

INDICE

Introduzione pag. 1
Scopo della ricerca 4

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA

PARTE TEORICA

Sorgenti di esposizione e diffusione del mercurio 5
Effetti genetici del Metil Mercurio in uomini
esposti attraverso il consumo del pesce 10

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE BIOLOGICHE

Metodi di determinazione del mercurio totale in
matrici biologici Anno accademico 1971/72 12

Metodi di determinazione del Metil Mercurio in
sistemi biologici 15

Determinazione del Mercurio totale ed organico
nelle acque 17

Bibliografia 19

INDAGINE SULL'INQUINAMENTO DA MERCURIO
IN UN TRATTO DI MARE ANTISTANTE LA ZONA INDUSTRIALE
DI ROSIGNANO SOLVAY

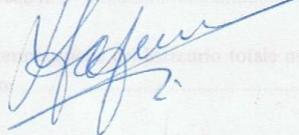
PARTE SPERIMENTALE

Determinazione del Mercurio totale nel muscolo
asciale dei pesci ed in altri materiali biologici 23

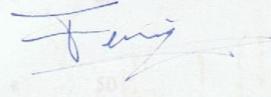
Tabella n. 1 - n. 2 - n. 3 - n. 4 - n. 5 - n. 6 - n. 7 25

Determinazione del Metil Mercurio nel muscolo
asciale dei pesci 27

Relatore:
Lapucci Prof. Dott. Pierluigi



Candidato:
Ferri Gastone



Determinazione del Mercurio totale nelle acque di
mare 50

Castiglione

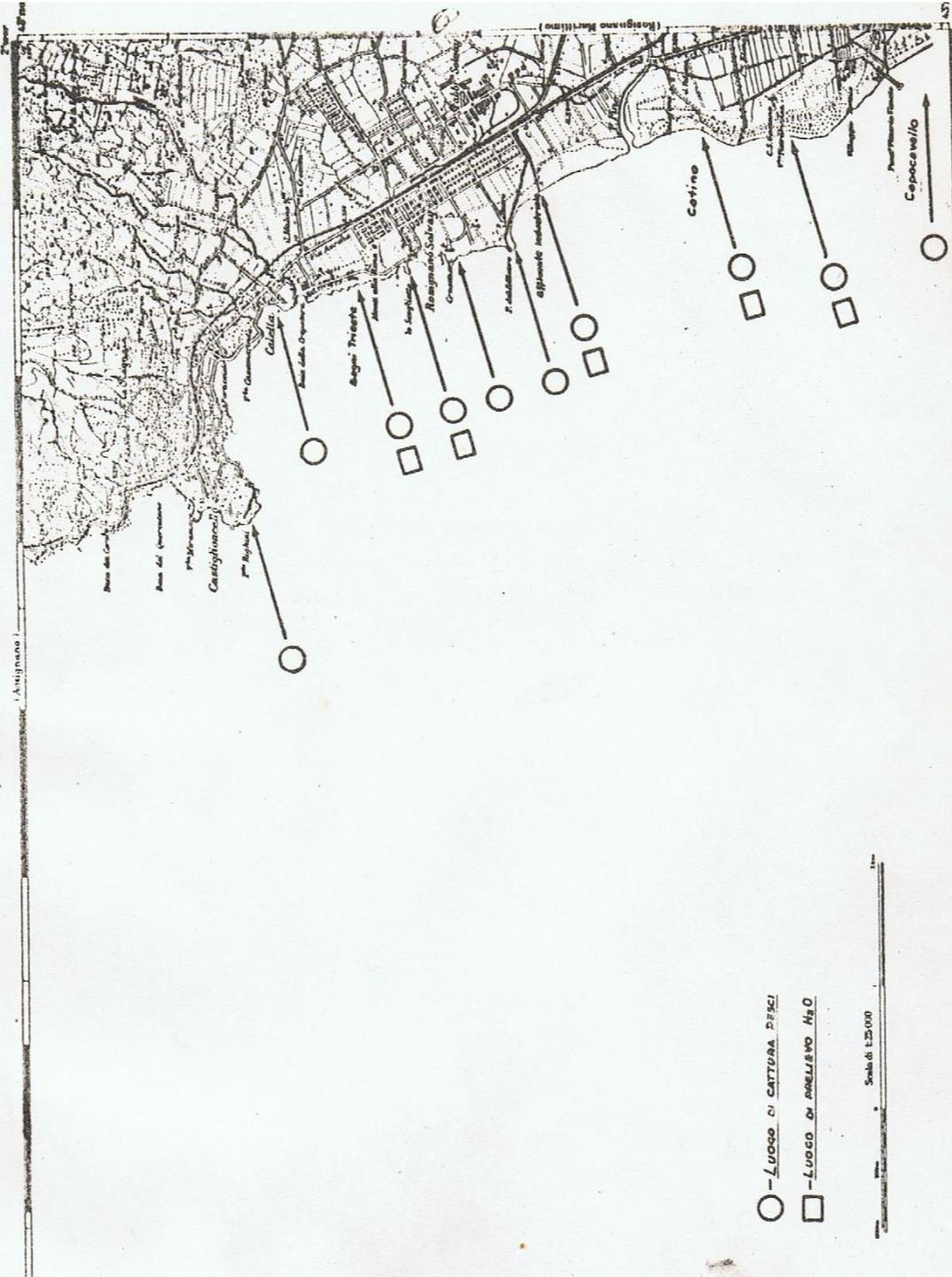
F. 111 della Carta d'Italia

CASTIGLIONCELLO

I I S E.

La cartina compilata con riferim. all'Ellissoide
Immaginaria applicata a Roma (S. Mura)

Longitudine Ovest dal meridiano di Roma (Monte Nuovo)



INDICE

Introduzione	pag.	1
Tabella n. 9	pag.	53
Scopo della ricerca	«	7
Determinazione del Metil Mercurio nelle acque di mare e nello effluente industriale	«	54
PARTE TEORICA		
Determinazioni Chimico-Fisiche eseguite sulle Sorgenti di esposizione e diffusione del mercurio	« «	8
Effetti genetici del Metil Mercurio in uomini esposti attraverso il consumo del pesce	«	58
esposti attraverso il consumo del pesce	«	10
Bibliografia	«	59
Metodi di determinazione del mercurio totale in materiali biologici	« «	12
Metodi di determinazione del Mercurio totale in sistemi biologici	«	61
Conclusioni	«	15
Determinazione del Mercurio totale ed organico nelle acque	«	72
Determinazione del Mercurio totale ed organico nelle acque	« «	17
Bibliografia	« «	19
PARTE SPERIMENTALE		
Determinazione del Mercurio totale nel muscolo assiale dei pesci ed in altri materiali biologici	«	25
Tabelle n. 1 - n. 2 - n. 3 - n. 4 - n. 5 - n. 6 - n. 7.	«	35
Determinazione del Metil Mercurio nel muscolo assiale dei pesci	«	42
Tabella n. 8	«	48
Determinazione del Mercurio totale nelle acque di mare	«	50

Tabella n. 9	pag.	53
Determinazione del Metil Mercurio nelle acque di mare e nello effluente industriale	«	54
Determinazioni Chimico-Fisiche eseguite sulle acque convogliate dal collettore industriale	«	57
Tabella n. 10	«	58
Bibliografia	«	59
Carta topografica	«	60
Discussione dei risultati	«	61
Conclusioni	«	72
Bibliografia	«	74
Riassunto	«	76

INTRODUZIONE

Si osservò ben presto che anche gli uccelli di mare ed i gatti, i quali come la popolazione dei pescatori, si nutrivano essenzialmente di pesce, presentavano i sintomi della stessa malattia.

Questo fatto portò alla scoperta di un'elevata concentrazione di composti del mercurio nel pesce, nei crostacei, nei frutti di mare pescati nella baia e la sorgente dell'inquinamento venne rintracciata negli scarichi di una fabbrica.

Da allora si sono registrati diversi altri incidenti allarmanti. Nel 1956 e nel 1960 in Iraq, centinaia di persone rimasero vittime di avvelenamento da mercuriali per avere mangiato del grano destinato esclusivamente alla semina, che era stato trattato con fungicidi a base di mercurio.

Casi analoghi si verificarono anche in Pakistan ed in Guatemala e molto

giunsero nel 1967 a proibire la vendita ed il consumo del pesce pescato in una quarantina di laghi, essendosi riscontrata nelle loro carni elevate quantità di metil mercurio. **INTRODUZIONE**

Nel 1970 l'allarme per l'inquinamento da mercurio raggiunse punte drammatiche nell'America Settentrionale. Infatti, in seguito alla scoperta di Nei primi anni successivi al 1950 i pescatori del golfo Minimata, in Giappone, vennero colpiti insieme alle loro famiglie da una malattia sconosciuta che danneggiava il sistema nervoso.

Il morbo di Minimata, così come viene chiamata la malattia, provocava un progressivo indebolimento muscolare, una menomazione della vista e di altre funzioni cerebrali, fino alla paralisi o, in certi casi, al coma e alla morte. Le vittime mostravano lesioni strutturali al cervello.

Si osservò ben presto che anche gli uccelli di mare ed i gatti, i quali come la popolazione dei pescatori, si nutrivano essenzialmente di pesce, presentavano i sintomi della stessa malattia.

Questo fatto portò alla scoperta di un'elevata concentrazione di composti del mercurio nel pesce, nei crostacei, nei frutti di mare pescati nella baia e la sorgente dell'inquinamento venne rintracciata negli scarichi di una fabbrica.

Da allora si sono registrati diversi altri incidenti allarmanti. Nel 1956 e nel 1960 in Iraq, centinaia di persone rimasero vittime di avvelenamento da mercuriali per avere mangiato del grano destinato esclusivamente alla semina, che era stato trattato con fungicidi a base di mercurio.

Casi analoghi si verificarono anche in Pakistan ed in Guatemala e molto

recentemente ancora in Pakistan. *è divenuta così importante e delicata che*

In Svezia, nel 1960, si osservarono i primi casi di avvelenamento di uccelli e di altra selvaggina provocati verosimilmente da sementi trattati con mercuriali. A seguito di tali eventi le autorità sanitarie di questo paese giunsero nel 1967 a proibire la vendita ed il consumo del pesce pescato in una quarantina di laghi, essendosi riscontrata nelle loro carni elevata quantità di metil mercurio. *grafia (1) sulla tossicologia dei composti del*

Nel 1970 l'allarme per l'inquinamento da mercurio raggiunse punte drammatiche nell'America Settentrionale. Infatti, in seguito alla scoperta di elevati quantitativi di mercurio nel lago Saint Clair, ad opera di un ricercatore norvegese che lavorava in Canada, si dovettero imporre delle restrizioni sulla pesca e sulla vendita del pesce in diverse zone del Canada e degli Stati Uniti. In entrambi i paesi gli organi statali presero delle iniziative per controllare lo scarico di acque contenenti mercurio entro laghi e corsi d'acqua. *ta infatti che oggi l'impiego del mercurio interessa*

Attualmente l'inquinamento da mercurio nelle acque marine si è esteso fino al punto che anche alcune specie di pesci che abitualmente vivono lontani dalle coste contengono elevate quantità di questo elemento. *della*

E' il caso del tonno la cui contaminazione ha portato le autorità sanitarie di molti paesi a fissare dei limiti, in verità piuttosto ampi, per il contenuto di mercurio nelle carni di questo pesce destinato alla alimentazione umana. *quente schema (A), da cui è facile osservare che*

L'ultimo caso in ordine di tempo, anche se non clamoroso, è quello che ha portato il laboratorio chimico provinciale di Pisa e di Firenze a denunciare alcune ditte produttrici di tonno in scatola in quanto la carne conteneva quantità di mercurio superiore a quella prevista dalle vigenti norme (lppm). *è ben semplificata dallo stesso autore (4) nello schema (B).*

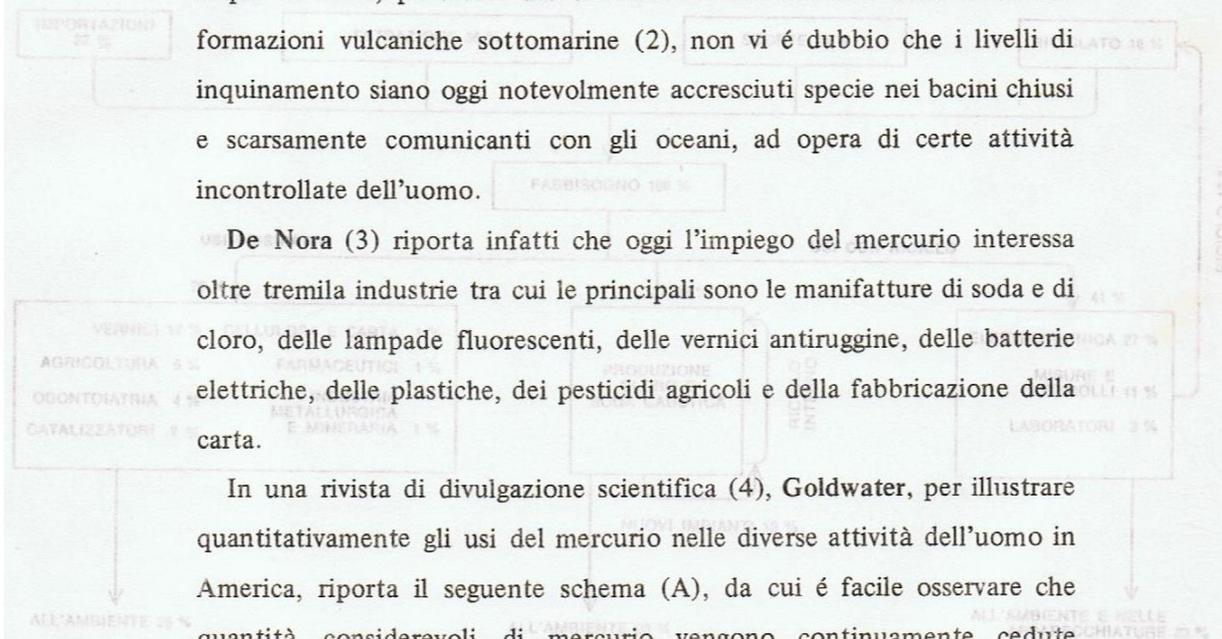
La situazione in questo settore é divenuta cosí importante e delicata che la Food and Drug Administration degli Stati Uniti e del Canada unitamente alle autorità sanitarie del Regno Unito hanno deciso di pianificare un'indagine per la ricerca di meccanismi di inquinamento da mercurio di tutte le derrate alimentari ed il problema non ha mancato di interessare anche gruppi misti FAO/OMS che sono giunti alla pubblicazione di una monografia (1) sulla tossicologia dei composti del mercurio.

Sebbene il mercurio sia considerato come un normale costituente delle acque di mare, portatovi dal dilavamento dei terreni e delle numerose formazioni vulcaniche sottomarine (2), non vi é dubbio che i livelli di inquinamento siano oggi notevolmente accresciuti specie nei bacini chiusi e scarsamente comunicanti con gli oceani, ad opera di certe attività incontrollate dell'uomo.

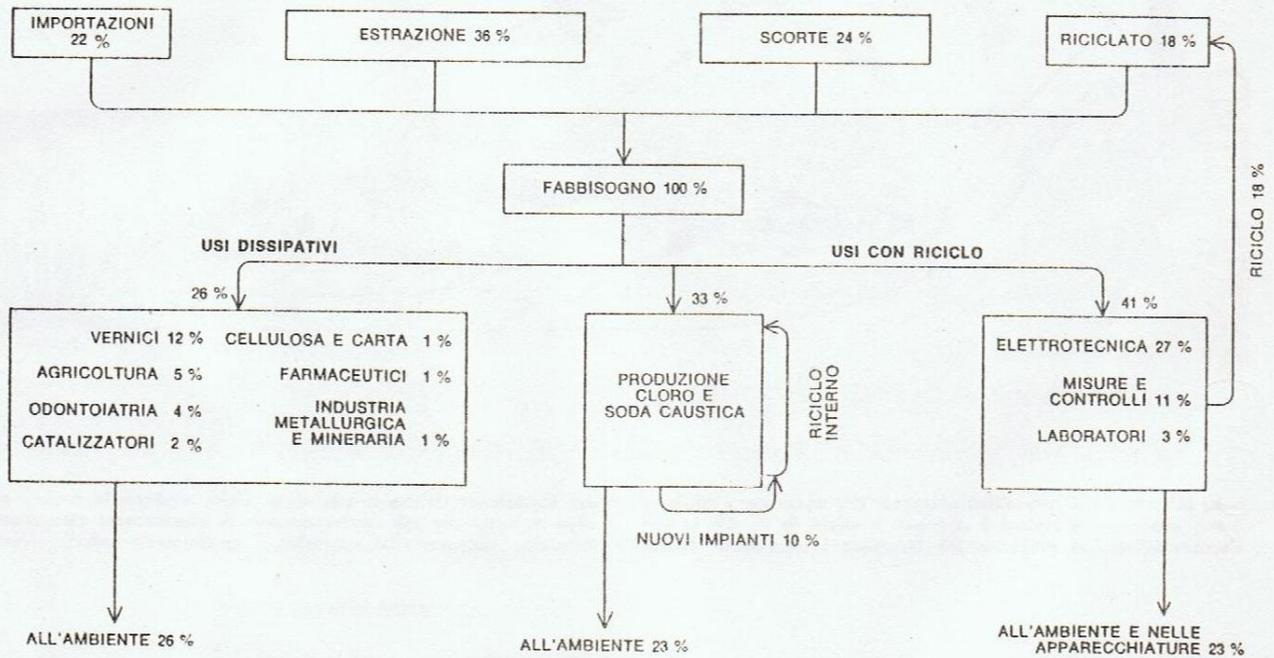
De Nora (3) riporta infatti che oggi l'impiego del mercurio interessa oltre tremila industrie tra cui le principali sono le manifatture di soda e di cloro, delle lampade fluorescenti, delle vernici antiruggine, delle batterie elettriche, delle plastiche, dei pesticidi agricoli e della fabbricazione della carta.

In una rivista di divulgazione scientifica (4), Goldwater, per illustrare quantitativamente gli usi del mercurio nelle diverse attività dell'uomo in America, riporta il seguente schema (A), da cui é facile osservare che quantità considerevoli di mercurio vengono continuamente cedute all'ambiente ed in particolare al mare da cui prende inizio ad opera degli organismi acquatici la catena alimentare che costituisce un importante meccanismo di concentrazione del mercurio.

Tale catena é ben semplificata dallo stesso autore (4) nello schema (B).



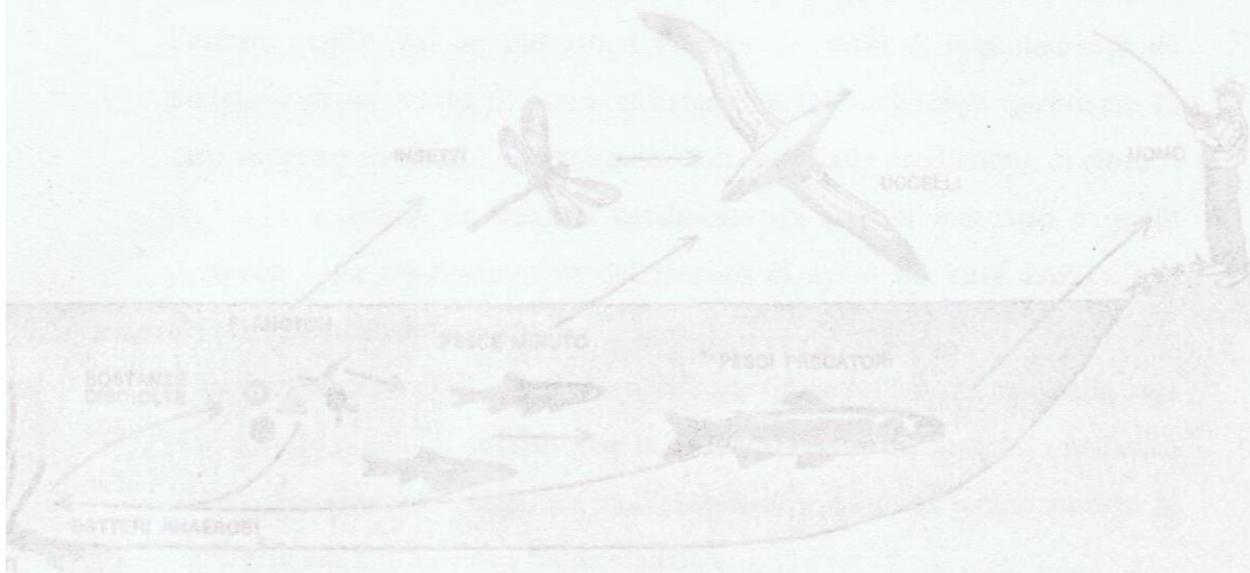
La catena alimentare degli organismi acquatici costituisce un importante meccanismo di (Schema A) del mercurio. Ad ogni livello trofico l'escrezione è inferiore all'assunzione, così che le alghe contengono più mercurio dell'acqua, ma meno dei pesci che si cibano di alghe e così via. I batteri ed i processi putrefattivi convertono i composti del mercurio in metilmercuriati.



Schema dell'utilizzazione del mercurio negli Stati Uniti per il 1968. Lo schema si basa su quello preparato da Robin A. Wallace, William Fulkerson, Wilbur D. Shults e William S. Lyon dello Oak Ridge National Laboratory. L'uso principale del mercurio è come catodo per la preparazione elettrolitica della soda caustica e del cloro. In questo processo si ricicla continua-

mente una gran massa di mercurio, ma nel 1968 il 23 per cento del metallo utilizzato servì per rimpiazzare quello che era andato disperso. Un altro 10 per cento è stato utilizzato per la messa in funzione di nuovi impianti. Da allora la legislazione e le contestazioni legali hanno obbligato le fabbriche a migliorare i sistemi di riciclo, riducendo nettamente gli effluenti.

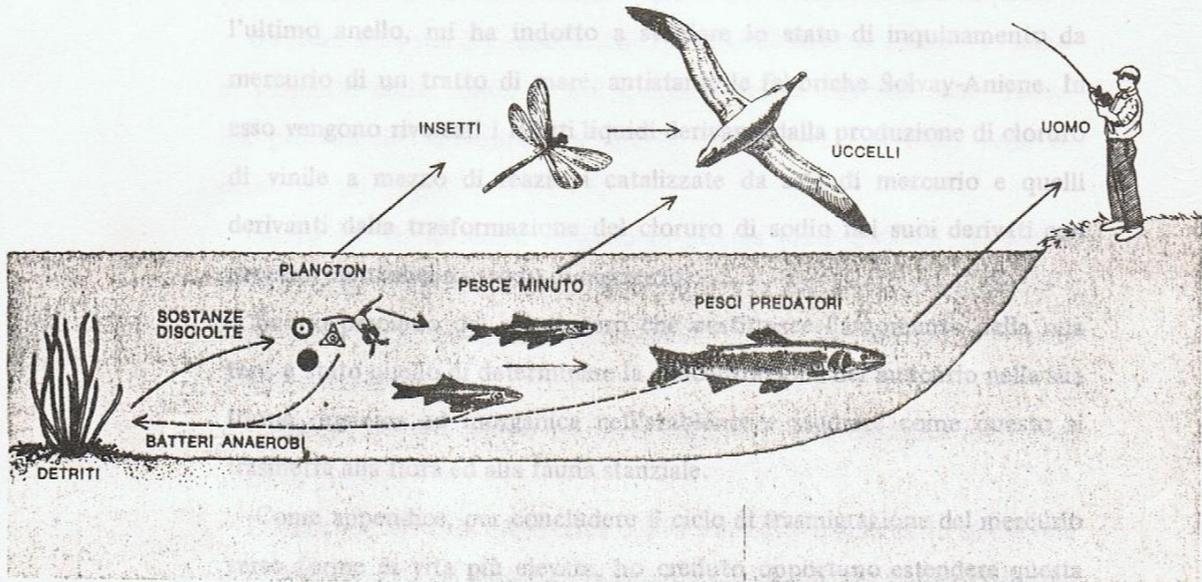
La catena alimentare degli organismi acquatici costituisce un importante meccanismo di concentrazione del mercurio. Ad ogni livello trofico l'escrezione è inferiore all'assunzione, così che le alghe contengono più mercurio dell'acqua, ma meno dei pesci che si cibano di alghe e così via. I batteri ed i processi putrefattivi convertono i composti del mercurio in metilmercuriati.



La catena alimentare degli organismi acquatici costituisce un importante meccanismo di concentrazione del mercurio. Ad ogni livello trofico l'escrezione è inferiore all'assunzione, così che le alghe contengono più mercurio dell'acqua, ma meno dei pesci che si cibano di alghe e così via. I batteri ed i processi putrefattivi convertono i composti del mercurio in metilmercuriati.

Schema B)

L'importanza tossicologica che ha assunto in questi ultimi 20 anni la determinazione del mercurio negli alimenti, con particolare riguardo al pesce sia fresco, che conservato, consapevole che questo tossico può essere trasmesso all'uomo attraverso una catena alimentare di cui egli costituisce l'ultimo anello, mi ha indotto a studiare lo stato di inquinamento da mercurio di un tratto di mare, antistante la fabbrica Solvay-Aniene. In esso vengono riversati i reflui derivanti dalla produzione di cloro di vinile a mezzo di reazioni catalizzate da mercurio e quelli derivanti dalle trasformazioni del cloruro di sodio e suoi derivati.



La catena alimentare degli organismi acquatici costituisce un importante meccanismo di concentrazione del mercurio. A ogni livello trofico l'escrezione è inferiore all'assunzione, cosicché

le alghe contengono più mercurio dell'acqua, ma meno dei pesci che si cibano di alghe e così via. I batteri e i processi putrefattivi convertono i composti del mercurio in metilmercuriali.

SORGENTI DI ESPORZIONE DEL MERCURIO

SCOPO DELLA RICERCA

L'importanza tossicologica che ha assunto in questi ultimi 20 anni la determinazione del mercurio negli alimenti, con particolare riguardo al pesce sia fresco che conservato, consapevole che questo tossico può essere trasmesso all'uomo attraverso una catena alimentare di cui egli costituisce l'ultimo anello, mi ha indotto a studiare lo stato di inquinamento da mercurio di un tratto di mare, antistante le fabbriche Solvay-Aniene. In esso vengono riversati i rifiuti liquidi derivanti dalla produzione di cloruro di vinile a mezzo di reazioni catalizzate da sale di mercurio e quelli derivanti dalla trasformazione del cloruro di sodio nei suoi derivati con processi elettrolitici a catodo di mercurio.

Scopo precipuo del mio lavoro che costituisce l'argomento della mia tesi, è stato quello di determinare la concentrazione del mercurio nella sua forma organica ed inorganica nell'ambiente e studiare come questo si trasmetta alla flora ed alla fauna stanziale.

Come appendice, per concludere il ciclo di trasmigrazione del mercurio verso forme di vita più elevate, ho creduto opportuno estendere questa ricerca ad altri anelli del sistema ecologico includendo anche gli uccelli e gli uomini che prevalentemente si nutrono del pesce pescato in questa zona.

Nelle industrie delle vernici (6) e della carta si usano generalmente derivati organici del mercurio come battericidi e fungicidi.

Alcuni derivati organici del mercurio vengono inoltre usati nelle vernici delle carene delle navi per prevenire la formazione di alghe.

SORGENTI DI ESPOSIZIONE E DIFFUSIONE DEL MERCURIO

mercurio comprendono termometri, misuratori di pressione, barometri, valvole, chiusure idrauliche di pompe, relais, interruttori.

Il Mercurio é un costituente naturale della crosta terrestre: in tutti i minerali e le rocce vi é un minimo di 40 ppb, nell'atmosfera fino a 10.000 m. di altezza vi sono $2 - 5 \times 10^{-6} \text{mg/m}^3$; nel mare, secondo recenti studi di scienziati russi, vi é una concentrazione quasi uniforme di 4 - 6 ppb(3).

De Nora nella stessa pubblicazione (3) afferma che circa 5.000 t / anno di mercurio sotto forma di sali inorganici viene rimosso dalle rocce per processi di corrosione e quindi trasportato dai fiumi negli oceani e nei laghi.

Questi sali di Mercurio vengono in piccola parte disciolti nell'acqua, mentre la gran parte di essi rimane nei detriti del fondo degli oceani e viene trasformata lentamente in composti organici del mercurio ad opera di microorganismi.

Il mercurio entra cosí a far parte della struttura biologica di piante, pesci ed animali.

L'industria usa ogni anno circa 5.000 tonnellate di mercurio di cui una buona parte (5) é utilizzata nell'industria cloro soda che impiega processi elettrolitici a catodo di mercurio.

Le apparecchiature elettriche che utilizzano mercurio comprendono pile a combustione, accumulatori, lampade fluorescenti a vapore di mercurio, raddrizzatori ecc..

Nelle industrie delle vernici (6) e della carta si usano generalmente derivati organici del mercurio come battericidi e fungicidi.

Alcuni derivati organici del mercurio vengono inoltre usati nelle vernici delle carene delle navi per prevenire la formazione di alghe.

Gli strumenti industriali e di uso scientifico che comportano l'uso del mercurio comprendono termometri, misuratori di pressione, barometri, valvole, chiusure idrauliche di pompe, relais, interruttori.

Molti sali di mercurio vengono usati come catalizzatori (7); tra questi, l'acetato e l'oleato di fenil mercurio viene usato per la produzione di resine ureiche, il cloruro ed il solfato per la produzione di cloruro di venile d'acetilene.

Nei processi di esterificazione, ossidazione, produzione di acetaldeide si usano principalmente catalizzatori a base di mercurio.

Il mercurio è usato in odontoiatria (8 - 9) come amalgama di argento o stagno per riempire le cavità prodotte dalla carie dei denti.

Questo uso, iniziato al principio del secolo, è stato ampiamente accettato per i suoi pregi: resistenza alla compressione ed alla abrasione, inerzia chimica, ottima durata, facilità di applicazione.

Nell'agricoltura (10 - 11) l'uso più importante del mercurio è il trattamento dei semi dei cereali con alcuni derivati alchilici.

Un uso secondario è per prevenire e curare malattie della frutta e dei vegetali. In commercio vi sono molti prodotti farmaceutici contenenti mercurio; diuretici, disinfettanti, cosmetici ecc..

Il mercurio inoltre fu largamente usato per l'estrazione dell'oro e dell'argento prima che i processi al cianuro fossero stati sviluppati (5), oggi viene ancora usato per il recupero dello zinco, cadmio, stagno ed altri metalli.

L'amalgama di sodio è inoltre impiegata per la produzione del piombo tetraetile.

Altri usi comprendono l'utilizzazione del mercurio negli scambiatori di calore, reattori nucleari, circuiti telefonici, calcolatori elettronici, esplosivi ecc..

EFFETTI GENETICI DEL METIL MERCURIO IN UOMINI ESPOSTI ATTRAVERSO IL CONSUMO DEL PESCE

Un largo numero di prodotti chimici sono capaci di provocare la rottura di cromosomi quando sono aggiunti a culture di cellule in concentrazione sufficientemente alta per un tempo opportunamente lungo (12).

Esperimenti condotti in vitro su cellule asportate da soggetti esposti a certi prodotti chimici, a radiazioni ionizzanti ed a certi virus, hanno pure mostrato un incremento nella frequenza della rottura dei cromosomi (13).

Pur tuttavia non si conosce ancora se sostanze, alle quali sono esposti larghi strati di popolazione, possano avere un tale effetto, sebbene esperimenti condotti su ratti in vivo (14) e su cellule umane in vitro (15 - 16) abbiano dimostrato che i ciclammati e le cicloesamine sono capaci di indurre rottura di cromosomi.

I pesci ed i frutti di mare contaminati con metil mercurio causarono due casi di intossicazione con carattere epidemico (17 - 18).

In paragone con il metil, il fenil, il metoxil mercurio, i composti inorganici di questo metallo sono considerati meno tossici (19).

Questi ultimi composti sono largamente usati in certi processi industriali e vengono riversati in laghi e mari.

Recenti studi hanno dimostrato che essi sono metabolizzati a metil mercurio da certi microorganismi nei sedimenti del fondo marino (20).

Conseguentemente, inSvezia (21 - 22), Finlandia (23), Norvegia (24), e Danimarca (25) sono stati osservati considerevoli incrementi nel livello del metil mercurio, durante questi ultimi cinque anni, nei pesci pescati in varie zone di mare litoraneo e laghi contaminati da scarichi industriali

contenenti fenil mercurio e mercurio inorganico. I soggetti umani che avevano consumato tali pesci mostravano una elevata concentrazione di mercurio nel sangue (26 - 27 - 28).

Studi citologici condotti sulle radici dell'aglio hanno mostrato che il metil, etil, butil, fenil e metoxil mercurio inducono la C-mitosi.

In particolare é stato appurato che il metil ed il fenil mercurio inducono anche la fragmentazione di cromosomi (29).

Fiskesjo (30) ha pure osservato C-mitosi in leucociti umani esposti in vitro al cloruro di metil e fenil mercurio.

Così, molti alchil composti del mercurio, fenil mercurio e metoxil mercurio hanno mostrato di produrre abnormalità cromosomiche in differenti organismi.

Recentemente Skerfving e Coll. (31) in un loro studio preliminare hanno segnalato anomalie cromosomiche in culture di cellule derivate da linfociti tratti da nove soggetti di cui si conosceva l'alta concentrazione di mercurio nel sangue, conseguente al consumo di pesce contaminato.

Con lo sviluppo della spettrofotometria di assorbimento atomico molti ricercatori si sono orientati verso l'applicazione di questa tecnica, soprattutto utilizzando il sistema di campionamento senza fiamma, in quanto l'impiego di questa ultima non consente di raggiungere la sensibilità richiesta (36).

Nel 1967 Brandemberger e Bader (37) hanno pubblicato un interessante metodo basato sulla nota proprietà del mercurio di formare amalgame con il rame; il metallo amalgamato quantitativamente su filo di rame viene

METODI DI DETERMINAZIONE DEL MERCURIO TOTALE IN MATERIALI BIOLOGICI

La determinazione del mercurio in sistemi biologici fino a qualche anno addietro é stata effettuata per spettrofotometria di assorbimento nel visibile, previa estrazione cloroformica del complesso ditizione - mercurio in ambiente acido per acido solforico normale (32 - 33).

Certe volte, con buoni risultati, in sostituzione del ditizione quale complessante si é impiegato il B-naftiltiocarbazone che con il mercurio forma complessi piú stabili (34).

Un metodo interessante, anche se laborioso, é quello descritto da **Kimura e Miller** (35) che consente la determinazione del mercurio per via colorimetrica in concentrazioni inferiori ad 1-mg/l.

Il metodo prevede la mineralizzazione del materiale biologico con una miscela di acqua ossigenata-permanganato solforico. Il mercurio dopo stripping con una corrente di gas inerte é assorbito su permanganato acido e quindi determinato clolorimetricamente come diti/zonato, previa riduzione del permanganato.

Con lo sviluppo della spettrofotometria di assorbimento atomico molti ricercatori si sono orientati verso l'applicazione di questa tecnica, soprattutto utilizzando il sistema di campionamento senza fiamma, in quanto l'impiego di questa ultima non consente di raggiungere la sensibilità richiesta (36).

Nel 1967 **Brandemberger e Bader** (37) hanno pubblicato un interessante metodo basato sulla nota proprietà del mercurio di formare amalgame con il rame: il metallo amalgamato quantitativamente su filo di rame viene

vaporizzato in una cella di assorbimento posto sul cammino del raggio luminoso la cui lunghezza d'onda 253,7 μ coincide con la riga di risonanza del mercurio.

Sebbene il metodo consenta determinazioni accurate di quantità di mercurio inferiori anche a 2 ng, la formazione dell'amalgama su filo di rame, ne costituisce il punto critico, per cui altri autori hanno sviluppato questo metodo preferendo al sistema dell'amalgama quella della riduzione del mercurio con cloruro stannoso, stripping della soluzione in corrente d'aria e misura dell'assorbimento dovuto ai vapori di mercurio costretti a passare in una cella per gas, con finestre di quarzo, attraversata da un raggio di luce monocromatica di 253,7 μ .

Questo metodo applicato per la prima volta nel 1968 da Hatch e Welland (38) è stato ripreso e modificato da diversi autori (39 - 40 - 41 - 42 - 43).

Il metodo di attivazione neutronica descritto da Westermark e Sjostrand (44) nel 1960 per quanto fosse interessante perché non richiedeva la distruzione del campione, aveva una sensibilità troppo bassa (0,5 ppm) per trovare una applicazione generale.

Successivamente il metodo è stato reso molto più sensibile (1 ng/0,5g di campione) ad opera di Sjostrand (45).

Dopo irradiazione per 2-3 giorni con un flusso di 10^{12} n/cm² per secondo, il campione è digerito con miscela solfonitrica a caldo in un sistema chiuso, e successiva aggiunta di 20 mg di cloruro mercurio come trascinante.

Il mercurio distillato a temperatura sopra 250°, previa aggiunta di acido perclorico e glicina, viene elettro depositato su lamina d'oro e l'isotopo 197 è determinato per gamma spettroscopia.

Questo metodo, generalmente adottato in Svezia, per quanto abbia grande sensibilità e accuratezza ($- 2\%$) é di difficile applicazione per la complessità delle operazioni e delle attrezzature richieste.

Più recentemente sono stati messi a punto altri metodi di determinazione del mercurio per attivazione nucleare da **Häsämen** (46) e **Kosta** (47).

Mentre il primo prevede la separazione del mercurio assorbendolo su polvere di rame, il secondo separa selettivamente il mercurio derivante dalla combustione della sostanza organica assorbendone i vapori $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ su carta impregnata di selenio.

Tra tutti i metodi passati in rassegna ho scelto quello proposto da **Lindsted** (43) per spettrofotometria di assorbimento atomico, perché a parità di precisione e sensibilità consente determinazioni rapide su piccole porzioni di campione con una attrezzatura accessoria veramente semplice.

METODI DI DETERMINAZIONE DEL METIL MERCURIO IN SISTEMI BIOLOGICI

La forma chimica in cui il mercurio è contenuto negli alimenti era sconosciuta fino a qualche decennio addietro, conseguentemente una valutazione tossicologica del mercurio contenuto nei cibi era molto difficile e critica.

Polley e Coll. (48) prima, e Gage (49) successivamente, svilupparono separatamente due metodi per la determinazione dei composti organici del mercurio, pur tuttavia questi metodi, oltre ad essere non idonei a distinguere i differenti composti, esempio metil mercurio da fenil mercurio, erano applicabili per livelli di mercurio più alti di quelli normalmente contenuti negli alimenti.

Solo recentemente il problema della determinazione di micro quantità di composti organici del mercurio in sistemi biologici è stata affrontata indipendentemente dalla Scuola Scandinava (50 - 51 - 52) e Giapponese (53 - 54 - 55 e 56).

Il metodo prevede la estrazione benzenica del materiale omogenizzato con Acido cloridico concentrato seguita da varie purificazioni per eliminare certe sostanze interferenti.

Gli estratti benzenici purificati portati a volume sono sottoposti ad analisi T.L.C. o G.L.C..

L'analisi cromatografica su strato sottile viene effettuata su strati di Gel di silice G usando come eluente opportune miscele di etere di petrolio ed etere etilico. Le macchie visualizzate con luce U.V. vengono quantizzate attraverso il confronto di campioni standard.

Il metodo risulta semplice, rapido e sensibile, ma presenta tutti quegli inconvenienti che sono connessi alle determinazioni quantitative per cromatografia su strato sottile.

L'analisi gas cromatografica degli estratti benzenici é effettuata su colonne di acciaio inossidabile termostate a 130-145° riempite con carbowax supportata su Teflon o chromosorb W.D.M.S.S., usando un detector a cattura di elettroni.

Questa tecnica oltre ad avere i pregi di quella precedentemente descritta, risulta più riproducibile e selettiva, per cui l'ho adottata per le determinazioni introducendo tutte quelle modificazioni apportate successivamente da Westöö (52) che riguardano, non tanto la tecnica strumentale, ma più che altro la purificazione degli estratti benzenici da sottoporre ad analisi gas cromatografica.

DETERMINAZIONE DEL MERCURIO TOTALE ED ORGANICO NELLE ACQUE

La determinazione del mercurio nelle acque non presenta particolari difficoltà se non quelle connesse al rilevamento di quantità dell'ordine di pochi ng/l.

Questa determinazione pertanto può essere ricondotta ad una delle tecniche strumentali precedentemente descritte previo arricchimento del campione da sottoporre all'analisi.

Uno dei metodi più generali per ottenere una concentrazione dei composti minerali nelle acque è quello basato sulla preparazione del residuo secco. Tale procedura, anche se è stata impiegata adattandola con opportuni accorgimenti, quali l'aggiunta di Solfuro di sodio (57 - 58), è in genere sconsigliata data l'alta volatilità di molti composti di questo elemento.

Un metodo, che per la sua semplice esecuzione e per la sua efficacia può essere vantaggiosamente impiegato, è quello basato sulla estrazione con diti-zone disciolto in opportuni solventi organici, quali il Tetracloruro di C. Con questo metodo è possibile ottenere un fattore di concentrazione molto elevato se si parte da grandi volumi di acqua (59).

Un originale metodo è stato recentemente proposto da Grillot (60); tale metodo consiste nel creare nell'acqua da analizzare, le condizioni di pH ed Eh per ottenere la deposizione del mercurio su spirale di argento.

Altri metodi che oltre a consentire notevoli recuperi si prestano bene allo scopo per la loro semplicità, sono quelli che prevedono la coprecipitazione del mercurio ridotto in soluzione acida con cloruro

stannoso ed assorbito su sabbia d'oro che é sottoposta ad analisi spettrografica (62).

Per le mie determinazioni del mercurio totale nelle acque, quando era necessario procedere ad un arricchimento, ho impiegato il metodo che ne prevede l'estrazione con diti-zone sciolto in cloroformio proposto dalla scuola giapponese (59 - 59'). Nei casi in cui la concentrazione del mercurio era sufficientemente elevata ho operato direttamente sull'acqua tal quale previa mineralizzazione con miscela solfonitrica.

Un metodo sensibile e rapido per la determinazione dei derivati organici del mercurio nelle acque é quello proposto da Nishi (63) che ne prevede la determinazione gas cromatografica dopo averlo estratto con benzene da 100 - 500 ml di acqua.

A questo metodo ho preferito quello proposto da Westöö (52) adattandolo alle acque non tanto perché lo ritenevo più sensibile quanto perché ero già padrone delle tecniche.

BIBLIOGRAFIA

- 1) F.A.O./P.L. - M. - 11 - 1.
- 2) Harris Natura 219, '54, 1968.
- 3) O. De Nora La Chimica e L'Industria 53, 40 - 43. 1970.
- 4) L. J. Goldwater Scienze 40 - 47, 1971.
- 5) J. H. Shelton Mineral facts and problems Bureau of mines bulletin 630, U.S. Govt printing office, Washington D.C. 1965.
- 6) A.A. Goldeerg M. Shapero J. Phatm Pharmacol 9, 469, 1957.
- 7) M. A. Gofman - Gigena i Sanit 28 (12à, 73, 1963.
- 8) M. M. Jeselow e Coll. Arch. Environ Healt 17, 39, 1963.
- 9) Slatov - Gigena i Sanit 31, 135, 1966.
- 10) N.A. Smart Residue Rev. 23, 1, 1968.
- 11) D.E.H. Frear Pesticide Index 3^o Ed. college Science Publisher, State college, 1963.
- 12) B. A. Kinlman Actin of chemicals an dividing cells. Englewood Cliff, N. J. Prentice - Hall Incc 1966.
- 13) M. Jensen Krogh Acta Med. Scadd. 182, 445-455, 1967.
- 14) MS. Legator, Ka. Palmer, S. Gren, et al. Science 165, 1139, 1969.
- 15) D. Stone, E. Lam et al. Science 164, 568, 1969.

- 16) Dr. Stoltz, Ks. Khera, R. Bendal, et al. Science 167, 1501, 1970.
- 17) Minemata Disease - Study Group of Minemata Disease, Kumamoto University, Japan, 1968.
- 18) Speciale Report on cases of Mercury Intoxication in Nigata Prefecture Tokyo, Ministry of Health and Welfare, 1967.
- 19) Maximum allowable concentrations of mercury compounds. Arch. Environmental Health 19:891, 905 - 1969.
- 20) Jensen S., Jernelov A.: Nature 223: 1453-1454, 1969.
- 21) Westoo G. Methyl mercury compound in animal foods, in Miller W. Berg. G.B. (eds): Chemical Fallout. Springfield, Ill, Charles C. Thomas Publishers, 1969, pp. 75 - 89.
- 22) Johnels A.G., Westermar K.T.: Mercury contamination of the environment in Sweden, in Miller W. Berg. G.B. (eds): Chemical Fallout - Springfield, Ill, Charles C. Thomas, Publishers, 1969, pp. 221 - 239.
- 23) Sjolom V., Hasanen E.: The Mercury level in fish in Finland. Nord. Hyg T 50 : 37 - 53, 1969.
- 24) Undesdal B.: Investigation of mercury in food. Nord Hig T 50 : 60 - 63, 1969.
- 25) Dalgaard - Mikkelsen S.: Mercury in the environment in Denmark Nord Hig T 50 : 34 - 36, 1969.
- 26) Biske G., Johnels A.G. Plantin C.O., et al: Mercury intoxication through consumption of fish - Lekartn ingen 64 : 3628 - 3637, 1967.
- 27) Tejning S. Mercury Levels in Red Blood Cells, Plasma and Hair in

Heavy Consumers of Fish from Different Arcas of Lake Vanaern and correlation Between Mercury Levels in These for Fish and Fish Products from International medicine, University Hospital, Lund, Sweden, 1967.

- 28) Sumari P., Bakman A.L., Karli P., ed al: Investigations of health among fish consumers in Finland. Nord Hyg T 50 : 97 - 102, 1969.
- 29) Ramel C.: genetic effects of organic mercury compounds. I. Citological investigations on Allium roots. Hereditas 61 : 208, 230 - 1969.
- 30) Fiskejo G : Some results from Allium tests with organic mercury halogenides. Hereditas 62/314, 322, 1969.
- 31) S. Skerfuing, MD; K. Hanson e J. Lindsten, MD, - Arch. Health Vol. 21, Aug. - 1970.
- 32) Dandell E.B.: Calorimetric determination of traces of metal - Interscientia, New York.
- 33) Methods of analysis A.O.A.C. - 1971.
- 34) Truhant R. e Bandem - Ann - Fols - exp chim. 1963 p; 223.
- 35) Kimura e Miller V. 2 - Anal Chim. Aeta, 27, 325, 1962.
- 36) Libro Perkin Elmer.
- 37) Branderberger H. e Bades - Helvetica Chim. A.
- 38) W. Ronald Hatch e L. Welland OH - Anal. Chem. 40 2085 1968.
- 39) Polnetov M. S., Vitkun R.A., Zelynkova V. - Zh. Anazit. Khim. 19, 937, 1964.
- 40) Jeffus M.T. Elkim J.S., Kenner C.T. J.A.O.A.C. 53 (6), 1171, 1970.

- 41) Poluektov N.S., Vitkun R.A., Zelynkova V. - Zh Analit Kim, 19, 937, 1964.
- 42) Jeffus M. T., Elkins J.S., Kenner C.T. - J.A.O.A.C. 53 (6) 1171 1970.
- 43) G. Lindstedt - Analyst 96, 264, 1970.
- 44) Westermark I. e Sjostrand D. - Int. J. App. Radiat Isotop 9, 1, 15 - 1960.
- 45) Sjostrand B. Anal Chem 36, 814, 1964.
- 46) Hasanen E. - Determination of mercury in biological materila by activation analysis - Suom Kemistilehti 43, 251, 1970.
- 47) Kosta L., e Byrne A. R. - Activation analysis of mercury in biological samples and manogram level. Talanta 16, 1927 - 1969.
- 48) Polley D. e Hiller V.L. J. Agr. Food Chem. 2 (1954) - 1030.
- 49) Gage J. C. Analyst 86 (1961) 457.
- 50) G. Westoo Acta Chem. Scand. 1966 - 20 (8) 3131
- 51) G. Westoo Acta Chem. Scand. 1967 - 21 (7) 1790 - 1800.
- 52) G. Westoo Acta Chem. Scand. 1968 - 22 (7) 2277 - 2280.
- 53) Suco Nishi e Yoshiynki Horimoto Japana Analyst 1968 - 17 (I) 75 - 81.
- 54) Kitamura, S: Tsukamoto, J: Hayakawa, K: e Shibata Medicine and Biology 72 (1966) 274.
- 55) S. Yamaguchi, H. Matsumoto: Kurume Med. J 16 : 33 - 42, 1969.

- 56) S. Yamaguchi, H. Matsumoto : Hoshide M. e altri Kurume Mod. J 16 : 53 - 56, 1969.
- 57) Karasik M.A., Gonciarov In. I. Vasilevskaja A. E. 1965 - Geokhimiya n. 1.
- 58) A. E. Vasilevskaja, V.P. Shcherbakov e A. V. Lechen Zhur, Anal - Khim 1963 - 18 (7).
- 59) A. Hamaguchi, R. Kurada e K. Hisiharo - J. Chem. Soc. Japan, Pen, Chem. Sect. 82 (3), 347, 349 - 1961.
- 59') Yiu - Kee Chau e Hirohumi Saitoh - Environmental science e Technology 4 (10) - 839, 1970.
- 60) Grillot H. Beguinot I. Bocetta M. Ronquette C, sima A. 1964. Memoris du BRG.M. Paris.
- 61) A. M. Igoshia e L. M. Boguscovich - Gidrohchim Mater 47, 150 - 156. 1968.
- 62) Dall'Aglio M., Granani R. - Laboratorio Geominerario C.M.E.N. - C.S.N. della Casaccia - Roma.
- 63) Suco Nishi e Yoshiyuki Horimoto - Japan Analist 17 (10) 1247 - 1251. 1968.

PARTE SPERIMENTALE

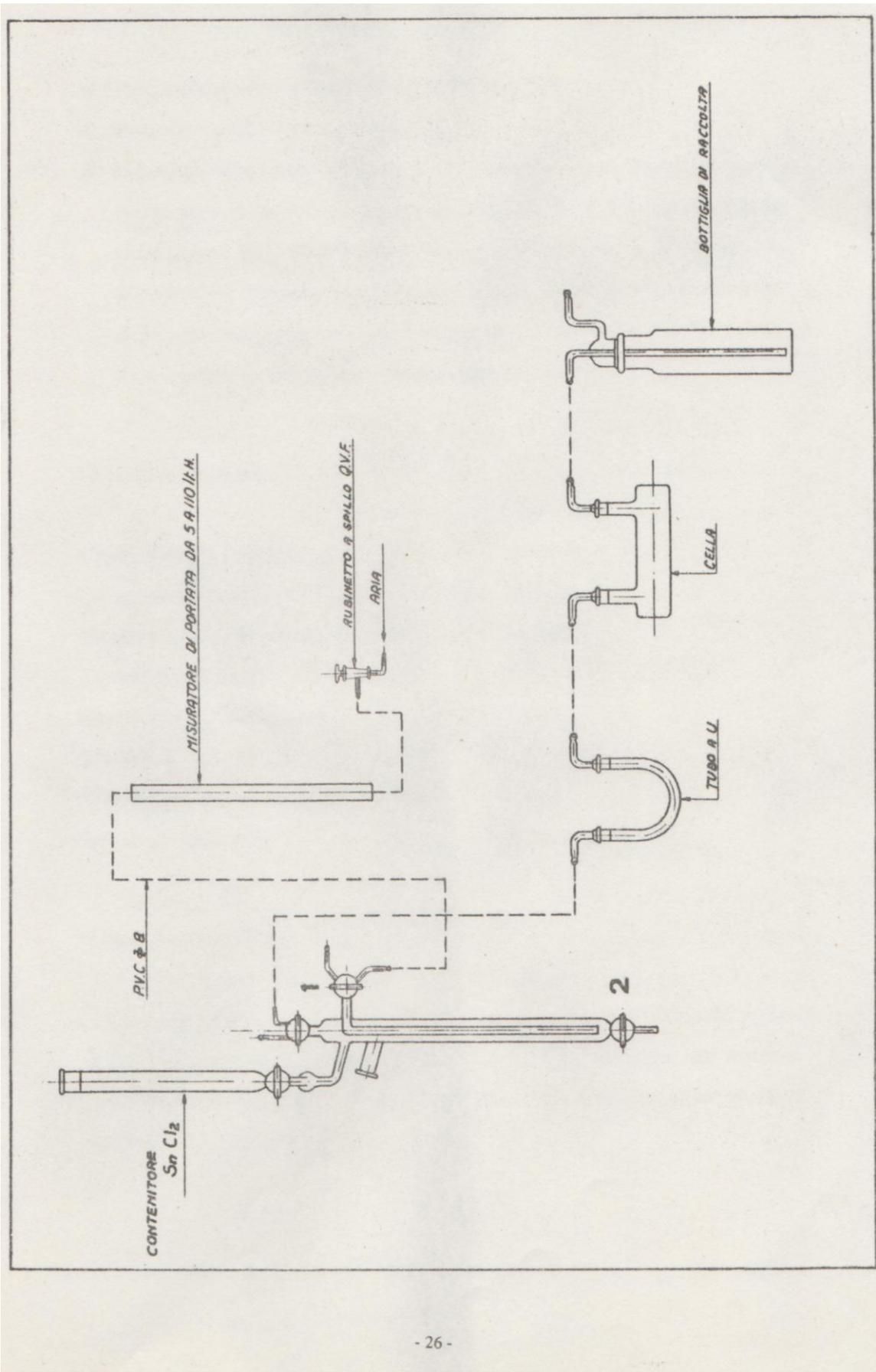
DETERMINAZIONE DEL MERCURIO TOTALE NEL MUSCOLO ASSIALE DEI PESCI ED IN ALTRI MATERIALI BIOLOGICI

Apparecchi e Vetreria

- a) Palloncini tarati da 50 ml. a collo lungo muniti di refrigerante ad aria.
- b) Bagnomaria termostatico.
- c) Sistema di stripping del mercurio come da figura I (Ditta Permax-Milano) con relativa celletta di vetro da 20 cm. di percorso ottico e Ø 2 cm. con finestre in quarzo.
- d) Misuratore di flusso tarato da 0-100 litri/ora.
- e) Bombola di aria compressa pura con relativo regolatore di pressione (pressione di esercizio 1 atm).
- f) Spettrofotometro ad assorbimento atomico Perkin Elmer modello 303 lampada a scarica a vapori di mercurio e registratore Hitachi QPD 53.
- g) Omogenizzatore.

Reagenti

- a) Soluzione di cloruro stannoso al 20%: 40g di $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ si sciolgono a caldo con 40ml di HCl conc. puro per analisi; si fa gorgogliare nella soluzione una corrente di aria per 10' onde eliminare eventuali tracce di mercurio e si porta al volume di 200ml con acqua bidistillata.
- b) Soluzione di cloruro di sodio - idrossilammina cloridrato 20%: 20g di idrossilammina cloridrato sciolti in 60ml di acqua bidistillata contenente 20g di NaCl vengono portati al volume di 100 ml.



- c) Magnesio perclorato essiccato a 120°C per 12h.
- d) Soluzione acido solforico circa 1M.
- e) Soluzione Standard di Mercurio: si prepara una soluzione madre contenente 1 mg/ml di mercurio sciogliendo 135,4 mg di cloruro mercurio in 100 ml di H₂SO₄ 1M. Le soluzioni contenenti 10, 25, 50, 80 ng/ml di Hg vengono preparate estemporaneamente per diluizione della soluzione madre con acido solforico 1M contenente 1,5% di NaCl onde evitare fenomeni di assorbimento sulla vetreria.

Condizioni operative

Corrente della lampada	350 m A
Lunghezza d'onda	253,7 mu
Flusso d'aria nella cella di vaporizzazione	0,5 ml/mh
Espansione di scala	x 1
Fenditura	x 3
Guadagno	x 4
Corrente di ingresso del registratore	10 mv
Velocità della carta	240 mm/h

Preparazione della vetreria

Tutta la vetreria viene accuratamente lavata con acido nitrico (1 – 1) a caldo per eliminare eventuali tracce di mercurio assorbito sul vetro e quindi, previo lavaggio con acqua distillata, seccata per 1h in stufa a 180°C.

Preparazione dei campioni

a) Pesci ed alghe -

La mineralizzazione del mercurio contenuto nei materiali biologici viene effettuata secondo quanto descritto da **Ronald** (1). Nel caso dei pesci, gli organi ed i muscoli assiali da sottoporre ad analisi sono stati prelevati con bisturi ed altri utensili con una tecnica che ritengo superfluo descrivere.

Si pesa esattamente in un pallone tarato da 50 ml circa 1g di campione previamente lavato ed omogenizzato. Successivamente si aggiungono 15 ml di Acido nitrico concentrato, si lascia reagire per circa 10 minuti senza riscaldare e quindi si aggiungono 2 ml di acido cloridrico concentrato.

Si aggiungono ancora 30 ml di acqua distillata e si pone in bagno ad acqua a 85° - 90° per circa 150 minuti.

Trascorso questo periodo il pallone viene tolto dal bagno, raffreddato sotto un getto di acqua e quindi portato a volume.

b) Organi di pesci e capelli -

La procedura seguita per la mineralizzazione del mercurio contenuto in questo tipo di campioni é del tutto analoga a quella precedentemente descritta solo che dovendo operare con quantità di sostanze dell'ordine di qualche decina di milligrammi si é conseguentemente ridotta la quantità di reattivi impiegati ed il volume del palloncino tarato impiegato per la mineralizzazione.

Normalmente per la distruzione del campione si impiegano palloncini del volume di 3 ml.

Stripping e determinazione del mercurio

La determinazione viene effettuata secondo quanto descritto da Lindstedt (2) e successivamente sperimentato da altri autori (3, 4, 5).

Dopo aver opportunamente predisposto l'attrezzatura di stripping ed allineata la cella col raggio ottico dello spettrofotometro, si lascia scaldare lampada e registratore per circa 30 minuti.

Quindi, dopo aver opportunamente aggiustato il registratore in modo che il 100% di assorbimento corrisponda ad una deflessione completa dell'ago sulla scala della carta, si pone nell'ordine nella cella di stripping 1 ml delle seguenti soluzioni: soluzione contenente il campione digerito, soluzione b e soluzione a.

Immediatamente ruotando velocemente il rubinetto (1) della figura (1) si immette nella cella di stripping la corrente gassosa che trasporta il mercurio ridotto nella cella ottica, determinando automaticamente una deflessione del pennino del registratore che segna un picco sulla carta.

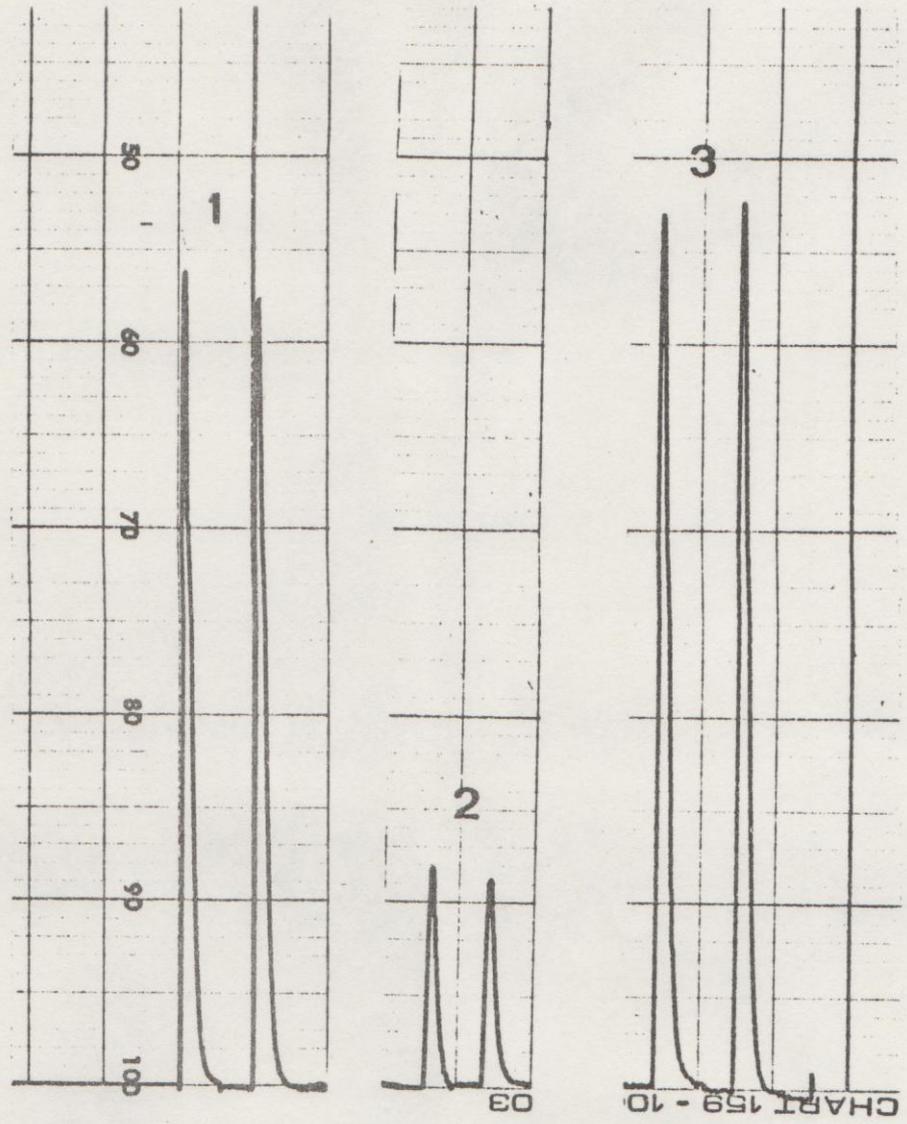
Dopo 2 - 3 minuti, quando la cella ottica é priva di vapori di mercurio e la penna del registratore é tornata alla linea base, si scarica il liquido residuo dal fondo della cella aprendo il rubinetto (2) e il sistema é nuovamente pronto per ulteriori determinazioni.

Nella figura (II) sono riportati alcuni picchi di assorbimento registrati durante le numerose determinazioni.

Preparazione della curva di taratura

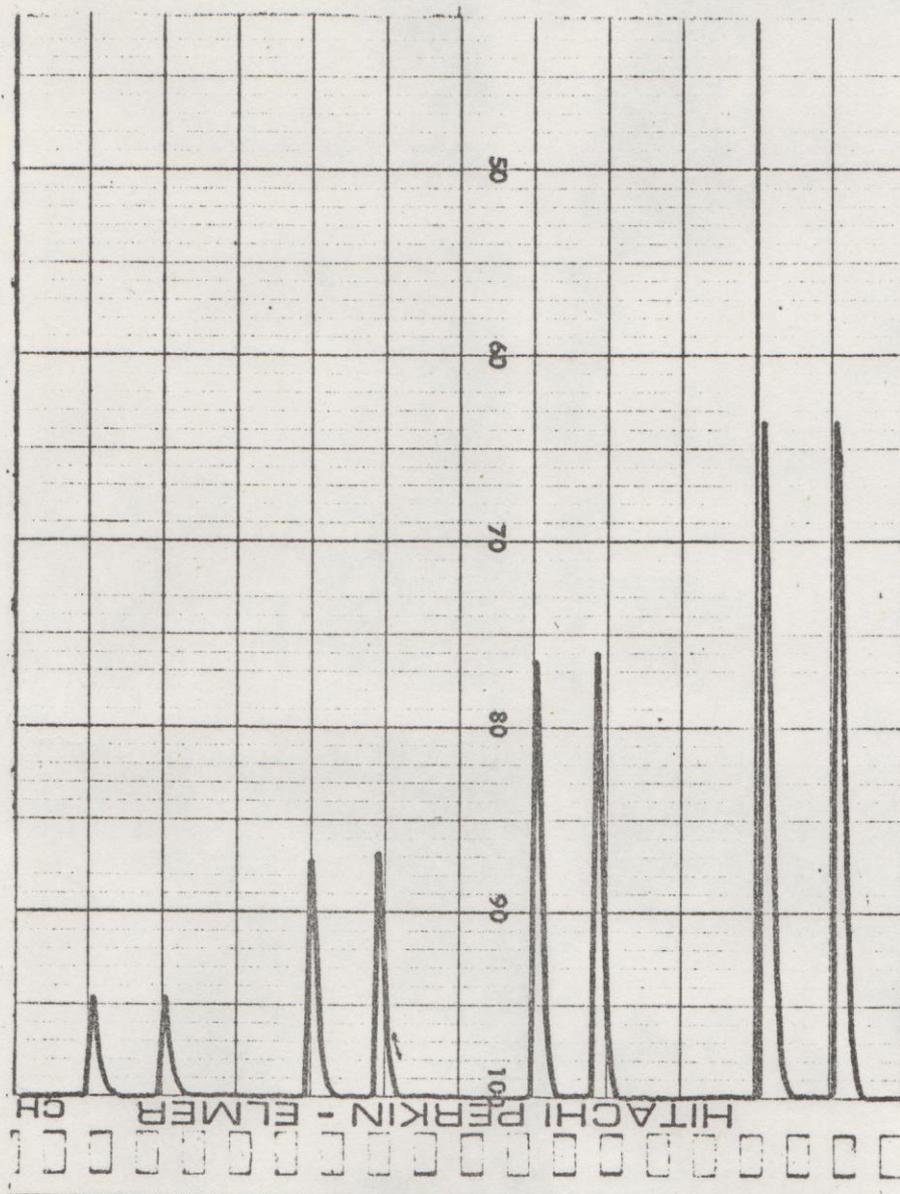
La curva di taratura viene effettuata sottoponendo al procedimento

Fig. II



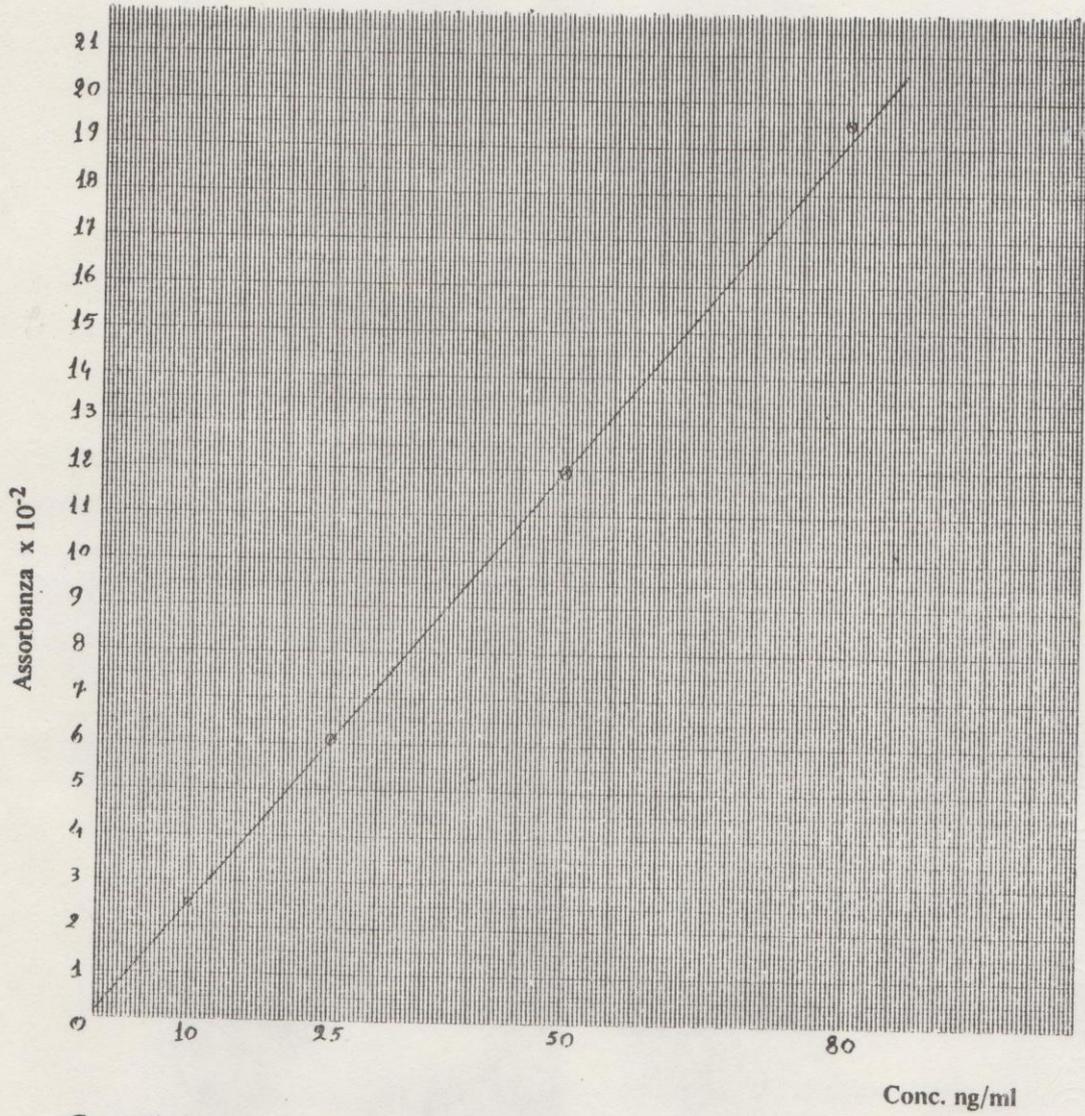
- 1) Picco di assorbimento relativo ad un campione di alga filamentosa.
- 2) Picco di assorbimento relativo al muscolo assiale di *Atherina hepsetus*.
- 3) Picco di assorbimento relativo ad un campione di penne remiganti.

Fig. III



Picchi di assorbimento caratteristici degli standard.

Fig. IV



Curva di taratura.

descritto i campioni di standard di mercurio preparati estemporaneamente.

La figura (III) mostra alcuni picchi relativi alla costruzione della curva di taratura riportata nella figura (IV).

Per ogni serie di campioni é necessario costruire una nuova curva di taratura in quanto le condizioni operative dello strumento variano di volta in volta.

I valori del % di assorbimento desunti dall'altezza dei picchi non sono lineari rispetto alla concentrazione del mercurio, per cui essi vengono convertiti per mezzo di apposite tabelle in assorbanza che viene riportata in grafico in funzione della concentrazione.

<i>Standard</i>	<i>% assorb.</i>	<i>assorbanza</i>
10 ng/ml	5,5	0,0246
25 «	13,0	0,0605
50 «	24,0	0,1192
80 «	36,2	0,1952

Calcoli per la determinazione del mercurio

Analogamente a quanto ho detto per la costruzione della curva di taratura i valori del % di assorbimento vengono trasformati a mezzo di apposite tabelle in assorbanza da cui mediante il grafico si possono calcolare i ng di Hg/ml.

Dalla formula seguente si ottiene il contenuto di mercurio totale presente nel campione espresso in p.p.m. di sostanza fresca

$$\text{Hg (ppm)} = \frac{a \times v}{b}$$

a = ng di Hg/ml desunti dalla curva di taratura

b = peso del campione mineralizzato espresso in mg

v = volume in ml del palloncino contenente il campione mineralizzato.

Le tabelle n. 1 - n. 2 - n. 3 - n. 4 - n. 5 - n. 6 - n. 7, riportano i risultati ottenuti rispettivamente sui muscoli assiali dei pesci, su alcuni organi dell'*Atherina hepsetus* sulle alghe e sui capelli di alcuni pescatori ed operai della zona in studio e sulle penne di 3 *Larus ridibundus*.

Tutti i risultati sono espressi su peso umido.

TABELLA N° 1

CONTENUTO DI MERCURIO NEL MUSCOLO ASSIALE DEI PESCI ERBIVORI

Nome	Peso g.	Lunghezza cm.	Periodo cattura	Luogo cattura	Hg. Totale p.p.m.
Labrus turdus	31,0	7,0	-	Scoglietto	0,17
"	210,0	24,0	11-71	"	0,05
"	50,0	12,0	10-71	Caletta	0,24
"	55,0	13,0	10-71	Catino	0,61
"	145,0	19,5	15/10/71	Lillatro	0,34
Boops salpa	205,0	18,5	10-70	Caletta	0,06
"	230,0	20,0	10-70	"	0,05
"	308,0	-	9-71	Scoglietto	0,08
"	365,0	30,0	-	-	0,04
"	389,0	31,0	16/10/71	Punta Arrighini	0,11
"	412,0	32,0	16/10/71	"	0,08
"	428,0	34,0	16/10/71	"	0,06
Coris julis	-	15,0	9-71	Catino	0,31
Sciaena cirrosa	100,8	16,2	10-70	Caletta	0,14

Per "Punta Arrighini" deve intendersi "Punta Righini" a Castiglioncello (NdR)

TABELLA N° 2

CONTENUTO DI MERCURIO NEL MUSCOLO ASSIALE DEI PESCI CARNIVORI

Nome	Peso g.	Lunghezza cm.	Periodo cattura	Luogo cattura	Hg. Totale p.p.m.
Scorpaena scrofa	95	16,0	10-71	Canottieri	7,51
"	115	17,0	10-71	"	6,19
"	132	17,5	10-71	"	6,24
"	153	16,5	7-70	Catino	3,60
"	170	19,5	9-71	"	4,69
"	181	20,0	8-70	"	4,05
Serranus scriba	33	13,5	9-71	"	2,50
"	45	15,0	9-71	"	2,59
"	98	18,0	9-71	"	2,87
Diplodus s.p.	9,5	9,0	9-71	Scoglietto	0,51
"	10	8,5	9-71	"	0,64
"	150	17,0	8-70	Catino	3,85
Serranus cabrilla	52	12,0	9-71	"	1,64
"	102	16,5	9-71	"	3,90
"	124	17,0	9-71	"	4,87
"	130	18,0	8-70	"	4,80
"	105	-	8-71	Canottieri	1,04
Belone belone	51	35,5	9-71	Scoglietto	0,03
Dicentrarcus labrax	33	14,5	9-71	Bagni Trieste	1,68
Conger conger	470	-	9-71	Castiglioncello	0,11