

IL METODO DELLE AGGIUNTE NELLA QUANTIFICAZIONE DEL BENZENE URINARIO

P. BASILICATA¹, N. MIRAGLIA¹, A. BASILE², A. SIMONELLI¹, M. PIERI²
G. GENOVESE², A. PERROTTA², A. ACAMPORA¹.

INTRODUZIONE

Tra i solventi organici maggiormente diffusi, il benzene, noto agente cancerogeno, riveste particolare interesse, in quanto è presente nell'aria-ambiente praticamente ovunque, derivando da processi di combustione sia naturali (incendi boschivi, emissioni vulcaniche) che artificiali (emissioni industriali, gas di scarico, ecc.).

Il benzene è inoltre contenuto nelle benzine, in cui viene aggiunto, insieme ad altri composti aromatici, per conferire le volute proprietà antidetonanti e per aumentare il "numero di ottano" in sostituzione totale (benzina verde) o parziale (benzina super) dei composti del piombo.

L'elevata concentrazione ambientale di benzene nei centri urbani, infatti, è dovuta per oltre il 90% ad emissioni attribuibili alle produzioni legate al ciclo della benzina: raffinazione, distribuzione dei carburanti e soprattutto traffico veicolare, che da solo incide per circa l'85% sul totale.

Il fumo di tabacco rappresenta la maggior fonte di esposizione a benzene per la popolazione generale non esposta professionalmente. L'ammontare medio di benzene contenuto nel fumo di una sigaretta è piuttosto elevato (40-50µg) e dipende dal tipo di tabacco; un fumatore di 20 sigarette al giorno inala circa 700-800µg di benzene (1).

Dati provenienti da studi epidemiologici dimostrano la tossicità del benzene; questa sostanza, infatti, è associata allo sviluppo di leucemia

¹ Dipartimento di Medicina e della Sicurezza Sociale, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli.

² Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Medicina del Lavoro, Seconda Università degli Studi di Napoli.

non-linfocitica acuta, anemia aplastica, aberrazioni cromosomiche ed una progressiva degenerazione del midollo osseo (2-7). L'American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH), sulla base di questi studi, classifica il benzene nella Categoria A1: "Cancerogeno riconosciuto per l'uomo" e definisce per il benzene un valore limite di soglia-media ponderata nel tempo (TLV-TWA) pari a 0,5ppm (1,6 mg/m³) (8).

Gli indicatori biologici di esposizione finora adoperati e proposti dall'ACGIH, nel caso di esposizione a benzene, sono l'N-acetil-S-fenilcisteina e l'acido *trans,trans* muconico (9-14). Negli ultimi tempi, tuttavia, fra le procedure adoperate per il monitoraggio biologico di soggetti professionalmente esposti hanno assunto particolare importanza tecniche basate sulla quantificazione del benzene come composto immodificato nelle urine, il quale rappresenta circa 1% della dose assorbita (15-18).

In questo lavoro viene illustrata una procedura per la determinazione del benzene, come composto immodificato nelle urine, la quale ha previsto tre fasi: la fase di campionamento; l'analisi mediante spazio di testa/micro estrazione in fase solida/gas cromatografia/spettrometria di massa (HS/SPME/GC/MS); e la quantificazione del benzene con il metodo delle aggiunte.

La scelta del metodo quantitativo da adoperare è stata dettata dalla complessità della matrice urinaria e dalla notevole influenza che la sua composizione opera sulla fase di estrazione del benzene. Il metodo delle aggiunte, infatti, prevede la divisione di ogni campione in tre aliquote, di cui una rappresenta il campione incognito, mentre le altre due, alla quali vengono addizionate quantità note dell'analita, servono per la calibrazione. In questo modo la fase di calibrazione viene effettuata con la stessa urina che deve essere analizzata, minimizzando, quindi, qualsiasi interferenza dovuta sia alla preparazione e conservazione del campione, che alla composizione dell'urina da analizzare. Il metodo è stato applicato all'analisi dei livelli di benzene nelle urine di 11 lavoratori esposti a vapori di benzene, impiegati in un deposito di stoccaggio di carburanti.

Parte sperimentale

Urine, raccolte da soggetti non fumatori e non esposti, sono state analizzate allo scopo di calcolare il coefficiente di variazione e l'in-

naccuratezza del metodo delle aggiunte, quale metodo di elezione per la quantificazione del benzene urinario. Dopo la raccolta l'urina è stata trattata con un flusso di azoto per 5 min, per allontanare eventuali quantità di benzene già presenti nelle urine, il campione è stato, quindi, diviso in tre aliquote, da 4 ml ciascuna, in vials da 10 ml contenenti 1g di NaCl. Il sale ha la funzione di aumentare la forza ionica della soluzione e di favorire, in questo modo, il passaggio del benzene dalla soluzione urinaria alla fase vapore dello spazio di testa. Ad ogni aliquota è stato aggiunto benzene esadeuterato, quale standard interno, ottenendo una concentrazione finale di 76 µg/l di questo composto. In ogni vial, inoltre, sono stati aggiunti volumi differenti di una soluzione acquosa 11.6 µg/l di benzene, ottenendo tre differenti concentrazioni dell'analita: 0.145, 0.58 e 2.32 µg/l. Il metodo messo appunto è stato utilizzato per analizzare urine di lavoratori esposti a vapori di benzene, impiegati in un deposito di stoccaggio carburanti, sia fumatori che non fumatori. I campioni raccolti sono stati divisi in tre aliquote da 4 ml ognuna, immediatamente introdotte, mediante l'ausilio di una siringa, in vials contenenti 1 g di NaCl precedentemente condizionate con un flusso di azoto e sigillate. Ad ogni aliquota è stato aggiunto lo standard interno alla concentrazione di 76 µg/l. Alla prima aliquota non è stato aggiunto benzene, alla seconda sono stati aggiunti 100 µl di una soluzione 11.6 µg/l di benzene, ottenendo una concentrazione di 0.29 µg/l ed alla terza sono stati aggiunti 800 µl della stessa soluzione, ottenendo una concentrazione di benzene di 2.32 µg/l. Il campionamento è stato effettuato per ogni soggetto sia all'inizio che alla fine del turno di lavoro. Tutti i campioni sono stati conservati a -4°C e scongelati solo al momento dell'analisi.

La procedura analitica si divide in varie fasi. La prima è la fase di estrazione del benzene e dello standard interno, mediante una fibra rivestita chimicamente, la cui funzione è di concentrare i composti volatili inizialmente contenuti nel campione liquido. In condizioni controllate (tempo e temperatura di contatto fra la fibra e la fase vapore), infatti, i composti chimici presenti nel campione vengono estratti mediante adsorbimento sul rivestimento della fibra stessa.

La fase di estrazione degli analiti dalla matrice biologica coincide con la purificazione del campione da analizzare, in quanto, solo le sostanze volatili arricchiscono lo spazio di testa, cioè la fase gassosa sovrastante il liquido contenuto nelle vials a tenuta.

Il campione scongelato viene tenuto 30 min in un bagno termostatico alla temperatura di 55°C, successivamente un fibra di silice,

rivestita con uno strato di carboxen/polidimetilsilossano (PDMS), dello spessore di 85 μm , viene esposta alla fase vapore sovrastante il campione all'interno della vial per 15min, alla stessa temperatura. La seconda fase è l'analisi vera e propria, la fibra viene tolta dal campione ed inserita direttamente nell'iniettore *split/splitless* di un gas cromatografo. L'elevata temperatura all'interno dell'iniettore (260°C) causa un rapido desorbimento delle sostanze volatili presenti nel campione e trattenute dalla fibra (benzene e benzene esadeuterato), le quali saranno trasportate da un flusso di Elio (1ml/min) nella colonna capillare del gas cromatografo.

La temperatura del forno del gas cromatografo è tenuta a 40°C per 2 min e poi incrementata di 6°C/min fino ad una temperatura di 70°C. La temperatura della sorgente dello spettrometro di massa è tenuta a 170°C. Lo spettro di massa viene acquisito in modalità a Scansione di Ioni Selezionati, (SIM) ed i segnali acquisiti sono ad m/z 51, 77 e 78 per il benzene ed m/z 82 ed 84 per il benzene esadeuterato.

Per la quantificazione mediante metodo delle aggiunte, i rapporti tra le aree dei picchi cromatografici relativi al benzene ed al benzene esadeuterato, delle tre aliquote di ogni campione analizzato, vengono riportati in grafico in funzione della concentrazione di benzene addizionata. L'intercetta sull'asse delle ascisse della retta passante per i tre punti rappresenta la concentrazione di benzene nel campione incognito (fig.1).

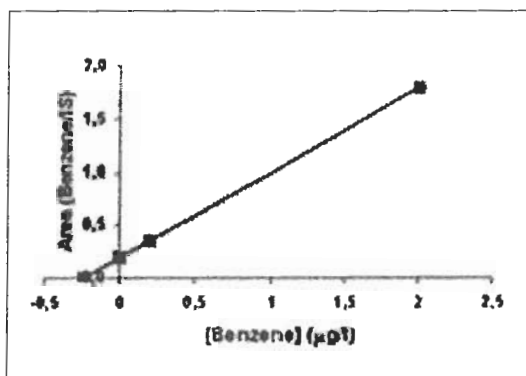


FIGURA 1: Retta passante per i punti: $y = 1,0037 x + 0,0302$ [benzene] nel campione incognito = intercetta = 0,030mg/l.

Risultati e discussione

Al fine di determinare l'inaccuratezza percentuale (Inacc.%) e la precisione, come coefficiente di variazione percentuale (C.V.%), del metodo delle aggiunte sono state analizzate tre aliquote di urina previamente insufflata con azoto, nelle quali erano stati aggiunti volumi diversi di una stessa soluzione acquosa di benzene e volumi uguali di una soluzione acquosa di standard interno. I tre campioni sono stati analizzati e ciascuno dei tre è stato trattato come un campione incognito, utilizzando gli altri due per la quantificazione. L'analisi è stata ripetuta tre volte in giorni differenti e con urine differenti. I risultati sono riportati in tabella 1. I dati mostrano che il metodo delle aggiunte può essere utilizzato per la quantificazione del benzene in lavoratori professionalmente esposti.

TABELLA 1: *Inaccuratezza e precisione del metodo delle aggiunte nella determinazione del benzene urinario*

<i>Nominal [Benzene] (mg/l)</i>	<i>CV%</i>	<i>Inacc.%</i>	<i>Calculated [Benzene] ±SD (mg/l)</i>
0.145	2.0	2.1	0.148 ± 0.003
0.580	2.5	3.4	0.600 ± 0.015
2.230	0.1	0.9	2.340 ± 0.002

I livelli di benzene presenti nelle urine di lavoratori esposti sono stati valutati mediante analisi di campioni raccolti presso un impianto di stoccaggio di carburanti. Ai soggetti indagati è stato sottoposto un questionario al fine di valutare la reale esposizione a vapori di benzene durante il turno lavorativo. Nel questionario, oltre all'esposizione professionale sono state prese in considerazione anche altre tra le principali fonti di esposizione a benzene, quali l'abitudine al fumo e l'esposizione al traffico veicolare, al fine di poter discriminare tra l'esposizione professionale ed altre eventuali fonti di esposizione.

Sono state raccolte le urine di inizio e fine turno degli 11 lavoratori. Le concentrazioni di benzene calcolate sono riportate in µg/g creatinina (tabella 2).

TABELLA 2: Concentrazione urinaria di benzene in soggetti professionalmente esposti

Campioni		Sigarette/die	[Benzene] mg /g creat
1 ^a	Prima del turno di lavoro Dopo il turno di lavoro	0	0.009 0.031
2 ^a	Prima del turno di lavoro Dopo il turno di lavoro	0	0.019 0.011
3 ^b	Prima del turno di lavoro Dopo il turno di lavoro	0	0.098 0.256
4 ^b	Prima del turno di lavoro Dopo il turno di lavoro	0	0.171 0.019
5 ^c	Prima del turno di lavoro Dopo il turno di lavoro	0	0.202 >>3
6 ^c	Prima del turno di lavoro Dopo il turno di lavoro	0	0.028 0.331
7 ^c	Prima del turno di lavoro Dopo il turno di lavoro	0	0.084 0.208
8 ^c	Prima del turno di lavoro Dopo il turno di lavoro	0	0.130 1.293
9 ^c	Prima del turno di lavoro Dopo il turno di lavoro	0	0.054 0.203
10 ^c	Prima del turno di lavoro Dopo il turno di lavoro	15	1.244 0.088
11 ^d	Prima del turno di lavoro Dopo il turno di lavoro	20	0.073 >3

Livelli di esposizione teorici in base alla mansione svolta:
a = molto basso; b = basso; c = medio; d = alto

I livelli di benzene nelle urine di inizio turno sono correlabili con i livelli basali di benzene soggettivi, relativi cioè a ciascun lavoratore in relazione alle proprie abitudini di vita. Per la maggior parte dei soggetti indagati si evidenzia un incremento proporzionale tra i livelli di benzene di inizio e fine turno, ad eccezione dei soggetti 10 ed 11 che sono gli unici due fumatori del gruppo. Dalle informazioni raccolte tramite il questionario è stata stabilita la seguente scala teorica dei livelli di esposizione in funzione della mansione svolta all'interno dell'impianto: molto basso per gli impiegati dell'ufficio tecnico (campioni 1 e 2); basso per il responsabile dell'impianto e l'addetto al deposito (campioni 3 e 4); medio per gli operai d'impianto (campioni da 5 a 10); alto per l'impiegato alle pompe (campione 11).

L'incremento di concentrazione rilevato nelle urine di inizio e fine turno è facilmente correlabile con la mansione svolta e con il grado di esposizione previsto in base all'analisi di quanto verbalmente affermato dai lavoratori stessi.

Gli impiegati dell'ufficio tecnico, infatti, presumibilmente meno esposti al benzene, mostrano uguali livelli di benzene urinario nelle urine di inizio e di fine turno; le concentrazioni dell'analita, inoltre, sono paragonabili a quelle riscontrate nella popolazione generale non professionalmente esposta a benzene. Le concentrazioni di benzene urinario riscontrate negli altri soggetti indagati (operai d'impianto), sebbene aumentino leggermente nelle urine di fine turno, riflettono un grado di esposizione a basse dosi di benzene. Fa eccezione un unico operaio di impianto (campione 4) in cui i livelli di benzene sono maggiori nelle urine di inizio turno. Questo fatto è attribuibile a fonti di esposizione diverse da quella professionale, quali: traffico autoveicolare o fumo passivo. Nei soggetti 5 e 11 sono stati ritrovati valori di benzenuria maggiori di 3 µg/l. Il soggetto 11 è l'addetto alle pompe, esposto, quindi, a maggiori quantità di benzene ed è, inoltre, un fumatore. Gli alti livelli di benzene, quindi, sono attribuibili ad entrambi i fattori. Nel caso del soggetto 5, nel quale si riscontrano livelli di benzene molto elevati, sarebbero necessarie ulteriori indagini. Nel soggetto 10, infine, i livelli di benzene nelle urine di inizio turno sono maggiori di quelle di fine turno, presumibilmente a causa dell'abitudine al fumo di questo soggetto.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti suggeriscono che il benzene urinario può essere utilizzato come biomarcatore di esposizione nel monitoraggio di lavoratori professionalmente esposti dato che si riscontrano apprezzabili differenze di concentrazione nelle urine raccolte prima e dopo il turno di lavoro. Tuttavia la raccolta e l'analisi di due campioni urinari per ogni soggetto da analizzare è svantaggiosa sia per i tempi sia per i costi elevati. Comunque anche l'analisi delle sole urine di fine turno può riflettere i livelli di esposizione professionale e può essere utilizzata per il monitoraggio biologico di lavoratori professionalmente esposti a vapori di benzene.

BIBLIOGRAFIA

1. DKOLFER F.A., SCHERER G., CONZE C., ANGERER J., LEHNERT G. Significance of exposure to benzene and other toxic compounds through environmental tobacco smoke. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 116: 591-598 (1990).
2. RINSKY R.A., SMITH A.B., HORNUNG R., FILLON T.G., YOUNG R.J., OKUN A.H., LANDRIGAN P.J. Benzene and leukemia. An epidemiologic risk assessment. *N. Engl. J. Med.* 316: 1044 (1987).
3. HITE M., PECHARO M., SMITH I., THORNTON S. The effect of benzene in the micronucleus test. *Mutat. Res.* 77: 149 (1980).
4. TICE R.R., COSTA D.L., DREW R.T. Cytogenetic effects of inhaled benzene in murine bone marrow: induction of sister chromatid exchanges, chromosomal aberrations, and cellular proliferation inhibition in DBA/2 mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 2148 (1980).
5. PIROZZI-CHATTERJEE S., SNYDER R., IN ARINE E., SCHENKMAN J.B., HODGSON E. (Editors), *Molecular Aspects of Monooxygenases and Bioactivation of Toxic Compounds. Plenum Press, New York* p. 387 (1991).
6. FORNI A. Benzene-induced chromosome aberrations: a follow-up study. *Environ. Health Perspect.* 104(Suppl. 6): 1309 (1996).
7. MELIKIAN A.A., MENG M., O'CONNOR R., HU P., THOMPSON S.T. Development of liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry methods for determination of urinary metabolites of benzene in humans. *Health Effect Institute, Research Report Number 87* (1999).
8. ACGIH Threshold Limit Values and biological Exposure Indices. American Conference of Governmental Industrial Hygienists. Cincinnati, Ohio, USA (1999).