

INTERN

Afdeling Organische Contaminanten

1986-06-11

RAPPORT 86.63

Pr.nr. 505.0400

Onderwerp: De bepaling van N-methyl-
carbamaten en metabolieten
in granen.

Bijlagen: 1.

Verzendlijst: directeur, directie VKA, sektorhoofd, afdeling OCON,
bibliotheek (1x), projectleider, projektbeheer.

Projekt: Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van bestrijdingsmiddelen en (organische) contaminanten.

Onderwerp: De bepaling van N-methylcarbamaten en metabolieten in granen.

Bijlagen: 1.

Doel:

Het aantonen van N-methylcarbamaten en metabolieten met vloeistofchromatografie en post-column derivatisering in graanmonsterextracten welke zijn gezuiverd met gelpermeatiechromatografie.

Samenvatting:

Graanmonsters worden voor de bepaling van fungiciden, organochloor- en organofosforbestrijdingsmiddelen na extractie gezuiverd met gelpermeatiechromatografie.

Onderzocht is of die gezuiverde extracten tevens gebruikt kunnen worden voor de bepaling van N-methylcarbamaten en metabolieten. Hiertoe is de vloeistofchromatografische methode met post-column derivatisering volgens Krause nagewerkt.

Conclusie:

N-methylcarbamaten en metabolieten kunnen kwantitatief en op voldoende laag niveau bepaald worden m.b.v. vloeistofchromatografie met post-column derivatisering in hetzelfde met GPC gezuiverde monsterextract waarin ook organochloorbestrijdingsmiddelen, organofosforbestrijdingsmiddelen en fungiciden te bepalen zijn.

De lagere detektiegrenzen en gemakkelijke manier van kwantifikatie maken deze methode geschikter dan de dunnelaag methode voor screening van monsters. De dunnelaag methode is geschikt om hoge gehalten te bevestigen.

Bij praktische toepassing van de methode is het toepassen van gradiënt elutie aan te raden om piekvorm en scheiding te verbeteren in een acceptabele analysetijd.

Verantwoordelijk : ir L.G.M.Th. Tuinstra
Medewerkers/samenstellers: A.J. van Munsteren, W.A. Traag
Projektleider : ir L.G.M.Th. Tuinstra

W.P.2

1. Inleiding

Carbamaten en carboyl-oxim metabolieten behoren tot de insecticiden en acariciden met cholinesteraseremmende werking. In de literatuur zijn vele analysemethoden beschreven, echter geen universele methode.

Ten behoeve van een inventariserend onderzoek door verschillende instellingen in Nederland naar pesticiden residuen in granen was de ontwikkeling van een kwantitatieve analysemethode voor enkele N-methylcarbamaten en N-methylcarboyl-oximen noodzakelijk.

Aangezien de graanmonsters door het RIKILT werden onderzocht op het gehalte aan organochloorbestrijdingsmiddelen en fungiciden en hiervoor met gelpermeatiechromatografie worden gezuiverd, is nagegaan of in die gezuiverde monsterextracten ook de bovengenoemde carbamaten bepaald kunnen worden.

De dunnelaag chromatografische methode (1) gebaseerd op multimethode 2 uit de OVR bundel (2) heeft als nadelen de hoge detektiegrenzen en de moeilijke en onnauwkeurige kwantificatie.

In dit verslag wordt het naverken van de methode volgens Krause (3,4,5,6) beschreven. Het betreft een vloeistofchromatografische methode met post-column derivatisering die in aangepaste vorm ook door anderen wordt toegepast (7,8).

2. Analysemethode

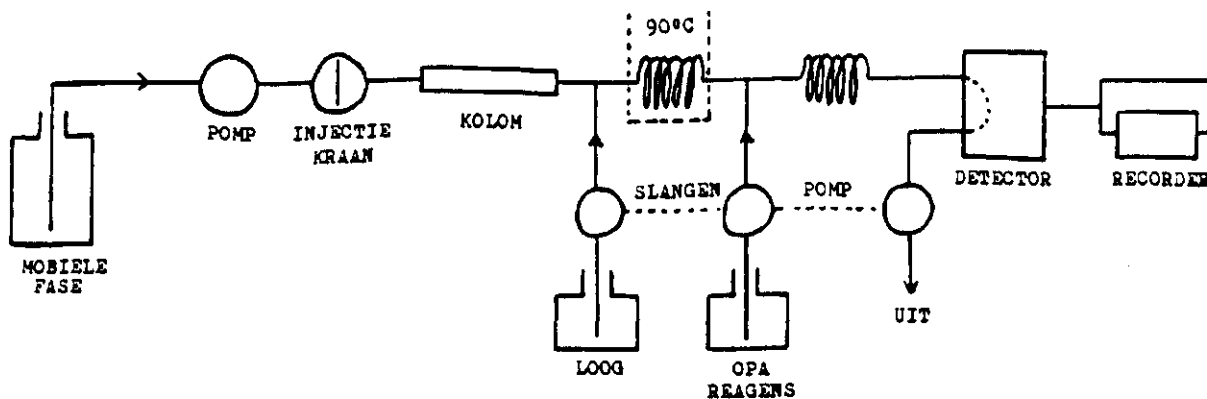
2. Extraktie/zuivering

Na extraktie met ethylacetaat, drogen met natriumsulfaat en concentreren werd een aliquot van het extrakt met gelpermeatiechromatografie gezuiverd (9).

Het gezuiverde extrakt werd geconcentreerd tot een extrakt overeenkomend met 1 g graan/ml.

2.2 Vloeistofchromatografie (fig. 1)

Na scheiding op de kolom worden de carbamaten met loog gehydrolyseerd tot onder andere methylamine. Dit reageert met het OPA-reagens tot een zeer sterk fluorescerende verbinding. De detektie vindt plaats met een fluorescentiedetektor.



Figuur 1: Schematische weergave van het gebruikte systeem.

De in dit verslag beschreven experimenten zijn, tenzij anders aangegeven, verkregen met de parameters zoals Krause als optimaal heeft gevonden.

3. Reagentia

1. Water, gezuiverd met Millipore waterzuiveringssysteem.
2. Acetonitril p.a., Merck art. 3.
3. Methanol p.a., Merck art. 6009.
4. Natriumhydroxide-oplossing 0,05 N in water (2 g/l).
5. Borax oplossing 0,05 M in water (10 g Na₂B₄O₇/l).
6. o-Ftaalaldehyde p.a., Merck art. 821027.
7. 2-Mercapto-ethanol p.a., Merck art. 15433.
8. OPA- reagens:

Los 500 mg o-Ftaalaldehyde op in 10 ml methanol, voeg ca. 500 ml Borax oplossing en 1,0 ml 2-mercapto-ethanol toe, meng, vul aan met Borax oplossing tot 1,0 L en meng opnieuw.

Dit reagens is maximaal vier dagen bruikbaar en is in elk geval niet meer bruikbaar bij geelkleuring of verhoging van de achtergrond van de detector.

Apparatuur

1. Waters M45 vloeistofpomp voor de mobiele fase.
2. Valco injectiekraan met 50 µl loop.
3. Kolom 5 RP 18 op Lichrosorb, lengte 150 mm, inw. diam. 4,6 mm.
4. Slangenpomp met (1 ml/min) slangen voor loog en OPA-reagens en een (2 ml/min) slang voor de afvoer vanuit de detector.

5. Reaktiespiraal voor hydrolyse, teflonslang 3 m, 0,5 mm inw. diam., diameter spiraal 20 mm.
6. Thermostaatbad voor hydrolysespiraal, gevuld met glycol, 90°C.
7. Reaktiespiraal voor OPA-reagens, teflonslang 1 m, 0,5 mm inw. diam., inw. diameter spiraal 20 mm.
8. Fluorescentiedetektor, Aminco, Multiplier:30, Blank adjust: high.
9. Recorder 10 mV, 10 mm/min.

5. Resultaten/discussie

5.1 Eluenssamenstelling:

In de literatuur wordt gradiënt-elutie toegepast met acetonitril/water. Omdat een gradiënt programmeur niet beschikbaar is, werd isocratisch gewerkt met acetonitril/water. De samenstelling van het mengsel is zeer kritisch voor de scheiding en retentie (zie tabel 1).

Tabel 1. Overzicht retentiegedrag bij verschillende eluenssamenstellingen.

<u>CH₃CN : H₂O</u>	<u>Retentie</u>
85 : 15	Carbamaten elueren in oplospiek ($k' = 0$)
50 : 50	k' voor carbaryl is 1
40 : 60	carbaryl RT = 8,7 min, $k' = 5$
30 : 70	carbaryl RT = 17,9 min, $k' = 10$
20 : 80	geen elutie ($k' = \alpha$)

Zelfs bij een 30:70 mengsel vallen de pieken van oxamyl en aldicarb-sulfon nog samen, evenals bendiocarb en carbofuran (zie bijlage 1). Gradiënt-elutie kan de scheiding aanzienlijk verbeteren in een acceptabele analysetijd.

5.2 Detector

Als detector werd de Aminco Fluorescentie detector gebruikt. De door Krause aangegeven golflengtes voor emissie (455 nm) en excitatie (340 nm) konden echter niet worden ingesteld, omdat de filters niet aanwezig waren. De metingen zijn met emissie $\lambda > 420$ nm en excitatie $\lambda = 360$ nm uitgevoerd.

Omdat de detectiegrenzen maar net bereikbaar zijn (met name door de slechte piekvorm) is bekeken of de Perkin Elmer LS-4 gevoeliger is. Deze beschikt over monochromatoren, zodat de juiste golflengtes in te stellen zijn. De LS-4 heeft echter een kleinere meetcel met grote weerstand. Hierdoor waren de pulsen van het slangenpompje zo storend in het chromatogram dat het signaal sterk verzwakt moest worden en de detectiegrenzen t.o.v. van die met de Aminco niet lager werden. Ook bij gebruik van een Orlita dubbelkops vloeistofpomp waren de pulsen te storend. Pogingen om de puls te dempen m.b.v. een luchtkamer, pulsdemper en lange toevoerleiding waren vergeefs.

5.3 Recovery-experimenten

De recovery voor carbaryl, methomyl en propoxur is bepaald voor tarwe, gerst, rogge, rijst en voor een blanco chemicaliën.

De carbamaten werden in oplossing aan monsters gedoseerd. Na droogdampen werden de monsters geëxtraheerd en met GPC gezuiverd. Na concentreren werd 50 µl extract in de vloeistofchromatograaf geïnjecteerd, waarna door vergelijken met een standaard de recovery werd berekend.

De recovery bedroeg in alle gevallen meer dan 90%, hetgeen in overeenstemming is met de literatuur (1,3,4,5,6,10,11). In deze literatuurreferenties wordt een kwantitatieve opbrengst gerapporteerd voor de volgende componenten:

carbaryl, carbofuran, mercaptodimethur, pirimicarb, promecarb, propoxur, aminocarb, oxamyl, 3-medroxy-carbofuran, bufencarb en aldicarb.

5.4 Monsteronderzoek

Van 14 monsters graan werden de met GPC gezuiverde extracten geconcentreerd tot een extract overeenkomend met 1 g graan/ml.

In deze monsters werden geen gehalten aan carbamaten aangetoond groter dan de detectiegrens (0,02 mg/kg).

Het betreft de volgende monsters:

RIKILT nummer	Monster code
1985/5/4/6043	gerst 2
6086	gerst 3
5856	rogge 1
5984	rogge 4
5859	rijst 2
5860	rijst 3
5862	rijst 5
5863	rijst 6
5989	tarwe 12
5992	tarwe 15
5602	tarwe 61
5603	tarwe 62
5605	tarwe 64
5606	tarwe 65

6. Toleranties en detectiegrenzen

In tabel 1 zijn de in de Nederlandse residubeschikking vermelde toleranties voor carbamaten in granen gegeven en de detectiegrenzen van de vloeistofchromatografische methode met post-column derivatisering (HPLC-PC) en van de dunnelaagchromatografische methode (DLC) (1).

Tabel 1: Toleranties voor granen en detectiegrenzen voor de HPLC-PC en de DLC methode in mg/kg.

	Soort verbinding ¹⁾	Tolerantie ²⁾	Detectiegrens	
			HPLC-PC	DLC
Aldicarb	CO	0*(0,02)	0,02	2
Bendiocarb	C	0*(0,05)	0,02	<0,4
Carbaryl	C	0*(0,1) rijst 1	0,02	0,4
Carbofuran	C	0*(0,1)	0,02	<0,4
Methiocarb	C		0,02	2
Methomyl	CO	0*(0,02)	0,02	2
Oxamyl	CO	0*(0,02)	0,02	
Propaxur	C	0*(0,05)	0,02	

1) C = N-methylcarbamaat

Co = N-methylcarbonyl-oxim

2) 0*(0,02) = multolerantie met 0,02 mg/kg als vereiste detectiegrens

7. Conclusie

N-methylcarbamaten en metabolieten kunnen kwantitatief en op voldoende laag niveau bepaald worden m.b.v. vloeistofchromatografie met post-column derivatisering in hetzelfde, met GPC gezuiverde, monsterextract waarin ook organochloorbestrijdingsmiddelen, organofosforbestrijdingsmiddelen en fungiciden te bepalen zijn. De lagere detectiegrenzen en gemakkelijke manier van kwantificatie maken deze methode geschikter dan de dunnelaagmethode voor screening van monsters. De dunnelaagmethode is geschikt om hoge gehalten te bevestigen.

Bij praktische toepassing van de methode is het toepassen van gradiënt-elutie aan te raden om piekvorm en scheiding te verbeteren in een acceptabele analysetijd.

Literatuur

1. G.F. Ernst, L. Stolker, Keuringsdienst van Waren Utrecht. Verslag IR/85/R135 - Dec. 1985.
2. OVR-bundel, "Analytical methods for residues of pesticides in food-stuffs" 4e editie 1985, part II multiresiduummethode 2.
3. R.T. Krause, J. of Chrom. Sci. 16 (1978) 281-288.
4. R.T. Krause, J. of Chrom. 185 (1979) 615-624.
5. R.T. Krause, JAOAC 63-5 (1980) 1114-1124.
6. R.T. Krause, JAOAC 68-4 (1985) 734-741.
7. A. Dekker, N.H.W. Houx, J. Env. Sci. Health B18 (3), (1983) 379-392.
8. L. Nondek, R.W. Frei, U.A.Th. Brinkman J. of Chrom. 282 (1983) 141-150.
9. Intern voorschrift RIKILT-A 429.
10. G. Fuchsbichler, Landwirtsch. Forschung 35, 1-2, 1982.
11. W. Specht, M. Tillkes, Fresenius Z. Anal. Chem. 301, 301-307 (1980).

Mengsel carbamaten

- 1 20 ng aldicarb-sulfon
- 2 20 ng oxamy1
- 3 20 ng methomy1
- 4 20 ng propoxur
- 5 20 ng bendiocarb
- 6 20 ng carbofuran
- 7 20 ng carbaryl
- 8 20 ng methiocarb

Eluens: acetonitril/water 30:70

