

SOCIETÀ ORTICOLA ITALIANA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PERUGIA
DIPARTIMENTO DI ARBORICOLTURA E PROTEZIONE DELLE PIANTE

CONVEGNO NAZIONALE

GERMOPLASMA OLIVICOLO E TIPICITÀ DELL'OLIO

5 DICEMBRE 2003

Facoltà di Agraria – Borgo XX Giugno, 74
Complesso Monumentale di S. Pietro - Perugia

Con il contributo finanziario di:

REGIONE DELL'UMBRIA

FONDAZIONE CASSA DI RISPARMIO DI PERUGIA

PARCO TECNOLOGICO AGROALIMENTARE DELL'UMBRIA

CAMERA DI COMMERCIO, INDUSTRIA, ARTIGIANATO E AGRICOLTURA DI
PERUGIA

ASSOCIAZIONE PRODUTTORI OLIVICOLI DI PERUGIA

DETERMINAZIONE INNOVATIVA DEL ROTENONE NEGLI OLI DI OLIVA DA AGRICOLTURA BIOLOGICA MEDIANTE SPETTROMETRIA DI MASSA TANDEM

Caravita M. A. ⁽¹⁾, Di Donna L. ⁽¹⁾, Fusto D. ⁽²⁾, Mazzotti F. ⁽³⁾, Muzzalupo I. ⁽³⁾, Parise A. ⁽³⁾, Perri E. ⁽³⁾, Sindona G. ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Dipartimento di Chimica, Università della Calabria, cubo 12 C 87030 Arcavacata di Rende (CS)

⁽²⁾ Suolo e salute, Sezione Calabria

⁽³⁾ Istituto Sperimentale per l'Olivicoltura, C.da Li Rocchi, 87036 Rende (CS)

Riassunto

Il rotenone, pesticida naturale utilizzato in agricoltura biologica su una grande varietà di colture, è stato determinato quantitativamente mediante Atmospheric Pressure Chemical Ionisation Spettrometria di Massa Tandem (APCI MS/MS) nelle olive e negli oli di oliva ottenuti dopo trattamento in una prova di campo che ha interessato la cv Carolea in Calabria. La tecnica analitica ha previsto la realizzazione di esperimenti "Multiple Reaction Monitoring" (MRM) utilizzando uno standard interno ottenuto per sintesi. Le quantità rilevate sono comprese tra 9 mg/Kg di olio dopo 1 giorno dal trattamento e 0.15 mg/Kg di olio dopo 1 mese circa dal trattamento. Quest'ultimo valore è molto più elevato dei 40 µg/Kg permessi dalla legislazione italiana.

Introduzione

Il Rotenone è un pesticida naturale, contemplato dall'allegato II B del Reg. CEE 2092/91 ed estratto dalle radici di alcune piante leguminose del genere *Derris*, *Tephrosia* e *Longhocharpus*¹. È utilizzato come veleno per i pesci e come insetticida non selettivo su una grande varietà di piante^{2,3}. È considerato moderatamente tossico per gli uomini⁴ visto che la dose letale stimata si attesta tra i 300 ed i 500 mg/Kg. Il rotenone è un inibitore del complesso I della catena respiratoria mitocondriale e, in un esperimento su cavie, ha provocato l'insorgenza di sintomi analoghi a quelli che si osservano a causa del morbo di Parkinson⁵. Il rotenone è usato nella difesa dell'olivo per la produzione di oli di oliva da agricoltura biologica, anche se, in generale, si degrada più lentamente nelle olive che in altri vegetali. Il limite massimo fissato dalla legislazione italiana nelle olive è di 0.04 mg/Kg. La tecnica di spettrometria di massa Elettrospray ionisation (ESI) è stata utilizzata per studiare la frammentazione del rotenone e di alcune molecole derivate e per mettere a punto un metodo di determinazione quantitativa basato sul monitoraggio di una transizione MRM. Come standard interno è stato utilizzato un cicloaddotto ottenuto mediante sintesi che presenta lo ione comune m/z 192 nello spettro MS/MS.

Materiali e metodi

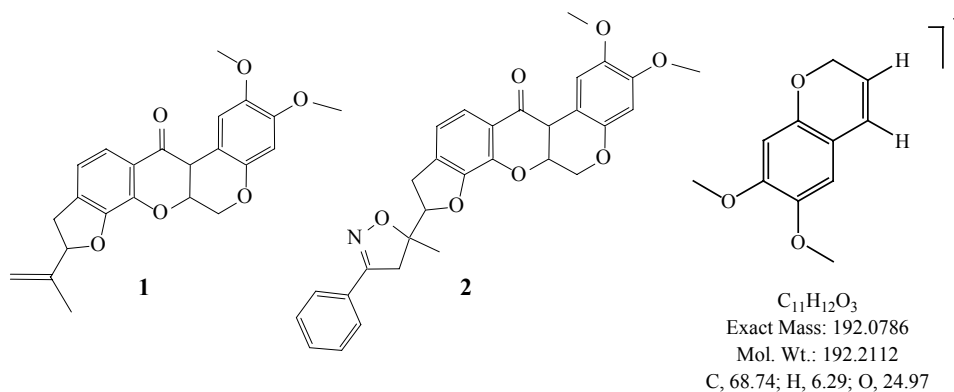
La prova è stata condotta nel corso dell'annata 2003 presso l'azienda Agricola Rossello DO.RA.TO di Palermiti (CZ), da anni coltivati secondo i metodi dell'agricoltura biologica, su piante della cv Carolea. Il campo è stato diviso in due parcelle corrispondenti alla tesi trattata con rotenone (p.c. Rotena, Serbios, 300 g/hl, addizionata di 50 g/hl di olio bianco e 50 g/hl di bagnante) ed acqua. Per irrorare le

piante è stata utilizzata una pompa a volume normale. Il trattamento è stato effettuato alle prime ore del mattino al superamento della soglia di infestazione attiva del 20%, avvenuta il 27.11.03. e non è stato ripetuto in seguito.

L'olio di oliva è stato ottenuto mediante minifrantoio. Il rotenone puro è stato acquistato dalla Sigma-Aldrich; il cicloaddotto usato come standard interno è stato preparato come segue⁶: ad una soluzione sotto agitazione di rotenone (0,5 mM) in benzene a refluxo è stata aggiunta 1 mmole di benzonitrilossido. Dopo due ore il solvente è stato evaporato sotto vuoto ed il grezzo purificato per HPLC (HP 1090, detector UV a 290 nm; colonna RP18 250 X 4.6 mm) utilizzando un gradiente H₂O/CH₃OH. Gli esperimenti ESI sono stati eseguiti su uno strumento ibrido (QqTOF), mentre gli esperimenti di determinazione quantitativa sono stati eseguiti su un triplo quadrupolo operando in condizioni MRM. Il Rotenone è stato estratto dagli oli utilizzando una cartuccia C18: 3 gr di olio di oliva, aggiunti della opportuna quantità di standard interno sono stati omogeneizzati con pochi ml di acetonitrile e caricati sulla cartuccia, il rotenone è stato eluito con altro acetonitrile, portato a secchezza, ripreso ed iniettato direttamente nello spettrometro di massa. Le transizioni utilizzate per gli esperimenti MRM sono state: m/z 395 \rightarrow m/z 192 per il rotenone e m/z 514 \rightarrow m/z 192 per lo Standard Interno. Per la determinazione quantitativa è stata costruita una curva di calibrazione in matrice, utilizzando olio di oliva privo di rotenone, in un range da 0.025 a 0.8 mg/Kg con una quantità di Standard Interno pari a 0.1 mg/Kg.

Risultati e discussione

La chimica in fase gassosa della specie $[M+H]^+$ ottenuta dal rotenone (**1**) e dal cicloaddotto (**2**) è caratterizzata dalla presenza di uno ione a m/z 192 nello spettro MS/MS, quest'ultimo, analizzato all'alta risoluzione, corrisponde ad un catione radicalico di composizione elementare C₁₁H₁₂O₃⁺, dove la struttura corrisponde al catione radicalico 6,7-Dimetossi-2H-1-bezopirano.



Il percorso di frammentazione dalla specie $[M+H]^+$ potrebbe coinvolgere una preliminare eliminazione di un atomo di H per dare la specie M^+ , seguito da un processo di retro Diels-Alder che produce il radicale cationico m/z 192 come picco base.

Lo spettro ESI dell'addotto (**2**), registrato nelle stesse condizioni del rotenone, mostra la specie attesa $[M+H]^+$ a m/z 514 e la specie radicalica a m/z 513. Lo spettro MS/MS di m/z 514 dà la specie m/z 192.

La peculiarità della chimica in fase gassosa del rotenone e del suo addotto è rappresentata dalla formazione del radicale cationico a m/z 192. Le transizioni $[M+H]^+ \rightarrow m/z$ 192 del rotenone e del suo addotto sono altamente specifiche e possono essere utilizzate per applicazioni analitiche relative alla determinazione quantitativa del rotenone in diverse matrici organiche. Nel caso particolare il rotenone è stato determinato in maniera inequivocabile nell'olio di oliva utilizzando come standard interno l'addotto col benzonitrilossido.

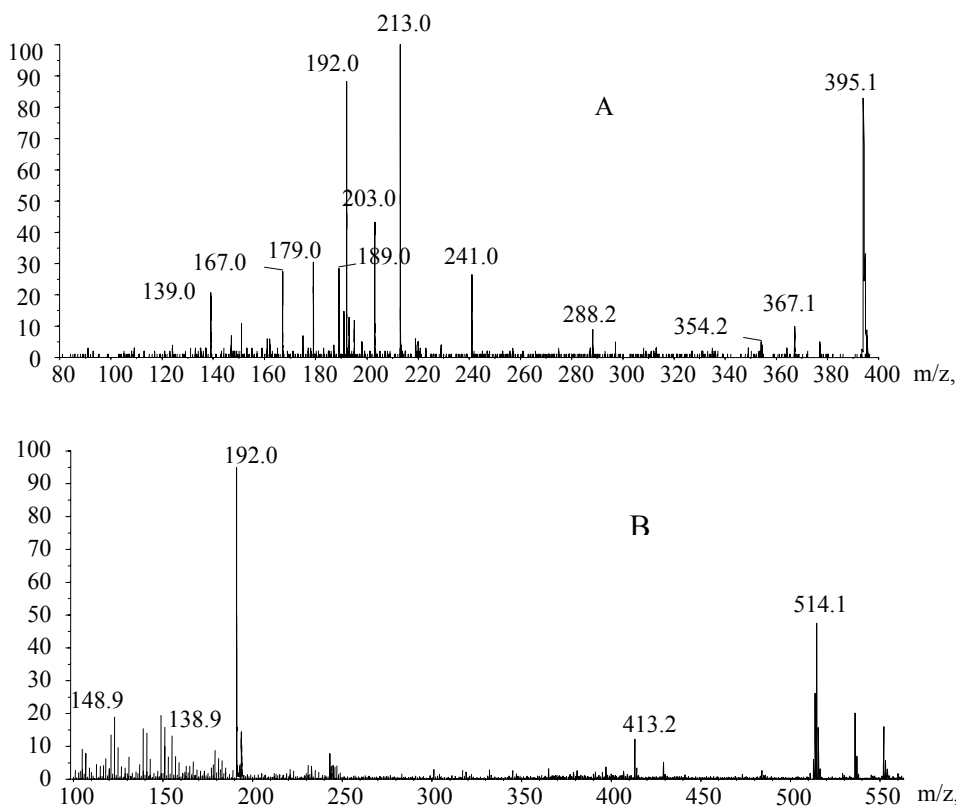


Figura 1. A; Spettro APCI MS/MS del rotenone; B, spettro APCI MS/MS dell'addotto **2**

Per la determinazione quantitativa è stata costruita una curva di calibrazione in matrice, utilizzando olio di oliva privo di rotenone, in un range da 0.025 a 0.8 mg/Kg. Il decadimento del rotenone è stato monitorato nel tempo fino ad un mese dal trattamento.

Il contenuto di rotenone in relazione ai giorni trascorsi dal trattamento è illustrato nella figura 2. In essa si osserva, ad esempio, che, dopo un giorno dal trattamento il contenuto nell'olio era di 9 mg/Kg mentre, a differenza di quanto osservato da Cabras e collaboratori³, dopo 20 giorni il contenuto di rotenone era ancora relativamente alto. Dopo 30 giorni dal trattamento il valore del contenuto di pesticida riscontrato era ancora di 0.15 mg/Kg di olio.



Conclusioni

Dai risultati ottenuti, anche se preliminari, sembra che il tempo di sicurezza del Rotenone debba essere incrementato rispetto a quanto previsto dalla legislazione. Il nuovo metodo analitico sviluppato è più sensibile dei classici metodi HPLC-UV. La risposta del metodo è inequivocabile in quanto le transizioni utilizzate sono specifiche dell'analita. Il metodo di estrazione utilizzato è più rapido della classica estrazione liquido-liquido. Il tempo di analisi è estremamente breve se paragonato al metodo HPLC. Infine, la spettrometria di massa è un valido metodo analitico per la determinazione quantitativa del rotenone nelle olive e negli oli di oliva. Infatti, esso è caratterizzato da maggiore sensibilità e sicurezza nella identificazione molecolare rispetto alle classiche metodologie analitiche riportate in letteratura che utilizzano l'HPLC.

Bibliografia

- Hayes W., 1982. Rotenone and related materials. In: Williams e Wilkins (ED) Pesticides Studies in Man, Baltimore, MD, pp 81-86.
- Crombie L., Whiting D.A., 1998. Biosynthesis in the rotenoid group of natural products: Applications of isotope methodology. *Phytochemistry*. 49: 1479-1507.
- Cabras P., Caboni P., Cabras M., Angioni A., Russo M., 2002. Rotenone residues on olives and in olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 50: 2576-2580.
- Tomlin., CDS, 1997. The Pesticide Manual, 11th ed. In: Farham, U.K., pp 1097-1099.
- Shastri BS., 2001. Parkinson disease: aetiology, pathogenesis and future of gene therapy. *Neuroscience Research* 41: 5-12.
- Quilico A., Speroni G., 1946. *Gazz. Chim. Ital.* 76: 146-166 (b) Just G., Dahl K., 1968. *Tetrahedron* 24: 5251.