



Analisi biologiche e chimiche

Azienda Certificata  
UNI EN ISO 9001:2008  
Certificato N. 501004992  
Centro di saggio BPL

REL/1388/2017/2016/CITO/  
ELB  
B94 Rev 00/17

## VALUTAZIONE *IN VITRO* DELL'EFFETTO PROTETTIVO DI UNA MATERIA PRIMA NEI CONFRONTI DI INQUINANTI ATMOSFERICI SU FIBROBLASTI

***In vitro evaluation of protective effect of a raw material against air pollutants on fibroblasts***

COMMITTENTE/CUSTOMER	Sinerga S.p.A. Via della Pacciarna, 67 21050 Gorla Maggiore (VA)
SPONSOR	Sinerga S.p.A. Via della Pacciarna, 67 21050 Gorla Maggiore (VA)
CAMPIONE/SAMPLE	Leniphenol Lotto/Batch: n.p.
DATA REPORT/REPORT DATE	29/06/2017
REPORT N.	REL/1388/2017/CITO/ELB

### Sede legale e laboratorio analisi

Via Quarantadue Martiri 213/B  
28924 Verbania/VB  
Italia

Pho.+39 0323 586239/496041  
Fax +39 0323 496877  
info@abich.it

CF/VAT/Reg. Imp. VCO: 01864020035  
R.E.A.: 189901  
Cap. Soc. € 116.000,00 i.v.

### Studi Clinici e Cosmetologici

Via Bruno Buozzi 4  
Via Burrona 51 - Edificio C  
20090 Vimodrone/MI  
Italia

[www.abich.it](http://www.abich.it)  
[www.abich.ca](http://www.abich.ca)

## Indice/Table of contents

1 PARTE PRIMA/PART ONE.....	3
INFORMAZIONI GENERALI/GENERAL INFORMATION .....	3
1.1 COMMITTENTE/SPONSOR.....	3
1.2 SPONSOR.....	3
1.3 CAMPIONE ANALIZZATO/TESTED SAMPLE .....	3
1.4 CONTROLLI/CONTROLS.....	3
1.5 TEST/ASSAY:.....	3
1.6 LABORATORIO INCARICATO/ENTRUSTED LABORATORY .....	4
1.7 DATE DELLO STUDIO/STUDY DATES .....	4
1.8 RICERCATORE PRINCIPALE/MAIN INVESTIGATOR .....	4
1.9 DIRETTORE DELLO STUDIO/ STUDY DIRECTOR .....	4
1.10 RESPONSABILE ASSICURAZIONE QUALITÀ / QUALITY ASSURANCE MANAGER.....	4
2 PARTE SECONDA/PART TWO .....	5
PROTOCOLLO Sperimentale/ STUDY DESIGN.....	5
2.1 ESECUZIONE DEL TEST/ASSAY PROCEDURES .....	5
2.1.1 Modello cellulare/Cell model.....	5
2.1.2 Particolato atmosferico NIST / Urban dust NIST .....	5
2.1.3 Trattamento ed esposizione/ Treatment and exposure .....	5
2.1.4 Test di vitalità cellulare MTT /MTT cell viability assay .....	6
2.1.5 Espressione dei risultati/ Expression of results .....	6
2.2 CRITERI DI ACCETTABILITÀ DEL METODO/ ACCEPTANCE CRITERIA FOR THE METHOD.....	7
2.3 INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI/ RESULTS INTERPRETATION: .....	7
3 PARTE TERZA/PART THREE - RISULTATI E CONCLUSIONI/RESULTS AND CONCLUSIONS .....	8
3.1 REQUISITI DI ACCETTABILITÀ DEL TEST /ASSAY VALIDITY REQUIREMENTS .....	8
3.2 RISULTATI/RESULTS .....	9
3.2 CONCLUSIONI/CONCLUSIONS .....	10
4 PARTE QUARTA/PART FOUR.....	11
BIBLIOGRAFIA/BIBLIOGRAPHY .....	11

### ALLEGATI/ ENCLOSURES:

- A) DATI GREZZI/ RAW DATA
- B) CERTIFICATO DI ANALISI NIST/ CERTIFICATE OF ANALYSIS NIST

### Nota>Note:

Il risultato dei test citati nel presente rapporto si riferisce esclusivamente al/ai prodotto/i testato/i e alle particolari condizioni sperimentali impiegate nel test. Il presente rapporto non può essere riprodotto parzialmente senza il consenso preliminare scritto degli sperimentatori. The results of the test in this report refer only to the tested product/s and to the particular experimental conditions here employed. This report cannot be partially duplicated without the preliminary written approval of the experimenters

#### Sede legale e laboratorio analisi

Via Quarantadue Martiri 213/B  
28924 Verbania/VB  
Italia

Pho.+39 0323 586239/496041  
Fax +39 0323 496877  
info@abich.it

#### Studi Clinici e Cosmetologici

Via Bruno Buozzi 4  
Via Burrona 51 - Edificio C  
20090 Vimodrone/MI  
Italia

[www.abich.it](http://www.abich.it)  
[www.abich.ca](http://www.abich.ca)



Analisi biologiche e chimiche

**Azienda Certificata**  
UNI EN ISO 9001:2008  
Certificato N. 501004992  
Centro di saggio BPL

REL/1388/2017/2016/CITO/  
ELB  
B94 Rev 00/17

## 1 PARTE PRIMA/PART ONE

### INFORMAZIONI GENERALI/GENERAL INFORMATION

#### 1.1 *Committente/Sponsor*

Sinerga S.p.A.  
Via della Pacciarna, 67  
21050 Gorla Maggiore (VA)

#### 1.2 *Sponsor*

Sinerga S.p.A.  
Via della Pacciarna, 67  
21050 Gorla Maggiore (VA)

#### 1.3 *Campione Analizzato/Tested Sample*

Campione/Sample	Codice interno/ Internal code	Descrizione/Description
Leniphenol Lotto/Batch: n.p.	4668/17-01	liquido marrone / brown liquid

np=non pervenuto/not identified

#### 1.4 *Controlli/Controls*

Controlli/Controls	Fornitore/ Supplier
Controllo positivo/ Positive control (PC)	Particolato atmosferico/ Urban dust: National Institute of Standards & Technology(NIST)
Tampone fosfato/Phosphate Buffer (PBS) Controllo negativo/ Negative control (CN)	Riferimento interno/ Internal standard

#### 1.5 *Test/Assay:*

- ❖ Test di sopravvivenza cellulare con test MTT – indicatore del potere protettivo della vitalità cellulare su fibroblasti murini dopo esposizione a particolato atmosferico in presenza del campione.
- ❖ Cell survival assay by MTT test – indicator of skin protective effect, using a murine fibroblasts following urban dust stress with the tested sample.

#### Sede legale e laboratorio analisi

Via Quarantadue Martiri 213/B  
28924 Verbania/VB  
Italia

Pho.+39 0323 586239/496041  
Fax +39 0323 496877  
info@abich.it

CF/VAT/Reg. Imp. VCO: 01864020035  
R.E.A.: 189901  
Cap. Soc. € 116.000,00 i.v.

#### Studi Clinici e Cosmetologici

Via Bruno Buozzi 4  
Via Burrona 51 - Edificio C  
20090 Vimodrone/MI  
Italia

[www.abich.it](http://www.abich.it)  
[www.abich.ca](http://www.abich.ca)



Analisi biologiche e chimiche

Azienda Certificata  
UNI EN ISO 9001:2008  
Certificato N. 501004992  
Centro di saggio BPL

REL/1388/2017/2016/CITO/  
ELB  
B94 Rev 00/17

### **1.6 Laboratorio incaricato/Entrusted laboratory**

ABICH S.r.l.  
Via 42 Martiri 213/B – 28924 Verbania ITALY  
Tel +39 (0)323 586239 – Fax +39 (0)323 496877

### **1.7 Date dello Studio/Study Dates**

Inizio/Start: 19/06/2017  
Fine/End: 29/06/2017

### **1.8 Ricercatore principale/Main investigator**

Dr Clara Sinigaglia, Tecnico di laboratorio biomedico/  
Biomedical laboratory technician  
ABICH S.r.l.

### **1.9 Direttore dello Studio/ Study Director**

Dr. Elena Bocchietto, Biologa specialista in Biotecnologie/  
Biologist, biotechnology specialist  
ABICH S.r.l.

### **1.10 Responsabile Assicurazione Qualità / Quality assurance manager**

Dr. Valentina Celada, ingegnere biomedico/  
Biomedical engineer  
ABICH S.r.l.

#### **Sede legale e laboratorio analisi**

Via Quarantadue Martiri 213/B  
28924 Verbania/VB  
Italia

Pho.+39 0323 586239/496041  
Fax +39 0323 496877  
info@abich.it

CF/VAT/Reg. Imp. VCO: 01864020035  
R.E.A.: 189901  
Cap. Soc. € 116.000,00 i.v.

#### **Studi Clinici e Cosmetologici**

Via Bruno Buozzi 4  
Via Burrona 51 - Edificio C  
20090 Vimodrone/MI  
Italia

[www.abich.it](http://www.abich.it)  
[www.abich.ca](http://www.abich.ca)

## **2 PARTE SECONDA/PART TWO** **PROTOCOLLO SPERIMENTALE/ STUDY DESIGN**

Lo scopo del lavoro è quello di valutare il potere protettivo di una sostanza o di una miscela di sostanze su colture di fibroblasti murini. Le cellule sono esposte a particolato atmosferico, la stima del potenziale protettivo viene effettuato indagando la vitalità cellulare in presenza e assenza dell'agente protettivo tramite test (MTT).

Le cellule vengono esposte al particolato atmosferico standard proveniente da un area urbana (NIST). Sono inclusi nel test adeguati controlli. Questo studio permette di valutare la protezione delle cellule da inquinanti organici di piccole dimensioni (PM 1, PM 2.5 e PM10).

This study concerns the in vitro evaluation of the protective effect of cosmetic product or raw materials on murine fibroblast. The cells are stressed with a certified standard atmospheric particulate materials collected in an urban area (NIST). The protective properties are evaluated through the investigation of the cell viability by MTT assay, with and without the protecting agent

Suitable controls are enclosed. This assay can point out a protection towards organic pollutants in small size particles (PM 1, PM 2.5 and PM10).

### **2.1 Esecuzione del test/Assay procedures**

#### **2.1.1 Modello cellulare/Cell model**

E' stata utilizzata una linea di fibroblasti murini (cellule Balb/3T3, clone A31). Le cellule sono coltivate in DMEM contenente 10% CS e antibiotici.

The test is carried out on a murine fibroblasts (Balb/3T3 cells, clone A31). Cells are cultured in DMEM containing 10% CS and antibiotics.

#### **2.1.2 Particolato atmosferico NIST / Urban dust NIST**

Lo standard (vedi allegato A) contiene idrocarburi policiclici aromatici, pesticidi, polichlorobifenili e altri inquinanti organici in concentrazioni definite e particolato di dimensioni tra 1µm e 10µm.

This standard (see enclosure A) contains polycyclic aromatic hydrocarbons, pesticides, polychlorinated biphenyls and other organic pollutants in defined concentrations, with a particle size mainly ranging from 1µm to 10µm.

#### **2.1.3 Trattamento ed esposizione/ Treatment and exposure**

Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti e lasciate crescere per 24h a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Il secondo giorno il terreno è stato sostituito con terreno di coltura fresco contenente il prodotto da testare a due diverse concentrazioni e lo stress inquinante a due concentrazioni. Il campione è stato sciolto direttamente in terreno di coltura. Ogni concentrazione è stata testata in triplicato. Quindi cellule stressate e non trattate con il campione sono state usate come controllo interno (massimo di mortalità cellulare), mentre cellule non stressate e non trattate con il campione sono state utilizzate come controllo negativo.

Al termine dell'incubazione di 24h è stato quindi eseguito il test di citotossicità (MTT) per valutare la percentuale di sopravvivenza cellulare.

Cells have been seeded in 96 wells plates and allowed to grow for 24 h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>.

#### **Sede legale e laboratorio analisi**

Via Quarantadue Martiri 213/B  
28924 Verbania/VB  
Italia

Pho.+39 0323 586239/496041  
Fax +39 0323 496877  
info@abich.it

CF/VAT/Reg. Imp. VCO: 01864020035  
R.E.A.: 189901  
Cap. Soc. € 116.000,00 i.v.

#### **Studi Clinici e Cosmetologici**

Via Bruno Buozzi 4  
Via Burrona 51 - Edificio C  
20090 Vimodrone/MI  
Italia

[www.abich.it](http://www.abich.it)  
[www.abich.ca](http://www.abich.ca)

The second day medium has been replaced with a fresh one, supplemented with 2 dilutions of the tested product and with 2 concentrations of air pollutant stress. The sample has been dissolved directly in the culture medium. The test has been carried out in three replicates for each test dilution. Stressed cells untreated with the sample and unstressed untreated cells have been used as controls in the experiment. At the end of the incubation period, the cells are tested for their viability with the citotoxicity (MTT) assay.

#### 2.1.4 Test di vitalità cellulare MTT /MTT cell viability assay

Il terreno di coltura viene aspirato e le cellule incubate in una soluzione 1mg/ml di MTT, per 2h a 37°C. La soluzione viene rimossa e sostituita con isopropanolo con successivi 40' di incubazione a temperatura ambiente e con agitazione a media velocità.

Viene letta l'assorbanza a 570 nm con un colorimetro (Tecan modello Sunrise remote) equipaggiato con un lettore di piastre sottraendo la lettura del fondo a 650 nm. Le assorbanze vengono corrette sottraendo le letture dovute al mezzo diluente.

Culture medium is removed and the cells incubated for 2 h in 1mg/ml MTT solution at 37°C. The solution is then removed and replaced with isopropanol, with further 40' incubation at room temperature under medium speed shaking.

The absorbance at 570 nm is measured with a microplate reader (Tecan modello Sunrise remote), with background clearing at 650 nm. The absorbance values are corrected by subtracting the reading of the blanks, with the diluent only.

#### 2.1.5 Espressione dei risultati/ Expression of results

La vitalità cellulare viene espressa in percentuale secondo la formula:

**% vitalità cellulare = [OD(570 nm - 650 nm) prodotto testato/ OD(570 nm - 650 nm) controllo cellule non trattate con inquinanti] x 100**

Quindi viene calcolata la mortalità cellulare:

**% mortalità cellulare = 100 - % di vitalità cellulare**

Per valutare la protezione della vitalità cellulare si utilizza la seguente formula:

**% protezione dallo stress inquinante = (%mortalità cellulare<sub>CSNT</sub>- %mortalità cellulare<sub>CST</sub>)/ %mortalità cellulare<sub>CSNT</sub> \*100**

Dove

CSNT = cellule stressate con inquinanti atmosferici non trattate con il campione

CST = cellule stressate con inquinanti trattate con il campione

Viene inoltre riportata, in caso di efficacia, l'analisi statistica per la valutazione della significatività del dato.

Valore di p < 0,05 dato statisticamente significativo

The cell viability is expressed in percentage terms:

**% cell viability = [OD(570 nm - 650 nm) test product / OD(570 nm - 650 nm) negative control] x 100**

So the cell death rate is calculated as:

**% cell death = 100 - % cell viability**

#### Sede legale e laboratorio analisi

Via Quarantadue Martiri 213/B  
28924 Verbania/VB  
Italia

Pho.+39 0323 586239/496041  
Fax +39 0323 496877  
info@abich.it

CF/VAT/Reg. Imp. VCO: 01864020035  
R.E.A.: 189901  
Cap. Soc. € 116.000,00 i.v.

#### Studi Clinici e Cosmetologici

Via Bruno Buozzi 4  
Via Burrona 51 - Edificio C  
20090 Vimodrone/MI  
Italia

[www.abich.it](http://www.abich.it)  
[www.abich.ca](http://www.abich.ca)

To evaluate the viability cell protection:

**% protection from pollution stress= pollutant stress**  
(% cell death<sub>CSNT</sub>-% cell death<sub>CST</sub>)/ % cell death<sub>CSNT</sub> \*100

Where

CSNT = Stressed cells not treated with the sample

CST = Stressed cells treated with sample

If the sample has a efficacy, a statistical analysis is reported to evaluate the statistical significance of the data.

p value < 0,05 statistically significant result

## 2.2 Criteri di accettabilità del metodo/ Acceptance criteria for the method

per il controllo negativo (CN): Il valore di OD deve essere > 0,2  
la deviazione standard deve essere ≤ 18%

per il controllo positivo (CP): la deviazione standard deve essere ≤ 18%

per il campione : la deviazione standard deve essere ≤ 18%

for negative control (CN): OD value has to be > 0.2  
the standard deviation has to be ≤ 18%

for positive control (PC): the standard deviation has to be ≤ 18%

for the sample : the standard deviation has to be ≤ 18%

## 2.3 Interpretazione dei risultati/ Results interpretation:

Una differenza significativa di mortalità cellulare tra le cellule stressate con l'inquinante e trattate con il campione e le cellule trattate con il solo inquinante è indice dell'efficacia protettiva del campione. /

A different cell mortality value between units treated with urban dust stress and sample and units treated with only urban dust is an index of protective and epidermis barrier effect of the sample

### Sede legale e laboratorio analisi

Via Quarantadue Martiri 213/B  
28924 Verbania/VB  
Italia

Pho.+39 0323 586239/496041  
Fax +39 0323 496877  
info@abich.it

CF/VAT/Reg. Imp. VCO: 01864020035  
R.E.A.: 189901  
Cap. Soc. € 116.000,00 i.v.

### Studi Clinici e Cosmetologici

Via Bruno Buozzi 4  
Via Burrona 51 - Edificio C  
20090 Vimodrone/MI  
Italia

[www.abich.it](http://www.abich.it)  
[www.abich.ca](http://www.abich.ca)

### 3 **PARTE TERZA/PART THREE - RISULTATI E CONCLUSIONI/RESULTS AND CONCLUSIONS**

#### 3.1 *Requisiti di accettabilità del test /Assay validity requirements*

MTT	Valore/value	Limiti/ Limits	Risultato/result
CP: dev. standard % vitalità cellulare/ % stand. dev. cell viability	≤ 18	≤ 18	Conforme/ Complies
CN: dev. standard % vitalità cellulare/ % stand. dev. cell viability	≤ 18	≤ 18	Conforme/ Complies
CN: OD	0,52	>0.2	Conforme/ Complies
Campione/ sample: dev. standard % vitalità cellulare/ % stand. dev. cell viability	≤ 18	≤ 18	Conforme/ Complies

I criteri di accettabilità del test (vedi § 2.3) sono conformi, quindi il test è considerato valido.

Acceptance criteria of the assay (see § 2.3) comply, hence the assay is valid.

\* CSNT = *cellule stressate con inquinanti atmosferici non trattate con il campione/ Stressed cells not treated with the sample*

**Sede legale  
e laboratorio analisi**

Via Quarantadue Martiri 213/B  
28924 Verbania/VB  
Italia

Pho.+39 0323 586239/496041  
Fax +39 0323 496877  
info@abich.it

CF/VAT/Reg. Imp. VCO: 01864020035  
R.E.A.: 189901  
Cap. Soc. € 116.000,00 i.v.

**Studi Clinici  
e Cosmetologici**

Via Bruno Buozzi 4  
Via Burrona 51 - Edificio C  
20090 Vimodrone/MI  
Italia

[www.abich.it](http://www.abich.it)  
[www.abich.ca](http://www.abich.ca)

### 3.2 Risultati/Results

Leniphenol Lotto/Batch: n.p.	% vitalità cellulare(DS) % viability cell(DS)	Mortalità cellulare%/ Cell death %	% protezione dallo stress inquinante/ % protection from pollutants stress
0,4%	102,03 (6,69)	N/A	N/A
0,2%	92,64 (8,00)	7,36	N/A
0,4% + NIST 3mg	17,04 (2,23)	82,96	<b>Nessuna protezione/ no protection</b>
0,2% + NIST 3mg	20,77 (2,86)	79,23	<b>Nessuna protezione/ no protection</b>
0,4% + NIST 1mg	52,07 (5,06)	47,93	<b>19,95</b>
0,2% + NIST 1mg	53,49 (1,79)	46,51	<b>22,33</b>
<b>NIST 3mg</b>	<b>23,98 (1,10)</b>	<b>76,02</b>	<b>N/A</b>
<b>NIST 1mg</b>	<b>40,12 (3,84)</b>	<b>59,88</b>	<b>N/A</b>
<b>Controllo negativo/ Negative control</b>	<b>100,00 (2,70)</b>	<b>N/A</b>	<b>N/A</b>

### 3.2 Conclusioni/Conclusions

Sulla base dei risultati riportati il campione /On the bases of the results obtained, the sample:

## Leniphenol

Lotto/Batch: n.p.

**ha mostrato di possedere un'attività di protezione dagli effetti negativi di inquinanti atmosferici su fibroblasti in vitro.**

**did show an in vitro protection against air pollutants stress  
on human keratinocytes.**

Data/Date: 29/06/2017

Direttore dello Studio/ Study Director  
Dr. Elena Bocchietto



#### Sede legale e laboratorio analisi

Via Quarantadue Martiri 213/B  
28924 Verbania/VB  
Italia

Pho.+39 0323 586239/496041  
Fax +39 0323 496877  
info@abich.it

CF/VAT/Reg. Imp. VCO: 01864020035  
R.E.A.: 189901  
Cap. Soc. € 116.000,00 i.v.

#### Studi Clinici e Cosmetologici

Via Bruno Buozzi 4  
Via Burrona 51 - Edificio C  
20090 Vimodrone/MI  
Italia

[www.abich.it](http://www.abich.it)  
[www.abich.ca](http://www.abich.ca)

## **4 PARTE QUARTA/PART FOUR**

### **BIBLIOGRAFIA/BIBLIOGRAPHY**

- Tai-Long Pan, Pei-Wen Wang, Ibrahim A. Aljuuffali, Chi-Ting Huang, Chiang-Wen Lee, Jia-You Fang. (2015). The impact of urban particulate pollution on skin barrier function and the subsequent drug absorption. *J. Dermatol Sci.* 78(1):51-60.
- Régnier M, Caron D, Reichert U, Schaefer H.(1992). Reconstructed human epidermis: a model to study in vitro the barrier function of the skin. *Skin Pharmacol*; 5(1):49-56.
- Mossman, T. (1993). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65:55-63.
- Flora et al., Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian J Med Res* 128: 501-523., 2008;
- Jarup L., Hazards of some heavy metal contamination., *Br Med Bull* 68(1): 167-182., 2003.
- Morais et al., Heavy metals and human health, in Environmental health- emerging issues and practice., 227-246., InTech., 2012;
- Satarug et al., Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. *Ciencia e Saude Coletiva* 16(5):2587-2602., 2011.
- Singh et al., Arsenic in the environment: effects on human health and possible prevention. *J Environ Biol* 28(2 Suppl): 359-365., 2007;
- Stohs SJ et al., Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* 18(2): 321-336., 1995.

**Sede legale  
e laboratorio analisi**

Via Quarantadue Martiri 213/B  
28924 Verbania/VB  
Italia

Pho.+39 0323 586239/496041  
Fax +39 0323 496877  
info@abich.it

CF/VAT/Reg. Imp. VCO: 01864020035  
R.E.A.: 189901  
Cap. Soc. € 116.000,00 i.v.

**Studi Clinici  
e Cosmetologici**

Via Bruno Buozzi 4  
Via Burrona 51 - Edificio C  
20090 Vimodrone/MI  
Italia

[www.abich.it](http://www.abich.it)  
[www.abich.ca](http://www.abich.ca)

## ALLEGATO A ALLA RELAZIONE / ENCLOSURE A TO THE REPORT 1387-17



National Institute of Standards & Technology

### Certificate of Analysis

#### Standard Reference Material® 1649b

##### Urban Dust

This Standard Reference Material (SRM) is an atmospheric particulate material collected in an urban area and is intended for use in evaluating analytical methods for the determination of selected polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyl (PCB) congeners, and chlorinated pesticides in atmospheric particulate material and similar matrices. Reference values are also provided for nitro-substituted polycyclic aromatic hydrocarbons (nitro-PAHs), decabromodiphenyl ether, toxaphene congeners, and polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin and dibenzofuran congeners. Information concentration values are provided for selected hydrocarbons, hopanes, steranes, ketones, and particle-size characteristics. All of the constituents for which certified, reference, and information values are provided in SRM 1649b are naturally present in the particulate material. SRM 1649b is prepared from the same particulate material that was issued in 1982 as SRM 1649 [1] and re-issued in 1999 as SRM 1649a [2]. This bulk material was sieved to a smaller particle size fraction than the previous materials. A unit of SRM 1649b consists of a bottle containing 2 g of particulate material.

**Certified Concentration Values:** Certified values for the concentrations, expressed as mass fractions, for 23 PAHs, 13 PCB congeners, and 4 chlorinated pesticides are provided in Tables 1, 2, and 3. A NIST certified value is a value for which NIST has the highest confidence in its accuracy in that all known or suspected sources of bias have been investigated or taken into account [3]. The certified values for the PAHs, PCB congeners, and chlorinated pesticides are based on the agreement of results obtained from two or more chemically independent analytical techniques performed at NIST.

**Reference Concentration Values:** Reference values for concentrations, expressed as mass fractions, are provided for 38 additional PAHs, 16 nitro-PAHs, 49 additional PCB congeners (some in combination), and 34 chlorinated pesticides (includes 22 toxaphene congeners) in Tables 4, 5, 6, and 7, respectively. Table 8 contains a reference value for decabromodiphenyl ether. Reference values are provided in Table 9 for the 17, 2,3,7,8-substituted polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin and dibenzofuran congeners and total, tetra-, penta-, hexa-, and hepta-substituted congeners of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin and dibenzofuran. Reference values are noncertified values that are the best estimates of the true value; however, the values do not meet the NIST criteria for certification and are provided with associated uncertainties that may reflect only measurement precision, may not include all sources of uncertainty, or may reflect a lack of sufficient statistical agreement among multiple analytical methods [3].

**Information Concentration Values:** Information values for selected aliphatic hydrocarbons, hopanes, steranes, and ketones are provided in Table 10. Information values for particle-size characteristics are provided in Table 11. An information value is considered to be a value that will be of interest to the SRM user, but insufficient information is available to assess the uncertainty associated with the value or only a limited number of analyses were performed [3].

**Expiration of Certification:** The certification of SRM 1649b is valid, within the measurement uncertainties specified, until 31 July 2018, provided the SRM is handled in accordance with instructions given in this certificate (see "Instructions for Use"). This certification is nullified if the SRM is damaged, contaminated, or otherwise modified.

**Maintenance of SRM Certification:** NIST will monitor this SRM over the period of its certification. If substantive technical changes occur that affect the certification before the expiration of this certificate, NIST will notify the purchaser. Registration (see attached sheet) will facilitate this notification.

Coordination of the technical measurements leading to the updated certification was under the direction of M.M. Schantz, L.C. Sander, and S.A. Wise of the NIST Analytical Chemistry Division.

Stephen A. Wise, Chief  
Analytical Chemistry Division

Robert L. Watters Jr., Chief  
Measurement Services Division

Gaithersburg, MD 20899  
Certificate Issue Date: 23 February 2009

SRM 1649b

Page 1 of 14

Nota/Not

e: è possibile richiedere l'invio di tutto il certificato di analisi dello standard NIST/ is it possible to send all the analysis certificate of the NIST standard.

#### Sede legale e laboratorio analisi

Via Quarantadue Martiri 213/B  
28924 Verbania/VB  
Italia

Pho.+39 0323 586239/496041  
Fax +39 0323 496877  
info@abich.it

CF/VAT/Reg. Imp. VCO: 01864020035  
R.E.A.: 189901  
Cap. Soc. € 116.000,00 i.v.

#### Studi Clinici e Cosmetologici

Via Bruno Buozzi 4  
Via Burrona 51 - Edificio C  
20090 Vimodrone/MI  
Italia

[www.abich.it](http://www.abich.it)  
[www.abich.ca](http://www.abich.ca)



Analisi biologiche e chimiche

**Azienda Certificata**  
UNI EN ISO 9001:2008  
Certificato N. 501004992  
Centro di saggio BPL

REL/1388/2017/2016/CITO/  
ELB  
B94 Rev 00/17

## ALLEGATO B ALLA RELAZIONE / ENCLOSURE B TO THE REPORT 1388-17

### DATI GREZZI/RAW DATA

SUNRISE; Serial number: 03930004669; Firmware: V 3.17 13/06/02; XFLUOR4 Version: V 4.50

Date:	23/6/17											
Time:		11:55										
Measurement mode:	Absorbance											
Measurement wavelength:	570 nm											
Reference wavelength:	650 nm											
Read mode:	Normal											
Shake duration (Inside Normal):	60 s											
Dual wave data (difference)												
<>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,0070	0,0090	0,0100	0,0090	0,0080	0,0090	0,0070	0,0050	0,0050	0,0050	0,0070	0,0200
B	0,0040	0,4860	0,1180	0,1850	0,5070	0,4930	0,0750	0,0950	0,2660	0,2710	0,4770	0,0040
C	0,0050	0,5060	0,1290	0,2200	0,5110	0,4340	0,0950	0,1040	0,2460	0,2880	0,6480	0,0070
D	0,0020	0,5130	0,1260	0,2190	0,5690	0,5140	0,0950	0,1240	0,2980	0,2730	0,4810	0,0030
E	0,0070	0,5020	0,1400	0,2270	0,4920	0,5110	0,0690	0,0980	0,1840	0,1900	0,4950	0,0030
F	0,0170	0,5140	0,1530	0,2140	0,4780	0,5120	0,0760	0,0950	0,1660	0,1750	0,4510	0,0080
G	0,0420	0,5230	0,1170	0,2000	0,4910	0,5030	0,0680	0,0860	0,1680	0,1940	0,5150	0,0290
H	0,0060	0,0070	0,0130	0,0410	0,0500	0,0790	0,0070	0,0070	0,0050	0,0070	0,0080	0,0170

#### Sede legale e laboratorio analisi

Via Quarantadue Martiri 213/B Pho.+39 0323 586239/496041 CF/VAT/Reg. Imp. VCO: 01864020035  
28924 Verbania/VB Fax +39 0323 496877 R.E.A.: 189901  
Italia info@abich.it Cap. Soc. € 116.000,00 i.v.

#### Studi Clinici e Cosmetologici

Via Bruno Buozzi 4  
Via Burrona 51 - Edificio C  
20090 Vimodrone/MI  
Italia

[www.abich.it](http://www.abich.it)  
[www.abich.ca](http://www.abich.ca)