossingen de kwantificatie van de monsters.

3.3 Berekening gehalten op basis van externe standaardmethode

Het gehalte van de componenten is berekend met behulp van de lineaire regressie methode. Daartoe dient wel een ijklijn van tenminste vijf ijkpunten te zijn uitgevoerd. Handteerbare concentraties zijn 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Afgeleid van de vereenvoudigde lineaire regressieformule $y = bx + a$, wordt de formule toegepast: $x = ((y-a)/b)m$

Waarin:

- x : gehalte aan analyt a in het monster, in mg/kg
- y : respons van het kwantificeringsion van het analyt a in het extract van het monster
- a : intercept (Y-asafsnode)
- b : slope (richtingscoëfficiënt)
- m : massa van het in bewerking genomen monster

Tabel 1: Resultaten validatie op productbasis

Monster	Kresoxim-methyl	Eopxyconazool	Azoxystrobine
	µg/g	µg/g	µg/g
Bl. Chem + 1ug/g nr. 11	0,56	0,83	0,81
Bl. Chem + 1ug/g nr. 12	0,60	0,80	0,71
Bl. Chem + 1ug/g nr. 13	0,81	1,12	1,13
Bl. Chem + 1ug/g nr. 14	0,66	0,99	0,99
Bl. Chem + 1ug/g nr. 15	0,50	0,78	0,72
bl. Champpost + 0,1 ug/g nr. 1	<0,02	<0,04	<0,04
bl. Champpost + 0,1 ug/g nr. 2	<0,02	0,14	<0,04
bl. Champpost + 0,1 ug/g nr. 3	<0,02	<0,04	<0,04
bl. Champpost + 0,1 ug/g nr. 4	<0,02	0,08	<0,04
bl. Champpost + 0,1 ug/g nr. 5	<0,02	<0,04	<0,04
bl. Champpost + 1,0 ug/g nr. 6	<0,02	<0,04	<0,04
bl. Champpost +1,0 ug/g nr. 7	0,81	1,00	0,11
bl. Champpost + 1,0 ug/g nr. 8	0,66	0,88	0,06
bl. Champpost +1,0 ug/g nr. 9	0,98	1,06	0,08
bl. Champpost +1,0 ug/g nr. 10	0,79	0,74	0,10

Tabel 2: Resultaten monsters op produktbasis

Rikilt no.	Monster	Kresoxim-methyl µg/g	Epoxyconazool µg/g	Azoxystrobine µg/g
32404	Bl comppost GSM	<0,02	<0,04	<0,04
32405	Bl. Compost GSM	<0,02	<0,04	<0,04
32406	Azoxystrobin GSM	<0,02	<0,04	0,97
32407	Azoxystrobin GSM	<0,02	<0,04	1,15
32408	Azoxystrobin GSM	n.a	n.a	n.a
32409	Kresoxim-methyl GSM	6,53	<0,04	<0,04
32410	Kresoxim-methyl GSM	n.a	n.a	n.a
32411	Kresoxim-methyl GSM	6,84	<0,04	<0,04
32412	Epoxyconazool GSM	<0,02	5,45	<0,04
32413	Epoxyconazool GSM	<0,02	6,10	<0,04
32414	Epoxyconazool GSM	<0,02	8,70	<0,04
32415	Azoxystrobine IVC	<0,02	<0,04	5,16
32416	Azoxystrobine IVC	<0,02	<0,04	6,10
32417	Azoxystrobine IVC	<0,02	<0,04	5,69
32418	Kresoxim-methyl IVC	<0,02	<0,04	<0,04
32419	Kresoxim-methyl IVC	<0,02	<0,04	<0,04
32420	Kresoxim-methyl IVC	<0,02	<0,04	<0,04
32421	Epoxyconazool IVC	<0,02	3,33	<0,04
32422	Epoxyconazool IVC	<0,02	5,85	<0,04
32423	Epoxyconazool IVC	<0,02	4,25	<0,04
32424	Azoxystrobine EC	<0,02	<0,04	6,20
32425	Azoxystrobine EC	<0,02	<0,04	6,63
32426	Azoxystrobine EC	<0,02	<0,04	5,97
32427	Kresoxim-methyl EC	<0,02	0,07	<0,04
32428	Kresoxim-methyl EC	<0,02	<0,04	0,09
32429	Kresoxim-methyl EC	<0,02	0,05	0,06
32430	Epoxyconazool EC	<0,02	4,87	0,05
32431	Epoxyconazool EC	<0,02	10,29	0,05
32432	Epoxyconazool EC	<0,02	7,94	0,07
32433	Azoxystrobine DC	<0,02	<0,04	10,52
32434	Azoxystrobine DC	<0,02	<0,04	8,46
32435	Azoxystrobine DC	<0,02	<0,04	10,17
32436	Kresoxim-methyl DC	<0,02	<0,04	0,03
32437	Kresoxim-methyl DC	<0,02	<0,04	<0,04
32438	Kresoxim-methyl DC	<0,02	<0,04	0,03
32439	Epoxyconazool DC	<0,02	4,93	<0,04
32440	Epoxyconazool DC	<0,02	5,87	<0,04
32441	Epoxyconazool DC	<0,02	6,57	<0,04

Opmerking:

1) De toevoeging is gedaan op een niveau van 25 mg/kg op droge stof basis. Het percentage droge stof is ongeveer 25%. Het gehalte op produktbasis is derhalve circa 6,25 mg/kg

2) Visuele inspectie van de aangeleverde monster leerde dat het materiaal inhomogeen was. Zelfs na intensief malen kon geen homogeen monsters verkregen worden.

4 CONCLUSIES

-De ontwikkelde methode is goed toepasbaar voor de bepaling van Kresoxim-methyl en Epoxyconazool. Voor Azoxystrobine dienen de resultaten als indicatief te worden beschouwd

-De gemeten gehalten zijn als volgt:

De gehalten in GSM (grondstoffenmengsel) is voor Azoxystrobine 1,06 mg/kg ± 0,13, voor Epoxyconazool 6,75 ± 1,72 en voor Kresoxim-methyl 6,68 ± 0,22.

De gehalten in IVC (verse compost) is voor Azoxystrobine 5,65 mg/kg ± 0,47, voor Epoxyconazool 4,48 mg/kg ± 1,28 en voor Kresoxim-methyl <0,02 mg/kg.

De gehalten in EC (geënte compost) is voor Azoxystrobine 6,26 mg/kg ± 0,33, voor Epoxyconazool 7,70 mg/kg ± 2,72 (in deze monsters is naast Epoxyconazool ook Azoxystrobine aangetoond met een gehalte van 0,06 mg/kg ± 0,02) en voor Kresoxim-methyl 0,06 mg/kg ± 0,01.

De gehalten in DC (doorgroeide compost) is voor Azoxystrobine 9,71 mg/kg ± 1,10, voor Epoxyconazool 5,79 mg/kg ± 0,82 en voor Kresoxim-methyl <0,04 mg/kg

- Voor Epoxyconazool kon geen afbraak in de tijd vastgesteld worden
- Kresoxim-methyl bleek zeer snel af te breken
- Voor Azoxystrobine kan geen eenduidige uitspraak worden gedaan. Het lijkt er op dat er geen afbraak plaats vindt.

5 LITERATUUR

Cabras, P., Angioni, A., Garau, V.L. and Pirisi, F.M.
Gas chromatographic determination of azoxystrobin, fluazinam, kresoxim-methyl, mepanipyrim and tetraconazole in grapes, must and wine.
Journal of AOAC vol. 81, no. 6,1998, 1185-1189

Burke, S.R.
Residue analytical method for the analysis of azoxystrobin and R230310 in crops.
Zeneca Agrochemicals, vertrouwelijk rapport

BIJLAGE 1

2 MATERIALEN EN METHODEN

2.1 Zie bladzijde 6.

2.2 DOEL EN TOEPASSINGSGBIED

2.3 TOELICHTING

Dit voorschrift beschrijft een methode voor de extractie van azoxystrobine, epoxyconazool en kresoxim-methyl in champignonnencompost. De daaropvolgende identificatie en kwantificering van de fungiciden wordt uitgevoerd met behulp van gaschromatografie met massaspectrometrische detectie(GC-MS).

Het voorschrift is van toepassing op grondstoffenmengsel, verse, entbare en doorgroeide compost. De methode maakt gebruik van een extractie methode waarmee een breed scala van stoffen kan worden geïsoleerd. Als consequentie hiervan kunnen de extractierendementen in een aantal gevallen lager zijn. De extracten vervuilen het GC-MS systeem en daarom moeten standaardmixen in monsterseries meerdere malen worden geanalyseerd worden.

De aantoonbaarheid van Kresoxim-methyl in champignonnencompost is 0,02 mg/kg, die voor Azoxystrobine en Epoxyconazool is 0,04 mg/kg.

2.4 NIET-AANWEZIGE PARAGRAFEN WELKE CONFORM F0001 VEREIST ZIJN

2.5 PRESTATIEKENMERKEN

Zie paragraaf 7.1.

2.6 DEFINITIE

Blanco chemicalien spike

Bekende hoeveelheid van een mengsel van de drie fungiciden, die wordt toegevoegd aan de chemicalien die de hele methode doorlopen.

Blanco compost spike

Bekende hoeveelheid van een mengsel van de drie fungiciden, die wordt toegevoegd aan blanco compost (grondstoffenmengsel zonder toevoeging van fungiciden).

2.7 BEGINSEL

Het monster wordt geëxtraheerd met een mengsel acetonitril en methanol, waarna het extract wordt gefiltreerd over een papieren filter. Een aliquot wordt gedroogd door filtratie over natriumsulfaat. Het filtraat wordt geconcentreerd door indampen. Het residue wordt tot een bepaald volume aangevuld met een mengsel van ethylacetaat en hexaan. Deze oplossing wordt gemeten met GC-MS.

OPMERKING:

Zie voor gegevens voor veilig werken met chemicaliën de desbetreffende Chemiekaart [1]

2.8 CHEMICALIEN

2.8.1 Acetonitril, Merck, Darmstadt(Ger)

2.8.2 Methanol, Merck, Darmstadt(Ger)

2.8.3 Ethylacetaat for HPLC, Acros Organics(Bel)

2.8.4 Hexaan, Merck, Darmstadt(Ger)

2.8.5 Natriumsulfaat uitgestookt bij 160° C, Merck, Darmstadt(Ger)

2.8.6 Glaswol uitgestookt bij 160° C

2.8.7 Vouwfilter S&S 595 ½ Ø 185 mm, Schleicher & Schuell, Dassel(Ger)

2.8.8 Acrodisc CRPTFE syringe filter 0,45 µm, Gelman, Fisher Scientific, 's-Hertogenbosch

2.8.9 Spuit 2 ml, Terumo syringe, Terumo Europe, Leuven(Bel)

2.8.10 Azoxystrobine, Dr. Ehrenstorfer GmbH, C104130, Brunswick, Amsterdam

2.8.11 Azoxystrobine-oplossing 1 mg/ml in methanol

2.8.12 Epoxyconazool, F111, 99116, Dr. Ehrenstorfer GmbH, C131850, Brunswick, Amsterdam

2.8.13 Epoxyconazool-oplossing 2 mg/ml dichloormethaan,

2.8.14 Kresoxim-methyl, F 115, Dr. Ehrenstorfer GmbH, C 145700, Brunswick, Amsterdam

2.8.15 Kresoxim-methyl-oplossing 12mg/20ml methanol

2.8.16 Fungicidenmengsel-oplossing 200 µg/ml methanol

Breng 200µl van standaardoplossing 2.8.11, 100 µl standaardoplossing 2.8.13 en 333,3µl van standaardoplossing 2.8.15 met 366,7 µl methanol in een 4 ml vial

2.8.17 Fungicidenmengsel-oplossing 10 µg/ml methanol

Breng 30 µl van standaardoplossing 2.8.11, 15 µl standaardoplossing 2.8.13 en 50 µl van standaardoplossing 2.8.15 met 2905 µl methanol in een 4 ml vial

2.8.18 Fungicidenmengsel-ijklijnoplossing 10 µg/ml methanol

Breng 200µl standaard oplossing 2.8.16 en 3800µl methanol in een 4 ml vial

2.8.19 Fungicidenmengsel-ijklijnoplossing 5µg/ml methanol

Breng 100 µl standaard oplossing 2.8.16 en 3900µl methanol in een 4 ml vial

2.8.20 Fungicidenmengsel-ijklijnoplossing 1µg/ml methanol

Breng 100µl standaard oplossing 2.8.18 en 900 µl methanol in een 4 ml vial

2.8.21 Fungicidenmengsel-ijklijnoplossing 0,5 µg/ml methanol

Breng 100µl standaard oplossing 2.8.19 en 900µl methanol in een 4 ml vial

2.8.22 Fungicidenmengsel-ijklijnoplossing 0,1 µg/ml methanol

Breng 100µl standaard oplossing 2.8.20 en 900µl methanol in een 4 ml vial

2.9 APPARATUUR

Gebruikelijk laboratoriumglaswerk, vrij van storende componenten. Het te gebruiken glaswerk moet volgens de gebruikelijke reinigingsprocedure worden behandeld.

Ultra Turrax mengstaafmixer met regelbare snelheid

Glazen trechters

Glazen trechters met $\Phi = 10$ cm

Glazen maatkolven

Glazen maatkolven van 200 ml met ingeslepen stop

TurboVap II, Labotec (Zymark)

TurboVapbuizen

Glazen turbovapbuizen, puntbuizen met 1 ml endpoint van 200 ml (Labotec 45817)

Volumepipetten, instelbaar, gecalibreerd

Vortex mixer

Afsluitbare injectieflesjes met teflon gecoate septa

Gaschromatograaf/massaspectrometer

HP-MSD systeem, zie RSV T-0049

Capillaire kolom met apolaire stationaire fase, speciaal voor pesticiden-analyse

Rtx-CLPesticiden, 30m, 0,25 mmID, 0,25µm df (Alltech RESEK cat# 11123)

Acquisitie-methode: SIMFUNG

2.10 METHODEN

2.10.1 Algemeen

Champignonnencompost monsters worden met een mengsel van acetonitril/methanol 1/1 3 maal gemacereerd. De organische fasen worden over een papieren vouwfilter in een maatkolf gebracht. Een aliquot wordt van water ontdaan door dit over natriumsulfaat te filtreren. De organische fase vervolgens ingedampt met behulp van een turbovap tot een volume < 1 ml. Het eindvolume wordt op 1 ml gebracht met een mengsel van ethylacetaat/hexaan 1/4. De organische oplossing wordt over een Acrodisc gefiltreerd in een vial. Een aliquot wordt op de GC-MS gemeten. Daarnaast worden ook de fungicidenmengsel-ijklijnstandaard oplossingen op de GC-MS gemeten.

2.10.2 Voorzorgsmaatregelen

Bij de uitvoering van de analyse dient men beschermende kleding te dragen zoals bril, jas en handschoenen. De handelingen moeten zoveel mogelijk in afzuigkasten worden uitgevoerd.

2.10.3 Voorbehandeling van het monster

Bewaar de compostmonsters in het donker bij -25° C. Laat de monsters op kamertemperatuur komen voor het in bewerking nemen. Breng de monsters terug naar de -20° C na afweging van de monsters.

2.10.4 Proefeenheid

Neem 5 gram monster in bewerking.

2.10.5 Omschrijving procedure

2.10.5.1 Spiken

Blanco chemicaliën: voeg, in vijfvoud, aan 50 ml acetonitril/methanol 1/1 mengsel 25 µl van een 200 µg/ml fungicidenmengsel-oplossing(2.8.16) toe.

Blanco champignonnencompost(Rikilt nr. 32404): voeg, in vijfvoud, aan 5 gram 50µl van een 10 µg/ml of 25 µl van een 200 µg/ml fungicidenmengsel-oplossing (2.8.17 en 2.8.16) toe.

2.10.5.2 Extractie procedure

Voeg toe aan de monsters 50 ml acetonitril/methanol 1/1 en macereer met behulp van de Ultra Turrax gedurende 2 minuten. Filtreer de organische fase over een vouwfilter S&S 5951/2 via een trechter in een 200 ml maatkolf. Macereer nog tweemaal gedurende 2 minuten met de Ultra Turrax en breng deze fasen ook over het filter. Vul de maatkolf aan tot 200 ml met acetonitril/methanol 1/1. Filtreer 20 ml van de 200 ml over 30 gram natriumsulfaat, op glaswol via een trechter, dat is voorbevochtigd is met 15 ml ethylacetaat in een 200 ml turbovapbuis. Spoel de natriumsulfaat na met 30 ml ethylacetaat. Damp de ethylacetaat af tot een volume < 1 ml met behulp van de turbovap, 40° C en 0,5 bar. Vul de vloeistof aan tot 1,0 ml met een mengsel van ethylacetaat/hexaan 1/4. Filtreer de vloeistof over 0,45 µm Acrodisc filter met behulp van een 2 ml spuit in een 4 ml vial.

Meetoplossing directe meting GC-MS

Van de monsteroplossing(2.10.5.2) wordt 2 µl gemeten met behulp van GC-MS

Meting met behulp van de GC-MS

Instellingen gaschromatograaf en massaspectrometer

Optimaliseer de apparatuur en gebruik onderstaande instellingen als uitgangspunt(T-0049).

Injecteer 2 µl monsteroplossing(2.10.5.2) splitless op de capillaire kolom onder de volgende condities:

Methode informatie: C:\HPCHEM\I\METHODS\ISIMFUNG.M

Temperatuur:

- injectiepoort 250° C
- Ovenprogramma: 70° C(2 min); 10° C per min → 280° C (21 min); 280° C (30 min)

MS informatie

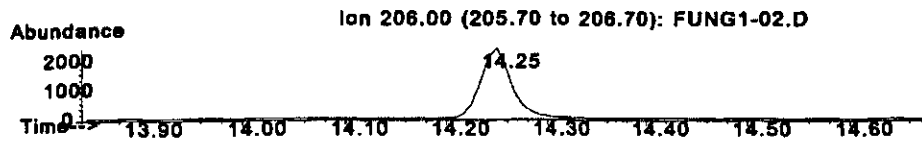
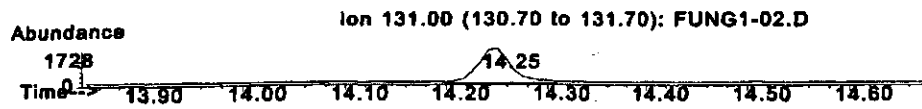
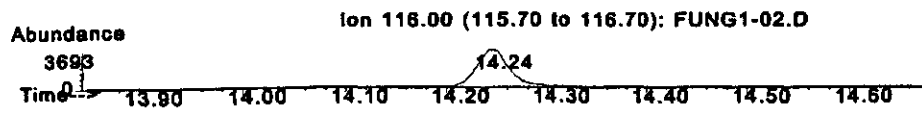
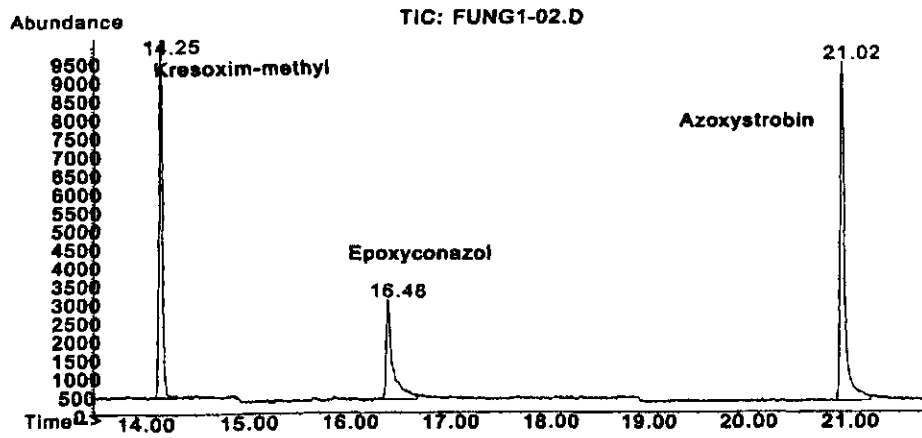
Kresoxim-methyl ionenmassa's: 116-131-206—(313)

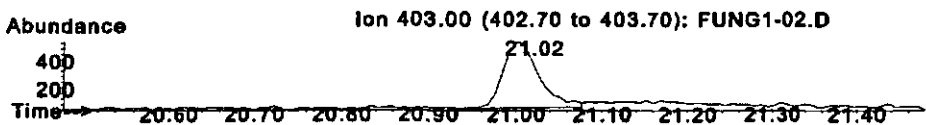
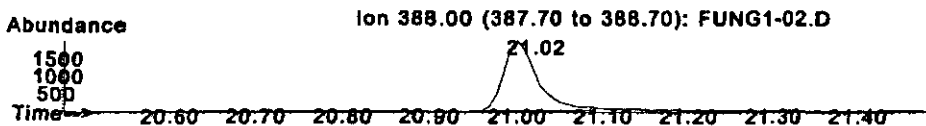
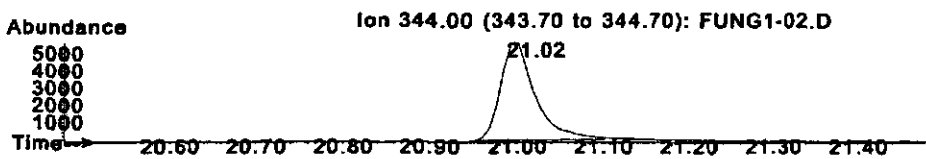
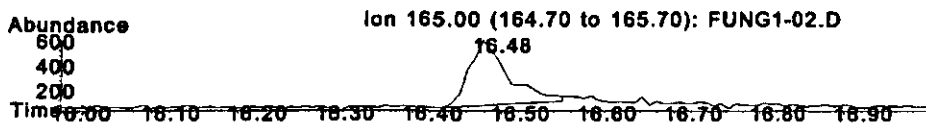
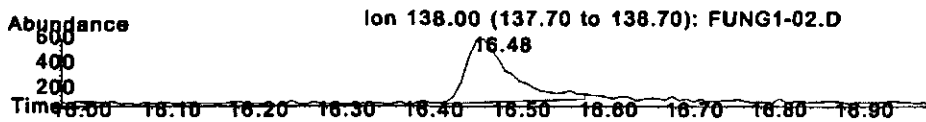
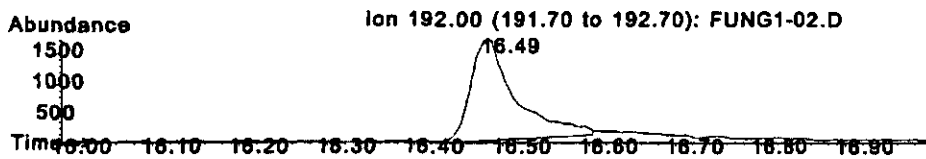
Epoxyconazool ionenmassa's: 192-138-165(330)

Azoxystrobine ionenmassa's: 344-388-403(372)

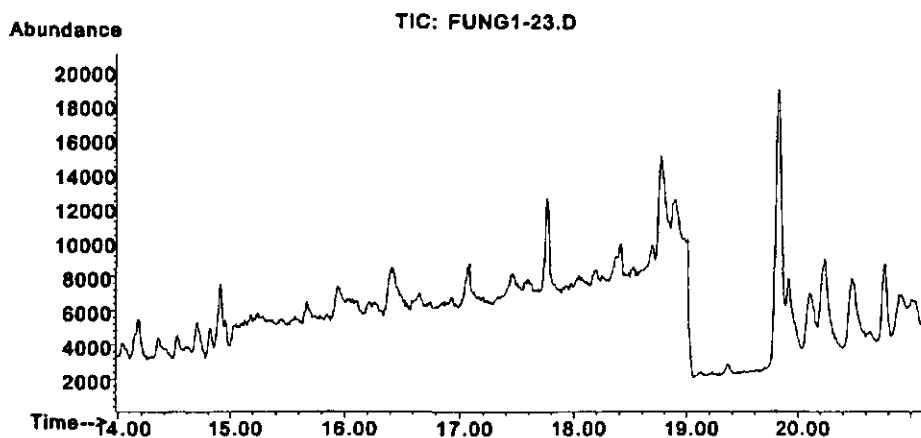
BIJLAGE 2

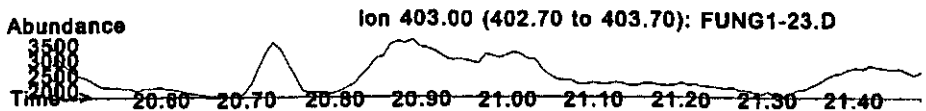
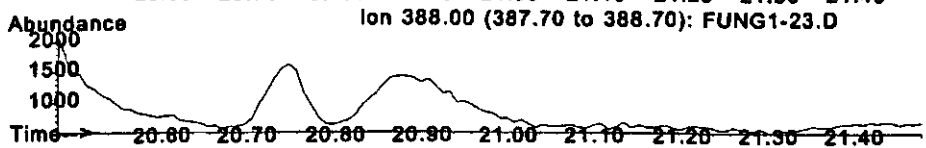
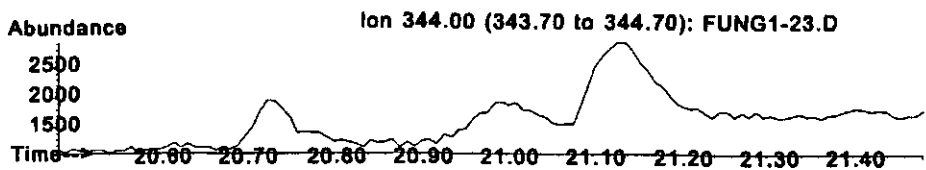
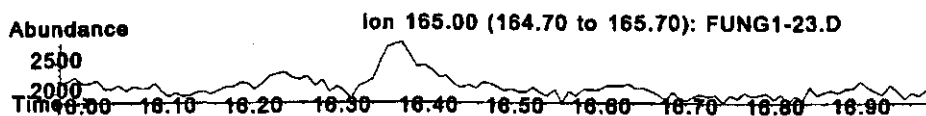
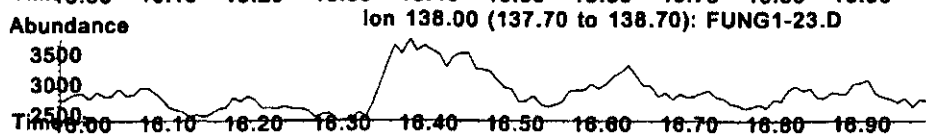
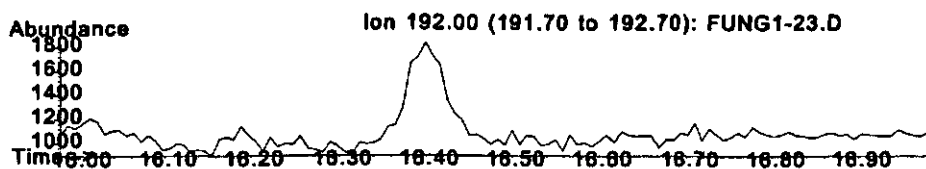
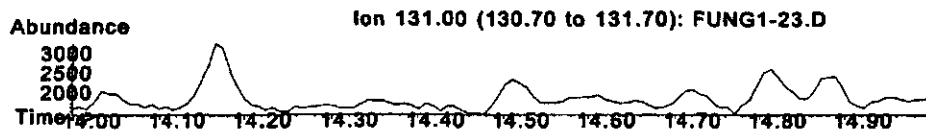
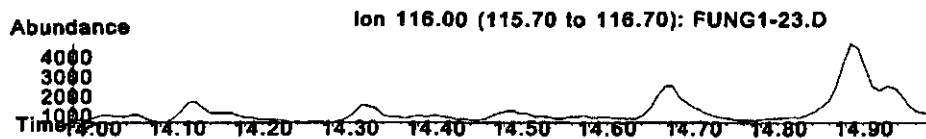
Std. Fungmix 0,1 ng/μl



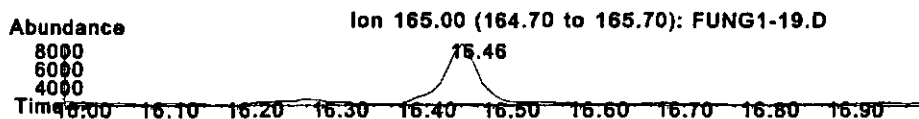
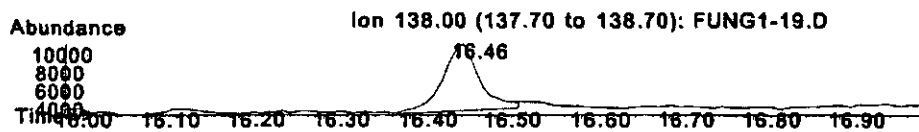
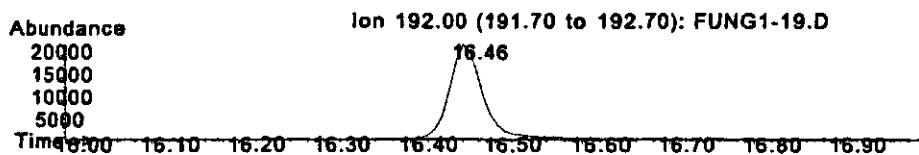
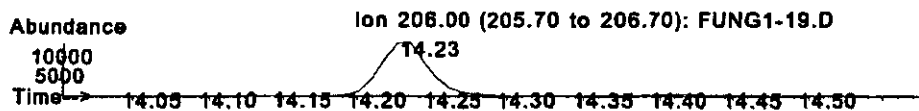
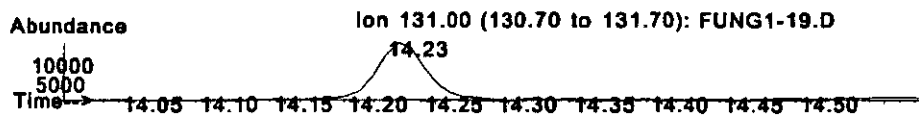
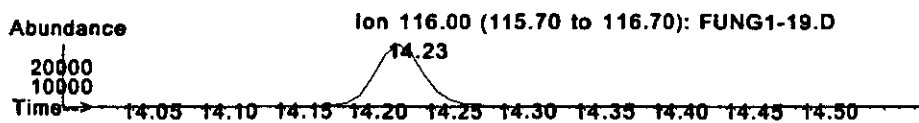
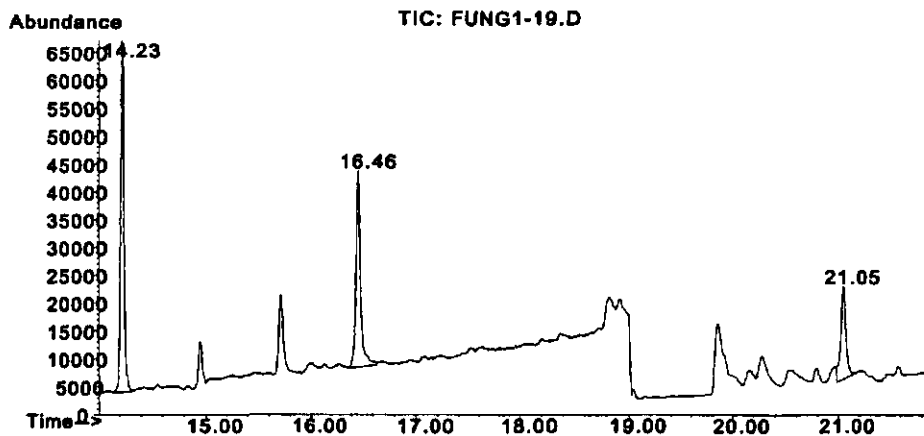


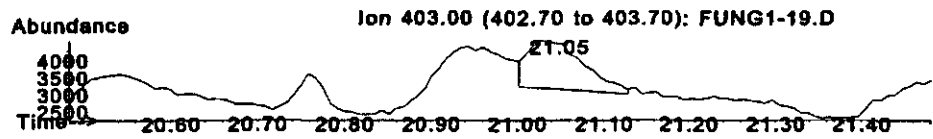
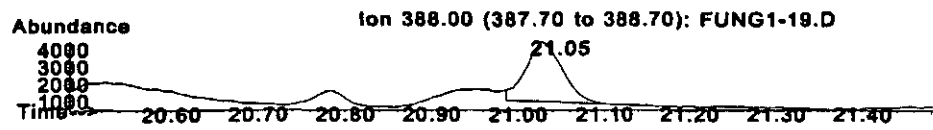
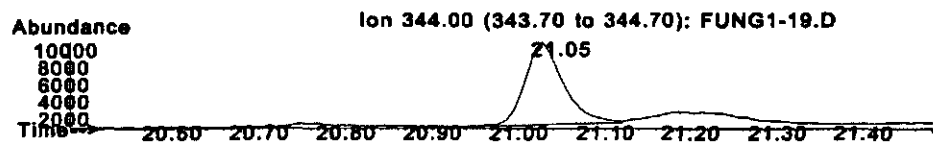
M 32404 blanco grondstoffenmengsel



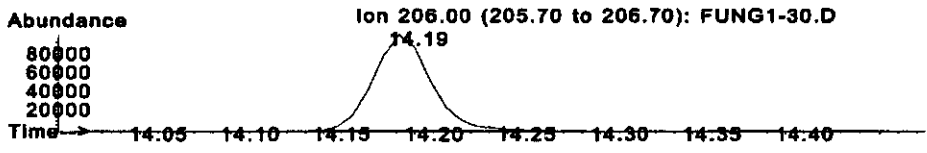
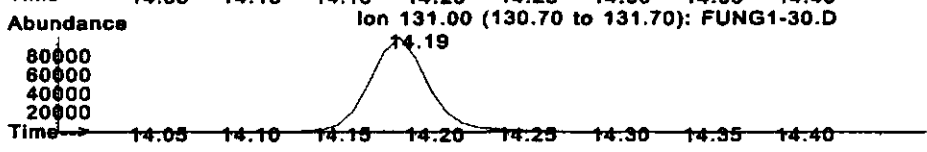
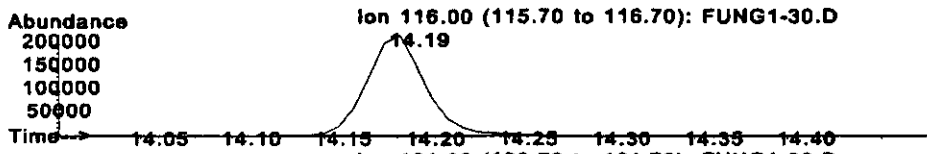
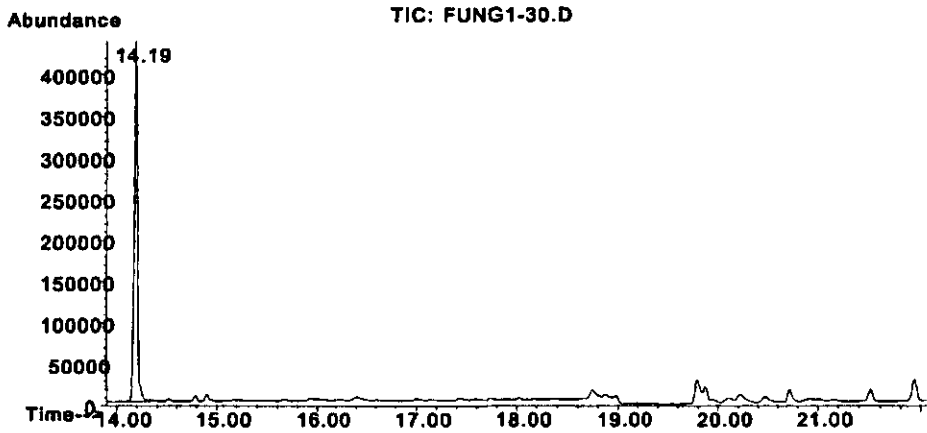


Blanco grondstoffenmengsel + 1 µ Fungmix/g nr. 7

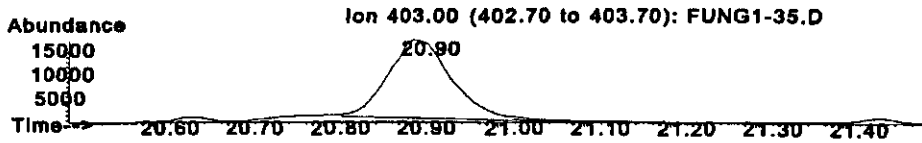
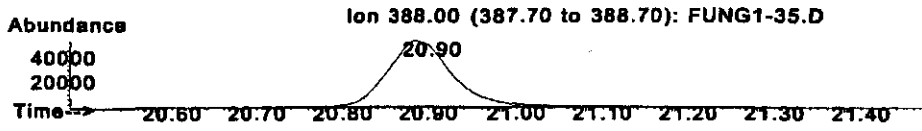
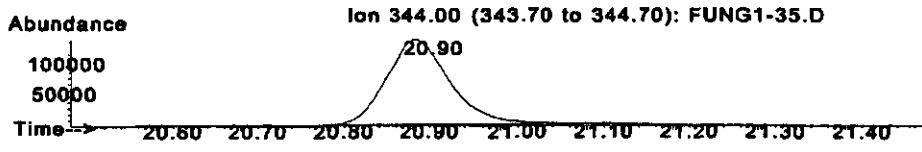
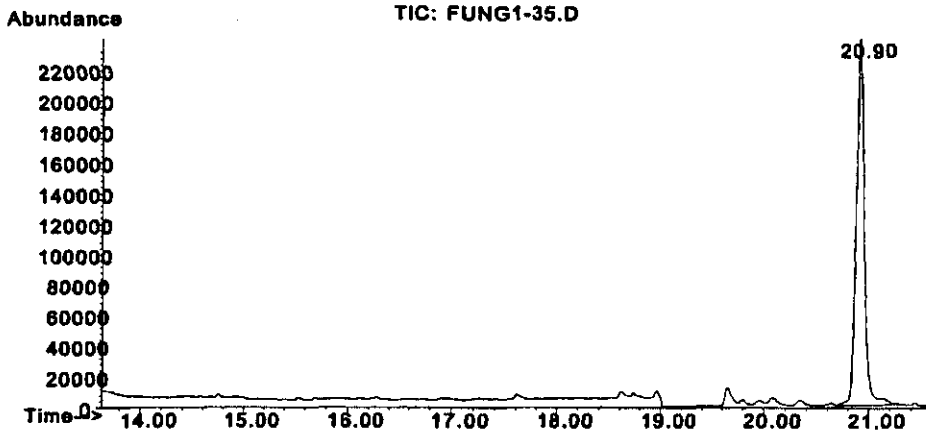




M 32411 grondstoffenmengsel + kresoxim-methyl



M 32416 verse compost + azoxystrobin



M 32441 doorgroeid compost + epoxyconazol

