

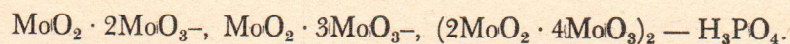
ODREĐIVANJE FOSFORA U MALIM KOLIČINAMA U ORGANOFOSFORNIM SPOJEVIMA

KATA VOLODER

*Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb
(Priljeno 24. XII 1964.)*

Opisana je jednostavna spektrofotometrijska metoda za određivanje malih količina-tragova fosfora u anorganskom materijalu i organofosfor-
nim spojevima diptereksu, izopestoksu i parationu. Metoda za određivanje
fosfora u spomenutom materijalu temelji se na razvijanju modre boje
fosfomolibdata, koja nastaje reakcijom između fosfata prisutnih u uzorku
i reagensa u kojemu ima molibdata. Metoda je brza, jednostavna i po-
uzdana. Osjetljivost metode iznosi oko 10 $\mu\text{g P}_2\text{O}_5$ u 50 ml otopine, a u
području do 100 $\mu\text{g P}_2\text{O}_5$ u 50 ml otopine vlada proporcionalnost između
koncentracije fosfata i intenziteta obojenja. Ispitane su i fizikalno-kemij-
ske karakteristike modro obojenog fosfomolibdata.

Stvaranje modro obojenog fosfomolibdata temelj je za većinu važni-
jih metoda za kolorimetrijsko (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 19) i fotometrijsko
(4, 5, 7, 10, 12, 13, 15) određivanje malih količina fosfora. Fosforna
kiselina stvara s fosfomolibdenovom kiselinom kompleksnu fosfomolib-
denovu kiselinu $\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot (\text{MoO}_3)_{12} \cdot x\text{H}_2\text{O}$, koja je prema reducensima
mnogo osjetljivija nego molibdenova kiselina. Ako se na smjesu fosfo-
molibdenove i suvišne molibdenove kiseline djeluje s povoljno odabra-
nim redukcionim sredstvom, onda se može postići da redukcija zahvaća
samo fosfomolibdenovu kiselinu i daje modro obojeni fosfomolibdat.
Cilj je redukcije da se postigne stabilna intenzivna modra boja čiji je
intenzitet proporcionalan količini fosfata u otopini. Intenzitet obojenja
ovisan je i o koncentraciji vodikovih iona u ispitivanoj otopini, zatim
o vrsti upotrijebljenog redukcionog sredstva, o temperaturi pri kojoj se
izvodi redukcija i o prisustvu drugih iona. Prema podacima iz literature
(4, 9, 12), modro obojeni fosfomolibdat je negativno nabijeni koloid čiji
se stehiometrijski sastav navodi kao:



Kao redukciona sredstva najviše se upotrebljavaju:

1. stanoklorid po Denigesu (12, 14). Redukcija se provodi brzo i daje intenzivno modru boju, ali se mora paziti na kvalitet reagensa i svaki dan kontrolirati njegov titar;

2. 1,2,4-aminonaftol sulfonska kiselina (7, 9, 13) daje brzu redukciju na sobnoj temperaturi i intenzivno modru boju. Odlikuje se stabilnošću;

3. 1,2,6-aminonaftol sulfonska kiselina po Fiskeu i Subbarowu (11), izomer reducensa pod (2). Obje su teže pristupačne;

4. hidrokinton po Belly i Doisyju (4, 15) koji djeluje sporije od stanoklorida i aminonaftol sulfonske kiseline.

Ne daje tako intenzivnu modru boju kao reducensi 1, 2 i 3, ali se odlikuje stabilnošću;

5. N-fenil-*p*-fenilendiamin (4, 15);

6. amidol (2 : 4-diaminofenol hidroklorid) (2, 14, 18, 22);

7. askorbinska kiselina (16, 19).

Kako bi se smanjio utjecaj drugih iona prisutnih u ispitivanoj otopini, redukcija se provodi u sumporno kiselom mediju, jer sulfatni ioni pokazuju najmanji utjecaj na modru boju.

Do sada je publiciran velik broj varijanata analitičkih metoda primijenjenih na anorganski i organski materijal. Glavna razlika između njih sastoji se i u redukcionom sredstvu, i u načinu redukcije. Sve analitičke metode pomoću kojih se određuje fosfor mogu se svrstati u dvije glavne kategorije:

1. one pri kojima se suvišak molibdata i redukcionog sredstva dodaju zasebno, i

2. metode pri kojima se upotrebljava samo jedan reagens.

Jedna od svrha ovih ispitivanja bila je da između postojećih metoda za određivanje malih količina – tragova fosfora odaberem takvu koja će biti brza, tačna i reproducibilna, a istovremeno dovoljno jednostavna da se može primijeniti u svakom osrednje opremljenom laboratoriju. U tu je svrhu bio odabran *Lucena-Pratov* reagens (17). Ako se primjenjuje taj reagens, nije potrebno nikakvo zasebno redukciono sredstvo, a priprava reagensa je vrlo jednostavna i njime se može bez teškoća rukovati.

EKSPERIMENTALNI DIO

Reagencije

1. *Standardna otopina fosfata* (1 mg P_2O_5 /ml)

Odvagne se 1,917 g kalijeva primarnog fosfata (KH_2PO_4) p. a. (»Merck«) i otopi u 1000 ml red. vode. Od te ishodne otopine razrjeđivanjem se pripremaju otopine manjih koncentracija.

2. *Amonijev molibdat kristalizirani* $(NH_4)_6Mo_7O_{24} + 4H_2O$ p. a. (»Merck«)

3. *Sumporna kiselina* p. a. (»Merck«), sp. t. = 1.83, (95–97%)

4. *Solna kiselina* p. a., sp. t. = 1.186 (37%), (»Merck«)

5. *Živa (metalna)* p. a.

6. *Lucena-Pratov reagens*. Taj reagens sadržava Mo (VI) i Mo (V), a odnos Mo (VI) prema Mo (V) je 3 : 2. Otopina Mo (V) dobije se redukcijom (Mo VI) u solnokiselom mediju s metalnom živom. Priprema reagensa:

a) ishodna otopina: odvagane se 12.225 g amonijeva molibdata kristaliziranog $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} + 4 \text{H}_2\text{O}$ i otopi u 90 ml redestilirane vode.

b) otopina Mo (V): uzme se 50 ml ishodne otopine (a), stavi u odmjernu tikvicu (100 ml) s ubrušenim čepom, doda 25 ml 12 N solne kiseline i nadopuni do oznake sa vodom. Sva se količina prenese u lijevak za odjeljivanje (250 ml), doda oko 20 ml žive (metalne) i čvrsto mućka 5 minuta. Nakon odjeljivanja slojeva dobivena se otopina, koja je intenzivno crveno-smeđe boje, profiltrira.

c) konačna otopina: uzme se 30 ml ishodne otopine (a), stavi u menzuru (250 ml) i k tome se doda: 50 ml 12 N HCl i 56 ml 36 N H_2SO_4 . U tu se mješavinu doda 40 ml otopine (b) u vrlo malim obrocima uz stalno miješanje i hlađenje, a zatim se sadržaj razrijedi do ukupno 200 ml s red. vodom.

Otopina je smaragdno zelene boje. Spremi se u tamnu bocu i čuva na tamnom i hladnom mjestu. Tako pripremljeni reagens je stabilan 6 mjeseci, pa i više. Pomoću tog reagensa anorganski se fosfor iz ispitivane otopine veže s molibdenovom kiselinom u žuto obojeni fosfomolibdat, koji se kuhanjem reducira i nastaje modro obojeni fosfomolibdat koji ima maksimum optičke apsorpcije kod valne dužine od 830 $\text{m}\mu$. U tom spoju molibden se nalazi u niževalentnom stanju i njegova struktura nije zasad još potpuno poznata (6, 14, 20).

Aparatura

Mjerenje ekstinkcije: Beckmanov spektralni fotometar model DU. Mjerenja su izvršena kod valne dužine od 830 $\text{m}\mu$ uz širinu pukotine od 0,03 mm; »crvena« fotostanica »Corex« kivete, čija je duljina optičkog puta iznosila 1,002 cm.

Stakleno posuđe. Upotrijebljeno stakleno posuđe bilo je iz kvalitetnog stakla (Jena, Pyrex), oprano lužinom i razrijeđenom dušičnom kiselinom te isprano redestiliranom vodom.

Vodena kupelj. Konstantna temperatura za vrijeme izvođenja reakcije bila je održavana u vodenoj kupelji s kontaktnim termometrom.

Postupak

Otopina koja sadržava fosfor u obliku fosfata stavi se u odmjernu tikvicu (50 ml) s ubrušenim čepom, razrijedi redestiliranom vodom na volumen od otprilike 30 ml, doda 1.5 ml specifičnog reagensa. Nastali

žuto obojeni fosfomolibdat lagano se promućka, stavi u vodenu kupelj na temperaturu 98° C, gdje se grije 15 min. Slijepa proba sadržava redestiliranu H₂O + 1.5 ml reagensa.

Nakon kuhanja tikvice se naglo ohlade, dopune do oznake sa H₂O redest. i spektrofotometrijski se izmjeri ekstinkcija prema slijepoj probi, koja nakon kuhanja treba da zadrži svoju žutu boju – a to je ujedno dokaz čistoće reagensija, tj. odsutnosti fosfora. Modra boja stabilna je više od 2 sata na sobnoj temperaturi i na normalnom danjem svjetlu. Dobivenu spektralnu krivulju apsorpcije fosfomolibdata modre boje prikazuje slika 1.

REZULTATI I DISKUSIJA

Utjecaj temperature i baždarni pravac

Kod primjene metode provjeren je utjecaj raznih temperatura na intenzitet obojenja. Dobivene rezultate prikazuje slika 2.

Izrađen je baždarni pravac za otopine koje su sadržavale različite koncentracije fosfora (kao P₂O₅). Temperatura vodene kupelji iznosila je 98 °C. Dobiveni rezultati prikazani su na slici 3.

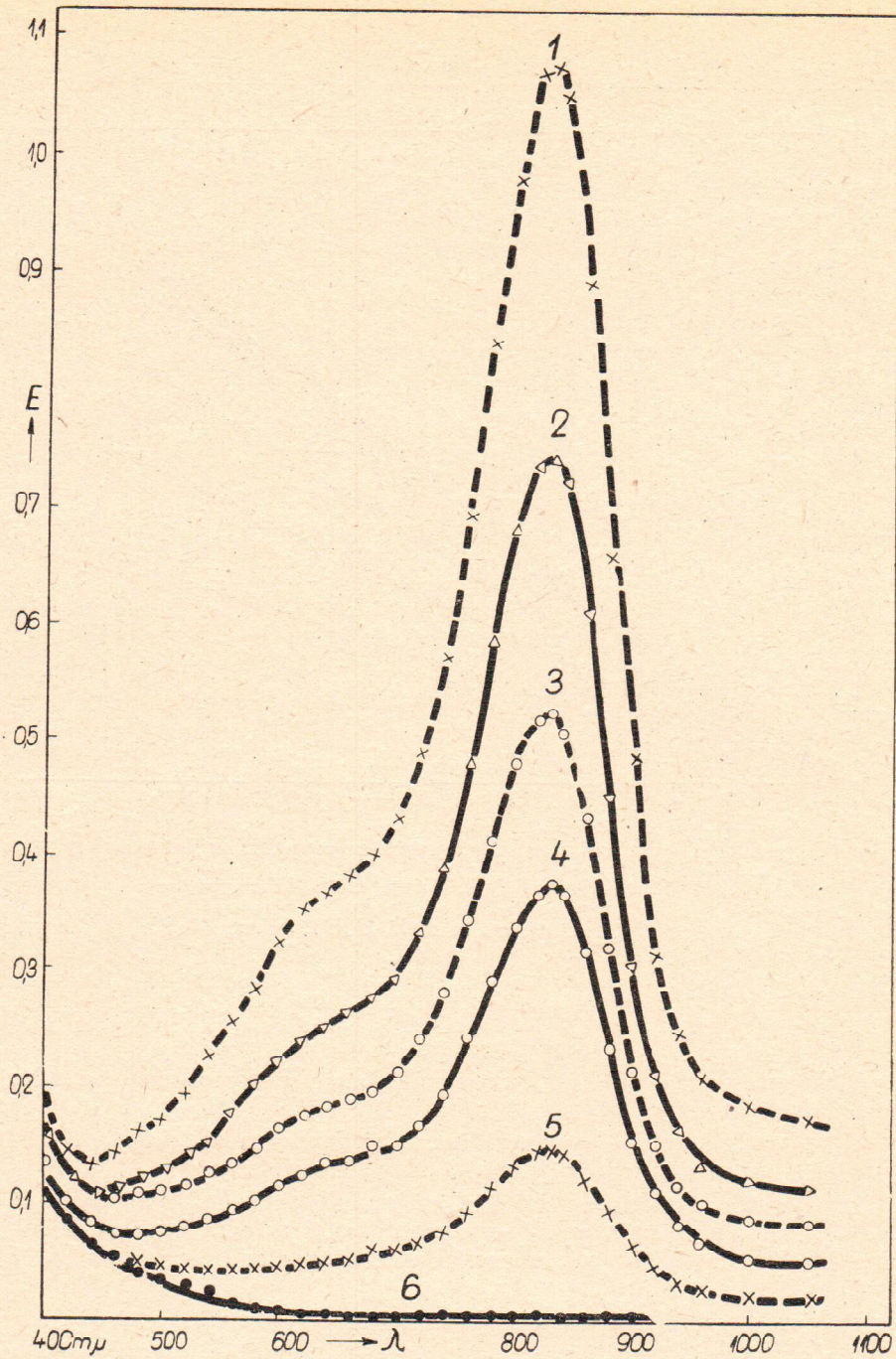
Tačke na pravcu predstavljaju srednju vrijednost od 3 nezavisna očitavanja. Izračunata je jednadžba najboljeg pravca kroz eksperimentalne tačke uz uvjet da pravac treba da prolazi kroz ishodište. Direktno izračunavanje koncentracije P₂O₅ izlazi iz jednadžbe $C = E \cdot 100 \cdot 1.3$.

Utjecaj raznih soli na modru boju fosfomolibdata

Radi boljeg poznavanja opisanog procesa ispitane su fizikalno-kemijske karakteristike modro obojenog fosfomolibdata. Eksperimentalni uvjeti u kojima su izvršeni ispitivani sistemi bili su ovi:

a) koncentracioni gradijent ispitivanih soli bio je prema skali:

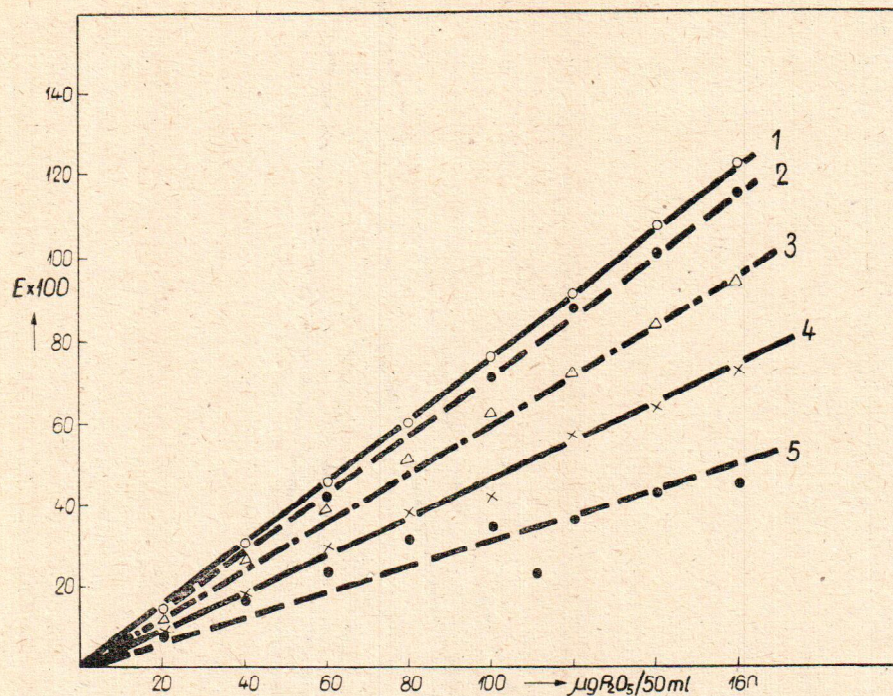
1.	1.0 · 10 ⁻² N
2.	2.5
3.	4.0
4.	6.0
5.	1.0 · 10 ⁻¹ N
6.	1.5
7.	2.5
8.	4.0
9.	6.0
10.	1.0 N



Slika 1. - Spektar apsorpcije modro obojenog fosfomolibdata

Krivulja 1. - 3.0 μg $\text{P}_2\text{O}_5/\text{ml}$
 2. - 2.0 μg "
 3. - 1.4 μg "

Krivulja 4. - 1.0 μg $\text{P}_2\text{O}_5/\text{ml}$
 5. - 0.4 μg "
 6. - slijepa proba



Slika 2. - Utjecaj raznih temperatura na intenzitet obojenja
Različite koncentracije P₂O₅ održavane kod ovih temperatura:

Pravac 1 temperatura od 95° C kroz 15 minuta

"	2	"	"	85° C	"	15	"
"	3	"	"	75° C	"	15	"
"	4	"	"	65° C	"	15	"
"	5	"	"	55° C	"	15	"

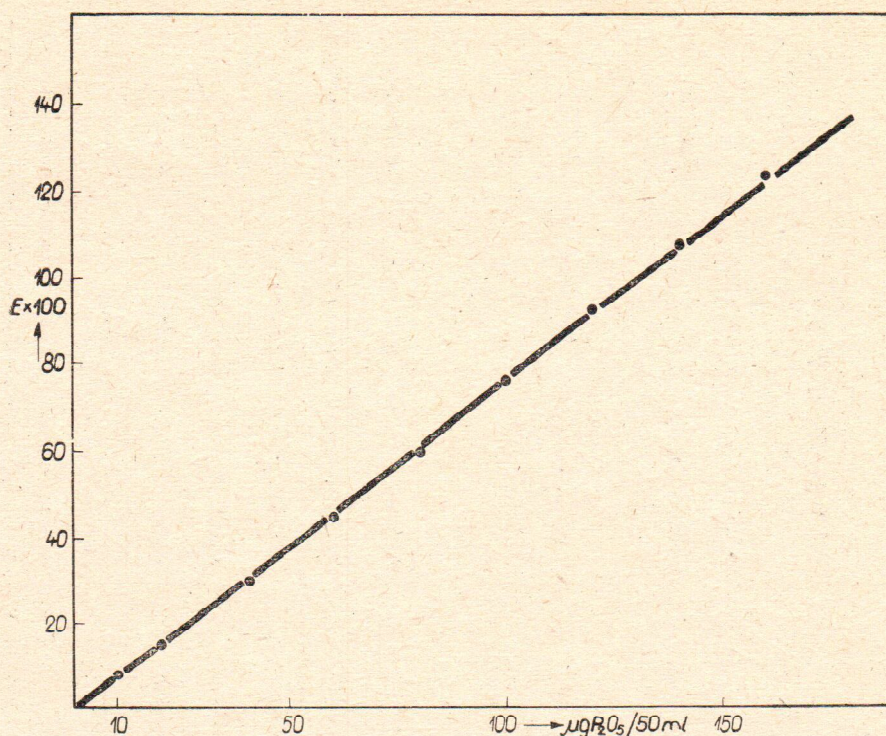
b) koncentracija fosfata u modro obojenom fosfomolibdatu u svim uzorcima bila je konstantna i iznosila je 3.2 µg P₂O₅/ml

c) volumen otopine fosfomolibdata i ispitivanog neutralnog elektrolita za svaki uzorak iznosio je po 10 ml prije miješanja.

Mjerenja su vršena na Pulfrichovu nefelometru u kombinaciji sa Zeissovim fotometrom pomoću crvenog filtra, i to odmah nakon miješanja obiju otopina, te u vremenskim intervalima od 15 min., 3, 6 i 24 sata nakon miješanja (21).

Dobivene rezultate pokazuju tablice 1 i 2.

Specifični utjecaj na modro obojeni fosfomolibdat pokazali su ioni barija, olova i stroncija stvarajući talog, analognu reakciju dali su Fe³⁺-ioni, dok su ioni kalcija pokazali isto svojstvo tek 3 sata nakon



Slika 3. - Zavisnost ekstinkcije od koncentracije fosfora (kao P_2O_5) u 50 ml otopine

miješanja. Razlog takvom ponašanju je, vjerojatno, netopljivost odgovarajućih fosfata, jer su barijev i stroncijev fosfat vrlo slabo topljivi, a topljivost olovnog fosfata iznosi 0.000014 g/100 ml, dok topljivost $Ca_3(PO_4)_2$ iznosi 0.002 g/100 ml. Kalijev i kadmijev sulfat te aluminijev i cinkov klorid nisu pokazali nikakav utjecaj.

Od ispitivanih aniona pokazuje nitrat-ion u svim formama, i to u raznim solima i osobito kao dušična kiselina, reoksidaciono svojstvo i djeluje na modru boju fosfomolibdata vjerojatno zbog prisutnih nitrita i drugih dušičnih oksida.

Sulfati i kloridi ne mijenjaju intenzitet modre boje.

Ni kod jednog ispitivanog sistema nije se pojavilo zamućenje ili flokulacija molibdata, a to dokazuje da se ne može primijeniti Schulze-Hardyjev zakon (21). Ovi eksperimenti također pokazuju da modro obojeni fosfomolibdat nije negativno nabijeni koloid, kako to navode neki autori (4, 9, 12), već pokazuje svojstva i ponašanje kemijskog kompleksa na čiju stabilnost i intenzitet boje jako utječu nitratni ioni.

Tablica 1

ION	Dodan kao	Boja kompleksa pri dodatku	Boja kompleksa nakon miješanja			
			15 min	3 sata	6 sati	24 sata
K ⁺	KNO ₃	nepromijenjena	nepromijenjena	oslabljena	svjetložuta	oslabljena neznatno
K ⁺	K ₂ SO ₄	nepromijenjena	nepromijenjena	nepromijenjena	nepromijenjena	nepromijenjena
Ba ⁺⁺	Ba(OH) ₂	oslabljena jako talog bijel	—	—	—	—
Ca ⁺⁺	Ca(NO ₃) ₂	nepromijenjena	oslabljena	žuta, talog bijel	izgubljena potpuno, talog	—
Sr ⁺⁺	SrCl ₂	oslabljena, talog bijel	oslabljena, talog bijel	—	—	—
Pb ⁺⁺	Pb(CH ₃ COO) ₂	oslabljena, talog bijel	—	—	—	—
Cd ⁺⁺	Cd(NO ₃) ₂	nepromijenjena	oslabljena	žuto-zelena	žuto-zelena	žuto-zelena
Cd ⁺⁺	Co(NO ₃) ₂	nepromijenjena	nepromijenjena	nepromijenjena	nepromijenjena	nepromijenjena
Co ⁺⁺	CdSO ₄	nepromijenjena	oslabljena	oslabljena jače	žuto-zelena	žuto-zelena
Mg ⁺⁺	Mg(NO ₃) ₂	nepromijenjena	oslabljena	zelena	zelena	zelena
Ni ⁺⁺	Ni(NO ₃) ₂	nepromijenjena	oslabljena	zelena	zelena	zelena
UO ⁺⁺	UO ₂ (NO ₃) ₂	nepromijenjena	oslabljena	žuto-zelena	zelena	zelena
Zn ⁺⁺	ZnCl ₂	nepromijenjena	nepromijenjena	nepromijenjena	nepromijenjena	nepromijenjena

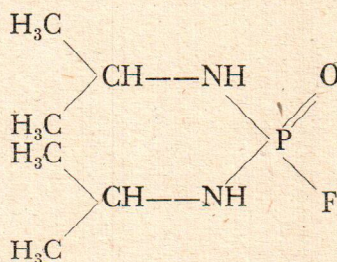
Tablica 2

Ion	Dodan kao	Boja kompleksa pri dodatku	Boja kompleksa nakon miješanja			
			15 min	3 sata	6 sati	24 sata
Fe^{3+}	FeCl_3	ispadanje taloga, crveno-smeđeg	obezbojena otopina iznad taloga	—	—	—
La^{3+}	$\text{La}(\text{NO}_3)_3$	nepromijenjena	oslabljena	oslabljena jače	žuto-zelena	zelena
Al^{3+}	AlCl_3	nepromijenjena	nepromijenjena	nepromijenjena	nepromijenjena	nepromijenjena
Th^{4+}	$\text{Th}(\text{NO}_3)_4$	oslabljena	oslabljena	oslabljena	žuto-zelena	žuto-zelena
Zr^{4+}	$\text{Zr}(\text{NO}_3)_4$	oslabljena	oslabljena	oslabljena	oslabljena jače	zelena

Određivanje fosfora u nekim organofosforim spojevima

Opisana metoda bila je primijenjena na određivanje fosfora u izopestoksu, diptereksu i parationu.

a) određivanje u *izopestoksu* (bis-(monoisopropilamino)-fluorofosfin oksidu)



Pri određivanju fosfora u izopestoksu primijenjen je isti analitički postupak kao i pri određivanju fosfora u anorganskom materijalu. Na temelju eksperimenata utvrđeno je da se fosfor u njemu može odrediti na tri načina:

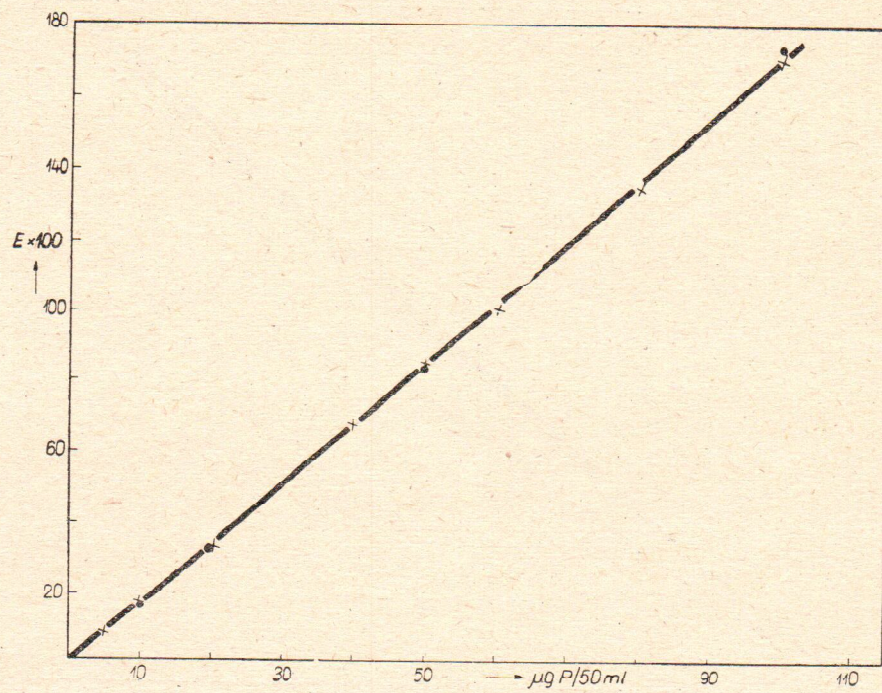
1. direktno – bez razaranja supstancije. U standardnu otopinu poznate koncentracije stavi se, naime, 1.5 ml reagensa i izvrši opisani postupak.

2. Nakon hidrolize sa 1 N NaOH. U tikvicu od 50 ml otpipetira se standardna otopina poznate koncentracije, doda 3 ml N NaOH i na vodenoj kupelji kod 60 °C drži 2 sata. Zatim se tikvica ohladi na sobnu temperaturu, njezin sadržaj se neutralizira sa 10 N H₂SO₄ do pH = 6. Kad se to postiglo, doda se 1.5 ml reagensa i nastavi opisani postupak.

Ispitan je učinak raznih temperatura i raznih koncentracija NaOH, kao i potrebna količina, radi dobivanja što boljih rezultata. Baždarni pravac izrađen za oba načina prikazuje slika 4.

3. Mineralizacijom – sa 10 N H₂SO₄, bromnom vodom i H₂O₂. U Kjeldahlovu tikvicu (100 ml) se stavi standardna otopina poznate koncentracije, doda 1.5 ml 10 N H₂SO₄ i otprilike 2 ml bromne vode. Tikvica se zagrijava na laganom plamenu ili u pješčanoj kupelji u digestoru uz neprestano miješanje. U toku procesa doda se u obrocima još 5 ml bromne vode. Sadržaj tikvice se zagrijava tako dugo dok se u kruškastom dijelu tikvice ne pojave bijele pare; zatim se tikvica ohladi, doda samo jedna kap H₂O₂ i ponovo zagrijava najviše 2 minute. Dobiiveni sadržaj tikvice treba da je bezbojan i bistar. On se prenese u odmjernu tikvicu, neutralizira sa 1 N NaOH do pH = 6 i nastavi već opisani postupak.

Ispitana je hlapljivost fosfora P³². Utvrđeno je da nema nikakvih gubitaka. Dobivene baždarne pravce prikazuje slika 5.

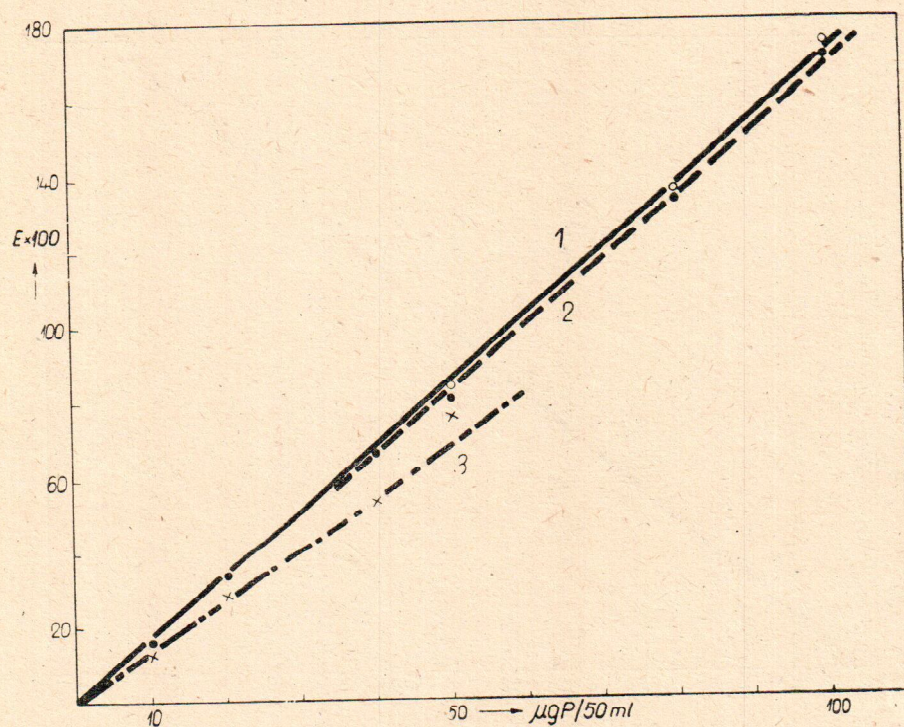


Slika 4. - Zavisnost ekstinkcije od koncentracije fosfora u izopestoksu
Unesene tačke označuju srednju vrijednost ekstinkcije od tri uzastopna određivanja

X direktno - bez mineralizacije

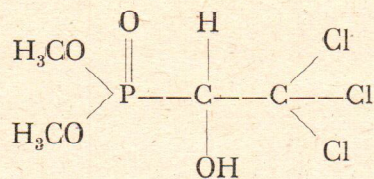
● hidroliza izopestoksa sa 1 N NaOH

Jednadžba baždarnog pravca: $C = E \cdot 100 \cdot 0.59$

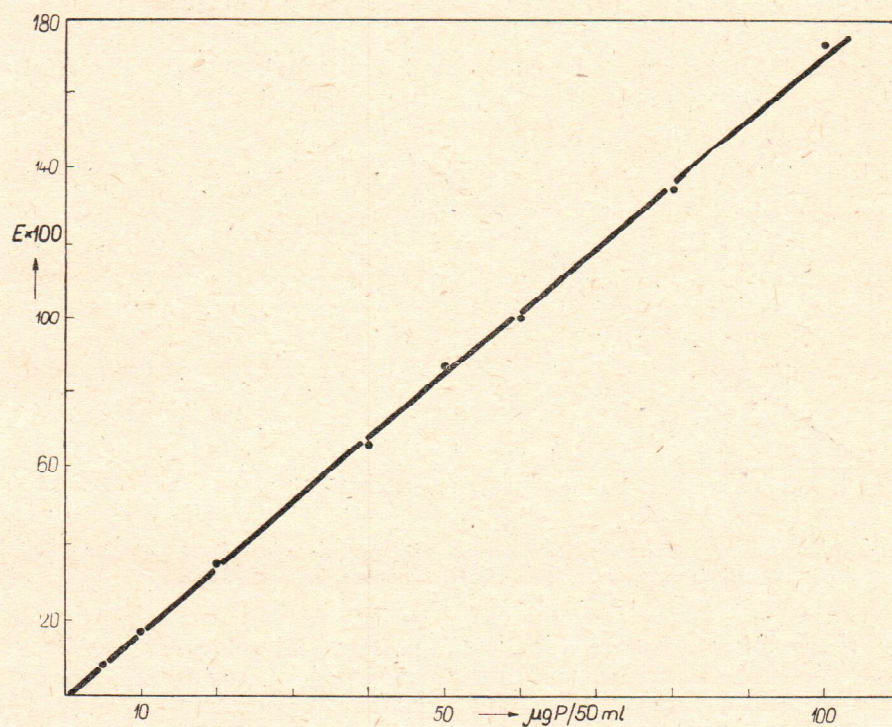


Slika 5. - Zavisnost ekstinkcije od koncentracije fosfora u izopestoksu primjenom raznih postupaka mineralizacije

1. - nakon hidrolize sa 1 N NaOH
2. - nakon procesa mineralizacije sa 10 N H₂SO₄
3. - nakon procesa mineralizacije sa 10 N H₂SO₄, bromnom vodom i HNO₃ (umjesto H₂O₂)

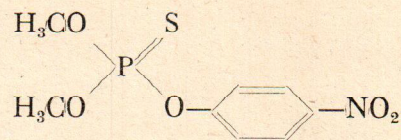
Određivanje u *diptereksu* (0,0-dimetil-2,2,2-triklor-1,oksietilfosfonatu)

Određivanje fosfora u diptereksu može se provesti samo uz uvjet da se prethodno izvrši mineralizacija primjenom istog postupka i istih supstancija kao i kod izopestoksa. Baždarni pravac na slici 6 prikazuje dobivene rezultate.

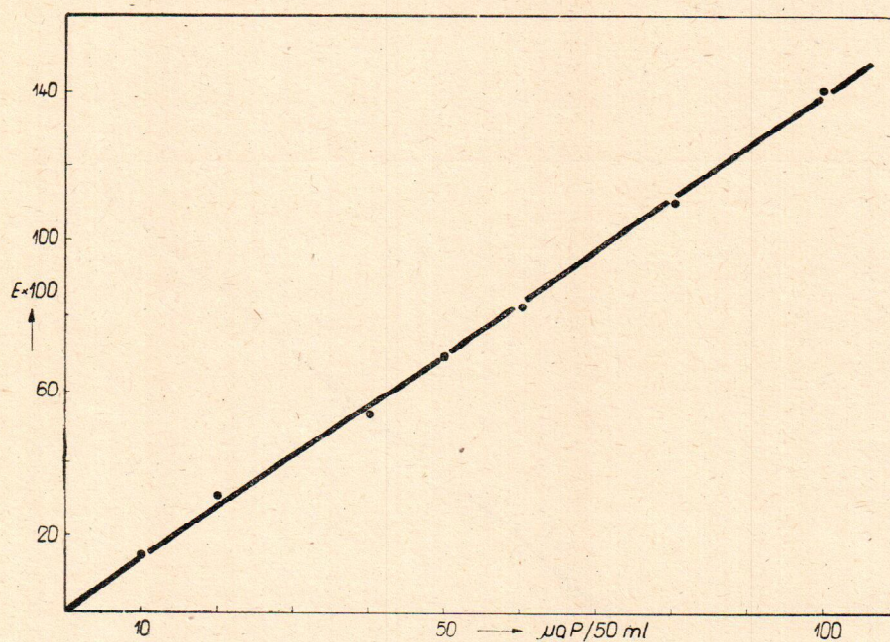


Slika 6. - Zavisnost ekstinkcije od koncentracije fosfora u diptereksu nakon mineralizacije sa 10 N H_2SO_4 , bromnom vodom i H_2O_2

Određivanju u *parationu* (0,0-dietil-0-*p*-nitrofenil tiofosfonatu, E 605



U *parationu* se može odrediti fosfor nakon procesa mineralizacije po istom postupku i s istim supstancijama kao i u spomenuta dva spoja. Baždarni pravac za taj postupak prikazan je na slici 7.



Slika 7. – Zavisnost ekstinkcije od koncentracije fosfora u *parationu* nakon procesa mineralizacije sa 10 N H_2SO_4 bromnom vodom i H_2O_2

Pri određivanju fosfora u tom spoju postoje neki gubici (17%). Volumen koji treba ispariti nakon mineralizacije od velikog je utjecaja na gubitke fosfora. Gubici rastu proporcionalno s volumenom.

Opisana metoda je najprikladnija za određivanje fosfora u navedena tri organofosforna spoja u području od 5–100 $\mu\text{g P}$ u 50 ml.

LITERATURA

1. Boltz, D. E.: Colorimetric Determination of Nonmetals, Interscience. New York, 1958.
2. Allen, R. J. L.: J. Biochem., 34 (1940) 858.
3. Benedict-Theis: J. Biol. Chem., 61 (1924) 63.
4. Fišer-Herman, M.: Kliničko-biokemijske pretrage, Zagreb, 1956.
5. Kemula, W. and Rosolowski, S.: Chem. analit., 5 (1960) 410 (Warszawa).
6. Kemija u industriji, 9 (1960) 235.
7. King, E. J.: Microanalysis in Medical Biochemistry, London 1951.
8. Kennert, G. and Heath, D. F.: Anal. Chem., 25 (1953) 1849.
9. Lange, B.: Kolorimetrische Analyse, Weinheim (Bergst, 1956).
10. Burton, I. D. and Riley, I. P.: The Analyst, 80 (1955) 391.
11. Fiske, C. H., Subbarow, Y.: J. Biol. Chem., 66 (1925) 375.
12. Hepler, O. E.: Manual of Clinical Laboratory Methods, 1950.
13. King, E. I.: J. Biochem., 26 (1932) 292.
14. Tillmanus-Ohnesoye: Praktikum der klinischen Untersuchungsmethoden, 1944.
15. Štark, O.: Kliničko laboratorijske analize, Medic. knjiga, Zagreb-Beograd, 1958.
16. Harvey, H. W.: The Analyst, 78 (1953) 110.
17. Lucena-Conde, F. and Prat, L.: Anal. Chim. Acta, 16 (1957) 473.
18. Urbach, C. - Raabe, S.: Biochem. Z., 268 (1934) 457.
19. Wilkinson, N. T. - Fogg, D. N.: The Analyst, 83 (1958) 406.
20. Rhodes, D. N.: Nature, 176 (1955) 215.
21. Težak, B., Matijević, E., Schulz, K.: J. Phys. and Colloid Chem., 55 (1951) 1557.
22. Capitan, F. - Ruiz, R. G.: Anales edafol. fisiol. vegetal, 15 (1956) 57. (Madrid).

Summary

DETERMINATION OF SMALL AMOUNTS OF PHOSPHORUS
IN ORGANOPHOSPHOROUS COMPOUNDS

Simple spectrophotometric method for determination of small quantities (traces) of phosphorus in inorganic material and organophosphorus compounds Dipterex, Isopestox and Parathion is described.

The method is based on the development of blue colour of phosphomolibdate resulting from the reaction between the phosphates present in the sample and the reagent containing the molybdate. The method is rapid, simple and reliable. The sensitivity of the method is about $10 \mu\text{g P}_2\text{O}_5$ in 50 ml of the solution. In the interval up to $100 \mu\text{g P}_2\text{O}_5$ in 50 ml of the solution the intensity of colour is proportional to the concentration of the phosphate. Physico-chemical characteristics of the blue coloured phosphomolibdate have been investigated.

*Institute for Medical Research
(incorporating the Institute of
Industrial Hygiene) Zagreb*

*Received for publication
December 24, 1964*