

S. Negri<sup>1</sup>, A. Alessio<sup>1</sup>, L. Maestri<sup>1</sup>, M. Sgroi<sup>3</sup>, S. Ghittori<sup>1</sup>, M. Imbriani<sup>2</sup>

## Uso della cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) con rivelatore UV per il dosaggio dell'N-acetil-S-(N-metilcarbamoil)cisteina (AMCC)

<sup>1</sup> Fondazione S. Maugeri, IRCCS, Istituto di Pavia. Laboratorio Monitoraggio Esposizione Inquinanti Aeriformi

<sup>2</sup> Dipartimento di Medicina Preventiva, Occupazionale e di Comunità, Università degli Studi di Pavia - Servizio di Fisiopatologia Respiratoria

<sup>3</sup> Scuola di Specializzazione in Medicina del Lavoro 2 - Università degli Studi di Pavia

**RIASSUNTO.** La N,N-dimetilformammide (DMF) è un solvente organico utilizzato nelle lavorazioni industriali per la preparazione di tessuti e di pelli sintetiche. Questo solvente può essere facilmente assorbito sia attraverso l'apparato respiratorio, sia attraverso la cute: per questo motivo, il monitoraggio biologico assume particolare importanza per una corretta valutazione dell'esposizione occupazionale. L'indicatore più comunemente utilizzato (N-metilformammide) permette di valutare l'esposizione giornaliera; al contrario, il mercapturato specifico della DMF, N-acetil-S-(N-metilcarbamoil)cisteina (AMCC) permetterebbe di stimare la dose media settimanale del solvente. L'articolo descrive un metodo analitico per la determinazione dell'AMCC con apparecchiature ampiamente diffuse (HPLC-UV) e senza la necessità di derivatizzare la molecola. Il protocollo di purificazione dei campioni prevede due successive estrazioni in fase solida con cartucce tipo C18 ed ENV<sup>+</sup>. L'ottimizzazione delle condizioni cromatografiche permette di ottenere una buona separazione dell'AMCC dagli interferenti mediante l'uso di una colonna basata su resine polimeriche (Aminex HPX). Attraverso la procedura di purificazione descritta possono essere processati contemporaneamente un elevato numero di campioni e l'analisi successiva può essere effettuata in tempi brevi mediante eluzione isocratica. Lo studio ha inoltre confermato la specificità e la sensibilità dell'AMCC come indicatore biologico dell'esposizione a DMF.

**Parole chiave:** N,N-dimetilformammide (DMF), N-acetil-S-(N-metilcarbamoil)cisteina (AMCC), monitoraggio biologico, metodi analitici, cromatografia liquida ad elevate prestazioni (HPLC).

**ABSTRACT.** USE OF HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) WITH UV DETECTION FOR MEASURING URINARY N-ACETYL-S-(N-METHYLCARBAMOYL)CYSTEINE (AMCC). N,N-dimethylformamide (DMF) is a solvent widely used to prepare synthetic fibers. Biomonitoring of DMF is usually performed by measuring urinary N-methylformamide, which allows us to estimate exposure during the working day. An alternative biomarker is the mercapturic acid N-acetyl-S-(N-methylcarbamoil)cysteine (AMCC) whose excretion accounts for about 13% of the absorbed DMF dose. Owing to its slow excretion (mean half-life = 23 hours) the urinary levels of AMCC at the end of a workweek reflect the cumulative dose of DMF during the whole week. Methods given in literature for measuring AMCC need the derivatization of the molecule before analysis. The paper describes a method for the determination of urinary AMCC by high-performance liquid chromatography (HPLC) with direct UV detection. Samples were purified by solid phase extraction with C18 and ENV<sup>+</sup> cartridges, then 10 µl were directly injected onto an Aminex HPX-87H Ion Exclusion column maintained at a temperature of 37°C. Analyses were

performed by isocratic run with 1 mM sulphuric acid delivered at 0.85 mL/min. The detector was set at 196 nm. Under these conditions, AMCC eluted at 11.1 min., and the detection and quantification limits were 1.32 mg/L and 3.96 mg/L, respectively. The performance of the method was evaluated on samples containing 25 mg/L and 400 mg/L of AMCC: each sample was analysed three times. The mean recovery of the extraction procedure was 88.3%. The precision (CV%) and the accuracy (Error%) ranged from 0.8% to 2.9%, and from -1.2% to +3.2%. The calibration curve was linear up to a concentration of 1000 mg/L, the coefficient of correlation was  $r = 0,9997$ . AMCC was measured in urine samples from 30 exposed and 20 unexposed (smokers and nonsmokers) subjects. Measurable amounts of AMCC were found in all of the samples from workers exposed to DMF; on the contrary, none of the samples from unexposed subjects contained this metabolite. The proposed method is sufficiently sensitive and specific for the evaluation of occupational exposure to DMF, thus it could be useful for the biological monitoring of workers exposed to this solvent.

**Key words:** N,N-dimethylformamide (DMF), N-acetyl-S-(N-methylcarbamoil)cysteine (AMCC), biological monitoring, analytical methods, high-performance liquid chromatography (HPLC).

### Introduzione

La N,N-dimetilformammide (DMF) è un solvente ampiamente utilizzato in impianti industriali che manipolano polimeri poliuretanic, poliaccrilonitrilici e a base di polivinilcloruro, impiegati per la lavorazione di tessuti e di pelli sintetiche (9). Si stima che la produzione mondiale di DMF sia di 250 mila tonnellate l'anno (11).

In passato l'IARC (International Agency for Research on Cancer) ha classificato questo solvente tra le sostanze possibili cancerogene (6), ma ulteriori ricerche hanno portato tale Ente ad includere la DMF fra le sostanze del gruppo 3 (non classificabili per quanto riguarda la loro cancerogenicità nell'uomo) (7).

L'esposizione cronica a DMF può causare danni epatici, pancreatici, fenomeni di irritazione congiuntivale, dispnea, sintomi gastroenterici e intolleranza all'alcol (5).

La DMF può essere facilmente assorbita dai polmoni poiché il suo elevato coefficiente di ripartizione sanguinea facilita una ritenzione polmonare circa pari al 70% della dose inalata (3).

Questo solvente, inoltre, può essere assorbito in modo considerevole anche dalla cute sotto forma di vapore o di liquido. A tale proposito, Mráz e Nohová hanno rilevato che l'immersione di una mano in DMF pura per 15 minuti comporta un assorbimento di solvente sovrapponibile a quello che si ottiene con un'esposizione di 8 ore a 60 mg/m<sup>3</sup> di vapori di DMF (12).

Altri studi, inoltre, hanno evidenziato che la protezione fornita dai guanti risulta spesso insufficiente (14). Per questi motivi si rende necessario attuare un programma di monitoraggio biologico dei soggetti professionalmente esposti, che deve basarsi sulla conoscenza del metabolismo della DMF (Figura 1).

L'indicatore biologico attualmente più utilizzato per valutare l'esposizione giornaliera a DMF è l'N-metilformammide (MF), dosata mediante tecnica gascromatografica. In realtà è stato dimostrato che l'MF presente nelle urine dei soggetti esposti rappresenta una quota minima della dose di DMF assorbita: le elevate concentrazioni di MF misurate nei campioni dopo esposizione provengono principalmente dalla degradazione termica (dovuta alle alte temperature utilizzate durante l'analisi) della N-idrossimetil-N-metilformammide (HMMF), che va ritenuto uno dei "veri" metaboliti principali della DMF. Analogamente, anche la formammide (F), un altro composto dosabile nelle urine dopo esposizione a DMF, deriva principalmente dalla degradazione termica dell'N-idrossimetilformammide (HMF) (2, 10, 18).

Un secondo percorso metabolico, i cui dettagli non sono stati ancora completamente chiariti, coinvolge la coniugazione del glutatone (GSH) con l'N-metilisocianato (MIC), un intermedio reattivo che deriva probabilmente dalla ossidazione della HMMF e della HMF, ed è sospettato essere il responsabile degli effetti tossici riscontrati in seguito all'esposizione a DMF (11).

Questa via metabolica termina con la formazione dell'acido mercapturico specifico della DMF, l'N-acetil-S-(N-metilcarbamoil)cisteina (AMCC) (13).

Recentemente l'American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) ha inserito questo metabolita urinario tra i biomarkers di esposizione a DMF, affiancandolo alla "tradizionale" MF. L'indice biologico (BEI) raccomandato per un limite ambientale di 10 ppm (8 ore TLV-TWA) è di 40 mg/L di AMCC per le urine raccolte prima dell'ultimo turno lavorativo settimanale (1); va comunque notato che l'ACGIH considera l'AMCC come indice di esposizione semiquantitativo (notazione "Sq").

La raccolta dei campioni biologici viene effettuata al termine della settimana lavorativa a causa della lenta cinetica di eliminazione dell'AMCC (emivita di circa 23 ore): a differenza della MF, che evidenzia l'esposizione giornaliera (emivita di 3-5 ore), l'AMCC fornirebbe infatti una stima della dose media di DMF assorbita nell'arco dell'intera settimana lavorativa (15, 17).

Su un gruppo di volontari esposti ad una concentrazione di DMF pari a 30 mg/m<sup>3</sup> per 8 ore è stato determinato il livello di tutte le sostanze presenti nell'urina dopo esposizione al solvente: lo studio ha evidenziato un livello di DMF immodificata molto basso, pari allo 0,3% della dose assorbita, un livello di indicatori biologici HMMF

ed HMF (dosati come MF e F) pari al 22,3% e al 13,2% rispettivamente, e infine un livello di AMCC pari al 13,4% (12). L'AMCC, quindi, è uno dei metaboliti maggiori della DMF e si ritrova in concentrazioni relativamente elevate anche nelle urine dei soggetti esposti a basse dosi di solvente.

Il riscontro di elevate concentrazioni di AMCC nelle urine dei soggetti esposti anche a modeste dosi di DMF, unito alla capacità di accumularsi e alla sua specificità, rendono questo metabolita un indicatore di notevole interesse pratico.

Attualmente, in letteratura sono descritti tre metodi per la determinazione dell'AMCC:

- 1) Il metodo proposto originariamente da Mráz prevede la conversione dell'AMCC in etil-N-metilcarbammato e la successiva analisi con un gascromatografo abbinato ad un detector specifico per composti contenenti azoto o fosforo (NPD) (11), oppure, più recentemente, un detector termoionico (TSD) (8).
- 2) Un'altra procedura descritta in letteratura comporta la derivatizzazione del gruppo carbossilico del composto e la sua successiva analisi con un gascromatografo abbinato ad uno spettrometro di massa (4);
- 3) Recentemente è stato proposto un metodo che prevede la reazione dell'AMCC con dabsil cloruro prima dell'iniezione in un sistema per cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) abbinato ad un detector UV (16).

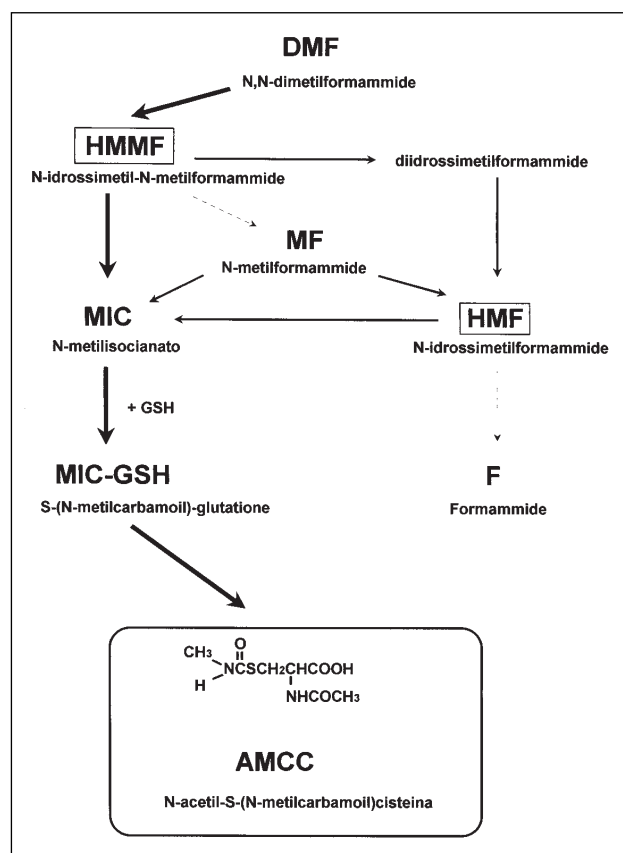


Figura 1. Schema del metabolismo della N,N-dimetilformammide.

Le frecce tratteggiate indicano i composti che si formano soprattutto in seguito a degradazione termica durante l'analisi gascromatografica

Nel primo metodo la riproducibilità della reazione è influenzata dalla concentrazione di creatinina nella matrice urinaria, mentre il secondo richiede un apparato relativamente costoso; tutti i metodi sinora riportati in letteratura, inoltre, richiedono una reazione di derivatizzazione dell'AMCC prima dell'analisi cromatografica.

In questo studio viene proposto un nuovo metodo di determinazione dell'AMCC con un apparato relativamente poco costoso, HPLC-UV; questo metodo, inoltre, non richiede alcuna derivatizzazione del metabolita prima dell'analisi.

## Materiali e metodi

### Reattivi e materiale utilizzato

Le cartucce per estrazione in fase solida (SPE, Isolute C18 (EC), 500 mg/3 ml e Isolute ENV<sup>+</sup> 200 mg/3 ml) erano della International Sorbent Technology (IST, Hengoe, UK).

Lo standard di AMCC è stato sintetizzato dalla Alchemy S.r.l., Bologna, Italia; il grado di purezza dichiarato era del 97% ed è stato confermato mediante analisi con HPLC.

L'acqua, il metanolo e l'acetonitrile utilizzati erano di grado HPLC, mentre gli acidi solforico, fosforico e cloridrico e tutti gli altri reagenti avevano un grado di purezza analitico.

### Strumenti

Il sistema cromatografico era costituito da una pompa HPLC Waters 600 E (Milford, MA, USA) equipaggiata con una colonna Aminex Ion Exclusion HPX - 87 H, 300 x 7,8 (ID) mm, 9 µm (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), mantenuta a temperatura costante mediante un fornello termostatico; il rivelatore UV (Waters 484) era regolato a 196 nm. Il sistema era collegato ad un autocampionatore Waters Wisp 715 e ad un computer per l'acquisizione e l'elaborazione dei dati mediante software Millennium 2.15.

### Raccolta dei campioni

I campioni di urina sono stati raccolti in due fabbriche per la produzione della finta pelle. Sono stati presi in considerazione 30 soggetti addetti alla lavorazione e 20 soggetti di controllo (non esposti) di cui 10 fumatori e 10 non fumatori. La raccolta è stata effettuata all'inizio del turno di venerdì.

Le urine sono state congelate a -20°C subito dopo la raccolta e scongelate immediatamente prima dell'analisi.

### Preparazione dei campioni

Il protocollo di purificazione che precede l'analisi cromatografica prevede due stadi successivi di estrazione in fase solida:

- 1) prima purificazione con una cartuccia C18 (EC)
- 2) seconda purificazione con una cartuccia ENV<sup>+</sup>.

I campioni di urina (2 ml) sono stati acidificati con 200 µl di HCl 2,4 M e centrifugati a 4000 rpm per 15 min.

I sovrantanti (1 ml) sono stati caricati sulle cartucce C18 precedentemente attivate con 3 ml di metanolo e condizionate con 3 ml di HCl 1M.

Il lavaggio è stato effettuato con 3 ml di H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> all'1% (v/v).

L'AMCC è stato eluito con altri 3 ml di H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1%; questo eluato è stato raccolto e caricato sulle cartucce ENV<sup>+</sup> (precedentemente attivate e condizionate come per le cartucce C18).

I lavaggi sono stati effettuati in successione con 3 ml di miscela H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1% - metanolo (80:20, v/v), 2 ml di H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1% e 2 ml di tampone fosfato 0,5 M pH 7.

L'eluizione è stata realizzata con 4 ml di tampone fosfato 0,5 M pH 7 contenente il 5% di metanolo; l'eluato è stato acidificato effettuando la raccolta direttamente in provette contenenti 340 µl di HCl 2,4 M.

I campioni così ottenuti sono stati iniettati direttamente in HPLC.

### Analisi cromatografica

La metodica analitica finale è stata ottenuta dopo numerose prove nelle quali sono stati variati diversi parametri: temperatura, flusso e composizione della fase mobile.

La migliore separazione cromatografica è stata realizzata a 37°C con una fase mobile costituita da acido solforico 1 mM, in condizioni isocratiche e ad un flusso di 0,85 mL/min. Il volume di iniezione di ciascun campione era di 10 µl e l'AMCC aveva un tempo di ritenzione pari a 11,1 min. Il detector UV era regolato a 196 nm e le iniezioni potevano essere effettuate ogni 12-13 min. (i composti con un tempo di ritenzione superiore a quello dell'AMCC uscivano all'inizio del cromatogramma successivo senza sovrapporsi al picco dell'AMCC).

L'intera procedura per il trattamento e l'analisi dei campioni è riassunta in Figura 2.

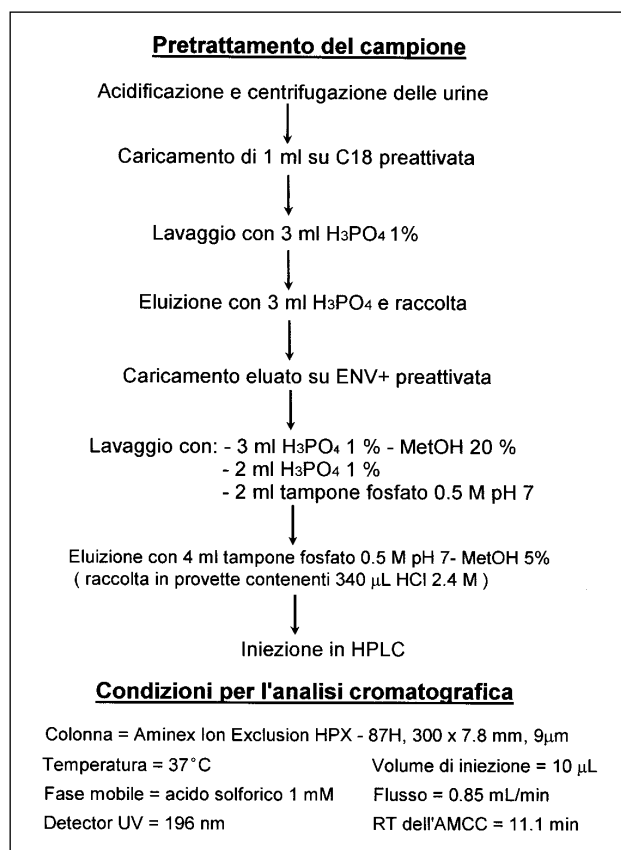


Figura 2. Schema riassuntivo delle condizioni per la purificazione e l'analisi dei campioni urinari

## Risultati

Lo standard di AMCC (da 5 a 1000 mg/L) è stato aggiunto a due campioni di urina presi da soggetti non esposti con una concentrazione di creatinina pari a 0,35 e 3,1 g/L. I campioni sono stati quindi purificati e analizzati, allo scopo di ottenere due distinte curve di calibrazione e di verificare l'influenza della concentrazione di creatinina nei due passaggi di purificazione. Le curve di calibrazione ottenute erano lineari fino ad una concentrazione di AMCC pari a 1000 mg/L e non erano influenzate dal contenuto in creatinina.

Una tipica curva di taratura era:

$$Y = 11465 X + 5881 \quad (r = 0,9997)$$

dove

Y = area del picco in  $\mu\text{V} \cdot \text{min}$ ;

X = concentrazione di AMCC in mg/L

La percentuale di recupero della procedura di estrazione e le caratteristiche di riproducibilità e accuratezza del metodo sono state valutate su due campioni ottenuti per aggiunta di standard (concentrazioni finali pari a 25 mg/L e 400 mg/L) all'urina di un soggetto non esposto. Ciascun campione è stato analizzato tre volte: i risultati delle prove sono riassunti in Tabella I. In breve, il metodo è risultato sensibile (limite di rilevabilità = 1,32 mg/L), riproducibile (valori di CV% inferiori al 3%) e accurato (errore massimo = 3,2%).

Tutti i campioni dei soggetti esposti professionalmente a DMF contenevano quantità dosabili di AMCC: i valori ottenuti erano compresi fra il limite di dosabilità (3,96 mg/L) e 115 mg/L di AMCC, con un valore medio corrispondente a  $37,9 \pm 28,4$  mg/L (media  $\pm$  deviazione standard). La media geometrica corrispondeva a 26,0 mg/L e la deviazione geometrica standard era pari a 2,8. Non sono state riscontrate quantità dosabili del metabolita nei campioni dei soggetti non esposti, sia fumatori che non fumatori.

**Tabella I. La tabella riassume la percentuale di recupero della procedura di estrazione dell'AMCC dai campioni d'urina e le caratteristiche di riproducibilità, accuratezza e sensibilità del metodo**

Percentuale di recupero medio		88,3 %	
<b>Riproducibilità (n = 3)</b>			
Concentrazione (mg/L)	CV% intra-assay	CV% inter-assay	
25	0,2	0,8	
400	0,4	2,9	
<b>Accuratezza (n = 3)</b>			
Conc. attesa (mg/L)	Conc. misurata (mg/L)	Errore %	
25	25,8	+ 3,2 %	
400	395,2	- 1,2 %	
<b>Limite di rilevabilità (per un rapporto segnale / rumore pari a 3)</b> = 1,32 mg/L			
<b>Limite di dosabilità (3 x limite di rilevabilità) = 3,96 mg/L</b>			

## Discussione

L'AMCC è il prodotto finale della coniugazione tra il GSH e la DMF e la determinazione della sua concentrazione nelle urine può essere utile per il monitoraggio biologico dei soggetti esposti a questo solvente.

In questo studio è stato sviluppato un metodo, basato sulla cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) abbinata ad un detector UV, che non richiede né la derivatizzazione dell'analita, né un apparato d'analisi eccessivamente costoso.

Per ottenere un metodo analitico sufficientemente sensibile e specifico si sono dovute superare alcune difficoltà legate alle proprietà chimico-fisiche della molecola in esame: la molecola dell'AMCC, infatti, è caratterizzata da un'elevata polarità e dalla mancanza di un gruppo cromoforo.

Quest'ultima caratteristica, in particolare, costringe ad utilizzare il detector a basse lunghezze d'onda, ma in questa zona dello spettro l'analisi risulta aspecifica poiché l'AMCC viene rilevato insieme a molti altri composti organici.

Un punto critico nell'allestimento del metodo è stato quindi quello di separare l'analita dalla maggior parte dei possibili interferenti prima dell'analisi: si è verificato, infatti, che iniettando direttamente nel cromatografo il campione d'urina semplicemente diluito con la fase mobile si ottenevano cromatogrammi poco chiari, a causa della coeluzione dell'AMCC con diversi interferenti. Inoltre i tempi d'analisi risultavano troppo lunghi, a causa della presenza di picchi con tempi di ritenzione elevati.

Si è quindi cercato di ovviare al problema purificando le urine mediante estrazione in fase solida (SPE), che attualmente rappresenta la tecnica più efficace per il trattamento di matrici complesse come l'urina.

La migliore pulizia del campione si è ottenuta mediante il passaggio successivo del campione su due tipi differenti di cartucce lipofile.

Il protocollo di purificazione delle urine è stato realizzato utilizzando unicamente cartucce monouso per SPE a basso contenuto di "fines", cioè di particelle di piccole dimensioni che riducono il flusso dei solventi utilizzati per il lavaggio e l'eluizione dei campioni: tali cartucce permettono di eluire i solventi semplicemente per gravità, senza l'ausilio di apparecchiature per il vuoto. In questo modo è possibile trattare contemporaneamente un maggior numero di campioni; abbiamo verificato infatti che si possono purificare fino a 100 campioni d'urina in un giorno. Questo protocollo garantisce un recupero con rese elevate ed una riproducibilità soddisfacente; inoltre, non essendo necessario evaporare il campione abbiamo ritenuto inutile aggiungere uno standard interno.

In base alle prove effettuate in precedenza, è stato verificato che la molecola dell'AMCC si degrada lentamente per valori di pH neutri e basici. È quindi necessario acidificare immediatamente l'eluato dalle cartucce ENV<sup>+</sup> (che contiene tampone a pH 7) raccogliendolo direttamente in provette contenenti una quantità di HCl sufficiente ad acidificare la miscela e a stabilizzare l'AMCC.

Essendo l'AMCC un metabolita molto polare, è risultato impossibile separarlo dagli interferenti (ancora presenti nel campione purificato) mediante le consuete colonne per cromatografia in fase inversa (tipo C18). Per questo motivo è stato necessario utilizzare una colonna basata su resine polimeriche, come la colonna Aminex HPX, in cui la separazione dei vari componenti il campione non si realizza solamente in base alle caratteristiche di polarità delle molecole, ma anche attraverso meccanismi di scambio ionico.

In base alle prove effettuate, la separazione dell'analita dagli interferenti è fortemente influenzata dalla temperatura della colonna, dalla composizione della fase mobile, dal tipo di acido utilizzato (solforico o fosforico) e dalla percentuale di modificante organico (acetone) aggiunto alla stessa. Variando sistematicamente questi parametri si sono determinate le condizioni ottimali per l'analisi (Figura 2).

È stata quindi ottenuta una buona separazione del picco dell'AMCC dai potenziali interferenti in un tempo ragionevolmente breve e mediante una semplice eluizione isocratica, come si può osservare chiaramente nella Figura 3.

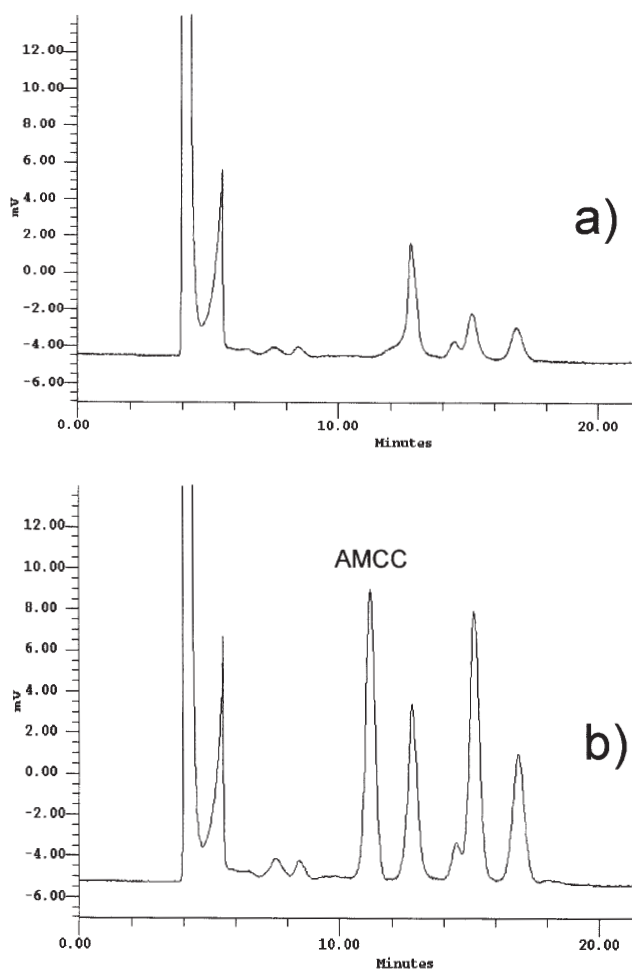


Figura 3. Esempio di cromatogrammi ottenuti con il metodo descritto nel testo:

- a) campione di urina di un soggetto non esposto a *N,N*-dimetilformamide;  
 b) campione di urina di un soggetto esposto professionalmente a *N,N*-dimetilformamide; concentrazione di AMCC = 45 mg/L

Secondo l'ACGIH la concentrazione di AMCC non dovrebbe superare i 40 mg/L per le urine raccolte prima dell'ultimo turno lavorativo settimanale (1). Il metodo qui descritto permette di ottenere un limite di dosabilità pari a circa un decimo del limite BEI e quindi risulta adeguato al monitoraggio biologico dei lavoratori esposti al solvente.

La strumentazione utilizzata (HPLC-UV) è ampiamente diffusa nei laboratori d'analisi e quindi il metodo potrebbe essere applicato per l'analisi di routine. Di conseguenza, il monitoraggio biologico dei soggetti esposti a questo solvente, affiancato al monitoraggio ambientale, potrebbe diventare uno strumento pratico ed efficace per una migliore prevenzione delle patologie associate all'esposizione a DMF.

## Conclusioni

A causa delle molteplici vie di penetrazione della DMF nell'organismo, per una valutazione più attendibile della reale esposizione dei singoli soggetti è necessario affiancare al monitoraggio ambientale il monitoraggio biologico dei lavoratori esposti.

Il metodo qui descritto permette di determinare la concentrazione di AMCC nelle urine dei soggetti esposti a questo solvente: il metodo prevede una purificazione dei campioni con cartucce SPE e la successiva analisi con un sistema HPLC-UV. Attraverso la procedura di purificazione proposta, può essere processato contemporaneamente un numero elevato di campioni e la successiva separazione cromatografica viene effettuata in condizioni isocratiche.

Il metodo è risultato sensibile e specifico e sembra adatto a valutare la reale esposizione a DMF; inoltre non richiede né un apparato eccessivamente costoso, né la derivatizzazione dell'analita.

Il nostro studio, infine, ha fornito ulteriori prove a conferma della specificità e della sensibilità dell'AMCC come indicatore biologico d'esposizione a DMF: in tutti i soggetti esposti, infatti, erano presenti quantità dosabili del metabolita, mentre nei soggetti non esposti (sia fumatori che non fumatori) non è stata rilevata alcuna quantità dosabile di AMCC.

## Bibliografia

- 1) ACGIH. Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices. Cincinnati, 2001.
- 2) Bavazzano P, Benassi S, Colzi A, Li Donni V, Casal Lareo A, Baldasseroni A, Mazzone M, Garro S, Giuliano G. La biotrasformazione della dimetilformamide (DMF) in lavoratori addetti alla produzione della finta pelle. Secondo Convegno Nazionale "Salute nella attività produttiva tessile" Prato 4-6 Aprile 1991.
- 3) Brugnone F, Perbellini L, Gaffuri E. *N,N*-Dimethylformamide concentration in environmental and alveolar air in an artificial leather factory. *Brit J Ind Med* 1980; 37: 185-188.
- 4) Casal Lareo A, Perico A, Perbellini L. Biological monitoring of workers exposed to *N,N*-dimethylformamide. Dimethylformamide and its metabolites in urine of exposed workers. *Int Arch Occup Environ Health* 1995; 67: 41-46.
- 5) Garnier R, Chataigner D, Perez-Trigalou B, Efthymiou ML. Intoxications professionnelles par le diméthylformamide. *Arch Mal Prof* 1992; 53 (2): 111-120.

- 6) IARC. Some organic solvents, resin monomers and related compounds, pigments and occupational exposure in paint manufacture and painting. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 47, IARC, Lyon, 1989.
- 7) IARC. Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol 71, IARC, Lyon, 1999.
- 8) Kafferlein HU, Angerer J. Simultaneous determination of two human urinary metabolites of N,N-dimethylformamide using gas chromatography - thermionic sensitive detection with mass spectrometric confirmation. *J Chromatogr B*, 1999; 734: 285-298.
- 9) Kawai T, Yasugi T, Mizunuma K, Watanabe T, Cai SX, Huang MY, Xi LQ, Qu JB, Yao BZ, Ikeda M. Occupational dimethylformamide exposure. 2. Monomethylformamide excretion in urine after occupational dimethylformamide exposure. *Int Arch Occup Environ Health*, 1992; 63 (7): 455-460.
- 10) Kestell P, Threadgill MD, Gescher A, Gledhill AP, Shaw AJ, Farmer PB. An investigation of the relationship between the hepatotoxicity and metabolism of N-alkylformamides. *J Pharmacol Exp Therap* 1987; 240: 265-270.
- 11) Mráz J. N-Acetyl-S-(N-methylcarbamoyl)cysteine (AMCC), the mercapturic acid of N,N-dimethylformamide (DMF): metabolic formation, methods of analysis, application in biological monitoring. In: Ambrosi L, Soleo L, Ghittori S, Maestri L, Imbriani M (Ed.). Mercapturic acids as biomarkers of exposure to industrial chemicals. Advances in Occupational Medicine. Pavia, Maugeri Foundation Books, Vol 2, 2001, PI-ME Press.
- 12) Mráz J, Nohová H. Percutaneous absorption of N,N-dimethylformamide in humans. *Int Arch Occup Environ Health* 1992; 64: 79-83
- 13) Mráz J, Turacek F. Identification of N-acetyl-S-(N-methylcarbamoyl)cysteine, a human metabolite of N,N-dimethylformamide and N-methylformamide. *J Chromatogr* 1987; 414: 355-404
- 14) Perico A, Bavazzano P, Bongini G. Permeabilità alla N,N-dimethylformamide dei guanti protettivi utilizzati nella produzione di fibre sintetiche. *G Ig Ind* 1993; 18: 13-17
- 15) Perbellini L. Mercapturati e monitoraggio biologico della N,N-dimethylformamide. *G Ital Med Lav Erg* 1999; 21:4, 347-350.
- 16) Perbellini L, Maestri L, Veronese N, Brugnone F. Determination of urinary N-acetyl-S-(N-methylcarbamoyl)cysteine, the mercapturic acid derived from dimethylformamide. In corso di pubblicazione.
- 17) Sakai T, Kageyama H, Araki T, Yosida T, Kuribayashi T, Masuyama Y. Biological monitoring of workers exposed to N,N-dimethylformamide by determination of the urinary metabolites, N-methylformamide and N-acetyl-S-(N-methylcarbamoyl)cysteine. *Int Arch Occup Environ Health* 1995; 67: 125-129
- 18) Santoni G, Bavazzano P, Perico A, Colzi A, Benassi S, Medica A, La Morgia R, Giuliano G. High performance liquid chromatographic determination of N-methylformamide and N-methyl-N-(hydroxymethyl)-formamide in human urine. *J Chromatogr B* 1992; 581: 287-292.

**Richiesta estratti:** Dr. L. Maestri, Fondazione S. Maugeri, IRCCS, Istituto di Pavia. Laboratorio Monitoraggio Esposizione Inquinanti Aeriformi - Via Ferrara, 4 - 27100 Pavia, Italy - Tel. 0382/556600 - e-mail: siclav@ipv36.unipv.it