

# DIMETILFUMARATO IN PRODOTTI ESSICCANTI: METODICHE E RISULTATI

Patrizia Stefanelli

Reparto Antiparassitari, Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria,  
Istituto Superiore di Sanità, Roma

## Introduzione

Il DiMetilFumarato (DMF) è un estere dell'acido fumarico che ha trovato applicazione in passato come biocida antimuffa. È una sostanza deumidificante caratterizzata da elevata igroscopicità e potere fungicida. È utilizzato come biocida in alternativa del classico silica gel per evitare il deterioramento dei prodotti in pelle durante il loro trasporto e immagazzinamento in condizioni climatiche di elevata umidità (1).

L'impiego del DMF in Europa non è autorizzato secondo la normativa vigente (2).

A partire dall'anno 2008, il DMF è stato ritenuto la causa di numerosi gravi casi di dermatite allergica associati a contatto con la tappezzeria di divani e poltrone e con scarpe di importazione da paesi monsonici (3-5).

A seguito di queste osservazioni, la Commissione dell'Unione Europea ha emanato nel marzo del 2009 una decisione, la 251 con la quale si impone a tutti gli stati membri di garantire che non vengano immessi e messi a disposizione prodotti contenenti DMF (6). In Italia, a seguito di questa richiesta, il Ministero della Salute ha avviato una capillare attività di vigilanza e controllo sulle merci all'importazione con un occhio di riguardo per i prodotti di provenienza asiatica e su tutto il territorio nazionale. Inoltre ha richiesto alle autorità sanitarie regionali di segnalare tutti i casi di dermatite associati all'esposizione a DMF.

Il Ministero della Salute ha inoltre chiesto al Nucleo AntiSofisticazione dei Carabinieri (NAS) di verificare in ambito nazionale, ai sensi del DL.vo 65/2003 relativo alla classificazione, imballaggio ed etichettatura dei preparati pericolosi, presso i singoli importatori e distributori, la presenza dei dati di composizione relativi alle bustine di materiale essiccante ed ha disposto che in assenza di questi dati tutti gli articoli, con annesse bustine, fossero sottoposti a ritiro dal mercato e a sequestro cautelativo (7). Il Ministero della Salute ha disposto, relativamente agli articoli sequestrati, il campionamento con il criterio di casualità e la valutazione analitica per la determinazione del DMF nelle bustine di gel di silice presso il Reparto Antiparassitari dell'Istituto Superiore di Sanità.

L'attività di analisi/controllo ha interessato 32 province di prelevamento per un totale di 153 campioni di bustine di materiale essiccante.

La Decisione 251 ha fissato un limite massimo di presenza del DMF pari a 0,1 mg/kg di prodotto parte di esso ed ha stabilito che il metodo di analisi dovrebbe essere in grado di quantificare in modo affidabile questo valore di conseguenza il limite di quantificazione (*Limit of Quantification*, LOQ) dovrebbe essere pari o inferiore a 0,1 mg/kg.

Il Decreto Ministeriale (8) di recepimento della suddetta decisione emanato dal Ministero dello Sviluppo Economico d'intesa con il Ministero della Salute, rispetto al metodo di analisi ha assunto una posizione più di cautela se si considera quanto segue: "Il limite di quantificazione deve essere adeguatamente inferiore a 0,1 mg/kg a garanzia dell'affidabilità del risultato".

## Materiali e metodi

Il metodo prevede l'estrazione con solvente mediante l'impiego di un bagno riscaldante ad ultrasuoni, la determinazione gascromatografica (*Gas Chromatography*, GC) con rivelatore a spettrometria di massa mediante un analizzatore a trappola ionica, operante a scansione totale (SCAN), e la determinazione mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) con rivelatore a serie di diodi (*Diode Array Detector*, DAD).

Pesare un'aliquota da saggio vicina a 10 g ( $a \pm 0,01$  g) e aggiungere 10 mL di acetonitrile. Estrarre per 20 min a 60° C in un bagno ad ultrasuoni.

Filtrare la soluzione mediante filtri a membrana, diametro dei pori da 0,45  $\mu\text{m}$ .

I residui di DMF sono determinabili usando un gas cromatografo equipaggiato con un sistema di iniezione splitless e un rivelatore a spettrometria di massa a trappola ionica : Varian System Saturn 2000, dotato di una colonna capillare VF – 35ms (30m x 0,25 mm d.i. x 0,25  $\mu\text{m}$  spessore di fase).

I residui di DMF sono determinabili usando un cromatografo liquido ad alta prestazione equipaggiato con un rivelatore DAD: *Varian System 9012 Q* interfacciato con un rivelatore DAD *Varian 9065 Polycrom*, dotato di una colonna impaccata Nucleosil C18, 250 mm x 4 mm d.i. x 5  $\mu\text{m}$ . Fase mobile: Acetonitrile – Acqua acidificata, in gradiente.

## Risultati e discussione

Il primo *step* è stato quello di mettere a punto un metodo affidabile, semplice e rapido per la determinazione di DMF in silica gel, considerando che a livello bibliografico, fino al 2009, erano disponibili pochissime informazioni (9).

Tests preliminari sono stati condotti per caratterizzare il metodo con le migliori condizioni sperimentali.

Diversi fattori sono stati investigati. In particolare, il solvente e la temperatura di estrazione, e la fase stazionaria della colonna capillare gascromatografica. La Figura 1 mostra una *flowchart* dei singoli passaggi.

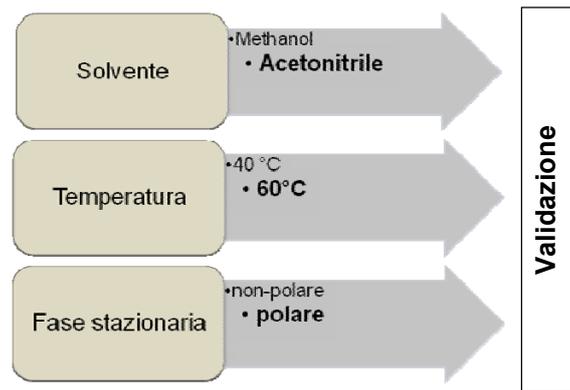
Tra i solventi estraenti, l'acetonitrile è risultato essere più selettivo. Infatti, un elevato numero di composti co-estrattivi potrebbero interferire con l'analisi del DMF nelle bustine di gel di silice.

La presenza negli estratti di elevate concentrazioni di molecole co-eluenti può causare effetti negativi; particolarmente rilevanti quando s'impiega come sistema di rivelazione uno spettrofotometro di massa a trappola ionica.

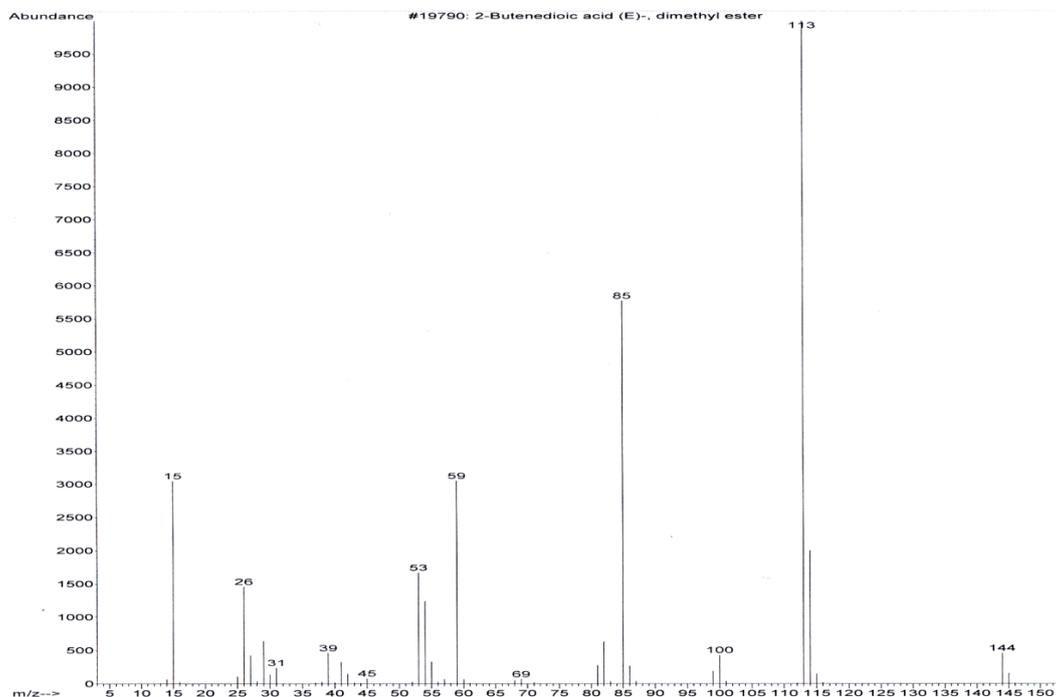
La temperatura di 60°C ha garantito una maggior efficienza di estrazione; mentre una fase stazionaria polare quale la 35% metilfenilpolisilossano (VF-35 ms) ha garantito un'accettabile asimmetria del picco cromatografico con valori di fattore di taglio ( $T = W/2f$ ) pari a 0,88 cioè notevolmente inferiore al criterio di accettabilità ( $T \leq 2$ ) stabilito dalle procedure di controllo qualità per la forma del picco cromatografico (10).

Lo spettro di massa del DMF è molto semplice e caratterizzato da masse molto basse (Figura 2). Il peso molecolare del DMF è 144 (g/mol). L'identificazione è stata focalizzata sulle masse più caratteristiche: 85 m/z, 113 m/z, 114 m/z.

Il 113 m/z è stato scelto come ione di quantificazione.



**Figura 1. Diagramma di flusso dello sviluppo del metodo analitico per la determinazione del DMF in prodotti essiccanti**



**Figura 2. Spettro di massa del DMF**

In considerazione dell'ampio range di concentrazione (fino ad un massimo di 8000 mg/kg) riscontrato nel corso della nostra attività di sorveglianza, parallelamente si è sviluppato un metodo di determinazione strumentale basato su HPLC operante con un rivelatore DAD.

Definito il metodo, si è proceduto alla sua validazione. La validazione del metodo è stata condotta prendendo in considerazione i criteri espressi dalla linea guida SANCO/10684/2009 (11).

Sono state investigate le seguenti caratteristiche prestazionali: specificità, accuratezza, precisione, linearità, limite di rivelabilità e limite di quantificazione, e incertezza della misura.

Il metodo è risultato essere accurato con recuperi medi del 97% condotti al livello di 0,05 mg/kg e 1 mg/kg, e ripetibile con deviazione standard relativa (*Relative Standard Deviation*, RSD) inferiore al 15%. Si è riscontrata una buona linearità con un valore di  $R > 0,9998$  nell'intervallo tra 0,05 µg/mL e 1 µg/mL.

La procedura garantisce una buona specificità con limiti di rivelabilità di 0,02 mg/kg e limite di quantificazione di 0,05 mg/kg (12).

Il metodo impiegato assicura la qualità del risultato, è affidabile e rapido, caratteristica questa molto importante se si considera che, nel corso dell'anno 2009, il Ministero della Salute ha trasmesso all'ISS un totale di 153 campioni che abbiamo provveduto ad analizzare in doppio.

L'attività di controllo ha interessato 32 province di prelevamento distribuite su tutto il territorio nazionale. La percentuale massima ha interessato la provincia di Alessandria con un valore del 27%; seguita da Napoli con il 12%; Cagliari il 6%; Udine, Potenza e Padova con un valore del 5%; Venezia il 4%; Catania, Firenze e Perugia con il 3% mentre le restanti province oggetto di prelevamento mostrano percentuali dell'ordine di 1% e 2% sul totale.

Nella Tabella 1 sono riportate le frequenze e le percentuali di campioni analizzati in ogni singola provincia, caratterizzando la frequenza dei singoli casi in funzione dei livelli di concentrazione riscontrati. Le elaborazioni statistiche sono state ottenute mediante l'applicazione del software di elaborazione statistica STATA.

**Tabella 1. Correlazione tra i livelli di concentrazione e le province di prelevamento espressa in termini di frequenza e percentuale di campioni analizzati**

Province	A	B	C	D	E	F	Totale	
Alessandria	38 90,8	1 2,38	2 4,76	0 0,00	0 0,00	1 2,38	42 100,00	Freq %
Bari	0 0,00	1 50,00	1 50,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	2 100,00	Freq %
Brescia	1 50,00	1 50,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	2 100,00	Freq %
Cagliari	2 22,22	5 55,56	1 11,11	1 11,11	0 0,00	0 0,00	9 100,00	Freq %
Campobasso	2 100,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	2 100,00	Freq %
Catania	2 50,00	2 50,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	4 100,00	Freq %
Cosenza	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	1 100,00	0 0,00	1 100,00	Freq %
Cuneo	0 0,00	0 0,00	3 100,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	3 100,00	Freq %
Firenze	0 0,00	0 0,00	1 20,00	0 0,00	0 0,00	4 80,00	5 100,00	Freq %
Foggia	0 0,00	1 33,33	2 66,67	0 0,00	0 0,00	0 0,00	3 100,00	Freq %
Frosinone	0 0,00	1 100,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	1 100,00	Freq %
Lecce	1 100,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	1 100,00	Freq %
Lecco	0 0,00	1 100,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	1 100,00	Freq %
Lucca	0 0,00	1 50,00	1 50,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	2 100,00	Freq %

segue

continua

Province	A	B	C	D	E	F	Totale	
Matera	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	2 100,00	2 100,00	Freq %
Napoli	7 36,84	8 42,11	3 15,79	0 0,00	0 0,00	1 5,26	19 100,00	Freq %
Oristano	1 33,33	2 66,67	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	3 100,00	Freq %
Padova	5 71,43	1 14,29	1 14,29	0 0,00	0 0,00	0 0,00	7 100,00	Freq %
Pavia	0 0,00	1 100,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	1 100,00	Freq %
Perugia	4 100,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	4 100,00	Freq %
Pordenone	1 100,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	1 100,00	Freq %
Potenza	1 12,50	2 25,00	4 50,00	1 12,50	0 0,00	0 0,00	8 100,00	Freq %
Reggio Calabria	0 0,00	1 100,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	1 100,00	Freq %
Rieti	0 0,00	1 50,00	0 0,00	0 0,00	1 50,00	0 0,00	2 100,00	Freq %
Roma	0 0,00	0 0,00	2 100,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	2 100,00	Freq %
Sassari	1 100,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	1 100,00	Freq %
Teramo	0 0,00	1 50,00	1 50,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	2 100,00	Freq %
Treviso	0 0,00	1 100,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	1 100,00	Freq %
Trieste	1 50,00	1 50,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	2 100,00	Freq %
Udine	5 62,50	1 12,50	1 12,50	1 12,50	0 0,00	0 0,00	8 100,00	Freq %
Venezia	3 60,00	1 20,00	1 20,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	5 100,00	Freq %
Vicenza	1 100,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	1 100,00	Freq %
Totale	77 50,33	35 22,88	24 15,69	3 1,96	2 1,31	12 7,84	153 100,00	Freq %

Intervalli di concentrazione **A**: <0,1mg/kg; **B**: 0,1-1 mg/kg; **C**: 1-5 mg/kg; **D**: 5-10 mg/kg; **E**: 10-30mg/kg; **F**: >30 mg/kg

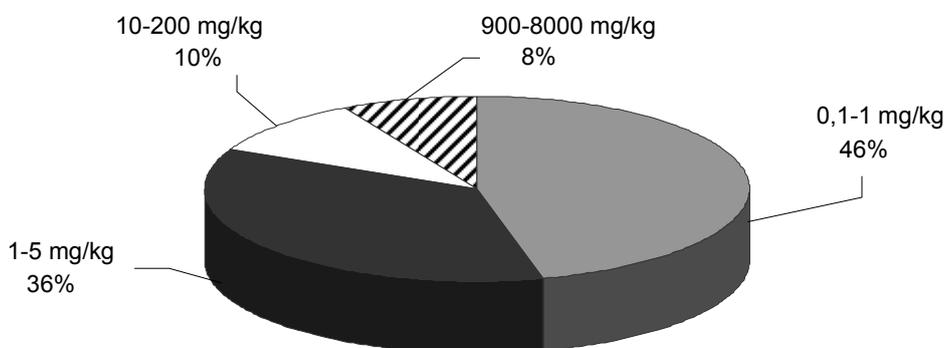
Ad esempio nella provincia di Alessandria sono stati effettuati 42 prelevamenti e dall'analisi dei campioni prelevati in 38 casi sono stati riscontrati livelli di concentrazione inferiori al limite di legge (Limite Massimo, LM: 0,1 mg/kg), in 2 casi è risultata una concentrazione nell'intervallo tra 1-5 mg/kg e in un solo caso sono emersi valori superiori a 30 mg/kg.

Per quanto concerne invece la provincia di Firenze da 5 campioni analizzati è risultata una percentuale di livelli di concentrazione superiori a 30 mg/kg nell'80% dei casi.

Su un totale di 153 campioni solo dodici hanno presentato livelli di concentrazione superiori a 30 mg/kg.

La presenza di DMF maggiore di 0,1 mg/kg è stata rilevata su un numero di 76 campioni, con una concentrazione minima pari a 0,14 mg/kg e una massima di 7145 mg/kg, caratterizzando l'indagine da un ampio range di concentrazione. Il valore di concentrazione medio rilevato è stato 174,6 mg/kg, mentre il valore mediano pari a 1,4 mg/kg.

La preponderanza dei campioni risultati positivi presenta livelli di concentrazione tra 0,1-1 mg/kg con percentuali del 46% e tra 1-5 mg/kg con il 36%. Mentre solo il 10% e l'8%, hanno presentato livelli di concentrazione notevolmente alti, corrispondenti ai due seguenti intervalli di concentrazione: 10-200 mg/kg e 900-8000 mg/kg. Il dettaglio dei risultati è illustrato in Figura 3.



**Figura 3. Livelli di concentrazione di DMF riscontrati in campioni di gel di silice**

## Bibliografia

1. Lammintausta K, Zimerson E, Hasan T, Susitaival P, Winhoven S, Gruvberger B, Beck M, Williams JD, Bruze M. An epidemic of furniture-related dermatitis: searching for a cause. *Contact dermatitis and allergy* 2010;162:108-16.
2. Comunità Europea. Direttiva 98/8/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 16 febbraio 1998 relativa all'immissione sul mercato dei biocidi. *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee* n. L123/1, 24 aprile 1998.
3. Gimenez-Arnau A, Silvestre JF, Mercader P, De la Cuadra J, Ballester I, Gallardo F, PujolR M, Zimerson E, Bruze M. Shoe contact dermatitis from dimethyl fumarate: clinical manifestations, patch test results, chimica analysis, and source of exposure. *Contact dermatitis* 2009;61:249-60.
4. Foti C, Zambonin CG, Cassano, N, Aresta A, Damascelli A, Ferrara F, Vena GA. Occupational allergic contact dermatitis associated with dimethyl fumarate in clothing. *Contact dermatitis* 2009;61:122-4.
5. Davanzo F, Settini L, Stefanelli P, Bartolini G, Barciocco D, Sesana F, Borghini R, Panzavolta G, Fonda A. A case of contact dermatitis to dimethylfumarate in shoes identified in Italy. *Annali Istituto Superiore Sanità* 2010;46(4):366-9.
6. Unione Europea. Decisione della Commissione del 17 marzo 2009 che impone agli Stati membri di garantire che non vengano immessi o messi a disposizione sul mercato prodotti contenenti il Biocida dimetilfumarato. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 74/32 del 20 marzo 2009.
7. Fonda A, Stefanelli P, Girolmetti S, Santilio A, Dommarco R, La Sala L. Prevenzione di dermatidi acute da DMF: vigilanza sui prodotti di importazione. In: *Atti del 44° Congresso Nazionale della Società Italiana di Igiene*. Venezia 3-6 ottobre 2010. p. L207.
8. Italia. Decreto ministeriale del Ministero dello Sviluppo Economico del 13 aprile 2010. Attuazione della Decisione della Commissione europea del 17 marzo 2009, n. 251, inerente disposizioni relative

all'immissione e alla messa a disposizione sul mercato di prodotti contenenti il biocida dimetilfumarato. *Gazzetta ufficiale della Repubblica italiana* 102, 4 maggio 2010.

9. Lamas JP, Sanchez-Prado L, Garcia-Jares C, Llompert M. Determination of dimethyl fumarate in desiccant and mouldproof agents using electron-capture detection. *J Chromatogr A* 2009;1216:5755-8.
10. Center for Drug Evaluation and Research. *Reviewer guidance. Validation of chromatographic methods*. Rockville, MD: CDER US FDA; 1994.
11. European Commission. *Method of validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed*. 2009. (Doc. SANCO/10684/2009).
12. Stefanelli P, Attard Barbini D, Girolimetti S, Santilio A, Dommarco R. Determination of Dimethyl Fumarate (DMFu) in silica gel pouhes using gas chromatography oupled Ion Trap mass spectrometry. *J Health Env Science Part B* 2011;46:341-9.