



# RAPPORTI ISTISAN 16|13

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

## Metodi chimici per l'analisi di pneumatici e materie prime correlate

P. Izzo, C. Abenavoli, D. Attard Barbini, M. Cortese,  
P. Di Prospero Fanghella, R. Draisci, M. Famele, C. Ferranti, M. Fontana,  
F. Monfredini, L. Palleschi, M. Radeschi, M. Ricciutelli, F. Tancredi



AMBIENTE  
E SALUTE



# ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

## Metodi chimici per l'analisi di pneumatici e materie prime correlate

Paolo Izzo (a), Carmelo Abenavoli (a), Danilo Attard Barbini (b),  
Manuela Cortese (c), Paola Di Prospero Fanghella (a),  
Rosa Draisci (a), Marco Famele (a), Carolina Ferranti (a),  
Marco Fontana (d), Fabio Monfredini (b), Luca Palleschi (a),  
Maria Radeschi (c), Massimo Ricciutelli (c), Francesco Tancredi (b)

*(a) Centro Nazionale Sostanze Chimiche, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

*(b) Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria,  
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

*(c) Gestione Strumentazioni Complesse, Università degli Studi di Camerino, Camerino*

*(d) Struttura Semplice Rischio Industriale e Igiene Industriale,  
Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale Piemonte, Torino*

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

**Rapporti ISTISAN**  
**16/13**

Istituto Superiore di Sanità

**Metodi chimici per l'analisi di pneumatici e materie prime correlate.**

Paolo Izzo, Carmelo Abenavoli, Danilo Attard Barbini, Manuela Cortese, Paola Di Prospero Fanghella, Rosa Draisci, Marco Famele, Carolina Ferranti, Marco Fontana, Fabio Monfredini, Luca Palleschi, Maria Radeschi, Massimo Ricciutelli, Francesco Tancredi  
2016, 32 p. Rapporti ISTISAN 16/13

Il benzo[a]pirene e altri sette idrocarburi policiclici aromatici sono stati selezionati come *marker* nelle diverse matrici quali sostanze di rilevanza tossicologica; la matrice pneumatico è una realtà complessa contenente anche queste sostanze e viene utilizzata in diverse applicazioni dopo il ciclo di vita sulle automobili. La caratterizzazione della matrice per il contenuto di questi *marker* è importante per conoscere i loro livelli nei prodotti derivati. In questo rapporto vengono descritti due metodi che permettono la determinazione quantitativa degli idrocarburi policiclici aromatici con tecniche strumentali comunemente disponibili nella maggior parte dei laboratori di analisi chimiche quali gascromatografia/spettrometria di massa e cromatografia liquida ad alta prestazione con rivelatore spettrofotometrico e fluorimetro.

*Parole chiave:* Idrocarburi Policiclici aromatici; SPE; Sephadex LH; Pneumatici; GC/MS; HPLC-DAD-FL

Istituto Superiore di Sanità

**Chemical methods for the analysis of tires and related raw materials.**

Paolo Izzo, Carmelo Abenavoli, Danilo Attard Barbini, Manuela Cortese, Paola Di Prospero Fanghella, Rosa Draisci, Marco Famele, Carolina Ferranti, Marco Fontana, Fabio Monfredini, Luca Palleschi, Maria Radeschi, Massimo Ricciutelli, Francesco Tancredi  
2016, 32 p. Rapporti ISTISAN 16/13 (in Italian)

Benzo[a]pyrene and seven other polycyclic aromatic hydrocarbons have been selected as markers in different matrices such substances of toxicological significance; tire is a complex matrix also containing these substances and it is used in various applications after the life cycle on cars. The characterization of the matrix, for the content of these markers, is important to know their levels in the products. This report describes two methods that allow the quantitative determination of polycyclic aromatic hydrocarbons with instrumental techniques commonly available in most laboratories of chemical analysis such as gas chromatography/mass spectrometry and high performance liquid chromatography with spectrophotometric (diode-array) and fluorimetric detection.

*Key words:* Polycyclic Aromatic Hydrocarbons; SPE; Sephadex LH; Tyres; GC/MS; HPLC-DAD-FL

Progetto realizzato con il supporto finanziario del Ministero della Salute – capitolo 4145 nell'ambito dello "Studio comparativo per la caratterizzazione del contenuto di idrocarburi policiclici aromatici nei pneumatici".

Per informazioni su questo documento scrivere a: [paolo.izzo@iss.it](mailto:paolo.izzo@iss.it)

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: [www.iss.it](http://www.iss.it).

Citare questo documento come segue:

Izzo P, Abenavoli C, Attard Barbini D, Cortese M, Di Prospero Fanghella P, Draisci R, Famele M, Ferranti C, Fontana M, Monfredini F, Palleschi L, Radeschi M, Ricciutelli M, Tancredi F. *Metodi chimici per l'analisi di pneumatici e materie prime correlate*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2016. (Rapporti ISTISAN 16/13).

---

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Gualtiero Ricciardi*  
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*  
Redazione: *Paola De Castro* e *Sandra Salinetti*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori, che dichiarano di non avere conflitti di interesse.



# INDICE

|                   |   |
|-------------------|---|
| Introduzione..... | 1 |
|-------------------|---|

## PARTE A

---

### Metodo chimico per la determinazione del contenuto di Idrocarburi Policiclici Aromatici negli pneumatici e nelle materie prime correlate con tecnica di rilevazione GC/MS

|   |    |
|---|----|
| <b>A1. Campo di applicazione</b> .....              | 7  |
| <b>A2. Acronimi utilizzati</b> .....                | 7  |
| <b>A3. Materiali e metodi</b> .....                 | 8  |
| A3.1. Reagenti e vetreria.....                      | 8  |
| <b>A4. Strumentazione</b> .....                     | 8  |
| <b>A5. Modalità operative</b> .....                 | 9  |
| A5.1. Sezionamento e preparazione del campione..... | 9  |
| A5.2. Estrazione del campione.....                  | 9  |
| A5.3. Purificazione del campione, prima fase.....   | 10 |
| A5.4. Purificazione del campione, seconda fase..... | 10 |
| A5.5. Determinazione strumentale.....               | 11 |
| <b>A6. Risultati e discussione</b> .....            | 14 |
| <b>A7. Conclusioni</b> .....                        | 18 |
| <b>A8. Bibliografia</b> .....                       | 19 |

## PARTE B

---

### Metodo per la determinazione del contenuto di Idrocarburi Policiclici Aromatici negli pneumatici e nelle materie prime correlate con tecnica di rilevazione HPLC-DAD-FL

|   |    |
|---|----|
| <b>B1. Campo di applicazione</b> .....              | 23 |
| <b>B2. Acronimi utilizzati</b> .....                | 23 |
| <b>B3. Materiali e metodi</b> .....                 | 24 |
| B3.1. Reagenti e vetreria.....                      | 24 |
| <b>B4. Strumentazione</b> .....                     | 24 |
| <b>B5. Modalità operative</b> .....                 | 24 |
| B5.1. Sezionamento e preparazione del campione..... | 24 |
| B5.2. Estrazione del campione.....                  | 25 |
| B5.3. Purificazione del campione, prima fase.....   | 26 |
| B5.4. Purificazione del campione, seconda fase..... | 26 |
| B5.5. Determinazione strumentale.....               | 26 |
| <b>B6. Risultati e discussione</b> .....            | 29 |
| <b>B7. Conclusioni</b> .....                        | 31 |
| <b>B8. Bibliografia</b> .....                       | 31 |



## INTRODUZIONE

Gli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) sono sostanze chimiche presenti in numerosi prodotti e miscele di uso quotidiano, tra cui gli oli diluenti utilizzati nei processi di polimerizzazione di alcune gomme e nella realizzazione delle miscele per pneumatici.

Queste sostanze chimiche hanno una struttura complessa e la loro famiglia è molto numerosa. Alcuni di questi composti hanno un'elevata tossicità per l'uomo e per l'ambiente. La comunità scientifica ha individuato alcuni di composti della famiglia che per le loro caratteristiche e la loro presenza nelle miscele degli IPA sono da considerare dei *marker* pertanto la loro quantificazione è indice sia della loro presenza che della pericolosità dell'intera miscela.

Da due decenni gli Stati Membri e la Commissione Europea hanno posto sotto osservazione queste sostanze e negli anni hanno posto alcune limitazioni nell'utilizzo di miscele che contengono le stesse.

L'Allegato XVII del Regolamento (CE) 1907/2006 (noto come REACH: *Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals*) riguarda le restrizioni in materia di fabbricazione, immissione sul mercato e uso di talune sostanze, miscele e articoli pericolosi e la voce 50 tratta gli IPA.

Questa voce è stata modificata e integrata dagli ultimi regolamenti ad oggi in vigore, che specificano i composti e le loro limitazioni nei miscele e/o nei prodotti commerciali:

- Regolamento (CE) 552/2009 della Commissione del 22 giugno 2009;
- Regolamento (UE) 1272/2013 della Commissione del 6 dicembre 2013;
- Regolamento (UE) 2015/326 della Commissione del 2 marzo 2015.

Si riporta di seguito il testo in vigore della voce 50 integrata e modificata:

### *Voce 50 – Idrocarburi policiclici aromatici (IPA)*

- a) Benzo[a]pirene (BaP) N. CAS 50-32-8
- b) Benzo[e]pirene (BeP) N. CAS 192-97-2
- c) Benzo[a]antracene (BaA) N. CAS 56-55-3
- d) Crisene (CHR) N. CAS 218-01-9
- e) Benzo[b]fluorantene (BbFA) N. CAS 205-99-2
- f) Benzo[j]fluorantene (BjFA) N. CAS 205-82-3
- g) Benzo[k]fluorantene (BkFA) N. CAS 207-08-9
- h) Dibenzo[a,h]antracene (DBAhA) N. CAS 53-70-3

### *Restrizione:*

1. A decorrere dal 1° gennaio 2010, non possono essere immessi sul mercato o utilizzati per la produzione di pneumatici o parti di pneumatici gli olii diluenti aventi un contenuto:
  - di BaP superiore a 1 mg/kg (0,0001 % in peso), o
  - un contenuto complessivo di tutti gli IPA elencati superiore a 10 mg/kg (0,001% in peso).

«La norma EN 16143-2013 [Prodotti petroliferi — Determinazione del contenuto di Benzo[a]pirene (BaP) e di alcuni idrocarburi policiclici aromatici (IPA) negli oli diluenti — Procedimento che utilizza la doppia purificazione mediante LC e l'analisi GC/MS] è utilizzata come metodo di prova per dimostrare la conformità con i limiti di cui al primo comma. Fino al 23 settembre 2016, si ritiene che i limiti di cui al primo comma siano rispettati se l'estratto di policiclici aromatici (PCA) è inferiore al 3% in peso, secondo la norma dell'Institute of Petroleum IP 346:1998 (Determinazione dei

PCA negli oli lubrificanti di base inutilizzati e nelle frazioni di petrolio prive di asfaltene — estrazione di dimetile solfo), purché il rispetto dei limiti di BaP e degli elencati IPA, nonché la correlazione dei valori misurati con l'estratto PCA, siano misurati dal fabbricante o dall'importatore ogni sei mesi o dopo ogni cambio operativo di rilievo, optando per il più prossimo.»;

2. Inoltre, non possono essere immessi sul mercato pneumatici e battistrada per rigenerazione fabbricati dopo il 1° gennaio 2010 se contengono oli diluenti in quantitativi superiore ai limiti fissati nel paragrafo 1. Tali limiti sono considerati 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 (gomma vulcanizzata — determinazione dell'aromaticità degli olii nei composti di gomma vulcanizzata).
3. In deroga a quanto sopra stabilito, le disposizioni del paragrafo 2 non si applicano agli pneumatici rigenerati se il loro battistrada non contiene oli diluenti che superano i limiti di cui al paragrafo 1.
4. Ai fini della presente voce, per «pneumatici» si intendono gli pneumatici di veicoli contemplati nelle seguenti direttive: — direttiva 2007/46/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 5 settembre 2007, che istituisce un quadro per l'omologazione dei veicoli a motore e dei loro rimorchi (GU L 263 del 9.10.2007, pag. 1), — direttiva 2003/37/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 26 maggio 2003, relativa all'omologazione dei trattori agricoli o forestali, dei loro rimorchi e delle loro macchine intercambiabili trainate, nonché dei sistemi, componenti ed entità tecniche di tali veicoli (GU L 171 del 9.7.2003, pag. 1), e — direttiva 2002/24/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 18 marzo 2002, relativa all'omologazione dei veicoli a motore a due o tre ruote e che abroga la direttiva 92/61/CEE del Consiglio (GU L 124 del 9.5.2002, pag. 1).
5. Gli articoli non possono essere immessi in commercio per la vendita al pubblico se uno dei loro componenti in gomma o in plastica che vengono a contatto diretto e prolungato o ripetuto e a breve termine con la pelle umana o con la cavità orale, in condizioni d'uso normali o ragionevolmente prevedibili, contiene oltre 1 mg/kg (0,0001 % del peso di tale componente) di uno degli IPA elencati. Tali articoli comprendono, tra l'altro: — attrezzature sportive come le biciclette, le mazze da golf, le racchette, — utensili per la casa, carrelli, girelli, — attrezzi per uso domestico, — abbigliamento, calzature, guanti e abbigliamento sportivo, — cinturini di orologi, bracciali, maschere, fasce per i capelli. 6. I giocattoli, inclusi quelli per le attività, e gli articoli di puericultura non devono essere immessi in commercio se uno dei loro componenti che vengono a contatto diretto e prolungato oppure ripetuto e a breve termine con la pelle umana o con la cavità orale, in condizioni d'uso normali o ragionevolmente prevedibili, contiene oltre 0,5 mg/kg (0,00005 % del peso di tale componente) di uno degli IPA elencati. 7. In deroga ai paragrafi 5 e 6, la restrizione non si applica agli articoli immessi in commercio per la prima volta anteriormente al 27 dicembre 2015.
8. Entro il 27 dicembre 2017 la Commissione riesamina i valori limite di cui ai paragrafi 5 e 6 alla luce dei nuovi dati scientifici, compresi quelli relativi alla migrazione degli IPA presenti negli articoli di cui allo stesso regolamento, nonché quelli relativi a materie prime alternative e, se del caso, modifica tali paragrafi.

I metodi, qui proposti, hanno per oggetto la caratterizzazione e la quantificazione del contenuto di IPA negli pneumatici e materie prime correlate.

I metodi sono stati studiati e realizzati nell'ambito di un progetto finanziato dal Ministero della Salute con l'Istituto Superiore di Sanità e con la collaborazione tecnica della Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale Piemonte (ARPA Piemonte) e dell'Università di Camerino.

Lo scopo del progetto è stato la messa a confronto dei dati analitici ottenuti applicando a un gruppo di campioni di pneumatici sia il metodo ISO 21461:2012, citato nel Regolamento (CE) 1907/2006, che permette la determinazione dell'aromaticità dell'olio nelle mescole di gomma vulcanizzata, sia i metodi per l'identificazione e la determinazione quantitativa di 8 singoli IPA in Gascromatografia/Spettrometria di Massa (*Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, GC/MS) e in cromatografia liquida ad alta prestazione con rivelatore spettrofotometrico e fluorimetro (*High Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detector and FLuorimetric detector*, HPLC-DAD-FL).

L'analisi mediante risonanza magnetica nucleare (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) non permette di discriminare il reale contenuto di IPA, classificati dall'Unione Europea per le loro proprietà cancerogene, negli pneumatici e in particolare il contenuto di benzo[a]pirene, *marker* caratteristico per le sue proprietà tossicologiche.

I metodi qui messi a punto utilizzano, invece, tecniche strumentali comunemente disponibili nella maggior parte dei laboratori permettendo così un'analisi quantitativa.

Le due metodiche sono descritte nelle seguenti sezioni del rapporto:

– *PARTE A*

*Metodo chimico per la determinazione del contenuto di Idrocarburi Policiclici Aromatici negli pneumatici e nelle materie prime correlate con tecnica di rilevazione GC/MS;*

– *PARTE B*

*Metodo per la determinazione del contenuto di Idrocarburi Policiclici Aromatici negli pneumatici e nelle materie prime correlate con tecnica di rilevazione HPLC-DAD-FL.*



**PARTE A**  
**Metodo chimico per la determinazione**  
**del contenuto di Idrocarburi Policiclici Aromatici**  
**negli pneumatici e nelle materie prime correlate**  
**con tecnica di rilevazione GC/MS**



## A1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile agli pneumatici, nuovi o rigenerati e alle materie prime correlate per la determinazione delle seguenti sostanze:

- Benzo[a]pirene (BaP) – CAS 50-32-8
- Benzo[e]pirene (BeP) – CAS 192-97-2
- Benzo[a]antracene (BaA) – CAS 56-55-3
- Crisene (CHR) – CAS 218-01-9
- Benzo[b]fluorantene (BbFA) – CAS 205-99-2
- Benzo[j]fluorantene (BjFA) – CAS 205-82-3
- Benzo[k]fluorantene (BkFA) – CAS 207-08-9
- Dibenzo[a,h]antracene (DBAhA) – CAS 53-70-3.

La normativa di riferimento (Regolamento REACH) non specifica un campo di applicazione quindi in base alle esperienze pregresse su tale tipologia di matrici si è scelto di applicare il metodo ai parametri indicati nella Tabella A1.

Si considera come campo di misura l'intervallo di concentrazione rappresentato dagli estremi della retta di taratura.

**Tabella A1. GC/MS per pneumatici o materie prime correlate: IPA e campo di applicazione**

| Matrice                              | Analita                                     | Campo di applicazione (µg/L) |
|--------------------------------------|---|------------------------------|
| Pneumatici o materie prime correlate | Benzo[a]pirene (BaP) – CAS 50-32-8          | 25/1000                      |
|                                      | Benzo[e]pirene (BeP) – CAS 192-97-2         | 25/1000                      |
|                                      | Benzo[a]antracene (BaA) – CAS 56-55-3       | 25/1000                      |
|                                      | Crisene (CHR) – CAS 218-01-9                | 25/1000                      |
|                                      | Benzo[b]fluorantene (BbFA) – CAS 205-99-2   | 25/1000                      |
|                                      | Benzo[j]fluorantene (BjFA) – CAS 205-82-3   | 25/1000                      |
|                                      | Benzo[k]fluorantene (BkFA) – CAS 207-08-9   | 25/1000                      |
|                                      | Dibenzo[a,h]antracene (DBAhA) – CAS 53-70-3 | 25/1000                      |

## A2. Acronimi utilizzati

GC/MS = *Gas Chromatography/Mass Spectrometry*

NMR = *Nuclear Magnetic Resonance*

IPA = *Idrocarburi Policiclici Aromatici*

R<sup>2</sup> = *coefficiente di correlazione della retta di taratura*

REACH = *Regolamento (CE) 1907/2006*

SIM/Scan = *Selected Ion Monitoring/Scan acquisition*

SPE = *Solid-Phase Extraction*

## A3. Materiali e metodi

La metodica analitica si può suddividere in 5 fasi:

- Sezionamento e preparazione del campione;
- Estrazione;
- Prima fase di purificazione;
- Seconda fase di purificazione;
- Determinazione.

### A3.1. Reagenti e vetreria

- Acetone di grado analitico
- n-eptano, per cromatografia
- 2-propanolo, per cromatografia
- Toluene, per cromatografia
- N<sub>2</sub>, purezza > 99,9%
- Materiale di riferimento:
  - Master standard: standard analitici certificati degli IPA determinati
  - Standard di processo: benzo[a]antracene D12, benzo[b]fluorantene D12, benzo[a]pirene D12
  - Standard di siringa: decafluorobifenile
- Cartucce Supelclean LC-SI 6 mL 1000 mg (SPE)
- Fase solida adsorbente Sephadex LH 20
- Colonna per fase solida, diametro 23 mm ID, lunghezza 100 mm
- Normale vetreria da laboratorio.

## A4. Strumentazione

- Coltello e taglierino per pneumatico
- Pinza per pneumatico
- Bilancia analitica, risoluzione 0,1 mg
- Apparecchiatura per l'estrazione Soxhlet
- Evaporatore rotante (rotavapor)
- Sistema per l'evaporazione automatica con flusso di azoto (opzionale)
- Estrattore per la purificazione su fasi solide SPE (Vacuum manifold) (opzionale)
- Gascromatografo dotato di: autocampionatore, colonna gascromatografica Rxi-17Sil MS (lunghezza 30 m; ID 0,25 mm; film 0,25 µm)
- Spettrometro di massa con analizzatore di massa quadrupolare
- Sorgente ionica inerte e capacità di acquisizione SIM/Scan sincronizzata.

## A5. Modalità operative

### A5.1. Sezionamento e preparazione del campione

Lo pneumatico è un oggetto articolato in più sezioni reso complesso dalla modalità intrinseca di costruzione e realizzazione dello pneumatico stesso.

Nello pneumatico si possono individuare più sezioni di gomma vulcanizzata che possono essere sottoposte ad indagine analitica. Le sezioni devono avere prestazioni fisiche e meccaniche differenti in funzione della parte dello pneumatico in cui sono posizionate.

Si possono distinguere:

- battistrada;
- fianco;
- foglietta e tela di carcassa;
- tallone di riempimento/apice;
- chafer/abrasione striscia gomma;
- sotto-battistrada;
- cinghie in gomma.

Non tutte le sezioni sono sempre presenti in funzione delle caratteristiche e della tipologia di pneumatico.

Il metodo di indagine prevede il sezionamento e prelievo del battistrada.

Con l'utilizzo di un coltello e/o taglierino adatto procedete al sezionamento del battistrada tagliando delle strisce del battistrada di uno spessore di circa 0,1-0,3 mm avendo cura che non ci siano parti estranee allo pneumatico. Le strisce devono essere ridotte in piccoli pezzettini di circa 2 mm<sup>2</sup>.

Dopo il sezionamento, se disponibile un apparecchiatura per il trattamento dei materiali gommosi della azienda Fortuna (<http://www.fortuna-gmbh.de>) o similari, il processo di realizzazione del campione può essere effettuato con la tale macchina che possiede frese adeguate alla realizzazione delle strisce di spessore 0,1-0,3 mm partendo da parti di pneumatico con spessore di circa 1-2 cm.

Le strisce vengono ridotte in piccoli pezzettini di circa 2 mm.

### A5.2. Estrazione del campione

Un campione di gomma di pneumatico di circa 3,0 g viene pesato in un ditale per estrazione su una bilancia analitica. La quantità di campione deve consentire di ottenere circa 0,3 g di estratto quantità che consente di svolgere il metodo analitico. Si possono avere campioni con concentrazioni sia molto basse che molto alte in IPA, in questi casi è possibile che l'estrazione debba essere ripetuta.

Il contenitore viene chiuso con ovatta e inserito nell'estrattore Soxhlet per l'estrazione degli IPA.

L'estrattore si collega ad un pallone da 500 mL, mantenuto su una cuffia riscaldante, con aggiunta di 300 mL di acetone.

L'estrazione prosegue per 8 ore, regolando le condizioni di riscaldamento in modo che il solvente distillante riempia la tazza di estrazione almeno 5 volte all'ora.

Terminata l'estrazione, il solvente viene allontanato con un rotavapor a 35°C, l'estratto viene ridotto a piccolo volume e poi trasferito in un palloncino di piccole dimensioni precedentemente tarato, tipicamente il residuo dopo l'evaporazione del solvente è circa 500 mg.

L'estratto viene portato cautamente a secco in corrente di azoto, fino a un peso costante. All'estratto, così stabilizzato, viene aggiunta una quantità di n-eptano al fine di ottenere una soluzione a concentrazione nota di circa 100 mg/mL.

### **A5.3. Purificazione del campione, prima fase**

La prima fase di purificazione viene effettuata con cartucce SPE utilizzando l'estrattore per la purificazione su fasi solide.

Le cartucce prima dell'utilizzazione necessitano di essere condizionate con 10 mL di n-eptano; quando il solvente è quasi completamente eluito, si introduce 1 mL dell'estratto in testa alla cartuccia, unitamente ad una quantità nota degli standard di processo in toluene (benzo[a]antracene D12, benzo[b]fluorantene D12, benzo[a]pirene D12), tale da avere una concentrazione finale di ciascuno pari a 0,50 mg/L.

Per il trasferimento quantitativo del materiale in cartuccia si utilizzano 0,5 mL di n-eptano poi si inizia la fase di eluizione con ulteriori 25 mL di n-eptano.

Durante l'eluizione il flusso è mantenuto a circa 5 mL/min. L'eluato, raccolto in palloncino a cuore, viene portato a piccolo volume al rotavapor a 35°C e successivamente cautamente a secco con leggero flusso di azoto.

### **A5.4. Purificazione del campione, seconda fase**

La seconda fase di purificazione è effettuata su colonna impaccata con fase adsorbente Sephadex LH 20.

La colonna con la fase adsorbente viene preparata realizzando un impasto di 5 g di Sephadex LH 20 e propanolo, usando un rapporto 3:1 (p/p) tra solvente e fase. La miscela viene lasciata a riposo una notte per la deattivazione della fase solida.

La fase viene trasferita su colonna di vetro dedicata, il diametro della colonna garantisce la corretta velocità di eluizione della miscela nella fase di purificazione che deve essere mantenuta a circa 1 mL/min.

Dopo ogni campione sottoposto alla fase di purificazione la colonna di Sephadex LH 20 viene eluita con 30 mL di isopropanolo per garantirne la rigenerazione completa, scartando il solvente. La fase nella colonna viene mantenuta bagnata dal solvente, chiusa con alluminio e conservata per successivi utilizzi.

Dopo la prima fase di purificazione, il campione, portato a secco, viene disciolto utilizzando 1 mL di 2-propanolo così da permettere il trasferimento della soluzione sulla testa della colonna per la seconda fase. Si utilizzano ulteriori 2 mL di 2-propanolo per trasferimento quantitativo del campione in colonna.

Si inizia la fase di eluizione con il flusso a circa 1 mL/min, la prima frazione, compresa tra 0 e 24 mL di eluizione, è raccolta e scartata. La seconda frazione compresa tra 24 e 70 mL, contenente gli IPA di interesse e gli standard di processo, è raccolta in un palloncino a cuore e successivamente ridotta a piccolo volume con evaporatore rotante a 35°C e portata cautamente a secco sotto leggero flusso di azoto.

Il campione viene disciolto in 2 mL di acetone e trasferito in un vial a fondo conico, utilizzando 1 mL di acetone per trasferimento quantitativo del materiale in cartuccia, quindi portato a secco con leggero flusso di azoto.

Alla fine delle fasi di purificazione, il residuo viene ripreso con 1 mL di toluene a cui vengono aggiunti 50 µL della soluzione DF-2 (*vedi* A5.5.2.2), in qualità di standard interno di siringa in modo da ottenere una concentrazione finale di 0,50 mg/L di decafluorobifenile.

## A5.5. Determinazione strumentale

### A5.5.1. Condizioni gascromatografiche

Colonna gascromatografica: Rxi-17Sil MS (lunghezza 30 m; ID 0,25 mm; film 0,25 µm)

Gas di trasporto: He, flusso costante 1,2 mL/min

Iniettore, modalità split: flusso 10 mL/min

Volume iniezione: 1,0 µL

Gradiente termico:

- 80°C, isoterma 1 min
- 25°C/min fino a 180°C, 0 min
- 5°C/min fino a 300°C, isoterma per 20 min

Modalità di acquisizione: SIM

Temperatura transferline: 300°C

Temperatura sorgente ionica: 230°C

Temperatura quadrupolo: 150°C

Solvent delay: 10 min.

La colonna e le condizioni strumentali permettono una buona separazione di tutti gli analiti, compreso i tre benzofluoranteni: benzo[b]fluorantene, benzo[k]fluorantene e benzo[j]fluorantene.

La Tabella A2 riporta gli ioni di quantificazione e di conferma per ogni standard di IPA.

**Tabella A2. Ioni di quantificazione e di conferma per ogni standard di IPA**

| Analita            | Ione di quantificazione (m/z) | Ioni di conferma qualitativa (m/z) |     |
|--------------------|-------------------------------|------------------------------------|-----|
| BaA-D12            | 240                           | 120                                | 241 |
| BaA                | 228                           | 114                                | 229 |
| CHR                | 228                           | 114                                | 229 |
| BbFA_D12           | 264                           | 132                                | 265 |
| BbFA               | 252                           | 126                                | 253 |
| BkFA               | 252                           | 126                                | 253 |
| BjFA               | 252                           | 126                                | 253 |
| BeP                | 252                           | 126                                | 253 |
| BaP_D12            | 264                           | 132                                | 265 |
| BaP                | 252                           | 126                                | 253 |
| DBahA              | 278                           | 139                                | 279 |
| Decafluorobifenile | 334                           | 265                                | 335 |

### A5.5.2. Preparazione della retta di calibrazione

#### A5.5.2.1. Conservazione degli standard di calibrazione

Gli standard certificati concentrati vengono conservati in congelatore a -18°C.

La soluzione madre degli standard denominata IPA-2, conservata in congelatore a -18°C, può essere utilizzata per un periodo di un anno dalla data di preparazione. Le altre soluzioni della retta di calibrazione, conservate con la stessa modalità, possono essere utilizzate per un periodo di sei mesi dalla data di preparazione.

#### A5.5.2.2. Preparazione degli standard di calibrazione

- a) Preparazione delle soluzioni madre degli standard di IPA deuterati, in qualità di standard di processo:

STD-1: 10 mg di ciascun composto deuterato in 10 mL di toluene (1000 µg/mL)

STD-2: 100 µL di STD-1 in 10 mL di toluene (10 µg/mL)

- b) Preparazione delle soluzioni madre del decafluorobifenile, in qualità di standard di siringa:  
 DF-1: 10 mg di decafluorobifenile in 10 mL di toluene (1000 µg/mL)  
 DF-2: 100 µL di DF-1 in 10 mL di toluene (10 µg/mL)
- c) Preparazione delle soluzioni standard di IPA:  
 IPA-1: soluzione madre a 1000 µg/mL in toluene  
 IPA-2: 100 µL di IPA-1 in 10 mL di toluene (10 µg/mL)

Per la costruzione della retta di calibrazione sono stati utilizzati i seguenti livelli di concentrazione:

- P1: 0,025 µg/mL di ciascun IPA, 0,5 µg/mL di ciascun IPA deuterato,
- P2: 0,050 µg/mL di ciascun IPA, 0,5 µg/mL di ciascun IPA deuterato,
- P3: 0,100 µg/mL di ciascun IPA, 0,5 µg/mL di ciascun IPA deuterato,
- P4: 0,250 µg/mL di ciascun IPA, 0,5 µg/mL di ciascun IPA deuterato,
- P5: 0,500 µg/mL di ciascun IPA, 0,5 µg/mL di ciascun IPA deuterato,
- P6: 1,000 µg/mL di ciascun IPA, 0,5 µg/mL di ciascun IPA deuterato.

Per ottenere i livelli di concentrazione elencati sono state utilizzate le soluzioni madre come indicato in Tabella A3. Tali soluzioni sono state portate a volume in un matraccio da 10 mL con toluene.

**Tabella A3. Livelli di concentrazione degli standard di lavoro degli IPA per analisi GC/MS**

| Soluzione | P1    | P2    | P3     | P4     | P5     | P6      |
|-----------|-------|-------|--------|--------|--------|---------|
| IPA-2     | 25 µL | 50 µL | 100 µL | 250 µL | 500 µL | 1000 µL |
| STD-2     | 50 µL | 50 µL | 50 µL  | 50 µL  | 50 µL  | 50 µL   |

Infine per la costruzione della retta di taratura ad 1 mL di ciascuna soluzione della Tabella A3 sono stati aggiunti 50 µL della soluzione DF-2, così come viene fatto per i campioni.

#### **A5.5.3. Preparazione dello standard di controllo**

Lo standard di controllo si prepara da una soluzione indipendente rispetto allo standard di taratura utilizzando uno standard certificato conservato in congelatore -18°C per 12 mesi.

Viene preparato per ogni batch di analisi ad una concentrazione intermedia rispetto all'intervallo di calibrazione ed iniettato in doppio.

#### **A5.5.4. Taratura dello strumento**

Il sistema GC/MS deve essere tarato ogni qualvolta si eseguono delle azioni correttive (es. pulizia della sorgente, cambio della colonna, ecc.) che possono modificare la risposta strumentale oppure nel momento in cui lo standard di controllo di calibrazione non rientra nei criteri di accettabilità come più avanti specificato.

La retta di calibrazione di ogni analita (regressione lineare) si costruisce su 6 livelli di concentrazione (P1-P6) e ogni punto della curva è iniettato in triplo. Si utilizza il metodo del riferimento interno (standard interno di siringa, decafluorobifenile) per la normalizzazione delle aree.

I criteri di accettabilità per la retta di calibrazione sono:

- *Criterio di accettabilità della retta:*  $R^2 \geq 0,99$ .

- *Criterio di accettabilità della sensibilità*: risposta strumentale (area) benzo[a]pirene 0,025 mg/L  $\geq$  6500.  
Ad ogni sessione di analisi si inietta lo standard di controllo che permette di verificare la linearità e l'accettabilità della retta di calibrazione.
- *Criterio di accettabilità dello standard di controllo*: si verifica che la concentrazione risultante sia pari alla concentrazione attesa  $\pm$  20%.

Se i criteri proposti non vengono rispettati si procede a:

- Tarare nuovamente lo strumento.
- Ripreparare le miscele di taratura e/o di standard di controllo.
- Richiedere un intervento di manutenzione all'assistenza tecnica dello strumento.

La registrazione dell'esito positivo del controllo della taratura sul registro degli interventi dello strumento comprende la verifica della conformità all'uso.

#### **A5.5.5. Analisi quantitativa**

Per l'analisi quantitativa del campione vengono monitorati, oltre allo ione quantificatore, due ioni qualificatori, in modo da effettuare un riconoscimento più affidabile vista la complessità della matrice (i rapporti m/z di ogni singolo analita sono riportati in Tabella A2).

La presenza degli analiti di interesse è verificata attraverso i seguenti criteri:

- il tempo di ritenzione dei singoli analiti nel campione (calcolato come rapporto tra il tempo di ritenzione dell'analita e quello dello standard di processo), deve rientrare nello 0,15% del tempo di ritenzione dello stesso analita calcolato nello stesso modo sulla retta di calibrazione.
- il rapporto singoli ioni qualificatori/ione quantificatore, calcolato per ogni analita nel campione, deve differire di non più del 30% rispetto allo stesso rapporto per gli standard. Dalle prove effettuate e vista la complessità della matrice può essere accettato, alle basse concentrazioni, un rapporto qualificatori/ione quantificatore del 40%.

La determinazione quantitativa è effettuata in modalità SIM, utilizzando gli ioni di quantificazione riportati in Tabella A2, per il calcolo la curva di taratura. La curva è costruita nell'intervallo di linearità degli analiti oggetto di analisi, utilizzando la tecnica dello standard interno.

Per concentrazioni superiori al campo di misura individuato dalla taratura, si diluisce opportunamente il campione con toluene contenente lo standard di processo e quello di siringa alla concentrazione di cui alla retta di taratura.

#### **A5.5.6. Controllo dello standard di processo**

Le prove effettuate per la validazione del metodo hanno evidenziato un recupero medio dell'80%.

Il recupero dello standard di processo deuterato corrispondente a ciascun analita (Tabella A4), evidenziato sul report strumentale, viene registrato su una carta di controllo in cui sono specificati i limiti di accettabilità.

Se il criterio del recupero dello standard di processo deuterato non è rispettato, si procede a ripetere la determinazione a partire dalla pesata del campione stesso.

Tabella A4. IPA e standard di controllo e di siringa

| Analita               | Standard di processo    | Standard di siringa |
|-----------------------|-------------------------|---------------------|
| Benzo[a]antracene     | Benzo[a]antracene_d12   | Decafluorobifenile  |
| Crisene               | Benzo[a]antracene_d12   | Decafluorobifenile  |
| Benzo[b]fluorantene   | Benzo[b]fluorantene_d12 | Decafluorobifenile  |
| Benzo[k]fluorantene   | Benzo[b]fluorantene_d12 | Decafluorobifenile  |
| Benzo[j]fluorantene   | Benzo[b]fluorantene_d12 | Decafluorobifenile  |
| Benzo[e]pirene        | Benzo[a]pirene_d12      | Decafluorobifenile  |
| Benzo[a]pirene        | Benzo[a]pirene_d12      | Decafluorobifenile  |
| Dibenzo[a,h]antracene | Benzo[a]pirene_d12      | Decafluorobifenile  |

## A6. Risultati e discussione

Nelle Figure A1-A8 sono presentati i profili cromatografici acquisiti in modalità Scan e modalità SIM della miscela con gli 8 IPA, della prova bianco metodo, della prova bianco campione e di due campioni con due livelli in contenuto di IPA.

Per ciascuna specie il risultato finale costituito dalla media delle due iniezioni, è normalizzato per il recupero ottenuto dallo standard di processo corrispondente aggiunto al campione (*vedi* Tabella A4) e portato al 100%.

Sul rapporto di prova si riporta il valore dell'incertezza estesa calcolata in base all'approccio Horwitz-Thompson.

La quantità di ciascun IPA nel campione è espressa in  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e il risultato viene espresso senza cifre decimali.

Il risultato finale delle quantità ottenute permette di calcolare ed esprimere il dato relativo all'intero pneumatico.

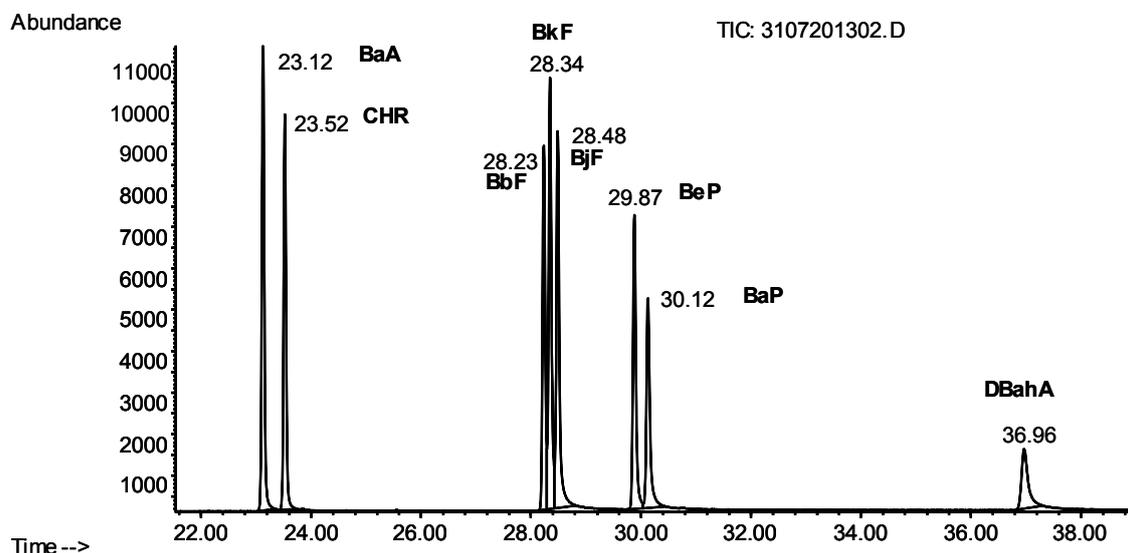
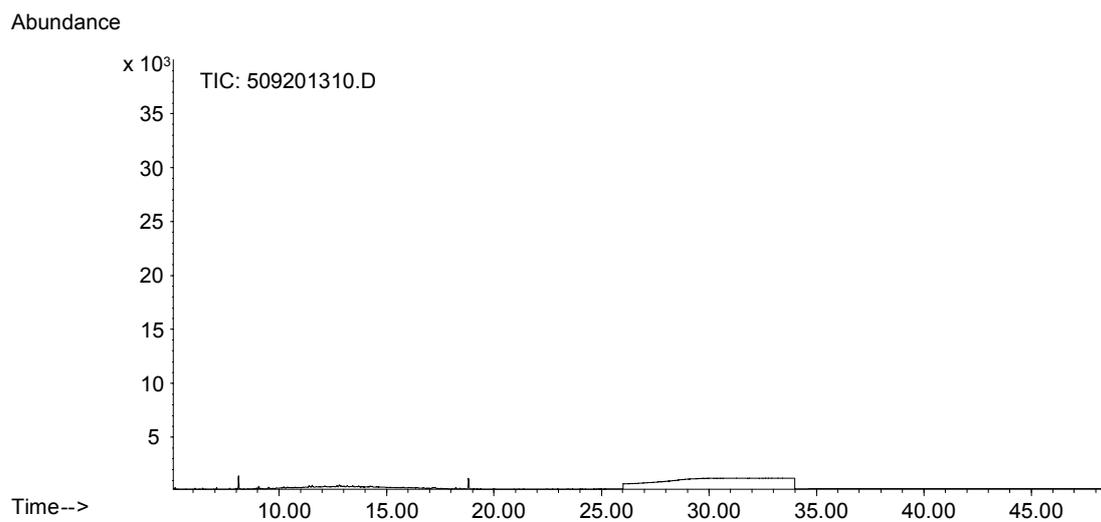
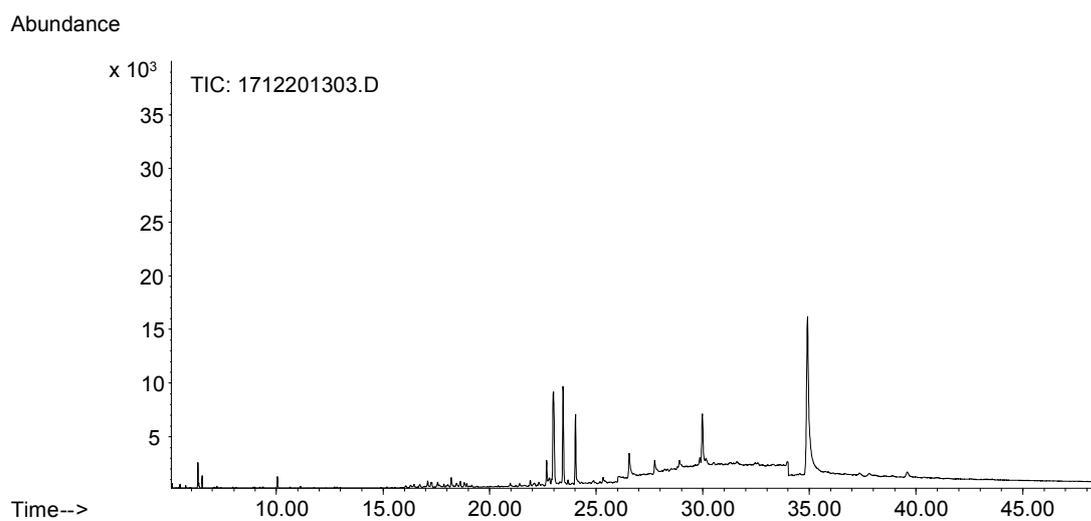


Figura A1. Cromatogramma della miscela degli 8 IPA ottenuto con GC/MS



**Figura A2. Cromatogramma della prova Bianco metodo ottenuto con GC/MS**



**Figura A3. Cromatogramma della prova Bianco matrice ottenuto con GC/MS**

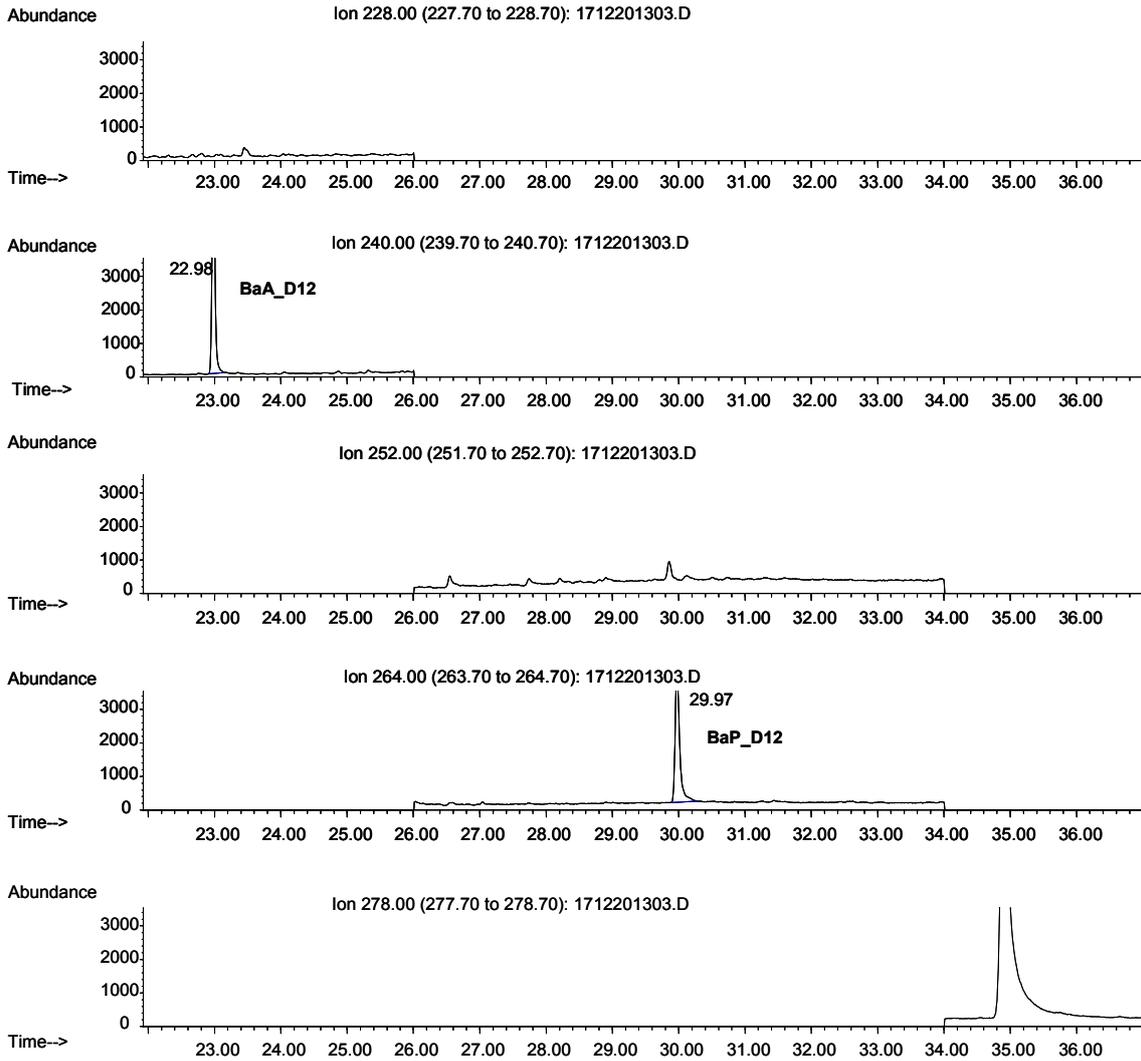


Figura A4. Cromatogramma dei singoli ioni della prova Bianco matrice ottenuto con GC/MS

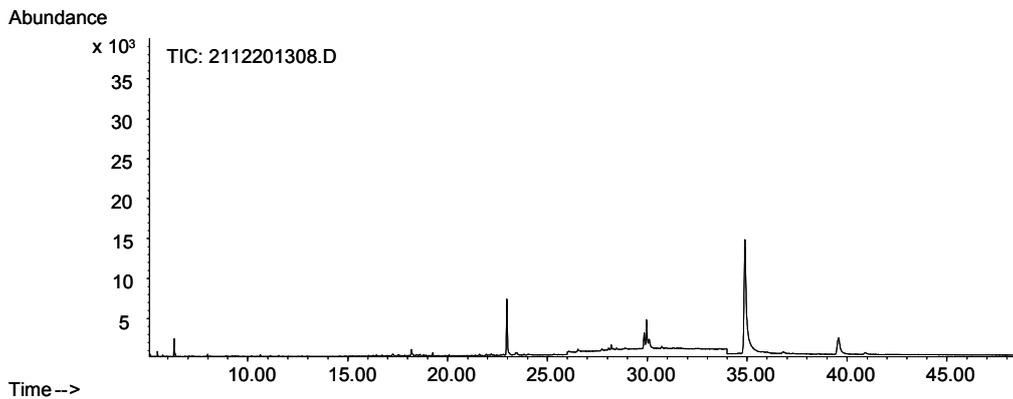


Figura A5. Cromatogramma del campione 1 ottenuto con GC/MS

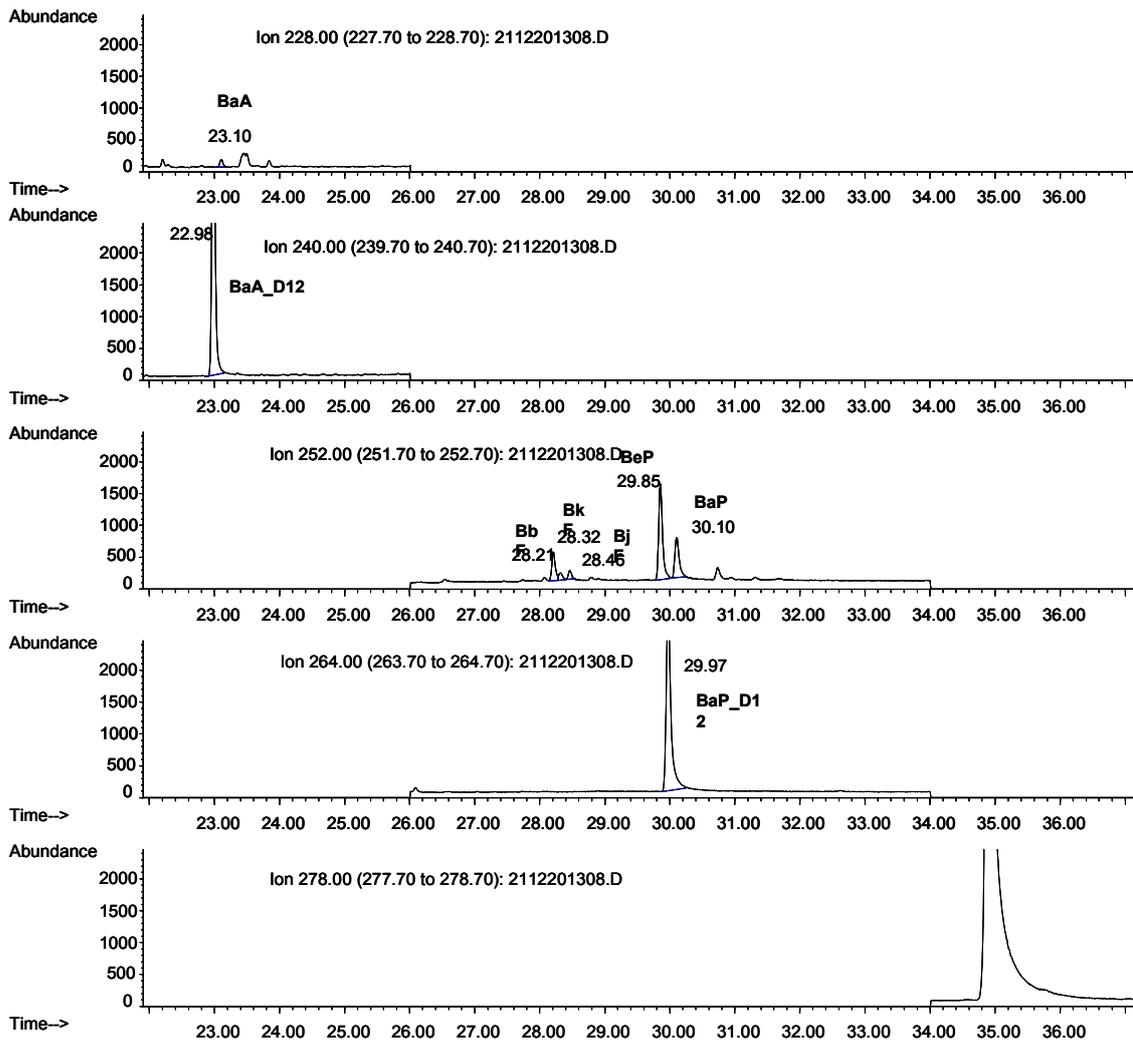


Figura A6. Cromatogramma dei singoli ioni del campione 1 ottenuto con GC/MS

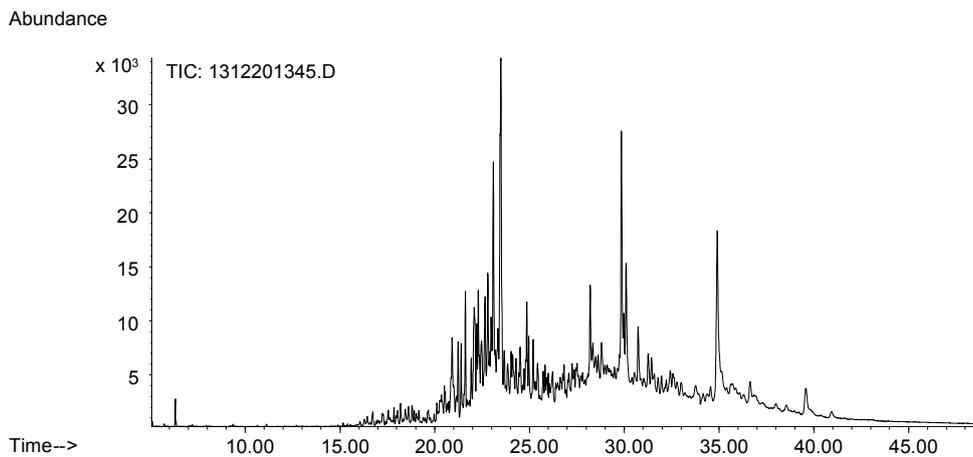


Figura A7. Cromatogramma del campione 2 ottenuto con GC/MS

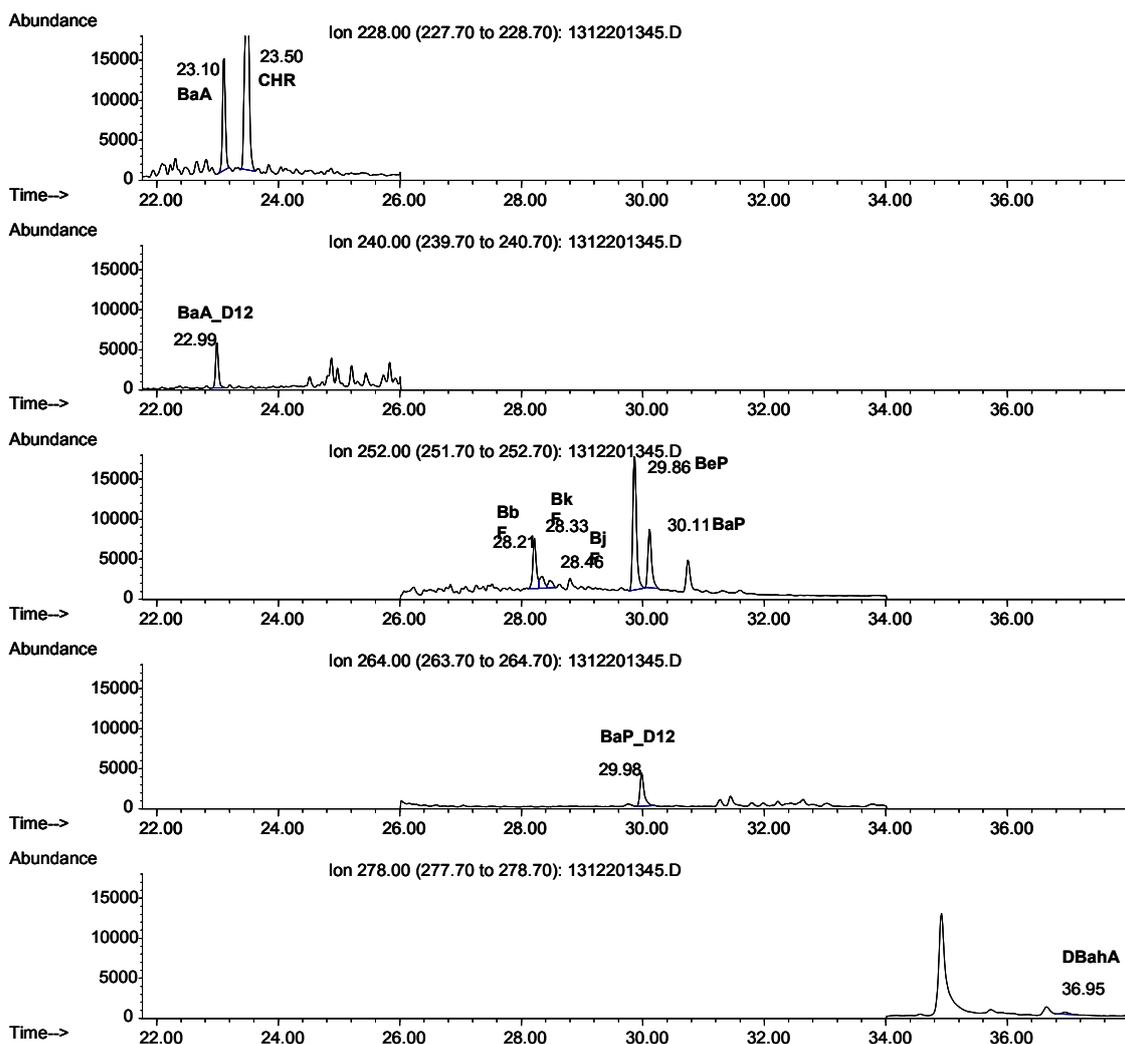


Figura A8. Cromatogramma dei singoli ioni del campione 2 ottenuto con GC/MS

## A7. Conclusioni

Il metodo qui descritto permette la determinazione e la quantificazione degli IPA su matrici complesse come gli pneumatici.

Il confronto con la metodica che ne permette la determinazione dell'aromaticità negli stessi campioni ha dimostrato una correlazione nei dati individuati dai due metodi.

L'opportunità che offre questo metodo è la possibilità di applicazione nei laboratori che hanno disponibili strumentazioni comunemente disponibili come la GC/MS così da permettere la caratterizzazione dei materiali che si ottengono dagli pneumatici dopo il loro primo utilizzo

nonché la quantificazione degli IPA negli oggetti di utilizzo quotidiano che sono realizzate con gomme ottenuti con oli diluenti che contengono queste sostanze.

## A8. Bibliografia

Europa. Regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 18 dicembre 2006, concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH), che istituisce un'Agenzia europea per le sostanze chimiche, che modifica la direttiva 1999/45/CE e che abroga il regolamento (CEE) n. 793/93 del Consiglio e il regolamento (CE) n. 1488/94 della Commissione, nonché la direttiva 76/769/CEE del Consiglio e le direttive della Commissione 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 396 del 30.12.2006.

Europa. Regolamento (CE) N. 552/2009 della Commissione del 22 giugno 2009 recante modifica del regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH) per quanto riguarda l'allegato XVII. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 164 del 26.6.2009

Europa. Regolamento (UE) 2015/326 della Commissione del 2 marzo 2015 recante modifica dell'allegato XVII del regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH) per quanto riguarda gli idrocarburi policiclici aromatici e gli ftalati. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 58 del 3.3.2015

Europa. Regolamento (UE) N. 1272/2013 della Commissione del 6 dicembre 2013 recante modifica dell'allegato XVII del Regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH) per quanto riguarda gli idrocarburi policiclici aromatici. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 328 del 7.12.2013.

ISO 1407:2011. *Rubber – Determination of solvent extract*. Geneva: International Organization for Standardization; 2011.

ISO 21461:2012. *Rubber – Determination of the aromaticity of oil in vulcanized rubber compounds*. Geneva: International Organization for Standardization; 2012.

NEN-EN 16143:2012. *Petroleum products - Determination of content of Benzo(a)pyrene (BaP) and selected polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in extender oils - Procedure using double LC cleaning and GC/MS analysis*. Delft: Netherlands Standardization Institute (NEN); 2012.



**PARTE B**  
**Metodo per la determinazione**  
**del contenuto di Idrocarburi Policiclici Aromatici**  
**negli pneumatici e nelle materie prime correlate**  
**con tecnica di rilevazione HPLC-DAD-FL**



## B1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile agli pneumatici, nuovi o rigenerati e alle materie prime correlate per la determinazione delle seguenti sostanze:

- Benzo[a]pirene (BaP) – CAS 50-32-8
- Benzo[e]pirene (BeP) – CAS 192-97-2
- Benzo[a]antracene (BaA) – CAS 56-55-3
- Crisene (CHR) – CAS 218-01-9
- Benzo[b]fluorantene (BbFA) – CAS 205-99-2
- Benzo[j]fluorantene (BjFA) – CAS 205-82-3
- Benzo[k]fluorantene (BkFA) – CAS 207-08-9
- Dibenzo[a,h]antracene (DBAhA) – CAS 53-70-3.

La normativa di riferimento (regolamento REACH n 1907/2006) non specifica un campo di applicazione quindi in base alle esperienze pregresse su tale tipologia di matrici si è scelto di applicare il metodo ai parametri indicati nella Tabella B1.

Si considera come campo di misura l'intervallo di concentrazione rappresentato dagli estremi della retta di taratura.

**Tabella B1. HPLC-DAD-FL per pneumatici o materie prime correlate: IPA e campo di applicazione**

| Matrice                              | Analita                                     | Campo di applicazione (µg/L) |
|--------------------------------------|---|------------------------------|
| Pneumatici o materie prime correlate | Benzo[a]pirene (BaP) – CAS 50-32-8          | 12,5/250                     |
|                                      | Benzo[e]pirene (BeP) – CAS 192-97-2         | 25/500                       |
|                                      | Benzo[a]antracene (BaA) – CAS 56-55-3       | 12,5/250                     |
|                                      | Crisene (CHR) – CAS 218-01-9                | 25/500                       |
|                                      | Benzo[b]fluorantene (BbFA) – CAS 205-99-2   | 12,5/250                     |
|                                      | Benzo[j]fluorantene (BjFA) – CAS 205-82-3   | 12,5/250                     |
|                                      | Benzo[k]fluorantene (BkFA) – CAS 207-08-9   | 12,5/250                     |
|                                      | Dibenzo[a,h]antracene (DBAhA) – CAS 53-70-3 | 25/500                       |

## B2. Acronimi utilizzati

HPLC-DAD-FL = *High Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detector and Fluorimetric detector*

NMR = *Nuclear Magnetic Resonance*

IPA = Idrocarburi Policiclici Aromatici

R<sup>2</sup> = coefficiente di correlazione della retta di taratura

REACH= Regolamento (CE) 1907/2006

SPE = *Solid-Phase Extraction*

## B3. Materiali e metodi

La metodica analitica si può suddividere in 5 fasi:

- Sezionamento e preparazione del campione;
- Estrazione;
- Prima fase di purificazione;
- Seconda fase di purificazione;
- Determinazione.

### B3.1. Reagenti e vetreria

- Acetone di grado analitico
- n-eptano, per cromatografia
- 2-propanolo, per cromatografia
- Acetonitrile, per HPLC
- Acqua ultrapura per HPLC
- N<sub>2</sub>, purezza > 99,9%
- Materiale di riferimento:
  - Master Standard: standard analitici certificati degli IPA determinati;
  - Standard di processo: Indeno[1,3-c,d]pirene;
- Cartucce Supelclean LC-SI 6 mL 1000 mg (SPE),
- Fase solida adsorbente Sephadex LH 20
- Colonna per fase solida, ID 23 mm, lunghezza 100 mm,
- Normale vetreria da laboratorio.

## B4. Strumentazione

- Coltello e taglierino per pneumatico
- Pinza per pneumatico
- Bilancia analitica, risoluzione 0.1 mg
- Apparecchiatura per l'estrazione Soxhlet
- Evaporatore rotante (rotavapor)
- Sistema per l'evaporazione automatica con flusso di azoto (opzionale)
- Estrattore per la purificazione su fasi solide SPE (Vacuum manifold) (opzionale)
- HPLC cromatografo liquido ad alta pressione, dotato di: autocampionatore, colonna cromatografica Zorbax Eclipse PAH 4,6 x150 mm, 3,5 µm
- Rivelatore a diodi (DAD)
- Rivelatore fluorimetro (FL).

## B5. Modalità operative

### B5.1. Sezionamento e preparazione del campione

Lo pneumatico è un oggetto articolato in più sezioni reso complesso dalla modalità intrinseca di costruzione e realizzazione dello pneumatico stesso.

Nello pneumatico si possono individuare più sezioni di gomma vulcanizzata che possono essere sottoposte ad indagine analitica. Le sezioni devono avere prestazioni fisiche e meccaniche differenti in funzione della parte dello pneumatico in cui sono posizionate.

Si possono distinguere:

- battistrada;
- fianco;
- foglietta e tela di carcassa;
- tallone di riempimento/apice;
- chafer/abrasione striscia gomma;
- sotto-battistrada;
- cinghie in gomma.

Non tutte le sezioni sono sempre presenti ciò è sempre funzione delle caratteristiche e della tipologia di pneumatico.

Il metodo di indagine prevede il sezionamento e prelievo del battistrada.

Con l'utilizzo di un coltello e/o taglierino adatto procedete al sezionamento del battistrada tagliando delle strisce del battistrada di uno spessore di circa 0,1-0,3 mm avendo cura che non ci siano parti estranei allo pneumatico. Le strisce devono essere ridotte in piccoli pezzettini di circa 2 mm<sup>2</sup>.

Dopo il sezionamento, se disponibile un apparecchiatura per il trattamento dei materiali gommosi della azienda Fortuna (<http://www.fortuna-gmbh.de>) o di altre aziende, il processo di realizzazione del campione può essere effettuato con la macchina che possiede frese adeguate alla realizzazione delle strisce di spessore 0,1-0,3 mm partendo da parti di pneumatico con spessore maggiore 1-2 cm.

Le strisce vengono ridotte in piccoli pezzettini di circa 2 mm.

## **B5.2. Estrazione del campione**

Un campione di gomma di pneumatico di circa 3,0 g viene pesato in un ditale per estrazione su una bilancia analitica. La quantità di campione deve consentire di ottenere circa 0,3 g di estratto quantità che consente di svolgere il metodo analitico. Si possono avere campioni con concentrazioni sia molto basse che molto alte in IPA, in questi casi è possibile che l'estrazione debba essere ripetuta.

Il contenitore viene chiuso con ovatta e inserito nell'estrattore Soxhlet per l'estrazione degli IPA.

L'estrattore si collega ad un pallone da 500 mL, mantenuto su una cuffia riscaldante, con aggiunta di 300 mL di acetone.

L'estrazione prosegue per 8 ore, regolando le condizioni di riscaldamento in modo che il solvente distillante riempi la tazza di estrazione almeno 5 volte all'ora.

Terminata l'estrazione, il solvente viene allontanato con un rotavapor a 35°C, l'estratto viene ridotto a piccolo volume e poi trasferito in un palloncino di piccole dimensioni precedentemente tarato, tipicamente il residuo dopo l'evaporazione del solvente è circa 500 mg.

L'estratto viene portato cautamente a secco in corrente di azoto, fino a un peso costante. All'estratto, così stabilizzato, viene aggiunta una quantità di n-eptano al fine di ottenere una soluzione a concentrazione nota di circa 100 mg/mL.

### **B5.3. Purificazione del campione, prima fase**

La prima fase di purificazione viene effettuato con cartucce SPE utilizzando l'estrattore per la purificazione su fasi solide.

Le cartucce prima dell'utilizzazione necessitano di essere condizionate con 10 mL di n-eptano.

Per il trasferimento quantitativo del materiale in cartuccia si utilizzano 0,5 mL di n-eptano poi si inizia la fase di eluizione con ulteriori 25 mL di n-eptano.

Durante l'eluizione il flusso è mantenuto a circa 5 mL/min. L'eluato, raccolto in palloncino a cuore, viene portato a piccolo volume al rotavapor a 35°C e successivamente cautamente a secco con leggero flusso di azoto.

### **B5.4. Purificazione del campione, seconda fase**

La seconda fase di purificazione è effettuata su colonna impaccata con fase adsorbente Sephadex LH 20.

La colonna con la fase adsorbente viene preparata realizzando un impasto di 5 g di Sephadex LH 20 e propanolo, usando un rapporto 3:1 (p/p) tra solvente e fase. La miscela viene lasciata a riposo una notte per la deattivazione della fase solida.

La fase viene trasferita su colonna di vetro dedicata, il diametro della colonna garantisce la corretta velocità di eluizione della miscela nella fase di purificazione che deve essere mantenuta a circa 1 mL/min.

Dopo ogni campione sottoposto alla fase di purificazione la colonna di Sephadex LH 20 viene eluita con 30 mL di isopropanolo per garantirne la rigenerazione completa, scartando il solvente. La fase nella colonna viene mantenuta bagnata dal solvente, chiusa con alluminio e conservata per successivi utilizzi.

Dopo la prima fase di purificazione, il campione, portato a secco, viene disciolto utilizzando 1 mL di 2-propanolo così da permettere il trasferimento della soluzione sulla testa della colonna per la seconda fase. Si utilizzano ulteriori 2 mL di 2-propanolo per trasferimento quantitativo del campione in colonna.

Si inizia la fase di eluizione con il flusso a circa 1 mL/min, la prima frazione, compresa tra 0 e 24 mL di eluizione, è raccolta e scartata. La seconda frazione compresa tra 24 e 70 mL, contenente gli IPA di interesse e gli standard di processo, è raccolta in un palloncino a cuore e successivamente ridotta a piccolo volume con evaporatore rotante a 35°C e portata cautamente a secco sotto leggero flusso di azoto.

Il campione viene disciolto in 2 mL di acetone e trasferito in un vial a fondo conico, utilizzando 1 mL di acetone per trasferimento quantitativo del materiale in cartuccia, quindi portato a secco con leggero flusso di azoto.

Il campione ha completato la fase di purificazione, il residuo viene ripreso con 1 mL di acetonitrile e filtrato su filtro da 0,45 µm.

### **B5.5. Determinazione strumentale**

#### **B5.5.1. Condizioni cromatografiche**

Colonna cromatografica: Zorbax Eclipse PAH (4,6 mm x150 mm; diametro particelle 3,5 µm)

Fase mobile composizione: H<sub>2</sub>O (A), CH<sub>3</sub>CN (B)

Fase mobile gradiente:

**Schema concentrazione di B**

| Tempo | % B |
|-------|-----|
| 0     | 50  |
| 10    | 50  |
| 35    | 100 |
| 80    | 100 |

Volume d'iniezione: 5  $\mu$ L

DAD: Lunghezza d'onda d'acquisizione: 254 nm, bandwidth 4 nm,  
Spectrum range: 210-500 nm

FLD: Lunghezza d'onda d'eccitazione: 238 nm  
Lunghezza d'onda d'emissione: 420 nm per BaA, CHR, BbFA, BeP, BaP, DBahA  
500 nm per BjFA, BkFA

Gain: 14

I tempi di ritenzione e le lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione degli IPA sono riportati nella Tabella B2.

**Tabella B2. Tempi di ritenzione e lunghezze d'onda degli IPA**

| IPA   | Tempo di ritenzione (min) | $\lambda$ eccitazione (nm) | $\lambda$ emissione (nm) |
|-------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|
| BaA   | 27,2                      | 238                        | 420                      |
| CHR   | 28,1                      | 238                        | 420                      |
| BjFA  | 30,4                      | 238                        | 500                      |
| BeP   | 30,6                      | 238                        | 420                      |
| BbFA  | 31,3                      | 238                        | 420                      |
| BkFA  | 32,7                      | 238                        | 500                      |
| BaP   | 33,9                      | 238                        | 420                      |
| DBahA | 35,8                      | 238                        | 420                      |

La scelta di utilizzare per il BkFA la coppia di lunghezza d'onda 238/500 nm è motivata da una risposta molto elevata del BkFA alla coppia 238/420 nm e non allineata a quella degli altri IPA monitorati nelle stesse condizioni.

Si è evidenziato nelle condizioni cromatografiche descritte una parziale coeluizione tra il BjFA e il BeP non risolvibile modificando il gradiente della fase mobile. Il BjFA mostra una risposta specifica alla coppia di lunghezza d'onda 238/500 nm pertanto è stata preferita questa coppia di lunghezza d'onda.

Queste considerazioni comportano una doppia iniezione per ciascun campione/mix standard, però assicurano un'accuratezza di misura per tutti gli analiti.

## **B5.5.2. Preparazione della retta di calibrazione**

### **B5.5.2.1. Conservazione degli standard di calibrazione**

Gli standard certificati concentrati vengono conservati in congelatore a -18°C.

La soluzione madre degli standard denominata IPA-2, conservata in congelatore a -18°C, può essere utilizzata per un periodo di un anno dalla data di preparazione. Le altre soluzioni della retta di calibrazione, conservate con la stessa modalità, possono essere utilizzate per un periodo di sei mesi dalla data di preparazione.

### B5.5.2.2. Preparazione degli standard di calibrazione

- a) Preparazione della soluzione madre di indeno [1,3-c,d] pirene in 10 mL di acetonitrile (100 µg/mL) in qualità di standard di processo.
- b) Preparazione delle soluzioni standard di IPA:
  - IPA-1: soluzione madre a 1000 µg/mL in toluene
  - IPA-2: 100 µL di IPA-1 in 10 mL di acetonitrile (10 µg/mL)

Per la costruzione della retta di calibrazione sono stati utilizzati i seguenti livelli di concentrazione:

- P1: 0,025 µg/mL di ciascun IPA,
- P2: 0,050 µg/mL di ciascun IPA,
- P3: 0,100 µg/mL di ciascun IPA,
- P4: 0,250 µg/mL di ciascun IPA.

Per ottenere i livelli di concentrazione elencati sono state utilizzate le soluzioni madre come indicato in Tabella B3. Tali soluzioni sono state riportate a volume in un matraccio da 10 mL con acetonitrile.

**Tabella B3. Livelli di concentrazione degli standard di lavoro degli IPA per analisi HPLC-DAD-FL**

| Soluzione | P1    | P2    | P3     | P4     |
|-----------|-------|-------|--------|--------|
| IPA-2     | 25 µL | 50 µL | 100 µL | 250 µL |
| STD-2     | 50 µL | 50 µL | 50 µL  | 50 µL  |

### B5.5.3. Preparazione dello standard di controllo

Lo standard di controllo si prepara da una soluzione indipendente rispetto allo standard di taratura utilizzando uno standard certificato conservato in congelatore -18°C per 12 mesi.

Viene preparato per ogni batch di analisi ad una concentrazione intermedia rispetto all'intervallo di calibrazione ed iniettato in doppio.

### B5.5.4. Taratura dello strumento

Il sistema HPLC-DAD-FL viene tarato ogni qualvolta si eseguono delle azioni correttive (es. cambio della colonna o della *safety guard cartridge*) che possono modificare la risposta strumentale oppure quando lo standard di controllo di calibrazione non rientra nei criteri di accettabilità come più avanti specificato.

La retta di calibrazione di ogni analita (regressione lineare) si costruisce su 4 livelli di concentrazione (P1-P4) e ogni punto della curva è iniettato in triplo.

I criteri di accettabilità per la retta di calibrazione sono:

- *Criterio di accettabilità della retta*:  $R^2 \geq 0,99$ .
- *Criterio di accettabilità della sensibilità*: risposta strumentale (area) benzo[a]pirene 0,025 mg/L  $\geq 122$ .

Ad ogni sessione di analisi si inietta lo standard di controllo che permette di verificare la linearità e l'accettabilità della retta di calibrazione.

- *Criterio di accettabilità dello standard di controllo*: si verifica che la concentrazione risultante sia pari alla concentrazione attesa  $\pm 20\%$ .

Se i criteri proposti non vengono rispettati si procede a:

- Tarare nuovamente lo strumento.

- Ripreparare le miscele di taratura e/o di standard di controllo.
- Richiedere un intervento di manutenzione all'assistenza tecnica dello strumento.

La registrazione dell'esito positivo del controllo della taratura sul registro degli interventi dello strumento comprende la verifica della conformità all'uso.

### B5.5.5. Analisi quantitativa

Data la complessità della matrice si ritiene necessaria la presenza di un rivelatore DAD che possa permettere un riconoscimento qualitativo dei singoli analiti da quantificare. Il riconoscimento quindi si basa su:

- il tempo di ritenzione dei singoli analiti nel campione deve rientrare nello 0,15% del tempo di ritenzione dello stesso analita sulla retta di calibrazione;
- lo spettro UV-VIS degli analiti rispetto a quelli registrati su una miscela standard.

La determinazione quantitativa è effettuata a mezzo del rivelatore a fluorescenza per confronto con la retta di taratura registrata iniettando le miscele standard preparate secondo quanto riportato nel paragrafo B.5.5.2. Per concentrazioni superiori al campo di misura individuato dalla taratura, si diluisce opportunamente il campione con acetonitrile.

## B6. Risultati e discussione

Nelle Figure B1-B4 sono presentati i profili cromatografici acquisiti alle due coppie di lunghezze d'onda della miscela con gli 8 IPA e di un campione caratteristico per profilo. Per ciascuna specie il risultato finale costituito dalla media delle due iniezioni, Sul rapporto di prova si riporta il valore dell'incertezza estesa calcolata in base all'approccio Horwitz-Thompson. La quantità di ciascun IPA nel campione è espressa in  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e il risultato viene espresso senza cifre decimali. Il risultato finale delle quantità ottenute permette di calcolare ed esprimere il dato relativo all'intero pneumatico.

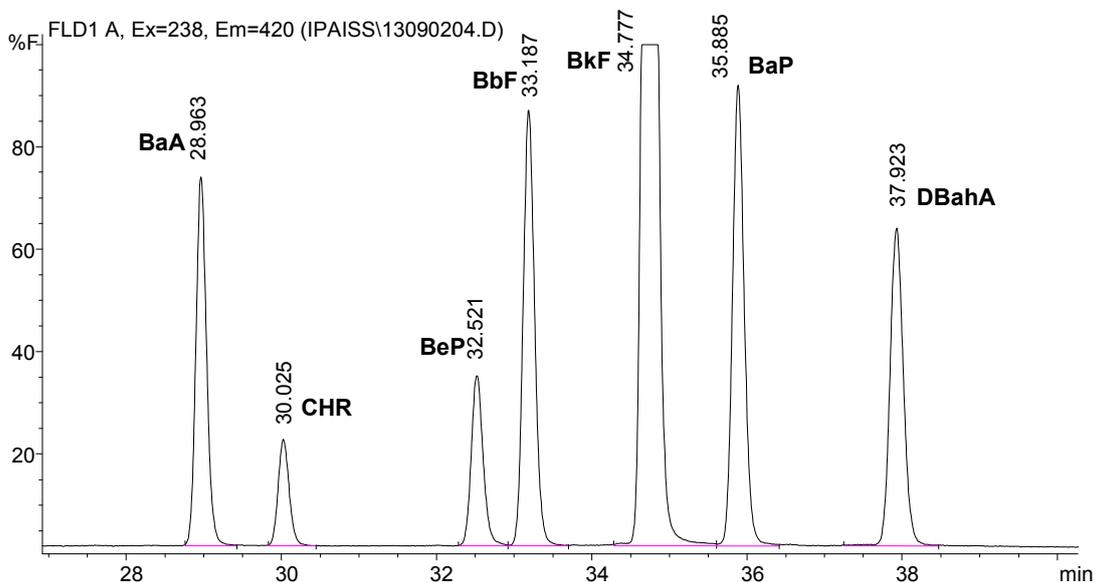
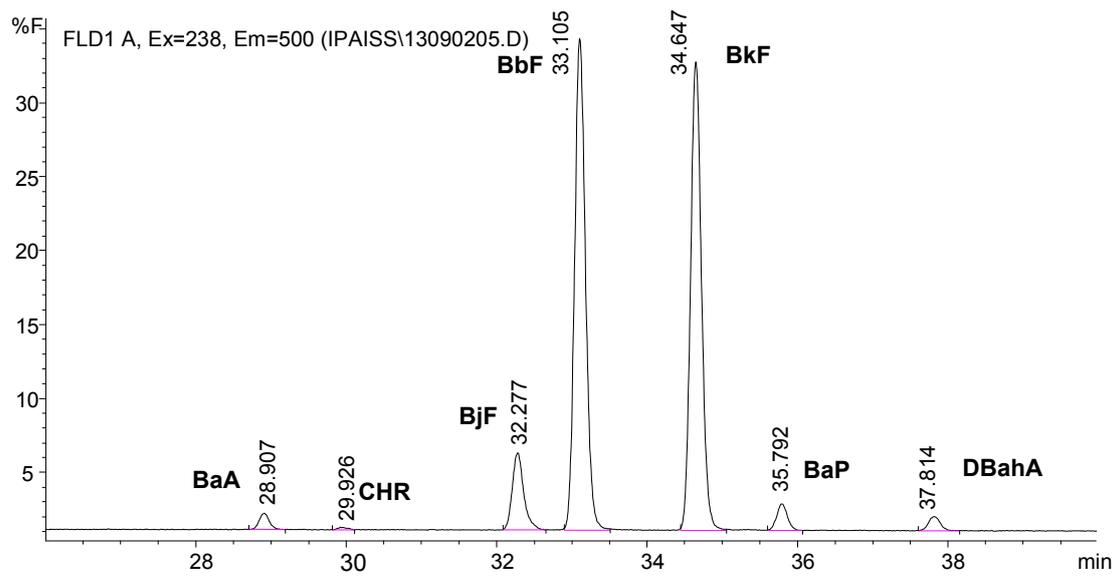
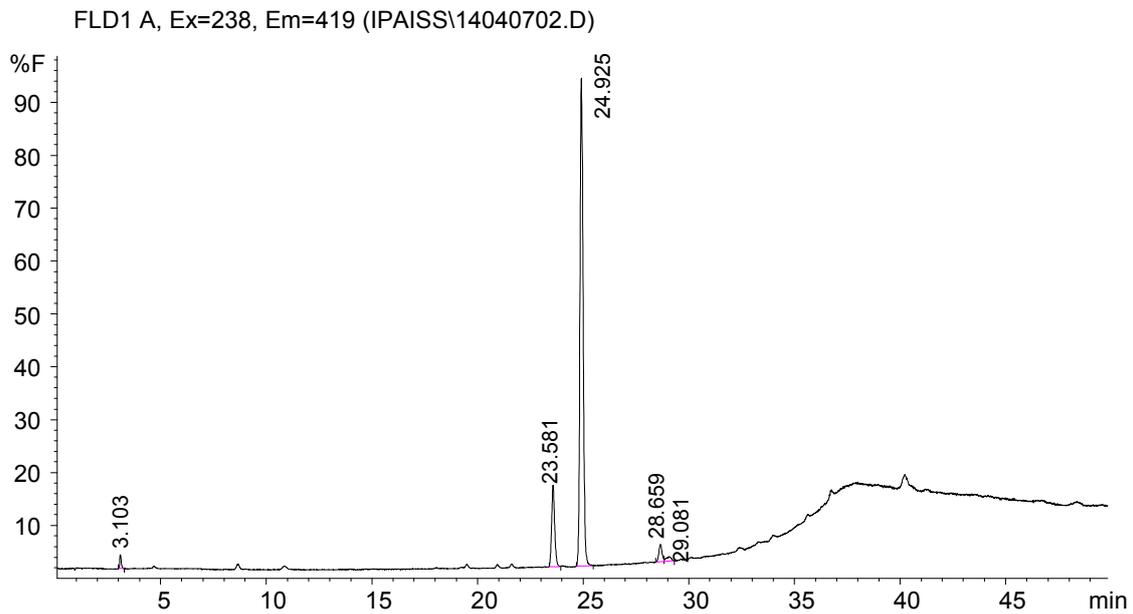


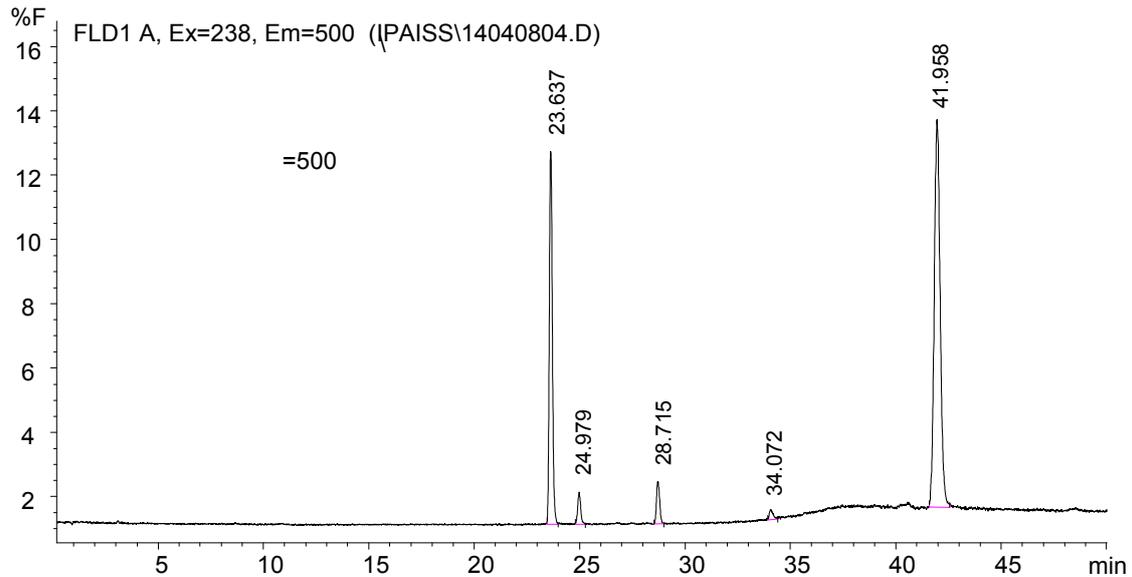
Figura B1. Cromatogramma della miscela degli 8 IPA ottenuto in HPLC-DAD-FL alla coppia di lunghezza d'onda 238/420 nm



**Figura B2. Cromatogramma della miscela degli 8 IPA ottenuto in HPLC-DAD-FL alla coppia di lunghezza d'onda 238/500**



**Figura B3. Cromatogramma di un campione ottenuto in HPLC-DAD-FL alla coppia di lunghezza d'onda 238/420**



**Figura B4. Cromatogramma di un campione ottenuto in HPLC-DAD-FL alla coppia di lunghezza d'onda 238/500**

## B7. Conclusioni

Il metodo qui descritto permette la determinazione e la quantificazione degli IPA su matrici complesse come gli pneumatici.

Il confronto con la metodica che permette la determinazione dell'aromaticità negli stessi campioni ha dimostrato una correlazione nei dati individuati dal metodo qui descritto.

La quantificazione dei singoli IPA consentita dal metodo qui illustrato è importante per comprendere le quantità presenti in ogni campione.

L'opportunità che offre questo metodo è la possibilità di applicazione nei laboratori che hanno disponibili strumentazioni comunemente disponibili come la HPLC-DAD-FL così da permettere la caratterizzazione dei materiali che si ottengono dagli pneumatici dopo il loro primo utilizzo.

## B8. Bibliografia

Europa. Regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 18 dicembre 2006, concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH), che istituisce un'Agenzia europea per le sostanze chimiche, che modifica la direttiva 1999/45/CE e che abroga il regolamento (CEE) n. 793/93 del Consiglio e il regolamento (CE) n. 1488/94 della Commissione, nonché la direttiva 76/769/CEE del Consiglio e le direttive della Commissione 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 396 del 30.12.2006.

Europa. Regolamento (CE) N. 552/2009 della Commissione del 22 giugno 2009 recante modifica del regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio concernente la registrazione, la

valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH) per quanto riguarda l'allegato XVII. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 164 del 26.6.2009.

Europa. Regolamento (UE) 2015/326 della Commissione del 2 marzo 2015 recante modifica dell'allegato XVII del regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH) per quanto riguarda gli idrocarburi policiclici aromatici e gli ftalati. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 58 del 3.3.2015.

Europa. Regolamento (UE) N. 1272/2013 della Commissione del 6 dicembre 2013 recante modifica dell'allegato XVII del Regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH) per quanto riguarda gli idrocarburi policiclici aromatici. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 328 del 7.12.2013.

ISO 1407:2011. *Rubber – Determination of solvent extract*. Geneva: International Organization for Standardization; 2011.

ISO 21461:2012. *Rubber – Determination of the aromaticity of oil in vulcanized rubber compounds*. Geneva: International Organization for Standardization; 2012.

NEN-EN 16143:2012. *Petroleum products - Determination of content of Benzo(a)pyrene (BaP) and selected polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in extender oils - Procedure using double LC cleaning and GC/MS analysis*. Delft: Netherlands Standardization Institute (NEN); 2012.

*Serie Rapporti ISTISAN  
numero di giugno 2016*

*Stampato in proprio  
Settore Attività Editoriali – Istituto Superiore di Sanità*

*Roma, giugno 2016*