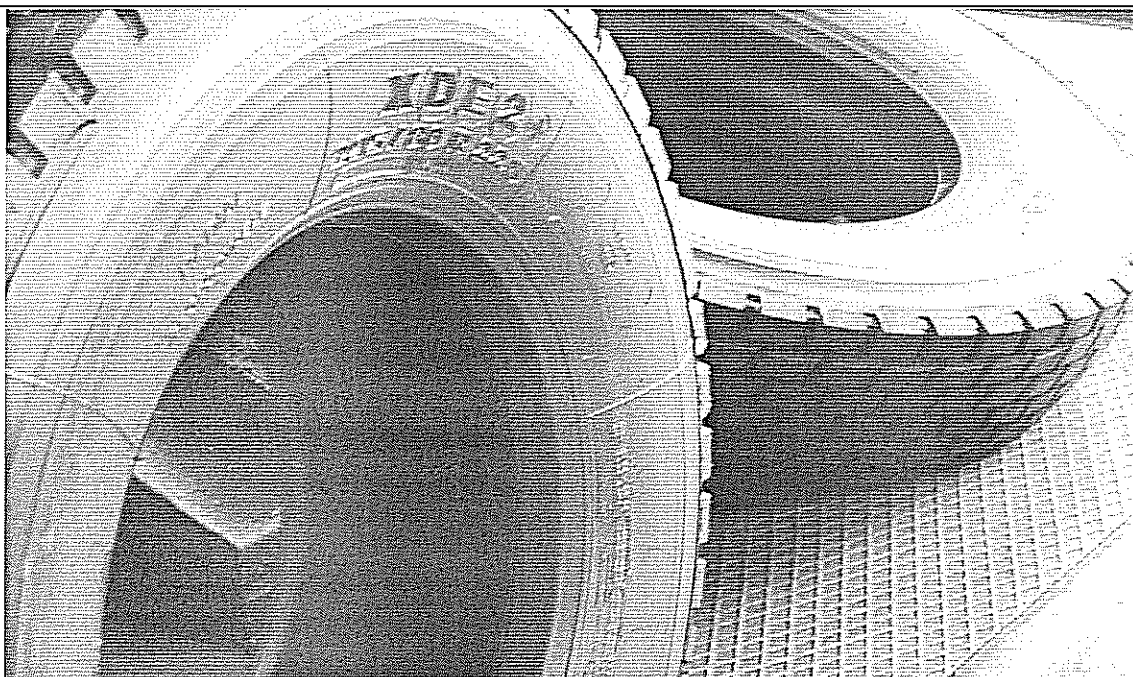
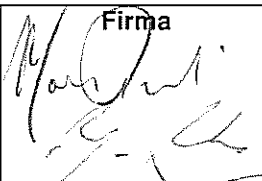
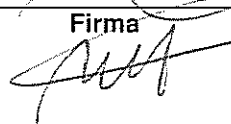



**Struttura Complessa Rischio Industriale ed Energia**  
**Struttura Semplice Rischio Industriale ed Igiene Industriale**

**"STUDIO COMPARATIVO PER LA CARATTERIZZAZIONE DEL CONTENUTO DI IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI NEI PNEUMATICI"**

*Responsabile scientifico dott. Paolo Izzo Centro Nazionale Sostanze Chimiche Istituto Superiore di Sanità*  
**Relazione intermedia**



Redazione	Funzione :Tecnico della S.S. 03.07	Data:	Firma
	Nome: Maria RADESCHI	29.01.2013	
	Nome: Roberto RIGGIO	29.01.2013	
Redazione e Approvazione	Funzione: Responsabile S.S. 03.07	Data:	Firma
	Nome: Marco FONTANA	29.01.2013	
Per Presa Visione	Funzione: Responsabile S.C. 03	Data:	Firma:
	Nome: Claudio TROVA	29.01.2013	



## Premessa

Il regolamento europeo 1907/2006, attraverso lo strumento dell'Allegato XVII, ha previsto la riduzione del contenuto di idrocarburi policiclici aromatici (IPA) negli oli diluenti per la produzione dei pneumatici, tale riduzione è entrata in vigore il 01/01/2010.

Il regolamento stesso individua alcune tecniche analitiche per la misura del contenuto di IPA negli oli diluenti utilizzati per produrre gli pneumatici ma non dà indicazioni sul quantitativo presente e/o permesso di IPA nel prodotto finito.

L'agenzia ECHA ha scelto gli pneumatici tra i prodotti su cui intensificare l'attività di vigilanza pertanto viene richiesto di aumentare l'attenzione su questi prodotti.

L'Allegato XVII indica tra l'altro quanto segue:

- Dal 1° gennaio 2010, non possono essere immessi sul mercato e utilizzati per la produzione di pneumatici gli oli diluenti aventi un contenuto di Benzo (a) pirene superiore a 1mg/Kg o un contenuto complessivo degli otto IPA cancerogeni di cui alla tabella 1, superiore a 10mg/Kg
- Si ritiene che tali limiti siano rispettati se l'estratto di IPA (PCA) è inferiore al 3% per massa, secondo la norma dell'Institute of Petroleum IP 346:1998, purché il rispetto dei valori limite di B(a)P e degli elencati IPA, nonché la correlazione dei valori misurati con l'estratto PCA, siano controllati dal fabbricante o dall'importatore ogni sei mesi o dopo ogni cambio operativo di rilievo, optando per il più prossimo.
- Non possono essere immessi sul mercato pneumatici e battistrada destinati alla rigenerazione, fabbricati dopo il 1° gennaio 2010 che contengono oli diluenti in quantitativi superiori ai limiti fissati nel paragrafo 1.
- Tali limiti sono da considerarsi rispettati se i composti di gomma vulcanizzata non superano il limite dello 0,35% di HBay come misurato e calcolato con il metodo ISO 21461 "*Determinazione dell'aromaticità dell'olio nelle mescole di gomma vulcanizzata*" - in NMR (Nuclear Magnetic Resonance).

Gli IPA ricercati sono quelli di cui alla voce n. 50 dell'allegato XVII del già citato regolamento. Le loro classificazioni, secondo il Regolamento (CE) n. 1272/2008 "classificazione, etichettatura e imballaggio delle sostanze e delle miscele" (CLP), secondo la direttiva 67/548/CEE, nonché secondo l'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) e l'ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists) sono indicate in tabella 1.

## Attività svolta

L'obiettivo del progetto promosso dal Ministero della Salute con l'Istituto Superiore di Sanità di cui ARPA Piemonte è collaboratore tecnico nella realizzazione dell'attività progettuale è quello di verificare la confrontabilità dei dati ottenuti con il Metodo ufficiale ISO 21461 ("*Determinazione dell'aromaticità dell'olio nelle mescole di gomma vulcanizzata*" in NMR - Nuclear Magnetic Resonance), che permette la determinazione dell'aromaticità dell'olio nelle mescole di gomma vulcanizzata con i dati ottenuti con i metodi in GC/MS (GasCromatografia/Spettrometria di Massa) e HPLC/FLUO-UV (Cromatografia liquida ad alte prestazioni con rivelatore fluorimetrico e UV-VIS). Questi ultimi due metodi permettono la separazione, l'identificazione e la quantificazione dei singoli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA). L'intento del progetto è quello di acquisire campioni di oli diluenti per la produzione degli pneumatici nonché gli pneumatici prodotti con gli stessi oli per correlare, dopo le analisi come sopra indicate, il contenuto di IPA nell'olio diluente ed il contenuto di IPA negli pneumatici. Poiché l'analisi in NMR non permette di discriminare effettivamente il reale contenuto negli pneumatici di IPA cancerogeni ed in particolare quello del benzo(a)pirene, (per i quali

sono previsti limiti specifici per gli oli diluenti utilizzati nella produzione degli pneumatici) si è reso necessario individuare e standardizzare delle metodiche di analisi al fine di definire il reale contenuto di IPA. Questo percorso permetterebbe di individuare il contenuto di IPA di un pneumatico correttamente fabbricato, e successivamente effettuare la vigilanza sugli pneumatici presenti in commercio senza obbligo di conoscere la tipologia di olio diluente utilizzato per produrre quello specifico prodotto commerciale.

I metodi individuati per lo studio di confrontabilità con la ISO 21461 sono:

- Metodo ISTISAN ISSN 1123-3117 (pubblicato nel Rapporto Istisan 10/8) per la ricerca degli IPA in materiale elastomerico impiegato nei campi da gioco in erba sintetica (determinazione in GC/MS). Il metodo è stato utilizzato come riferimento per la fase sperimentale e di approccio al progetto ed è stato parzialmente modificato per raggiungere le migliori prestazioni e le migliori performance, in funzione della matrice trattata e verrà di seguito sinteticamente definito metodo ISTISAN.
- Metodo “Determinazione di IPA negli oli alimentari” per la ricerca degli IPA negli oli alimentari e negli oli industriali sia minerali che aromatici (determinazione in GC/MS).

Il metodo Interno ARPA Piemonte per la ricerca degli IPA aerodispersi sia in forma vapore, sia adsorbiti su particolato in ambiente di lavoro (determinazione in HPLC/FLUO-UV) è, ai fini della sperimentazione sugli pneumatici, ancora allo studio e perciò non è stato utilizzato in questa prima fase del progetto.

Le attività di campionamento di oli aromatici e di pneumatici sono state coordinate dall'Istituto Superiore di Sanità e condotte in collaborazione con il Centro Nazionale Sostanze Chimiche a seguito di accordi di partecipazione al progetto con alcuni fabbricanti di pneumatici che gestiscono stabilimenti produttivi nel territorio nazionale.

I criteri utilizzati per la attività di campionamento sono i seguenti :

- organizzazione di una riunione con la direzione dello stabilimento interessato per la comunicazione delle finalità dello studio e delle caratteristiche dei campioni da prelevare;
- prelievo di alcuni campioni di oli aromatici e di pneumatici, secondo un principio di corrispondenza tra materia prima e prodotto finito ; sono necessarie due precisazioni : 1) la corrispondenza tra olio e prodotto finito non è lineare in quanto ad ogni pneumatico possono corrispondere, secondo quanto dichiarato dai produttori stessi, diverse mescole e pertanto diversi oli aromatici ; 2) il campionamento di pneumatici ha riguardato in questa fase unicamente la frazione “battistrada”, con aliquote di prodotto già preparate a tal fine dall’azienda stessa;
- acquisizione delle schede di sicurezza degli oli aromatici e di dati su analisi di controllo condotte dalle aziende sui campioni prelevati.

Sono attualmente in corso ulteriori campagne di prelievo di campioni di materie prime e prodotti finiti presso altri produttori nazionali di pneumatici, al fine di raccogliere altri dati utili allo studio e per ottenere un numero più significativo di risultati analitici per il raffronto dei diversi metodi strumentali.

IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI		CLASSIFICAZIONE CANCEROGENICITA'		CLASSIFICAZIONE (Directive 67/548/CEE, Allegato I)	CLASSIFICAZIONE REGOLAMENTO CE N. 1272/2008	
		IARC	ACGIH	CLASSE DI PERICOLOSITA' E FRASI DI RISCHIO	CLASSE E CATEGORIA DI PERICOLO	INDICAZIONE DI PERICOLO
benzo[a]pirene	50-32-8	1	A2 (L)	Carc. Cat. 2; R45 - Muta. Cat. 2; R46 - Repr. Cat. 2; R60-61 - R43 - N; R50-53	Carc. 1B	H350:Può provocare il cancro.
					Muta. 1B	H340:Può provocare alterazioni genetiche.
					Repr. 1B	H360FD:Può nuocere alla fertilità. Può nuocere al feto.
					Skin Sens. 1	H317:Può provocare una reazione allergica cutanea.
					Aquatic Acute 1	H400: Molto tossico per gli organismi acquatici
					Aquatic Chronic 1	H410: Molto tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.
benzo(e)pirene	192-97-2	3		Carc. Cat. 2; R45 N; R50-53	Carc. 1B	H350:Può provocare il cancro.
					Aquatic Acute 1	H400: Molto tossico per gli organismi acquatici
					Aquatic Chronic 1	H410: Molto tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.
benz[a]antracene	56-55-3	2A	A2 (L)	Carc. Cat. 2; R45 N; R50-53	Carc. 1B	H350:Può provocare il cancro.
					Aquatic Acute 1	H400: Molto tossico per gli organismi acquatici
					Aquatic Chronic 1	H410: Molto tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.
crisene	218-01-9	2B	A3 (L)	Carc. Cat. 2; R45 - Muta. Cat. 3; R68 N; R50-53	Carc. 1B	H350:Può provocare il cancro.
					Muta. 2	H341: Sospettato di provocare alterazioni genetiche.
					Aquatic Acute 1	H400: Molto tossico per gli organismi acquatici
					Aquatic Chronic 1	H410: Molto tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.
benzo(b)fluorantene	205-99-2	2B	A2 (L)	Carc. Cat. 2; R45 N; R50-53	Carc. 1B	H350:Può provocare il cancro.
					Aquatic Acute 1	H400: Molto tossico per gli organismi acquatici
					Aquatic Chronic 1	H410: Molto tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.
benzo(j)fluorantene	205-82-3	2B		Carc. Cat. 2; R45 N; R50-53	Carc. 1B	H350:Può provocare il cancro.
					Aquatic Acute 1	H400: Molto tossico per gli organismi acquatici
					Aquatic Chronic 1	H410: Molto tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.
benzo[k]fluorantene	207-08-9	2B		Carc. Cat. 2; R45 N; R50-53	Carc. 1B	H350:Può provocare il cancro.
					Aquatic Acute 1	H400: Molto tossico per gli organismi acquatici
					Aquatic Chronic 1	H410: Molto tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.
dibenz[a,h]antracene	53-70-3	2A		Carc. Cat. 2; R45 N; R50-53	Carc. 1B	H350:Può provocare il cancro.
					Aquatic Acute 1	H400: Molto tossico per gli organismi acquatici
					Aquatic Chronic 1	H410: Molto tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.

Tabella 1

Questa prima fase di sperimentazione ha riguardato cinque campioni di battistrada e quattro campioni di oli diluenti prelevati presso due diverse aziende che producono pneumatici, che per comodità verranno di seguito denominate come ditta A e ditta B.

Nella tabella 2 vengono identificati secondo la loro provenienza:

DITTA A	DITTA B
BATTISTRADA 1	BATTISTRADA 4
BATTISTRADA 2	BATTISTRADA 5
BATTISTRADA 3	OLIO 3
OLIO 1	OLIO 4
OLIO 2	

Tabella 2

Al fine di standardizzare al meglio la procedura finale di confronto con il metodo in NMR, tutti i campioni battistrada sono stati analizzati in GC/MS, con il metodo strumentale più avanti riportato. Gli stessi sono stati preventivamente sottoposti a:

- diverse tipologie di estrazione (es: ultrasuoni, Soxhlet);
- diversi solventi selettivi per l'estrazione degli IPA (es: diclorometano, toluene, esano, cicloesano);
- diverse modalità di purificazione (es: Gel Permeation Chromatography-GPC, Gel di Silice).

Nel capitolo sulla descrizione delle procedure per l'estrazione e la purificazione dei campioni di battistrada, verrà riportata soltanto la procedura del metodo ISTISAN in quanto è quella che ha restituito il migliore recupero di IPA dai campioni di battistrada.

I campioni Battistrada 1 della Ditta A e i battistrada 4 e 5 della ditta B, nonché gli oli 1 e 2 della ditta A e gli oli 3 e 4 della ditta B, sono stati anche analizzati secondo il metodo UNI ISO 21461 "Determinazione dell'aromaticità dell'olio nelle mescole di gomma vulcanizzata", basato sulla spettrometria di risonanza magnetica nucleare, per la determinazione della percentuale degli idrogeni (%HBay).

In questa prima fase del progetto, la preparazione, l'estrazione e la purificazione dei tre campioni di battistrada è stata realizzata da ARPA Piemonte – Laboratorio di Igiene Industriale mentre l'analisi, mediante la tecnica dell'NMR, dai laboratori dell'Università di Torino – Scienze M.F.N., Istituto di Chimica .

Inoltre un' aliquota dell'estratto di ciascuno dei tre campioni di battistrada, ottenuta seguendo il metodo ISO 21461, è stata analizzata anche in GC/MS. Lo scopo della sperimentazione, su questo primo limitato gruppo di campioni, è quello di confrontare i risultati del Benzo(a)pirene e della sommatoria degli IPA (di cui alla voce n. 50 dell'allegato XVII regolamento 1907/2006) ottenuti con il metodo di estrazione e purificazione ISO 21461, con quelli ottenuti seguendo il metodo ISTISAN. La doppia analisi su un unico estratto permetterebbe sia la determinazione della % di HBay, in accordo alla ISO 21461, che l'identificazione e la quantificazione degli IPA, oggetto del presente progetto.

I metodi sotto descritti, relativi all'analisi dei battistrada e degli oli diluenti, permettono l'estrazione, la purificazione, l'identificazione e la determinazione quantitativa in GC/MS degli idrocarburi policiclici aromatici di cui alla tabella 3. Nella presente relazione tecnica vengono riportati esclusivamente i dati degli analiti di cui alla voce n. 50 dell'allegato XVII regolamento 1907/2006, evidenziati in grassetto.

ACENAFTENE	<b>BENZO(J)FLUORANTENE</b>
ACENAFTILENE	<b>BENZO(K)FLUORANTENE</b>
ANTRACENE	<b>CRISENE</b>
<b>BENZO(A)ANTRACENE</b>	<b>DIBENZO(A,H)ANTRACENE</b>
<b>BENZO(A)PIRENE</b>	FENANTRENE
<b>BENZO(B)FLUORANTENE</b>	FLUORANTENE
<b>BENZO(E)PIRENE</b>	FLUORENE
BENZO(G,H,I)PERILENE	INDENO(1,2,3-C,D)PIRENE
	PIRENE

Tabella 3

### **Procedura analitica (ISTISAN) per la determinazione degli Idrocarburi Policiclici Aromatici nei battistrada: estrazione, purificazione e analisi in GC/MS.**

#### *Estrazione:*

Circa 0,4 g di campione battistrada (preventivamente tagliato e macinato in mulino con setto fori da 4 mm – vedere figure 1 e 2) sono stati posti in palloncino a cuore da 100 mL e addizionati con una quantità nota di standard di processo IPA isotopicamente marcati.

### *Ione Target (m/z)*

- Benzo[a]pirene D12	264
- Benzo[a]antracene D12	240
- Crisene D12	240
- Benzo[b]fluorantene D12	264
- Dibenzo[a,h]antracene D14 - SI (Standard Interno)	292

Il campione è stato sottoposto a quattro estrazioni sequenziali in bagno ad ultrasuoni, della durata di 30 minuti ciascuna; le prime tre estrazioni con diclorometano, l'ultima con n-esano. Sono stati utilizzati 20 mL di solvente per ciascuna estrazione.

Gli estratti sono stati separati dalla matrice solida mediante pipetta pasteur di vetro e riuniti in pallone da 250 mL previo passaggio su cotone (precedentemente trattato e purificato con n esano in Soxhlet per 4 ore) per eliminare l'eventuale presenza di impurità più macroscopiche.

L'estratto è stato portato a piccolo volume con evaporatore rotante (alla temperatura massima di 40°C) e poi a secco con leggero flusso di azoto, infine ripreso con 2 mL di cicloesano.



*Figure 1 e 2: taglio e macinazione di un battistrada*

### *Purificazione:*

Per la purificazione sono state preparate delle colonnine in vetro scuro con circa 2 g di silice (preventivamente scaldata in stufa per 12 ore a 170°C) contenente il 10% (peso/peso) di acqua e condizionate con 7 mL di n-esano. 0,5 mL di estratto è stato trasferito in colonnina (figure 3 e 4) per avviare la raccolta delle due frazioni di eluato:

Frazione 1: pre-eluito, (utilizzando 7 mL di n-esano), contenente gli Idrocarburi alifatici leggeri. E' stata analizzata come la frazione 2 per escludere, (in questa prima fase sperimentale) l'eventuale presenza di IPA.

Frazione 2: eluato, (utilizzando 7 mL +7 mL di una miscela toluene/esano nel rapporto 1:1) contenente invece gli Idrocarburi Policiclici Aromatici di interesse.

La frazione 2 è stata concentrata con evaporatore rotante (alla temperatura massima di 40°C) e poi portata a secco con leggero flusso di azoto. Il residuo è stato ripreso con 0,5 mL di cicloesano contenente circa 100 ug/L di Standard Interno (dibenzo(a,h) antracene D14 per la determinazione strumentale.



Figure 3 e 4: Colonnine in vetro scuro per la purificazione dei campioni.

Condizioni operative per la determinazione strumentale degli IPA di interesse, mediante la tecnica GC/MS (Agilent 5975 Series Mass Selective Detectors):

Colonna gascromatografica: Rxi-17Sil MS (media polarità) (30m; 0,25 mm ID; 0,25  $\mu$ m);

Gas di trasporto: He; constant flow: 1,0mL/min;

Iniettore: Modalità split: Split flow 30mL/min;

Volume iniezione: 1,5  $\mu$ L

Gradiente termico:

75 °C, isoterma 1 min;

15 °C/min fino a 270 °C, isoterma per 1 min;

35 °C/min fino a 290 °C, isoterma per 25 min;

Modalità di acquisizione:

Temperatura transfer line, 290 °C;

Temperatura sorgente ionica, 230 °C;

Temperatura Quad. 150 °C

SIM/SCAN simultanea

Solvent Delay 5 min

I rapporti massa/carica (m/z) di ogni singolo analita sono riportati in tabella 4.



	<i>Ione Target (m/z)</i>		<i>Ione Target (m/z)</i>
Benzo[a]pirene	252	Acenaftilene	152
Benzo[e]pirene	252	Acenaftene	153
Benzo[a]antracene	228	Fluorene	165
Crisene	228	Antracene	178
Benzo[b]fluorantene	252	Fenantrene	178
Benzo[j]fluorantene	252	Fluorantene	202
Benzo[k]fluorantene	252	Pirene	202
Dibenzo[a,h]antracene	278	Indeno(1,2,3-c,d)Pirene	276
Dibenzo(a,h)Antracene D14 (SI)	292	Benzo(g,h,i)Perilene	276

Tabella 4

#### Taratura e campo di applicazione

Il campo di misura (C. di M.), ovvero l'intervallo di concentrazione compreso tra lo standard più diluito e quello più concentrato della retta di taratura, è compreso tra 10 e 400 µg/L per ciascun analita ricercato. Il limite inferiore di quantificazione (strumentale) è quindi 10 µg/L corrispondente, secondo il metodo sopra descritto, a 50 µg/Kg.

La presenza degli analiti di interesse è verificata attraverso la corrispondenza del tempo di ritenzione e la comparazione degli spettri delle sostanze identificate con quello della libreria NIST. Si è proceduto alla loro quantificazione utilizzando i frammenti m/z (ioni Target) riportati in tabella 4. Il valore degli analiti presenti nei campioni sono stati letti sulla retta di calibrazione costruita su 6 livelli di concentrazione (10, 25, 50, 100, 200 e 400 ug/L) utilizzando materiale di riferimento certificato CRM. Il criterio di accettabilità della retta di calibrazione è  $R^2 \geq 0.99$ . Lo standard di controllo, posto a ogni fine sequenza, è stato costruito utilizzando un materiale di riferimento certificato diverso da quello utilizzato per la retta di calibrazione.

Nella Figura 5 è rappresentato il cromatogramma del campione di battistrada n. 5.

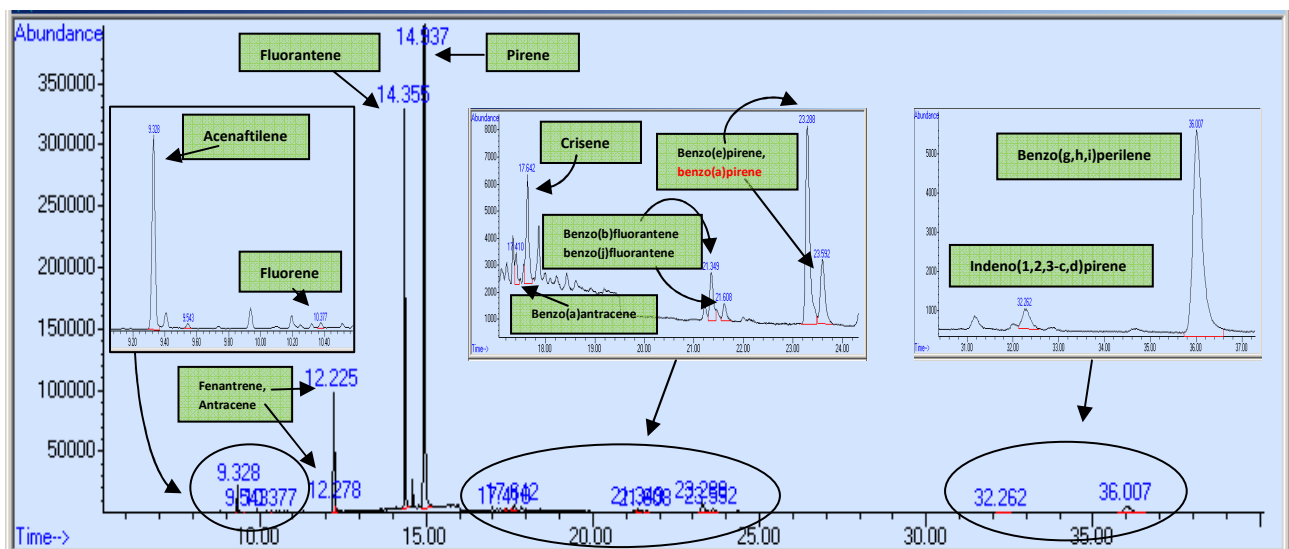


Figura 5: Cromatogramma di un campione di battistrada.

In questa prima fase, sui campioni di battistrada nn.1, 4 e 5 è stata sperimentata un'estrazione in doppio. Nel primo caso, è stato utilizzato il cicloesano come unico solvente per le tre estrazioni sequenziali; nel secondo caso sono stati utilizzati il Diclorometano e il n-Esano per l'ultima delle quattro estrazioni sequenziali. Quest'ultimo caso ha restituito un recupero più soddisfacente tranne che per il Benzo(a)pirene del campione1.

### Espressione dei risultati

La concentrazione dei singoli IPA viene espressa in µg/kg.

Tutti i risultati relativi ai campioni di battistrada vengono riportati in Tabella 5:

Campione	Ditta B Battistrada 4		Ditta A Battistrada 3			Ditta B Battistrada 5		Ditta A Battistrada 1			Ditta A Battistrada 2			
	Pesata (g)	0,3200	0,2961	1,0299	0,3224	0,2013	0,3162	0,2957	0,3236	0,2515	0,2515	0,3107	0,2529	0,3096
Estrazione	Cicloesano	DCM e Esano ISTISAN	Cicloesano	Cicloesano	cicloesano	Cicloesano	DCM e Esano ISTISAN	Cicloesano	Cicloesano	cicloesano	DCM e Esano ISTISAN	Cicloesano	Cicloesano	cicloesano
Purificazione	silice	silice	silice	silice	GPC	silice	silice	silice	silice	GPC	silice	silice	silice	GPC
	(ug/Kg)	(ug/Kg)	(ug/Kg)	(ug/Kg)	(ug/Kg)	(ug/Kg)	(ug/Kg)	(ug/Kg)	(ug/Kg)	(ug/Kg)	(ug/Kg)	(ug/Kg)	(ug/Kg)	(ug/Kg)
Benzo[a]antracene	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	118	137	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
Crisene	206	233	120	144	232	311	362	77	76	68	97	45	38	56
Benzo[b+j+k]fluorantene	< 50	< 50	< 50	< 50	60	482	738	< 50	< 50	80	< 50	< 50	< 50	92
Benzo[e]pirene	836	1493	220	635	N.D.	2160	2922	411	475	201	537	319	281	316
Benzo[a]pirene	380	424	240	291	260	865	1166	212	205	94	135	98	65	97
Dibenzo[a,h]antracene	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
IPA Totali R45	1422	2150	580	1478	552	3936	5325	700	756	443	769	462	384	561

Tabella 5

### Procedura analitica per l'analisi in NMR (Nuclear Magnetic Resonance) dei battistrada.

I campioni battistrada 1 della Ditta A e i battistrada 4 e 5 della ditta B sono stati anche analizzati secondo il metodo UNI ISO 21461 "Determinazione dell'aromaticità dell'olio nelle mescole di gomma vulcanizzata".

La struttura molecolare non lineare di alcuni IPA con tre o più anelli condensati contiene una caratteristica area concava in cui gli idrogeni sono chiamati "Bay region Hydrogens". La spettroscopia NMR può identificare e quantificare tali idrogeni (<sup>1</sup>H) che sono caratteristici degli oli aromatici. La percentuale degli idrogeni di baia (%HBay) determina la percentuale di aromaticità negli oli che, secondo la norma ISO 21461 deve essere inferiore a 0.35 %HBay

#### Estrazione:

Circa 10 g di campione battistrada (preventivamente tagliato e macinato in mulino con setto fori da 4 mm) sono stati posti in un filtro di carta (ditale) per l'estrazione in Soxhlet della durata di 8 ore, utilizzando circa 300 mL di acetone. L'estratto, raccolto in un palloncino da 500 mL, è stato portato a secco con evaporatore rotante e successivamente pesato ottenendo, per tutti i campioni, un valore superiore ai 350 mg come previsto dal metodo UNI ISO 21461:2009 (cfr. Figure 6, 7 e 8).



Figure 6, 7 e 8: Estrazione in Soxhlet, estratto in solvente e dopo passaggio in rotavapor

*Purificazione:*

Dall'estratto totale di ogni campione sono state prelevate 4 aliquote di circa 100 mg ciascuno (cfr. tabella 6) denominate frazione A, B, C e D e sottoposte al processo di purificazione. Ciascuna aliquota, ripresa con 1 mL di diclorometano, è stata iniettata in testa alla cartuccia di purificazione (sono state utilizzate le cartucce SPE VARIAN BOND ELUT JR-SI 500 mg) preventivamente condizionata con 5 mL di n-esano (che viene scartato); ulteriori 0,5 mL di diclorometano sono stati utilizzati per recuperare gli eventuali residui di campione dal palloncino e trasferiti in colonnina. Quando tutto il diclorometano è stato assorbito dalla cartuccia è iniziata la fase di eluizione con 25 mL di n-esano. Durante l'eluizione il flusso è stato mantenuto a circa 5 cm<sup>3</sup>/min (cfr. figure 9 e 10). L'eluato, raccolto in palloncino a cuore, è stato portato a secco con leggero flusso di azoto.

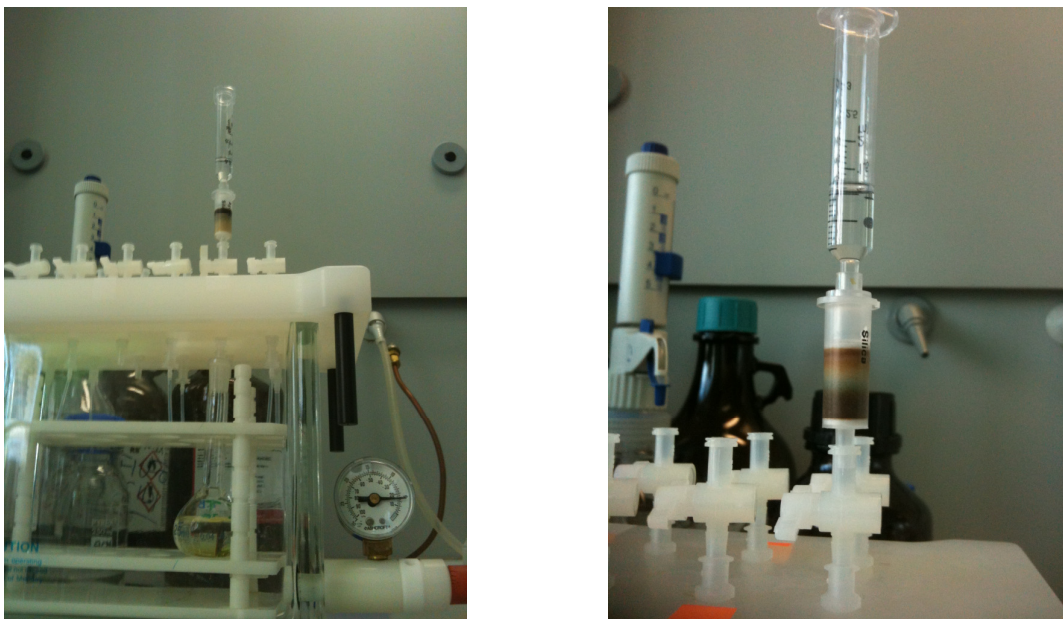


Figure 9 e 10: processo di purificazione con colonnina SPE

Le singole pesate vengono riportate nella tabella 6. Si fa rilevare che le percentuali di recupero individuali ottenute per ciascuna prova di ogni singolo battistrada, sono rientrate nel  $\pm 5\%$  della media dei valori delle tre percentuali di recupero (cfr. tabella 6). Risultano così rispettati i criteri stabiliti al punto 6.2 della Norma UNI ISO 21461:2009.

CAMPIONE BATTISTRADA N. 4					CAMPIONE BATTISTRADA N. 5					CAMPIONE BATTISTRADA N.1				
battistrada di partenza (g)	10,2415				battistrada di partenza (g)	10,0999				battistrada di partenza (g)	10,1796			
	FRAZ. A	FRAZ. B	FRAZ. C	FRAZ. D		FRAZ. A	FRAZ. B	FRAZ. C	FRAZ. D		FRAZ. A	FRAZ. B	FRAZ. C	FRAZ. D
estratto pre purificazione (g)	<b>0,1097</b>	0,0998	0,0989	0,1000	estratto pre purificazione (g)	<b>0,1002</b>	0,1004	0,1002	0,0834	estratto pre purificazione (g)	<b>0,1002</b>	0,1003	0,1000	0,1014
estratto post purificazione (g)		0,0631	0,0659	0,0634	estratto post purificazione (g)		0,0493	0,0526	0,0429	estratto post purificazione (g)		0,0830	0,0830	0,0884
recupero %		63,2	66,6	63,4	recupero %		49,1	52,4	51,4	recupero %		82,8	83,0	87,2
media recupero %		64,4			recupero % media		51,0			media recupero %		84,3		
61,2 ≤ valori ≤ 67,6					48,5 ≤ valori ≤ 53,6					80,1 ≤ valori ≤ 88,5				

Tabella 6

Le frazioni B, C e D di ciascun battistrada sono state analizzate mediante la tecnica dell'NMR dai laboratori dell'Università di Torino – Scienze M.F.N., Istituto di Chimica (vedere allegato 1); i valori medi di %HBay sono stati utilizzati per il confronto con i valori degli IPA ottenuti in GC/MS (ISTISAN) evidenziati in rosso nella tabella 5. Il confronto è riportato in tabella 7.

	Ditta A battistrada 1	Ditta B battistrada 5	Ditta B battistrada 4
Benzo[a]antracene	< 50 ug/kg	137 ug/kg	< 50 ug/kg
Crisene	97 ug/kg	362 ug/kg	233 ug/kg
Benzo[b+j+k]fluorantene	< 50 ug/kg	738 ug/kg	< 50 ug/kg
Benzo[e]pirene	537 ug/kg	2922 ug/kg	1493 ug/kg
Benzo[a]pirene	135 ug/kg	1166 ug/kg	424 ug/kg
Dibenzo[a,h]antracene	< 50 ug/kg	< 50 ug/kg	< 50 ug/kg
IPA Totali R45	<b>769 ug/kg</b>	<b>5325 ug/kg</b>	<b>2150 ug/kg</b>
% HBay (NMR) valore medio	<b>0.02 %</b>	<b>0.12 %</b>	<b>0.13 %</b>

Tabella 7

La frazione A dei battistrada 1, 4 e 5, come specificato nei capitoli precedenti, è stata analizzata in GC/MS dal laboratorio di ARPA Piemonte – Igiene industriale. I risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti con la tecnica di estrazione e purificazione secondo il metodo ISTISAN.

I dati vengono riportati in tabella 8.

Campione	Ditta B Battistrada 5	Ditta B Battistrada 5	Ditta B Battistrada 4	Ditta B Battistrada 4	Ditta A Battistrada 1	Ditta A Battistrada 1
Pesata (g)	0,2957	10,0999	0,2961	10,2415	0,3107	10,1796
Metodo di estrazione	ISTISAN	ISO 21461 NMR	ISTISAN	ISO 21461 NMR	ISTISAN	ISO 21461 NMR
Metodo strumentale	GC/MS	GC/MS	GC/MS	GC/MS	GC/MS	GC/MS
Unità di Misura	$\mu\text{g}/\text{Kg}$	$\mu\text{g}/\text{Kg}$	$\mu\text{g}/\text{Kg}$	$\mu\text{g}/\text{Kg}$	$\mu\text{g}/\text{Kg}$	$\mu\text{g}/\text{Kg}$
<b>Benzo[a]pirene</b>	<b>1166</b>	<b>1020</b>	<b>424</b>	<b>244</b>	<b>135</b>	<b>169</b>
<b>IPA Totali R45</b>	<b>5325</b>	<b>4850</b>	<b>2150</b>	<b>1818</b>	<b>769</b>	<b>632</b>

Tabella 8

### Procedura analitica per la determinazione degli idrocarburi policiclici aromatici negli oli minerali, aromatici e diluenti

#### Preparazione del campione:

Il campione non necessita di preparazione iniziale.

#### Estrazione:

Sono stati pesati circa 0,80 g di campione e trasferiti in un imbuto separatore. Sono stati aggiunti 20 mL di cicloesano e 2 mL di soluzione di standard di processo deuterati ed estratti per 3 volte con dimetilsolfossido DMSO (20 mL + 10 mL + 10 mL).

Le soluzioni di DMSO riunite (circa 40 mL) sono state idrolizzate con circa 60 mL di acqua distillata e dopo raffreddamento sono state trasferite in un imbuto separatore. Si è proceduto all'estrazione per 3 volte con cicloesano (50 mL + 25 mL + 25 mL) recuperando la fase organica (cfr. Figure 11 e 12).



Figure 11 e 12 processo di estrazione L-L

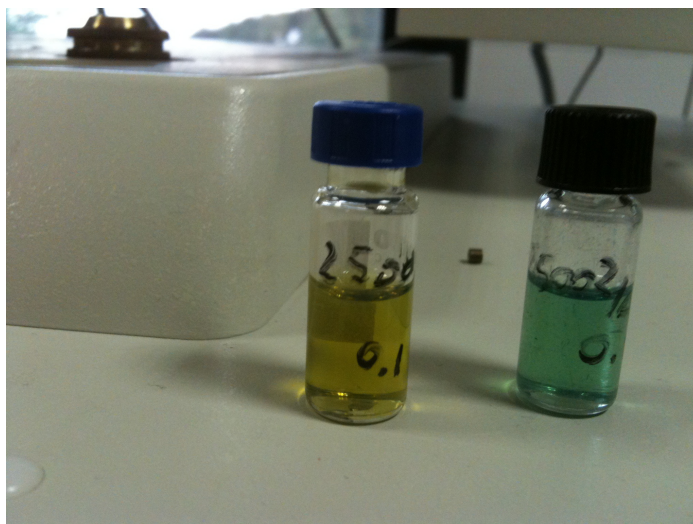
La soluzione cicloesamica (circa 100 mL) è stata lavata per 3 volte con circa 100 mL di acqua distillata per eliminare le tracce di dimetilsolfossido e, dopo avere eliminato i residui di acqua dalla soluzione con solfato di sodio anidro, si è proceduto all'evaporazione fino a piccolo volume con rotavapor a temperatura  $\leq 40^\circ\text{C}$  e successivamente portato a secco in flusso di azoto per evitare di perdere gli IPA più volatili. Il residuo del campione proveniente dalla fase di estrazione è stato disciolto con 4 mL di miscela eluente e, dopo sonicatura per agevolarne la dissoluzione è stato filtrato su filtro da 0,45 micron ed iniettato (1 mL) sul sistema Gel Permeation Chromatography-GPC.

#### *Purificazione:*

La purificazione in GPC, permette la separazione degli IPA dai composti interferenti che hanno, per la maggior parte, un peso molecolare maggiore rispetto ai composti di interesse analitico.

E' stato iniettato 1 mL di campione ed eluito con diclorometano a flusso di 2.0 mL/min; la frazione utile risulta compresa fra circa 22 e 50 minuti.

Il solvente è stato in seguito fatto evaporare fino a piccolo volume su evaporatore rotante, quindi portato a secco sotto leggera corrente di azoto. Il residuo, ripreso con 1 mL di soluzione di standard interno è stato iniettato in GC/MS.



*Figura 13: campioni di oli pronti per la determinazione strumentale*

*Condizioni operative per la determinazione strumentale degli analiti di interesse mediante la tecnica GC/MS (Thermo-Trace Single Quadrupole DSQ II):*

*Colonna gascromatografica: Rxi-17Sil MS (media polarità) (30m, 0,25 mm ID, 0,25  $\mu\text{m}$ );*

*Gas di trasporto: He*

*Costant flow: 1.0 mL/min*

*Volume di iniezione 1.0  $\mu\text{l}$*

*Gradiente termico:*

*70  $^\circ\text{C}$  per 1 minuto;*

*15  $^\circ\text{C}/\text{min}$  fino a 270  $^\circ\text{C}$ , isoterma per 1'*

*35  $^\circ\text{C}/\text{min}$  fino a 290  $^\circ\text{C}$ , isoterma per 4'*

Modalità di acquisizione:

Temperatura interfaccia 250 °C

Temperatura sorgente 200 °C

Solvent Delay: 5 min

SIM/SCAN simultaneo

I rapporti massa/carica (m/z) di ogni singolo analita sono gli stessi già riportati per il metodo strumentale utilizzato per l'analisi dei battistrada, ad eccezione dello SI che in questo caso è il Naftalene D8 – rapporto m/z: 136.

Il campo di misura (C. di M.), definito come l'intervallo di concentrazione compreso tra lo standard più diluito e quello più concentrato della retta di taratura, va da 1 a 100 µg/kg per ciascun analita ricercato. Il campo di prova (C. di P.), definito come il campo di misura corretto per il fattore di diluizione (f.d.= 5), va da 5 a 500 µg/kg

La presenza degli analiti di interesse è verificata attraverso la corrispondenza del tempo di ritenzione e la comparazione degli spettri delle sostanze identificate con quello della libreria NIST. Si procede alla loro quantificazione utilizzando i frammenti m/z (ioni Target) già riportati nel metodo strumentale per i battistrada. Il valore per ogni analita individuato è letto sulla retta di calibrazione costruita, utilizzando materiale di riferimento certificato CRM, su 7 livelli (1, 5, 10, 25, 50, 75 e 100 ug/L) e il cui criterio di accettabilità è  $R^2 \geq 0.99$ . Lo standard di controllo, posto a ogni fine sequenza, è stato costruito utilizzando un materiale di riferimento certificato diverso da quello utilizzato per la retta di calibrazione.

Nelle figure 14 e 15 sottostanti sono riportate le sezioni di un cromatogramma di un mix IPA.

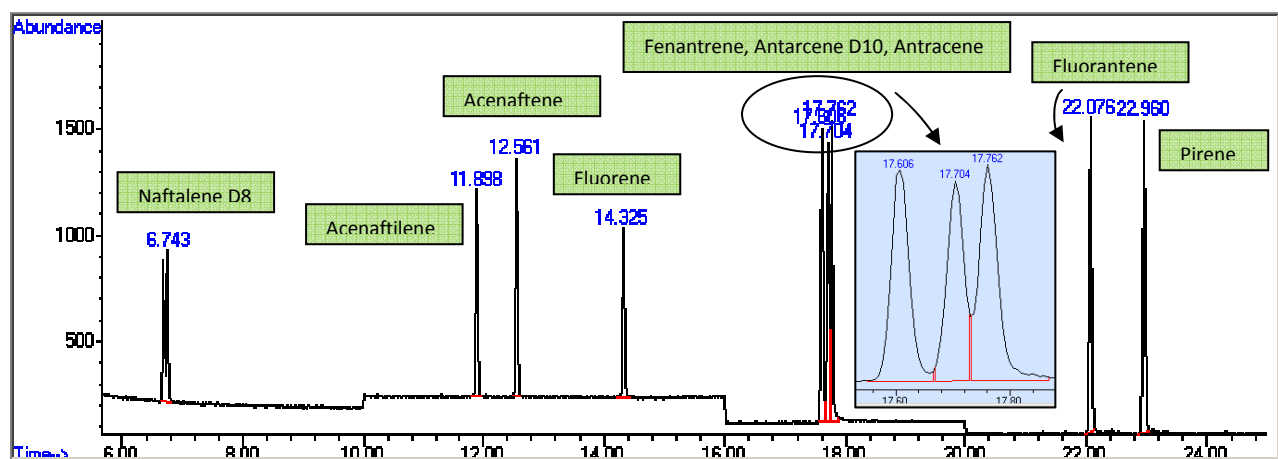


Figura 14: Cromatogramma di un mix IPA 100 ug/l – sezione iniziale da 6 min a 25 min

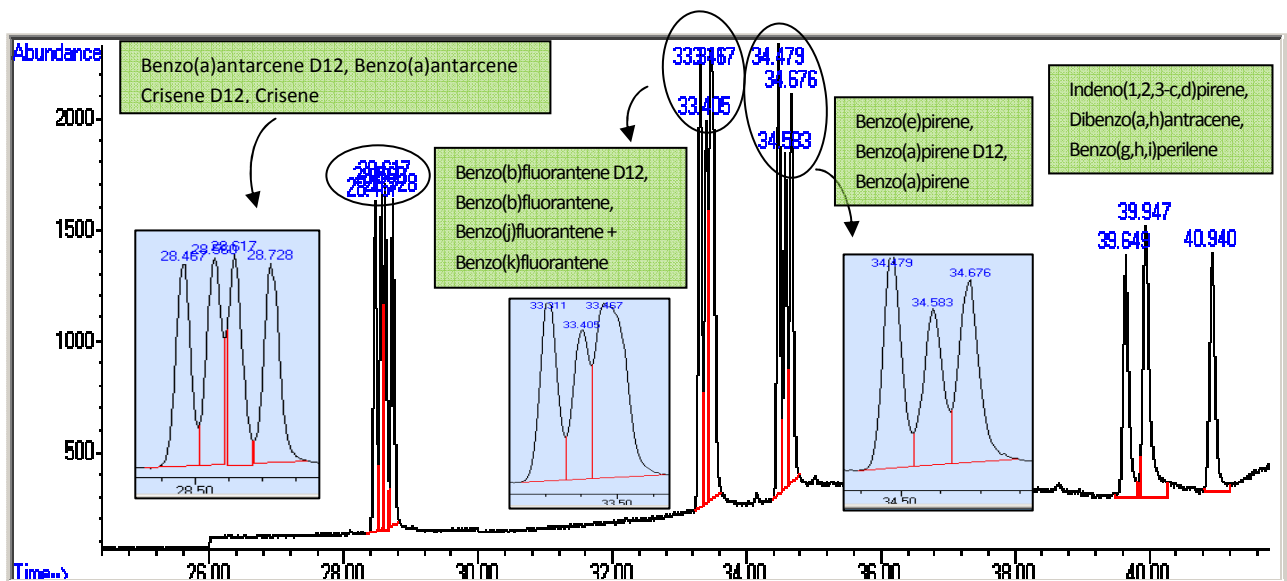


Figura 15: Cromatogramma di un mix IPA 100 ug/l – sezione finale da 25 a 60 min

### Espressione dei risultati

La concentrazione dei singoli IPA viene espressa in  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

In Tabella 9 vengono riportati i risultati dell'analisi in GC/MS dei quattro oli prelevati nelle due diverse ditte.

Campione	DITTA A Olio 1	DITTA A Olio 2	DITTA B Olio 3	DITTA B Olio 4
Pesata (g)	1.003	1.1870	0.8000	0.8000
Estrazione	Cicloesano/DMSO	Cicloesano/DMSO	Cicloesano/DMSO	Cicloesano/DMSO
Purificazione	GPC	GPC	GPC	GPC
	( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )
<b>benzo[a]antracene</b>	< 10	< 10	< 10	< 10
<b>crisene</b>	55	400	< 10	< 10
<b>benzo[b+j+k]fluorantene</b>	50	210	< 10	< 10
<b>benzo[e]pirene</b>	< 10	< 10	138	6,9
<b>benzo[a]pirene</b>	< 10	< 10	17	< 10
<b>dibenzo[a,h]antracene</b>	< 10	< 10	< 10	< 10
<b>IPA Totali R45</b>	<b>105</b>	<b>610</b>	<b>155</b>	<b>6,9</b>

Tabella 9



## Procedura analitica per l'analisi in NMR (Nuclear Magnetic Resonance) degli oli.

I quattro oli sono stati anche analizzati mediante la tecnica dell'NMR (ISO/TC 45/SC3N del 2011-05-16) dai laboratori dell'Università di Torino – Scienze M.F.N., Istituto di Chimica (vedere allegato 1); i valori medi di %HBay sono stati utilizzati per il confronto con i valori degli IPA ottenuti in GC/MS. Il confronto è riportato in tabella 10.

	<b>DITTA B Olio 3</b>	<b>DITTA A Olio 1</b>	<b>DITTA B Olio 4</b>	<b>DITTA A Olio 2</b>
Benzo[a]antracene	< 10 ug/kg	< 10 ug/kg	< 10 ug/kg	< 10 ug/kg
Crisene	< 10 ug/kg	55 ug/kg	< 10 ug/kg	400 ug/kg
Benzo[b+j+k]fluorantene	< 10 ug/kg	50 ug/kg	< 10 ug/kg	210 ug/kg
Benzo[e]pirene	138 ug/kg	< 10 ug/kg	6.9 ug/kg	< 10 ug/kg
Benzo[a]pirene	17 ug/kg	< 10 ug/kg	< 10 ug/kg	< 10 ug/kg
Dibenzo[a,h]antracene	< 10 ug/kg	< 10 ug/kg	< 10 ug/kg	< 10 ug/kg
IPA Totali R45	<b>155 ug/kg</b>	<b>105 ug/kg</b>	<b>6.9 ug/kg</b>	<b>610 ug/kg</b>
% HBay (NMR) valore medio	<b>0.00 %</b>	<b>0.06 %</b>	<b>0.00 %</b>	<b>0.12 %</b>

Tabella 10

## Considerazioni

### 1. Oli

I campioni di oli analizzati in NMR, come previsto dalla ISO/TC 45/SC 3 N del 2011 (Determinazione dell'aromaticità degli oli in spettroscopia NMR), sono ampiamente entro il valore di 0,35% di HBay, ad eccezione dell'olio denominato "olio 2 Ditta A" con un valore di circa un terzo del limite. (cfr. Allegato 1)

Le analisi sugli estratti, secondo il metodo interno ARPA Piemonte (GC/MS), confermano tendenzialmente i dati ottenuti in NMR; infatti, il campione "olio 2 Ditta A" con il valore di % di HBay più elevato è quello che presenta le concentrazioni maggiori in GC/MS (cfr. tabella 10).

### 2. Pneumatici/Battistrada

I risultati delle analisi in NMR dei campioni di battistrada sono tutti inferiori al limite di 0,35% di HBay, come misurato e calcolato secondo il metodo ISO 21461 (Determinazione dell'aromaticità dell'olio nelle mescole di gomma vulcanizzata). I due campioni di battistrada prelevati presso la ditta B presentano una contaminazione superiore al battistrada prelevato presso la ditta A. (cfr. Allegato 1)

Pur non esistendo attualmente una limitazione nell'immissione sul mercato per gli pneumatici in funzione del reale contenuto degli IPA e del benzo(a)pirene, sono state eseguite analisi sul battistrada con metodiche analitiche in GC/MS in analogia alle analisi effettuate sugli oli al fine di comparare i risultati in NMR con quelli ottenuti in GC/MS. Al solo fine di avere una indicazione dei livelli di IPA riscontrati è stato utilizzato come parametro di riferimento il limite previsto per l'immissione e l'utilizzazione degli oli negli pneumatici.

Le analisi in GC/MS sono state condotte seguendo diverse procedure di estrazione e purificazione, come riportato nei capitoli precedenti. Gli estratti che hanno restituito il miglior recupero (cfr. tabella 5) sono quelli relativi al metodo ISTISAN.

I valori di IPA dei campioni di battistrada nn.1,4 e 5 ottenuti in GC/MS con il metodo ISTISAN, sono stati utilizzati per il confronto con quelli misurati in NMR (cfr. tabella 7). Da tale confronto si può evidenziare quanto segue:

- Entrambe le tecniche analitiche hanno mostrato e confermato su due campioni una concentrazione significativa di IPA. I valori sono risultati comunque inferiori sia al limite di 0.35% di HBay (analisi in NMR) che a quello di 10 mg/Kg come sommatoria degli otto IPA determinati (valore limite per gli oli utilizzati nella produzione degli pneumatici - analisi in GC/MS).
- Se invece si considera il valore del Benzo[a]pirene, IPA per il quale è previsto per gli oli utilizzati negli pneumatici un valore limite pari a 1 mg/Kg (analisi in GC/MS), si può osservare come in un campione, quello denominato "Battistrada 5 – Ditta B" (cfr. tabella 3), la concentrazione sia dello stesso ordine di grandezza di tale limite. Questo nonostante per lo stesso battistrada l'analisi in NMR aveva determinato un valore di %HBay di circa un terzo del limite. Dai risultati sperimentali, sebbene circoscritti ad un numero limitato di campioni, si evidenzia come il rispetto del valore misurato con l'analisi in NMR non sia necessariamente un indice attendibile del contenuto degli IPA effettivamente presenti.

La sperimentazione condotta su tre campioni di battistrada ha permesso di confrontare i risultati del Benzo[a]pirene e della sommatoria degli IPA cancerogeni (di cui alla voce n. 50 dell'allegato XVII regolamento 1907/2006) ottenuti con il metodo ISO 21461 (solvente acetone) con quelli ottenuti seguendo l'estrazione e purificazione prevista dal metodo ISTISAN (solvente diclorometano - esano).

La doppia analisi su un unico estratto ha permesso sia la determinazione della percentuale degli idrogeni di baia (%HBay), in accordo alla ISO 21461, che l'identificazione e la quantificazione dei singoli IPA.

Gli attuali risultati, sebbene limitati ad un ristretto numero di campioni, sono confrontabili e confortanti (cfr. tabella 8).

Se tali risultati venissero confermati su un numero più elevato di campioni, si potrebbe valutare l'ipotesi di utilizzare una sola tecnica di estrazione e purificazione del campione per entrambe le tecniche analitiche strumentali (NMR, GC/MS); ciò comporterebbe un confronto più diretto dei risultati e un notevole risparmio di tempo e di risorse umane, nonché un risparmio di solventi, reagenti e materiali diversi per la purificazione.

## **Conclusioni**

I risultati ottenuti evidenziano come la sola analisi e verifica della qualità degli oli diluenti possa non essere un indicatore completo e sufficiente a caratterizzare, nel manufatto finale in gomma, la presenza di IPA e di benzo(a)pirene in particolare. Inoltre la % di HBay misurata sul battistrada non sembra sufficientemente tutelante nei confronti dei reali valori di IPA cancerogeni nel prodotto finito.

Sebbene non vi sia la certezza, in quanto si tratta di campioni non fiscali, che gli oli analizzati siano gli stessi e dello stesso lotto di quelli presenti nei battistrada, dall'osservazione dei risultati non risulta necessariamente una diretta correlazione tra il contenuto di composti policiclici (misurati sia in NMR sia in GC/MS) negli oli attualmente utilizzati e il contenuto misurabile nel prodotto finito (battistrada). Di particolare attenzione risultano i casi in cui il contenuto nel battistrada è superiore a quello riscontrabile nell'olio diluente, in quanto indica ulteriori fonti di contaminazione nelle materie prime utilizzate per la produzione del pneumatico oltre all'olio diluente. Si ritiene utile approfondire gli aspetti legati al contributo di altre materie prime, come il nerofumo o semilavorati elastomerici.

Se i risultati di tale esperienza venissero confermati in altri campioni, si evidenzerebbe la necessità di definire valori di riferimento per gli IPA e il benzo(a)pirene non solo sugli oli utilizzati, ma soprattutto sul prodotto finito sul quale andrebbe effettuata prioritariamente l'attività di vigilanza. Ciò anche in virtù della difficoltà a definire con certezza la reale corrispondenza tra gli oli (o altre materie prime) e il prodotto finito.

In tal caso si ritiene utile considerare l'ipotesi dell'utilizzo della stessa procedura di estrazione e purificazione dei campioni attualmente prevista dalla norma ISO 21461 anche per la successiva separazione e

quantificazione dei singoli IPA cancerogeni in GC/MS, con evidenti semplificazioni e risparmi nelle procedure analitiche.

Le attività analitiche in spettroscopia NMR riportate nel presente rapporto sono state condotte in base ad accordi informali intercorsi con il Dipartimento di Chimica dell'Università di Torino ; eventuali nuove forme di collaborazione dovranno essere concordate tra soggetto committente e il laboratorio individuato.

Se le attività di verifica dei metodi di analisi e preparazione dei campioni saranno validate nel corso del primo semestre 2013, si ritiene possibile prevedere l'avvio di campionamenti ufficiali . Resta da definire la scelta del laboratorio di riferimento per la preparazione dei pneumatici, in particolare per la fase iniziale di taglio del pneumatico stesso nelle diverse componenti per le quali è prevista analisi separata (battistrada, fianco, ecc.). La richiesta di organizzare un corso presso laboratori che effettuano tale operazione ( es. Cerisie, Assogomma) non ha ad oggi avuto alcun seguito.



Torino, 11 dicembre 2012

**Subject: Determination of the aromaticity of oil in vulcanized rubber compounds**  
**International Standard UNI ISO 21461**

**Tested Rubber Samples:** Ditta A Tyre rubber (1-B, 1-C and 1-D), Ditta B Tyre rubber (4-B, 4-C and 4-D) and Ditta B Tyre rubber (5-B, 5-C and 5-D)

**NMR data: Tyre rubbers**

Samples	$I_0$	$I_{\text{CHCl}_3}$	$I_1$	$I_2$	$I_3$	%H <sub>Bay</sub>
	6.0-9.5 ppm	7.26 ppm	$I_0 - I_{\text{CHCl}_3}$	8.3-9.5 ppm	0.2-5.8 ppm	
1-B	740.81	18.82	721.99	2.71	10000	0.02
1-C	748.74	20.08	728.66	2.31	10000	0.02
1-D	680.43	20.12	660.31	3.38	10000	0.03
4-B	540.55	17.63	522.92	14.67	10000	0.14
4-C	545.68	20.68	525.00	11.68	10000	0.11
4-D	646.72	29.66	617.06	14.19	10000	0.13
5-B	1229.1	32.76	1196.3	18.64	10000	0.17
5-C	948.68	34.59	914.09	10.50	10000	0.10
5-D	415.75	33.75	382.00	8.52	10000	0.08

Dates of the tests: 20/11/2012 and 26/11/2012

**Subject: Rubber- Determination of aromaticity of oil by NMR spectroscopy**  
**ISO/TC 45/SC 3 N**

**Tested Oil Samples:** Ditta A oil 1, Ditta A oil 2, Ditta B oil 3 and Ditta B oil 4

**NMR data: Oils**

Samples	$I_0$	$I_{\text{CHCl}_3}$	$I_1$	$I_2$	$I_3$	%H <sub>Bay</sub>
	6.0-9.5 ppm	7.26 ppm	$I_0 - I_{\text{CHCl}_3}$	8.3-9.5 ppm	0.2-5.8 ppm	
oil 1	295.50	2.85	292.65	6.27	10000	0.06
oil 2	283.01	3.14	279.87	12.53	10000	0.12
oil 3	147.33	3.00	114.33	0.51	10000	0.00
oil 4	23.18	3.13	20.05	0.034	10000	0.00

Dates of the tests: 20/11/2012 and 26/11/2012

**Experimental details:**

All NMR spectra were performed according to the International Standard UNI ISO 21461 and ISO/TC 45/SC 3 N for the rubber and oil samples, respectively. The experiments were recorded on a JEOL EX-400 spectrometer operating at 400 MHz for  $^1\text{H}$ . The chemical shift scale was referenced by using the solvent residual signal ( $\text{CHCl}_3$  at 7.26 ppm with respect to TMS)<sup>1,2</sup>. Integral regions are:  $I_0$  (6.0-9.5 ppm) aromatic area;  $I_{\text{CHCl}_3}$  (7.26 ppm)  $\text{CHCl}_3$  signal;  $I_1$  ( $I_0 - I_{\text{CHCl}_3}$ ) pure aromatic area;  $I_2$  (8.3-9.5 ppm) bay region;  $I_3$  (0.2-5.8 ppm) aliphatic and ethylenic regions; %H<sub>Bay</sub> =  $[I_2 / (I_1 + I_3)] * 100$ .

**References**

- 1) H.E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512-7515.
- 2) G.R. Fulmer, A.J.M. Miller, N.H. Sherden, H.E. Gottlieb, A. Nudelman, B.M. Stoltz, J.E. Bercaw, K.I. Goldberg, *Organometallics* **2010**, *29*, 2176-2179.