



ISPRA

Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale



ARPAT

Agenzia regionale
per la protezione ambientale
della Toscana

INSIEME PER UN FUTURO SOSTENIBILE

***“Applicazione di un metodo analitico
per la valutazione della frazione bioaccessibile
di arsenico in alcuni suoli di aree demaniali
nel SIN di Piombino”***

Marzo 2017



ISPRA

Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale



**Sistema Nazionale
per la Protezione
dell'Ambiente**



ARPAT

Agenzia regionale
per la protezione ambientale
della Toscana

INSIEME PER UN FUTURO SOSTENIBILE

Elaborato da:

Nicoletta Calace¹, Damiano Centioli¹, Eugenia Bartolucci¹, Stefania Gaudino¹, Patrizia Leone¹, Federico Araneo¹, Fabio Cadoni¹ Luca Spagli², Guido Spinelli², Carlo Cini², Elisa Di Alessandro², Franco Castellani Tarabini².

¹ISPRA Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale

²ARPAT – Agenzia regionale per la protezione ambientale della Toscana

Acronimi, Abbreviazioni e Simboli

As: Arsenico

CdS: Conferenza di Servizi

CQ: Campione per controllo qualità

CSC: Concentrazione Soglia di Contaminazione

CV%: coefficiente di variazione percentuale

HDPE: polietilene ad alta densità

ICP-MS: spettrometria di massa al plasma accoppiato induttivamente

MRC: Materiale di Riferimento Certificato

pc: piano campagna

PE: polietilene

R²: coefficiente di determinazione

RfD: Reference Dose (Dose di riferimento)

SBET: Simplified Bioaccessibility Extraction Test

SF: Slope Factor (Pendenza della curva dose-risposta)

SIN: Sito di Interesse Nazionale

Sommario

1	Introduzione e scopo dello studio.....	4
2	Stato dell'arte sulle metodologie analitiche per la determinazione della frazione bioaccessibile dell'arsenico nei suoli.....	5
3	Campionamento	5
4	Pretrattamento dei campioni.....	7
5	Estrazione della frazione bioaccessibile.....	8
5.1	estrazione ISPRA.....	8
5.2	estrazione ARPAT	9
5.3	seconda fase di approfondimento	9
6	Determinazione della frazione bioaccessibile dei metalli	9
6.1	Determinazione con ICP-MS presso ISPRA	9
6.2	Procedure di controllo di qualità delle misure adottate da ISPRA	10
6.3	Determinazione con ICP-MS presso ARPAT	10
6.4	Procedure di controllo di qualità delle misure adottate da ARPAT	10
6.5	Risultati analitici.....	11
7	Determinazione della frazione pseudo-totale dei metalli	13
7.1	determinazione presso ISPRA	13
7.2	determinazione presso ARPAT	13
7.3	risultati del contenuto totale	13
8	determinazione del contenuto totale con ED-XRF.....	14
9	Discussione dei risultati	16
10	Calcolo bioaccessibilità.....	19
11	Conclusioni.....	21
12	Limiti di applicazione.....	21
13	Bibliografia.....	23
	Allegato 1.....	24



ISPRA
Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale



ARPAT
Agenzia regionale
per la protezione ambientale
della Toscana

INSIEME PER UN FUTURO SOSTENIBILE

1 Introduzione e scopo dello studio

Le attività di caratterizzazione effettuate nel SIN di Piombino hanno evidenziato la presenza diffusa di superamenti delle CSC per alcuni metalli nei suoli e nelle acque sotterranee con particolare riferimento all'Arsenico.

La Conferenza di Servizi (CdS) istruttoria del 24 ottobre 2014, alla luce della diffusa presenza di superamenti delle CSC per l'Arsenico nei suoli e ai fini dell'elaborazione dell'AdR, ha incaricato ARPA Toscana (di seguito ARPAT) di definire, congiuntamente ad ISPRA e ISS, un protocollo tecnico per l'esecuzione di uno studio volto a valutare la bioaccessibilità dell'As per ingestione da parte degli organismi superiori.

In questo rapporto si descrivono le attività dello studio svolte da ISPRA e ARPAT.

La tossicità di una sostanza chimica ingerita dipende, in parte, dalla frazione che viene effettivamente assorbita dal tratto gastrointestinale nel corpo. Poiché i parametri di tossicità espressi come dose orale di riferimento (RfD) per le sostanze tossiche e come pendenza della curva dose-risposta per le sostanze cancerogene (SF) sono generalmente riferiti alla dose ingerita da matrici acquose, nel caso dei suoli e di matrici solide in generale risulta di importanza fondamentale la stima della biodisponibilità al fine di non sopravvalutare il rischio legato alle sostanze immesse nell'ambiente.

In effetti per biodisponibilità si intende la capacità di un contaminante di attraversare le membrane biologiche e quindi la valutazione della frazione di contaminante biodisponibile è determinabile esclusivamente con metodi "in vivo" ovvero basati sulla somministrazione di differenti dosi di contaminante al recettore (generalmente suini) e quindi sulla determinazione della frazione assorbita o per via diretta (concentrazione nel sangue) o calcolata come differenza tra la quantità somministrata e quella escreta. In pratica questi metodi sono difficilmente applicabili e molto costosi.

Negli ultimi tre decenni sono stati proposti in letteratura molti metodi alternativi per la valutazione della frazione "biodisponibile" basati su estrazioni chimiche, sia singole che a vari step (schemi di estrazione sequenziale), e su estrazioni basate sulla simulazione dei meccanismi estrattivi che intervengono nell'apparato gastrointestinale (metodi "in vitro"). I primi, in effetti, valutano la mobilità dei contaminati nell'ambiente, che può dipendere da variazioni dei parametri chimici e fisici; i secondi, pur essendo basati su alcuni degli effetti chimici presi in considerazione dalle estrazioni chimiche, sono strettamente legati alle caratteristiche fisiologiche dell'organismo recettore (nel caso specifico dell'uomo). Per entrambe le tipologie di metodi studiati, è però corretto parlare di bioaccessibilità ovvero della frazione di contaminante solubile o solubilizzabile in condizioni chimico-fisiche definite sulla base delle modalità di esposizione e delle caratteristiche del recettore. In effetti, il trasporto attivo (via di esposizione ingestione) dei contaminanti attraverso le membrane biologiche coinvolge generalmente la sola frazione di contaminante in grado di essere solubilizzata dal mezzo liquido con cui viene a contatto la matrice, ad esempio soluzioni digestive. Nonostante ciò, la frazione in grado di essere solubilizzata (bioaccessibile) può non essere necessariamente biodisponibile "in toto". Quindi la determinazione della frazione bioaccessibile potrebbe ancora determinare una sovrastima del rischio ma certamente meno significativa del contenuto pseudo-totale attualmente utilizzato in questi calcoli e basato su un'estrazione con miscela acida (*acqua regia*).



ISPRA
Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale



ARPAT
Agenzia regionale
per la protezione ambientale
della Toscana

INSIEME PER UN FUTURO SOSTENIBILE

2 Stato dell'arte sulle metodologie analitiche per la determinazione della frazione bioaccessibile dell'arsenico nei suoli

E' stata effettuata una ricerca bibliografica al fine di valutare, tra le differenti metodologie analitiche proposte per la determinazione della bioaccessibilità dell'arsenico, quale potesse risultare la più idonea ad applicazioni di tipo routinario.

Come già accennato nell'introduzione tra i vari metodi proposti in letteratura si trovano differenti schemi di estrazioni chimiche (Wenzel et al. 2001; Mossop et al. 2003; Pumure et al. 2010) e metodi di estrazione "in vitro" (Oomen et al., 2003; Juhasz et al, 2007; Poggio et al. 2009; Baig et al., 2009, Sialielli et al., 2010; Moreda-Pineiro et al., 2011; Denys et al, 2012; Bradham et al. 2015; Li et al., 2015).

Anche tenendo in considerazione i risultati ottenuti da una precedente sperimentazione condotta in collaborazione con l'Università di Genova (Ianni et al. 2014), il test "in vitro" (Simplified Bioaccessibility Extraction Test –SBET) è stato valutato il più idoneo per le necessità operative nell'ambito dei procedimenti di bonifica. Esso è basato sull'utilizzo di una soluzione gastrica costituita da glicina in ambiente acido, procedura tra l'altro già validata per la bioaccessibilità del piombo nei suoli (Guidance US EPA, 2007; metodo EPA 9200.2-86/2012).

Quindi, ai fini del presente studio, sulla base del metodo EPA per il piombo si è proceduto a redigere una procedura operativa per la determinazione della frazione bioaccessibile dell'As, riportata nell'allegato 1, basata sull'estrazione dell'arsenico dai suoli con una soluzione di glicina e acido cloridrico a pH 1,5. L'arsenico estratto in soluzione viene poi determinato con metodo di misura di spettrometria di massa al plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS).

3 Campionamento

L'area oggetto degli approfondimenti relativi alla determinazione della frazione bioaccessibile di As nei suoli è l'area Demaniale del SIN di Piombino.

Il campionamento è stato condotto da ARPAT il 19/03/2015.

Sono stati prelevati un totale di 20 campioni di cui:

5 campioni interessanti il litotipo sabbioso contrassegnati dal codice identificativo da AS01 a AS05 e prelevati lungo l'arenile in area demaniale, a profondità di 0-0,5 m da pc.

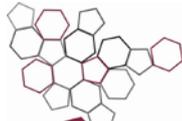
15 campioni del litotipo limo/argilla (da AS06 a AS20) prelevati a profondità di 0-0,5 m da pc, rappresentativi della porzione di area demaniale mostrata in Figura 1 ubicata nella piana alluvionale del fiume Cornia .

I campioni sono stati sottoposti a quartatura per essere suddivisi tra ARPAT e ISPRA e congelati fino al momento delle analisi.

Un'aliquota di ogni campione è stata recapitata al laboratorio ISPRA il 12/10/2015 congelata.



ISPRA
Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale



**Sistema Nazionale
per la Protezione
dell'Ambiente**



ARPAT
Agenzia regionale
per la protezione ambientale
della Toscana

INSIEME PER UN FUTURO SOSTENIBILE

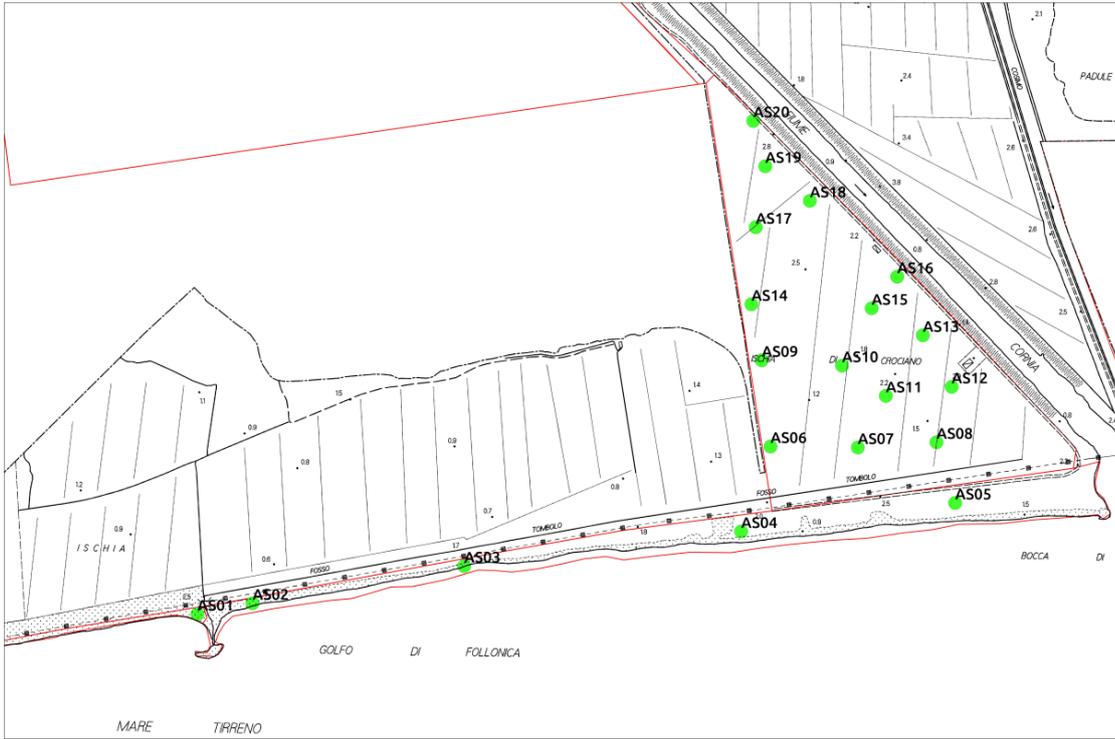


Figura 1. Ubicazione dei punti di indagine (Fonte ARPAT)

4 Pretrattamento dei campioni

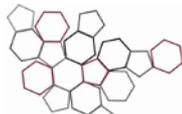
I campioni sono stati scongelati a temperatura ambiente e successivamente posti ad essiccare in stufa ventilata a 40°C. I campioni essiccati sono stati sottoposti a setacciatura per separare la frazione inferiore ai 2 mm di diametro. La tabella successiva mostra i risultati ottenuti espressi in percentuale per le diverse frazioni granulometriche.

Tabella 1. Risultati della setacciatura dei campioni ISPRA

ID campione in entrata da ARPAT		ID campione ISPRA		Frazione granulometrica ISPRA (%)		Frazione granulometrica ARPAT (%)	
Verbale di campionamento	Etichetta campione	Registro campioni	Campioni per analisi	> 2mm	< 2mm	> 2mm	< 2mm
AS1	1	1/2016	1 (PIO)	2,1	97,9	1,8	98,2
AS2	2	2/2016	2 (PIO)	2,7	97,3	2,2	97,8
AS3	3	3/2016	3 (PIO)	0,4	99,6	0,5	99,5
AS4	4	4/2016	4 (PIO)	0,9	99,1	0,4	99,6
AS5	5	5/2016	5 (PIO)	4,8	95,2	4,3	95,7
AS6	6	6/2016	6 (PIO)	0,8	99,2	1,0	99,0
AS7	7	7/2016	7 (PIO)	0,4	99,6	0,7	99,3
AS8	8	8/2016	8 (PIO)	0,7	99,3	1,3	98,7
AS9	9	9/2016	9 (PIO)	1,3	98,7	4,8	95,2
AS10	10	10/2016	10 (PIO)	0,0	100,0	0,0	100,0
AS11	11	11/2016	11 (PIO)	0,1	99,9	0,0	100,0
AS12	12	12/2016	12 (PIO)	0,0	100,0	2,5	97,5
AS13	13	13/2016	13 (PIO)	0,0	100,0	0,3	99,7
AS14	14	14/2016	14 (PIO)	0,1	99,9	4,5	95,5
AS15	15	15/2016	15 (PIO)	0,1	99,9	0,0	100,0
AS16	16	16/2016	16 (PIO)	0,1	99,9	1,0	99,0
AS17	17	17/2016	17 (PIO)	0,1	99,9	0,6	99,4
AS18	18	18/2016	18 (PIO)	0,7	99,3	1,0	99,0
AS19	19	19/2016	19 (PIO)	0,0	100,0	0,0	100,0
AS20	20	20/2016	20 (PIO)	0,0	100,0	0,0	100,0



ISPRA
Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale



**Sistema Nazionale
per la Protezione
dell'Ambiente**



ARPAT
Agenzia regionale
per la protezione ambientale
della Toscana

INSIEME PER UN FUTURO SOSTENIBILE

5 Estrazione della frazione bioaccessibile

5.1 estrazione ISPRA

L'estrazione è stata effettuata in accordo al protocollo condiviso e riportato in allegato. In particolare modo si è avuto cura di verificare il pH e la temperatura della soluzione estraente di glicina. La regolazione di pH è stata effettuata con aggiunta di HCl 37% suprapuro fino a pH=1,5 prima di portare a volume la soluzione.

I campioni sono stati preparati ponendo in appositi recipienti di HDPE circa 1 g di suolo e 100 ml di soluzione di glicina. Tutti i campioni sono stati posti ad agitare per 1 ora in apposito bagno termostato a 37°C. Successivamente i campioni sono stati filtrati con siringhe monouso in PE accoppiate a filtri monouso in acetato di cellulosa da 0,45 µm (Figura 2) e conservati in provette da centrifuga da 50 ml in frigorifero fino all'analisi con ICP-MS.



Figura 2. Filtrazione campioni

Ciascun batch di estrazione era costituito da 18-20 campioni di cui due bianchi di processo. In uno dei batch di estrazione sono stati inseriti anche due materiali di riferimento certificati di suolo/sedimento (LGC6139) e di suolo calcareo argilloso (ERMCC141).

I primi tre batch di estrazione effettuati nei giorni 2, 4 e 9 febbraio 2016 hanno permesso di ottenere due repliche indipendenti per tutti i campioni ed una terza replica indipendente solo per alcuni.

In base ai risultati ottenuti con l'analisi all'ICP-MS, si è reso necessario ripetere l'estrazione del 04/02 che, effettuata a valore di pH 1,3 ha restituito valori di concentrazione non riproducibili con le repliche condotte a pH 1,5. L'estrazione è stata ripetuta il 24 marzo 2016.

Infine il 1 aprile è stata effettuata l'estrazione della terza replica di tutti i restanti campioni.



ISPRA
Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale



ARPAT
Agenzia regionale
per la protezione ambientale
della Toscana

INSIEME PER UN FUTURO SOSTENIBILE

5.2 estrazione ARPAT

L'estrazione è stata effettuata in accordo al protocollo condiviso e riportato in allegato. Sono sempre stati verificati il pH e la temperatura della soluzione estraente di glicina. La regolazione di pH è stata effettuata con aggiunta di HCl 37% ultrapuro fino a $\text{pH}=1,5 \pm 0,05$ (pH finale = 1,54) prima di portare a volume la soluzione.

I campioni sono stati preparati ponendo in appositi recipienti di HDPE (contenitori con tappo a vite a tenuta) circa 1 g di suolo ($1 \pm 0,05$ g) e 100 ml di soluzione di glicina. Tutti i campioni sono stati posti ad agitare per 1 ora in un bagno predisposto appositamente termostato a 37°C ed agitato. Successivamente i campioni sono stati filtrati con siringhe monouso in PE accoppiate a filtri monouso in acetato di cellulosa da 0,45 μm e conservati in provette da centrifuga da 50 ml in frigorifero fino all'analisi con ICP-MS utilizzando un ICP-MS Thermo Scientific iCAP Qc (1).

Ciascun batch di estrazione era costituito da 9-10 campioni di cui un bianco (costituito esclusivamente dalla soluzione di glicina 0,4 M a pH 1.5) e una soluzione di arsenico in acqua Milli Q con concentrazione pari a 20 ppb ed un materiale di riferimento certificato (National Research Council Canada MESS-3).

I batch di estrazione effettuati nei giorni 4, 7, 9 e 10 dicembre 2015 hanno permesso di ottenere due repliche indipendenti per tutti i campioni.

5.3 seconda fase di approfondimento

Tra giugno e novembre 2016 sono state condotte delle attività integrative alla prima fase di analisi che sono consistite nella elaborazione e discussione tra i due laboratori ISPRA e ARPAT dei risultati ottenuti che hanno evidenziato un certo grado di variabilità per alcuni campioni. Pertanto per 9 campioni per i quali i risultati erano maggiormente discordanti si è deciso la ripetizione dell'estrazione e dell'analisi da parte di ARPAT ed ISPRA. ARPAT ha pertanto eseguito tali ripetizioni su 9 aliquote degli stessi campioni (4,6,7,9,11,12,14,17,20) diverse da quelle precedentemente analizzate, su una soluzione di arsenico in acqua Milli Q a 20 ppb e sullo stesso materiale di riferimento certificato (National Research Council Canada MESS-3). In tale fase si è proceduto alla estrazione di due repliche indipendenti di ognuna delle 10 aliquote ai fini della successiva determinazione analitica con ICP-MS. E' da rilevare che in questa fase è stato utilizzato un diverso lotto di sale di Glicina rispetto alla prima determinazione (AppliChem anziché Fluka) perché terminato, e che la regolazione di pH della soluzione estraente di glicina è stata effettuata con aggiunta di HCl 37% ultrapuro fino a $\text{pH}=1,5 \pm 0,05$ (pH finale = 1,53) prima di portare a volume la soluzione.

Al contempo per minimizzare il contributo di variabilità dovuto all'eterogeneità del campione, ISPRA ha ripetuto l'estrazione e l'analisi sulle stesse aliquote dei 9 campioni rianalizzate da ARPAT. In tale fase si è proceduto quindi alla estrazione di due repliche indipendenti di ognuna delle 9 aliquote ai fini della successiva determinazione analitica con ICP-MS.

6 Determinazione della frazione bioaccessibile dei metalli

6.1 Determinazione con ICP-MS presso ISPRA

La misura dei metalli nelle soluzioni provenienti dall'estrazione con glicina è stata effettuata in ISPRA mediante uno spettrometro di massa al plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS) della Agilent Technologies modello 7500 CE in dotazione al Servizio di Metrologia Ambientale.

L'ICP-MS è stato tarato con apposite soluzioni di taratura certificate ISO17025 e ISO34 su 5 valori di concentrazione in funzione del singolo analita.

Poiché la presenza di cloro nella matrice provoca un effetto di interferenza sulla determinazione dell'As con ICP-MS, si è provveduto a diluire tutti i campioni 1:2. Inoltre alcuni campioni sono stati diluiti e analizzati in doppio per valutare la ripetibilità dell'operazione di diluizione.

6.2 Procedure di controllo di qualità delle misure adottate da ISPRA

Come previsto dai protocolli analitici di misura sono stati osservati diversi controlli per assicurare la qualità dei risultati.

Di seguito vengono riportate le procedure utilizzate e le relative azioni di correzione nel caso in cui i parametri prefissati non fossero stati rispettati.

Tabella 2. Procedure di controllo di qualità dei risultati

Procedura	Criterio di accettabilità	Azione correttiva
Controllo del coefficiente di regressione della retta di taratura.	$R^2 > 0.999$	Nuova taratura
Utilizzo di soluzioni di controllo (CQ) analizzate ogni 15 campioni al max della sequenza.	CV% < 5 %	Controllo dei risultati dei MRC; nuova taratura.
Materiali di riferimento certificati	Recupero tra il 85 – 126 % a seconda dell'elemento	Indagare sulle ragioni e tenere conto dei risultati sul recupero nel calcolo dell'incertezza.

6.3 Determinazione con ICP-MS presso ARPAT

La misura dei metalli nelle soluzioni provenienti dall'estrazione con glicina è stata effettuata in ARPAT mediante uno spettrometro di massa al plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS) della Thermo Scientific modello iCAP Qc ICP-MS (1) in dotazione alla AVL - Chimica I.

L'ICP-MS è stato tarato con apposite soluzioni di taratura certificate su 5 valori di concentrazione in funzione del singolo analita.

I campioni sono stati analizzati tal quali.

Nota (1): si precisa che tutte le determinazioni analitiche sono state effettuate con l'utilizzo della tecnica ICP – MS con il metodo APHA standard methods for examination of water and waste water 22st ed 2012 3125 anziché con il metodo APHA standard methods for examination of water and waste water 22st ed 2012 3120 erroneamente riportato nei certificati di prova.

6.4 Procedure di controllo di qualità delle misure adottate da ARPAT

Come previsto dalla procedura di prova PP/C/AVL.002 "Determinazione di elementi mediante spettrometria di massa al plasma accoppiato induttivamente Metodo: "APHA standard methods for examination of water

and waste water 22st ed 2012 3125" sono stati effettuati diversi controlli per assicurare la qualità dei risultati.

Di seguito vengono riportate le procedure utilizzate e le relative azioni di correzione nel caso in cui i parametri prefissati non fossero stati rispettati.

Tabella 3. Procedure di controllo di qualità dei risultati

Procedura	Criterio di accettabilità	Azione correttiva
Controllo del coefficiente di regressione della retta di taratura.	$R^2 > 0.995$	Ripetere la curva di taratura
Utilizzo di soluzioni di controllo (CQ) analizzate ogni 15 campioni al max della sequenza.	Concentrazioni riscontrate ± 10 % del valore nominale	Controllo dei risultati dei MRC; nuova taratura.
Verifica della curva di taratura (ICV)	Concentrazioni riscontrate ± 10 % del valore nominale	Ripetere la curva di taratura
Verifica dell'effetto memoria su un bianco (ICB)	Concentrazioni misurate $< MDL$	Ripetere l'analisi del bianco ed eventualmente effettuare le operazioni di manutenzione programmata (PO LAB.99.003)
Verifica dei Low Level	Concentrazioni riscontrate ± 20 % del valore nominale	Ripetere la curva di taratura
Materiali di riferimento certificati	Recupero ± 20	Indagare sulle ragioni e tenere conto dei risultati sul recupero nel calcolo dell'incertezza.

6.5 Risultati analitici

Nella tabella seguente sono riportati tutti i risultati della determinazione del contenuto bioaccessibile ottenuti nei due laboratori ISPRA e ARPAT. Come si evince dai risultati, le estrazioni del 20/6/16 in ARPAT e del 4/2/16 e del 2/11/2016 in ISPRA mostrano risultati non congruenti con quelli delle altre estrazioni con concentrazioni dell'ordine della metà per ARPAT o doppia per ISPRA.

Si ritiene che l'incongruenza dei risultati ottenuti dalle due estrazioni del 4/2/16 e del 2/11/2016 effettuate dal laboratorio Ispra debba essere spiegata con il differente pH della soluzione di glicina estraente, che nei casi in esame era stato portato a valori sensibilmente più acidi. Tali risultati mostrano, perciò, una rispondenza del trend registrato con il comportamento teorico dei metalli confermando quanto riportato in letteratura circa l'elevata sensibilità del metodo alla variazione di pH.

Pertanto nelle successive valutazioni non verranno considerate le tre estrazioni indicate.

Si rileva inoltre la difficoltà di termostatazione a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ della soluzione estraente di glicina, se preparata come previsto dal metodo in matraccio tarato da 2 litri, vista la possibile indisponibilità di apparecchiature idonee a contenere tali volumi.

Tabella 4 risultati della frazione bioaccessibile dell'arsenico di tutte le estrazioni

ID campione N°	Estrazioni ARPAT				Estrazioni ISPRA											
	10/12/2015 rep1	10/12/2015 rep2	20/06/16 rep3 stessa aliquota rep1	20/06/16 rep4 aliquota nuova	02/02/2016 rep 1	02/02/2016 rep 2	04/02/2016 rep 1	04/02/2016 rep2	09/02/2016 rep1	09/02/2016 rep 2	24/03/2016 rep 1	24/03/2016 rep 2	01/04/2016	02/11/2016 rep1 stessa aliquota rep 4 ARPAT	02/11/2016 rep2 stessa aliquota rep 4 ARPAT	
1	14,34	12,11			20,60	21,56					21,15					
2	10,28	10,19			19,90	20,22							19,52			
3	8,11	7,84			18,36	18,09							19,44			
4	12,81	10,86	7,64	6,96	18,69	19,82			18,47					28,96	26,13	
5	15,98	14,25			21,37	20,43	36,99		22,81							
6	69,28	52,94	29,87	31,72	70,69	73,28							73,29	94,59	71,49	
7	47,06	46,90	23,96	23,40	50,40	53,80							53,06	61,21	64,46	
8	38,43	32,91			42,91	40,63	85,24		46,99							
9	28,70	27,11	24,21	21,93			86,10	86,60	41,21		51,36	49,13		43,67	46,62	
10	47,33	43,95						93,32	88,07	34,20		42,73	43,72			
11	55,95	53,56	26,05	31,06				111,90	128,90			51,10	49,64	50,30	69,80	63,43
12	42,75	42,07	21,01	26,47				96,89	108,20	35,49		41,35	43,40			
13	54,18	40,41						124,90	130,50			48,33	48,24	46,53	57,35	57,02
14	27,68	26,56	23,68	20,69						44,05	40,03			46,53	34,57	42,42
15	41,72	40,64								39,53	36,46			44,07		
16	43,27	38,32								41,30	44,87			49,36		
17	31,97	30,94	26,40	24,87						38,45	38,74			44,38	45,27	44,74
18	45,51	38,23								43,49	48,11			56,69		
19	50,45	50,20								50,64	44,87			48,59		
20	36,96	34,93	22,31	18,80						36,86	35,85	45,21			50,95	82,92
pH di glicina	1,54	1,54	1,53	1,53	1,54	1,54	1,32	1,32	1,52	1,52	1,52	1,52	1,54	1,33	1,33	

7 Determinazione della frazione pseudo-totale dei metalli

7.1 determinazione presso ISPRA

In considerazione delle finalità dello studio legate alla bonifica il contenuto pseudo - totale dei metalli (di seguito definito come contenuto totale) è stato condotto mediante dissoluzione in acqua regia (miscela di acido cloridrico e acido nitrico in rapporto 3:1). La dissoluzione è effettuata in forno a microonde e la soluzione ottenuta è analizzata mediante ICP-MS. La taratura della strumentazione e i controlli di qualità sono stati eseguiti come già riportato al precedente paragrafo 6.2.

7.2 determinazione presso ARPAT

Il contenuto “pseudo totale” di arsenico (vedi definizione al precedente punto 7.1) è stato determinato con il metodo EPA 3051A 2007 “MICROWAVE ASSISTED ACID DIGESTION OF SEDIMENTS, SLUDGES, SOILS, AND OILS” + APHA standard methods for examination of water and waste water 22st ed 2012:3125” che consiste nella mineralizzazione con miscela di HCl+HNO₃ in rapporto 3:1, in forno a microonde e successiva analisi con ICP-MS. La taratura della strumentazione e i controlli di qualità sono stati eseguiti come già riportato al precedente paragrafo 6.2.

7.3 risultati del contenuto totale

Nella tabella seguente sono riportati i risultati del contenuto totale dei metalli. Come si può notare i risultati ottenuti nei due laboratori sono comparabili tra loro in quanto lo scostamento per la maggior parte dei risultati è inferiore al 10% e solamente per il campione n. 8 si registra uno scostamento maggiore del 20%.

Come si può notare dalla tabella e dal grafico, il contenuto totale di As nelle sabbie (campioni da 1 a 5) è nettamente inferiore a quello dei campioni limosi.

Figura 3 contenuto in Arsenico (espresso in mg/kg) determinato mediante ICP-MS dai due laboratori e mediante ED-XRF e Arsenico lisciviato (media risultati Ispra).

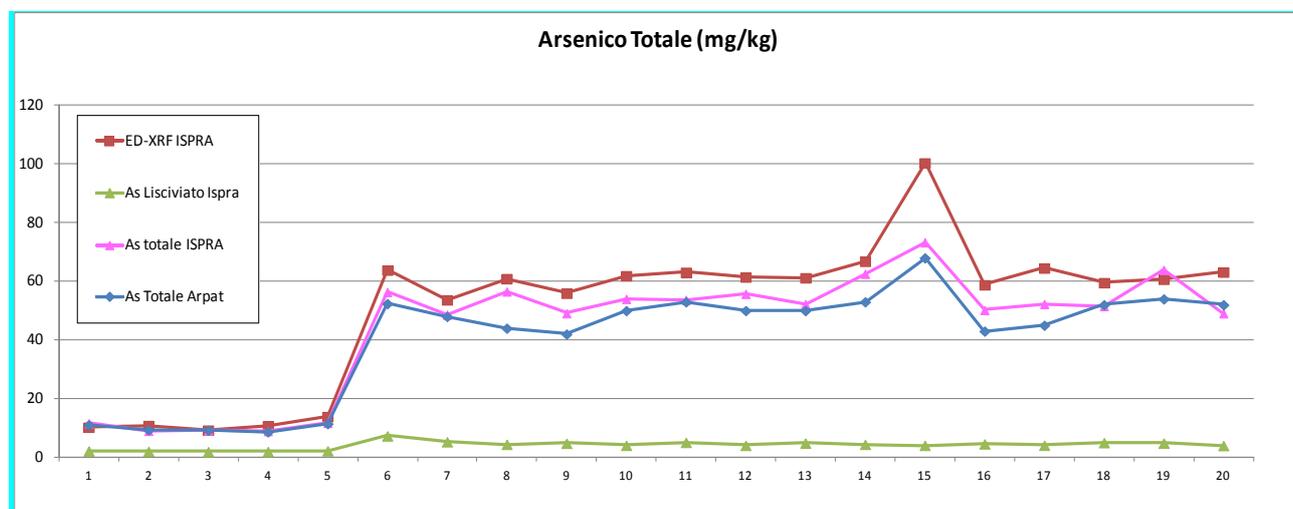


Tabella 5: contenuto totale di Arsenico (espresso in mg/kg) determinato mediante ICP-MS dai due laboratori e scostamento relativo

identificativo campione N°	As totale ARPAT	As totale ISPRA	Scostamento %
1	11,00	11,5	-4,7
2	9,30	9,0	3,7
3	9,20	9,1	0,8
4	8,60	8,9	-3,2
5	11,40	11,7	-2,7
6	52,40	56,4	-7,0
7	48,00	48,6	-1,3
8	44,00	56,5	-22,2
9	42,00	49,1	-14,5
10	50,00	54,0	-7,4
11	53,00	53,7	-1,3
12	50,00	55,7	-10,3
13	50,00	52,2	-4,3
14	53,00	62,6	-15,3
15	68,00	73,3	-7,3
16	43,00	50,2	-14,4
17	45,00	52,3	-13,9
18	52,00	51,6	0,9
19	54,00	63,9	-15,5
20	52,00	49,1	5,9

8 determinazione del contenuto totale con ED-XRF

Anche se non strettamente richiesto dalle finalità dello studio, si è proceduto alla determinazione del contenuto totale di metalli mediante l'utilizzo della spettrometria di fluorescenza a raggi X (ED-XRF). Essa non prevede il pretrattamento chimico del campione in quanto l'analisi ED-XRF viene effettuata sul campione tal quale. Tale analisi è in grado di determinare anche la frazione di metallo strettamente associata al reticolo cristallino non misurabile mediante l'applicazione dei metodi di dissoluzione. Ai fini dell'analisi i campioni setacciati a 2 mm sono stati ulteriormente macinati in mulino a sfere di agata per poter permettere la preparazione del campione sotto forma di pasticca pressata utilizzando 4 g di campione e 0,5 g di cera di supporto. Per le misure è stato utilizzato uno spettrometro di fluorescenza a raggi X a dispersione di energia della Rigaku modello NEX-CG, con modalità di misura sotto vuoto.

I risultati sono riportati nella tabella seguente e nel grafico precedente.

Come atteso, le determinazioni effettuate mediante EDXRF restituiscono quantità maggiori di Arsenico rispetto al contenuto totale determinato mediante l'utilizzo di acqua regia, con scostamento percentuale che su 15 campioni risulta compreso tra il 10 e il 30 %. I campioni n.1 e n. 19 costituiscono dati anomali in quanto presentano una sottostima con la tecnica ED-XRF.

Tabella 6 contenuto in Arsenico totale espresso in mg/kg determinato mediante ICP-MS e mediante ED-XRF e scostamento percentuale.

identificativo campione N°	As totale ISPRA	As totale ED-XRF	scostamento % As totale/ As ED-XRF
1	11,54	10,20	-11,7
2	8,97	10,77	20,0
3	9,13	9,19	0,6
4	8,88	10,67	20,2
5	11,71	13,83	18,1
6	56,36	63,83	13,3
7	48,63	53,67	10,3
8	56,53	60,90	7,7
9	49,13	55,93	13,9
10	54,02	61,90	14,6
11	53,69	63,07	17,5
12	55,75	61,47	10,3
13	52,23	61,20	17,2
14	62,59	66,83	6,8
15	73,32	100,40	36,9
16	50,24	58,80	17,0
17	52,27	64,53	23,5
18	51,55	59,53	15,5
19	63,92	60,70	-5,0
20	49,08	63,17	28,7

9 Discussione dei risultati

L'estrazione è stata effettuata in accordo al protocollo condiviso e riportato in allegato. In particolar modo si è avuto cura di verificare il pH e la temperatura della soluzione estraente di glicina. La regolazione di pH è stata effettuata con aggiunta di HCl 37% suprapuro. Il range di pH delle estrazioni varia da 1.32 a 1.54, e i risultati ottenuti (Figura 4 e Tabella 4) hanno evidenziato una forte dipendenza della concentrazione nel lisciviato in funzione del pH. Tenuto conto che il protocollo prevedeva un range di pH pari a 1.50 ± 0.05 e che il metodo è stato validato per il piombo in questo range di pH con i test in vivo, sono stati presi in considerazione solamente i risultati ottenuti utilizzando soluzioni estraenti con un pH compreso tra 1.50 a 1.54. Il pH della soluzione estraente è una variabile estremamente sensibile e pertanto la ripetibilità e la riproducibilità del metodo sono risultati pH dipendenti.

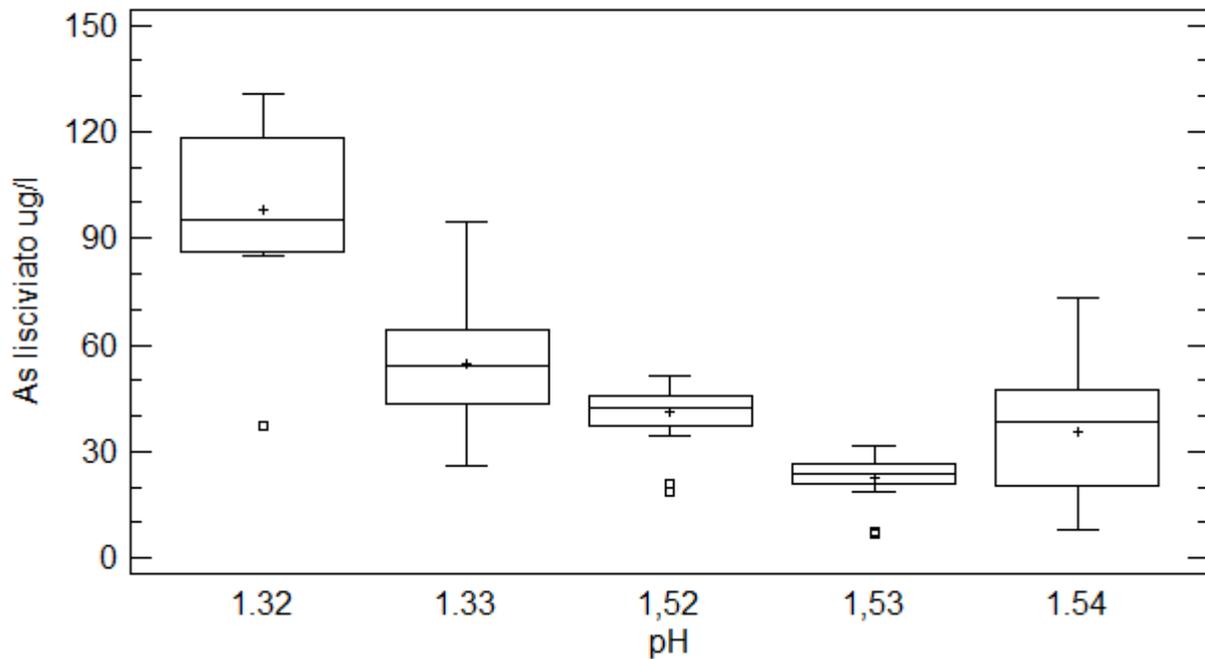


Figura 4 distribuzione delle repliche di lisciviato in funzione del pH della soluzione estraente

Tabella 7 Confronto dei risultati ottenuti da ARPA e ISPRA (estrazioni effettuate a pH 1.5 ± 0.05). I risultati sono espressi in $\mu\text{g/l}$. In rosso i valori superiori ai criteri di accettabilità

ID campione N°	Litotipo	Estrazioni ARPAT		Estrazioni ISPRA							media lisciviato ARPAT	media lisciviato ISPRA	ripetibilità ARPAT CV%	ripetibilità ISPRA CV%	riproducibilità tra laboratori CV%
		10/12/2015 replica 1	10/12/2015 replica 2	02/02/2016 replica 1	02/02/2016 replica 2	09/02/2016 replica 1	09/02/2016 replica 2	24/03/2016 replica 1	24/03/2016 replica 2	01/04/2016					
1	Sabbia	14,34	12,11	20,60	21,56			21,15			13,23	21,10	11,9	2,3	24,5
2	Sabbia	10,28	10,19	19,90	20,22					19,52	10,23	19,88	0,7	1,8	33,0
3	Sabbia	8,11	7,84	18,36	18,09					19,44	7,97	18,63	2,4	3,8	40,8
4	Sabbia	12,81	10,86	18,69	19,82	18,47					11,83	18,99	11,7	3,8	24,9
5	Sabbia	15,98	14,25	21,37	20,43	22,81					15,12	21,54	8,1	5,6	19,3
6	Limo/argilla	69,28	52,94	70,69	73,28					73,29	61,11	72,42	18,9	2,1	12,6
7	Limo/argilla	47,06	46,90	50,40	53,80					53,06	46,98	52,42	0,2	3,4	6,4
8	Limo/argilla	38,43	32,91	42,91	40,63	46,99					35,67	43,51	10,9	7,4	13,0
9	Limo/argilla	28,70	27,11			41,21		51,36	49,13		27,91	47,23	4,0	11,3	28,5
10	Limo/argilla	47,33	43,95			34,20		42,73	43,72		45,64	40,22	5,2	13,0	11,5
11	Limo/argilla	55,95	53,56					51,10	49,64	50,30	54,76	50,35	3,1	1,5	5,0
12	Limo/argilla	42,75	42,07			35,49		41,35	43,40		42,41	40,08	1,1	10,2	7,8
13	Limo/argilla	54,18	40,41					48,33	48,24	46,53	47,29	47,70	20,6	2,1	10,4
14	Limo/argilla	27,68	26,56			44,05	40,03			46,53	27,12	43,54	2,9	7,5	25,1
15	Limo/argilla	41,72	40,64			39,53	36,46			44,07	41,18	40,02	1,9	9,6	6,9
16	Limo/argilla	43,27	38,32			41,30	44,87			49,36	40,80	45,17	8,6	8,9	9,5
17	Limo/argilla	31,97	30,94			38,45	38,74			44,38	31,46	40,52	2,3	8,2	14,9
18	Limo/argilla	45,51	38,23			43,49	48,11			56,69	41,87	49,43	12,3	13,6	14,6
19	Limo/argilla	50,45	50,20			50,64	44,87			48,59	50,32	48,03	0,3	6,1	4,9
20	Limo/argilla	36,96	34,93			36,86	35,85	45,21			35,94	39,31	4,0	13,1	10,9

In **Tabella 7** sono riportati i risultati delle estrazioni ritenute idonee come precedentemente indicato al paragrafo 6.4. Inoltre sono riportati come caratteristiche di performance del metodo, i valori di ripetibilità intralaboratorio e di riproducibilità tra laboratori diversi, espressi come coefficiente di variazione percentuale di tutte le repliche. Come si può notare la ripetibilità intralaboratorio rispetta il criterio di accettabilità del 20% per tutti i campioni ad esclusione del campione n.13 di ARPAT che supera di poco tale criterio. In realtà il valore di ripetibilità di ISPRA essendo basato su più estrazioni in diverse giornate è assimilabile ad una ripetibilità intermedia.

Invece i valori di riproducibilità del metodo tra laboratori diversi mostrano evidenti criticità. In particolare per 4 dei 5 campioni sabbiosi la riproducibilità risulta ben superiore al criterio di accettabilità del 20%. Lo stesso problema si riscontra anche per due (campioni n. 9 e 14) dei quindici campioni limoso/argillosi che mostrano valori di riproducibilità superiori al 25%. Per tutti questi campioni la concentrazione di As lisciviato da ARPAT risulta inferiore di circa il 50% rispetto a quella ottenuta da ISPRA. La variabilità ottenuta per i campioni sabbiosi è in parte attribuibile ai valori di concentrazione di As totale e lisciviabile nettamente inferiore a quella dei campioni limosi. Per i due campioni limosi/argillosi n.9 e n.14 si deve evidenziare che i risultati ottenuti potrebbero essere dovuti all'eterogeneità delle aliquote dei campioni analizzate dai due laboratori; infatti tale eterogeneità è messa in evidenza anche dai risultati delle setacciature per le quali la frazione > 2 mm ottenuta da ARPAT è circa il 5% del totale mentre nelle aliquote analizzate da ISPRA tale frazione è nettamente inferiore (circa l'1%).

Tenuto conto che, come richiesto dai controlli di qualità della procedura analitica riportata in allegato, la ripetibilità interna al singolo laboratorio non supera mai il 20%, e che tale valore è rispettato anche per la riproducibilità della maggior parte dei campioni, si decide di considerare come criterio di qualità per la riproducibilità tra laboratori diversi il rispetto di tale soglia. Quindi tale criterio è stato aggiunto alla procedura in allegato.

Per le ragioni sopra esposte non verranno formulate valutazione della frazione bioaccessibile dell'arsenico nei campioni sabbiosi.

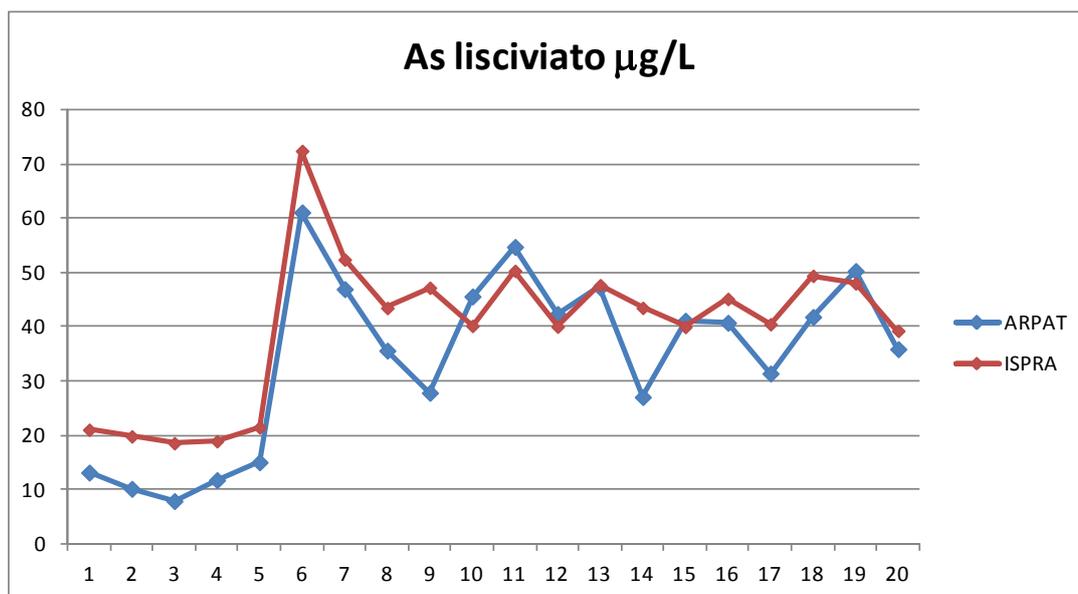


Figura 5 andamento delle concentrazioni medie di Arsenico lisciviato ottenuto dai due laboratori; i maggiori scostamenti in termini percentuali si registrano per i campioni da 1 a 5 (sabbie) e per i campioni 9 e 14 (limi/argille).

10 Calcolo bioaccessibilità

La bioaccessibilità (BAC) è calcolata ed espressa su base percentuale (BAC%) con la seguente equazione:

$$BAC\% = \frac{As_{ext} \times V_{ext}}{As_{tot} \times Suolo_{Massa}} \times 100$$

Dove:

As_{ext} la concentrazione di arsenico determinata nell'estratto (espressa in mg/L)

V_{ext} il volume di estraente (espressa in L; 0,1 L)

As_{tot} la concentrazione totale di arsenico determinata nel campione di suolo (espressa in mg/kg del campione setacciato a 2 mm)

$Suolo_{massa}$ la massa di suolo estratta (espressa in Kg; 0,001 kg)

Considerando che lo studio è finalizzato alla convalida del metodo per la determinazione della BAC%, si è proceduto a calcolare tale parametro per ogni laboratorio utilizzando sia i valori medi delle diverse repliche di As lisciviato, che il valore massimo ottenuto tra tutte le repliche. I valori di BAC% ottenuti con i due approcci sono riportati nella Tabella 8 unitamente ai valori di contenuto totale e di lisciviato utilizzati per il calcolo.

Dai dati mostrati in tabella si evince che le BAC% medie dei due laboratori variano tra 5,1 e 11,7% per ARPAT e tra 5,5 e 12,8% per ISPRA; le BAC massime tra 5,2 e 13,2 per ARPAT e tra 6,0 e 13,0% per ISPRA.

Analizzando lo scostamento percentuale tra le BAC determinate dai due laboratori si osserva che, sia per le BAC medie che per quelle massime, quattro campioni su quindici risultano con scostamenti non accettabili, cioè superiori al 20%. Si tratta dei campioni 9 e 14, la cui riproducibilità sul lisciviato aveva già mostrato valori maggiori del 20% (vedi Tabella 7) e dei campioni 10 e 19 nel caso delle BAC medie e dei campioni n. 18 e 20 in quello delle BAC massime.

Dal confronto tra i valori di BAC media con i valori di BAC massima per ogni singolo laboratorio si può dedurre che la differenza tra questi valori è tanto maggiore quanto peggiore è la ripetibilità interna del laboratorio sui lisciviati. Nel caso in esame nel passaggio da BAC media a BAC massima per ogni laboratorio risulta evidente solo un leggero aumento dei valori per alcuni campioni (ad es. campione 6 BAC ARPAT passa da 11,7 a 13,2 % e quella ISPRA da 12,8 a 13,0%) mentre per altri campioni il valore rimane inalterato.

Quindi considerando la sostanziale sovrapposibilità dei valori, confermata anche dall'analisi della varianza, si decide di optare per l'approccio che utilizza il valore medio delle repliche dei lisciviati ai fini del calcolo della BAC%.

Inoltre per il confronto tra i valori di BAC ottenuti da ARPAT e quelli ottenuti da ISPRA l'analisi della varianza non mostra differenze significative tuttavia per 4 campioni lo scostamento tra i valori ottenuti dai due laboratori supera il 20%.

Tabella 8: BAC % medie e massime determinate dai due laboratori e relativi scostamenti percentuali. In rosso i valori che superano lo scostamento del 20%

Campione	Litotipo	media lisciviato ARPAT (µg/l)	media lisciviato ISPRA (µg/l)	max lisciviato ARPAT (µg/l)	max lisciviato ISPRA (µg/l)	As totale ARPAT (mg/kg)	As totale ISPRA (mg/kg)	BAC % media ARPAT	BAC% media ISPRA	scostamento % delle BAC medie	BAC % max ARPAT	BAC % max ISPRA	scostamento % delle BAC max
1	Sabbia	13,2	21,1	14,3	21,6	11,0	11,5	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2	Sabbia	10,2	19,9	10,3	20,2	9,3	9,0	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3	Sabbia	8,0	18,6	8,1	19,4	9,2	9,1	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4	Sabbia	11,8	19,0	12,8	19,8	8,6	8,9	nd	nd	nd	nd	nd	nd
5	Sabbia	15,1	21,5	16,0	22,8	11,4	11,7	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6	Limo/argilla	61,1	72,4	69,3	73,3	52,4	56,4	11,7	12,8	9,2	13,2	13,0	-1,7
7	Limo/argilla	47,0	52,4	47,1	53,8	48,0	48,6	9,8	10,8	9,2	9,8	11,1	11,4
8	Limo/argilla	35,7	43,5	38,4	47,0	44,0	56,5	8,1	7,7	-5,3	8,7	8,3	-5,1
9	Limo/argilla	27,9	47,2	28,7	51,4	42,0	49,1	6,6	9,6	30,9	6,8	10,5	34,6
10	Limo/argilla	45,6	40,2	47,3	43,7	50,0	54,0	9,1	7,4	-22,6	9,5	8,1	-17,0
11	Limo/argilla	54,8	50,3	56,0	51,1	53,0	53,7	10,3	9,4	-10,2	10,6	9,5	-10,9
12	Limo/argilla	42,4	40,1	42,7	43,4	50,0	55,7	8,5	7,2	-18,0	8,5	7,8	-9,8
13	Limo/argilla	47,3	47,7	54,2	48,3	50,0	52,2	9,5	9,1	-3,6	10,8	9,3	-17,1
14	Limo/argilla	27,1	43,5	27,7	46,5	53,0	62,6	5,1	7,0	26,4	5,2	7,4	29,7
15	Limo/argilla	41,2	40,0	41,7	44,1	68,0	73,3	6,1	5,5	-10,9	6,1	6,0	-2,1
16	Limo/argilla	40,8	45,2	43,3	49,4	43,0	50,2	9,5	9,0	-5,5	10,1	9,8	-2,4
17	Limo/argilla	31,5	40,5	32,0	44,4	45,0	52,3	7,0	7,8	9,8	7,1	8,5	16,3
18	Limo/argilla	41,9	49,4	45,5	56,7	52,0	51,6	8,1	9,6	16,0	8,8	11,0	20,4
19	Limo/argilla	50,3	48,0	50,4	50,6	54,0	63,9	9,3	7,5	-24,0	9,3	7,9	-17,9
20	Limo/argilla	35,9	39,3	37,0	45,2	52,0	49,1	6,9	8,0	13,7	7,1	9,2	22,8

11 Conclusioni

I risultati ottenuti per la bioaccessibilità sono risultati fortemente dipendenti dal pH: infatti 2 delle 8 estrazioni realizzate dai laboratori sono state scartate per il mancato rispetto del range di pH richiesto.

I risultati sono dipendenti altresì dal litotipo analizzato e dalla concentrazione di Arsenico totale presente nel suolo.

Sulla base del criterio di accettabilità scelto (riproducibilità tra laboratori minore del 20%), il metodo è risultato non applicabile alla litologia delle sabbie prelevate nell'arenile.

Per quanto riguarda i campioni limo/argillosi, i risultati hanno mostrato concentrazioni della frazione bioaccessibile di Arsenico variabili tra 2,7 e 7,2 mg/kg e che corrispondono ad un intervallo di valori percentuali compresi tra il 5,1 e il 12,8%.

Alla luce dei risultati ottenuti e in considerazione del fatto che le prestazioni analitiche del metodo sono state confrontate da due laboratori solamente, si evidenzia la necessità di proseguire le attività secondo le procedure standard richieste in caso di validazione di un metodo analitico. A tal fine si ritiene necessario differenziare la tipologia di matrici da indagare sia per caratteristiche litologiche che per concentrazione di arsenico totale, avendo cura di coinvolgere un numero di laboratori dello SNPA statisticamente rilevante. Nello studio dovrebbero essere programmati differenti step di convalida mediante l'uso di appositi materiali di riferimento (attualmente non reperibili in commercio) che potrebbero essere prodotti da ISPRA, per mettere in evidenza e valutare sia la variabilità dovuta ad ogni singola fase (estrazione, fase analitica, contenuto totale) che per valutare correttamente il campo di applicazione e le altre caratteristiche di performance inclusa l'incertezza di misura.

A valle dello studio di convalida, la disponibilità di materiali di riferimento prodotti *ad hoc* permetterebbe l'implementazione del metodo anche da parte di altri laboratori non direttamente coinvolti nello studio.

Ciò detto si ritiene comunque che i risultati ottenuti da questo studio preliminare possano essere utilizzati ai fini della gestione del rischio per le aree industriali indagate.

12 Limiti di applicazione

Il metodo proposto consente di ottenere risultati "riproducibili" tra i due laboratori solo in presenza di campioni omogenei sia per litologia che per concentrazione di Arsenico totale.

Il metodo risulta fortemente dipendente dal pH. Ciò comporta i dovuti accorgimenti in fase di analisi.

Benché il presente metodo sia stato già validato con test in vivo per il Piombo ma non per l'arsenico (Guidance US EPA, 2007; metodo EPA 9200.2-86/2012), si rimanda alle autorità competenti in materia di salute un approfondimento sulla rappresentatività del range di pH utilizzato nel metodo per l'Arsenico con quello stomacale in fase digestiva.

Si deve infine evidenziare che il valore minimo quantificabile (o limite di quantificazione, LOQ) è stato determinato pari a 0,33 mg/kg. Tale limite di quantificazione rende il metodo di bioaccessibilità non applicabile a suoli aventi destinazione residenziale/verde pubblico con i parametri di esposizione sito-generici.

Qualora si intenda applicare tale metodo a livello nazionale nelle attività di caratterizzazione ai fini delle bonifiche, risulta necessario effettuare uno studio completo di convalida esteso a differenti tipologie di suoli e ad un numero di laboratori statisticamente rilevante, come precisato nel paragrafo precedente.



La complessità ed il costo del metodo che prevede molteplici determinazioni analitiche e la produzione di appositi materiali di riferimento, richiede il reperimento di risorse necessarie per l'applicazione dello studio nell'ambito del SNPA.

13 Bibliografia

Baig et al. Arsenic fractionation in sediments of different origins using BCR sequential and single extraction methods, *Journal of hazardous Materials* 167(2009) 745-751

Bradham et al. Independent Data Validation of an in Vitro Method for the Prediction of the Relative Bioavailability of Arsenic in Contaminated Soils, *Environ. Sci. Technol.* 49 (2015) 6312–6318

Denys et al., In Vivo Validation of the Unified BARGE Method to Assess the Bioaccessibility of Arsenic, Antimony, Cadmium, and Lead in Soils *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 6252–6260

Ianni et al. Bioaccessibility of metals in soils: comparison between chemical extractions and in vitro tests, *Chemistry and Ecology* 30 (2014) 541-554

Juhasz et al. Comparison of in vivo and in vitro methodologies for the assessment of arsenic bioavailability in contaminated soils, *Chemosphere* 69 (2007) 961–966

Li et al., Comparison of arsenic bioaccessibility in housedust and contaminated soils based on four in vitro assays, *Science of the Total Environment* 532 (2015) 803–811

Moreda-Pineiro et al. In-vivo and in-vitro testing to assess the bioaccessibility and the bioavailability of arsenic, selenium and mercury species in food samples, *Trends in Analytical Chemistry*, 30 (2011) 324-345

Mossop et al. Comparison of original and modified BCR sequential extraction procedures for the fractionation of copper, iron, lead, manganese and zinc in soils and sediments, *Analytica Chimica Acta* 478 (2003) 111–118

Poggio et al. Metals pollution and human bioaccessibility of topsoils in Grugliasco (Italy), *Environmental Pollution* 157 (2009) 680–689

Pumure et al. Ultrasonic extraction of arsenic and selenium from rocks associated with mountaintop removal/valley fills coal mining: Estimation of bioaccessible concentrations, *Chemosphere* 78 (2010) 1295–1300

Sialelli et al. Use of a physiologically based extraction test to estimate the human bioaccessibility of potentially toxic elements in urban soils from the city of Glasgow, UK, *Environ Geochem Health* 32 (2010) 517–527

Wenzel et al. Arsenic fractionation in soils using an improved sequential extraction procedure, *Analytica Chimica Acta* 436 (2001) 309–323

Allegato 1

Procedura operativa per la determinazione della bioaccessibilità dell'arsenico nei suoli contaminati

Scopo e applicazione

Lo scopo di questa procedura operativa è quello di definire la metodologia analitica adeguata per la determinazione della bioaccessibilità (test *in vitro*) dell'arsenico, utilizzando la procedura già validata per il piombo nel suolo (US EPA, 2007; metodo EPA 9200.2-86 (2012)).

Questo test *in vitro* per la determinazione della bioaccessibilità fornisce una rapida e relativamente poco costosa alternativa ai test *in vivo* utilizzati per la determinazione della biodisponibilità relativa (RBA) ovvero la frazione di contaminante, rispetto alla dose ingerita, in grado di attraversare l'epitelio gastrointestinale e di raggiungere i tessuti e gli organi bersaglio interni.

Il test si basa su un'estrazione del suolo con una soluzione estraente in grado di simulare il fluido gastrico. Essa estrae solubilizzandola una quantità di analita che è direttamente correlabile alla quantità effettivamente biodisponibile e determinabile con i test *in vivo*.

Apparecchiature

Per effettuare l'estrazione della frazione bioaccessibile è necessario dotarsi di:

contenitori da 125 ml a bocca larga in polietilene ad alta densità (HDPE) completi di tappo

un sistema costituito da un agitatore rotante ed un bagno termostatico in grado di mantenere una temperatura di 37 ± 2 °C; il sistema deve permettere l'agitazione delle bottiglie immerse nel liquido a 37°C.

un elettrodo di pH dotato del compensatore automatico per la temperatura

siringa in vetro (tipo Luer-Lok) con filtri 0,45 µm in acetato di cellulosa (usa e getta direttamente utilizzabili con le siringhe LUER-LOK)

vetreria varia: la vetreria e le attrezzature utilizzate per l'estrazione e per la preparazione dei reagenti devono essere adeguatamente puliti prima dell'uso, ovvero lavati con acido e risciacquati almeno tre volte con acqua deionizzata

bilancia analitica con risoluzione di almeno 0,0001 g;

uno spettrometro di massa al plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS)

Reagenti

Il reagente di estrazione è una soluzione 0,4 M di glicina (glicina in acqua deionizzata), regolata a $\text{pH } 1.50 \pm 0,05$ a 37°C utilizzando acido cloridrico (HCl) concentrato ultra puro.

3.1 Glicina 0,4 M: inserire 1,9 L di acqua deionizzata (conducibilità elettrica $< 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$) in un matraccio tarato (Classe A) da 2 litri. Aggiungere 60,06 grammi di glicina ultra pura pesati mediante una bilancia analitica e registrare il peso con una precisione pari a 0,0001 grammi. Porre il matraccio contenente la soluzione in un bagno termostato a 37 ± 2

Ce scaldare

Tarare il pH-metro a 37 ± 2 °C con soluzioni di taratura mantenute alla stessa temperatura e misurare il pH della soluzione di glicina, aggiungendo acido cloridrico concentrato (37%) ultrapuro fino a che il pH si mantenga costante a $\text{pH } 1.50 \pm 0.05$. Quindi portare la soluzione ad un volume finale di 2 L (0,4 M glicina).

Tutti i reattivi devono essere privi di arsenico e la soluzione di estrazione finale deve essere misurata per essere certi che la concentrazione di arsenico risulti inferiore almeno a $1,5 \mu\text{g/L}$ ovvero pari ad almeno $\frac{1}{4}$ del limite di quantificazione ($5 \mu\text{g/L}$). Qualora la soluzione estraente venga preparata in anticipo, sarà necessario riscaldarla a $37 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e regolarne il pH a 1.50 ± 0.05 con acido cloridrico concentrato (37%) ultrapuro prima dell'uso.

Procedura analitica

I campioni di suolo devono essere seccati ad una temperatura $<40^\circ\text{C}$ e setacciati a 2mm.

Accendere il bagno termostato.

Pesare $1,00 \pm 0,05$ g di suolo setacciato nei contenitori da 125 ml e registrare il peso con risoluzione pari a 0,0001 g.

Prelevare con cilindro graduato $100 \pm 0,5$ mL della soluzione estraente mantenuta a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ e trasferirli nel contenitore in cui è stato pesato il suolo.

Misurare e registrare il pH della miscela prima di iniziare l'estrazione.

Chiudere ermeticamente i contenitori e agitarli per essere sicuri che non perdano.

Sistemare i contenitori nell'agitatore e registrare l'orario di inizio.

I campioni andranno agitati a 30 ± 2 rpm per 1 ora.

Al termine andranno prelevati i contenitori e sistemati sul bancone al fine di lasciar depositare il solido; misurare il pH della miscela surnatante e confrontarlo con quello iniziale. Se la variazione supera le 0,5 unità di pH, l'estrazione del campione andrà ripetuta. Nel caso in cui anche la seconda estrazione dovesse superare le 0,5 unità di pH tra inizio e fine estrazione, la procedura dovrà prevedere un aggiustamento manuale del pH fermando l'agitazione a 5, 10, 15, and 30 minuti e aggiustando il pH mediante aggiunte goccia a goccia di HCl ultrapuro fino ad un pH di $1,50 \pm 0,05$.

Dopo aver verificato il pH, andranno quindi prelevati 15 ml di surnatante mediante siringa dotata di filtro da $0,45 \mu\text{m}$ in acetato di cellulosa che andranno trasferiti in appositi contenitori pronti per l'analisi strumentale.

ATTENZIONE: La durata totale della procedura di estrazione e filtrazione non dovrà eccedere i 90 min a campione.

Le aliquote filtrate potranno essere conservate in frigorifero ad una temperatura pari a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ fino a 30 giorni prima della determinazione strumentale che dovrà prevedere l'utilizzo di un ICP-MS.

Controllo di qualità

Al fine di assicurare la accuratezza della procedura di misura è necessario implementare i seguenti controlli di qualità per ogni batch di campioni che viene estratto simultaneamente.

Controllo bianco reagente – analizzare la concentrazione di arsenico nel reagente (soluzione estraente) ogni volta che viene preparata; la concentrazione di As deve risultare inferiore almeno a $1,5 \mu\text{g/L}$ ovvero pari ad almeno $\frac{1}{4}$ del limite di quantificazione ($5 \mu\text{g/L}$).

Controllo bianco di processo – analizzare un campione che abbia subito tutto il processo di estrazione in assenza del suolo con una frequenza di almeno 1 bianco del metodo ogni 10 campioni;

qualora il valore del bianco di processo sia superiore a 1,5 µg/L nella valutazione dei risultati se ne dovrà tenere conto.

Controllo recupero soluzione estraente – analizzare la soluzione reagente in cui è stato aggiunto arsenico in concentrazione pari a 20 µg/L; il recupero deve risultare compreso tra 80-120%;

Analisi in duplicato – analizzare tutti i campioni in duplicato applicando tutta la procedura estrattiva. Le repliche vanno trattate esattamente come un campione e la differenza relativa percentuale deve essere < 20%.

Qualora i laboratori coinvolti devono rientrare in un ottenuto sulle repliche dei diversi laboratori deve essere inferiore al 20%

Materiale di riferimento – analizzare un materiale di riferimento ogni 10 campioni per tenere sotto controllo il metodo; poiché non sono disponibili materiali di riferimento certificati per l'estrazione di arsenico con glicina, si deve verificare che il coefficiente di variazione ottenuto sulle diverse repliche del materiale di riferimento sia inferiore al 10%

Per ogni carrello di estrazione deve essere utilizzato almeno un campione di controllo tra quelli elencati.

Qualora aliquote degli stessi campioni vengano sottoposte ad analisi in laboratori differenti, ai fini del controllo di qualità, la riproducibilità dei risultati, espressa come coefficiente di variazione percentuale, deve risultare inferiore al 20%.

Analisi dei dati e calcoli

Per ogni campione setacciato a 2 mm dovrà essere determinato con la stessa tecnica analitica strumentale (ICP-MS) anche il contenuto totale dell'arsenico (pseudo-totale in acqua regia). (anche in questo caso si dovranno adottare gli idonei controlli di qualità quali analisi dei bianchi reagenti e dei materiali di riferimento certificati).

La bioaccessibilità (BAC) è calcolata ed espressa su base percentuale (BAC%):

Dove:

As_{ext} la concentrazione di arsenico determinata nell'estratto (espressa in mg/L)

V_{ext} il volume di estraente (espressa in L; 0,1 L)

As_{tot} la concentrazione totale di arsenico determinata nel campione di suolo (espressa in mg/kg del campione setacciato a 2 mm)

$Suolo_{massa}$ la massa di suolo estratta (espressa in Kg; 0,001 kg)

ATTENZIONE: Il rapporto di estrazione solido:liquido è pari a 1:100 ovvero 1 g con 100 ml.

La bioaccessibilità espressa in percentuale (BCA%) è direttamente correlabile al contenuto totale nel suolo ricalcolato sullo scheletro così come richiesto dalla normativa vigente.