

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO  
FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA  
DIPARTIMENTO DI PATOLOGIA ANIMALE  
CATTEDRA DI TOSSICOLOGIA VETERINARIA

DETERMINAZIONE MEDIANTE HPLC  
DEI RESIDUI DI ETILENTIOUREA (IMIDAZOLIDIN-2-TIONE)

HPLC DETERMINATION  
OF ETHYLENETHIOUREA (IMIDAZOLIDINE-2-THIONE)  
IN ANIMAL TISSUES

FERRERO E. (\*) - NEBBIA C. (\*) - DACASTO M. (\*)  
TOPI B. (\*\*) - GENNARO SOFFIETTI M. (\*)



Estratto da:  
*Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Torino*  
Vol. XXXIII - 1988-1989-1990

(\*) Dipartimento di Patologia Animale.  
(\*\*) Borsista Ministero Affari Esteri presso la Cattedra di Tossicologia Veterinaria.

---

TIPOGRAFIA EMILIO BONO - VIA SAN PAOLO 12 - TORINO



RIASSUNTO. — Gli autori hanno elaborato un metodo per la determinazione dell'etilentiourea (ETU) in tessuti animali mediante HPLC in fase inversa. Il limite di rilevabilità è pari a 0,05 µg/ml, il recupero è del 75% circa e la curva standard è lineare nell'intervallo compreso tra le concentrazioni di 0,1 e 100 µg/ml.

PAROLE CHIAVE. — Etilentiourea, HPLC, Determinazione, Residui.

SUMMARY. — The ethylenethiourea (ETU) residues in animal tissues have been determined by a reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC) method. The recovery is 75% and the detection limit is 0,05 µg/ml.

KEY WORDS. — Ethylenethiourea, HPLC, Determination, Residues.

### *Introduzione.*

L'etilentiourea (ETU) o imidazolidin-2-tione è un derivato ciclico con un anello imidazolidinico e si ottiene dalla condensazione dell'etilendiamina con disolfuro di carbonio in soluzione idroalcolica (20).

Foma cristalli aghiformi bianchi, alquanto solubili in acqua e poco solubili nei solventi organici. È un composto che

si origina dalla demolizione degli etilenbisditiocarbamati (EBDC) (14).

La formazione dell'ETU si verifica già durante la loro preparazione industriale ed il loro immagazzinamento (4, 9, 13, 27, 28, 43). Inoltre essa può risultare come prodotto del metabolismo degli EBDC sia nei vegetali (7, 30, 35, 37) che negli animali (8, 38, 41, 44). Si forma anche durante la cottura di alimenti contenenti residui di tali composti (3, 37).

Gli EBDC sono fra i fungicidi più usati in agricoltura e quindi questo loro prodotto di demolizione può facilmente essere un inquinante ambientale.

È stato inoltre dimostrato che l'ETU è in grado di esercitare attività teratogena (1, 2, 11, 12, 21, 22), mutagena (39, 40) e cancerogena (19, 42). Inoltre possedendo il gruppo carbamilico S-C-N presenta attività antitiroidea (15, 16, 32, 42).

Numerosi sono i metodi descritti in letteratura per la ricerca e la determinazione di questa molecola (5).

Inizialmente furono messi a punto metodi di cromatografia su strato sottile (TLC) (3, 14, 34). In seguito sono stati anche applicati diversi metodi gas cromatografici (8, 10, 17, 18, 23, 31, 34, 35, 37). MARSHALL (29) e OHNLEY (33) hanno introdotto l'uso dell'high performance liquid chromatography (HPLC) nella determinazione dell'ETU rispettivamente come impurezza del Nabam e come residuo nei vegetali. Ultimamente è stato preconizzato un metodo di analisi con HPLC in cui la determinazione viene eseguita con detector elettrochimico (25).

Queste metodiche, anche valide per la determinazione di residui di ETU in fluidi biologici (24, 26, 36) non sono però risultate adatte per la ricerca dell'ETU presente in organi e tessuti animali.

Ci è parso quindi necessario modificare i metodi già descritti al fine di poter determinare la presenza di questo composto in animali che possono averlo assunto direttamente o averlo metabolizzato dagli EBDC.

*Apparecchiature.*

Cromatografo liquido Spectra Physics 8100;

Rivelatore Spectra Physics 8440, U.V. detector a lunghezza d'onda variabile;

Integratore Spectra Physics 4290;

Siringa Glenco mod. 19225 da 1 ml;

Colonna Chromsep (Chrompack) in vetro, riempita con LiChrosorb RP 8, 7  $\mu$ , 200 x 3 mm, con precolonna in acciaio inox (stesse caratteristiche), 50 x 3 mm;

Omogeneizzatore Ultra Turrax Modello TP.

*Reagenti.*

Acqua deionizzata e purificata col sistema Milli-Q della Millipore;

Etere etilico 99,8% per analisi Carlo Erba;

Etanolo 95% per spettroscopia Merck;

Metanolo 99,7% per cromatografia Merck;

Etile acetato per analisi 99,5% Merck;

Cloruro di ammonio per analisi 99,8% Merck;

Soluzioni standard di imidazolidin-2-tione per sintesi 98% Merck, purificata e cristallizzata in etanolo.

Ossido di alluminio 90 per analisi cromatografica Merck;

Quarzo a granulazione fina, lavato e arroventato, per analisi Merck.

*Metodo.*

Venticinque grammi di organo vengono omogeneizzati in Ultra Turrax a 24.000 giri/min.

L'omogeneizzato viene addizionato di 50 ml di etere etilico e scaldato a ricadere su bagno maria a 40°C per 30 minuti. Il tutto viene trasferito in un imbuto separatore per l'eliminazione della fase eterrea.

Il residuo viene ripreso per 2 volte con 50 ml di una soluzione acqua metanolo 9 : 1. Si filtra ed il filtrato viene tirato a secco in evaporatore rotante a 60°C a 100 giri/min sotto vuoto. Se durante il riscaldamento si ha intorbidamento si filtra su carta fino ad ottenere una soluzione limpida.

Il residuo secco viene quindi ripreso con 25 ml di etanolo e scaldato a ricadere su bagno maria a 60°C per 30 minuti. Si riporta nuovamente a secco nelle stesse condizioni precedente-

mente descritte ed il residuo viene ripreso con 20 ml di una soluzione acquosa di ammonio cloruro all'1%.

La soluzione ottenuta viene concentrata fino a 10 ml in evaporatore rotante e sottoposta a clean-up su colonna in vetro im-paccata a secco per un'altezza di 10 cm con ossido di alluminio e di 2,5 cm con quarzo a granulazione fina (6).

L'ETU viene raccolta mediante eluizione con 50 ml di soluzione acquosa di ammonio cloruro all'1%. L'eluato viene saturato con ammonio cloruro cristallino ed estratto tre volte con 50 ml di acetato di etile.

Infine la soluzione di acetato di etile viene tirata a secco in evaporatore rotante ed il residuo viene ripreso con 10 ml di fase mobile.

L'iniezione viene effettuata secondo i seguenti parametri operativi:

- fase mobile acqua/metanolo 90/10 v/v;
- loop 10  $\mu$ l;
- flusso 0.15 ml/min;
- pressione 26 bar;
- temperatura ambiente;
- lunghezza d'onda 240 nm;
- sensibilità 0.64 UAFS;
- velocità della carta 0.1 cm/min;
- metodo dello standard esterno.

#### Risultati e discussione.

Secondo le condizioni operative riportate più sopra, il tempo di ritenzione dell'ETU è di 10,5 minuti.

Il limite di rilevabilità e la linearità della risposta del rivelatore nelle condizioni descritte sono state saggiate con soluzioni salari di ETU in fase a titolo noto (Fig. 1).

La quantità minima di ETU rilevabile, con un rapporto segnale/disturbo di 3 : 1, è risultata essere di 0,05  $\mu$ g/ml. La risposta del rivelatore si presenta lineare per soluzioni di ETU a concentrazioni comprese tra 0,1 e 100  $\mu$ g/ml (Fig. 2).

Il calcolo della percentuale di recupero e la stima della riproducibilità del metodo sono stati eseguiti aggiungendo 10 e 100  $\mu$ g

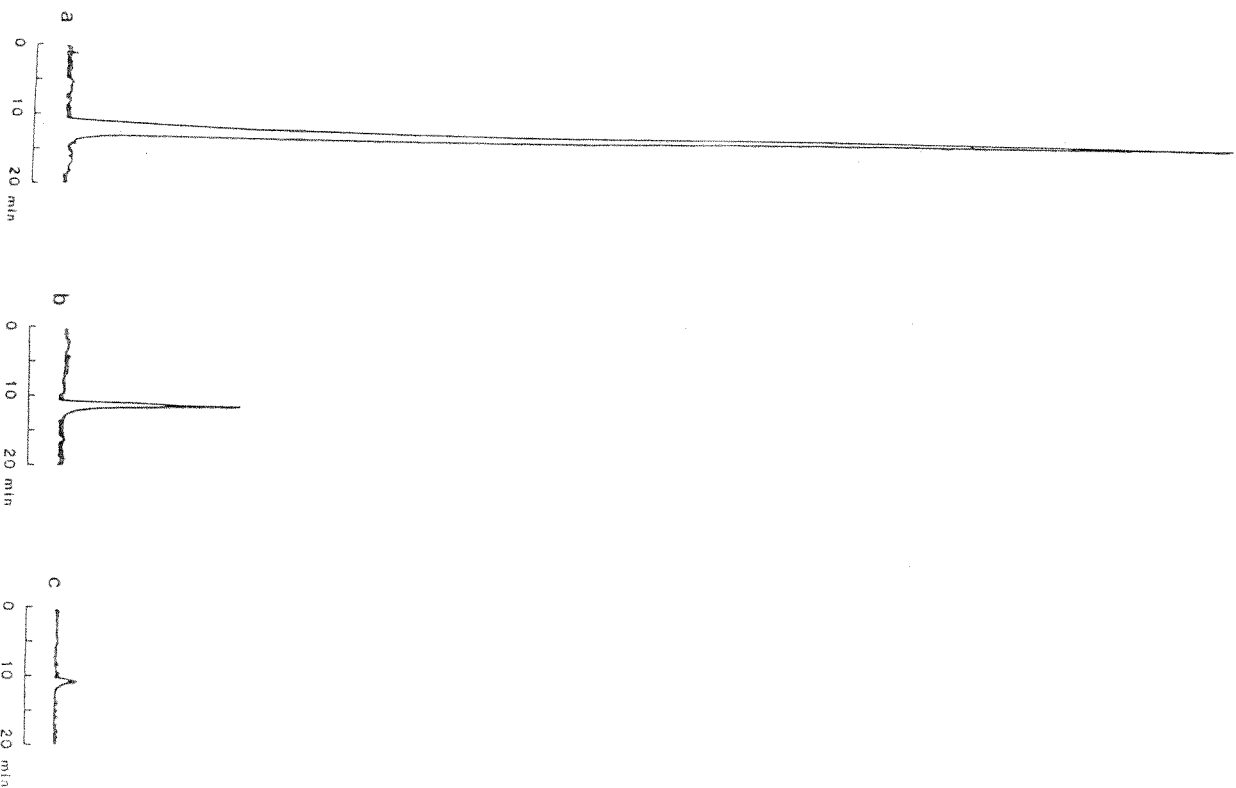


Fig. 1. - Cromatogrammi relativi a soluzioni standard di ETU (a) 10  $\mu$ g/ml, (b) 1  $\mu$ g/ml, (c) 0,1  $\mu$ g/ml.

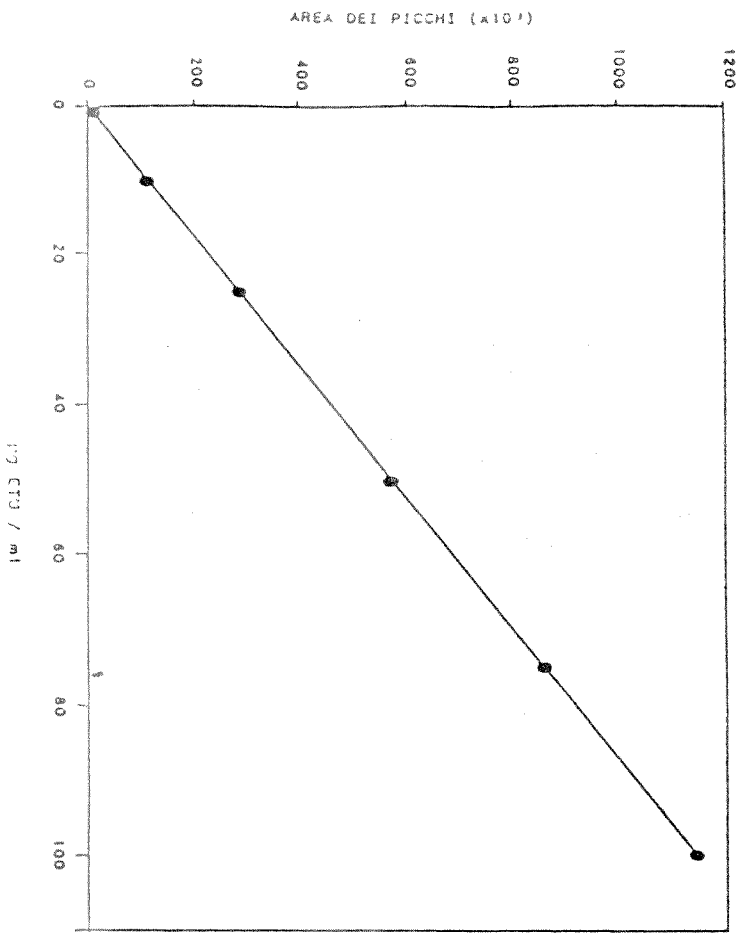


Fig. 2. - Curva di taratura.

di ETU rispettivamente a due gruppi di cinque campioni di fegato bovino sicuramente esenti da residui di tale molecola (Fig. 3).  
 Il valore medio del recupero calcolato su tali campioni è pari al 75% (Tab. 1).

TABELLA I.

*Percentuale di recupero dell'ETU addizionata a campioni di fegato bovino.*

µg di ETU aggiunti	N. campioni	% media di recupero ± DS
10	5	74 ± 13
100	5	77 ± 11

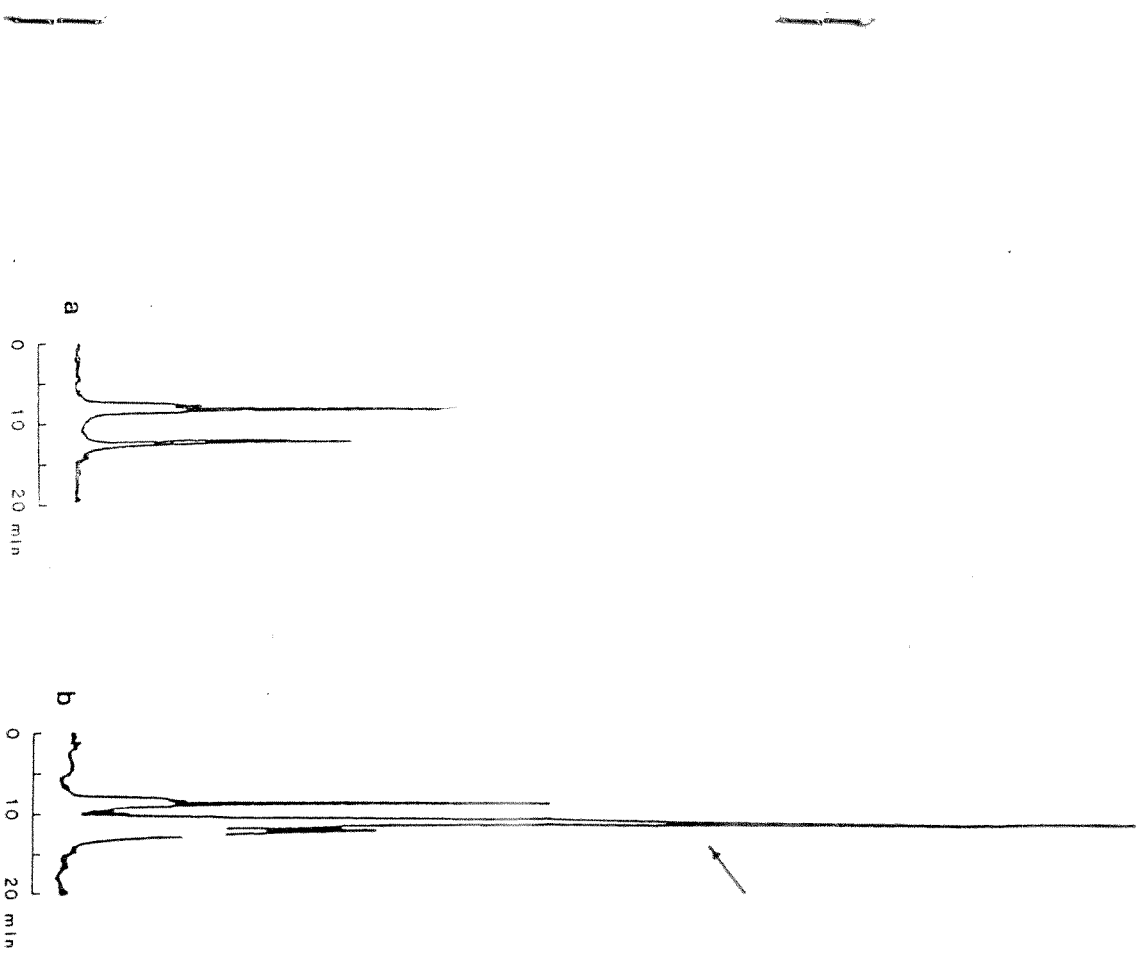


Fig. 3. - Cromatogrammi di campioni provenienti da fegati di bovino; (a) controllo, (b) addizionato con 10 ml di una soluzione standard di ETU 10 µg/ml.

Il metodo descritto appare pertanto ripetibile, con buoni valori di recupero, lineare per un ampio range di valori e dotato di un limite di rilevanza estremamente basso in rapporto ai dati forniti dalla letteratura. Inoltre si è dimostrato particolarmente valido per la determinazione di residui di ETU in tessuti animali monostante i tempi richiesti per l'esecuzione dell'analisi (circa 15 ore).

## BIBLIOGRAFIA

- 1) BAL H. S. (1980) - *Teratogenicity of pesticides, fungicides and their effect on mammalian reproductive systems*. Zbl. Vet. Med. C., 9, 89-96.
- 2) BAL H. S., KHERRA K. S. (1975) - *Teratogenic effects of ethylenethiourea (ETU) a degradation product of ethylenedisithiocarbamate (EBDC) fungicides on the rat fetus and their uterogential system*. Zbl. Vet. Med. C., 4, 368-375.
- 3) BLAZQUEZ C. H. (1973) - *Residue determination of ethylenethiourea (2-imidazolinedithione) from tomato foliage, soil and water*. J. Agric. Food Chem., 21 (3), 330-332.
- 4) BONTOYAN W. R., LOOKER J. B. (1973) - *Degradation of commercial ethylene bisdithiocarbamate formulations to ethylenethiourea under elevated temperature and humidity*. J. Agric. Food Chem., 21 (3), 338-341.
- 5) BORTOMLEY P., HOODLESS R. A., SMART N. A. (1985) - *Review of methods for the determination of ethylenethiourea (imidazolinedithione) residues*. Res. Rev., 95, 45-89.
- 6) CACCIALANZA G., GANDINI C., ROGGI C., ZECCA E. (1980) - *Determinazione diretta di 2-imidazolinditione (ETU) in matrici alimentari mediante cromatografia liquida ad alta pressione (H.P.L.C.)*. Il Farmaco, 35 (9), 449-454.
- 7) CACCIALANZA G., GANDINI C., ROGGI C., ZECCA E. (1981) - *Determinazione e dosaggio dell'etilentiourea in uve e vini*. Il Farmaco, 36 (2), 73-77.
- 8) CAMONI I., CIGERO A. M., DI MUCCIO A., DOMINARCO R. (1984) - *Verifica della escrezione urinaria di etilentiourea (ETU) in ratti trattati con zinco*. Med. Lav., 75 (3), 207-214.
- 9) CAMONI I., DI MUCCIO A., PONTICORVO D., CITTI P. (1988) - *Survey of ethylenethiourea (ETU) in ethylenebis (dithiocarbamate) (EBDC) fungicides*. Ecotoxicol. Environ. Saf., 16, 176-179.
- 10) Committee for analytical methods for residues of pesticides and veterinary products in foodstuffs of the ministry of agriculture, fisheries and food (1987) - *Determination of ethylenethiourea in canned fruits and vegetables*. Analyst, 112, 1559-1563.
- 11) DASTON G. P., EBRON M. T., CARVER B., STEFANADIS J. G. (1987) - *In vitro teratogenicity of ethylenethiourea in the rat*. Teratology, 35, 239-245.
- 12) DASTON G. P., REHBERG B. F., CARVER B., KAVLOCK R. J. (1988) - *Functional teratogens of the rat kidney. II. Nitrofen and Ethylenethiourea*. Fundam. Appl. Toxicol., 11, 401-415.
- 13) FARRINGTON D. S., HOPKINS R. G. (1979) - *Determination of ethylenethiourea in ethylenedisithiocarbamate fungicides: comparison of high performance liquid chromatography and gas-liquid chromatography*. Analyst, 104, 111-116.
- 14) FISHER L., FAWKES J. (1965) - *Thin-layer chromatography of metallic derivatives of ethylenebis (dithiocarbamic acid) and their degradation products*. J. Chromatogr., 19, 364-369.
- 15) GRAHAM S. L., DAVIS K. J., HANSEN W. H., GRAHAM C. H. (1975) - *Effects of prolonged ethylenethiourea ingestion on the thyroid of the rat*. Food Cosmet. Toxicol., 13, 493-499.
- 16) GRAHAM S. L., HANSEN W. H., DAVIS K. J., PERRY C. H. (1973) - *Effects of one-year administration of ethylenethiourea upon the thyroid of the rat*. J. Agric. Food Chem., 21 (3), 324-329.
- 17) HAINES L., ADLER I. L. (1973) - *Gas chromatographic determination of ethylene thiourea residues*. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 56 (2), 333-337.
- 18) HIRVI T., PYYSALO H., SAVOLAINEN K. (1979) - *A glass capillary gas-liquid chromatography method for determining ethylenethiourea without derivatization*. J. Agric. Food Chem., 27 (1), 194-195.
- 19) INNES J. R. M., ULLAND B. M., VALERIO M. G., PERRUCELLI L., HART E. R., PALLOTTA A. J., BATES R. R., FALK H. L., GART J. J., KLEIN M., MITCHELL I., PETERS J. (1969) - *Bioassay of pesticides and industrial chemicals for tumorigenicity in mice: a preliminary note*. J. Nat. Cancer Inst., 42, 1101-1114.
- 20) JOHNSON T. B., EDENS C. O. (1942) - *Complex formations between iodine and p-mercapto-dihydroglyoxalines*. J. Am. Chem. Soc., 64, 2706-2708.
- 21) KHERRA K. S. (1987) - *Ethylenethiourea: a review of teratogenicity and distribution studies and an assessment of reproduction risk*. CRC Critical Reviews in Toxicology, 18 (2), 129-139.
- 22) KHERRA K. S. (1989) - *Ethylenethiourea-induced hydrocephalus in vivo and in vitro with a note on the use of a constant gaseous atmosphere for rat embryo cultures*. Teratology, 39, 277-285.
- 23) KING R. R. (1977) - *Derivatization of ethylenethiourea with m-trifluoromethylbenzyl chloride for analysis by electron-capture gas chromatography*. J. Agric. Food Chem., 25 (1), 73-75.
- 24) KOBAYASHI H., MATANO O., GOTO S. (1981) - *Simultaneous quantitation of thioureas in rat plasma by high-performance liquid chromatography*. J. Chromatogr., 207, 281-285.
- 25) KRAUSE R. T., WANG Y. (1988) - *Liquid chromatographic-electrochemical technique for determination of ethylenethiourea residues*. J. Liq. Chromatogr., 11 (2), 349-362.
- 26) LAWRENCE J. F., IVERSON F., HANEKAMP H. B., BOS P., FRET R. W. (1981) - *Liquid chromatography with UV absorbance and polarographic detection*.

- tion of ethylenethiourea and related sulfur compounds - Application to rat urine analysis. *J. Chromatogr.*, 212, 245-250.
- 27) LEHOTAY J., BRANDSTETEROVA E., LISKA O., GARAI J. (1984) - High-performance liquid chromatographic determination of ethylenethiourea in Perozin and Dithane M-45. *J. Chromatogr.*, 287, 192-196.
- 28) LOPATECKI L. E., NEWTON W. (1952) - Decomposition of dithiocarbamate fungicides with special reference to volatile products. *Can. J. Bot.*, 30, 131-138.
- 29) MARSHALL W. D. (1977) - Thermal decomposition of ethylenebisdithiocarbamate fungicides to ethylenethiourea in aqueous media. *J. Agric. Food Chem.*, 25 (2), 357-361.
- 30) NASH R. G., BEALL M. L. Jr. (1980) - Fate of Maneb and Zincb fungicides in microaerobic system chambers. *J. Agric. Food Chem.*, 28, 322-330.
- 31) NITZ S., MOZDA P., KORTE F. (1982) - A capillary gas-liquid chromatographic method for determination of ethylenethiourea and propylenethiourea in hops, beer, and grapes. *J. Agric. Food Chem.*, 30, 593-596.
- 32) O'NEIL W. M., MARSHALL W. D. (1984) - Goitrogenic effects of ethylenethiourea on rat thyroid. *Pest. Biochem. Physiol.*, 21, 92-101.
- 33) O'NEIL J. H., GUGERIDA L., IVES N.F., WATTS R. R., STOVNEVA R. W. (1977) - Gas liquid chromatography and liquid chromatography of ethylene-thiourea in fresh vegetable crops, fruits, milk and cooked foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 60, 1105-1110.
- 34) O'NEIL J. H., YIP G. (1971) - Determination of ethylene thiourea in foods, using thin layer and gas chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 54 (1), 165-169.
- 35) PEASE H. L., HOLT R. F. (1977) - Manganese ethylenebis (dithiocarbamate) (Maneb)/ethylenethiourea (ETU) residue studies on five crops treated with ethylenebis (dithiocarbamate) (EBDC) fungicides. *J. Agric. Food Chem.*, 25 (3), 561-567.
- 36) PRINCE J. L. (1985) - Analysis of ethylenethiourea in urine by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 33, 93-94.
- 37) RIPLEY B. D., COX D. F. (1978) - Residue of ethylenebis (dithiocarbamate) and ethylenethiourea in treated tomatoes and commercial tomato products. *J. Agric. Food Chem.*, 26 (5), 1137-1143.
- 38) SEARLE A. J. F., STEWART A. C., PAUL M. (1987) - The measurement of ethylenethiourea and ethylenurea in the rat and common marmoset *Callithrix jacchus* after zincb (zinc ethylenebisdithiocarbamate) dosing. *Xenobiotica*, 17 (6), 733-740.
- 39) SENLIER J. P. (1974) - Ethylenethiourea (ETU), a carcinogenic and mutagenic metabolite of ethylenebis (dithiocarbamate). *Mutat. Res.*, 26, 89-94.
- 40) TERAMOTO S., MORIYA M., KATO K., TEZUKA H., NAKAMURA S., SHINGU A., SHIRASU Y. (1977) - Mutagenicity testing on ethylenethiourea. *Mutat. Res.*, 56, 121-129.

- 41) TRUHAUT R., FUJITA M., LICH N. P., CHAIGNEAU M. (1973) - Etude des transformations métaboliques du zincb (éthylènebisdithiocarbamate de zinc) chez le rat. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 276, 229-233.
- 42) ULLAND B. M., WEISBURGER J. H., WEISBURGER E. K., RICE J. M., CYPHER R. (1972) - Thyroid cancer in rats from ethylenethiourea intake. *J. Nat. Cancer Inst.*, 49, 583-587.
- 43) VANDAMME J. C., GALOUX M., VERDIER J. (1981) - Méthode de dosage par chromatographie liquide haute performance de l'éthylène-thiourea dans les formulations à base d'éthylène-bis-dithiocarbamates. *J. Chromatogr.*, 206, 125-131.
- 44) VILLA P., SCLARCA M., PILERI M., FIGARCA M. G., ORESCINO F. (1984) - Biological action of dithiocarbamates. Biochemical change in liver and plasma of rabbits treated with zinc ethylenebisdithiocarbamate (Zincb) and ethylenethiourea (ETU). *Acta Medica Romana*, 22, 292-310.