

M. BARBINA TACCHEO, L. BARUZZINI, C. SPESSOTTO

Centro Regionale per la Sperimentazione Agraria per il

Friuli - Venezia Giulia

- U D I N E -

VINCLOZOLIN E PROCYMIDOX (SUMISCLEX)*: DETERMINAZIONE GASCROMATO
GRAFICA DEI PRINCIPI ATTIVI TAL QUALI E DEL DERIVATO-3,5 DICLOROANI
LINA IN CAMPIONI DI VINO

Questa relazione costituisce il proseguimento dell'indagine da noi condotta per determinare il residuo di Vinclozolin in campioni di uva e vini (BARBINA et Al.1978 (1)). Nelle conclusioni del precedente lavoro avevamo sottolineato la necessità di ulteriori controlli del metodo GLC originale della ditta produttrice BASF. Perciò continuammo la determinazione di tale p.a. e di un composto simile, il Sumisclex, antitritico prodotto dalla SUMITOMO, derivato sempre della 3,5 dicloroanilina (DCA).

I campioni successivi facevano parte di sperimentazioni riguardanti l'uso di nuovi antitritici eseguite dal prof. M. Bisiach, dell'Istituto di Patologia Vegetale della Università di Milano, e dalla SHELL.

Le metodiche impiegate per tali determinazioni sono state di tipo spettrofotometrico, ampiamente illustrata nel precedente lavoro (1) e di tipo GLC per la determinazione dei p.a. tal quali (MOLINARI, DEL RE 1978 (2), o del derivato.

Determinazione della 3,5 dicloroanilina (DCA) ottenuta per idrolisi alcalina

Il p.a. viene idrolizzato a caldo in ambiente alcalino e la 3,5 DCA formatasi viene estratta, acetilata, e determinata con GLC a rivelatore a ECD.

Reattivi

Benzolo, acetato di etile per pesticidi, KOH sol. 10 N, H_2SO_4 sol. 1N, $NaHCO_3$ sol. satura in acqua, cloroacetil cloruro sol. 2% in benzolo, Na_2SO_4 anid., silicone antischiuma, soluz. standard di Vinclozolin, 10 µg/ml in acetone.

Idrolisi e distillazione

50 ml di vino vengono posti in un pallone da distillazione con 250 ml di acqua di-

* SUMISCLEX: nome commerciale del prodotto non ancora registrato in Italia.

stillata e 50 ml di KOH e alcune gocce di silicone. Si inizia la distillazione e si raccolgono esattamente 250 ml di distillato su 25 ml di H_2SO_4 1N.

Estrazione e preparazione del derivato

Il distillato viene estratto con 2 porzioni da 25 ml di cloroformio, neutralizzato con 100 ml di acqua satura di $NaHCO_3$ e ulteriormente estratto con 2 porzioni da 25 ml di cloroformio. Si riuniscono le frazioni di cloroformio, si filtrano su Na_2SO_4 anid. pre-lavato con cloroformio, si aggiunge 1 ml di soluz. di cloroacetil cloruro e si evapora sottovuoto in evaporatore rotante a 30°C. Il residuo viene ripreso con acetato di etile (5 ml). Si prelevano frazioni di 1-1,5 µl per iniettare nel GLC.

Analisi gascromatografica

La determinazione è stata messa a punto su un gascromatografo Perkin-Elmer 900 con ECD, con colonne in vetro da 2 m, ϕ int. 2 mm., riempimento Chromosorb G AW 60/80 mesh, fasi staz. DC 200 (12500 cst) e SE 30 al 5%, gas di trasp. N_2 50 ml/min; temperature: iniettore 280°C, colonna 200°C, rivelatore 250°C.

La sensibilità del detector alla DCA acetilata è dell'ordine di 0,05 ppm, per l'iniezione di un µl di estratto. Inoltre la ripetibilità è molto buona e la curva standard può essere ripetuta ogni 20-25 determinazioni, in relazione alla natura degli estratti. La linearità della curva si mantiene costante da 0,25 - 1 ppm, intervallo sufficiente alla determinazione della maggioranza dei campioni, anche perchè eventuali concentrazioni o diluizioni degli stessi non ne alterano la determinazione.

Isolamento e purificazione della 3,5 dicloroanilina

Dopo i primi campioni di vino, proveniente dalla regione F.V.G., che avevano dato luogo ad estratti molto puri e per i quali non erano sorte difficoltà nella determinazione GLC, cominciammo ad avere problemi con i vini provenienti dalle Marche che, pur essendo vinificati in bianco, davano luogo ad estratti estremamente impuri, non inettibili senza purificazione. Nella ricerca di un metodo valido e spedito di purificazione, propendemmo per lo strato sottile. Eseguiamo prove per le diverse cloro

aniline, al fine di evidenziare la formazione di eventuali interferenze. I dati relativi ai solventi e agli strati impiegati con i relativi R_f sono riportati in (tab. 1.) Quelli riguardanti il recupero sono riferiti in (tab. 2 colonna IV^a).

TAB N. 1 - Analisi TLC di Cloroaniline ed altri p.a. su lastre gel di silice
O,250 mm F 254

Sostanza	R i v e l a z i o n e				R_f	
	Limiti μg		Colorazione		Benzene 90	Toluolo 95
	UV	diaz.	UV	diaz.	acetone 10	Ac. etile 5
4-Cl anilina	0,5	0,2	assorb.	V	0,46	0,23
4-Cl an.acet.	1,0	-	"	-	0,56	0,22
3,(4Br) an.	0,5	0,2	"	RV	0,45	-
3,(4Br) an.acet.	1,5	-	"	-	0,51	-
3,4dCl anilina	0,5	0,2	"	V	0,52	0,29
3,4dCl an.acet.	1,0	-	"	-	0,55	0,24
3-Cl anilina	0,5	0,2	"	RL	0,56	0,33
3-Cl an.acet.	2,0	-	"	-	0,58	0,27
3,5 dCl anil.	0,5	0,2	"	RL*	0,65	0,43
3,5 dCl an.acet.	1,0	-	"	-	0,66	0,38
2,4 dCl anilina	0,2	0,2	"	RL	0,71	0,49
2,4 dCl an.acet.	0,5	-	"	-	0,82	0,50
Tiofanate met.	5,0	-	"	-	0,31	0,00
Benomyl	10,0	-	"	-	0,63	0,14
Captafol	10,0	-	"	-	0,74	0,33
Captan	10,0	-	"	-	0,76	0,30
Sumisclex	10,0	-	"	-	0,79	0,42
Folpet	10,0	-	"	-	0,83	0,54
Vinclozolin	10,0	-	"	-	0,88	0,64

V = viola, RV = rosso-viola, RL = rosso-lilla

* = appena sviluppata, e per almeno 20' la 3,5 DCA si differenzia dalle altre macchie, poiché al centro, per quantità $>$ a 2 μg , compare una colorazione bluastra.

Materiali e reattivi

Lastre gel di silice F254 da O,250 mm - lastre per purificazione da O,500 mm:
per 5 lastre, 45 g di GS G60 F254 + 95 ml H_2O ; attivazione a 105°C per 1 h.

Soluzione A: 10% di HCl conc. in Met. OH

Soluzione B: 250 mg Na NO_2 + 2ml H_2O $\rightarrow$ 25 ml con Met. OH

Soluzione C: 250 mg ac. solfamico + 5 ml di sodio acetato al 15% $\rightarrow$ 25 ml Met. OH

Soluzione D: 250 mg N-(1-naftil)-etilendiamina dicloridrato + 1ml H_2O , scaldare a b.m. fino a dissoluzione $\rightarrow$ 25 ml con Met. OH

Tutte le soluzioni vanno preparate estemporaneamente ad eccezione della A.

Purificazione degli estratti

Gli estratti in acetato di etile vengono depositi su una lastra per preparativa, strisciando 500 μ l su una banda di 5 cm, eluiti con benzene: acetone 90: 10. Si asporta lo strato corrispondente al R_f del test di riferimento (3,5 DCA acetilata) e si eluisce con l'apparecchio per eluizione Desaga. Per controllare eventuali perdite durante la procedura, si è operato un controllo impiegando soluzioni a titolo noto di DCA aggiunta ad una soluzione di 25 ml di H_2SO_4 1 N, in 250 ml di acqua, mettendoci nelle stesse condizioni della soluzione proveniente dall'idrolisi. I dati relativi, controllati con GLC, sono riportati in (tab. 2 colonna 4^a, in fig. 2).

Si può vedere che le rese sono state sufficientemente buone, cosa che ci ha consentito di adottare tale metodo di purificazione per tutti i vini che ponevano problemi di purezza dell'estratto.

La discordanza dei dati, fra le analisi GLC e colorimetriche (vedi tab. n. 3), ci indussero ad indagare sui composti che si formano durante l'idrolisi, che avrebbero potuto interferire nella GLC. Procedemmo come segue: campioni di vino addizionati di Vinclozolin puro al 98% e Vinclozolin aggiunto ad acqua vennero idrolizzati ed estratti come i campioni di vino analizzati. Gli estratti in cloroformio, concentrati senza aggiunta di cloroacetilcloruro in evaporatore rotante a temp. di 30°C, vennero ripresi con acetato di etile, concentrati ad 1 ml e depositi su lastra di gel di silice da 0,250 mm. La lastra venne eluita con benzene: acetone 90: 10. Rivelazione: si spruzza sulla lastra la soluz. A, si asciuga per 4'; si spruzza la soluz. B e si lascia reagire per 3' asciugando all'aria; si spruzza la soluz. C, si lascia reagire ed asciugare per 5' e quindi si spruzza la soluz. D. Tutte le operazioni vanno eseguite bagnando uniformemente le lastre: con tale reazione si rivelano macchie di cloroaniline dell'ordine di 0,1 - 0,2 μ g.

Tale procedura ci ha permesso di capire alcuni fatti strettamente legati alle analisi in corso: osservando la (fig. 1) si può notare che: - i test delle cloroaniline impiegate sono molto puri, mentre l'idrolisi del Vinclozolin nella matrice vinoda origine

ad una serie di composti che reagiscono con la N-(1-naftil)-etilendiamina dicloridrato, composti che non sono presenti nei vini idrolizzati e distillati in assenza dell'antibiotico - i vini idrolizzati come confronto in bianco danno origine ad alcuni composti colorati che probabilmente alterano l'analisi colorimetrica - la resa della cloroacetilazione è pari al 100% : è imputabile quindi all'idrolisi la sensibile variabilità riscontrata in campioni con gli stessi contenuti di p.a. - il Sumisclex, per idrolisi da origine agli stessi derivati del Vinclozolin - eventuali composti contenenti altre cloro o dicloro aniline possono essere differenziati utilizzando la separazione TLC, come si può osservare dagli R_f in (tab. 1) - con TLC sono stati controllati i distillati alcalini di Tiofanate met., Benomyl, Captano, Folpet e Captafol: nessuno ha prodotto composti interferenti la GLC o la TLC . Poiché abbiamo adottato anche il metodo (2) per la determinazione dei p.a. tal quali, abbiamo provato una separazione TLC dei p.a. citati dal metodo ed alcuni altri p.a., per controllare se servisse una purificazione. I dati relativi sono riportati in (tab. 1).

Tab. n. 2 - Prove di recupero

Idrolisi e distillazio ne da vino addiz.		Recupero da prin cipio attivo puro		Purificazione su TLC
Colonna DC 200		Colonna SE30	Colonna DC 200	
ppm	% rec.	% rec.	% rec.	% rec.
0.25	105.00 $\pm$ 10.00		96.00 $\pm$ 13.56	
0.50	115.50 $\pm$ 12.37	109.00 $\pm$ 10.89	96.00 $\pm$ 3.74	82.51 $\pm$ 6.09
1.00	113.25 $\pm$ 9.18	115.60 $\pm$ 14.01	96.80 $\pm$ 12.15	94.71 $\pm$ 2.56
2.00		100.00 $\pm$ 14.85		

Media di 4 replicaz. e deviazione standard di 5 replic.e dev. di 7 rep.e dev.

Determinazione dei principi attivi tal quali (MOLINARI, DEL RE 1978)

Per il Sumisclex ed il Vinclozolin è stato utilizzato il metodo della determinazione del p.a. tal quale come indicato da (2) . con un'unica modifica riguardante l'omogeneizzazione che è stata eseguita con un apparecchio Ultraturrax, miscelando 20 ml di vino + 20 ml di benzene. Non si sono avute variazioni nei risultati rispetto al metodo originale.

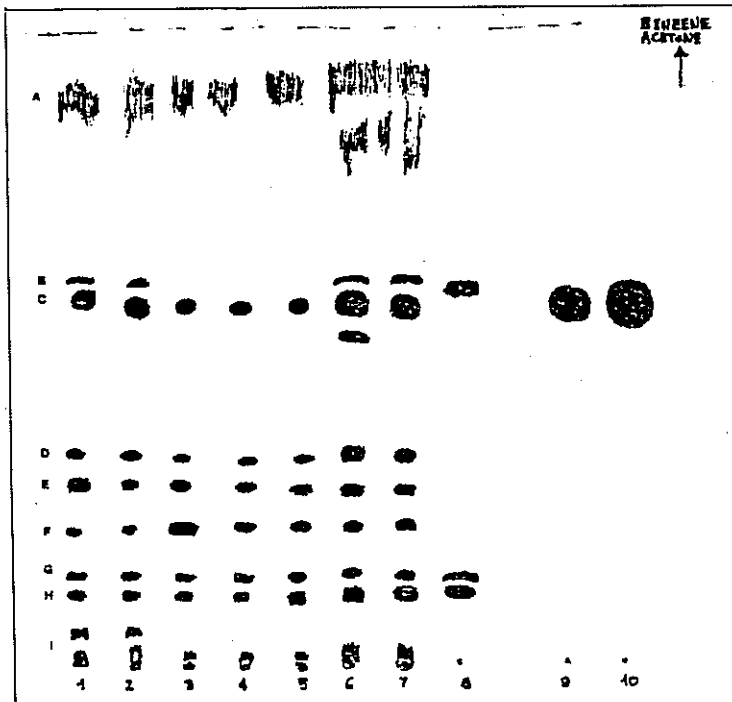


FIGURA N. 1 - CROMATOGRAMMA TLC DI ESTRATTI DA IDROLISI. RIVELAZIONE CON REATTIVO DI DIAZOTAZIONE. - GEL SI 250 μ EF 254

1) Vino + Sumiscles, 2) Vino + Sumiscles, 3) Merlot + 0,25 ppm Vincicrolin,
4) Tocai + 0,25 ppm Vinc., 5) Traminer + 0,25 ppm Vinc., 6) idem c. n. 5 con distillaz.
più prolungata, 7) Merlot + 1 ppm Vinc., 8) Merlot in bianco, 9) 3,5 DCA equivalente
a 0,25 ppm V., 10) 3,5 DCA equivalente a 1 ppm di Vinc. sui campioni di vino.

A) macchia rossastre sul fronte, B) macchie viola, C) m. rosso lilla, D, E, F) m. rosse,
G) m. arancio, H) m. viola, I) m. alla partenza rossastre.
Sono stati depositi, per ogni macchia 100 μ l di estratto + 50 ml di vino idrolizzati e
portati, dopo distillazione a 1 ml di estratto finale;

Tab. n. 4 - Prova di distillazione - recuperi - Colonna DC 200

ppm	con 200 ml raccolti-%	con 250 ml raccolti-%	con 200 ml. raccolti + insufl. di N. - %
0.25	67.4 $\pm$ 16.71	91.9 $\pm$ 14.61	85.9 $\pm$ 9.58
0.50	54.7 $\pm$ 9.61	97.85 $\pm$ 5.27	75.95 $\pm$ 4.71

Media di 4 replicazioni e deviazione standard

Risultati e conclusioni

L'estrazione in continuo a vol. costante (1) non è stata applicata alla GLC, per la
lunghezza dei tempi di analisi: pur dando estratti più puri e la distillazione descritta
all'inizio del lavoro richiede per molti campioni una purificazione prima dell'ana-
lisi GLC ed inoltre la raccolta di una quantità di distillato rigorosamente costante,

che le nostre prove hanno indicato essere 250 ml. Dalla (Tab. 4) si possono osservare le differenze nella resa di distill. e come in particolare l'insufflazione di azoto nel pallone di reazione per accentuare l'asporto dei vapori, con 200 ml raccolti, non sia sufficiente come recupero. — In generale si può osservare come i dati delle distill. (tab. 2 e 4), presentino una notevole variabilità, che riteniamo dovuta soprattutto alla distill. e in parte alla GLC, per le difficoltà di separazione e relativo calcolo dei picchi, alla quale abbiamo cercato di ovviare provando diverse colonne (DC200 ed SE30). — Le percentuali della prova di recupero dalla matrice vino sono > 100 per i vini del '76, cosa che non avviene con quello adoperato per la prova di recupero di distill. e e per la prova di distill. e del p.a. puro (Tab. 2 e 4). — Si può ipotizzare che ciò sia dovuto ad interferenze prodotte da alcune matrici, ipotesi che sembra confermata dalla TLC e dalla GLC (Fig. 2) — Il metodo per la determinazione dei p.a. t.q. valido per stabilire la vera natura dei residui, cioè distinguere tra Vinclozolin e Sumisclex non permette di determinare eventuali prodotti di degradazione in forma coniugata; inoltre è applicabile a campioni prelevati subito dopo il trattamento. — In (Tab. 3) si può notare la consistente differenza del residuo di Vinclozolin ottenuto con i due metodi, in accordo con quanto affermato dal dr. S. Otto (3) che riferisce valori più alti del residuo di Vinclozolin determinato come 3,5 DCA, rispetto alla determinazione t.q. — Non si ritengono validi i valori ottenuti con il metodo colorimetrico e tale procedura non è più adottata perchè fornisce risultati mutevoli al cambiare dei vini ed in generale molto più alti dei valori reali; tale diversità è attribuibile al formarsi di interferenti durante l'idrolisi (Fig. 1). — I valori del Sumisclex sono generalmente più alti di quelli del Vinclozolin per il quale sono sempre più bassi del limite max. per la frutta (O.M.6°/1/79). — In accordo con la comunicazione (3) l'idrolisi dovrebbe essere spinta fino a trasformare totalmente i metaboliti in 3,5 DCA e quindi andrebbe fissato un residuo max. in base alla 3,5 DCA.

TAB. N. 3 — Determinazione dei residui di Vinclozolin e Sumisclex su vini provenienti da uve trattate

VINI	VINCLOZOLIN		metodo colorim.	SUMISCLEX mg/l t.q.
	t.q.	mg/l 3,5 DCA		
1	tracce	0,093	0,170	-
2	0,024	0,118	0,250	-
3	n.d.	0,100	0,180	-
4	0,022	0,057	0,360	-
5	n.d.	0,067	0,360	-
6	0,025	0,077	0,310	-
7	tracce	0,045	0,590	-
8	n.d.	0,092	0,170	-
9	n.d.	0,080	0,180	-
10	n.d.	0,044	0,010	-
11	n.d.	0,050	0,210	-
12	n.d.	0,008	-	-
13	n.d.	0,008	-	-
14	n.d.	0,044	-	-
15	0,027	0,041	0,388	-
16	-	-	-	0,205
17	tracce	0,025	0,423	-
18	-	-	-	0,078
19	-	-	-	0,250
20	0,034	0,040	0,353	-
21	-	-	-	0,168
22	-	-	-	0,200
23	-	-	-	0,153
24	-	-	-	0,185
25	-	-	-	-

Dall'1 al 13 vini del '76, dal 14 al 25 vini del '78, dall'1 all'11 Verdicchio — 12 vigneto confronto — 13 antip. renouperico conf. — 14 Pinot '78 — dal 15 al 21 Verdicchio — dal 22 al 25 Barbera.

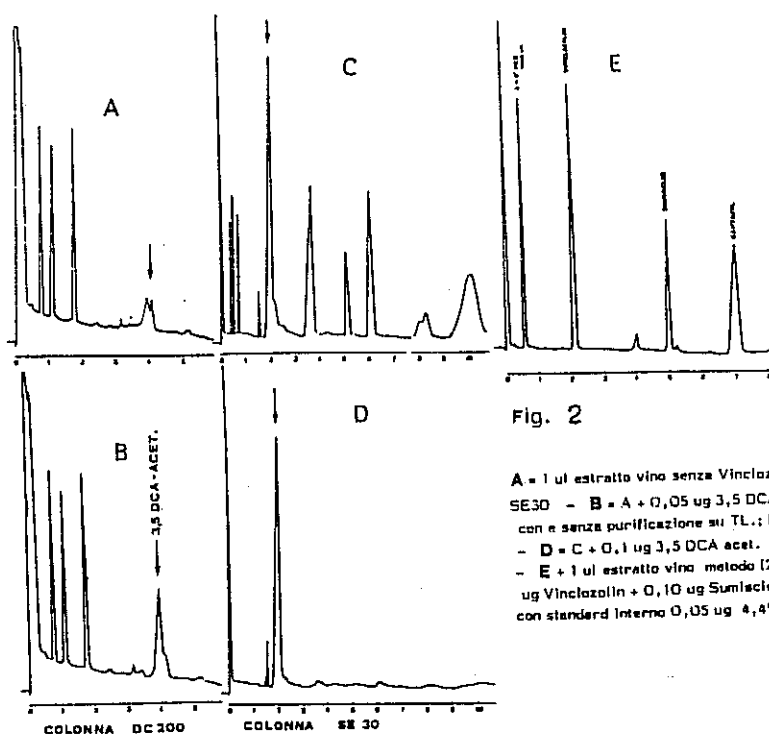


Fig. 2

A = 1 ul estratto vino senza Vinclozolin non purificato su TLC;
SE30 - B = A + 0,05 ug 3,5 DCA - C/D = 1 ul estratto vino
con e senza purificazione su TL.: DC 200
- D = C + 0,1 ug 3,5 DCA acet.
- E = 1 ul estratto vino metodo (2) + 0,05
ug Vinclozolin + 0,10 ug Sumisclex + 0,25 ug Captafol,
con standard interno 0,05 ug 4,4' PCB

RIASSUNTO - SUMMARY

Vengono riportati i dati concernenti i residui di Vinclozolin e Sumisclex in campioni di vino, ottenuti con metodi GLC per i p.a. t.q. e per il derivato 3,5 DCA. Inoltre si riferisce la purificazione TLC applicabile alla matrice vino. - Data concerning Vinclozolin and Sumisclex residues in wine samples are reported, obtained by the use of GLC methods, for a.p. the same and for the derivative of 3,5 DCA. Furthermore purification by TLC applicable to the wine matrix is reported.

BIBLIOGRAFIA

- 1) BARBINA TACCHEO M., BARUZZINI L., SPESSOTTO C. (1978). Determinazione residuo di Vinclozolin in campioni di uva e vino, Atti Giornate Fitopat., 1, 31-37.
- 2) MOLINARI G.P., DEL RE A., (1978). Residui di antibiotritici in uve, mosti e vini, La chimica e l'industria, 9, 705-708.
- 3) OTTO S. (1979). Relazione del Simposio: Chimica degli anticrittogamici - Piacenza, (Università Cattolica del Sacro Cuore. -

- O ° O ° O -

Si ringraziano il dott. Paolo Flori del Centro di Fit. Farm. dell'Università di Bologna e le ditte BASF e SHELL, per la collaborazione prestata.