

Polineuropatie tossiche nei calzaturifici: aspetti preventivi

C. CARAPELLA

Ispettorato Medico del Lavoro, Roma

Le polineuropatie tossiche costituiscono un'entità tecnopatica che ha assunto, specie negli ultimi anni, un rilievo preminente nel settore calzaturiero, sia per la vasta categoria di lavoratori che sono esposti al rischio professionale, sia per le particolari condizioni di carenza igienico-sanitaria degli ambienti di lavoro, sia per i riflessi economico-sociali particolarmente incidenti in aziende, prevalentemente, di tipo piccolo e medio quali sono quelle operanti nel settore considerato.

L'incidenza di queste manifestazioni morbose è stata notevole nella regione Marche dove operano oltre 30.000 lavoratori in circa 5000 aziende nel settore calzaturiero.

Scopo della presente nota è quello di portare un contributo di patologia professionale riferendo alcune osservazioni basate sul ripetuto riscontro di alcuni fattori etiopatogenetici che sono alla base delle polineuropatie verificatesi fra le maestranze del settore industriale dei calzaturifici della provincia di Macerata, nel periodo decorrente dal 1970 al 1973, al fine di stabilire un criterio orientativo per la valutazione del nesso di causalità per quanto concerne la responsabilità patogena del materiale usato nella lavorazione, nonché di indicare i sistemi di prevenzione atti ad evitare od a ridurre il rischio.

Nel corso di una indagine igienico sanitaria condotta presso 19 calzaturifici occupanti complessivamente 1264 dipendenti, si è riscontrato in 32 soggetti una sindrome morbosa di tipo polineuritico con andamento epidemiologico sovrapponibile per l'anamnesi lavorativa, per il periodo stagionale di insorgenza, per le manifestazioni cliniche, per il decorso, per le condizioni ambientali a cui i soggetti erano esposti, specie in relazione ai fattori di inquinamento.

I lavoratori colpiti appartengono ad entrambi i sessi: 16 donne, 16 maschi (Tab. 1).

Il fenomeno tossico ha interessato nelle varie aziende talora collettivamente un gruppo di lavoratori, talora un singolo lavoratore, con manifestazione dei disturbi quasi sempre nello stesso periodo stagionale. Infatti la maggior parte dei casi si sono verificati durante i mesi di marzo-aprile.

TABELLA 1

Lavoratori intossicati nei calzaturifici delle Marche

N. ord.	S E D E	Lavorazioni industriali	Forza lavorativa		Numero dei casi	
			M.	F.	M.	F.
1	Civitanova Marche	Calzaturificio	3	7	1	5
2	Civitanova Marche	Calzaturificio	2	3	—	1
3	Civitanova Marche	Calzaturificio	2	2	1	—
4	Monte S. Giusto	Calzaturificio	170	60	1	—
5	Monte S. Giusto	Calzaturificio	50	25	1	—
6	Monte S. Giusto	Calzaturificio	28	10	1	—
7	Montecosaro	Calzaturificio	60	55	2	—
8	Civitanova Marche	Calzaturificio	15	10	1	—
9	Civitanova Marche	Calzaturificio	8	3	1	—
10	Civitanova Marche	Calzaturificio	8	4	1	4
11	Civitanova Marche	Calzaturificio	5	5	1	—
12	Civitanova Marche	Calzaturificio	80	90	2	1
13	Petriolo	Calzaturificio	15	3	1	—
14	P.P. Piceno	Calzaturificio	87	121	—	1
15	Civitanova Marche	Calzaturificio	1	13	—	2
16	Civitanova Marche	Calzaturificio	18	5	1	—
17	S. Severino	Calzaturificio	37	132	—	1
18	Corridonia	Calzaturificio	18	19	1	—
19	Matelica	Calzaturificio	67	123	—	1
TOTALE . . .					16	16

Si riporta la casistica dalla quale si può desumere il rapporto esistente fra la forza lavorativa di ogni singola azienda ed i casi di intossicazione manifestatisi.

Per quanto concerne le caratteristiche della sindrome morbosa, queste non si discostano da quelle ormai note. Le manifestazioni cliniche presentate dai soggetti colpiti consistono, nella forma conclamata, in una paralisi simmetrica di tipo periferico, in genere senza sintomi estranei al sistema nervoso. Le paralisi colpiscono gli arti superiori ed inferiori, ma sono più accentuate ai segmenti distali degli arti inferiori. I sintomi iniziali sono caratterizzati da parestesie agli arti (senso di freddo, formicolio), astenia con progressiva

diminuzione della forza muscolare degli arti, specie inferiori, difficoltà dei movimenti di flessione-estensione delle gambe sulle cosce, con deambulazione progressivamente difficoltosa. I segni prodromici di anoressia, disturbi gastrici, cefalea, sono scarsamente evidenziabili. Obiettivamente, nella fase conclamata, si riscontra ipoariflessia rotulea, achillea e medioplantare, ipotonia simmetrica alle prove di Mingazzini e Barré, raramente ipoestesia tattile a carico della parte superiore delle gambe. Questa fase può permanere per lungo tempo invariata od attenuarsi fino a scomparire o precipitare nelle paralisi flaccide.

Gli esami ematologici sono negativi. Oscillometria, pletismografia, esame EEG, negativi. Non si osserva febbre. All'esame elettromiografico risulta assenza di reazione elettrica degenerativa. L'evoluzione della sindrome è lenta ed i fenomeni neuritici sono reversibili. Dopo alcuni mesi si perviene alla guarigione clinica nelle forme conclamate, mentre le forme iniziali scompaiono, dopo breve tempo, con l'allontanamento dal lavoro. Tuttavia spesso si hanno postumi di atonia e di astenia degli arti che, pur permettendo l'attività motoria, ne rallentano la funzione per un periodo di tempo variabile che può durare anche qualche anno.

Al fine di evidenziare l'etiopatogenesi della sindrome morbosa descritta, si svolgeva un'indagine igienico-sanitaria intesa a stabilire il nesso di causalità basato sull'anamnesi lavorativa (Tab. 1). Pertanto l'indagine è stata rivolta a considerare i seguenti fattori:

- 1) definizione dell'etiopatogenesi tossica;
- 2) valutazione dei fattori qualitativi e quantitativi di rischio in relazione al ciclo tecnologico di produzione, alla composizione e natura del materiale usato ed all'inquinamento dell'ambiente di lavoro.

Definizione dell'etiopatogenesi tossica

Per quanto riguarda l'etiopatogenesi tossica, la prima, e per molti aspetti ancor valida, ipotesi fu che l'agente tossico fosse identificabile in un plastificante contenuto nei mastici, nelle vernici, nelle lacche cellulosiche delle pelli naturali ed artificiali, nella gomma: il triortocresilfosfato (TOCP).

Quantità da 0,5 a 2 g di TOCP sono ritenute sufficienti a provocare negli uomini gravi manifestazioni morbose. Tuttavia, le ricerche condotte da vari Enti specializzati ed Istituti Scientifici non hanno portato alla dimostrazione della presenza del TOCP in quantità tale da giustificare la insorgenza dell'intossicazione. Si è dimostrato che solo nella verniciatura alla nitrocellulosa delle pelli le vernici contengono una miscela plastificante composta da tricresilfosfato, ma le pelli rifinite alla nitro si usano solo per articoli di pelletteria e non per calzature.

L'attenzione si è spostata verso altre sostanze soffermandosi sul gruppo degli idrocarburi paraffinici (esano, etilpentano, eptano, ecc.), ciò particolarmente a seguito della descrizione di casi di polineurite da esano di AA. francesi, giapponesi, americani [1-4]. L'esano, idrocarburo alifatico saturo, risulta pressoché sempre presente nei mastici utilizzati presso le aziende oggetto della nostra indagine. Esso si trova in percentuali variabili, ma che arrivano sino al 60-70 % del solvente. L'esano è responsabile, nella forma di intossicazione cronica, di turbe gastroenteriche e di alterazioni neurologiche sovrapponibili a quelle già descritte.

In considerazione delle ipotesi che le polineuriti tossiche potessero essere attribuite ad inalazioni di vapori di esano, si è rivolta l'attenzione a conoscere qualitativamente e quantitativamente gli inquinanti ambientali. A tal fine sono stati esaminati i vari posti di incollaggio presso cui sono stati effettuati prelievi di aria per la determinazione di sostanze volatili. Si è utilizzato il metodo gascromatografico. Il valore MAC (500 ppm) relativo alle concentrazioni di idrocarburi alifatici è risultato sempre superato in corrispondenza dei posti di lavoro ove si effettuano operazioni di incollaggio delle calzature: si è dimostrata la presenza di costanti ed elevati livelli di inquinamento dell'aria con sostanze riferibili ad idrocarburi alifatici a sei, sette, otto atomi di carbonio (C6, C7, C8) cioè ai prodotti comunemente noti come « etere di petrolio e benzina ».

Valutazione dei fattori qualitativi e quantitativi di rischio

Per quanto concerne i fattori qualitativi e quantitativi di rischio in relazione alle condizioni ambientali, l'indagine è stata rivolta alla:

a) identificazione dei singoli posti di lavoro esponenti a rischio di inalazione di vapori nocivi;

b) determinazione e valutazione del contenuto nel materiale e nell'aria di N-esano e cicloesano;

c) rilevazione dei dati relativi alle caratteristiche costruttive degli ambienti di lavoro. Determinazione dei valori microclimatici ambientali;

d) rilevazione dei dati relativi all'organizzazione del lavoro: servizi igienico assistenziali, effettuazione dei controlli sanitari preventivi e periodici, misure di igiene personale adottate dalle maestranze.

a) Per quanto concerne l'esposizione a rischio relativo ai posti di lavoro, è stata rivolta l'attenzione alle operazioni che comportano uso di collanti, operazioni differenziabili in base al tipo di collante usato, alle caratteristiche dei contenitori, alla struttura e disposizione del posto di lavoro, alla geometria dei pezzi trattati, ai tempi e ritmi di lavoro, alla posizione di lavoro. Tutti questi fattori determinano il rischio specifico, in base alla natura del tossico ed alle modalità di assorbimento.

L'operazione che maggiormente espone a rischio è quella di incollaggio delle varie parti della calzatura.

I posti di lavoro dove si effettua tale operazione consistono in un normale piano per lo più dislocato, nella fase di montaggio delle calzature, lungo la manovra dove sono posti ad essiccare i fondi e le tomaie nella fase di assemblaggio. Durante queste fasi di lavorazione si ha continua evaporazione di solvente per cui si attua la maggiore esposizione ad inalazioni di vapori tossici. Grande importanza assume la geometria dei pezzi trattati perché la quantità dei vapori sviluppati è in diretto rapporto con la superficie dei pezzi masticiati, oltre che con il numero dei pezzi incollati nell'unità di tempo. Per quanto riguarda la durata di esposizione, bisogna distinguere la masticiatura effettuata nell'intero turno di lavoro e quella discontinua alternata con operazioni di preparazione, di assemblaggio e di rifinitura del manufatto. Tuttavia, nelle aziende considerate, poiché il tipo di lavorazione è a ciclo continuo e le varie fasi operative avvengono in un unico ambiente di lavoro, l'esposizione ai vapori di solventi interessa la maggior parte dei lavoratori qualunque sia la mansione da essi svolta.

b) Per quanto riguarda i tipi di collante, questi variano in base ai gruppi di solventi in essi contenuti di cui al D.P.R. 19 marzo 1956, n. 303, dichiarati dal fabbricante:

- gruppo 30 (etere di petrolio e benzina);
- gruppo 38 (derivati alogenati degli idrocarburi alifatici);
- gruppo 39 (acetone e derivati alogenati);
- gruppo 41 (esteri);
- gruppo 40 (alcoli);
- gruppo 33 (idrocarburi benzenici).

Dall'indagine effettuata è risultato che i collanti maggiormente usati presso le aziende considerate sono costituiti da solventi classificati al gruppo 30 (eteri di petrolio e benzina).

Si riporta la composizione quali-quantitativa di 2 campioni dei mastici prevalentemente usati presso i calzaturifici oggetto dell'indagine (Tab. 2).

Nei prodotti, esaminati mediante metodo gascromatografico, non è presente triortocresilfosfato, mentre invece si rileva una considerevole percentuale di esano e di cicloesano. Nel secondo campione è presente toluolo al 5,9 %.

Per valutare la dispersione del *n*-esano e cicloesano nell'aria ambiente sono stati effettuati prelievi di campioni di aria in corrispondenza dei posti di lavoro dove si presumeva la formazione dei vapori, e si è evidenziato, sia mediante metodo colorimetrico Draeger sia mediante analisi gascromatografica, la presenza di *n*-esano e cicloesano in percentuali che superavano largamente i valori del MAC (500 ppm).

TABELLA 2

Composizione qualitativa e quantitativa di due campioni di mastici^(a)

Materiale	Composizione	% (*)
1) Mastice tipo a) (83,5% solvente) . .	2-metilpentano	13,8
	3-metilpentano	14,8
	Esano normale	54,2
	2,4-dimetilpentano	13,2
	Cicloesano	1,2
	Cloroformio	0,4
	Tricloroetilene	2,4
2) Mastice tipo b) (75,2% solvente) . .	2-metilpentano	2,2
	3-metilpentano	2,2
	Esano normale	9,2
	2,4-dimetilpentano	1,7
	Cicloesano	32,0
	Etilacetato	37,3
	Metiletilchetone	9,0
	Tricloroetilene	1,3
	Toluolo	5,1

(a) Dati forniti dell'ENPI.

Come si nota, il normal-esano è contenuto nella percentuale del 54,2 % nel primo mastice, mentre nel secondo mastice il cicloesano è contenuto per il 32 % e l'esano normale per il 9,2 %. Sono le percentuali più elevate in solvente contenute nei mastici usati. Il normal-esano oltre che rappresentare un parametro quantitativamente incidente, rappresenta anche un parametro di notevole diffusibilità nell'ambiente a causa della sua elevata volatilità.

c) Per quanto concerne i requisiti igienico-ambientali, altezza, superficie e cubatura dei locali di lavoro, anche se sono rispettati i limiti minimi previsti dall'art. 6 del D.P.R. 303, c'è da osservare che tali valori minimi non sono sempre idonei ad evitare un oggettivo sovraffollamento dei locali ed una sufficiente diluizione delle sostanze volatili presenti. Spesso i locali di lavoro sono ingombri da materiale di lavorazione.

TABELLA 3

**Contenuto in esano e cicloesano nei solventi
di collanti usati nei calzaturifici (a)**

CAMPIONI	% di n-esano	% di cicloesano
Solvente 5024	60,1	—
Solvente 5025	53,7	2,7
Solvente 5026	54,5	3,7
Solvente 5027	21,0	49,3
Solvente 5028	62,4	—
Solvente 5029	27,2	25,9
Solvente 5030	60,0	—
Solvente 5031	62,5	—
Solvente 5032	14,2	55,0
Solvente 5033	60,4	—
Solvente 5034	64,4	4,1
Solvente 5035	5,6	—
Solvente 5036	17,7	1,0
Solvente 5037	66,5	1,5
Solvente 5038	—	78,2
Solvente 5039	30,2	36,9

(a) Dati forniti dall'Istituto Superiore di Sanità.

Non esiste separazione dei locali ove si effettuano lavorazioni nocive perché il ciclo tecnologico è di tipo continuo. La ventilazione è quasi sempre assicurata per via naturale, ma le finestre sono tenute quasi costantemente chiuse nella stagione fredda, con aperture disposte irrazionalmente. I locali sono sempre riscaldati con verosimile aumento del processo di evaporazione dei solventi. I sistemi di depurazione ambientale non esistono o funzionano in modo incongruo.

Pertanto le condizioni igienico-ambientali sono carenti non solo per il difetto di ventilazione naturale, ma anche per la mancanza di qualsiasi sistema di depurazione atto a limitare la dispersione nell'ambiente dei solventi che evaporano dai materiali lavorativi, ovvero atti a convogliare i vapori stessi all'esterno.

d) Per quanto concerne le condizioni igienico-sanitarie:

— i controlli sanitari, quando non sono disattesi, sono effettuati in modo irregolare senza rispetto della periodicità e senza essere corredati dai necessari

esami specialistici. Quasi sempre detti controlli sono eseguiti da medici non esperti in medicina del lavoro;

– i mezzi di profilassi individuale (abiti di lavoro, maschere, guanti, pomate barriera) non vengono adottati;

– le misure di igiene personale non sono osservate. Si riscontra tra le maestranze una sensibile carenza di educazione sanitaria, per cui non usano accorgimenti atti ad evitare la esposizione al rischio;

– i servizi igienico-assistenziali sono carenti o insufficienti; i lavandini, le docce, gli spogliatoi spesso mancano o non sono adeguati al numero dei lavoratori, mancano i refettori, mancano i mezzi detersivi e per asciugarsi.

Concludendo, il rischio tecnopatologico dovuto ad inalazione di solventi tossici nei calzaturifici è riferibile ad una genesi multi-fattoriale che si può così riassumere:

1) carenza e scarsa efficienza dei sistemi di depurazione ambientale (captazione localizzata dei vapori con adeguate condotte di scarico ecc.);

2) carenza dei requisiti igienico-ambientali (ventilazione naturale, cubatura, microclima, servizi igienico-assistenziali);

3) organizzazione del lavoro inadeguata (insufficiente educazione sanitaria dei lavoratori, mancanza di informazione sui rischi specifici, uso di attrezzi da lavoro in modo incongruo, ritmi eccessivi, ecc.);

4) carenza di idonea prevenzione sanitaria.

Discussione

Dall'esame della casistica osservata e dai relativi fattori etiopatogenetici si possono dedurre alcune considerazioni:

1) i 32 casi osservati presentano un quadro tipico di polineurite avente caratteristiche sovrapponibili che si possono riferire allo stesso agente tossico;

2) i soggetti colpiti costituiscono un gruppo omogeneo, sia per l'anamnesi lavorativa, sia per le condizioni ambientali di lavoro, sia per la durata di esposizione al rischio;

3) il materiale lavorativo da essi usato è costituito dagli stessi tipi di mastice a base degli stessi solventi;

4) l'attività operativa da essi svolta, consistente prevalentemente nelle fasi di incollaggio dei vari pezzi delle calzature, ha determinato una esposizione allo stesso tipo di rischio specifico;

5) l'inquinamento degli ambienti di lavoro causato dai vapori di solventi, ha superato in tutte le aziende considerate, i valori MAC.

Quanto premesso depone per un nesso causale diretto fra il materiale di lavorazione contenente la *noxa* e le manifestazioni morbose.

Per quanto attiene alla ricerca qualitativa dell'agente nocivo bisogna tener conto dei seguenti fattori:

a) i mastici usati dai soggetti colpiti contenevano tutti solventi classificati al gruppo 30 (etere di petrolio e benzina) in elevate percentuali costituite prevalentemente da n-esano e cicloesano;

b) l'analisi dell'aria ambiente dei posti di lavoro ha dimostrato la presenza di elevate concentrazioni di cicloesano e n-esano.

Le predette considerazioni depongono per un inquinamento ambientale di n-esano e conseguente esposizione dei lavoratori a questo agente.

Circa le modalità di assorbimento del tossico si rileva quanto segue:

1) i disturbi sono insorti nello stesso periodo di tempo, alla fine dell'inverno (marzo-aprile), cioè dopo un periodo stagionale durante il quale, sia perché si tengono le finestre chiuse, sia perché si riscaldano gli ambienti, la ventilazione è più scarsa e l'evaporazione delle sostanze volatili è maggiore, motivo per cui si determina un aumento della concentrazione del tossico nell'aria ambiente;

2) le condizioni igienico-ambientali delle aziende considerate sono carenti per quanto riguarda sia l'aerazione che i sistemi di depurazione degli ambienti di lavoro, motivo per cui nessuna misura cautelativa ha limitato la dispersione del tossico nell'ambiente.

Quanto premesso avvalorava l'ipotesi che l'assorbimento dell'agente nocivo avvenga prevalentemente per via aerogena, il che non esclude un concomitante assorbimento per via cutanea. Poiché la sindrome morbosa ha avuto, in tutti i soggetti colpiti, lo stesso decorso con caratteristiche simili, cioè insorgenza dei disturbi con sintomi prodromici distribuiti in un certo lasso di tempo sino ad esitare nelle paralisi, si può ipotizzare una intossicazione di tipo cronico.

I fattori etiopatogenetici, oggetto delle nostre considerazioni, riscontrati nelle aziende calzaturiere presso cui è stata condotta l'indagine di cui trattasi, sono del tutto simili, sia per le correlazioni tecnologiche che igienico-ambientali che clinico-tossicologiche, a quelli riscontrati nel corso dell'indagine effettuata nel settore dei borsettifici in provincia di Teramo (*Acta Neurologica*, Napoli, nov.-dic. 1973).

La ricorrenza dell'uso degli stessi tipi di mastice, sia nei calzaturifici che nei borsettifici, a base di solventi classificati al gruppo 30 (idrocarburi alifatici) avvalorava l'ipotesi che l'agente responsabile della sindrome morbosa sia la stessa *noxa* riferibile al n-esano, contenuto in elevate percentuali nel materiale usato e riscontrato anche nell'aria ambientale come fattore inquinante in una concentrazione che supera largamente il MAC (500 ppm).

Aspetti preventivi

Per evitare il rischio tecnopatologico da solventi in generale e, in particolare, da n-esano è necessario attuare una idonea prevenzione tecnica e sanitaria.

Gli interventi prevenzionali, tenuto conto della genesi multifattoriale, debbono essere rivolti in varie direzioni, specificate nei punti seguenti:

a) *Prevenzione a monte.* — Si attua operando un controllo sulle aziende che producono il materiale responsabile di azione patogena e sperimentando preventivamente la possibile azione tossica al fine di non consentire che sia l'uomo e, trattandosi di patologia professionale, il lavoratore ad assumere la funzione di cavia.

In proposito si ricorda che alla CEE è allo studio un progetto di legge sul controllo dei prodotti chimici pericolosi. In base alle direttive che emergeranno in sede comunitaria, dovrà essere recepita una regolamentazione *ad hoc* anche in Italia.

b) *Prevenzione tecnica.* — Si realizza con un'efficace ed oculata bonifica degli ambienti di lavoro. A tal fine è di primaria importanza osservare le seguenti misure di prevenzione:

- realizzazione della separazione dei reparti di lavoro nocivo (reparto incollaggio, reparto essiccazione dei manufatti in pelle);

- captazione localizzata dei vapori in corrispondenza dei punti di loro formazione; tavoli di incollaggio, monovie, piano dove sono posti ad asciugare i pezzi incollati;

- controllo periodico della funzionalità ed efficienza dei sistemi di aspirazione forzata;

- limitazione delle superfici di evaporazione mediante uso di contenitori chiusi per i mastici e non permettendo che negli ambienti di lavoro siano conservati in deposito i materiali vari: mastici, solventi additivi, ecc.;

- areazione forzata o sistema di condizionamento in modo da assicurare un continuo ricambio d'aria negli ambienti di lavoro;

- riscaldamento effettuato in modo idoneo, cioè evitando nel modo più assoluto il riciclaggio dell'aria;

- rilevazione strumentale degli inquinanti volatili e, in particolare, degli idrocarburi alifatici, con valutazione critica dei MAC. In proposito si riportano le caratteristiche fisico-chimiche dell'n-esano.

Formula: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$.

Peso molecolare: 86,17.

Punto di ebollizione: 68,74° C.

Densità di vapore: 2,79 (aria = 1).

Solubile in etere e cloroformio; isolubile in acqua.

A 25° C e 760 mm/Hg.

1 ppm di vapore = 0,00352 mg/l.

1 mg/l di vapore = 284 ppm.

Limiti d'esplosività in volume % nell'aria: da 1,3 a 6,9 %;

La maggior parte dei trattati di tossicologia gli attribuisce un'azione irritante e soprattutto narcotica in forte concentrazione.

Le massime concentrazioni ammissibili nell'aria dei locali industriali sono le seguenti:

- 1) per gli igienisti americani (1971): 500 ppm (1.800 mg/m³);
- 2) per gli igienisti giapponesi: 100 ppm (360 mg/m³);
- 3) per gli igienisti sovietici: per idrocarburi alifatici saturi da C₁ a C₁₀: 85 ppm (300 mg/m³);
- 4) per la Società Italiana di Medicina del Lavoro: VLP — 1000 mg/m³.

c) *Prevenzione sanitaria primaria.* — È basata sull'attenta valutazione dello stato sanitario individuale al momento dell'assunzione al lavoro. Ciò allo scopo di stabilire, con un esame preventivo di idoneità specifica, se i soggetti avviati a determinate mansioni non sono portatori di sindromi polineuritiche attribuibili a diversa etiologia: es. polineuriti da farmaci, da alcool, da stati tossici dismetabolici (diabete, epatopatia) da forme criptogenetiche; ovvero se sono predisposti a tali manifestazioni.

Si escluderanno, a norma dell'art. 5 della legge 17 ottobre 1976, dai lavori esponenti ai vapori di solventi, i fanciulli e gli adolescenti di età inferiore agli anni 16 e le donne fino agli anni 18 nonché, a norma dell'art. 3 della legge 30 dicembre 1971, le donne durante il periodo di gestazione e fino a sette mesi dopo il parto.

d) *Prevenzione sanitaria secondaria.* — Si realizza con visite mediche trimestrali corredate, a norma dell'art. 33 del D.P.R. 19 marzo 1956 n. 303, da esami integrativi atti ad evidenziare l'eventuale azione tossica dei solventi con specifico riferimento alla compromissione del sistema nervoso periferico. Qualora i lavoratori non presentino manifestazioni patologiche, gli esami integrativi possono essere annuali e consistere in: emocromo, conta piastrine (se presenti solventi aromatici), bilirubinemia frazionata, fosfatasi alcalina, esame urine, transaminasi GOT, eventuale visita neurologica a giudizio del medico.

Qualora i lavoratori accusino disturbi o le rilevazioni strumentali dimostrino concentrazione di solventi prossime o superiori ai MAC, gli accertamen-

ti integrativi, oltre a quelli predetti, saranno basati sulla visita neurologica e sull'esame elettromiografico (determinazione della velocità di conduzione motoria massima e minima), nonché sulla ricerca di eventuali metaboliti urinari: acido ippurico e acido tricloroacetico (secondo i prodotti usati).

Compromissione del sistema nervoso periferico. — Effettuata la diagnosi di compromissione del sistema nervoso periferico, è indispensabile allontanare il soggetto dall'ambiente di lavoro nocivo.

L'intervento sul fattore comportamentale dei lavoratori è basato sull'educazione sanitaria consistente nell'informazione dei rischi specifici e delle misure d'igiene personale da adottare, nonché sul corretto atteggiamento da mantenere durante lo svolgimento delle varie operazioni lavorative al fine di evitare o di ridurre l'esposizione all'agente tossico.

Riassunto. — Si riferisce su un'indagine effettuata presso 19 calzaturifici delle Marche, occupanti 1264 lavoratori, presso cui si sono verificati 32 casi di polineuropatie.

Dalla disamina dei fattori qualitativi e quantitativi di rischio si conclude che: sotto il profilo etiologico la sindrome morbosa si può attribuire ad intossicazione da inquinanti ambientali riferibili ad idrocarburi alifatici (esano-cicloesano).

Sotto il profilo quantitativo il rischio tecnopatologico è riferibile ad una genesi multi-fattoriale che si può così riassumere:

- 1) carenza e scarsa efficienza dei sistemi di depurazione ambientale;
- 2) carenza dei requisiti igienico-ambientali;
- 3) carenza di prevenzione sanitaria;
- 4) organizzazione del lavoro inadeguata.

Per evitare o ridurre l'incidenza della tecnopatia polineuretica è necessario impostare una efficace azione prevenzionale.

Summary (*Prevention of toxic polyneuropathies in shoe factories*). — An investigation was carried out concerning 19 shoe factories of Marche province, where 32 cases of polyneuropathy, upon 1264 workmen, have been verified.

After examination of qualitative and quantitative risk factors the following conclusions can be deduced.

Under the etiological aspect the syndrome can be attributed to poisoning caused by environmental pollutions and thus relating to aliphatic hydrocarbons (hexane-cyclohexane).

Under the quantitative aspect the tecnopatic risk has a multifactorial origin which can be summarized as follows:

- 1) lack and poor efficiency of environmental purification systems;
- 2) lack of hygienic-environmental elements;
- 3) lack of sanitary precautions;
- 4) poor work organization.

A strong preventive therapy is necessary to avoid or at least to reduce the polyneuretic tecnopathy incidence.

BIBLIOGRAFIA

1. YAMAMURA, 1969. *n*-Hexane polyneuropathy. *Folia Psychiatr. Neurol. Jap.*, **23**: 45-57.
2. CAVIGNEAUX, 1972. *Polynevrites par n-hexane*. Institut National de Recherche et de Sécurité.
3. INOVE *et al.* 1970. A health survey on vinyl sandal manufactures with incidence of *n*-hexane intoxication occurred. *Jap. J. Industr. Health*, **12**: 73-84.
4. HERSKOWITZ A., I. NOBUYOSHI & H. SCHAUMBURG. 1971. Hexane neuropathy. A syndrome occurring as a result of industrial exposure. *New Engl. J. Med.* **285**: 82-84.

Determinazione della piomburia per spettrografia di emissione ottica con la tecnica del doppio arco

G. CECCHETTI e A. IANNACCONE

con la collaborazione tecnica di M. BARBIERI

Istituto di Medicina del Lavoro, Università Cattolica del S. Cuore, Roma

INTRODUZIONE

L'analisi del piombo urinario è una *routine* di quasi tutti i laboratori degli Istituti di Medicina del Lavoro.

Le metodiche che vengono usate sono colorimetriche o di assorbimento atomico ed in entrambi i casi possiamo mettere in evidenza alcuni problemi:

- 1) indaginosità con evidenti rischi di contaminazioni;
- 2) scarsa sensibilità per valori di concentrazione di piombo prossimi ai livelli di norma;
- 3) effetti matrice.

Questi tre aspetti non esistono contemporaneamente, ma la indaginosità e la scarsa sensibilità sono proprie delle metodiche colorimetriche e di assorbimento atomico a fiamma [1-6], mentre gli effetti matrice impediscono una applicazione semplicistica dell'assorbimento atomico con forno di grafite [7-10]. In quest'ultimo caso, infatti, la eccezionale sensibilità della metodica poteva far ben sperare per una valida applicazione anche ad una determinazione del piombo nelle urine, dato che gli effetti matrice si pensava dovessero essere minimizzati dalle diluizioni del campione. Alle prove dei fatti si è evidenziato come, anche se i campioni vengono diluiti, gli effetti matrice rimangono ugualmente marcati e non giova alla precisione spingere la sensibilità analitica oltre certi limiti. Per tutti questi motivi fino ad oggi nel nostro laboratorio la piomburia è stata eseguita per via colorimetrica. L'impiego di personale e i costi di analisi sempre più elevati ci hanno spinto a cercare una nuova via di analisi strumentale e precisamente la spettrografia di emissione ottica. La scelta può sembrare piuttosto singolare, perché sono noti gli enormi vantaggi di questa tecnica (rapidità e sensibilità) per analisi di tipo qualitativo, mentre sono anche note le difficoltà a livello di analisi

quantitative dovute al fatto che la sorgente adoperata per l'eccitazione atomica (arco elettrico in corrente continua) risulta poco stabile e quindi non riproducibile.

Con questa nota illustreremo viceversa come sia stata messa a punto una metodica di analisi quantitativa della piomburgia, metodica che è risultata essere semplice, rapida ed attendibile.

PARTE SPERIMENTALE

Preparazione del campione

Si potevano seguire diverse modalità tradizionali, ma per ottenere un campione secco che fosse perfettamente omogeneo, l'unica procedura che si è mostrata perfettamente rispondente alle esigenze analitiche è stata la liofilizzazione opportunamente programmata. In questo modo siamo riusciti ad ottenere una polvere soffice, perfettamente omogenea, a granulometria sottile e di facile manipolazione. Unico inconveniente è un fattore di arricchimento non così elevato, come poteva realizzarsi nel caso che si fosse usata una tecnica di incenerimento.

Analisi spettrografica

Si è scelto il crogiolo usato nel doppio arco capace di contenere una maggiore quantità di sostanza (Fig. 1).

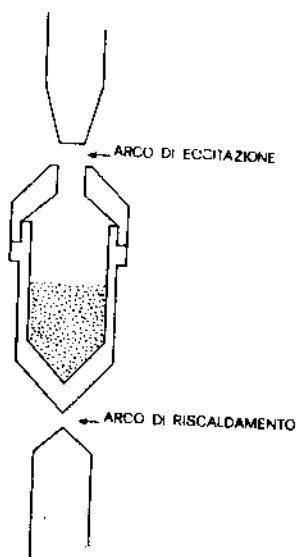


Fig. 1. — Sezione verticale del doppio arco.

Il doppio arco [11] è una sorgente spettrale che esalta la distillazione frazionata e permette di ridurre enormemente il fondo con evidente esaltazione della sensibilità, determinata anche in questo caso dai rapporti riga-fondo. Nella Fig. 2 si evidenzia come il primo arco serve per riscaldare il crogiolo, mentre il secondo arco è quello in cui avviene la eccitazione atomica degli elementi che distillano dal crogiolo stesso. Un arco di questo tipo, anche presentando notevoli caratteristiche di stabilità, dovute essenzialmente alla più omogenea alimentazione e distribuzione della sostanza da eccitare, ai fini di una analisi quantitativa non risulta ancora sufficientemente riproducibile. È necessario anche in questo caso ricorrere alla tecnica dello standard interno. Si deve cioè aggiungere ai campioni standard e ai campioni in esame una stessa quantità di un elemento che emetta una riga analitica vicino a quella dell'elemento da determinare e con intensità simile. Se i due elementi, quello in analisi e quello di riferimento, si comportano nello stesso modo nella sorgente eccitativa e se le righe dei due elementi hanno caratteristiche spettroscopiche simili, le variazioni di intensità delle righe dell'elemento in esame dovute alla non riproducibilità della sorgente vengono controllate osservando le variazioni di intensità della riga dell'elemento di riferimento.



Fig. 2. Il doppio arco in funzione.

La corretta applicazione del metodo della coppia analitica nelle analisi quantitative in emissione ottica con sorgente ad arco elettrico (alimentato da corrente continua) richiede la conoscenza della curva di volatilizzazione degli elementi della coppia analitica. I fenomeni che determinano la volatilizzazione selettiva sono stati oggetto di studi più approfonditi [12], che pun-

TABELLA 1

**Caratteristiche chimico-fisiche considerate nello studio
della volatilizzazione selettiva**

ELEMENTO	Lunghezza d'onda in Å	Intensità relativa	Energia di eccitazione in eV	Prima energia d. ionizzazione in eV	Punto di ebollizione (°C)	
					Elemento	Comp.
Piombo	2833,07 Å	500R	4,40	7,415	1620	(PbO) 890 m.p.
Indio	3039,36 Å	1000R	4,10	5,785	2000	(In ₂ O ₃) 850
Bismuto	3067,72 Å	3000R	4,04	8,000	1560	(Bi ₂ O ₃) 1890?
Tallio	2767,87 Å	400R	4,44	6,106	1457	(Tl ₂ O ₃) 875 (Tl ₂ O) 1080
Carbonio	2478,57 Å	400	7,69	11,265	4200	
Calcio	4226,73 Å	500R	2,93	6,112	1240	(CaO) 2850
Fosforo	2535,65 Å	100	—	10,977	280	(P ₂ O ₅) 347 s.
	2553,28 Å	80	—			

tualizzavano la possibilità di una corretta scelta della coppia analitica attraverso la conoscenza delle curve di volatilizzazione selettiva.

Nella Tab. 1 sono mostrate alcune caratteristiche chimico-fisiche utilizzate nella scelta delle coppie di righe analitiche. Per l'analisi del piombo almeno tre elementi, ed esattamente indio, bismuto e tallio, presentano le caratteristiche chimico-fisiche essenziali per essere scelti come elemento di riferimento.

Nella Tab. 2 sono indicati i tempi di volatilizzazione ottenuti per diverse coppie di righe analitiche in presenza di diverse matrici su prove effettuate con elettrodi di tipo convenzionale e con quantità di sostanza stabilita (esattamente $2,5 \cdot 10^{-7}$ grammi-atomo di ciascun elemento).

Si evidenzia come il tallio risulta essere l'elemento con tempo di volatilizzazione uguale a quello del piombo sia in presenza di matrice di fosfato di calcio che di carbone.

Le prove di volatilizzazione selettiva sono state ripetute per la coppia piombo-tallio utilizzando un'eccitazione a doppio arco e con matrici costituite da urina liofilizzata.

Nelle Fig. 3-5 sono riportate le curve di volatilizzazione selettiva del tallio e del piombo, ottenute con il doppio arco alimentato rispettivamente con 10, 12,5 e 19,5 A; le curve coincidono già abbastanza bene a partire da un arco alimentato con 12,5 A in c. c.

TABELLA 2

**Tempo di volatilizzazione delle coppie analitiche Pb - In; Pb - Bi; Pb - Tl
in due differenti matrici**

ELEMENTO	Lunghezza d'onda usata (Å)	Matrice	Tempo di volatilizzazione in sec
Piombo	2833,07	Carbone	11,0
Indio	3039,36		12,0
Piombo	2833,07		11,0
Bismuto	3067,72		13,0
Piombo	2833,07		12,0
Tallio	2767,87		12,0
Piombo	2833,07	Fosfato di calcio	12,0
Indio	3039,36		12,0
Piombo	2833,07		12,0
Bismuto	3067,72		13,5
Piombo	2833,07		12,0
Tallio	2767,87		12,0

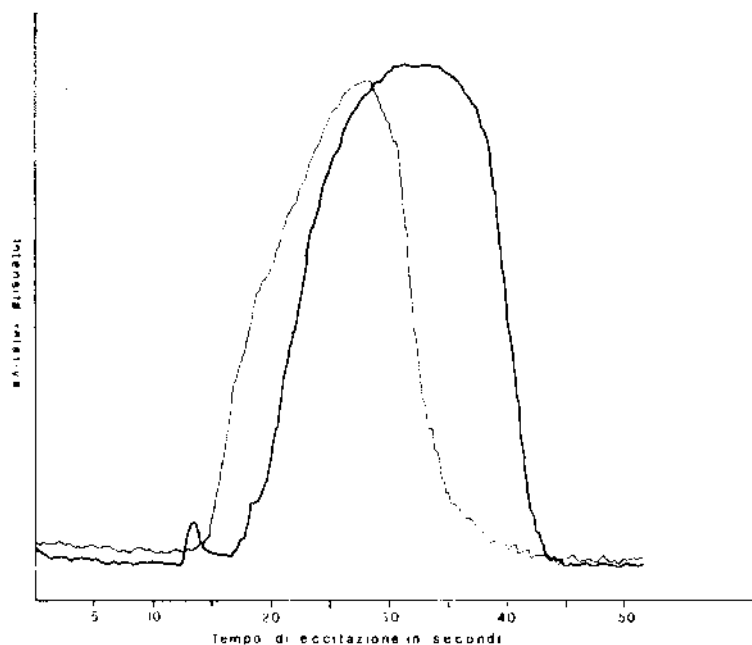


Fig. 3. — Curve di volatilizzazione selettiva del Tl e Pb per le righe analitiche del Tl = 2767,87 Å e del Pb = 2833,07 Å. Arco a corrente continua 10,0 A. La riga sottile si riferisce al Tl, quella marcata al Pb.

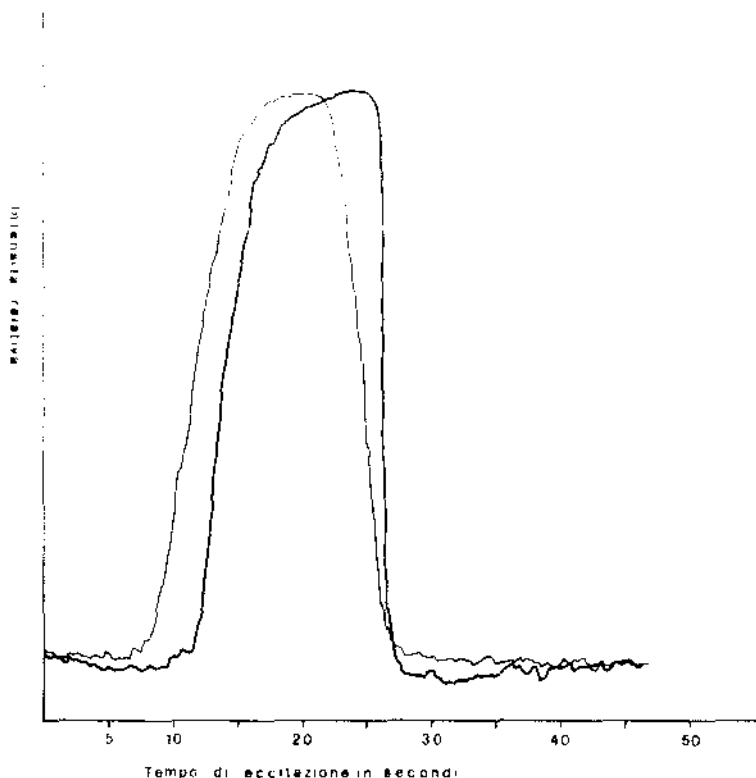


Fig. 4. — Curve di volatilizzazione selettiva del Tl e Pb per le righe analitiche del Tl = 2767,87 Å e del Pb = 2833,07 Å. Arco a corrente continua 12.5 A. La riga sottile si riferisce al Tl, quella marcata al Pb.

L'andamento della volatilizzazione selettiva pressoché identico e il fatto che le due righe analitiche hanno pressoché uguale potenziale di eccitazione permettono di considerare ottimale la scelta del tallio come standard interno.

Procedura per la routine

- a) Si prelevano 10 ml di urina che si pongono in cristallizzatori di quarzo; si aggiungono 100 µl di una soluzione a 10 ppm di tallio, corrispondenti a 1 µg di tallio, e si agita debolmente;
- b) si lascia liofilizzare per tutta una notte;
- c) un terzo dell'intera sostanza liofilizzata viene prelevata e posta nel crogiolo di grafite. Si porta il crogiolo al doppio arco e si effettua la ripresa degli spettri secondo le condizioni operative riportate nella Tab. 3.

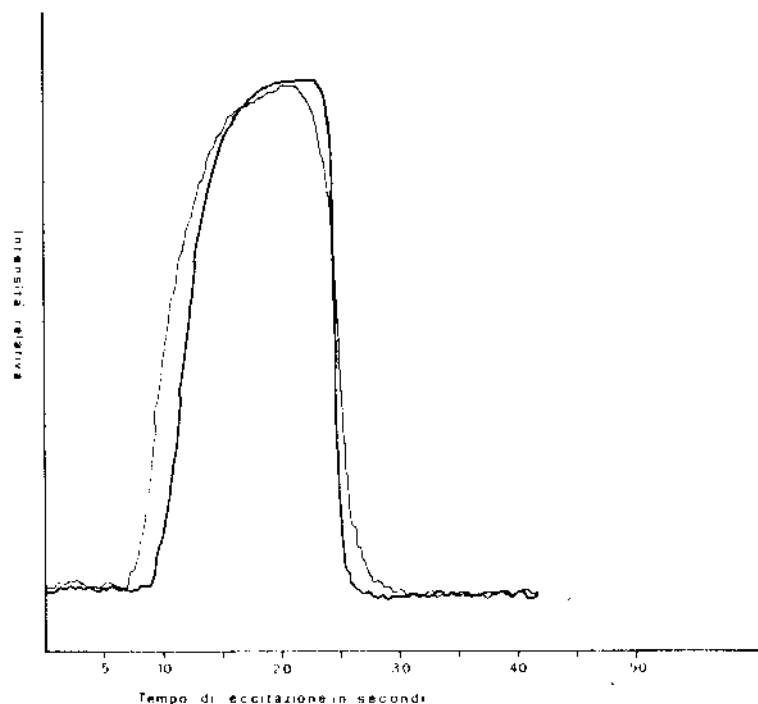


Fig. 5. — Curve di volatilizzazione selettiva del Tl e Pb per le righe analitiche del Tl = 2767,87 Å e del Pb = 2833,07 Å. Arco a corrente continua 19,5 A. La riga sottile si riferisce al Tl, quella marcata al Pb.

TABELLA 3

Condizioni strumentali per il rilevamento degli spettri

Spettrografo Q 24 Zeiss.

Illuminazione per immagine intermedia a fuoco per 3000 Å e illuminazione uniforme della fenditura.

Larghezza della fenditura 10 μ .

Tempo di esposizione 41 sec.

Doppio arco { a) Arco di riscaldamento - distanza tra gli elettrodi 2 mm;
b) Arco di eccitazione - distanza tra gli elettrodi 2 mm.

Condizioni di eccitazione: Arco corrente continua (generatore UB1) 300 V - 12 A.

Grafite ultrapura del orologio della Ringsdorff.

Lastre Ilford TFHT 9 $\times$ 24 - sviluppo Ferrania R28 - (5 min a 20 °C).

Misure di densità ottica eseguite con microfotometro Zeiss.

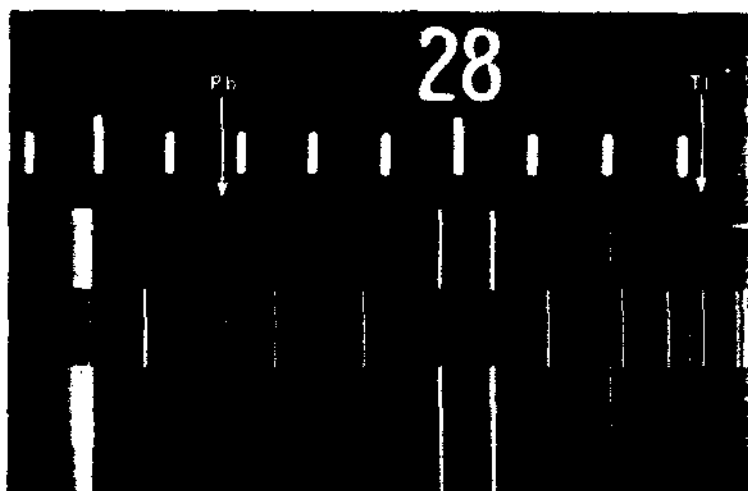


Fig. 6. — Spettrogrammi con le due righe analitiche TI-Pb.

Nella Fig. 6 viene mostrato un tratto degli spettrogrammi con le due righe analitiche TI e Pb, ottenuti con standard in urina corrispondenti a 5, 10 e 20 μg di Pb/l di urina. La differenza di annerimento delle due righe della coppia analitica si riporta sulla curva di taratura (Fig. 7) ottenuta

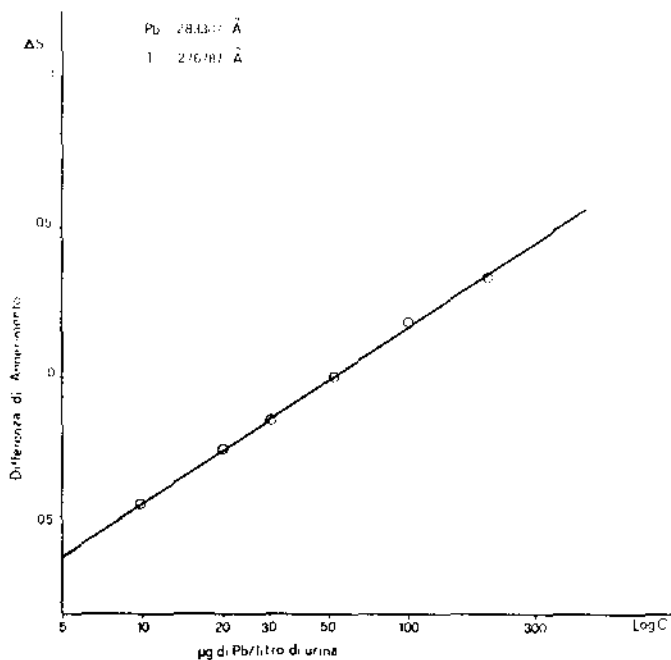


Fig. 7. — Curva di taratura.

per aggiunte su aliquote di 10 ml di una stessa urina, risultata alla analisi praticamente esente da Pb (inferiore a 5 $\mu\text{g/l}$), di quantità crescenti di Pb. I campioni standard hanno ovviamente seguito la stessa procedura analitica dei campioni da analizzare.

Il limite di rivelabilità del metodo è di 5 μg di Pb/l di urina. Il sigma trovato è di 0,005 come valore di differenza di annerimento letto per uno standard di 50 μg di Pb/l di urina che corrisponde ad un'incertezza di circa 3 μg di Pb/l di urina calcolata sulla curva di taratura.

Vantaggi della nuova metodica

La procedura analitica è estremamente rapida e precisa, come messo in evidenza; richiede poche manipolazioni e quindi è praticamente esente da possibili inquinamenti. Si può procedere ad una analisi contemporaneamente su 30-50 campioni di urina per un tempo di analisi di circa 3 ore.

Il limite di rivelabilità del metodo è di 5 μg di Pb/l di urina. Il sigma trovato è di 0,005 come valore di differenza di annerimento letto per uno standard di 50 μg di Pb/l di urina che corrisponde ad un'incertezza di circa 3 μg di Pb/l di urina calcolata sulla curva di taratura.

Riassunto. — Viene descritta una nuova metodica per l'analisi quantitativa del piombo urinario per mezzo della spettrografia di emissione ottica. Il campione viene concentrato mediante liofilizzazione e la polvere omogenea, così ottenuta, viene analizzata usando la tecnica del doppio arco. Gli effetti matrice e la instabilità della sorgente vengono compensati per mezzo di uno standard di riferimento. È stata studiata l'influenza della volatilizzazione degli elementi della coppia di righe analitiche ed è stata scelta la coppia tallio-piombo. Il metodo risulta riproducibile e permette di rilevare anche 5 $\mu\text{g/l}$ di piombo urinario.

Summary (*Determination of urinary lead by means of the emission spectrography*). — A new method for the determination of urinary lead by means of the emission spectroscopy is described. The sample is concentrated by lyophilization and the homogeneous dust obtained is analysed using the «double arc» method. The matrix effects and the source unstability are compensated by the use of the internal standard.

The influence of the volatilization of the elements of the analytical pairs are studied and the pair thallium-lead is selected.

The method is reproducible and the detection limit is 5 $\mu\text{g/l}$ of urinary lead.

BIBLIOGRAFIA

1. SANDELL, E. B. 1969. *Colorimetric Determinations of Traces of Metals*. Interscience, Inc., New York.
2. LYONS, H. & F. E. QUINN. 1971. Measurement of lead in biological materials by combined anion-exchange chromatography and atomic absorption spectrophotometry. *Clin. Chem.* **17**: 152-155.
3. DEVOTO, G. 1968. Determinazione del piombo nelle urine e nel sangue con la spettroscopia per assorbimento atomico. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* **44**: 421-423.
4. FARRELLY, R. O. & J. PYBUS. 1969. Measurement of lead in urine by atomic absorption spectrophotometry. *Clin. Chem.* **15**: 566-574.
5. TOMPSETT, S. L. 1964. The determination of lead in biological material. In: *Methods of Forensic Science*, 3. Curry A. S. (Ed.) Interscience, Inc., New York.
6. KAHN, H. L. & J. S. SEBESTYN. 1970. The determination of lead in blood and urine by atomic absorption spectrophotometry, with the sampling boat system. *At. Absorption Newslett.* **9**: 33-38.
7. EALY, J. A., N. E. BOLTON, R. J. McELHENY & R. W. MORROW. 1974. Determination of lead in whole blood by graphite furnace atomic absorption spectrophotometry. *Amer. Ind. Hyg. Ass. J.* **35**: 566-570.
8. EVENSON, M. A. & D. D. PENDERCAST. 1974. Rapid ultramicro direct determination of erythrocyte lead concentration by atomic absorption spectrometry, with use of graphite-tube furnace. *Clin. Chem.* **20**: 163-171.
9. KUBASIK, N. P., M. T. VOLOSIN & M. H. MURRAY. 1972. Carbon rod atomizer applied to measurement of lead in whole blood by atomic absorption spectrometry. *Clin. Chem.* **18**: 410-412.
10. ROSEN, J. F. 1972. The microdetermination of blood lead in children by flameless atomic absorption: the carbon rod atomizer. *J. Lab. Clin. Med.* **80**: 567-576.
11. ABRENS, I. H. 1964. *Spectrochemical analysis*. Pergamon Press, Cambridge.
12. CECCHETTI, G., F. COTTA-RAMUSINO & A. STACCHINI. 1969. Study on the matrix influence for the volatilization of the elements of the analytical pairs in the quantitative emission spectrography. XI *Colloquium spectroscopicum internationale*, Madrid-Abstracts p. 136.

Determinazione dei metalli nei liquidi biologici

L. POZZOLI e C. MINOIA

Istituto di Medicina del Lavoro, Università di Pavia

Abbiamo voluto fare il punto della situazione per quanto riguarda la determinazione dei metalli pesanti nei liquidi biologici con la tecnica della spettroscopia in assorbimento atomico.

La scelta dei metalli è stata orientata verso quelli ritenuti interessanti per il loro comportamento biologico e per la loro tossicologia, tenuto conto della ricorrenza con cui si trovano impiegati nei vari cicli produttivi. I liquidi biologici presi in esame, urina-sangue-siero, sono nella pratica utilizzati per raccogliere informazioni sulla eliminazione (urina) e sulla distribuzione compartimentale (sangue) di tossici esogeni in funzione della esposizione e della dose assorbita. Funzioni biologiche importanti e spesso non esplorate condizionano i processi di assorbimento, distribuzione, eliminazione di tali tossici.

I metodi di analisi descritti si rivolgono principalmente agli operatori chimici a cui sono demandate le analisi affinché possano avere una visione completa di come può essere affrontato il problema della determinazione dello specifico metallo nei vari liquidi di interesse. Ogni metodo di analisi è stato provato e documentato con traccianti strumentali; tutto il lavoro compilativo è riportato nella pubblicazione [1]; descriviamo ora i criteri generali seguiti per eliminare o minimizzare gli effetti matrice e per raggiungere la sensibilità necessaria a evidenziare le tracce, ossia in termini più concreti a dosare 1 µg di metallo per litro di liquido biologico.

Indubbiamente la determinazione di un metallo in liquidi biologici assume tanto più significato quanto maggiore è la possibilità di poter disporre di valori di concentrazione di persone professionalmente non esposte ed esposte, valutati con il metodo analitico impiegato. Riteniamo utile riportare anche un tentativo di definizione di valori di eliminazione in soggetti non esposti e in soggetti professionalmente esposti.

METODI DI ANALISI

In modo schematico le linee analitiche adottate sono illustrate nella Fig. 1.

Dato un determinato liquido biologico e il metallo da dosare, la scelta della linea analitica dipenderà in massima parte dai seguenti elementi:

- campo di concentrazione in cui si presuppone sia presente il metallo da determinare;
- sensibilità e specificità analitica del metallo;
- volume del campione a disposizione;
- numero dei campioni da analizzare.

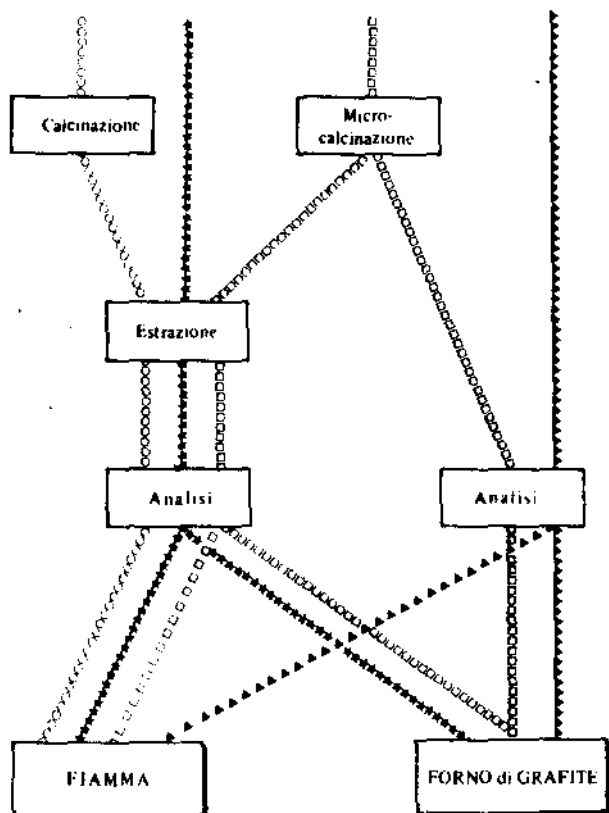


Fig. 1. — Schema delle linee analitiche impiegate.

Analisi diretta

L'analisi diretta è senza dubbio la più conveniente perché evita contaminazioni dall'esterno in quanto praticamente non richiede manipolazioni del campione. Con l'impiego del forno di grafite come elemento atomizzatore si può raggiungere per alcuni metalli la sensibilità necessaria per evidenziare

le tracce. Non sono richiesti grandi volumi di liquido: bastano in genere 0,5 ml di campione e a volte è sufficiente anche una quantità minore.

Il tempo necessario per la esecuzione di una analisi varia da un minimo di 5 min ad un massimo di 20 min (tenuto conto delle analisi supplementari). L'effetto matrice può venire eliminato, o nel peggiore dei casi ridotto ai minimi termini, mediante l'impiego del correttore di fondo o lampada al deuterio; mediante l'aggiunta in forno di sostanze che modificano la matrice, volatilizzando i composti più resistenti alla temperatura oppure bloccando il metallo con formazione di sali meno volatili del metallo stesso; mediante l'impiego di temperature programmate nella fase centrale dell'incenerimento mediante confronto con standard preparati in liquido biologico sintetico; mediante il metodo delle aggiunte ossia mediante analisi di liquidi biologici opportunamente standardizzati.

Con quest'ultima tecnica è possibile costruire la curva di taratura sulla base del liquido biologico in esame e questo diventa utile quando si hanno da analizzare un numero considerevole di campioni; quando si ha da analizzare invece un numero ridotto di campioni è utile eseguire due analisi supplementari con l'aggiunta di quantità note del metallo di interesse, in rapporto generalmente, una doppia dell'altra. Sono necessarie almeno due aggiunte per verificare la linearità della risposta. In questo caso la concentrazione del metallo nel liquido biologico risulta dallo sviluppo algebrico della formula riportata in vari capitoli.

Microcalcinazione

Il metodo della microcalcinazione consiste nel trattare piccole quantità di liquido biologico (in genere 1-2 ml) in crogiolo di quarzo a temperature diverse; prima su piastra riscaldante a temperatura non superiore alla ebollizione e poi, ottenuto un residuo, in muffola a temperatura di 350-500 °C a seconda dei metalli. La distruzione delle sostanze organiche viene facilitata mediante aggiunta in crogiolo di HNO_3 e H_2O_2 in diversi momenti del trattamento. Nel caso di metalli con punto di sublimazione basso (per esempio Cd, Pb) viene aggiunto in crogiolo un anione per bloccare il metallo con la formazione di un sale più resistente alle temperature richieste dal metodo.

Dopo l'ottenimento del residuo, tale metodologia può avere due sviluppi analitici: analisi diretta del liquido di ripresa, microestrazione del metallo di interesse dal liquido di ripresa con chelanti e solventi organici e questi ultimi ancora analizzati in forno di grafite oppure in fiamma.

Il primo sviluppo non richiede particolari arricchimenti: ricade nella analisi diretta con il vantaggio aggiunto di non avere nella matrice materiale organico. Il secondo sviluppo può raggiungere arricchimento del metallo

di interesse nel solvente di estrazione, rispetto al liquido biologico di partenza, fino ad un massimo di 2-3 volte. Ciò permette per alcuni metalli l'analisi per atomizzazione in fiamma.

Il metodo della microcalcinazione diventa interessante quando si hanno da analizzare un numero medio di campioni e ciò per ammortizzare il trattamento a caldo che richiede circa 3 ore di tempo e può essere eseguito in batteria per vari campioni. L'impiego del crogiolo di quarzo si è reso particolarmente utile, in quanto a differenza del vetro e della porcellana offre minor possibilità di adsorbimento del metallo durante i due momenti del riscaldamento. Il metodo ha una costante perdita di metallo rispetto alla quantità presente nel liquido originario che, a seconda dei metalli però, non supera il 20 %. Ciò è dovuto sia al trattamento termico sia alla estrazione che non è mai completa al 100 %. Tali perdite comunque fino a concentrazioni dell'ordine di 30-50 $\mu\text{g/l}$ di metallo nel liquido originario sono proporzionali nello stesso rapporto e garantiscono la linearità della risposta.

Estrazione diretta

Il metodo dell'estrazione del metallo direttamente dal liquido biologico è abbastanza seguito. L'estrazione può avvenire catturando il metallo, a opportuno pH, con chelanti particolari, ed estraendo con solvente organico il complesso che viene poi analizzato.

Si possono raggiungere concentrazioni arricchite del metallo nel liquido finale di estrazione fino a 10 volte rispetto a quella nel liquido biologico di partenza. Evidentemente in fase analitica vengono eliminati gli effetti matrice dovuti al liquido biologico. Rimane solo la determinazione del metallo in un solvente o in una soluzione acida per cui sarà opportuno eseguire curve di taratura con gli stessi criteri. È noto infatti che il solvente organico genera un incremento del segnale e che le soluzioni acide ne provocano invece un decremento che è funzione della concentrazione dell'acido stesso. L'analisi verrà eseguita indifferentemente in forno di grafite o in fiamma a seconda del metallo da analizzare e dell'arricchimento operato.

Impiegando tale tecnica si possono incontrare delle difficoltà di ordine pratico in quanto generalmente non si conosce la forma chimica del metallo presente nel liquido biologico e la formazione del complesso può risultare difficoltosa o parziale. È questo, ad esempio, il caso del Cd e del Pb per urina di persone trattate con EDTA. In questi casi l'aggiunta di piccole quantità di CaCl_2 sposta il metallo di interesse dall'eventuale complesso con EDTA e facilita la sua cattura dal chelante impiegato nella estrazione.

Esistono anche per tale metodo possibilità di perdita di metallo come già accennato nel caso della microcalcinazione. In questo caso però, essendo eli-

minato il trattamento termico del liquido biologico, tale perdita è dovuta solo alla percentuale di recupero in fase di estrazione: si dovranno cercare, pertanto, per ogni metallo, il chelante, il solvente e le condizioni ottimali di pH, nonché la manualità necessaria.

Calcinazione

Il metodo della calcinazione è solitamente quello ritenuto tradizionale. Si trattano grosse quantità di liquido biologico, anche fino a 100 ml, a bassa temperatura con ossidanti del tipo HNO_3 , HClO_4 , H_2SO_4 . Il trattamento deve essere spinto fino ad ottenere un residuo completamente bianco e cristallino. Il liquido di ripresa solitamente è circa 1/5-1/10 di quello di partenza. Per l'incremento di concentrazione dei sali non è possibile una analisi diretta di tale liquido (troppi sarebbero gli elementi interferenti) per cui occorre passare attraverso una estrazione con le modalità e le conseguenze negative e positive già accennate. Rimane il vantaggio però della fase di atomizzazione di avere il metallo di interesse sicuramente sotto forma di sale inorganico e ciò può facilitare la estrazione stessa.

L'analisi del solvente di estrazione può essere eseguita per atomizzazione in fiamma in quanto si raggiungono le concentrazioni necessarie. Il metodo presenta però lo svantaggio di tempi notevolmente lunghi: una calcinazione completa può richiedere anche qualche giorno. Per questo conviene operare con parecchi campioni in batteria. Come già detto per la microcalcinazione, si possono verificare perdite di metallo con la temperatura e con la estrazione. In questo caso, però, essendo prolungati i tempi del trattamento termico, si possono verificare maggiori inconvenienti.

Riportiamo nella Tab. 1 un elenco completo dei liquidi biologici trattati, dei metalli determinati, nonché una descrizione riassuntiva ma esauriente del metodo analitico impiegato. I simboli riportati in tabella hanno il seguente significato:

- A = mineralizzazione del campione a caldo (calcinazione);
- B = idem su piccole quantità di campione (microcalcinazione);
- C = mineralizzazione del campione a freddo;
- D = precipitazione delle proteine;
- E = estrazione diretta del metallo dal campione, con complessanti;
- F = estrazione del metallo dal residuo della mineralizzazione o dalla precipitazione delle proteine;
- G = idem su piccoli volumi (microestrazione);
- H = estrazione del metallo, dal campione trattato, con formazione di composti volatili;

TABELLA I

Schema riassuntivo dei metodi analitici descritti

N. ordine	Metallo determinato	Liquido biologico trattato		Metodo di analisi	Quantità dosata (1° punto della curva di taratura)		Riferimenti	
		Tipo	ml		µg/l	µg/100ml	Cap.	Grafici
1	Alluminio	urina	1	-- I.	2,5	--	2	3-4
2		siero	1	-- L	--	0,52	2	1-2
3	Arsenico	urina	20	A H I	5,0	--	3	5/7
4	Cadmio	urina	1	-- M	5,0	--	4	8/11
5		urina	3	- E L/M	2,5	--	5	12-13
6		urina	50	- E I/L/M	5,0	--	6	--
7		urina	50	A F I/L/M	0,5	--	7	15/20
8		sangue	5	A F I/L/M	--	0,5	7	21-22
9		sangue	1	- E L/M	--	0,25	8	23/25
10	Cobalto	urina	1	B - L	10,0	--	9	26-27
11		siero	1	B - L	--	0,1	9	--
12		urina	1	-- L	10,0	--	9	29
13		siero	1	-- L	--	0,1	9	28-29
14		urina	50	A F L	5,0	--	10	30-31
15		urina	50	A F I/L	5,0	--	11	32-33
16	Cromo	sangue	10	A F I/L	--	0,1	12	34-35
17		urina	1	-- L	5,0	--	13	36-37
18		siero	1	-- L	--	0,1	14	38/40
19		siero	1	B - L	--	0,1	14	--
20	Ferro	siero	1	D - I	--	25,0	15	41-42
21		urina	5	-- I	200	--	16	--
22		siero	0,5	D - L	--	50,0	17	44-45
23	Manganese	urina	50	A E I	5	--	19	46-47
24		siero	2	-- I	--	1	20	48
25		siero	1	-- L	--	0,5	20	49
26		urina	1	-- L	5	--	20	50-51
27		urina	1	B - L	5	--	21	54-55

Segue: TABELLA 1

N. ordine	Metallo determinato	Liquido biologico trattato		Metodo di analisi	Quantità dosata (1° punto della curva di taratura)		Riferimenti	
		Tipo	ml		µg/l	µg/100ml	Cap.	Grafici
28	Mercurio	urina	10	C H P	10	—	22	56
29		sangue	10	C H P	—	1	22	57/59
30	Nichel	siero	2,5	B (G) L	—	0,2	23	62-63
31		sangue	2,5	B (G) L	—	0,2	23	—
32		urina	2,5	B (G) L	1	—	23	60-61
33		siero	1,0	— L	—	0,3	23	62-64
34		siero	10	A F I/L	—	0,25	24	68-69
35		sangue	10	A F I/L	—	0,2	24	70-71
36		urina	50	A F I/L	1	—	24	65/67
37	Piombo	sangue	2,5	— E I/L/M	—	20	25	72/75
38		urina	10	— E L/M	50	—	25	76
39		siero	0,6	— E L	—	0,5	25	77
40		urina	12,5	— E I/L/M	50	—	26	78/82
41		urina	50	— E I/L/M	50	—	27	83
42		urina	3	— E L/M	25	—	28	84-85
43		sangue	5	D F I/L	—	10	29	—
44		urina	1	— L	25	—	30	86/88
45		sangue	0,5	— L	—	10	31	89
46		urina	1	— M	25	—	32	90
47		sangue	1	— M	—	20	32	91
48		sangue	0,5	— N	—	10	33	92
49	Rame	urina	5	— L	20	—	34	93
50		urina	2	B — L	12	—	34	94
51		urina	50	— E I/L	5	—	35	95/97
52		siero	0,5	— L	—	50	36	98/101
53		siero	1	— I	—	40	37	102-103
54	Zinco	urina	1	— I	500	—	38	104-105
55		siero	1	— I	—	50	39	106/109
56		urina	1	— L	500	—	40	110-112
57		siero	1	— L	—	50	40	111-112

- I = analisi diretta del campione o del liquido risultante dal trattamento del campione, per atomizzazione in fiamma;
- L = idem per atomizzazione in forno di grafite;
- M = idem per atomizzazione in Sampling Boat;
- N = idem per atomizzazione in Delves Cup;
- P = analisi in fase vapore.

VALORI MEDI DI ELIMINAZIONE RELATIVI A SOGGETTI PROFESSIONALMENTE ESPOSTI E NON ESPOSTI

Sono state eseguite varie analisi dei vari metalli per rilevare i valori di concentrazione nei liquidi biologici di persone professionalmente non esposte ed esposte in relazione ad alcuni dei metodi di analisi descritti. È noto infatti che tali valori possono assumere significati diversi a seconda della metodologia impiegata per la loro definizione.

Abbiamo considerato, per ogni metallo, gruppi di persone eterogenee e di diversa provenienza, sicuramente però non esposte ai metalli considerati per ragione di vita, di lavoro o di cause particolari od eccezionali. Sono stati inoltre analizzati liquidi biologici di persone soggette ad esposizione (inalazione o contatto) dei metalli considerati o dei loro composti. Per questi ultimi, ci siamo riferiti alla nostra specifica esperienza riportando i valori riscontrati in persone che vivono ed agiscono in ambienti di lavoro, in cui la concentrazione nell'aria del metallo non supera il valore limite di riferimento riportato nella lista degli igienisti americani per il 1974.

Nella Tab. 2 vengono quindi riportati i valori determinati per persone professionalmente non esposte e professionalmente esposte (sulla linea indicati rispettivamente con « N » e con « E ») corredati dal numero di casi esaminati e da indicazioni sul metodo analitico utilizzato.

Abbiamo determinato questi valori a titolo complementare ad una documentazione già esistente in bibliografia, ma che è per altro scarsa soprattutto per alcuni elementi. Il significato di queste misure è relativo alla rappresentatività dei campioni e se da un lato, per i non esposti, bisogna considerare tutti i possibili casi di variabilità (inquinamento atmosferico e idrico, alimentazione, abitudini voluttuarie), dall'altro, per i professionalmente esposti, bisogna disporre di confronto sulla salute degli individui a vario livello, anche subclinico. Questo è indubbiamente necessario per stabilire eventuali limiti di tollerabilità biologica: ciò è al di fuori degli obiettivi del nostro lavoro, in quanto abbiamo voluto solo portare un contributo tecnico alla soluzione di questo problema.

TABELLA 2

Valori di eliminazione per individui non professionalmente esposti (N) ed esposti (E)

METALLO	URINA			SIERO			SANGUE		
	Cam- pione N.	Valore $\mu\text{g/l}$	Metodo analisi rif. esp.	Cam- pione N.	Valore $\mu\text{g/100 ml}$	Metodo analisi rif. cap.	Cam- pione N.	Valore $\mu\text{g/100 ml}$	Metodo analisi rif. esp.
Alluminio	N	$3,7 \pm 1,4$	2	30	0 — 1	2	—	—	—
	E	> 5		40	1 — 3		—	—	
Arsenico	N	0 — 15	3	—	—	—	—	—	—
	E	15 — 30		—	—		—	—	
Cadmio	N	0,5 — 3	5 — 7	40	$0,15 \pm 0,07$	7	35	$0,24 \pm 0,09$	7 — 8
	E	10 — 30		80	$0,18 \pm 0,08$		30	$0,41 \pm 0,06$	
Cobalto	N	0 — 3,5	9	15	$0,3 \pm 0,15$	9	15	$0,40 \pm 0,12$	12
	E	—		—	—		—	—	
Cromo	N	5 — 10	13	15	$0,7 \pm 0,21$	14	15	$0,81 \pm 0,14$	14
	E	10 — 35		20	$1,1 \pm 0,24$		15	$2,12 \pm 0,24$	
Ferro	N	variabile	16	60	50 — 150	15-17	—	—	—
	E	—		—	—		—	—	

Segue: TABELLA 2

METALLO	URINA			SIERO			SANGUE		
	Cam- pione N.	Valore $\mu\text{g/l}$	Metodo analisi rif. cap.	Cam- pione N.	Valore $\mu\text{g}/100\text{ ml}$	Metodo analisi rif. cap.	Cam- pione N.	Valore $\mu\text{g}/100\text{ ml}$	Metodo analisi rif. cap.
Manganese	N	3,5 $\pm$ 1,4	20-21	20	0,6 $\pm$ 0,24	20-21	15	0,92 $\pm$ 0,15	21
	E	—		—	—		—	—	
Mercurio	N	5—10	22	—	—	—	25	0,5	22
	E	10—100		—	—		—	—	
Nichel	N	0—2,5	23	15	0,35 $\pm$ 0,17	23	15	0,5 $\pm$ 0,14	23 24
	E	8—20		—	—		—	—	
Piombo	N	25—50	25-28-30	70	0,5—1	25	> 50	18—40	25 31
	E	50—80		30	1—3		> 50	40—60	
	E	80—120		—	—		—	—	
Rame	N	14 $\pm$ 4,5	34	12	104 $\pm$ 52	37	—	—	—
	E	—		—	—		—	—	
Zinco	N	400—1000	38	25	50—100	39	—	—	—
	E	—		—	—		—	—	

Riassunto. — Gli AA. illustrano le tecniche analitiche che possono essere impiegate per la determinazione dei metalli nei liquidi biologici, con l'impiego della spettroscopia in assorbimento atomico. Per alcuni metalli l'analisi può essere effettuata direttamente per atomizzazione del liquido biologico in fiamma o in forno di grafite; per altri occorre un trattamento del campione per la separazione del metallo dal resto della matrice che può essere: calcinazione, microcalcinazione, estrazione.

Viene riportata, nella fase conclusiva del lavoro, una tabella con i valori di concentrazione in urina, sangue, siero di persone professionalmente esposte e non, per i seguenti metalli: Al, As, Cd, Co, Cr, Fe, Mn, Hg, Ni, Pb, Cu, Zn.

Summary (*Determination of metals in the biological liquids*). — The AA. show the analytical methods which can be used to determine the presence of metals in the biological liquids by means of the atomic absorption spectroscopy. For some metals the analysis can be directly achieved by means of atomisation of the biological liquid in a flame or in a graphite furnace; for other metals it is necessary a treatment of the sample to separate the metal from the rest of the matrix, which can be: calcination, microcalcination, mining.

In the final part of this paper, a table is showed with the concentration values in urine, blood, serum of occupationally exposed subjects and not, for the following metals: Al, As, Cd, Co, Cr, Fe, Mn, Hg, Ni, Pb, Cu, Zn.

BIBLIOGRAFIA

1. POZZOLI L., C. MINOIA & S. ANGELELLI, 1976. *Metodi di analisi per la determinazione dei metalli nei liquidi biologici*. Pubblicato dalla Leg. Cart. di C. GE. Pavia.

Contaminanti nei fluidi biologici

G. GHIMENTI, E. GALLI e G. TAPONECO

Laboratorio Chimico Provinciale, Pisa

La legge regionale n. 47 del 3 agosto 1973 ha promosso in Toscana l'istituzione di servizi per la tutela sanitaria dei lavoratori nei luoghi di lavoro da parte dei Comuni, loro Consorzi e Comunità montane.

In essa vengono dati precisi indirizzi agli Enti locali interessati tenendo prioritario il concetto che, in linea del resto con quanto già verificatosi nelle esperienze finora condotte, l'intervento debba coincidere con la capacità dei lavoratori di controllarne i metodi e le finalità, e di gestirne autonomamente i conseguenti risultati, in modo che questo tipo di servizio democratico non divenga una semplice riproposizione della « medicina di fabbrica » tradizionale. La legge n. 47 non si limita a questo ma prevede parallelamente un impegno diretto in quelle zone del territorio regionale dove, al di là della capacità di risposta degli Enti locali, particolari condizioni di concentrazione industriale o ben note situazioni di nocività impongono un rapido e più approfondito intervento.

Il Laboratorio di Igiene e Profilassi di Pisa è stato pertanto impegnato nella prima di queste indagini relativa alla situazione igienico-sanitaria della zona del caio che comprende i comuni di S. Croce S. A., S. Miniato, Castelfranco di Sotto e Fucecchio. La ricerca ha avuto inizio con la presa di conoscenza delle condizioni ambientali interne ed esterne di una conceria che per caratteristiche dimensionali e produttive si colloca nella media delle industrie similari. Questo primo approccio ad una situazione indubbiamente complessa ha permesso già di mettere in evidenza, oltre a parametri fisici di non trascurabile importanza, altri aspetti particolarmente gravi relativi all'attività produttiva. Soprattutto l'impiego di molti prodotti chimici fondamentali con caratteristiche di tossicità cronica ed acuta (sali di cromo, coloranti, solventi organici volatili, fissativi, ecc.) implica un contatto diretto e ravvicinato degli operatori con i relativi aerosols e vapori che vengono così inalati e assorbiti a causa della deficienza degli impianti e dei mezzi di protezione.

Nella fase di riviera e concia e più particolarmente nello scarico dei bottali, ad esempio, si hanno notevoli formazioni di nebbie e le analisi condotte al centro ambiente mettono in rilievo, tra i vari contaminanti, la presenza di cromo trivalente. Nell'intento di approfondirne l'eventuale incidenza in modo da correlare l'azione con la situazione epidemiologica esistente, si è intrapreso uno studio atto a determinare la concentrazione del cromo nei liquidi biologici e nei tessuti. Come è noto questo elemento è essenziale alle normali funzioni fisiologiche dell'organismo umano ed è riscontrabile nel sangue a livelli che oscillano normalmente tra 10 e 60 ng/ml.

Dato che la deficienza di cromo è un fattore riferibile a disturbi nel metabolismo del glucosio e la sua eccedenza provoca effetti tossici, la cui portata non è ancora del tutto definita, ne deriva la necessità di avere a disposizione un metodo analitico assai fine che ne permetta la determinazione a livelli anche inferiori ai 5 ng/ml e su campioni assai limitati.

Per questo, tra le varie metodiche riportate in letteratura [1-22], abbiamo ritenuto opportuno sviluppare e mettere a punto le due che utilizzano rispettivamente la spettrofotometria ad assorbimento atomico con fornace in grafite e la gascromatografia con introduzione del cromo in colonna sotto forma di trifluoroacetilacetato, sfruttando l'alta sensibilità che il rivelatore a cattura di elettroni presenta a questo chelato. In effetti già da tempo venivano condotti nel nostro laboratorio studi in questo senso sulla caratterizzazione e determinazione di vari metalli, quali ad esempio il berillio, il manganese, il cobalto, il nichel, lo stagno, il piombo, il mercurio, ecc. per cui il lavoro intrapreso per il cromo viene a costituire un aspetto, pur importante, di una indagine analitica assai più generale e diversificata.

PARTE SPERIMENTALE

Apparecchiatura

Tubi di reazione in vetro pyrex (100 × 6 mm d.i.) ottenuti da pipette Pasteur.

Provette graduate a fondo conico con tappo in teflon, capacità 5 ml.

Gascromatografo Fractovap Mod. GT (C. Erba S.p.A. Rodano-Milano), colonna in vetro, lunghezza m 2, d.i. mm 3, impaccata con OV-225 1,5 % su GasChrom P silanizzato 100-120 mesh:

temperatura della colonna 130 °C;

temperatura del blocco di iniezione 180 °C;

gas di trasporto (azoto) 40 ml/min;

gas ausiliario al rivelatore: miscela argon 92 %-metano 8 %, 60 ml/min;

rivelatore EC al Ni^{63} ;

temperatura del rivelatore; 250 °C;

condizioni di lavoro del rivelatore: ampiezza del segnale di eccitazione 10 V, durata 1 μs , periodo 100 μs .

Spettrofotometro ad assorbimento atomico Perkin-Elmer Mod. 503 con fornace in grafite (HGA).

HGA:

essiccamento a 100 °C per 30s;

preriscaldamento a 400 °C per 25s;

riscaldamento a 1200 °C per 15s;

atomizzazione a 2700 °C per 15s.

Reattivi

Esano per pesticidi (C. Erba S.p.A. Rodano-Milano).

Soluzione 1 : 100 di H (tfa) (Fluka AG Buchs SG) preparata sciogliendo il materiale appena distillato in esano.

Cis-trans $\text{Cr}(\text{tfa})_3$: si prepara mescolando 100 mg di polvere di cromo, 1 ml di H (tfa) e una goccia di HCl conc.; la miscela è agitata vigorosamente e l'eccesso di H(tfa) è rimosso estraendo con 4 ml di NaOH 0,5N dopo aver aggiunto 4 ml di benzene. Dopo l'eliminazione del solvente, in evaporatore rotante sotto vuoto, il prodotto è purificato per sublimazione frazionata a 100-140 °C (0,05 mmHg).

Soluzione di NaOH 1N.

Stock di $\text{Cr}(\text{tfa})_3$ preparato sciogliendo 0,01 g di materiale puro in 10 ml di esano: la soluzione che ne risulta contiene $1,02 \times 10^{-4}$ g/ml di cromo. Le soluzioni standard utili per il dosaggio del cromo nei liquidi biologici sono preparate per appropriate diluizioni con esano.

Stock di cromo trivalente preparato sciogliendo 960 mg di $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ in 500 ml di acqua: ne risulta una soluzione contenente 20 mg/100 ml di cromo che può essere ulteriormente diluita per gli standard utili nelle condizioni di lavoro.

Dosaggio del cromo nel sangue

Un campione di 0,05 ml di sangue è introdotto nel tubo di reazione con 0,50 ml di soluzione esanica contenente 0,005 ml di H (tfa). Il tubo immerso parzialmente in un bagno di acqua e ghiaccio viene saldato all'altra estre-

mità, agitato, rivestito con un foglio pesante di alluminio e posto in stufa a 175 °C per 30 min. Dopo 5 min di raffreddamento il tubo è aperto e la fase esanica è aggiunta in provetta conica a 0,50 ml di NaOH 1N. Dopo agitazione (5 min) la provetta è centrifugata per 5 min. La fase esanica è posta in provetta tarata e 2 µl della soluzione iniettati in gascromatografo.

La determinazione di cromo aggiunto al campione biologico è identica al procedimento descritto con l'unica eccezione che nel tubo di reazione oltre a 0,05 ml di sangue e 0,5 ml di soluzione esanica di H (tfa) sono posti anche 0,05 ml di soluzione acquosa di cromo a concentrazione nota.

DISCUSSIONE DEI RISULTATI

I metodi riportati in letteratura per la determinazione gascromatografica del cromo (III) nei tessuti e fluidi biologici si compongono generalmente di due processi ben definiti e cioè la digestione acida del campione in esame seguita da una vera e propria chelazione-estrazione e conseguente quantificazione strumentale. Senza trascurare l'importanza degli studi condotti a questo riguardo da Savory e coll. [13] da Booth e Darby [18] ecc., abbiamo comunque cercato di verificare e puntualizzare la tecnica sviluppata da Hansen e col. [19] che prevede un unico trattamento del campione con soluzione esanica dell'agente chelante ad alta temperatura.

In questo modo infatti, con poco sacrificio, come vedremo, della sensibilità del metodo e senza interferenze inopportune, si riesce a risparmiare tempo notevole nel procedimento di analisi che così viene a richiedere, considerando la possibilità di procedere su più campioni contemporaneamente, non più di 30 min per campione compresa l'analisi gascromatografica.

Le stesse considerazioni sono state seguite per la determinazione del cromo mediante assorbimento atomico con fornace in grafite; si è preferito infatti anche in questo caso utilizzare il metodo diretto, iniettando cioè una quantità definita di soluzione ematica opportunamente diluita nella fornace in modo da risparmiare tempo notevole dato che il metodo indiretto con digestione acida prevede un tempo medio di analisi di circa 2 h e 30 min anche se più campioni possono essere trattati contemporaneamente. Nel caso specifico comunque si incontrano diversi svantaggi che vanno da notevoli interferenze dovute alla matrice con soppressione evidente del segnale di assorbimento a errori non indifferenti causati dall'irregolare essiccamento del campione nel tubo di grafite e dall'inglobamento di cromo nell'eccessivo residuo che vi rimane dopo diversi incenerimenti.

In Tab. 1 sono riportati i parametri relativi alla determinazione del cromo nel sangue in queste condizioni; come si può osservare, il metodo gascromatografico presenta minori incertezze ed una sensibilità superiore a

TABELLA 1

Parametri relativi alla determinazione del cromo nel sangue

	GLC-EC (a)	HGA (b)
<i>Intervallo ottimale di lavoro</i>		
aliquota campione:		
2 µl	5-500 ng/ml	—
20 µl	—	25-200 ng/ml
50 µl	—	10-80 ng/ml
<i>Sensibilità</i>	0,005 ng	0,25 ng
<i>Limite di determinazione</i>	0,002 ng	0,10 ng

(a) come trifluoroacetilacetone; (b) metodo diretto.

quella ottenuta per HGA, sensibilità che può essere con buona approssimazione indicata rispettivamente pari a 2 ng/ml e 5 ng/ml.

I risultati delle determinazioni gascromatografiche di cromo aggiunto al sangue sono mostrati in Tab. 2 dalla quale si possono osservare efficienze

TABELLA 2

GLC-EC: recupero del cromo aggiunto al sangue

Campione n.	Cr aggiunto ng/ml	Cr determinato ng/ml	Cr recuperato %
B ₁		13	
B ₁₋₁	5	18	100
B ₁₋₂	10	22	90
B ₁₋₃	20	31	90
B ₁₋₄	40	51	95
B ₂		36	
B ₂₋₁	5	41	100
B ₂₋₂	10	45	90
B ₂₋₃	20	55	95
B ₂₋₄	40	73	92.5

di recupero che oscillano mediamente tra il 90 % ed il 95 %, utilizzando un volume di campione pari solo a 0.05 ml.

Cromatogrammi tipici di standard e di estratti esanici sono mostrati nelle figure che seguono.

In Fig. 1 sono riportati rispettivamente da sinistra a destra uno standard di $\text{Cr}(\text{tfa})_3$ disciolto in esano, un estratto esanico di un campione di sangue (B_1), lo stesso dopo l'aggiunta di 5 ng/ml di cromo.

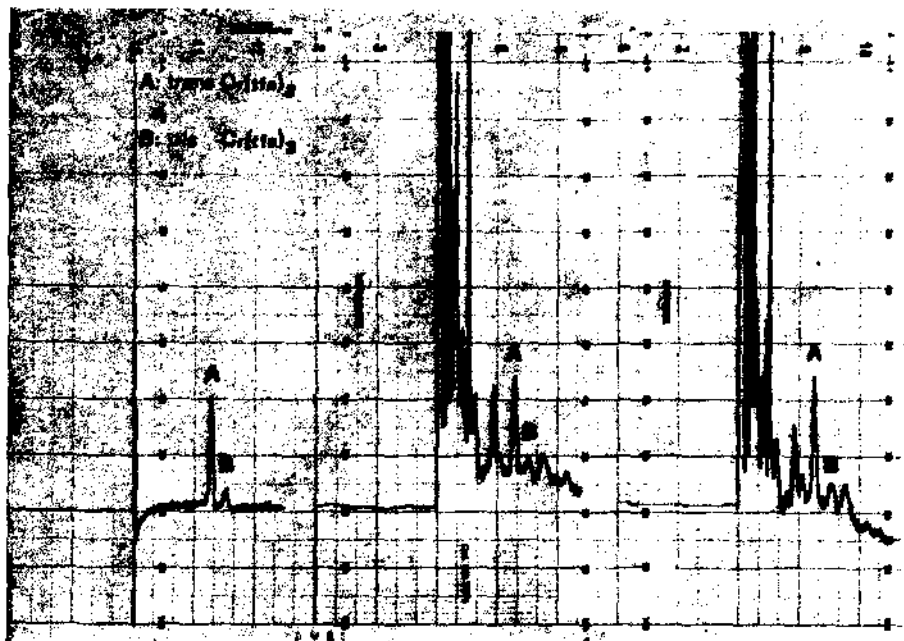


Fig. 1. — Da sinistra a destra: Cromatogrammi di a) 2 μl di soluzione standard di $\text{Cr}(\text{tfa})_3$ contenente 15 ng/ml di $\text{Cr}(\text{III})$; b) 2 μl di estratto esanico dal sangue B_1 con nessuna aggiunta di cromo; c) 2 μl di estratto esanico dal sangue B_1 a cui è stato aggiunto cromo pari a 5 ng/ml.

In Fig. 2 sono riportati uno standard di $\text{Cr}(\text{tfa})_3$ pari a 20 ng/ml di $\text{Cr}(\text{III})$ disciolto in esano ed un estratto esanico di un campione di sangue B_{14} , entrambi concentrati ad un volume pari alla metà di quello originario e iniettati ad una sensibilità del rivelatore a cattura di elettroni inferiore ($\times 100 \times 32$ invece di $\times 100 \times 16$).

In tutti i cromatogrammi si nota la presenza accanto al picco principale «A» dovuto al trans $\text{Cr}(\text{tfa})_3$ di quello caratteristico dell'isomero cis («B») con tempo di ritenzione superiore e con un rapporto pari approssi-



Fig. 2. — Da sinistra a destra: Cromatogrammi di a) 2 μ l di soluzione standard di $\text{Cr}(\text{tfa})_3$ contenente 20 ng/ml di $\text{Cr}(\text{III})$; b) 2 μ l di estratto esanico dal sangue B_{14} .

mativamente a 1:4, e negli estratti esanici dei campioni di sangue anche una serie di altri picchi in quantità notevole che per il momento non sono stati ancora identificati ma che comunque non interferiscono nella quantificazione desiderata. Essi infatti non possono essere attribuiti né all'eccesso di $\text{H}(\text{tfa})$ rimasto nella fase esanica, né alla presenza di $\text{Fe}(\text{tfa})_3$ dovuta alla grande quantità di ferro nei globuli rossi, in quanto il trattamento finale con NaOH 1N rimuove l'uno e l'altro di questi potenziali contaminanti con perdite trascurabili di $\text{Cr}(\text{tfa})_3$, come riportato da Ross e Sievers [11], da Hansen e coll. [19] e da noi verificato direttamente per via gascromatografica.

In Tab. 3 sono riportati i risultati relativi alla determinazione del cromo nel sangue in addetti alla concia delle pelli, normalmente ai bottali e solo in due casi alla rifinitura, ed in individui operanti in campi che escludono il contatto con i prodotti interessati.

L'osservazione dei risultati ottenuti, mentre rivela una buona concordanza tra il metodo gascromatografico e quello diretto per assorbimento atomico con fornace in grafite, mette altresì in evidenza un'alternanza di valori sia per gli individui esposti che per quelli non esposti che rientra comunque nei livelli normali finora riscontrati e riportati in letteratura [21].

TABELLA 3

Determinazione del cromo nel sangue

Campione n.	Conceria	GLC-EC ng/ml	HGA ng/ml
B ₁		15	10-15
B ₂		36	35-40
B ₃		23	26-32
B ₄		11	10-15
B ₅		33	30-35
B ₆	D b. 42	27	22-27
B ₇	D b. 1	47	47-52
B ₈	D b. 7	34	32-37
B ₉	D b. 16	39	35-40
B ₁₀	AL b. 4	18	18-23
B ₁₁	AL r. 25	10	12-17
B ₁₂	AL r. 13	11	10-15
B ₁₃	AL b. 4	8	13-18
B ₁₄	N b. 5	32	31-36
B ₁₅	N b. 3	46	30-35
B ₁₆	AR b. 6	16	12-17
B ₁₇	AR b. 19	26	22-27
B ₁₈	AR b. 4	18	18-23
B ₁₉	AR b. 13	11	8-13
B ₂₀	AR b. 8	18	10-15

b: bottali; r: rifuizione; seguono gli anni lavorativi.

Ciò evidentemente non permette per il momento di trarre conclusioni riguardo alla presenza del cromo nel sangue di lavoratori esposti, anche perché è ovvio che a questa determinazione deve necessariamente associarsi quella contemporanea nelle urine ed eventualmente nei tessuti. Tali indagini devono inoltre essere prolungate nel tempo particolarmente nei casi di più lunga esposizione. D'altra parte lo scopo del presente lavoro è unicamente rappresentato da una messa a punto di una metodica standard di facile applicabilità sia dal punto di vista chimico che da quello della disponibilità del campione; lo studio, per quanto detto sopra, sarà naturalmente esteso alla

quantificazione nelle urine e nei tessuti e ad altri campi che già alla luce di questi primi risultati sembrano presentare notevoli possibilità di applicazione.

Ad ogni modo questa tecnica, pur con necessarie riconferme, si impone per la praticità e la sensibilità come metodo diagnostico semplice e veloce in sostituzione dell'utilizzo di cromo radioattivo che spesso è prudente evitare.

Gli AA. ringraziano il sig. S. Porciani del Laboratorio Chimico Provinciale di Firenze ed il sig. Goracci della Perkin-Elmer Italiana per la preziosa collaborazione offerta nelle analisi dei campioni per assorbimento atomico.

Riassunto. — Gli Autori mettono in evidenza la possibilità di quantizzare con esattezza diversi metalli quali il berillio, il cromo, il manganese, il cobalto, il nichel, lo stagno, il piombo, il mercurio ed altri per via gascromatografica una volta che sono portati in colonna sotto forma di complessi o di derivati. In particolare viene presa in esame la determinazione del cromo nel sangue di addetti a lavorazioni inerenti la concia delle pelli facendo riferimento e valutando eventuali discrepanze, vantaggi o deficienze rispetto al dosaggio per spettrofotometria ad assorbimento atomico.

Summary (Pollutants in biological fluids). — The AA. report the gaschromatographic determination of some metal hazards encountered in the environment, as beryllium, chromium, manganese, cobalt, nickel, tin, lead, mercury and others. They develop the rapid method by Hansen *et al.* for the analysis of sub-nanogram amounts of chromium with the formation from blood of chromium trifluoroacetylacetonate $\text{Cr}(\text{tfa})_3$ and quantitation of this chelate using electron-capture GLC. Particularly different samples of chrome tanning workers blood are tested.

Informations are provided concerning the equipment, operating parameters, sensitivity, interferences and the approximate time required for this method and the correspondent using the atomic absorption spectrometry.

BIBLIOGRAFIA

1. URONE, P. F. & H. K. ANDERS. 1950. Determination of small amounts of chromium in human blood, tissues, and urine. *Anal. Chem.* **22**: 1317-1321.
2. CAHMANN, H. J. & R. BISEN. 1952. Microdetermination of chromium in blood. *Anal. Chem.* **24**: 1341-1345.
3. SALTZMAN, B. E. 1952. Microdetermination of chromium with diphenylcarbazide by permanganate oxidation. *Anal. Chem.* **24**: 1016-1020.
4. FAY, R. C. & T. S. PIPER. 1962. Coordination compounds of trivalent metals with unsymmetrical bidentate ligands I benzoylacetonates. *J. Amer. Chem. Soc.* **84**: 2303-2308.

5. ROSS, W. D. 1963. Detection of metal chelates in gas liquid chromatography by electron capture. *Anal. Chem.* **35**: 1596-1598.
6. JUVET, R. S. & R. P. DURBIN. 1963. Flame photometric detection of metal chelates separated by gas chromatography. *J. Gas Chromatogr.* **12**: 14-17.
7. HILL, R. D. & H. GESSER. 1963. An investigation into the quantitative gas chromatographic analysis of metal chelates using a hydrogen-flame ionization detector. *J. Gas Chromatogr.* **10**: 11-14.
8. FAY, R. C. & T. S. PIPER. 1963. Coordination compounds of trivalent metals with unsymmetrical bidentate ligands II trifluoroacetylacetonates. *J. Amer. Chem. Soc.* **85**: 500-504.
9. ALBERT, D. K. 1964. Comparison of electron capture and hydrogen flame detectors for gas chromatographic determination of trace amounts of metal chelates. *Anal. Chem.* **36**: 2034-2035.
10. ROSS, W. D. & G. WHEELER JR. 1964. Quantitative determination of chromium III hexafluoroacetylacetonate by gas chromatography. *Anal. Chem.* **36**: 266-268.
11. ROSS, W. D., R. E. SIEVERS & G. WHEELER JR. 1965. Quantitative ultratrace analysis of mixture of metal chelates by gas chromatography. *Anal. Chem.* **37**: 598-600.
12. VEENING, H. & G. F. K. HUBERT. 1968. Phenomena which influence the retention of metal fluoroacetylacetonates in gas liquid chromatography. *J. Gas Chromatogr.* **6**: 326-330.
13. SAVORY, J., P. MUSHAK & F. W. SUNDERMAN JR. 1969. Gas chromatographic determination of chromium in serum. *J. Chromatogr. Sci.* **7**: 674-675.
14. KOWALSKI, B. R., T. L. ISENHOUR & R. E. SIEVERS. 1969. Ultratrace mass spectrometric metal analysis using heptafluorodimethyloctanedione chelates. *Anal. Chem.* **41**: 998-1003.
15. BOOKER, J. L., T. L. ISENHOUR & R. E. SIEVERS. 1969. Rapid mass spectrometric determination of chromium as chromium III hexafluoroacetylacetonate. *Anal. Chem.* **41**: 1705-1707.
16. SAVORY, J., P. MUSHAK, F. W. SUNDERMAN JR., R. H. ESTES & N. O. ROSZEL. 1970. Microdetermination of chromium in biological materials by gas chromatography. *Anal. Chem.* **42**: 294-297.
17. HAMBIDGE, K. M. 1971. Use of static argon atmosphere in emission spectrochemical determination of chromium in biological materials. *Anal. Chem.* **43**: 103-107.
18. BOOTH, G. H. JR & W. J. DARBY. 1971. Determination by gas liquid chromatography of physiological levels of chromium in biological tissues. *Anal. Chem.* **43**: 831-834.
19. HANSEN, L. C., W. G. SCRIBNER, T. W. GILBERT & R. E. SIEVERS. 1971. Rapid analysis for sub nanogram amounts of chromium in blood and plasma using electron capture gas chromatography. *Anal. Chem.* **43**: 349-353.
20. WOLF, W. R., M. L. TAYLOR, B. M. HUGHES, T. O. TIERMAN & R. E. SIEVERS. 1972. Determination of chromium and beryllium at the picogram level by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chem.* **44**: 616-618.
21. SAVORY, J., M. T. GLENN & J. A. AHLSTROM. 1972. Studies on the determination of physiological levels of chromium in serum by gas chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* **10**: 247-252.
22. DAVIDSON, W. F. & W. L. SECREST. 1972. Determination of chromium in biological materials by atomic absorption spectrometry using a graphite furnace atomiser. *Anal. Chem.* **44**: 1808-1813.