

CARBAMATE



N-Methylcarbamate sind häufig verwendete Pestizide, deren starke Ausbringung die amerikanische Umweltbehörde (EPA) Anfang der 80er Jahre veranlasste sie in das Kontrollprogramm für Wasser mit aufzunehmen (EPA 531.1, Update EPA 531.2). Für Lebensmittel gibt es die AOAC-Methode 985.23. Beide Vorschriften basieren auf Reversed Phase-HPLC in Kombination mit Nachsäulenderivatisierung.

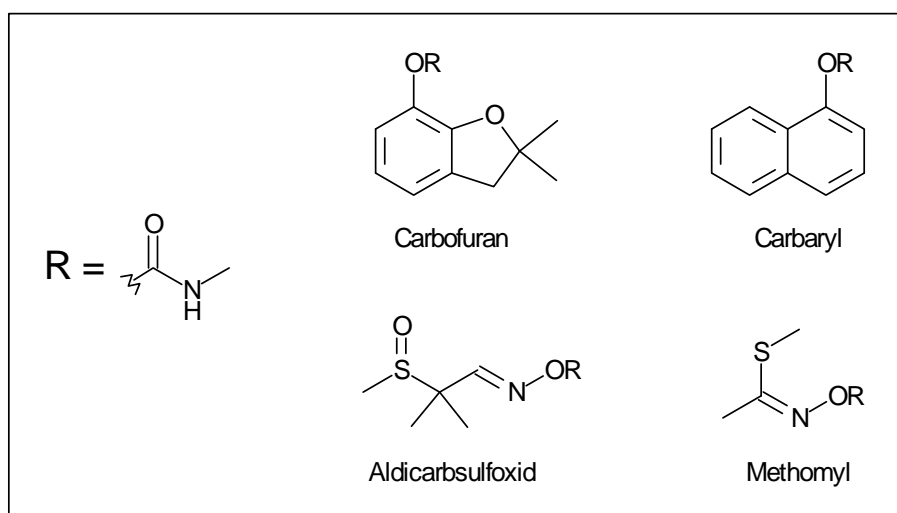
Die amerikanischen Vorschriften verlangen die Trennung von zehn *N*-Methylcarbamaten plus 1-Naphthol und eines internen Standards (4-Brom-3,5-dimethylphenyl-*N*-methylcarbamate = BDMC).

Für diese Anforderungen werden von PICKERING komplette Methoden (PINNACLE PCX und Applikationen-Kits) angeboten. Neben einem Kit mit C18-Säulen ist für die Analytik zusätzlicher Carbamate eine C8-Säule mit größerer Selektivität erhältlich.

Hiermit können bis zu 23 Carbamate bzw. deren Metaboliten getrennt werden. Die Carbamat-Kits enthalten neben den Säulen auch Reagenzien, Diluenten und Standards.

Methodenbeschreibung

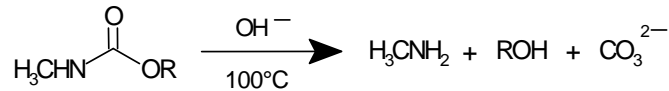
Alle *N*-Methylcarbamate besitzen eine *N*-Methyl-substituierte Urethanstruktur (=R) und unterscheiden sich lediglich im Rest der Estergruppe.



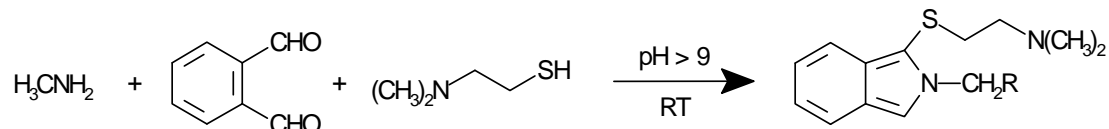
Grundstruktur der *N*-Methylcarbamate

Die Derivatisierung erfolgt in einer zweistufigen Reaktion. Im ersten Schritt wird die Carbamat-Funktion mit Hydrolyse-Reagenz (NaOH) hydrolysiert, wobei Methylamin (primäres Amin) entsteht, das danach im zweiten Schritt mit *o*-Phthaldialdehyd (OPA) und Thiofluor[®] (2-Mercaptoethanol-Derivat) zu einem fluoreszierenden Isoindol-Derivat umgesetzt wird.

1. Hydrolyse:



2. Derivatisierung:

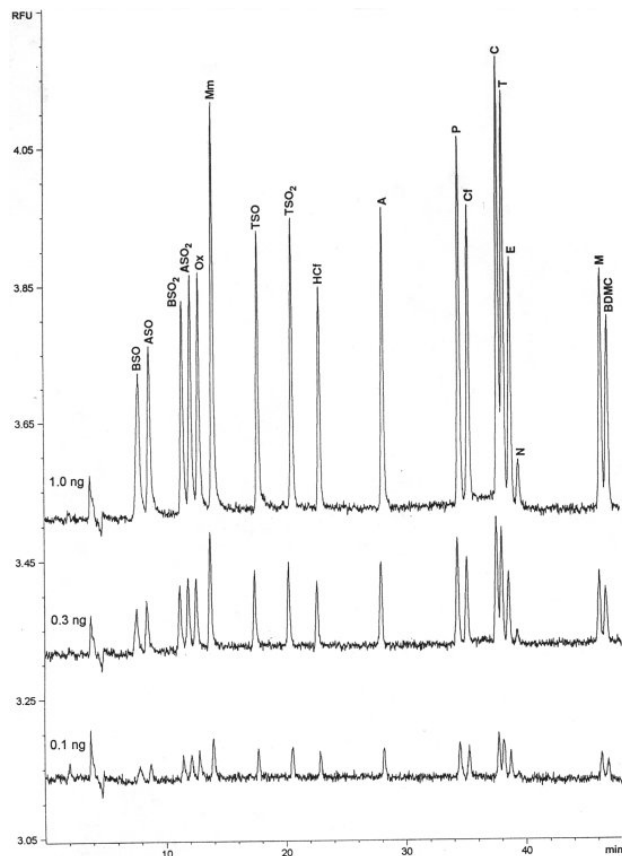


Derivatisierung von N-Methylcarbamaten zu fluoreszierenden Isoindolderivaten

Chromatogramme

Chromatogramme der Carbamatanalytik (C8-Säule) bei verschiedenen Konzentrationen

Konzentrationen (abs.) je Carbamat: 1,0 ng (oben), 0,3 ng (Mitte) und 0,1 ng (unten).
 Thiofanox (T) 5,0, 1,5 und 0,5 ng.
 Säule: Pickering C8-Reversed Phase-Säule (Bestellnummer 0840250)
 Eluenten: Wasser/Acetonitril-Gradient (Methode 03.6, s. u.)



APPLIKATIONSNOTE

Liste der Abkürzungen der verwendeten *N*-Methylcarbamate:

A	=	Aldicarb	HCf	=	3-Hydroxycarbofuran
ASO	=	Aldicarb-sulfoxid	M	=	Methiocarb
ASO ₂	=	Aldicarb-sulfon	Mm	=	Methomyl
BDMC*	=	Interner Standard	N	=	1-Naphtol
BSO	=	Butocarboximsulfoxid	Ox	=	Oxamyl
BSO ₂	=	Butocarboximsulfon	P	=	Propoxur
C	=	Carbaryl	T	=	Thiofanox
Cf	=	Carbofuran	TSO	=	Thiofanox-sulfoxid
E	=	Ethiofencarb	TSO ₂	=	Thiofanox-sulfon

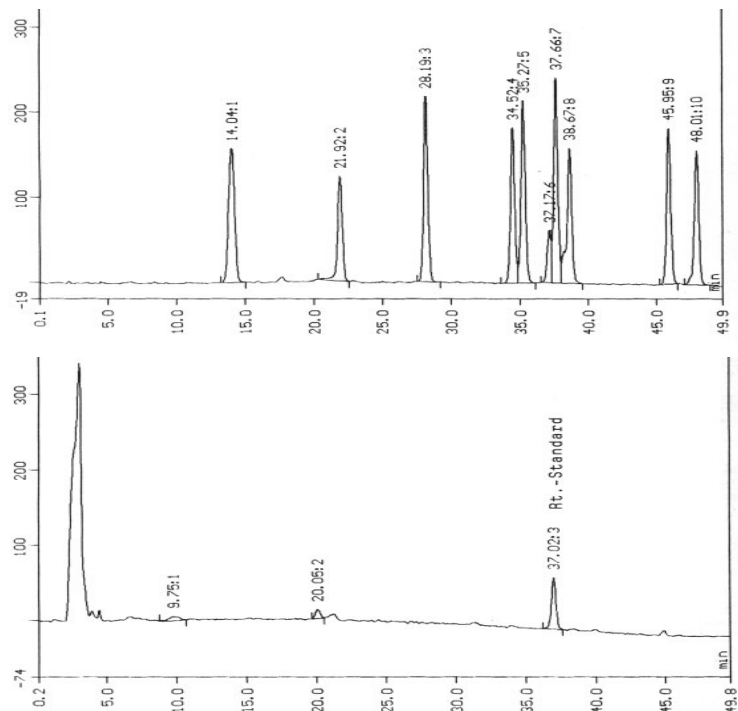
*4-Brom-3,5-dimethylphenyl-*N*-methylcarbamate

Chromatogramm einer mit Carbamatstandard (0,01 µg/kg) dotierten Fruchtprobe (Mango) sowie einer undotierten Fruchtprobe (Mango) nach Aufreinigung mittels Gelpermeationschromatographie

Säule: Pickering C8-Reversed Phase-Säule (Bestellnummer 0840250)
Eluenten: Wasser/Acetonitril-Gradient

Der zum Dotieren der Mangoprobe verwendete Standard enthält: Methomyl, Dioxacarb, Aldicarb, Propoxur, Carbofuran, Carbaryl, Thiofanox, Mercaptodimethur, Promecarb

Das Signal bei 37,17 bzw. 37,02 min ist ein Retentionszeitenstandard.



HPLC-Bedingungen und Derivatisierungsparameter

HPLC	
Betriebsmodus	binärer Gradient
Eluent	Wasser/Methanol oder Wasser/Acetonitril
Entgasung	Helium- oder Vakuum-entgast
HPLC-Säule	RP C18- oder C8- Säule mit Vorsäule
Flussrate	1.0 mL/min bzw. 0.8 mL/min.
Injektionsvolumen	Bis 100 µL
Nachsäulenderivatisierung	
Pinnacle PCX	Zweistufig
Säulenofen	42 °C bzw. 37 °C
Reaktorvolumen	0,5 mL
Reaktortemperatur	100 °C
Reagenz 1	CB 130 Hydrolyse-Reagenz 0.05M (wässrige NaOH-Lösung) bzw. CB130.2 Hydrolyse Reagenz 0.075M (für EPA 531.2)
Reagenz 2	o-Phthaldialdehyd + Thioflur in CB910 Diluent
Reagenzfluss	0.3 mL/min
Detektion	
Messart	Fluoreszenz-Detektion
Anregungswellenlänge	330 nm
Emissionswellenlänge	465 nm
Zelle	Analytisch; druckstabil bis 7 bar

Gradientenprogramme

Die C18-Säulen (15 und 25 cm) werden mit einem Wasser/Methanol-Gradienten gefahren. Für beide Säulen gibt es zwei unterschiedliche Gradientenprogramme. Eines für großvolumige Injektionen (bis zu 4000µL) von wässrigen Proben mit „On-Column“-Anreicherung der Carbamate auf der Säule oder für methanolische Proben nach „Off-Line“-Clean-up und Aufkonzentrierung.

Aufgrund der geringeren Grenzwerte in Europa (0,1 ppb pro Carbat) im Vergleich zu den USA ist es nicht möglich durch direkte Injektion großer Probenvolumina ohne vorheriges Aufkonzentrieren der Probe die nötige Empfindlichkeit zu erreichen. Das Gradientenprogramm für diese Methode wird daher hier nicht angegeben.

Kit für 12 Carbamate (AOAC-Methode 985.23): 0352-0004:

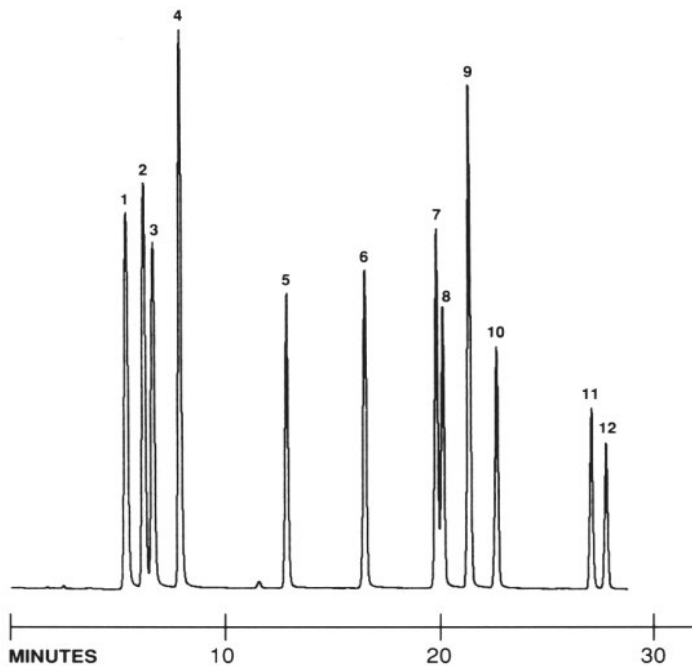
C18-Säule; 4.6 x 150mm; Probe in Methanol gelöst

Flussrate: 1,0 mL/min; Säulentemperatur: 42°C

Schritt	Zeit [min]	Intervall [min]	Wasser [%]	MeOH [%]	
Equil.			82	18	Equilibrierung
0	0	0	82	18	Injektion bis 10 µL
1	0 - 0,5	0,5	82	18	Isokratisch
2	0,5 - 29	28,5	30	70	Linearer Gradient
3	29,1 - 31	1,9	0	100	Sprung/Spülen der Säule
4	31,1 -	5 - 8	82	18	Re-Equilibrierung

Chromatogramm der C18-Säule (150 x 4,6 mm) eines Carbamatstandards

Konzentration (abs.): 25 ng je Carbamat



Liste der Abkürzungen der verwendeten *N*-Methylcarbamate:

6	=	Aldicarb	5	=	3-Hydroxycarbofuran
1	=	Aldicarb-sulfoxid	11	=	Methiocarb
2	=	Aldicarb-sulfon	4	=	Methomyl
12	=	BDMC (Interner Standard)	10	=	1-Naphtol
9	=	Carbaryl	3	=	Oxamyl
8	=	Carbofuran	7	=	Propoxur

*4-Brom-3,5-dimethylphenyl-*N*-methylcarbamate

APPLIKATIONSNOTE

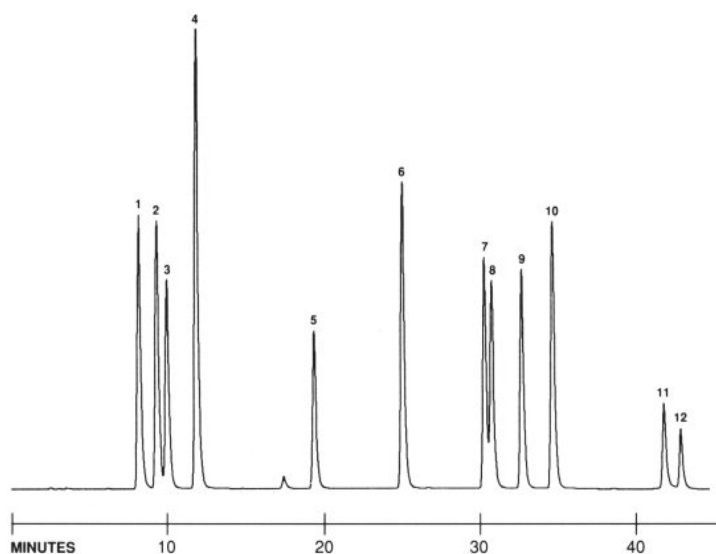
Methode für 12 Carbamate: EPA-Methode 531.1 (Kit P/N 0352-0003) und EPA-Methode 531.2 (Kit P/N 0352-0009):

C18-Säule; 4,6 x 250mm; Probe in Methanol gelöst
 Flussrate: 1,0 mL/min; Säulentemperatur: 42°C

Schritt	Zeit [min]	Intervall [min]	Wasser [%]	MeOH [%]	
Equil.			80	20	Equilibrierung
0	0	0	80	20	Injektion bis 10 µL
1	0 - 1	1	80	20	Isokratisch
2	1 - 44	43	25	75	Linearer Gradient
3	44,1 - 49	4,9	0	100	Sprung/Spülen der Säule
4	49,1 -	5 - 8	82	18	Re-Equilibrierung

Chromatogramm der C18-Säule (250 x 4,6 mm) eines Carbamatstandards

Konzentration (abs.): 25 ng je Carbamat
 Liste der verwendeten Carbamate siehe oben.



APPLIKATIONSNOTE

Kit für 23+ Carbamate: 0352-0002:

C8-Säule; 4 x 250mm; Probe in Methanol gelöst; Wasser/Methanol-Gradient
 Flussrate: 0,8 mL/min; Säulentemperatur: 37°C

Schritt	Zeit [min]	Intervall [min]	Wasser [%]	MeOH [%]	
Equil.			88	12	Equilibrierung
0	0	0	88	12	Injektion bis 10 µL
1	0 - 2	2	88	12	Isokratisch
2	2 - 42	40	66	34	Linearer Gradient
3	42 - 46	4	66	34	Isokratisch
4	46,1 - 49	2,9	0	100	Sprung/Spülen der Säule
4	49,1 -	5 - 8	88	12	Re-Equilibrierung

C8-Säule; 4 x 250mm; Probe in Methanol gelöst; Wasser/Acetonitril-Gradient
 Flussrate: 0,8 mL/min; Säulentemperatur: 37°C

Schritt	Zeit [min]	Intervall [min]	Wasser [%]	ACN [%]	
Equil.			90	10	Equilibrierung
0	0	0	90	10	Injektion bis 10 µL
1	0 - 2	1	90	10	Isokratisch
2	2 - 46	44	51	49	Linearer Gradient
3	46,1 - 49	2,9	0	100	Sprung/Spülen der Säule
4	49,1 -	5 - 8	90	10	Re-Equilibrierung

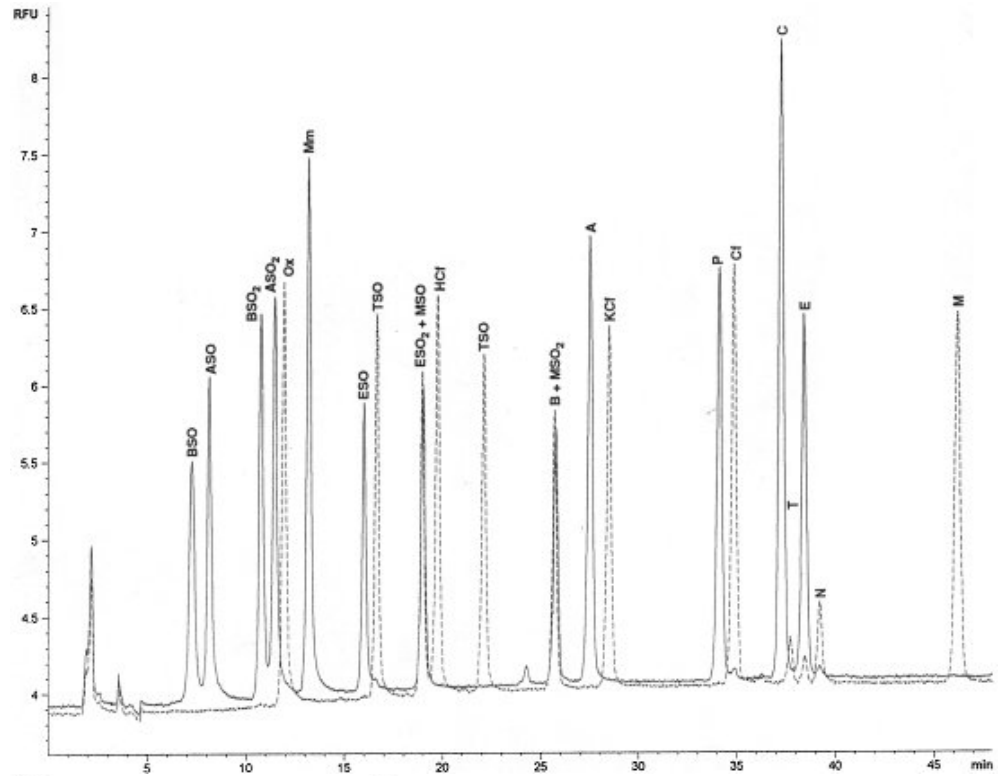
Für die C8-Säule stehen zwei Gradienten zur Auswahl: *Wasser/Methanol* oder *Wasser/Acetonitril*. Acetonitril ermöglicht zwar eine etwas höhere Empfindlichkeit, ist aber auch teurer in der Anschaffung und Entsorgung.

Mit jedem Gradienten koeluiieren zwei Carbamatpaare (s. Chromatogramme), die jedoch in den Methoden unterschiedlich sind. Ein Wechsel der Methode schafft so nötigenfalls Klarheit, welches Carbamat in der Probe vorhanden ist.

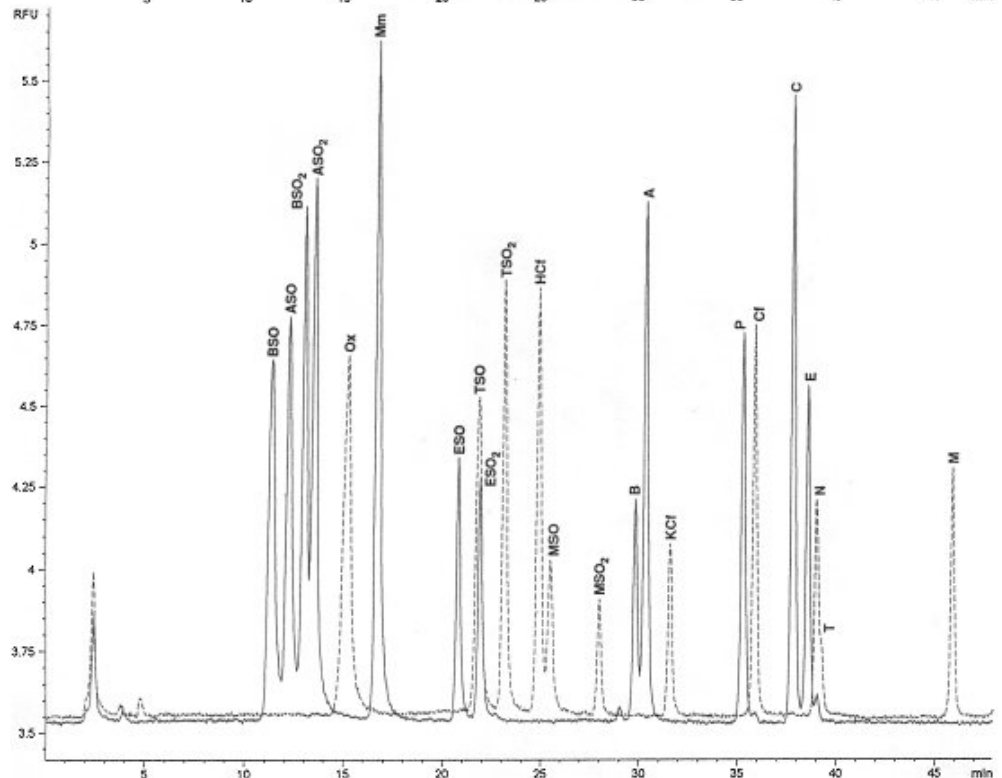
APPLIKATIONSNOTE

Chromatogramm eines Carbamatstandards (je 25 ng abs. pro Carbamat) auf der C8-Säule (250 x 4,0 mm) mit verschiedenen Gradienten

Wasser-Methanol-Gradient



Wasser-Acetonitril-Gradient



Liste der Abkürzungen der verwendeten *N*-Methylcarbamate:

A	=	Aldicarb	KCf	=	3-Ketocarbofuran
ASO	=	Aldicarbsulfoxid	M	=	Methiocarb
ASO ₂	=	Aldicarbsulfon	MSO	=	Methiocarbsulfoxid
B	=	Butocarboxim	MSO ₂	=	Methiocarbsulfon
BSO	=	Butocarboximsulfoxid	Mm	=	Methomyl
BSO ₂	=	Butocarboximsulfon	N	=	1-Naphtol
C	=	Carbaryl	Ox	=	Oxamyl
Cf	=	Carbofuran	P	=	Propoxur
E	=	Ethiofencarb	T	=	Thiofanox
ESO	=	Ethiofencarbsulfoxid	TSO	=	Thiofanoxsulfoxid
ESO ₂	=	Ethiofencarbsulfon	TSO ₂	=	Thiofanoxsulfon
HCf	=	3-Hydroxycarbofuran			

Literatur

B. D. McGarvey, *J. Chromatogr.* **1993**, 642, 89 – 105 (**Review**).

Lebensmittelproben

D. M. Holstege,, D. L. Scharberg, E. R. Tor, L. C. Hart, F. D. Galey, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1994**, 77, 1263 – 1274.

W. Blaß, C. Philipowski, *Pflanzenschutzachr. Bayer* **1992**, 45, 277 – 318.

A. de Kok, M. Hiemstra, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1992**, 75, 1063 – 1072.

M. J. Page, M. French, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1992**, 75, 1073 – 1083.

Wasserproben

M. Hiemstra, A. de Kok, *J. Chromatogr. A* **1993**, 667, 155 – 166.

V. A. Simon, K. S. Pearson, A. Taylor, *J. Chromatogr.* **1993**, 643, 317 – 320.

A. de Kok, M. Hiemstra, U. A. Th. Brinkman, *J. Chromatogr.* **1992**, 623, 265 – 276.

Chemikalien und Säulen

Nachsäulenderivatisierungssystem

Katalog Nr.	Beschreibung
1153-1052	PINNACLE PCX; zweistufig; 500 µL Reaktor

Applikationenkits

Katalog Nr.	Beschreibung
0352-0003	Applikationenkit-Carbamat für 12 Carbamate nach EPA-Methode 531.1, bestehend aus:
1846250	Trennsäule, RP C18, 4,6 x 250 mm
18ECG001	Kartuschenhalter mit 3 Vorsäulenkartuschen
O120	o-Phthalaldehyd (OPA), "Chromatographic Grade TM ", 5 g
CB910	OPA-Diluent, "Chromatographic Grade TM ", 4 x 950 mL
3700-2000	Thiofluor [®] , "Chromatographic Grade TM ", 10 g
CB130	Hydrolyse-Reagenz, 4 x 950 mL
1700-0132	ChlorAC [®] -Puffer zur Konservierung wässriger Proben, 250 mL
1700-0063	Carbamat-Standard, qualitativ, 1,5 mL, 2,5 µg/mL pro Komponente
0352-0004	Applikationenkit-Carbamat für 12 Carbamate nach AOAC-Methode 985.23, bestehend aus:
1846150	Trennsäule, RP C18, 4,6 x 150 mm
18ECG001	Kartuschenhalter mit 3 Vorsäulenkartuschen
O120	o-Phthalaldehyd (OPA), "Chromatographic Grade TM ", 5 g
CB910	OPA-Diluent, "Chromatographic Grade TM ", 4 x 950 mL
3700-2000	Thiofluor [®] , "Chromatographic Grade TM ", 10 g
CB130	Hydrolyse-Reagenz, 4 x 950 mL
1700-0132	ChlorAC [®] -Puffer zur Konservierung wässriger Proben, 250 mL
1700-0063	Carbamat-Standard, qualitativ, 1,5 mL, 2,5 µg/mL pro Komponente
0352-0002	Erweitertes Applikationenkit-Carbamat für 23+ Carbamate, bestehend aus:
0840250	Trennsäule, RP C8, 4,0 x 250 mm
18ECG001	Kartuschenhalter mit 3 Vorsäulenkartuschen
O120	o-Phthalaldehyd (OPA), "Chromatographic Grade TM ", 5 g
CB910	OPA-Diluent, "Chromatographic Grade TM ", 4 x 950 mL
3700-2001	Thiofluor [®] , "Chromatographic Grade TM ", 10 g
CB130	Hydrolyse-Reagenz, 4 x 950 mL
1700-0132	ChlorAC [®] -Puffer zur Konservierung wässriger Proben, 250 mL
1700-0063	Carbamat-Standard, qualitativ, 1,5 mL, 2,5 µg/mL pro Komponente

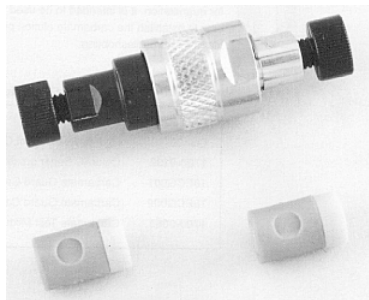
Trennsäulen für die Carbamat-Analytik

- 1) Speziell für die Carbamat-Analytik entwickelt
- 2) Binäre lineare Gradienten-Methode
- 3) Hohe Auflösung und Präzision
- 4) Kein Säulenbluten (stabile Phase)

Die amerikanischen Vorschriften verlangen die Trennung von zehn *N*-Methylcarbamaten plus 1-Naphthol und internem Standard (4-Brom-3,5-dimethylphenyl-*N*-methylcarbammat = BDMC). Für diese Anforderungen bietet PICKERING-Säulen mit C18 Material an. Für die Analytik zusätzlicher Carbamate ist eine C8-Säule mit größerer Selektivität erhältlich. Hiermit können bis zu 23 Carbamate bzw. deren Metaboliten getrennt werden.

Katalog Nr.	Beschreibung
1846150	Trennsäule RP C18, 4,6 x 150 mm
1846250	Trennsäule RP C18, 4,6 x 250 mm
0840250	Trennsäule RP C8, 4,0 x 250 mm

Kartuschenhalter mit drei Vorsäulenkartuschen



- 1) Schutz der analytischen Säule
- 2) Keine Auswirkung auf Peakform und Auflösung
- 3) Leichtes Austauschen der Kartuschen
- 4) Auf Korrosion und Dichtheit geprüft

Katalog Nr.	Beschreibung
18ECG001	Kartuschenhalter mit 3 Vorsäulenkartuschen
18ECG002	2 Vorsäulenkartuschen

o-Phthalaldehyd Reagenz

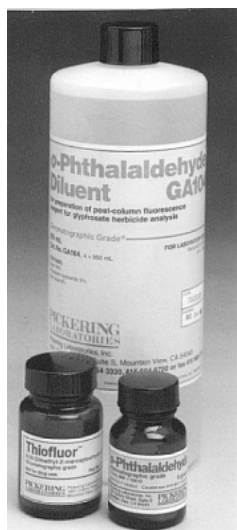
Primäre Amine bilden mit o-Phthalaldehyd (OPA) und einem Thioalkohol (Mercaptan) im alkalischen Milieu stark fluoreszierende Isoindol-Derivaten. Bei Raumtemperatur ist diese Reaktion bei einem pH-Wert von 9-10 normalerweise innerhalb von ca. 30 sec abgeschlossen.

Um eine maximale Empfindlichkeit der Methode zu gewährleisten, ist es notwendig, hochreine Chemikalien zu verwenden und die sauerstoffempfindliche OPA-Reagenzlösung ständig unter Inertgasatmosphäre zu halten. Es ist daher aber auch wichtig, nicht nur das Reagenzreservoir unter Inertgas zu halten sondern auch luftundurchlässige Gas- und Reagenzleitungen aus Saran® oder PEEK zu verwenden.

Die so aufbewahrte Reagenzlösung kann bis zu 10 Tagen verwendet werden, ohne dass sich das Signal/Rauschverhältnis ändert.

Für die o-Phthalaldehyd-Reagenzlösung bietet PICKERING an:

- 1) Hochreines, kristallines OPA
- 2) Boratdiluent; garantiert frei von Aminen und Schwermetallen
- 3) Thiofluor; ein kristallines 2-Mercaptoethanolderivat



o-Phthalaldehyd

Katalog Nr.	Beschreibung
O120	o-Phthalaldehyd (OPA), "Chromatographic Grade™", 5 g

o-Phthalaldehyd Diluent

Für die Carbamat-Analytik bietet Pickering einen Na-Boratpuffer mit pH 9,1 an.

Katalog Nr.	Beschreibung
CB910	OPA-Diluent, "Chromatographic Grade™", 4 x 950 mL

Thiofluor®

Thiofluor® der Firma PICKERING ist ein kristallines, schwer flüchtiges Nukleophil. Seine mit OPA und primären Aminen gebildeten Isoindol-Derivate sind bei gleichen Fluoreszenzeigenschaften stabiler als die des üblicherweise verwendeten 2-Mercaptoethanols.

Katalog Nr.	Beschreibung
3700-2000	Thiofluor®, "Chromatographic Grade™", 10 g

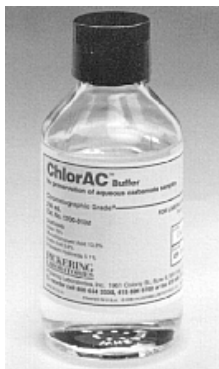
Hydrolysereagenz

- 1) Vermeidet mineralische Niederschläge
- 2) Garantiert frei von fluoreszierenden Verunreinigungen
- 3) Gleichbleibende Qualität, Flasche für Flasche

Die 0,05 M Natriumhydroxidlösung wird im ersten Schritt zur Hydrolyse der Carbamatgruppe eingesetzt. Bei der Analyse von harten Wässern besteht die Gefahr, dass unlösliches Calcium- oder Magnesiumhydroxid entsteht und sich im beheizten Reaktor niederschlägt. Durch den Zusatz von "C47" zur Hydrolyselösung werden diese Mineralien in Lösung gehalten und ein zeitaufwendiges Reinigen des Systems wird vermieden.

Katalog Nr.	Beschreibung
CB130	Hydrolyse-Reagenz, 4 x 950 mL

ChlorAC[®]-Puffer



- 1) Konserviert wässrige Carbamat-Proben
- 2) Garantiert frei von fluoreszierenden Verunreinigungen
- 3) Vorfiltriert, gebrauchsfertig

Viele Carbamate wie z.B. Carbaryl, Oxamyl und Hydroxycarbofuran werden in wässrigen Lösungen oxidiert oder hydrolysiert. Um richtige Analyseergebnisse zu erhalten, müssen deshalb Proben und Standards konserviert werden. Dafür wird die Probe auf einen pH-Wert von $3,0 \pm 0,2$ eingestellt, dechloriert und gekühlt. Der Puffer wird aus Monochloressigsäure und Kaliumacetat hergestellt. Da kommerziell erhältliche Monochloressigsäure oft nicht frei von fluoreszierenden Kontaminationen ist, wird die Verwendung des ChlorAC[®]-Puffers der Firma PICKERING empfohlen.

Empfohlene Probenvorbereitung

1,8 mL ChlorAC[®] Puffer für je 60 mL Probe werden im sauberen Probenglas vorgelegt.

Wenn die Wasserprobe gechlort ist, wird sie mit 5 mg Natriumthiosulfat pro 60 mL Probe dechloriert.

Dechlorierte Probe in Probengläschen füllen und gut mit dem vorgelegten ChlorAC-Puffer mischen.

Proben für den Transport auf 4 °C kühlen; für eine Aufbewahrung bis zu 28 Tagen auf -10 °C kühlen.

Für Standards und Blanks werden 10 mL ChlorAC Puffer in 1000 mL Wasser (HPLC-Reinheit) gelöst.

Referenz

M.W. Dong, M.V. Pickering, M.J.I. Mattina, H.M. Pylypiw, Jr., *LC•GC* **1992**, 10, 442-446.

Katalog Nr.	Beschreibung
1700-1320	ChlorAC [®] -Puffer zur Vorbereitung von wässrigen Proben, 250 mL

Carbamat Testmischung

Die Testmischung (1,5 mL wässrige Lösung von 10 Carbamaten, 2,5 µg/mL je Komponente) ist ein qualitativer Standard, der zur Erstellung eines Elutionsprofils verwendet werden kann. Für die Kalibrierung ist er nicht geeignet. Bitte wenden Sie sich dafür an einen Anbieter von analytischen Pestizid-Standards.

Der Standard enthält:

Aldicarb	3-Hydroxycarbofuran
Aldicarb Sulfoxid	Methiocarb
Aldicarb Sulfon	Methomyl
BDMC (Interner Standard)	1-Naphtol
Carbaryl	Oxamyl
Carbofuran	Propoxur

*4-Brom-3,5-dimethylphenyl-*N*-methylcarbamat

Katalog Nr.	Beschreibung
1700-0063	Carbamat-Standard, qualitativ; 1,5 mL; 2,5 µg/mL