

7° Convegno Nazionale Fitofarmaci e Ambiente

Determinazione simultanea di insetticidi neonicotinoidi mediante HPLC/MS/MS

Annalisa Longo, Paolo Branca

Arpa Piemonte - Agenzia Regionale Protezione Ambientale del Piemonte
Polo Chimico Regionale Alimenti - Via Nizza 24 - La Loggia (To)

Torino - 6/7 dicembre 2007

I neonicotinoidi costituiscono una classe di insetticidi di concezione relativamente nuova, che ha ottenuto in breve tempo ottimi riscontri ed una rapida diffusione.

CARATTERISTICHE

- ✓ Ottima attività insetticida in modo particolare contro gli Omotteri, Coleotteri ed alcune specie di Lepidotteri;
- ✓ Ampio spettro d'azione, risultano efficaci anche sugli insetti resistenti ad altri gruppi chimici
- ✓ Ridotta dose d'impiego

✓ Elevata sistemicità

Può essere assorbito dalle radici, dal fusto e dalle foglie; dopo l'assorbimento viene traslocato nella pianta attraverso la corrente xilematica (ascendente) venendo costantemente veicolato alle foglie presenti e a quelle in corso di formazione.

Il principio attivo viene assorbito anche attraverso la cuticola fogliare (azione citotropica e translaminare) e consente la protezione anche delle parti sviluppatasi dopo il trattamento.

✓ Nuovo meccanismo d'azione.

Agisce a livello del sistema nervoso degli insetti con un meccanismo di tipo acetilcolinomimetico: si lega in modo irreversibile ai recettori nicotinici dell'acetilcolina (nAChR), localizzati a livello delle sinapsi tra due neuroni, provocando l'alterazione della trasmissione degli impulsi nervosi, che determina conseguentemente paralisi e morte dell'insetto.

- ✓ Favorevole profilo tossicologico sui mammiferi
- ✓ Una non rilevabile tossicità sull'uomo a concentrazioni operative normali

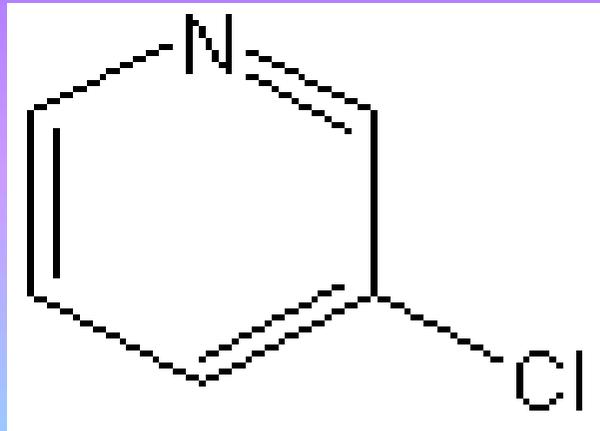
CLASSIFICAZIONE

I neonicotinoidi attualmente presenti sul mercato possono essere distinti in due sottoclassi a seconda del gruppo chimico che li caratterizza, e precisamente in

CLORONICOTINILI e THIANICOTINILI

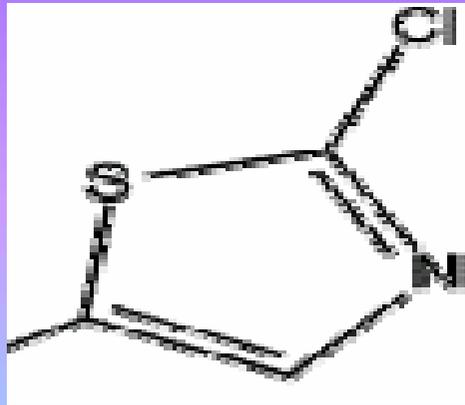
CLORONICOTINILI

Sono caratterizzati dalla presenza nella molecola di un gruppo CLOROPIRIDILE

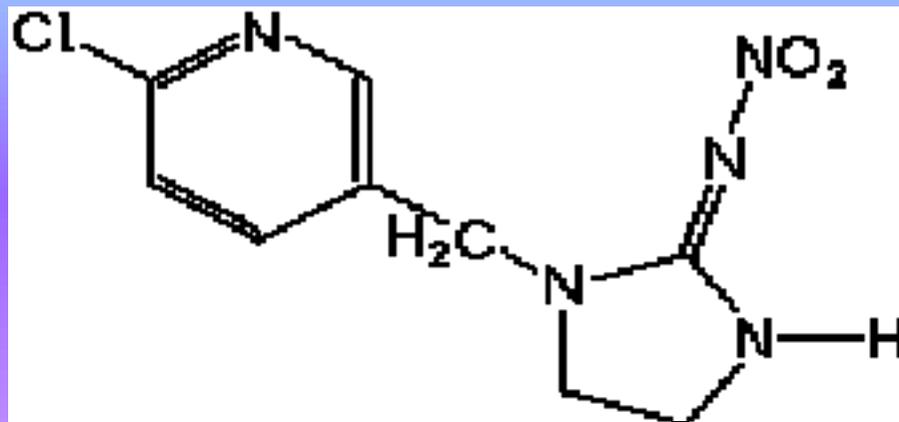


TIANICOTINILI

Sono caratterizzati dalla presenza nella molecola di un gruppo **CLOROTHIAZOLO**



IMIDACLOPRID



Nome IUPAC: 1-[(6-chloro-3-pyridinyl)methyl]-*N*-nitro-2-imidazolidinimine

CAS: 138261-41-3

Formula: $C_9H_{10}ClN_5O_2$

Massa molecolare: 255.7

L'imidacloprid è un insetticida relativamente recente, nonostante sia stato messo in commercio per la prima volta come pesticida negli USA solo nel 1994, ha registrato una crescita significativa ed è ora l'insetticida leader a livello mondiale.

Diversi sono gli impieghi: in agricoltura (trattamento al tronco), come antiparassitario per gli animali domestici e tra gli insetticidi ad uso domestico.

TOSSICITÀ

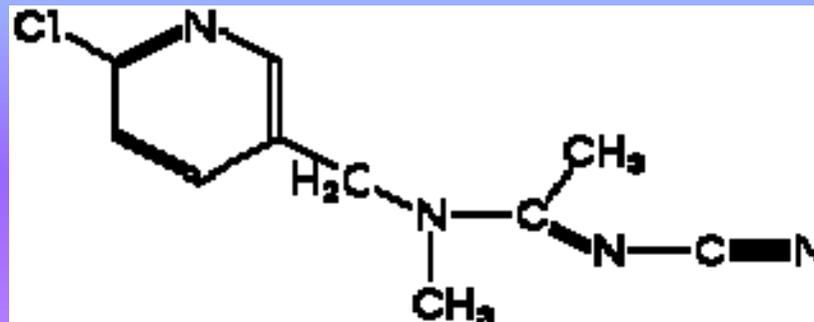
Molto tossico per le api

Non trattare né in immediata prefioritura né in fioritura (almeno 10 giorni prima).

Ritenuto responsabile della moria di api e per tale motivo è stata richiesta la sospensione cautelativa dell'uso di prodotti fitosanitari contenenti tale p.a.

Sospensione in Francia

ACETAMIPRID



Nome IUPAC: 1*E*-*N*-[(6-chloro-3-pyridinyl)methyl]-*N*-cyano-*N*-methylethanamide

CAS: 135410-20-7

Formula: $C_{10}H_{11}ClN_4$

Massa molecolare: 222.7

L'acetamiprid è un insetticida-aficida indicato per la difesa delle colture frutticole, orticole, floricole ed ornamentali.

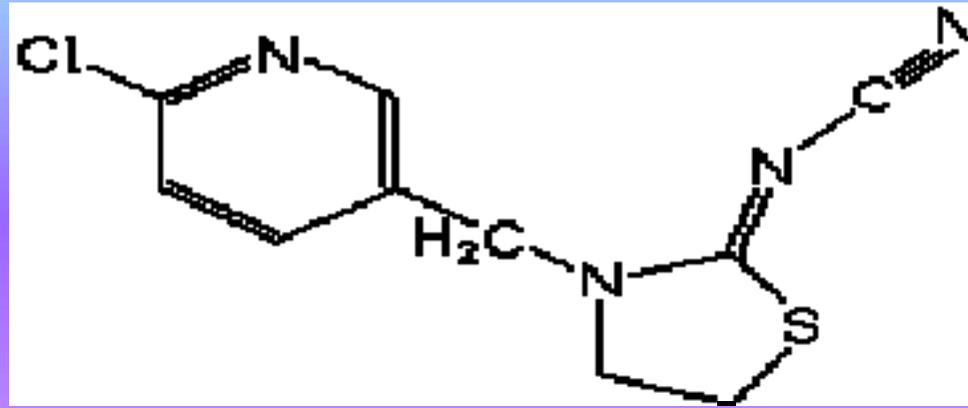
Introdotta in Italia nel 2004, e successivamente, con il DECRETO 17 febbraio 2005, incluso nell'allegato I del decreto legislativo 17 marzo 1995, n.194, in attuazione della direttiva 2004/99/CE.

TOSSICITÀ

Risulta tossico per gli organismi acquatici e pertanto il trattamento con tale sostanza deve essere effettuato lontano dai corsi d'acqua.

Non rientra nelle categorie di rischio: cancerogenesi, mutagenesi, tossicità per riproduzione, tossicità sviluppo embriofetale.

THIACLOPRID



Nome IUPAC: (Z) 3-(6-chloro-3-pyridilmethyl)-1,3-thiazolidin-2-ylidenecyanamide

CAS: 111988-49-9

Formula: $C_{10}H_9ClN_4S$

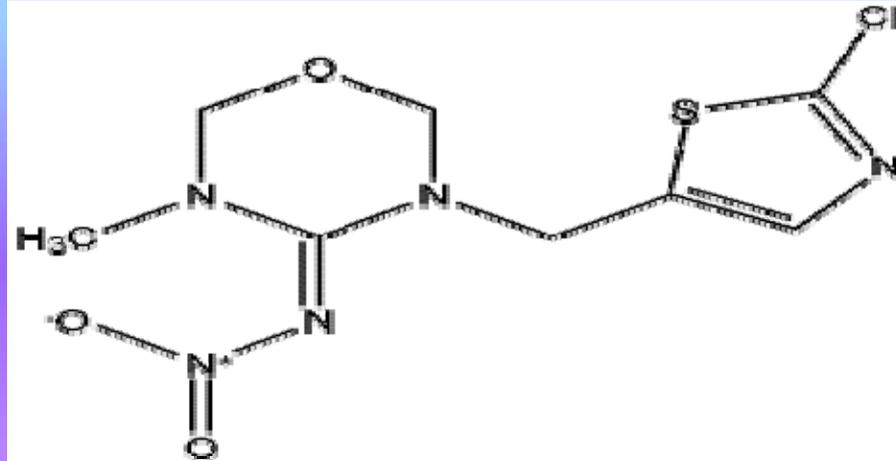
Peso molecolare: 252.7

Insetticida sistemico, introdotto in Italia nel 2003, si differenzia dagli altri neonicotinoidi per la possibilità di svolgere un'azione sia ovicida su uova fresche, che larvicida, specialmente sulle larve giovani.

Può provocare sensibilizzazione per contatto con la pelle.

Nocivo per gli organismi acquatici.

THIAMETOXAM



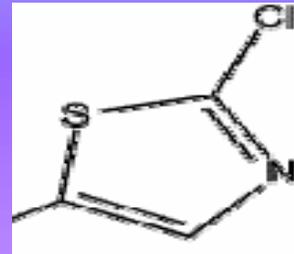
Nome IUPAC: 3-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-5-methyl-1,3,5-oxadiazinan-4-ylideneamino

CAS: 153719-23-4

Formula: $C_8H_{10}ClN_5O_3S$

Peso molecolare: 291.7

Neonicotinoide caratterizzato dal gruppo clorotiazolo eterociclico



Introdotta in Italia nel 2003, e successivamente, con il DECRETO 29 maggio 2007, incluso nell'allegato I del decreto legislativo 17 marzo 1995, n.194.

TOSSICITÀ

Uccelli: poco tossico

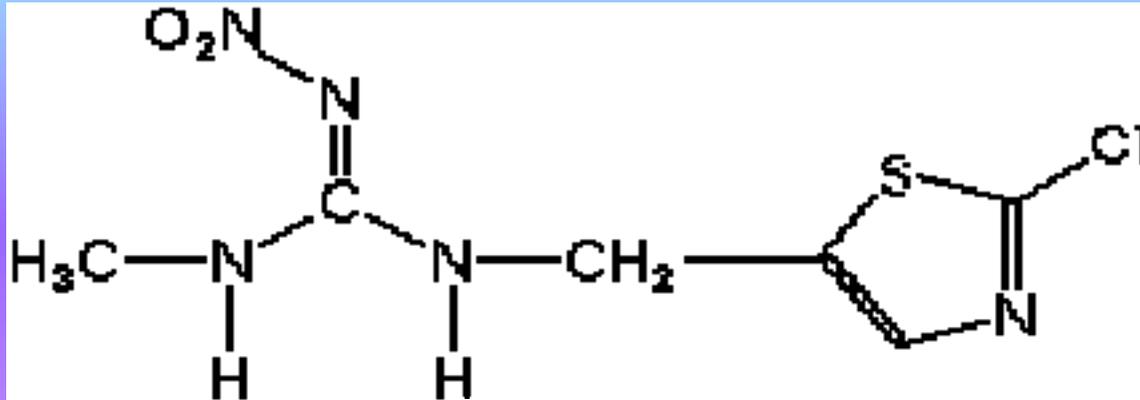
Lombrichi: non tossico

Api: molto tossico

Organismi acquatici:

il decreto 29 maggio 2007 nelle disposizioni specifiche indica di prestare particolare attenzione alla protezione degli organismi acquatici e al potenziale di contaminazione delle acque sotterranee.

CLOTHIANIDIN



Nome IUPAC: (*E*)-1-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-3-methyl-2-nitroguanidine

CAS: 210880-92-5

Formula: C₆H₈ClN₅O₂S

Peso molecolare: 249.7

Insetticida per la difesa di melo e pero e per la concia delle sementi di mais e barbabietola da zucchero.

Dal punto di vista legislativo con il Decreto 13 novembre 2006 tale sostanza è stata inclusa nell'allegato 1 del decreto legislativo 17 marzo 1995, n.194.

Attualmente tale p.a. non è ancora stato inserito in un provvedimento di aggiornamento del Decreto 27 agosto 2004.

TOSSICITÀ

È altamente tossico per le api tramite esposizione di tipo acuto (EPA).

Segnalato dalle organizzazioni degli apicoltori italiani come fonte di problemi per l'attività e possibile causa delle ricorrenti stragi di api.

PROVE SPERIMENTALI

Le fasi attraverso cui si sviluppa una metodica analitica sono:

- Estrazione del principio attivo
- Purificazione del principio attivo da tutti gli interferenti coestraibili
- Concentrazione della soluzione del principio attivo purificato
- Analisi strumentale

Prove sperimentali

La sperimentazione è stata condotta su un campione di zucchine previa verifica dell'assenza dei principi attivi oggetto della presente metodica.

Il campione scelto, opportunamente omogeneizzato, è stato fortificato con l'aggiunta dei principi attivi alle concentrazioni riportate nella tabella successiva.

| | SPIKE 1 (mg/kg) | SPIKE 2 (mg/kg) | SPIKE 3 (mg/kg) |
|---------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| ACETAMIPRID | 0,075 | 0,150 | 0,572 |
| CLOTHIANIDIN | 0,071 | 0,142 | 0,539 |
| IMIDACLOPRID | 0,068 | 0,135 | 0,515 |
| THIACLOPRID | 0,074 | 0,147 | 0,559 |
| THIAMETOXAM | 0,071 | 0,142 | 0,540 |

Estrazione

A 20 grammi di campione così preparato viene addizionata una quantità di terra di diatomee tale da ottenere il completo inglobamento del campione.

Si trasferisce quindi la miscela sulla colonna di estrazione e si assesta la massa con una leggera percussione sull'esterno della colonna senza comprimere. Si copre con uno strato di solfato di sodio anidro la sommità della colonna e, dopo circa 10', si eluisce con 150 ml di Diclorometano.

Ultimata l'eluizione l'estratto viene evaporato su rotovapor ad una temperatura non superiore ai 40°C.

Purificazione

Il residuo del campione proveniente dalla fase di estrazione viene disciolto con la miscela eluente, si procede quindi con la sonicatura e la filtrazione.

1 ml della soluzione filtrata viene iniettata sul sistema GPC raccogliendo la frazione utile in base ai tempi individuati nella precedente fase di calibrazione.

Evaporare il solvente su rotor vapor, e riprendere il residuo con acetonitrile.

Determinazione strumentale

La determinazione viene eseguita su HPLC dotato di spettrometro di massa a trappola ionica operando alle seguenti condizioni:

- Colonna C18 a fase inversa RP18 (5 μ m)
- Gradiente binario acetonitrile/acqua: dal 20% di acetonitrile al 80% di acetonitrile in 15 minuti con un flusso di 700 μ l/min,
- Volume di campione iniettato 20 μ l.

Spettrometro di massa

Sorgente: ESI polarità positiva

Modalità acquisizione: MS/MS SRM

Temp. Capillary: 250°C

| | parent mass (m/z) | isolation width (m/z) | Normalized Collision Energy (%) | ion quant (m/z) |
|--------------|----------------------|--------------------------|------------------------------------|----------------------------|
| ACETAMIPRID | 223 | 6 | 41 | 126, 181, 187, 196, 206 |
| CLOTHIANIDIN | 250 | 6 | 28 | 169 |
| IMIDACLOPRID | 256 | 6 | 29 | 175, 209, 210 |
| THIACLOPRID | 253 | 6 | 42 | 126, 186, 211, 217, 226 |
| THIAMETOXAM | 292 | 6 | 24 | 211, 246 |

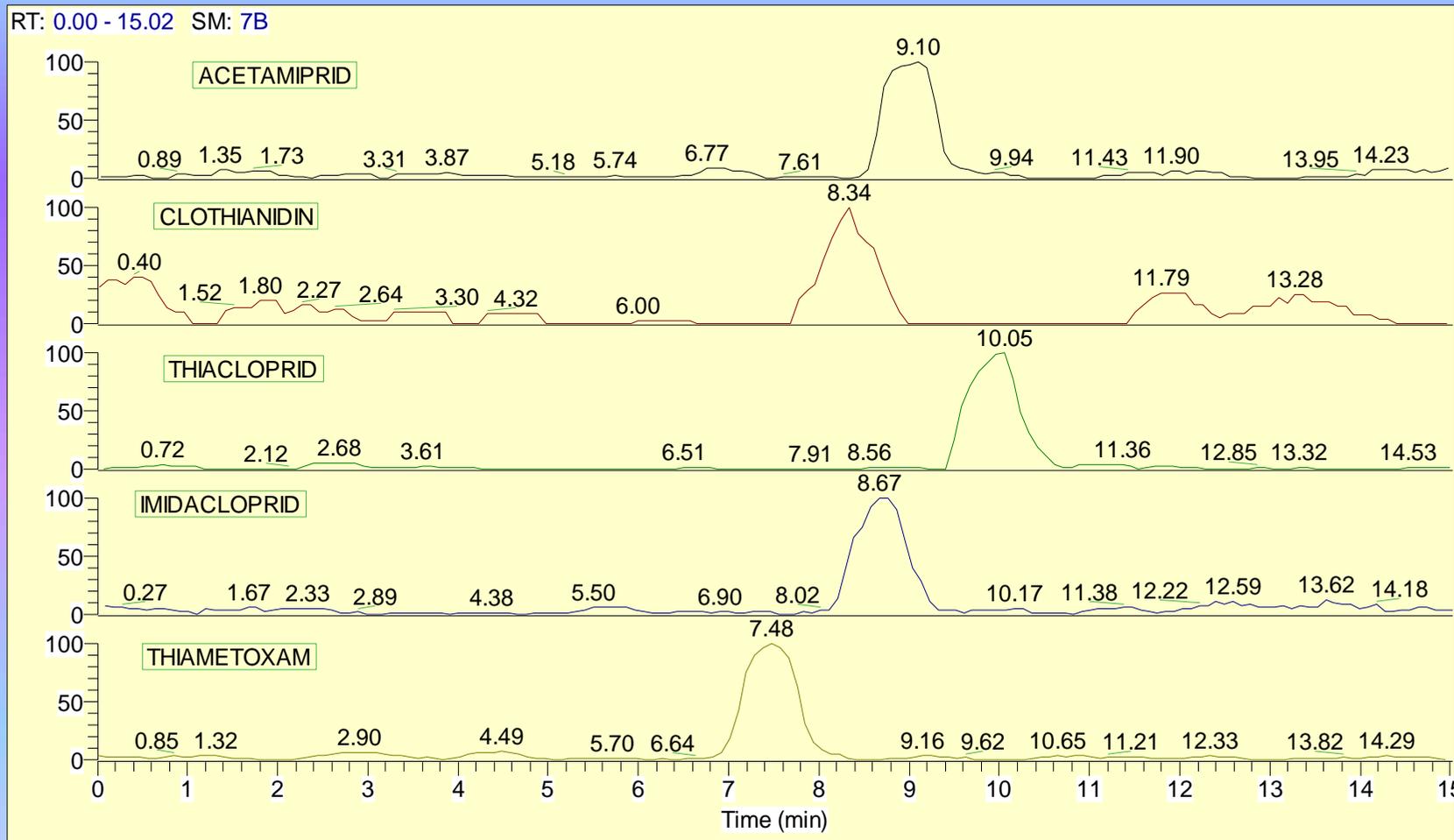
| LIVELLO 1 | VALORE MEDIO (mg/kg) | CV% | R% |
|---------------------|---------------------------------|-------------|-------------|
| ACETAMIPRID | 0,068 | 5,8 | 90,7 |
| CLOTHIANIDIN | 0,046 | 14,5 | 64,2 |
| IMIDACLOPRID | 0,053 | 14,1 | 78,4 |
| THIACLOPRID | 0,062 | 4,6 | 83,5 |
| THIAMETOXAM | 0,059 | 3,6 | 82,7 |

| LIVELLO 2 | VALORE MEDIO (mg/kg) | CV% | R% |
|---------------------|---------------------------------|-------------|-------------|
| ACETAMIPRID | 0,131 | 20,5 | 87,2 |
| CLOTHIANIDIN | 0,098 | 14,2 | 68,7 |
| IMIDACLOPRID | 0,117 | 21,7 | 86,5 |
| THIACLOPRID | 0,102 | 6,4 | 69,7 |
| THIAMETOXAM | 0,107 | 2,9 | 75,5 |

| LIVELLO 3 | VALORE MEDIO (mg/kg) | CV% | R% |
|---------------------|---------------------------------|-------------|-------------|
| ACETAMIPRID | 0,484 | 0,4 | 84,7 |
| CLOTHIANIDIN | 0,379 | 15,0 | 70,3 |
| IMIDACLOPRID | 0,436 | 7,0 | 84,7 |
| THIACLOPRID | 0,434 | 14,2 | 77,7 |
| THIAMETOXAM | 0,386 | 5,6 | 71,5 |

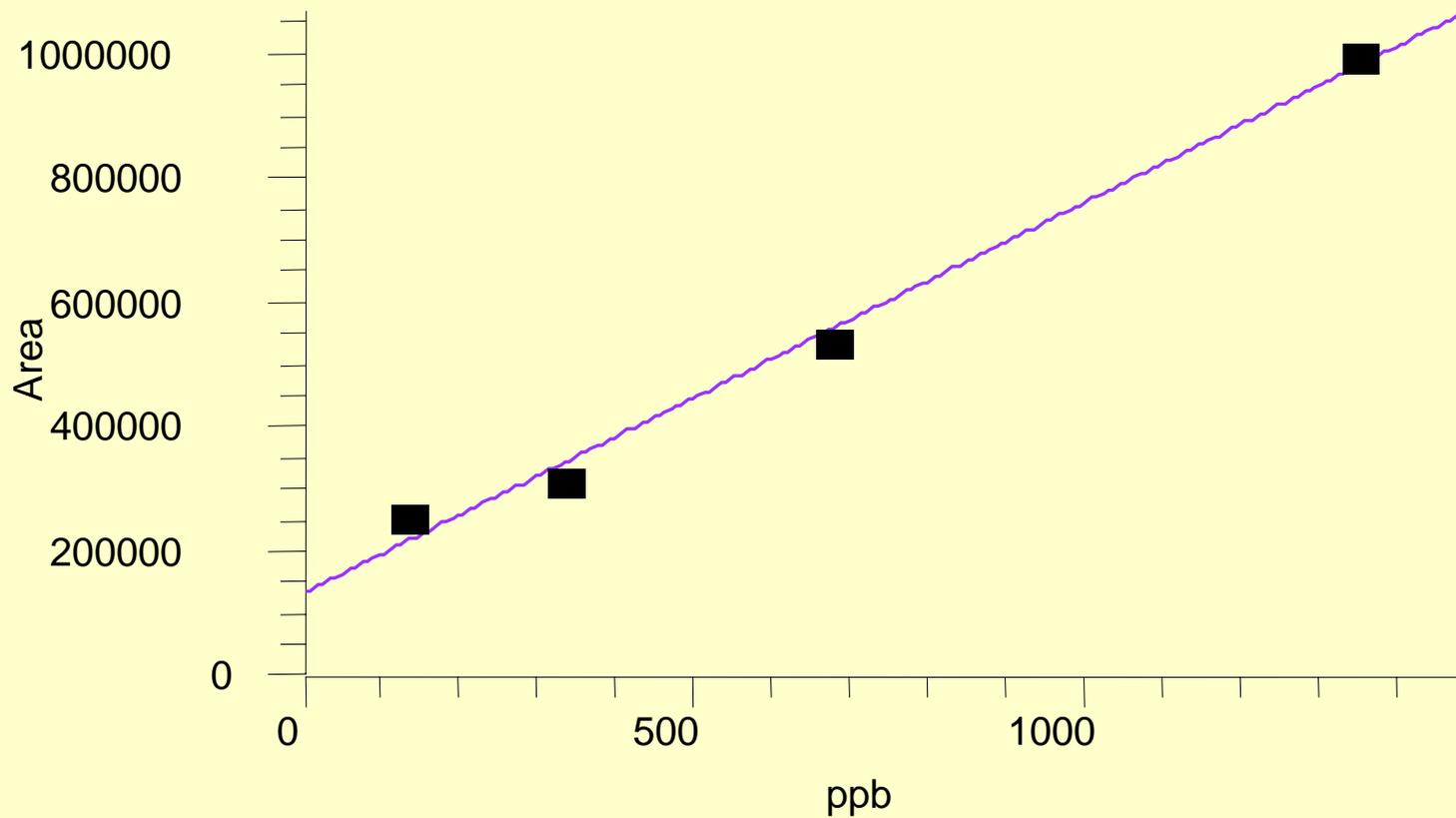
CROMATOGRAMMA CAMPIONE FORTIFICATO

1° LIVELLO



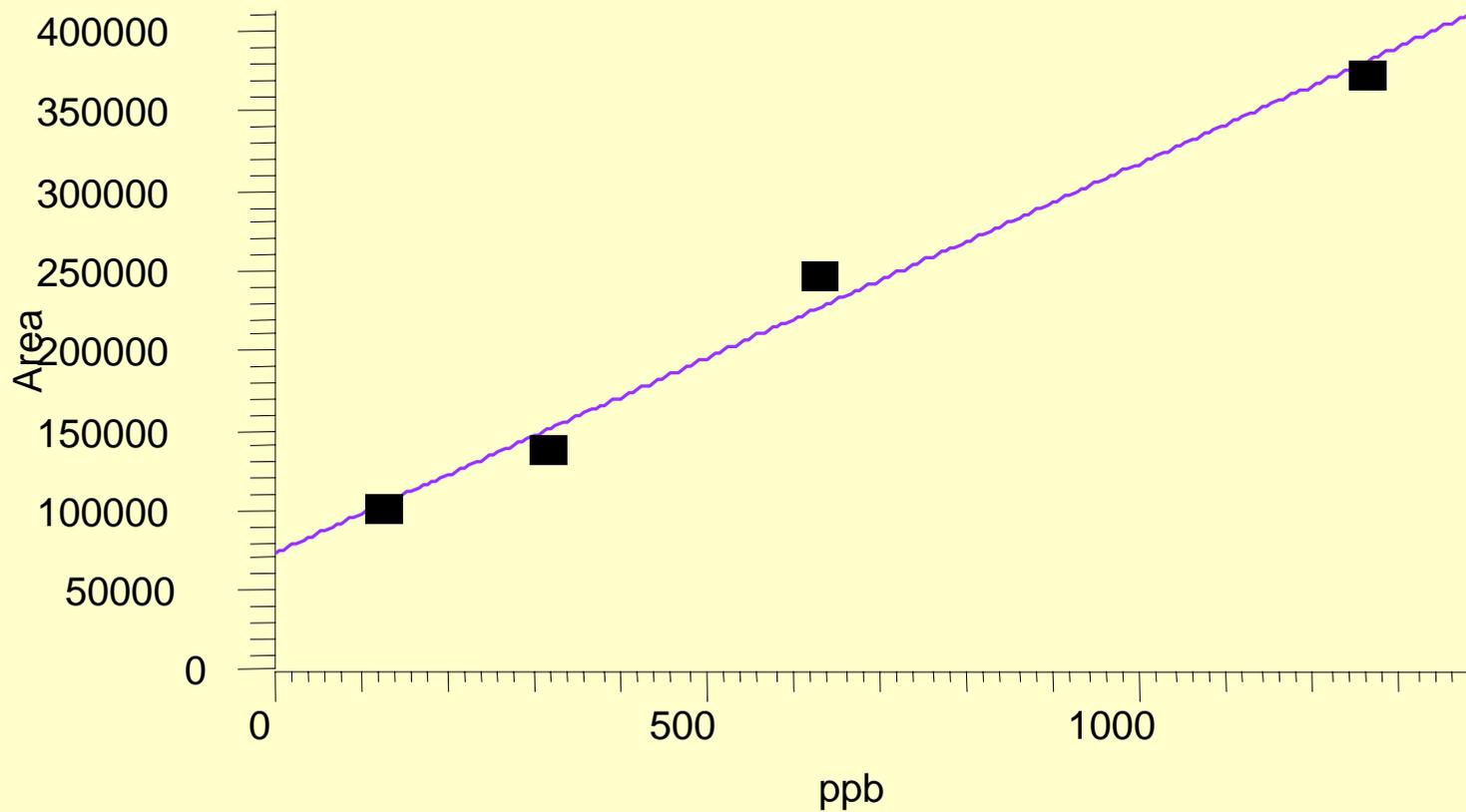
acetamiprid_MS

$Y = 133679 + 625.424 * X$ $R^2 = 0.9914$ W: Equal



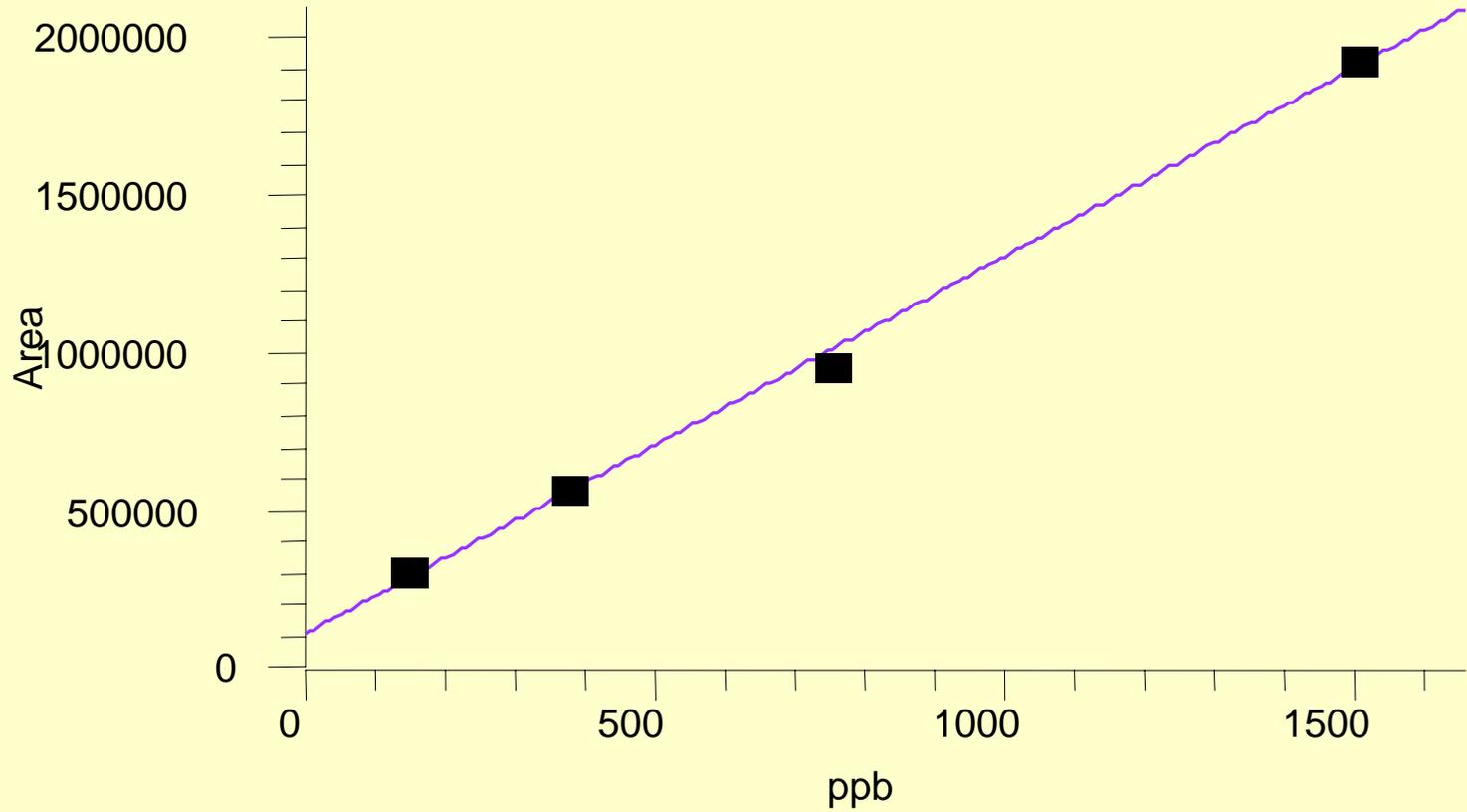
clothianidin_MS

$Y = 73341.2 + 244.129 * X$ $R^2 = 0.9858$ W: Equal



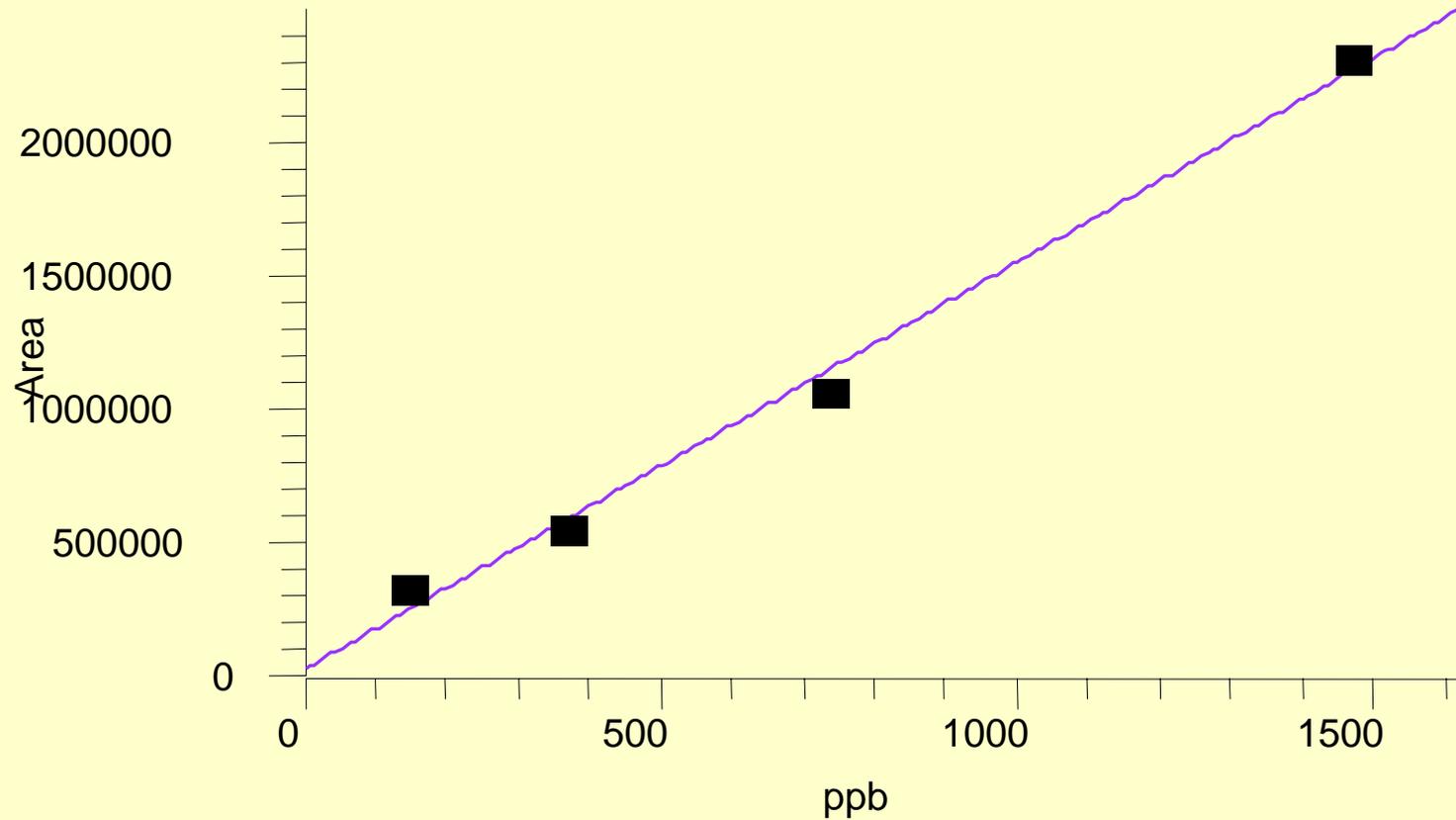
imidacloprid_MS

$$Y = 107726 + 1198.38 * X \quad R^2 = 0.9972 \quad W: \text{Equal}$$



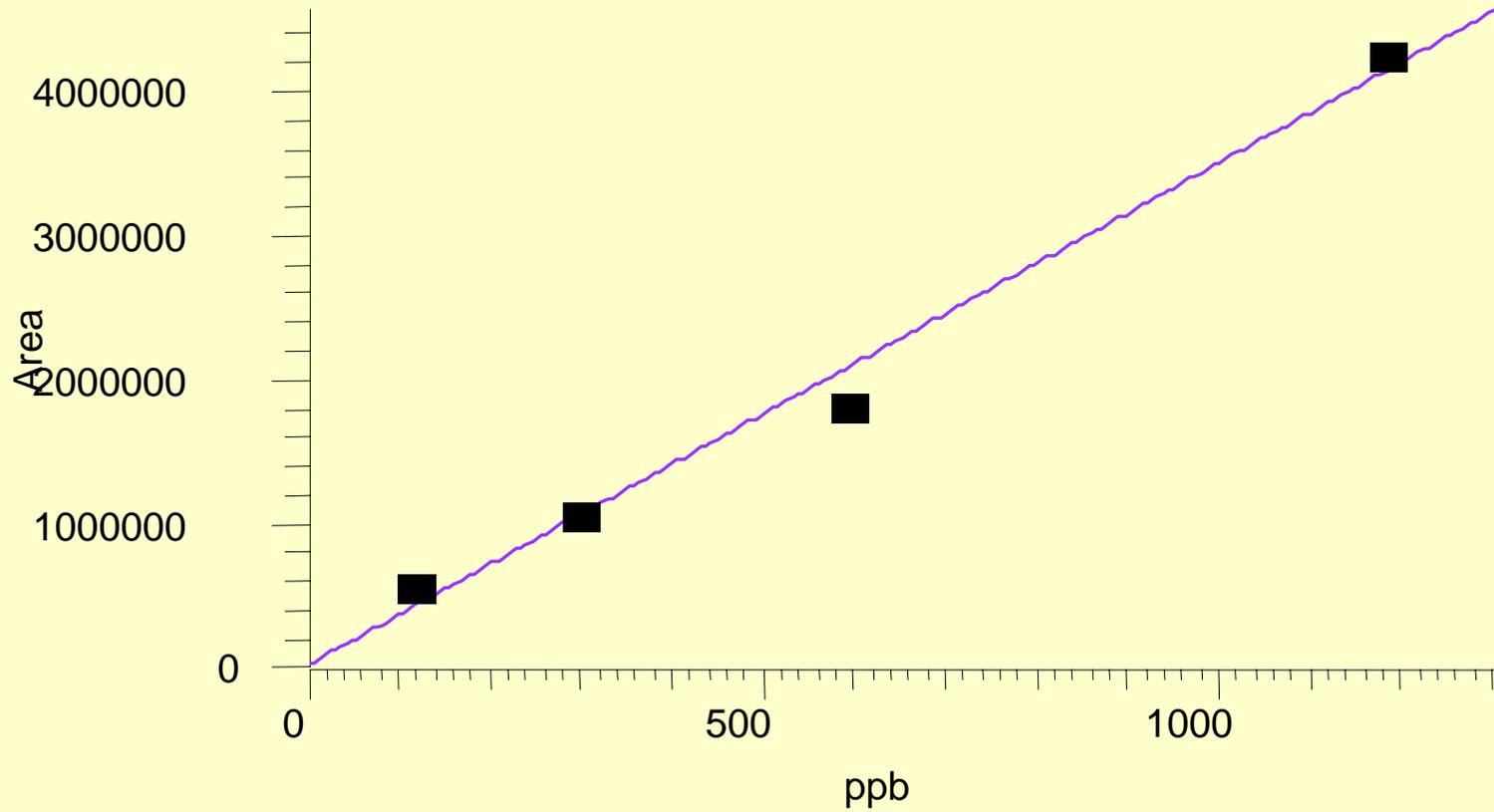
thiacloprid_MS

$$Y = 28392.3 + 1526.33 * X \quad R^2 = 0.9935 \quad W: \text{Equal}$$



thiametoxam_MS

$$Y = 23598.1 + 3481.87 * X \quad R^2 = 0.9876 \quad W: \text{Equal}$$



| | Campo di prova (mg/kg) | LOQ (mg/kg) | R% |
|---------------------|-----------------------------------|--------------------|-----------|
| ACETAMIPRID | 0,04-0,30 | 0,04 | 87 |
| CLOTHIANIDIN | 0,03-0,28 | 0,03 | 68 |
| IMIDACLOPRID | 0,03-0,27 | 0,03 | 83 |
| THIACLOPRID | 0,04-0,29 | 0,04 | 77 |
| THIAMETOXAM | 0,03-0,28 | 0,03 | 77 |

Allo stato attuale la sperimentazione è stata effettuata su 3 livelli di concentrazione (~0.06 mg/kg, ~0.14 mg/kg, ~0.55 mg/kg) e su una sola matrice (zucchine).

Si prevede di sviluppare il metodo effettuando prove di validazione a concentrazioni inferiori e a campioni appartenenti alle altre 2 classi matriciali (a basso contenuto di clorofilla e/o caroteni e ad alto contenuto di acidi).

conclusioni

L'uso degli antiparassitari si è notevolmente modificato nel corso degli anni, privilegiando sempre di più molecole a basso impatto ambientale pur con una persistente azione nei confronti dei competitori siano essi di origine vegetale o animale. Siamo così passati dagli organoclorurati, in uso negli anni '50 agli organofosforati negli anni '60 per approdare ai carbammati negli anni '70 ed ai piretroidi negli anni '80, i neonicotinoidi hanno preso il sopravvento nell'ultimo decennio. Si è infatti registrata una forte crescita nella vendita di prodotti a base di neonicotinoidi con l'imidacloprid in testa.

Nasce quindi l'esigenza di mettere a punto metodiche selettive da impiegare nella routine di un laboratorio d'analisi.

Sviluppi futuri verranno orientati all'analisi di nuove molecole di neonicotinoidi, con particolare attenzione a **dinotefuran** e **nitenpyram**, attualmente ancora non impiegati ma che potrebbero trovare sviluppo in futuro.

GRAZIE PER L'ATTENZIONE