

Arh. hig. rada, 26 (1975) 157.

METODE ODREĐIVANJA
0,0-DIMETIL 2,2,2-TRIKLORO-1-HIDROKSJETIL
FOSFONATA (DMTHF)

BLANKA KRAUTHACKER

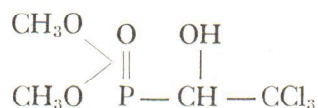
Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada JAZU, Zagreb

(Prinljeno 11. IX 1974)

Iznesen je pregled literature koja obrađuje metode odjeljivanja i određivanja organskofosforne pesticida i lijeka 0,0-dimetil 2,2,2-trikloro-1-hidroksietil fosfonata (DMTHF-a) u uzorcima različitog podrijetla. Prema svrsi i načinu određivanja metode su podijeljene u metode ekstrakcije, i metode kvalitativnog i kvantitativnog određivanja DMTHF-a. Za većinu metoda navedene su njihove osjetljivosti ako su bile navedene u originalnom radu. Popis literature sadržava 82 reference s naslovima radova na engleskom ili njemačkom jeziku.

Organskofosforni spoj 0,0-dimetil 2,2,2-trikloro-1-hidroksietil fosfonat poznat je u literaturi pod mnogim imenima, a za mnoga imena rabe se i različite transkripcije. Svjetska zdravstvena organizacija preporučuje ga kao lijek pod imenom »metrifonate«. Internacionalna organizacija za standardizaciju (ISO) preporučuje ime »trichlorfon«, dok se u Turskoj koristi ime »dipterex«, u Velikoj Britaniji »trichlorphon«, Sovjetskom Savezu »chlorofos«, a u Poljskoj »foschlor«; također je poznat pod trgovačkim imenom »Dipterex«, »Neguvon«, »Tugon« i »Dylox« (1). Bayer Farbenfabriken (Leverkusen, Zap. Njemačka) vodi ga pod imenom Bayer L 13/59 ili Bayer 15922.

U cijelom prikazu upotrebljavat ćemo kraticu DMTHF koja proizlazi iz kemijskog imena spoja 0,0-dimetil 2,2,2-trikloro-1-hidroksietil fosfonat.



DMTHF se uspješno upotrebljava u humanoj i veterinarskoj medicini. za liječenje nekih bolesti uzrokovanih nametnicima. Osim toga se primjenjuje u suvremenoj poljoprivredi kao pesticid za zaštitu od raznih vrsta štetočina.

Zbog široke primjene kao i opsežnih studija mehanizma djelovanja i metabolizma DMTHF-a potrebno je poznavati metode određivanja ovog spoja, pa će u ovom prikazu biti sažeto iznesen literaturni pregled metoda određivanja DMTHF-a.

Metode s kojima se susrećemo pri određivanju DMTHF-a mogu se podijeliti u dvije skupine:

1. metode ekstrakcije
2. metode kvalitativnog i kvantitativnog određivanja.

Nadalje, brojne metode kvalitativnog i kvantitativnog određivanja, opisane u literaturi, mogu se podijeliti u nekoliko skupina prema principu metode i načinu određivanja:

- 2.a. Kromatografske metode
- 2.b. Fotometrijske metode
- 2.c. Polarografske metode
- 2.d. Titracijske metode

Osim kod fotometrijskih i polarografskih metoda, pri određivanju se često upotrebljavaju i označeni spojevi, napose u metodama ekstrakcije i za praćenje metabolizma DMTHF-a.

1. Metode ekstrakcije

Široka primjena DMTHF-a u humanoj i veterinarskoj medicini kao i poljoprivredi uvjetovala je da se DMTHF u prirodi može naći u uzorcima najrazličitijeg podrijetla kao, na primjer, u uzorcima vode, tla, životinja, bilja i različitim produktima i prerađevinama biljnog i životinjskog podrijetla. Da bi se moglo pratiti koliko se DMTHF-a nalazi u pojedinim uzorcima, najčešće je potrebno prije kvantitativne analize izvršiti ekstrakciju uzorka. Nakon ekstrakcije DMTHF se kvantitativno određuje bilo u ekstraktu izravno ili se organsko otapalo ukloni isparavanjem i određuje količina DMTHF-a u vodenoj otopini što je moguće zbog dobre topljivosti DMTHF-a u vodi.

Za ekstrakciju DMTHF-a iz raznih bioloških materijala i vodenih otopina upotrijebljeno je nekoliko otapala. *Devine* (2) ekstrahirao je kloroformom iz uzoraka uzetih u šumi nakon prskanja: vode, vodene i šumske vegetacije, životinjskog tkiva (riba i žaba); kloroformom su se također koristili i *Fechner* i suradnici (3) za ekstrakciju DMTHF-a iz uzoraka mlijeka. *Anderson* i suradnici (4) ekstrahirali su DMTHF iz životinjskog tkiva acetonitrilom. Masno tkivo prije dodatka acetonitrila ekstrahiraju »Skellysolve B« otopinom. Acetonitrilni ekstrakt se onda upari, rezidue se otope u vodi, ekstrahiraju n-heptanom, a zatim se vodeni sloj koji sadržava DMTHF ekstrahira dietileterom. Eterski ekstrakt se nakon sušenja na Na_2SO_4 uparava do suhog i ostatak otapa u benzenu te analizira dalje jednom kvantitativnom metodom. DMTHF iz vodenih puferских otopina *El-Refai* (5) ekstrahira etilacetatom, koji se zatim suši natrijevim sulfatom, a alikvotnom dijelu određuje se točan sadržaj DMTHF-a. *Stempkovskaya* i *Pashkovskaya* (6) ekstrahiraju (uzorci nisu navedeni)

diklormetanom, koji zatim uparavaju i rezidue otapaju u vodi. *Bors* i suradnici (7) ekstrahiraju tetraklorugljikom, a *Mishina i Shutyaeva* (8) ekstrahiraju uzorke mlijeka smjesom benzen : n-heksan (1 : 1) koji nakon prolaza kroz kolonu aluminijeva oksida uparavaju i otparni ostatak otapaju u acetonu.

DMTHF je u vodenim otopinama nestabilan. U alkalnom mediju on se pregrađuje u organskofosforni spoj antikolinesterazne aktivnosti DDVP (0,0-dimetil 2,2-diklorovinil fosfat) (7) koji za razliku od DMTHF-a nije topljiv u vodi. U jako kiselom mediju DMTHF također nije stabilan, već se razgrađuje, ali nije poznato koji su razgradni produkti, dok je u neutralnom i slabo alkalnom DMTHF relativno stabilan. Zbog njegove pregradnje potrebno ga je odijeliti od DDVP-a koji mu je po kemijskim svojstvima vrlo sličan i u mnogim metodama određivanja smeta. Kao vrlo djelotvorne metode odljeljivanja DMTHF-a od DDVP-a razrađene su metode protustrujne distribucije (counter current distribution) koje se osnivaju na razdjeljenju DMTHF-a i DDVP-a u sustavu otapala. *Dedek i Schwarz* (9, 10) izvodili su razdjeljenje između kloroforma i tetraklorugljika, a *Metcalf* i suradnici (11) upotrijebili su sustav voda : kloroform (100 : 1). Navedeni su se autori služili označenim DMTHF-om, a radioaktivnost ekstrakta odnosno spoja označenog sa ^{32}P mjerena je Geigerovim brojačem.

Veoma je važno radi još opsežnije primjene DMTHF-a razjasniti njegov metabolizam u organizmu životinja, a ponajviše u organizmu sisavaca. Najpogodniji način praćenja metabolizma nedvojbeno je primjena označenog DMTHF-a bilo ^{14}C označenog u metilnoj skupini (12), ^{32}P označenog u fosfatnom dijelu molekule (10, 13—16) ili ^3H označenog na položaju C_1 (17) i detekcije mjesta ugradnje označenog atoma.

2.a. Kromatografske metode

Ove metode često se primjenjuju zbog brzine i djelotvornosti za odjeljivanje komponenata u smjesi, ali one nisu uvijek prikladne za kvantitativna određivanja pojedinih spojeva. Prema osnovnom procesu na kojem se temelji odjeljivanje, razlikuju se adsorpcijska, particijska i kromatografija ionskom izmjenom. S obzirom na razlike u prirodi mobilne faze kao i prirodi i oblikovanju stacionarne faze, podijeljena je particijska kromatografija u papirnu, tankoslojnu, stupnu i plinsku kromatografiju.

Za odjeljivanja DMTHF-a iz smjesa primijenjena je papirna kromatografija i razvijena kao metoda kvalitativnog određivanja. Kao kvalitativan test primijenio ju je *Cook* (18) za određivanje inhibitornih svojstava DMTHF-a, pa *Matsunaga* i suradnici (19), *Yamashita* (20), *Tokumaru* (21), *Mishina* (22), *Mishina i Shutyaeva* (8), *Fischer i Plunger* (23), dok su se *Golubev* i suradnici (24) koristili kružnom papirnom kromatografijom. Kao mobilne faze upotrijebljene su smjese: butanol : octena kiselina : voda, aceton : etanol : voda, n-butanol : voda : amonijak (1% -tni), butanol : aceton : voda : amonijak (10% -tni), kloroform : etanol, metanol : voda : amonijak (0,5% -tni) i aceton : voda. Nakon razvijanja kromato-

grama mrlje su vizualizirane štrcanjem otopinama reagenasa koji daju obojene mrlje nakon reakcije s DMTHF-om neposredno nakon tretiranja ili nakon stanovitog vremena. Od reagenasa bili su upotrijebljeni: srebrni nitrat i amonijak, 1%-tni rezorcinol u 0,1%-tnoj natrijevoj lužini, feri-sol i sulfosalicilna kiselina nakon koje su mrlje izlagane parama broma, Hanesov reagens, srebrni nitrat uz formaldehid i smjesu kalijeve lužine, dušične kiseline i vodikova peroksida ili je detekcija vršena enzimski, jer je poznato da je DMTHF nestabilan i u otopinama slabo kiselim, neutralnim i alkalnim prelazi u DDVP koji je inhibitor kolinesteraza, dok sam DMTHF ne inhibira kolinesteraze (25). Na osnovi inhibitornih svojstava DDVP-a koji je prisutan u otopinama DMTHF-a moguće je vršiti enzimsku detekciju DMTHF-a. Da bi potvrdio inhibitorna svojstva otopina DMTHF-a, Cook (18) upotrijebio je za enzimsku detekciju kao izvor enzima ljudsku plazmu, a metoda je adaptirana tako da su uzorak koji sadržava DMTHF, enzimska smjesa i supstrat smješteni svaki na svom papiru, a međusobno reagiraju kad se stave jedan na drugi. Mobilna faza je voda kojom je natopljen papir smješten ispod papira s uzorkom. Mjesta na kojima je smješten inhibitor obojena su na papiru gdje je supstrat, t. j. na najgornjem papiru plavo (indikator je bromtimol plavilo), dok ona mjesta gdje enzimska aktivnost nije promijenjena ostaju obojena zeleno do žuto. Papirnom kromatografijom Metcalf i suradnici (11) odjeljivali su i određivali DMTHF upotrebom ^{32}P DMTHF-a kojem je nakon odjeljivanja mjerena radioaktivnost. Osjetljivost metoda papirne kromatografije je u granicama 0,2 μg (18) do 100 μg (20) ukupne količine nanosene na kromatogram.

Tankoslojna kromatografija spominje se često kao prikladna kvalitativna metoda za određivanje DMTHF-a. Walker i Beroza (26) dali su literaturni prikaz o metodama tankoslojne kromatografije DMTHF-a i 61 organskofosfornog pesticida s tri otapala (kloroform, benzen, heksan) i u smjesi s otapalima etil eterom, etil acetatom, acetonom, metanolom i octenom kiselinom. Kao adsorbens odnosno stacionarna faza najviše je upotrebljavan silikagel (26—35), nadalje kao prikladan adsorbens spominju se kieselgur (27), aluminijev oksid (27, 31, 32), kieselgel (9, 23) i poliamid (35). Za razvijanje kromatograma upotrijebljena su različna otapala i smjese otapala kao mobilne faze: benzen (27), metanol : kloroform (9, 30), benzen : aceton (29), etanol : aceton i etanol : butanol (7, 33), benzen : metilacetat (3), heksan : butanol (36), heksan i heksan : aceton (37), aceton : toluen : heksan i aceton : toluen : heksan : etilacetat (32), kloroform : benzen : heksan (28), aceton : heksan : kloroform i benzen : eter (23). Mrlje DMTHF-a otkrivane su reakcijom različnih reagenasa štrcanih na ploče kao što su: Na-3,5-dihidroksipiren 8,10-disulfat (38), fluorescein ili smjesa srebrnog nitrata i 2-fenoksietanola (29), srebrni nitrat (7, 23, 27, 28, 33), pare joda i o-tolidin (39), nitrobenzilpiridin ili paladijev klorid (35), natrijev karbonat i rezorcinol (40), brom i 4-benzendiazonijum hidroksid (41). Enzimsku detekciju mrlja primijenilo je nekoliko istraživača: Winterlin i suradnici (32) detektiraju mrlje DMTHF-a kolinesterazom ljudske plazme i acetilkolineste-

razom mozga pčela; *Stijve i Cardinale* (34) primjenjuju kolinesterazu ljudske i konjske plazme a *Fechner* i suradnici (3) rabe homogenat goveđe jetre. *Ren Tse i Shiou* (42) primijenili su tankoslojnu kromatografiju zamijenjenih faza. Prije razvijanja kromatograma stacionarna faza (nije navedeno koja) zasićena je silikonskim uljem, kao mobilna faza primijenjena je smjesa aceton : etanol : voda, a za ploče koje nisu bile tretirane silikonskim uljem mobilna faza bila je smjesa n-heksan : benzen : aceton : voda. Mrlje su se pojavljivale nakon štrcanja 5⁰/₀-tnom bromnom vodom, 0,25⁰/₀-tnim fluoresceinom ili 1⁰/₀-tnim o-tolidinom. Metoda se pokazala prikladnom za kvalitativno određivanje dvadeset organskofosfornih spojeva. Primjenu tankoslojne kromatografije u kvantitativnim, određivanjima susrećemo danas sve češće zahvaljujući postojanju denzitometara kojima možemo izmjeriti intenzitet/stvorenih mrlja na tankom sloju. Napredak u tom smislu prilikom određivanja DMTHF-a susrećemo u radu *B. Kiseljak* (43) koja za stacionarnu fazu upotrebljava silikagel, kao mobilnu fazu kloroform : aceton, a mrlje stvorene nakon štrcanja srebrnim nitratom mjeri denzitometarski.

Osjetljivost tankoslojne kromatografije kreće se od 1 ng do 12 μ g nanijetih na ploču s vidljivom prednosti metoda koje primjenjuju enzimsku detekciju mrlja. Osjetljivost metoda koje koriste enzimsku detekciju je 1 ng do 250 ng, dok metode koje rabe druge reagense imaju manju osjetljivost, 0,2 μ g do 12 μ g.

Stupnu kromatografiju primjenio je *Hamilton* (44) za odjeljivanje DMTHF-a iz smjese. Kolone su bile punjene hidratiziranom silicijevom kiselinom kao stacionarnom fazom i eluirane tetraklorugljikom kao mobilnom fazom. *Keisuke* i suradnici (39) i *Mishina* i *Shutyayeva* (8) koristili su se kolonama punjenim aluminijevim oksidom aktivnosti 2—4⁰/₀ vode, a mobilna faza bile su smjese heksan : benzen ili heksan : aceton raznih omjera, ili čisti heksan i aceton.

Plinska kromatografija nije osobito prikladna metoda za određivanje DMTHF-a zbog njegova brzog raspada kod visokih radnih temperatura. Ovom metodom DMTHF se određuje preko produkata raspada i kada se nalazi u smjesi s DDVP-om nemoguće ga je razlikovati od DDVP-a koji daje iste produkte pri raspadu kod određivanja plinskom kromatografijom. Zbog toga se metoda ne može primjeniti ako ga želimo odrediti u smjesi s DDVP-om. Ako je prisutan sam DMTHF, onda je metoda plinske kromatografije kvantitativna metoda za određivanje DMTHF-a s velikom osjetljivošću. *Ellis i Bates* (45) upotrijebili su elektron-absorpcijski detektor i kolone punjene 0,075⁰/₀-tnim neopentil glikol sukcinatom i 0,675⁰/₀-tnim SE-30 na Chromosorbu W. Isti detektor i adsorbens upotrijebili su *Anderson* i suradnici (4) ali su kao selektivnu tekućinu primijenili XF-1150, dok *Salame* (46) koji se koristi istim detektorom primjenjuje kolone punjene 2,5⁰/₀-tnim Carbowaxom 20 M ili 5⁰/₀-tnim SE-30 na Chromosorbu P. *El-Refai* (5) koristio se plameno-ionizacijskim ili natrijevim termionskim detektorom, a kolone su bile punjene 25⁰/₀-tnim Carbowaxom 20 M na Anakromu ABS. *Mizuno* i suradnici (47) upotrijebili su kao selektivne tekućine SE-30 termal-3 ili DC 550, ali u sažetku

nije naveden adsorbens niti detektor. Posljednji rad na tom području objavio je *Devine* (2) koji se služi plameno-fotometrijskim detektorom i kolonama punjenim 16%-tnim XF-1150 na Chromosorbu W. Osjetljivost metoda plinske kromatografije je velika. Za uzorke vode *Devine* (2) navodi osjetljivost metode uključivši prethodnu ekstrakciju, 0,002 ppm, dok je za ostale uzorke šumske flore i faune 0,05 ppm. *Anderson* i suradnici (4) navode da je za uzorke biljnog i životinjskog tkiva osjetljivost njihove metode 0,1 ppm, dok *El-Refai* (5) određuje DMTHF u uzorcima vode ukupnoj količini ubačenoj u kromatograf 0,01 μg .

Usporedbom kromatografskih metoda vidimo da su za kvalitativna određivanja DMTHF-a prikladne metode papirne i tankoslojne kromatografije. Stupna kromatografija, papirna i tankoslojna kromatografija djelotvorne su metode za efikasna odjeljivanja DMTHF-a iz smjesa, dok se za kvantitativna određivanja može primijeniti plinska kromatografija ako nije u smjesi s DDVP-om.

2.b. Fotometrijske metode

Prve kvantitativne fotometrijske metode određivanja DMTHF-a bile su indirektne i dugotrajne. DMTHF se određivao pirolizom spoja pri 550 °C, pri čemu je kao razgradni produkt nastao kloroform, koji je zatim izmjeran modificiranim piridin-alkalnim *Fujiwarinim* testom za kloroform (48—51). *Yamashita* (20) i *Stempkovskaja i Pashkovskaya* (6) proveli su razgradnju DMTHF-a umjesto pirolizom, oksidacijom dikromatom i sumpornom kiselinom do klorala, a zatim lužinom do kloroforma. Nakon dodatka piridina razvija se crvena boja a apsorpcijska krivulja piridinskog sloja pokazuje dva maksimuma: kod 360 i 530 nm. Osjetljivost ove metode je 20—200 μg u konačnoj otopini, dok je prema *Giangu* i suradnicima (50) osjetljivost 20 μg što se uklapa u rezultate *Yamashite* (20). Na osnovi zapažanja *Mattsona* i suradnika (52) da DMTHF u lužnatom mediju pregradnjom prelazi u 2,2-diklorovinil fosfat, koji se kondenzira s 2,4-dinitrofenil hidrazinom u odgovarajući gliksal osazon (53), *Wollenber* (54) razvio je izravnu metodu za određivanje DMTHF-a: u reakciji DMTHF-a s hidrazidom izonikotinske kiseline u lužnatom mediju nastaje žuta boja koja se mjeri pri 410 nm.

Kvantitativno određivanje DMTHF-a može se provesti i na osnovi produkta hidrolize, metanola: u reakciji s kromotropnom kiselinom metanol daje crveno obojeni produkt s maksimumom apsorpcije pri 570 nm (20). Baždarni pravac dobiven je u rasponu koncentracija 10—50 $\mu\text{g/ml}$.

Kao temelj za određivanje DMTHF-a poslužila je također apsorpciometrijska modifikacija *Schöenemannove* reakcije (55) koja se temelji na oksidaciji odgovarajućeg reagensa donatorima kisika u slabo alkalnom mediju, pri čemu organskofosforni spoj služi kao prenosilac vezanog kisika. Kao reagensi za takva su određivanja najčešće upotrebljavani spojevi što daju intenzivno obojeni oksidacijski produkt, kao: benzidin, o-tolidin i o-dianizidin. Obojeni produkt reakcije benzidina s DMTHF-om mjeri se pri 420 nm (20, 36, 55, 56). Osjetljivost metode prema *Yama-*

shiti (20) jest 1–20 $\mu\text{g/ml}$ konačne koncentracije. Maksimum apsorpcije oksidacijskog produkta o-tolidina s DMTHF-om je između 400–405 nm (40, 57, 58). Osjetljivost metode prema *Vershininu* (57) iznosi 0,02 $\mu\text{g/ml}$, dok je po metodi *Nikolaeva i Trondine* (58) sto puta manja odnosno 2 $\mu\text{g/ml}$ konačne koncentracije. Oksidacijski produkt reakcije o-dianizidina s DMTHF-om ima maksimum apsorpcije kod valne duljine 450 nm, a prema *Lohsu i Doepelu* (59) osjetljivost metode je 0,2–5 $\mu\text{g/ml}$ konačne koncentracije, dok je prema *Weberu* i suradnicima (55) osjetljivost metode je 1 $\mu\text{g/ml}$ konačne koncentracije. *Rusiecki* i suradnici (60) primijenili su za tu vrstu određivanja indol, koji daje fluorescentni oksidacijski produkt. Osjetljivost metode fluorimetrijskog određivanja DMTHF-a je 0,02 μg u konačnom volumenu.

Mustafa i suradnici (61) modificirali su metodu *Gianga* i suradnika (50) tako što su proveli cijepanje P—C veze pri 70 °C. Tako nastali dimetilfosfat razvija u reakciji s otopinom 3,5-dinitrobenzojeve kiseline u lužnatom mediju stabilnu ljubičasto-plavu boju (62). Osjetljivost metode je 20 $\mu\text{g/ml}$ konačne koncentracije, a *Mustafa* i suradnici (61) izvodili su je kao spot kolorimetrijsku metodu i za kvantitativna određivanja mjerili površine mrlja.

Amonijev molibdat, u literaturi često spominjan kao *Hanesov* reagens, poznat reagens za kvantitativno i kvalitativno određivanje fosfata (63) pa može poslužiti i za određivanje DMTHF-a (20, 64). Kao kolorimetrijsku spot metodu razradio ju je *Yamashita* (20) a osjetljivost metode je 0,1 mg/ml konačne koncentracije.

Obojene produkte u reakciji s DMTHF-om prikladne za kvantitativno određivanje daje također rezorcin; apsorbanacija obojenog produkta mjeri se pri 490 nm (65) a pogodan je za mjerenje količina manjih od 1 mg, te aceton, koji reagira s nizom organskofosfornih spojeva kojih se maksimumi apsorbanacije obojenih produkata kreću u rasponu od 350 do 420 nm (66).

Za kvantitativna određivanja DMTHF-a *Marenich* (67) primjenjuje kolorimetrijsku reakciju s floroglucinolom uz NaOH. Apsorpcijski maksimumi ružičaste do krvavocrvene otopine su 480 i 280 nm. Optimalni uvjeti za razvijanje boje su 1 : 0,5 : 3 molarni odnos floroglucinola, DMTHF-a i NaOH, a osjetljivost reakcije je 100 $\mu\text{g/ml}$ konačne koncentracije. U koncentracijama 100–800 $\mu\text{g/ml}$ apsorbanacija se mijenja linearno s koncentracijom.

Kolorimetrijsku metodu za određivanje DMTHF-a u količinama do 400 μg opisuju *Tantawy* i suradnici (68). Temelji se na redukciji MnO_4 DMTHF-om, a apsorbanacija se mjeri kod 420 nm. Metoda nije pogodna za određivanje DMTHF-a u prisutnosti alkalija jer dolazi do precipitacije MnO_2 .

Usporedbom fotometrijskih metoda međusobno odnosno njihovih osjetljivosti vidimo da su za određivanje DMTHF-a najosjetljiviji reagensi bifenilne strukture: benzidin, o-tolidin i o-dianizidin.

Za kvalitativno dokazivanje DMTHF-a, osim *Hanesova* reagensa, primjenjuje se metoda reakcije kromotropnom kiselinom (20) i metoda ko-

ju je Yamashita (30) razradio za spojeve što sadržavaju klor, a sastoji se u razvijanju obojenih mrlja na papiru zbog reakcije spoja s formaldehidom, vodikovim peroksidom, dušičnom kiselinom i srebrnim nitratom. Vrlo prikladna za kvalitativno određivanje je i IR-spektrofotometrija kojom je i prvi put bila potvrđena struktura DMTHF-a (69, 70).

2.c. Polarografske metode

Usporedno s razvojem fotometrijskih i kromatografskih metoda počele su se primjenjivati polarografske metode određivanja DMTHF-a. Kovač (71) određivao je DMTHF polarografski u osnovnom elektrolitu sastava 30 vol. % etanola i 70 vol. % fosfatnog pufera (nije navedena koncentracija) pH = 6,5 uz 0,01% želatine. Mjerenja su vršena kapajućom živinom elektrodom i zasićenom kalomelovom elektrodom. DMTHF je uz te uvjete imao poluvalni potencijal $E_{1/2} = -1,08V$. DDVP koji se stvara u neutralnom i alkalnom mediju bio je polarografski neaktivan. Giang i Caswell (72) razradili su polarografsku metodu određivanja DMTHF-a uz kapajuću živinu elektrodu i kalomelovu elektrodu u 0,01 M KCl kao osnovnom elektrolitu. DMTHF je imao poluvalni potencijal $E_{1/2} = -0,68V$. Stabilnost DMTHF-a u 0,1 M fosfatnom puferu pH = 7,4 kod temperatura 37 i 25°C određivana je modificiranom polarografskom metodom Gianga i Caswella (72). Određivanja su vršena u osnovnom elektrolitu koji je sadržavao 0,2 ili 0,4 M KCl u 0,1 M fosfatnom puferu pH = 7,4 uz dodatak želatine radi smanjenja polarografskog maksimuma. Poluvalni potencijal izmjeren u tim uvjetima bio je $E_{1/2} = -0,80 V$ (73). Kosmatii i Shlyapak (74) također su polarografski određivali DMTHF, ali se redukcija DMTHF-a na kapajućoj katodi zbivala uz osnovni elektrolit, 0,1 M vodenu otopinu $(Me)_4NeBr$. Nangniot (75) primijenjuje oscilografsku polarografiju mjereći maksimum katodne adsorpcije. Osnovni elektrolit bio je 0,2 M KCl, a određivanja su vršena DMTHF-u otopljenom u 50%tnim vodenim otopinama MeOH. Poluvalni potencijal bio je $-1,04 V$. Jonzyk (76) uspoređivala je metode Kovača (71) i Gianga i Caswella (72) s metodom argentometrijskog određivanja DMTHF-a. Rezultati dobiveni obim polarografskim metodama nisu se dostatno slagali s rezultatima dobivenim argentometrijskim određivanjima DMTHF-a. U polarografskim određivanjima DMTHF-a Wang i Wu (77) uzimali su kao osnovni elektrolit solnu, limunsku ili fosforu kiselinu i acetatni pufer. Njihova određivanja pokazala su da je u odabranim uvjetima najprikladniji osnovni elektrolit acetatni pufer i u tom elektrolitu kod 25°C DMTHF je imao poluvalni potencijal $E_{1/2} = -0,70 V$. Iste je godine Palyi (78) utvrdio da DMTHF pri polarografskim određivanjima pokazuje ireverzibilni difuzijski val. Kinetiku raspada DMTHF-a u neutralnom i alkalnom mediju kod temperatura od 20 do 70°C pratili su Rybakov i Ermishkin također polarografskom metodom u 1 M KCl a poluvalni potencijal bio je $E_{1/2} = -0,75 V$. Lindner i Oehler (80) određivali su DMTHF polarografskom metodom u acetatnom puferu pH = 5,5 kao osnovnom elektrolitu i u tim

uvjetima DMTHF je imao poluvalni potencijal $-0,85$ V. Najniža granica osjetljivosti polarografskih metoda je oko $30 \mu\text{g/ml}$ konačne koncentracije (72, 73, 75, 79), dok je prema Lindneru i Oehleru (80) $100 \mu\text{g/ml}$. Metoda Wanga i Wua (77) je pet puta manje osjetljiva.

2.d. Titracijske metode

Sato i Vejima (81) određivali su DMTHF titrirajući ionski vezani klorid otopinama srebrnog nitrata, a višak srebrnog nitrata retitriran je amonijevim tiocijanatom uz Fe(III) sol kao indikator. Benevitz i Foth (82) određivali su titracijom s otopinom srebrnog nitrata uz MeOH i HNO_3 količinu DMTHF-a određujući ionski vezani klorid. Babina i Kucherova (66) određivale su DMTHF potenciometrijskom titracijom s NaOH i KOH u etanolu što je moguće s obzirom na svojstva DMTHF-a u alkalnom mediju, odnosno oslobađanje HCl pri pregradnji DMTHF-a u DDVP.

ZAHVALE

Zahvaljujem dru E. Reiner za korisne savjete i kritičko čitanje rukopisa, a dru M. Skrinjarić-Špoljar za pomoć pri pisanju i sakupljanju literature.

Literatura

1. Pesticide Manual, British Crop Protection Council, Third Edition, 1972.
2. Devine, J. M.: Determination of trichlorphos (0,0-Dimethyl [2,2,2-trichloro-1-hydroxyethyl]phosphonate) in forest environmental samples, J. Agr. Food Chem. 21 (1973) 1095.
3. Fechner, G., Kretzschmann, F., Ackermann, H., Toepfer, H.: Improved method of thin-layer chromatographic and enzymic determination of trichlorphos and dichlorvos residues in milk, Monatsch. Vetrinaermed. 26 (1971) 860 (ger.), abstr. C. A. 76 (1972) 139140 h.
4. Anderson, R. J., Anderson, C. A., Olson, T. J.: A gas-liquid chromatographic method for the determination of trichlorphos in plant and animal tissues, J. Agr. Food Chem., 14 (1966) 508.
5. El-Refai, A. R. A., Giufrida, L.: Separation and microquantitative determination of dipterex and DDVP by gas-liquid chromatography, J. Assoc. Offic. Agr. Chem., 48 (1965) 374.
6. Stempkovskaya, L. A., Pashkovskaya, I. I.: Determination of chlorophos based on Fudzhihar's reaction, Gib. Pitan, (1966) 175 (Rus.).
7. Bors, G., Popa, I., Voicu, A., Radian, I. S.: Experimental intoxication with Dipterex. Chemical toxicologic study of Dipterex and its metabolite (Rumanian). Farmacia (Bucharest), 18 (1970) 209.
8. Mishina, R. V., Shutyaeva, M. A.: Determination of chlorophos in milk by paper chromatography with the identification in UV light, Methody Anal. Pestits. (1970) 71 (Rus.), abstr. C. A. 76 (1972) 44739 w.
9. Dedek, W., Schwarz, H.: Metabolism and application of trichlorphos in veterinary medicine (German), Atompraxis, 12 (1966) 603.
10. Dedek, W., Schwarz, H.: Zur Rückstandsbildung von ^{32}P -markierten Organophosphorinsectiziden bei landwirtschaftlichen Nutztieren, Arch. exper. Vet. med. Bd., 24 (1970) 719.
11. Metcalf, R. L., Fukuto, T. R., March, R. B.: Toxic action of dipterex and DDVP to house fly, J. Econ. Entomol., 52 (1959) 44.

12. Dedek, W., Lohs, K.: II. Verteilung von ^{14}C in Organen und Leberproteinen bei Ratten nach Applikation von ^{14}C -Trichlorphon, *Z. Naturforsch.*, 25b (1970) 1110.
13. Dedek, W., Schwarz, H.: Untersuchungen zur Ausscheidung von ^{32}P -markierten Trichlorphon und sein Abbauprodukten in der Milch nach unterschiedlicher Applikation am Rind, *Arch. exper. Vet. med.*, 20 (1966) 849.
14. Bull, D. L., Ridgway, R. L.: Metabolism of trichlorphon in animals and plants, *J. Agr. Food Chem.*, 17 (1969) 837.
15. Arthur, B. W., Casida, J. E.: Metabolism and selectivity of 0,0-dimethyl 2,2,2-trichloro-1-hydroxyethyl phosphonate and its acetyl and vinyl derivatives, *J. Agr. Food Chem.*, 5 (1957) 186.
16. Hassan, A., Zayed, S. M. A. D., Abdel-Hamid, F. M.: Metabolism of 0,0-dimethyl-2,2,2-trichloro-1-hydroxyethyl phosphonate (dipterex) in mammalian nervous tissue and kinetics involved in its reaction with acetylcholinesterase, *Can. J. Biochem.*, 43 (1965) 1263.
17. Dedek, W., Koch, H., Uhlenhut, G., Bröse, F.: Zur Kenntnis der Umsetzung von ^3H -Trichlorphon zu DDVP, *Z. Naturforsch.*, 24b (1969) 663.
18. Cook, J. W.: Paper chromatography of some organic phosphate insecticides IV. Spot test for *in vitro* cholinesterase inhibitors, *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 38 (1955) 150.
19. Matsunaga, A., Murakami, A., Sato, I., Yamashita, K., Yoshimori, H., Shinagana, K.: Qualitative analysis of 17 organophosphorus compounds by paper chromatography, *Kumamoto Med. J.*, 12 (1959) 214.
20. Yamashita, K.: Studies on organic phosphorus dipterex III. Detection and discrimination of dipterex and its vinyl derivate (DDVP), *Kumamoto Med. J.*, 14 (1961) 13.
21. Tokumaru, T.: Identification of dimethyl 2,2,2-trichloro-1-hydroxyethylphosphonate (organophosphorus insecticide), *Kogyo Kagaku Zasshi* 67 (1964) 649, abstr. C. A. 61 (1964) 7636 f.
22. Mishina, R. V.: Determination of some organophosphorus compounds in biological material by a paper chromatographic method, *Sud-Med. Expert. Kriminalistika Sluzhbe Siedstvyia*, 5 (1967) 651 (Rus.), abstr. C. A. 73 (1970) 76027 s.
23. Fischer, R., Plunger, C.: Identification and quantitative determination of phosphorus insecticides in biological material. 2. (German), *Arch. Toxikol.*, 21 (1965) 101.
24. Golubev, T. I., Odumanova-Dunaeva, G. A., Volkova, V. A.: Determination of chlorophos by circular paper chromatography (Rus.), *Zavods. Lab.*, 31 (1965) 37.
25. Reiner, E., Krauthacker, B., Simeon, V., Škrinjarić-Špoljar, M.: Mechanism of inhibition *in vitro* of mammalian acetylcholinesterase and cholinesterase in solutions of 0,0-dimethyl 2,2,2-trichloro-1-hydroxyethyl phosphonate (Trichlorphon), *Biochem. Pharmacol.*, 24 (1975) 717.
26. Walker, K. C., Beroza, M.: Thin-layer chromatography for insecticide analysis, *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 46 (1963) 250.
27. Stanley, C. W.: Thin-layer chromatography of organophosphorus pesticides and acids on microchromatoplates, *J. Chromatog.*, 16 (1964) 467.
28. Zadrozinska, J.: Determination of selected phosphororganic pesticides (parathion, methylparathion, Diazinon, malathion, gusathion, meta-systox and Dipterex) by thin-layer chromatography method, *Rozniki Panstwowego Zakladu Hig.*, 16 (1965) 397.
29. Golubev, T. I., Volkova, V. A.: Specific enzymic-chromatographic thin-layer microtechnique of separate chlorophos and DDVP determinations in biological substrates, *Vop. Pitan.*, 26 (1967) 69.
30. Kolyakova, V. Y.: Separation of a mixture of chlorophos, DDVP, chloral and dimethylphosphorus acid by thin-layer chromatography, *Tr. Vses. Nauch-Issled. Inst. Vet. Sanit.* 29 (1967) 348 from Ref. Zh. Khim. (1968) Abstr. No. 4N635, abstr. C. A. 69 (1968) 42976 c.

31. Getz, M. E., Wheeler, H. G.: Thin-layer chromatography of organophosphorus insecticides with several adsorbents and ternary solvent systems, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, 51(5) (1968) 1101, abstr. C. A. 69 (1968) 75850 k.
32. Winterlin, W., Walker, G., Frank, H.: Detection of cholinesterase-inhibiting pesticides following on thin-layer chromatograms, *J. Agr. Food Chem.*, 16 (1968) 808, abstr. C. A. 69 (1968) 95350 a.
33. Bors, G., Popa, I., Voicu, A.: Chromatographic separation of some organochlorine insecticides, *Farmacia (Bucharest)*, 17 (1969) 647, abstr. C. A. 72 (1970) 13433 a.
34. Stijve, T., Cardinale, E.: Esterase inhibition technique for the detection of organophosphorus pesticides on thin-layer chromatograms, *Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg.*, 62 (1971) 25, abstr. C. A. 75 (1971) 117195 g.
35. Antoine, O., Mees, G. J.: Routine method for the determination of organophosphorus insecticides by thin-layer chromatography, *J. Chromatogr.*, 58 (1971) 247, abstr. C. A. 75 (1971) 75234 m.
36. Sidky, M. M., El-Darawy, Z. I., Kamel, H.: Colorimetric determination of 0,0-dimethyl(1-hydroxy)2,2,2-trichloroethylphosphonate and related compounds, *Egypt. J. Chem.*, 15 (1972) 169, abstr. C. A. 79 (1973) 101511 d.
37. Polyakova, V. N., Trondina, C. A.: Thin-layer chromatographic identification of chlorine containing pesticides, *Khim. Sel. Khoz.*, 10 (1972) 521, abstr. C. A. 79 (1973) 136123 q.
38. Salo, T., Salminen, K.: Thin-layer chromatography of pesticides, *Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.*, 129 (1966) 149, abstr. C. A. 64 (1966) 20546 e.
39. Keisuke, S., Koichi, M., Tsukasa, K.: Systemic identification and determination of pesticide. 1. Chromatography of pesticides on alumina column, *Noyaku-Kensako Hokako*, 10 (1970) 19, abstr. C. A. 74 (1971) 139895 s.
40. Babina, Y. K., Vershinin, P. V., Kucherova, A. I., Parfenov, A. I.: Determination of the total chlorophos and DDVP in industrial waste waters and natural water, *Probl. Anal. Khim.*, 2 (1972) 9, abstr. C. A. 79 (1973) 62442 k.
41. Sergeeva, D.: Thin-layer chromatographic demonstration of organophosphorus pesticide with pulverized and built developers, *Khranit. Prom.*, 20 (1971) 30, abstr. C. A. 77 (1972) 15352 e.
42. Ren-Tse, W., Shiou, S. C.: Simple and rapid reversed phase thin-layer chromatography of pesticides, *Hua Hsueh*, 4 (1969) 80, abstr. C. A. 74 (1971) 2953 q.
43. Kiseljak, B.: Magistarski rad, Zagreb, 1975.
44. Hamilton, D. J.: Partition chromatography of trichlorophon, *Queensland J. Agr. Sci.*, 23 (1966) 69, abstr. C. A. 66 (1967) 54550 k.
45. Ellis, J., Bates, J.: Determination of DDVP in DDVP-dipterex formulations by gas-chromatography, *J. Assoc. Offic. Agr. Chem.*, 48 (1965) 1115.
46. Salame, M.: The use of gas-chromatography with electron capture in the analysis of organophosphate pesticides, *Am. Biol. Clin.*, 26 (1968) 1011, abstr. C. A. 69 (1968) 105280 u.
47. Mizuno, K., Takanama, K., Takashi, K., Watanabe, C., Miyazaki, Y., Masuda, T., Noguchi, K., Miki, M.: Analysis of chlorinated and organic phosphorus pesticides by gas chromatography, *Nippon Hoigaku Zasshi*, 23 (1969) 477, abstr. C. A. 73 (1970) 65310 c.
48. Fujiwara, K.: *Sitzber. Naturforsch. Ges. Rostock*, 6 (1916) 33, cited in ref. No. 61.
49. Barthel, W. F., Giang, P. A., Hall, S. A.: Dialkyl α -hydroxyphosphonates derived from chloral, *J. Am. Chem. Soc.*, 76 (1954) 4186.
50. Giang, P. A., Barthel, W. F., Hall, S. A.: Colorimetric determination of 0,0-dialkyl-1-hydroxyalkyl-phosphonates derived from chloral, *J. Agr. Food Chem.*, 2 (1954) 1281, abstr. C. A. 49 (1955) 2950 e.
51. Gzhegotskii, M. I.: A colorimetric method for determining dipterex and atrazine in preparations and biological material, *Gig. Sanit.*, 32 (1967) 71, abstr. C. A. 67 (1967) 72749 g.
52. Mattson, A. M., Spillane, J. T., Pearce, G. V.: *J. Agr. Food Chem.*, 3 (1955) 319, cited in ref. No. 61.

53. *Barthel, W. F., Alexander, B. H., Giang, P. A., Hall, S. A.*: Insecticidal phosphates obtained by a new rearrangement reaction, *J. Am. Chem. Soc.*, **77** (1955) 2424, abstr. *C. A.* **50** (1956) 3208 d.
54. *Wollenberg, O.*: Colorimetric determination of the active substance of dipterex in Tugon fly bombs and fly trays, *Med. u. Chem.*, **5** (1956) 517, abstr. *C. A.* **55** (1961) 2988 d.
55. *Weber, K., Matković, J., Palla, Lj.*: Absorbimetric determination of organophosphorus insecticides, *Arh. hig. rada*, **19** (1968) 477.
56. *Gehauf, B., Epstein, J., Wilson, B. G., Witten, B., Suss, S., Bauer, E. V., Rueggeberg, W. H. C.*: *Anal. Chem.*, **29** (1957) 278, cited in ref. No. 20.
57. *Vershinin, P. V., Kucherova, V., Parfenov, A. I., Konovalova, A.*: Detection of a small concentrations of chlorophos and DDVP in water, *Gig. Sanit.*, **33** (1968) 72.
58. *Nikolaev, A. V., Trondina, G. A.*: Colorimetric determination of chlorofos in water, *Metody Anal. Pestits.*, (1970) 78, abstr. *C. A.* **76** (1972) 31138 z.
59. *Lohs, K., Doepel, W.*: Detection and determination of organophosphorus insecticides by the Shoemmann reaction, *Z. Chem.*, **7** (1967) 106, abstr. *C. A.* **66** (1967) 104259 v.
60. *Rusiecki, W., Brzezinski, J., Szutowski, M.*: Fluorimetric determination of phosphorus insecticides, *Acta Pol. Pharm.*, **28** (1971) 385, abstr. *C. A.* **76** (1972) 42551 e.
61. *Mustafa, A., Sidky, M. M., El-Darawy, Z. I., Kamel, H.*: Colorimetric determination of 0,0-dimethyl (1-hydroxy-2,2,2-trichloroethyl)phosphonate and its higher homologs, *J. Agr. Food Chem.*, **14** (1966) 503.
62. *Souders, B. C., Stark, B. P.*: *Tetrahedron*, **4** (1958) 197, cited in ref. No. 61.
63. *Hanes, C. S., Isherwood, F. A.*: Separation of the phosphoric esters on the filter paper chromatogram, *Nature*, **164** (1949) 1107.
64. *Sera, K., Matsunaga, A., Murakami, A., Sato, I., Yamashita, K., Yoshimori, K.*: Qualitative analyses of organic phosphorus color reaction and simple detection, *Kumamoto Med. J.*, **12** (1959) 193, abstr. *C. A.* **54** (1960) 11813 e.
65. *Klisenko, M. A., Novitskaya, L. P.*: Determination of organic phosphorus insecticides DDVP and chlorophos in the air, *Gig. Tr. Prof. Zabol.*, **11** (1967) 54.
66. *Babina, Y. K., Kucherova, A. I.*: Determination of chlorophos in technical products, *Probl. Anal. Khim.*, **2** (1972) 14, abstr. *C. A.* **79** (1973) 62443 m.
67. *Marenich, I. P.*: Photoelectric colorimetric method for the quantitative determination of chlorophos, *Farm. Zh. (Kiev)*, **23** (1968) 48, abstr. *C. A.* **70** (1969) 67066 q.
68. *Tantawy, G., Shafk, M. T., Isaac, I. G., El-Khishen, S. A.*: A colorimetric method for the determination of low concentrations of Dipterex, *Alexandria J. Agr. Res.*, **13** (1965) 53, abstr. *C. A.* **66** (1967) 85030 v.
69. *Lorenz, W., Henglein, A., Schrader, G.*: The new insecticide 0,0-dimethyl-2,2,2-trichloro-1-hydroxyethyl phosphonate, *J. Am. Chem. Soc.*, **77** (1955) 2554.
70. *Miyamoto, I. J.*: Non-enzymic conversion of dipterex into DDVP and their inhibitory action on enzymes, *Botyu-Kagaku*, **24** (1959) 130.
71. *Kovač, J.*: Polarographic determination of 0,0-dialkyl hydroxyethyl phosphonate derived from chloral, *Chem. Zvesti*, **10** (1956) 222, abstr. *C. A.* **50** (1956) 12757 a.
72. *Giang, P. A., Caswell, R. L.*: Polarographic determination of 0,0-dimethyl 2,2,2-trichloro-1-hydroxyethyl phosphonate (Bayer L13/59), *J. Agr. Food Chem.*, **5** (1957) 753.
73. *Krauthacker, B.*: Magistarski rad, Zagreb, 1974.
74. *Kosmatii, E. S., Shlyapak, S. I.*: Polarographic determination of chlorophos, *Khim. Prom. Nauk. Tekhn. Zb.*, **2** (1962) 67, abstr. *C. A.* **59** (1963) 6994 a.
75. *Nangniot, P.*: The determination of traces of phosphoric esters by oscilographic polarography, *Anal. Chim. Acta* **31** (1964) 166, abstr. *C. A.* **61** (1964) 12563 c.

76. Jonzyk, H. B.: Polarographic determination of dipterex, *Rozniki Panstwowego Zakladu Hig.*, 16 (1965) 117, abstr. C. A. 63 (1965) 7603 c.
77. Wang, T. Y., Wu, Y. C.: Polarographic analysis of dipterex, *Hua Hsueh Tung Pao*, (1966) 116, abstr. C. A. 65 (1966) 6470 d.
78. Palyi, G.: Polarographic determination of 0,0-dimethyl (1-hydroxyethyl)-phosphonic acid, *Mag. Kem. Lapja*, 21 (1966) 425, abstr. C. A. 65 (1966) 17689 a.
79. Rybakov, B. N., Ermishkin, V. P.: Kinetics of chlorophos decomposition in neutral and alkaline aqueous solutions, *Zh. Fiz. Khim.*, 40 (1966) 2753.
80. Lindner, R., Oehler, E.: Analysis of trichlorphon I., *Chem. Tech. (Berlin)*, 20 (1968) 43, abstr. C. A. 68 (1968) 94854 k.
81. Sato, R., Vejima, T.: Chemical studies on organophosphorus insecticides. III. Determination of 0,0-dimethyl 2,2,2-trichloro-1-hydroxyethyl phosphonate by the labile chlorine method, *Botyu- Kagaku*, 24 (1959) 36, abstr. C. A. 60 (1964) 2270 d.
82. Bennevit, R., Foth, G.: Chemical behaviour and analytical determination of trichlorphon, dichlorvos and tribufon, *Frasenius' Z. Anal. Chem.*, 229 (1967) 110, abstr. C. A. 67 (1967) 116103 y.

Summary

METHOD FOR THE DETERMINATION OF 0,0-DIMETHYL 2,2,2-TRICHLORO-1-HYDROXYETHYL PHOSPHONATE (DMTHF)

Methods for the separation and determination of the organophosphorus pesticide and drug 0,0-dimethyl 2,2,2-trichloro-1-hydroxyethyl phosphonate (DMTHF) in samples of different origin are reviewed. According to the purpose and mode of determination the methods are grouped into extraction, and qualitative and quantitative determination methods. The sensitivities, whenever cited in the original paper, are also given. The paper is accompanied with 82 literature references in English or German.

*Institute for Medical Research and
Occupational Health, Yugoslav Academy
of Sciences and Arts, Zagreb*

*Received for publication
September 11, 1974.*