

METODOLOGIE ANALITICHE PER LA DETERMINAZIONE DEL DIMETILFUMARATO

Patrizia Stefanelli, Silvana Girolimetti, Roberto Dommarco
Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Note introduttive

La metodologia analitica riportata ha lo scopo di determinare il dimetilfumarato in prodotti di materiale essiccante. Il campo di applicazione è valido per concentrazioni $\geq 0,05$ mg/kg.

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 (*full SCAN*) ed in tandem (*MS/MS*, *Mass Spectrometry*), e la determinazione mediante cromatografia liquida (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) con rivelatore a serie di diodi (*Diode Array Detector*, DAD).

Le definizioni sono:

- *Campione di laboratorio*
Campione destinato al laboratorio, costituito da un'aliquota rappresentativa del campione finale.
- *Campione di analisi*
Parte del campione di laboratorio destinata all'analisi.
- *Aliquota da saggio*
Porzione rappresentativa del campione di analisi.

Estrazione con acetonitrile mediante bagno riscaldante ad ultrasuoni

Reagenti e materiali

I reagenti e i materiali impiegati in fase di estrazione dei campioni di analisi sono elencati di seguito:

- Solventi di grado analitico: acetonitrile, ridistillati da apparecchiatura tutta in vetro.
- Materiale di riferimento di dimetilfumarato, Dr. Ehrenstorfer (Ausberg, Germania), con purezza del 99%.
- Filtri Millex a membrana in Durapore (PVDF, 0,45 μ m), forniti dalla Millipore (Bedford MA, USA).

Apparecchiatura e vetreria

Le specifiche tecniche delle apparecchiature e la vetreria utilizzate nella fase estrattiva sono le seguenti:

- Beute con collo smerigliato da 50 mL.
- Bilancia tecnica, $\pm 0,01$ g.
- Bagno ad ultrasuoni riscaldante (Elma GmbH, Germania).

Procedura

Pesare un'aliquota da saggio vicina a 10 g ($a \pm 0,01$ g) in una beuta da 50 mL.

Aggiungere 10 mL di acetonitrile. Estrarre per 20 min a 60 °C in un bagno ad ultrasuoni.

Filtrare la soluzione mediante filtri a membrana prima dell'analisi strumentale (diametro dei pori da 0,45 μm).

Determinazione mediante gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa

I residui di dimetilfumarato sono determinabili usando uno strumento di GC equipaggiato con un sistema di iniezione *splitless* e un rivelatore a spettrometria di massa a trappola ionica (MS - *Ion Trap*).

Il gascromatografo usato è un Varian System Saturn 2000, dotato di una colonna capillare VF-35 ms, 30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 μm spessore di fase.

Le condizioni operative selezionate per l'analisi strumentale mediante la tecnica della gascromatografia interfacciata alla spettrometria di massa sono di seguito riportate:

- *Condizioni di lavoro del gascromatografo:*
 - Gas di trasporto: elio (He) con flusso di 1,0 mL/min fornito con opzione Constant Flow ON.
 - Iniezione tramite autocampionatore CP-8400.
 - Programma di temperatura del forno della colonna:
 - Isoterma iniziale a 60 °C per 2 min.
 - Prima rampa di 10 °C/min fino a 130 °C.
 - Isoterma intermedia a 130 °C per 2 min.
 - Seconda rampa di 20 °C/min fino a 260 °C.
 - Isoterma finale di 20 min.
- *Condizioni di lavoro dello spettrometro di massa:*
 - Tempo di scansione: 0,5 s/scansioni
 - Corrente di emissione: 10 micro amp
 - Temperatura della trappola: 150 °C
 - Temperatura della transfer line: 260 °C
 - Temperatura del manifold: 120 °C
 - Acquisizione in *full SCAN*:
 - Ioni diagnostici: 113 m/z, 114 m/z, 85 m/z
 - Acquisizione in tandem (MS/MS):
 - *Ion parent*: 113 m/z
 - *Ion daughter*: 85 m/z

Determinazione mediante cromatografia liquida HPLC

I residui di dimetilfumarato sono determinabili usando un HPLC equipaggiato con un DAD. HPLC è un Varian System 9012 Q interfacciato con un rivelatore DAD Varian 9065 Polycrom.

Le condizioni operative selezionate per l'analisi strumentale mediante la tecnica della cromatografia liquida HPLC sono:

- *Condizioni di lavoro del cromatografo liquido:*
 - Colonna impaccata Nucleosil C18, 250 mm x 4 mm d.i. x 5 µm
 - Iniezione tramite autocampionatore Varian 9300
 - Loop da 100 µL
 - Fasi mobili: acetonitrile e acqua per HPLC acidificata (0,5% H₃PO₄)
 - In gradiente
 - Flusso 1,0 mL/min

Caratteristiche del metodo

Le caratteristiche prestazionali del metodo sono state determinate in sede di validazione del metodo. Il protocollo di validazione è stato definito secondo i criteri di accettabilità stabiliti dal documento SANCO/10684/2009 (1).

Sono stati valutati i seguenti parametri di qualità:

- Accuratezza
- Precisione
- Specificità
- Range dinamico di linearità
- Limite di determinazione (*Limit Of Detection*, LOD)
- Limite di quantificazione (*Limit Of Quantification*, LOQ)

L'accuratezza e la precisione sono state valutate attraverso l'esecuzione di prove di recupero ripetute e condotte a due livelli di concentrazione (0,05 mg/kg e 1 mg/kg).

La linearità strumentale è stata verificata nel seguente intervallo di concentrazione: 0,05-5 µg/mL. Il metodo è risultato essere accurato con un valore medio di 97% e ripetibile con valori di deviazione standard relativa (*Relative Standard Deviation*, RSD) inferiori al 15%.

Si è riscontrata una buona linearità ($R^2 > 0,9998$). La procedura assicura un elevato grado di specificità con il LOQ identificato nel valore di concentrazione di 0,05 mg/kg ed il limite di determinazione di 0,02 mg/kg.

Stato dell'arte sulle metodologie analitiche

Risultati dell'analisi della letteratura scientifica

Vengono dati in forma tabellare i risultati dello stato dell'arte sulle metodologie analitiche per la determinazione del dimetilfumarato, ottenuti attraverso l'analisi della letteratura scientifica. I dati analitici acquisiti attraverso l'indagine bibliografica sono riportati nella Tabella 1.

Tabella 1. Stato dell'arte sulle metodologie analitiche del dimetilfumarato con tecnica strumentale GC per diversi campioni

Campione/Estrazione	Colonna cromatografica	Rivelatore	LOQ (mg/kg)	Rif. bib.
Prodotti essiccanti				
con solvente (etilacetato)	HP-MSI (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 µm s.f.)	MS – full SCAN	nd	(2)
con bagno ultrasuoni (acetone)	HP-5MS (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 µm s.f.)	MS – full SCAN/SIM*	0,04	(3)
con bagno ultrasuoni (etilacetato)	HP-5 (30 m x 0,32 mm d.i., 0,25 µm s.f.)	µECD**	0,046	(4)
con bagno ultrasuoni (etilacetato)	HP-5 (30 m x 0,32 mm d.i., 0,25 µm s.f.)	MS – full SCAN	0,017	(5)
Prodotti tessili				
con bagno ultrasuoni (acetone)	HP-MSI (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 µm s.f.)	MS – full SCAN	nd	(2)
SPME*** - Spazio di testa	SPB-5 (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 µm s.f.)	MS – full SCAN	nd	(6)
Prodotti in pelle				
SPME*** - Spazio di testa	HP-5MS (30m x 0,25mm d.i., 0,25 µm s.f.)	MS – full SCAN/SIM*	0,05	(3)
con bagno ultrasuoni (etilacetato)	HP-MSI (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 µm s.f.)	MS – full SCAN	nd	(7)
nd	DB-35 (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 µm s.f.)	Tandem MS/MS	nd	(8)

nd: non disponibile * Single Ion Monitoring; ** Electron Capture Detector; *** Solid-phase microextraction

Bibliografia

1. European Commission. *Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed*. 2009. (Doc. SANCO/10684/2009).
2. 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.
3. Narizzano R, Risso F, Venturelli G, Devia C, Carlini E, Maggiolo S. Gas-chromatography-mass spectrometry analysis of dimethyl fumarate in consumer products. *J Chromatogr A* 2009;1216:6762-6.
4. Lamas JP, Sanchez-Prado L, Garcia-Jares C, Llompart M. Determination of dimethyl fumarate in desiccant and mouldproof agents using electron-capture detection. *J Chromatogr A* 2009;1216:5755-8.
5. 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.

6. Lamas JP, Sanchez-Prado L, Regueiro J, Llompert M, Garcia Jares C. Determination of dimethyl fumarate and other potential allergens in desiccant and antimould sachets. *Anal Bioanal Chem* 2009;394:2231-9.
7. 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.
8. Fraga A, Silva R, Filipe P, Scharrer K, Borges da Costa J, Bubbaum P, Marques Gomes M. Allergic contact dermatitis to dimethyl fumarate in footwear. *Contact dermatitis* 2010;62:121-3.