

Determinazione gas-cromatografica dei metaboliti urinari dei cloro derivati dell'etilene

G. VIVOLI, P. BORELLA e M. BERGOMI

*II Cattedra di Igiene, Facoltà di Medicina e Chirurgia,
Università degli Studi di Modena*

Le tecniche analitiche più frequentemente utilizzate per il monitoraggio biologico dei soggetti professionalmente esposti al tri e tetra-cloroetilene sono generalmente circoscritte al dosaggio per via colorimetrica dell'acido tricloroacetico (ATCA) mediante la tecnica di Fujiawara o sue varianti. Poiché tale reazione non è strettamente specifica, sono stati proposti vari metodi gascromatografici che presentano notevoli vantaggi sotto il profilo della precisione e della specificità, anche se talvolta comportano una maggiore complessità analitica e strumentale [1-7].

Nella presente nota viene descritta una metodica gas-cromatografica da noi messa a punto per il simultaneo dosaggio dei due principali metaboliti urinari (ATCA e TCE) del tri e del tetra-cloroetilene.

PROCEDIMENTO ANALITICO

Poiché il TCE è in gran parte coniugato con l'acido glicuronico occorre procedere preliminarmente alla idrolisi enzimatica del campione di urina incubando 0,5 ml di urina in presenza di tampone fosfato (pH 7) contenente 5000 unità Fishman di β -glicuronidasi (da *E.coli*) della Biochemia (pari a 0,1 U.I.) per 12 ore a 25 °C. Successivamente l'urina acidificata a pH 2 con HCl N viene sottoposta a due estrazioni consecutive con 5 ml di etere etilico; la fase eterica, previa disidratazione su solfato di sodio anidro viene concentrata mediante evaporatore ruotante. L'ATCA viene trasformato nel suo estere metilico mediante l'aggiunta di una soluzione eterica di diazometano.

Analisi gas-cromatografica. -- L'analisi gas-cromatografica dell'estratto eterico è stata effettuata impiegando lo strumento Fractovap mod. GI della

Carlo Erba, munito di un rivelatore a cattura di elettroni (Ni^{63}). Dopo numerose prove sono state adottate le seguenti condizioni operative: — colonna cromatografica in vetro silanizzato (lunga 2 m, diametro 6×3 mm); materiale di riempimento: Carbowax 20 M al 10 % su Chromosorb W 60-80 mesh; temperatura della colonna: 125 °C; temperatura dell'evaporatore: 180 °C; temperatura del rivelatore: 200 °C; gas di trasporto: azoto a 60 ml/min; tensione di eccitazione del rivelatore: continua a 20 volt.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI

Nella Fig. 1 è riportato il cromatogramma di un campione di urina di un soggetto professionalmente esposto al tricloroetilene; nelle condizioni operative adottate, si ottiene la registrazione di 2 picchi nettamente separati (costituiti dall'estere metilico dell'ATCA e del TCE) con tempi di ritenzione che non coincidono con nessun componente normale dell'urina.

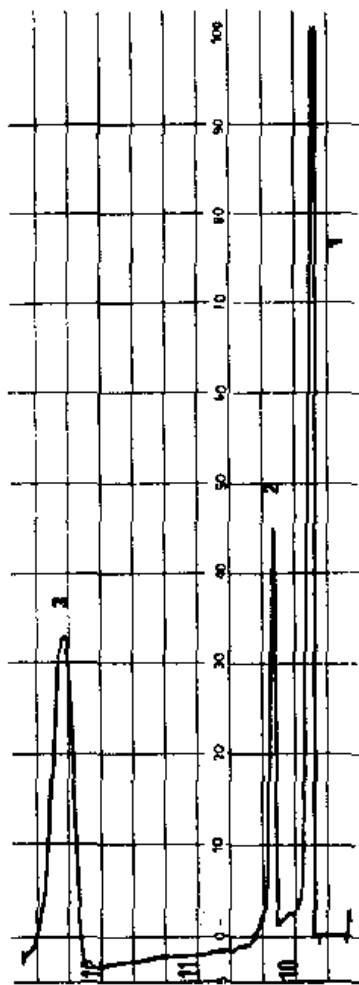


Fig. 1. — Cromatogramma di un estratto di urina di un lavoratore esposto al tricloroetilene:
 1) picco del solvente;
 2) picco dell'ATCA;
 3) picco del TCE.

Per controllare l'efficienza del procedimento analitico sono state addizionate ad uguali aliquote di urina (di un soggetto non professionalmente esposto) quantità scarsi di ATCA e di TCE comprese tra 0 e 60 mg/l. Osservando la Fig. 2 in cui sono raffrontate le curve di taratura ottenute esaminando i campioni di urina addizionati di quantità scarsi dei due metaboliti e quelle ricavate con la diretta introduzione nel gas-cromatografo delle soluzioni standard in etere di ATCA e di TCE, si può rilevare come esse siano praticamente sovrapponibili, il che deponere per un recupero pressoché totale dei due composti aggiunti all'urina, nell'intervallo tra 0 e 60 mg/l.

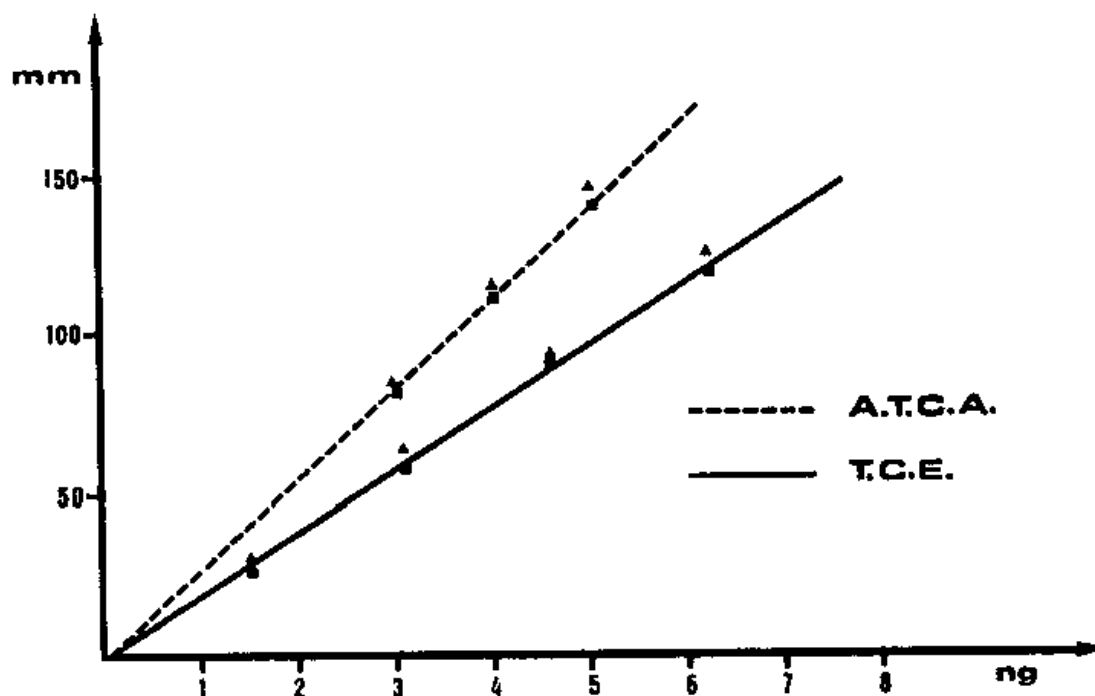


Fig. 2. — Curva di taratura ottenuta con concentrazioni scarsi di ATCA e di TCE addizionati ad una urina di un soggetto non esposto (■) e con soluzioni in etere di tali metaboliti (▲).

Onde verificare la riproducibilità della metodica è stato analizzato per 5 volte lo stesso campione di urina di un lavoratore esposto. Come risulta dalla Tab. I gli scarti registrati tra i vari estratti analizzati sono risultati di entità molto modesta.

In via preliminare abbiamo altresì studiato le condizioni ottimali per ottenere la completa « scissione enzimatica » del legame diestereo tra il TCE e l'acido glicuronico. Le prove eseguite utilizzando quantità scarsi di β -glicuronidasi, hanno documentato che per la totale liberazione del TCE coniugato sono sufficienti, nelle condizioni di incubazione adottate, 5000 U. Fishman di enzima (Fig. 3).

TABELLA I

Valori ottenuti esaminando
5 volte lo stesso campione di urina

N.	ATCA (mg/l)	TCE (mg/l)
1.	90,5	58,5
2.	88,2	56,0
3.	92,0	59,5
4.	87,1	54,8
5.	90,3	57,0
MEDIA	89,62	57,16
D.S.	1,95	1,88
C.V.	2,18	3,30

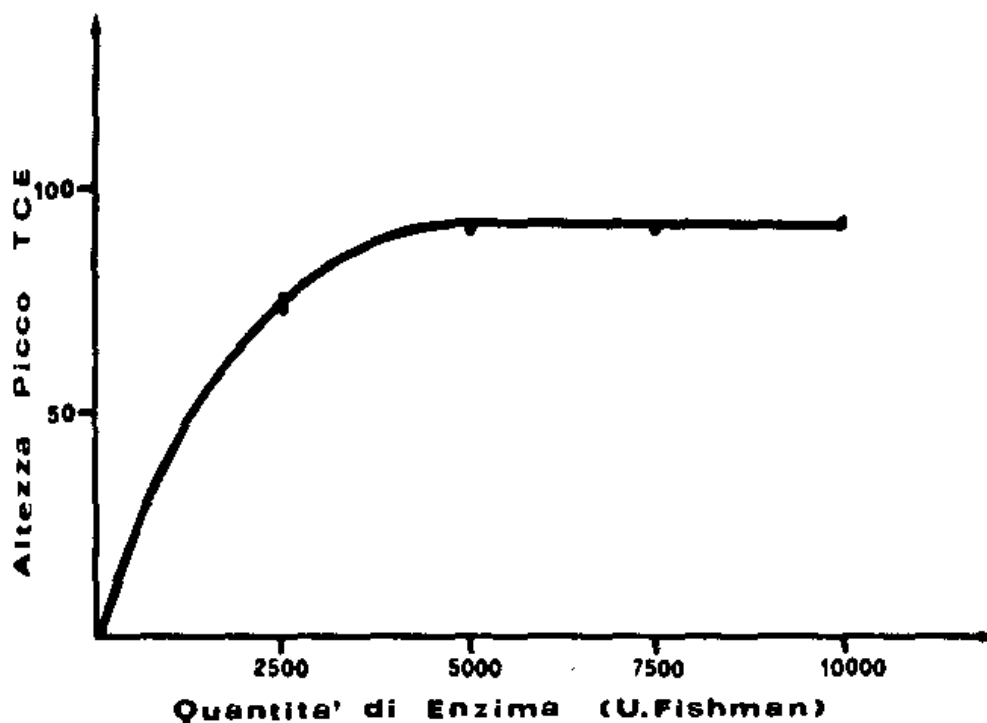


Fig. 3. — Cinetica dell'idrolisi enzimatica del TCE coniugato.

Per verificare l'efficienza del processo estrattivo sono state analizzate separatamente le fasi eteree al termine di ogni singolo processo estrattivo con 5 ml di solvente; con il primo estratto vengono recuperati oltre il 90 % dei metaboliti presenti nel campione di urina, mentre con la seconda estra-

zione viene trasferita la restante aliquota di ATCA e di TCE; del tutto superfluo si è dimostrato il terzo procedimento estrattivo.

La tecnica di determinazione dei metaboliti urinari del tri e del tetracloroetilene da noi messa a punto sembra presentare una serie di vantaggi rispetto a molte delle metodiche analitiche finora descritte; essa consente infatti il simultaneo dosaggio dell'ATCA e del TCE con un procedimento relativamente semplice, riproducibile e strettamente specifico. Alcune delle metodiche proposte da vari AA. prevedono invece il dosaggio del solo ATCA [1] od il ricorso a procedimenti estrattivi separati per i vari metaboliti [2, 4, 7]; altre tecniche sono fondate sulla decarbossilazione dell'ATCA in cloroformio o sull'impiego del metodo dello spazio di testa [3] che comportano ugualmente il ricorso a procedimenti separati per i due principali metaboliti.

La misura di ambedue i metaboliti consente di stimare più correttamente il grado di esposizione professionale al tri ed al tetracloroetilene, in quanto le concentrazioni urinarie di ATCA e di TCE ed il loro rapporto di escrezione variano in funzione della durata dell'esposizione e dei livelli ambientali di tali solventi alogenati. Il monitoraggio biologico di molti lavoratori professionalmente esposti a tali solventi alogenati ha dimostrato l'affidabilità della metodica proposta; in particolare è stato documentato, a conferma di analoghe osservazioni di Ikeda e Coll. [7], che la metabolizzazione del tetracloroetilene porta alla escrezione, oltre che di ATCA, anche di TCE, sia pure in concentrazioni sensibilmente inferiori a quelle derivanti dal catabolismo del tricloroetilene.

BIBLIOGRAFIA

1. EHRNER-SAMUEL, H., BALMER, K. & THORSELL, W. 1973. Determination of TCA in urine by a gaschromatographic method. *Am. Ind. Hyg. Ass. J.* **34**: 93-96.
2. OGATA, M. & SACKI, T. 1974. Measurement of chloral hydrate, trichloroethanol, trichloroacetic acid and monochloroacetic acid in the serum and the urine by gas-chromatography. *Int. Arch. Arbeitsmed.* **33**: 49-58.
3. BREINER, D.D., KETELAARS, H.C. & VAN ROSSUM, J.M. 1974. Gaschromatographic determination of chloralhydrate trichloroethanol and trichloroacetic acid in blood and in urine employing head space analysis. *J. Chromat.* **88**: 55-63.
4. BUCHET, Y.P., LAUWERYS, R. & ROELS, H. 1974. Le dépistage par chromatographie en phase gazeuse des metabolites urinaires du trichloréthylène: l'acide trichloroacétique et le trichloroéthanol. *Arch. Mal. Profess. Med. Trav. Sécur. Soc.* **3**: 395-402.
5. VESTERBERG, O., GORCZAK, J. & KRASTS, M. 1975. Methods for measuring TCE and TCA in blood and urine after exposure to tri. *Scand. J. Work. Env. Hlth.* **1**: 243-248.

6. HUMBERT, B.E. & FERNANDEZ, J.G. 1976. Simultaneous determination of TCA and TCE by G.C. *Int. Arch. Occup. Env. Hlth.* **36**: 235-241.
7. NOMIYAMA, H., NOMIYAMA, K. & UCHIKI, H. 1978. Gas-liquid chromatographic determination of trichloroethylene metabolites in urine. *Am. Ind. Hyg. Ass. J.* **39**: 506-510.
8. IKEDA, M., OHTSUJI, H., IMAMURA, T. & KOMOIKE, Y. 1972. Urinary excretion of total trichloro-compounds, trichloroethanol and trichloroacetic acid as measure of exposure to trichloroethylene and tetrachloroethylene. *Br. J. Ind. Med.* **29**: 328-333.