

20. I. CAMONI e M. CRUDELI. — **Determinazione delle piretrine biologicamente attive nelle formulazioni insetticide.**

Riassunto. — Viene descritto un metodo per la determinazione delle piretrine biologicamente attive in alcune formulazioni insetticide. Tale metodo consiste nella formazione, separazione cromatografica e successiva valutazione spettrofotometrica dei 2,4-dinitrofenilidrazoni delle piretrine.

Summary. — A method for biologically active pyrethrins determinations in some insecticide formulations, is described. This method consists in the formation, chromatographic separation, and spectrophotometric evaluation of 2,4 dinitrophenylhydrazones of the pyrethrins.

E' nota l'importanza sempre maggiore assunta in questi ultimi anni dagli estratti di piretro, nella preparazione di formulazioni insetticide, ad uso sia domestico che agricolo, dopo un periodo di tempo in cui il loro impiego ha subito un arresto, in seguito alla scoperta dei nuovi insetticidi organici di sintesi.

Il loro crescente consumo è dimostrato dai seguenti dati forniti dal Pyrethrum Board of Kenya, associazione di tipo cooperativistico tra agricoltori in massima parte africani, che detiene l'85% di tutta la produzione e distribuzione mondiale degli estratti di piretro.

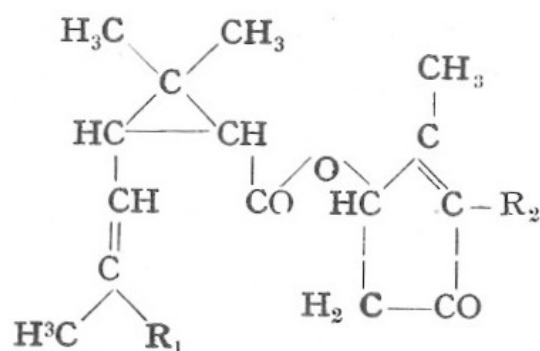
Nel 1935 si ebbe un consumo di 322 ton. di estratto di piretro, che passò a 2550 ton. nel 1954 e a 4075 ton. nel periodo aprile 1958-marzo 1959, fino a raggiungere la cifra attuale, riferentesi al periodo luglio 1960-giugno 1961, di ben 9165 ton. (¹).

Un così largo uso degli estratti di piretro è dovuto alla bassa tossicità da essi manifestata verso l'uomo e i mammiferi, sia per inalazione, che per assorbimento cutaneo, e per ingestione (², ³).

L'attività biologica degli estratti di piretro è dovuta a quattro costituenti: piretrina I, cinerina I (chiamate globalmente « piretrina I »), piretrina II e cinerina II (chiamate « piretrina II »).

La piretrina I e la cinerina I sono esteri dell'acido crisantemico con due chetoalcooli differenti, rispettivamente il piretrolone, per la piretri-

na I, e il cinerolone, per la cinerina I; la piretrina II e la cinerina II sono, invece, esteri dell'acido piretrico con i due chetoalcooli sopracitati.



Piretrina I:	$R_1 = -CH_3$	$R_2 = -CH_2-CH=CH-CH=CH_2$
Piretrina II:	$R_1 = -COOCH_3$	$R_2 = -CH_2-CH=CH-CH=CH_2$
Cinerina I:	$R_1 = -CH_3$	$R_2 = -CH_2-CH=CH-CH_3$
Cinerina II:	$R_1 = -COOCH_3$	$R_2 = -CH_2-CH=CH-CH_3$

La molecola delle piretrine è soggetta a processi di degradazione, dovuti a fattori di polimerizzazione, idrolisi ed altre cause di natura finora sconosciuta, che comportano cambiamenti nel sistema del ciclo-pentenolone ed in quello del ciclopropano (4).

La degradazione delle piretrine è accompagnata dalla perdita dell'attività biologica e porta a prodotti generalmente definiti come « piretrine degradate ».

I metodi di determinazione finora seguiti, benchè lunghi e complicati, e proprio per questo poco riproducibili, portano a risultati non in accordo con l'attività biologica dimostrata dagli estratti di piretro.

Tali metodi si possono così classificare:

- 8 sono basati sul dosaggio degli acidi messi in libertà dalla saponificazione delle piretrine;
- 2 utilizzano la formazione di semicarbazoni dovuta alla presenza del gruppo chetonico;
- 2 sono basati sul potere riducente del piretrolone;
- 3 sono basati sulla riduzione dei sali di mercurio da parte dell'acido crisantemico, e sono quelli più generalmente seguiti (5, 6).

Nessuno dei metodi sopraelencati consente, però, il dosaggio delle sole piretrine non degradate.

La necessità di mettere a punto metodi che consentano un tale dosaggio, sia negli estratti di piretro tal quali, sia nelle formulazioni con essi preparate, riveste, quindi, oltre che un interesse scientifico, anche una grande importanza pratica, per motivi di carattere economico connessi al costo elevato ed all'uso sempre più diffuso di tali prodotti.

Determinazione delle piretrine I e II mediante il metodo DNP modificato da H. J. Smith e adottato presso i Laboratori di Nakuru

1 - ESTRATTO REF/86

Ist. Superiore di Sanità			Nakuru's Laboratories			
Prova N.	% Pir. I	% Pir. II	% Pir. Tot.	% Pir. I	% Pir. II	% Pir. Tot.
1	11,31	8,96	20,27	11,34	8,57	19,91
2	11,25	8,70	19,95	11,19	8,83	20,02
3	11,39	8,77	20,16	11,31	8,95	20,26
4	11,11	8,76	19,87	11,14	8,49	19,63

2 - ESTRATTO DECOLORATO REF I/52

Ist. Superiore di Sanità			Nakuru's Laboratories			
Prova N.	% Pir. I	% Pir. II	% Pir. Tot.	% Pir. I	% Pir. II	% Pir. Tot.
1	4,50	3,52	8,02	4,54	3,54	8,08
2	4,52	3,48	8,00	4,52	3,46	7,98

3 - ESTRATTO DECOLORATO

Ist. Superiore di Sanità				Nakuru's Laboratories		
Prova N.	% Pir. I	% Pir. I	% Pir. Tot.	% Pir. I	% Pir. II	% Pir. Tot.
1	10,73	7,80	18,53	—	—	—
2	10,59	8,25	19,20	—	—	—
3	10,97	7,82	18,79	—	—	—
4	10,74	8,12	18,86	—	—	—

Determinazione delle piretrine biologicamente attive in formulazioni insetticide
Formulazione commerciale contenente il 6% di estratto di piretro al 25% di piretrine,
corrispondente all'1,5% teorico di piretrine totali

Prova N.	Piretrina I ‰	Piretrina II ‰	Piretrine totali ‰
1	0,64	0,28	0,92
2	0,66	0,28	0,94
3	0,66	0,29	0,95

Formulazione commerciale contenente il 16% di estratto di piretro al 25% di
piretrine, corrispondente al 4% teorico di piretrine totali

Prova N.	Piretrina I ‰	Piretrina II ‰	Piretrine totali ‰
1	2,19	1,38	3,57
2	2,07	1,44	3,51
3	2,15	1,43	3,58

Estratto di piretro usato nella preparazione di formulazioni in laboratorio

Prova N.	Piretrina I ‰	Piretrina II ‰	Piretrine totali ‰
1	14,72	9,02	23,74
2	14,50	9,10	23,60

Formulazione preparata in laboratorio, contenente il 10,064% di estratto di piretro
al 23,67% di piretrine, corrispondente al 2,38 teorico di piretrine totali

Prova N.	Piretrina I ‰	Piretrina II ‰	Piretrine totali ‰
1	1,33	0,96	2,32
2	1,82	0,92	2,24

Un metodo originale per la determinazione delle piretrine I e II fu studiato da MOORE (7) ma esso, nella sua primitiva forma, presentava molte limitazioni. Prevedeva la formazione, separazione cromatografica e successivo dosaggio per via spettrofotometrica dei 2,4-dinitrofenilidrazoni delle piretrine, formatisi in condizioni di reazione tali da rendere minima la scissione degli esteri.

Una totale eliminazione delle interferenze prodotte dalle piretrine degradate fu ottenuta da SMITH, modificando il metodo di MOORE sopracitato.

Il metodo di Smith è rapido e riproducibile, e permette la determinazione delle sole piretrine biologicamente attive.

Tale metodo è stato largamente sperimentato nei Laboratori del « Pyrethrum Board of Kenya » di Nakuru e nei Laboratori dei Pesticidi dell'Istituto Superiore di Sanità di Roma, mediante prove di confronto i cui risultati vengono riportati nella Tabella 1.

Tale metodo fu sperimentato, anzitutto, per la determinazione dei costituenti attivi delle piretrine in estratti di piretro puro, e non fu ancora applicato alla determinazione delle piretrine biologicamente attive nelle formulazioni commerciali.

Scopo del presente lavoro è stato, appunto, quello di applicare a tali formulazioni insetticide il metodo ideato dallo SMITH per gli estratti puri, apportando ad esso le modifiche necessarie a renderlo adatto allo scopo.

Le prove sono state condotte su formulazioni provenienti dal commercio e su altre preparate in laboratorio dagli AA., con prodotti tecnici. In questo ultimo caso è stato anche controllato il titolo dell'estratto di piretro usato nella preparazione di tali formulazioni.

I risultati ottenuti, relativi a tali prove, sono riportati nella Tabella 2, e dimostrano i soddisfacenti risultati ottenuti nelle formulazioni esaminate.

Gli AA. si ripromettono di effettuare ulteriori prove, estendendole ad altri tipi di formulazioni attualmente in commercio, comunicandone successivamente i risultati.

PARTE SPERIMENTALE

REATTIVI ED APPARECCHIATURA NECESSARI PER L'ESECUZIONE DEL METODO.

- 2,4-dinitrofenilidrazina - The British Drug Houses Ltd;
- Allumina attivata tipo « H », 100/200 mesh - P. Spence e Sons Ltd, Widnes. Lancs;
- Esano normale per cromatografia - Merck, Darmstadt;

- Alcool etilico 95° per spettrofotometria - C. Erba, Milano;
- Acetato di etile per cromatografia - C. Erba, Milano;
- Alcool metilico per cromatografia - Merck, Darmstadt;
- Etere etilico anidro RP - C. Erba, Milano;
- Soluzione satura di NaCl;
- Acido solforico concentrato;
- Acido cloridrico concentrato;
- Spettrofotometro Beckman D.U. o Unicam SP 500, filtro n. 3, fessura 0,65;
- Colonna cromatografica di vetro, senza rubinetto, diametro mm 11, lunghezza mm 450.

PREPARAZIONE DEI REATTIVI.

Alcool metilico.

L'alcool metilico deve essere esente da sostanze contenenti gruppi carbonilici. A tale scopo si trattano 200 ml di alcool metilico con g 0,5 di DNP e circa 1 ml di H_2SO_4 conc. Si lascia a sè per alcune ore e si distilla due volte, usando una colonna alta cm 40.

Miscela di reazione.

Si mescolano ml 25 di alcool metilico con ml 3 di HCl conc. La miscela, conservata in un matraccio a tappo smerigliato, non deve essere usata prima di 24 ore dalla sua preparazione, e va rinnovata ogni 15 giorni.

Allumina.

g 300 di allumina vengono lavati con acqua, allo scopo di allontanare la parte più fine, e quindi acidificati con ml 3 di HCl conc. Si lascia a sè per 10', agitando occasionalmente. Sul liquido supernatante si controlla l'acidità. Si lava con acqua fino a neutralizzazione. Si lascia seccare in stufa a 100° C per una notte e si pone quindi in essiccatore contenente cloruro di calcio dove si lascia per due giorni.

PREPARAZIONE DELLA COLONNA.

Si pesano g 25 di allumina e con essi si prepara una poltiglia mescolandoli con esano. Si versa la poltiglia nella colonna, dopo avervi posto sul fondo un batuffolo di cotone idrofilo, scuotendone dolcemente le

pareti con un tubo di gomma, in modo da evitare la formazione di bolle d'aria.

Riempita la colonna fino a raggiungere l'altezza di cm 26, vi si introduce un dischetto di carta da filtro, ponendolo a diretto contatto con l'allumina.

Durante la preparazione ed il successivo sviluppo della colonna deve essere presa ogni precauzione per evitare l'introduzione di acqua, che, anche in minima quantità, produrrebbe intasamenti.

PROCEDIMENTO.

In una beuta da ml 50 si pesa una quantità di campione tale da contenere g 0,030-0,035 di piretrine totali che si discioglie in ml 2,5 di etere etilico anidro ed in ml 6,5 di alcool metilico, aggiunto lentamente agitando. Si versano, quindi, nella beuta mg 70 (69-71) di 2,4-dinitrofenilidrazina e ml 1 della miscela di reazione. La beuta, coperta di un panno nero, viene posta in termostato a 25° C, per 3,5 ore, agitando dolcemente di tanto in tanto per i primi 30-45'. Si trasferisce poi la miscela in imbuto separatore da un litro, contenente ml 50 di soluzione satura di NaCl, lavando la beuta con un totale di ml 100-150 di esano e con due porzioni di ml 5 ciascuna di alcool metilico. Si aggiungono, quindi, ml 250 di soluzione satura di NaCl e si agita per 5'. Dopo aver lasciato separare le fasi, si trasferisce quella acquosa in un imbuto separatore da ml 500 e la si estrae per tre volte con ml 50 di esano ogni volta, agitando per 5'.

Si riuniscono le fasi esaniche e si lavano per due volte con ml 30 di soluzione satura di NaCl. Si scarta la fase acquosa e si filtra la fase esanica attraverso cotone idrofilo in una beuta da 500, lavando l'imbuto separatore e il cotone idrofilo rispettivamente con ml 20 e 30 di esano.

L'esano viene quindi evaporato sotto vuoto, mantenendo la beuta in un bagno d'acqua a temperatura non superiore ai 45° C.

Al residuo si aggiungono ml 1,5 di acetato di etile e ml 28,5 di esano e la miscela ottenuta si trasferisce nella colonna. La beuta viene lavata per 5 volte con porzioni di ml 5 di una miscela di acetato di etile ed esano (5:95) che vengono a loro volta trasferite in colonna.

La colonna viene sviluppata con la miscela di acetato di etile ed esano sopra indicata, fino a che le due bande di colore arancione dei fenilidrazoni delle piretrine I e II non siano chiaramente separate. A questo punto si continua lo sviluppo con una miscela al 7,5% di acetato di etile in esano, scartando l'eluato, generalmente colorato in giallo, fino a quando la banda arancione del fenilidrazone della piretrina I non si trovi a circa cm 2 dal fondo della colonna.

Si raccoglie allora l'eluato in pallone tarato da ml 100, provvedendo nel contempo a cambiare la miscela di sviluppo con altra al 10% di acetato di etile in esano.

La zona compresa tra la banda dei fenilidrazoni della piretrina I e della piretrina II viene ripartita a metà tra le due frazioni.

Quando tutto il fenilidrazone delle piretrine I è stato raccolto, si comincia a raccogliere il fenilidrazone della piretrina II, sempre in pallone tarato da ml 100, sostituendo la miscela di sviluppo con una al 20% di acetato di etile in esano. Si continua lo sviluppo fino a completa eluizione della banda.

Gli eluati vengono portati a volume con alcool etilico. Si prelevano ml 5 di essi che, trasferiti in pallone tarato da ml 100, vengono evaporati sotto vuoto. I residui vengono disciolti e portati a volume con alcool etilico.

Si legge quindi allo spettrofotometro la densità ottica a 377 mμ, usando celle da cm 1.

Si procede al calcolo con le formule seguenti:

$$\% \text{ Piretrina I} = \frac{\text{densità ottica}}{\text{peso campione in mg}} \times 2326$$

$$\% \text{ Piretrina II} = \frac{\text{densità ottica}}{\text{peso campione in mg}} \times 2640$$

Desideriamo ringraziare vivamente la Prof.ssa M. E. Alessandrini, che ci ha incaricato di eseguire il presente lavoro e ci è stata larga di consigli ed assistenza.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Chimica.

BIBLIOGRAFIA

- (1) The Pyrethrum Board of Kenya - Annual report (June 1961) Nakuru, Kenya.
- (2) African Pyrethrum Technical Information Bulletin, n. 6 (1961).
- (3) NEGHERBON W. O. - Handbook of toxicology, Vol. 3 - Saunders Co. Philadelphia and London (1959).
- (4) SMITH H. J. - J. Sci. Food Agr., 9: (5) 260 (1959).
- (5) Assoc. offic. agr. Chemists Methods - Washington, VII Ed. (1952) p. 72.
- (6) SEIL H. A. - Soap, N. Y., 23: (9) 131 (1947).
- (7) MOORE B. P. - J. Sci. Food Agr., 5: 500 (1954).

Direttore responsabile: Prof. DOMENICO MAROTTA

Reg. Stampa - Trib. di Roma n. 1334 del 14 luglio 1956