

**IL PROGETTO ITALIANO A SUPPORTO DELLE ATTIVITÀ DI CONTROLLO DELLE SOSTANZE PERICOLOSE
NEGLI INCHIOSTRI PER TATUAGGI.
STATO DELL'ARTE E CRITICITÀ NELLE DETERMINAZIONI ANALITICHE NELLE MISCELE PER TATUAGGI**



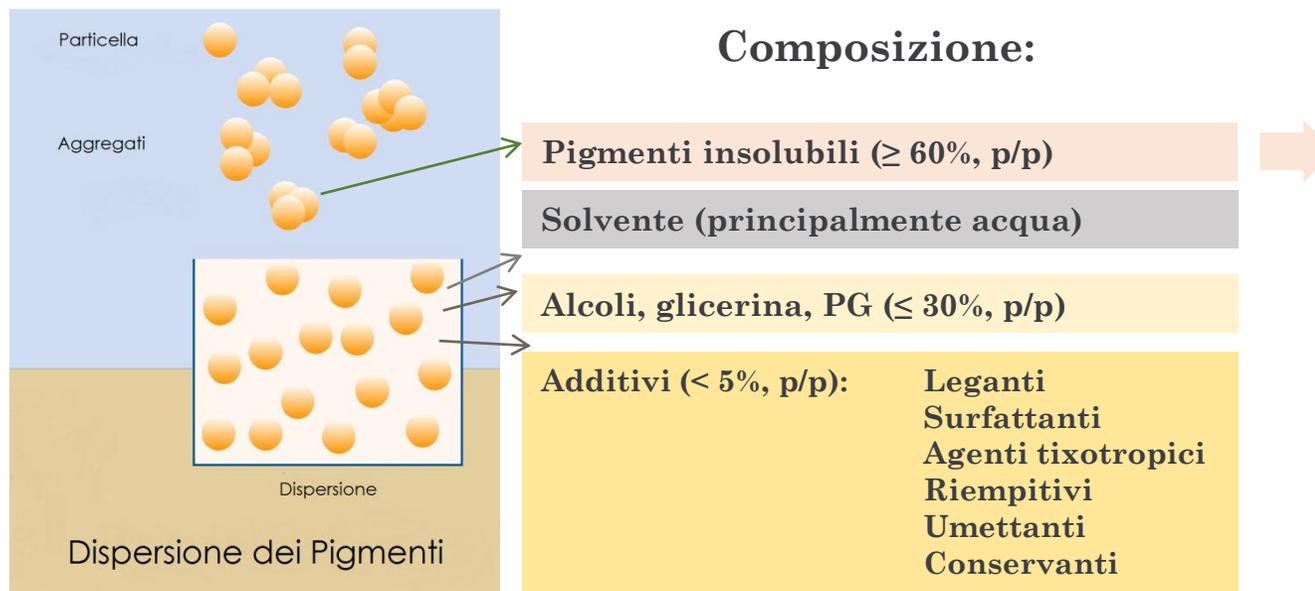
Marco Famele

*Centro Nazionale Sostanze Chimiche, Prodotti
Cosmetici e Protezione del Consumatore
Istituto Superiore di Sanità*



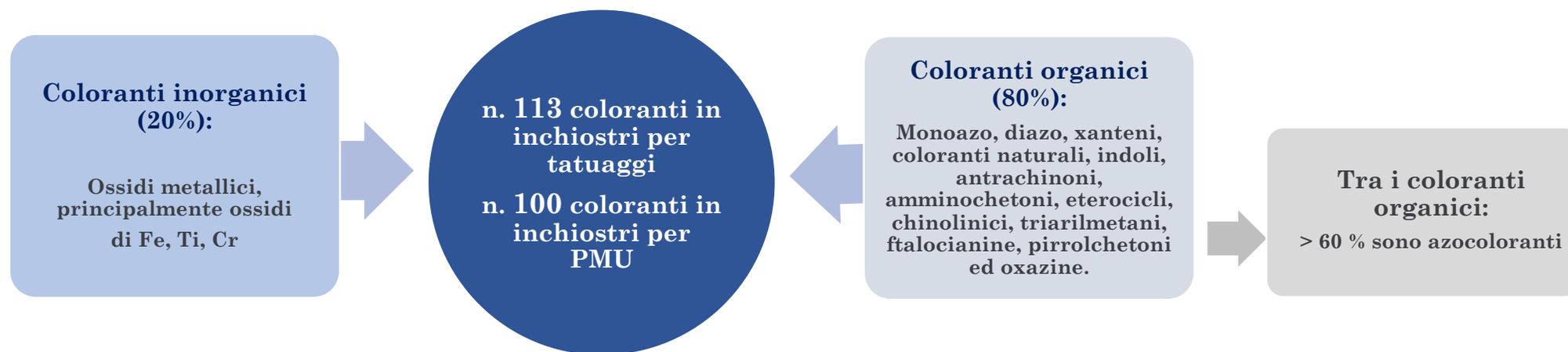
Background

Inchiostri per tatuaggi e PMU: composizione



Elementi particolati (μm o nm ; cristalli o particelle), tipicamente costituiti da una singola sostanza chimica (colorante).

I pigmenti sono responsabili della colorazione e rendono il tatuaggio permanente.



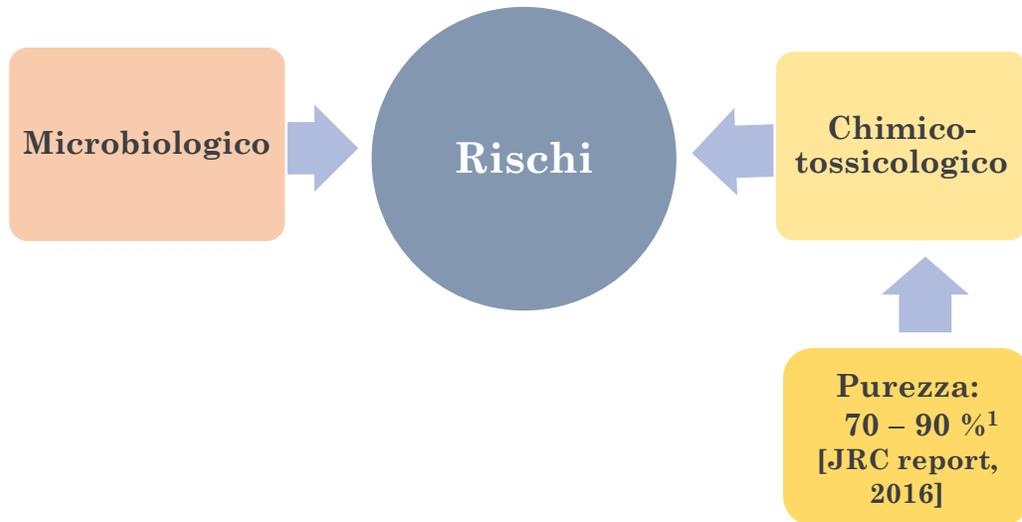
Inchiostri per tatuaggi e PMU: impurezze

Rischi chimici¹ associati a:

I pigmenti utilizzati per tatuaggi e PMU non sono generalmente prodotti espressamente per tale scopo, e dunque non sono testati per il contatto con la pelle e la permanenza nella stessa a lungo termine¹.

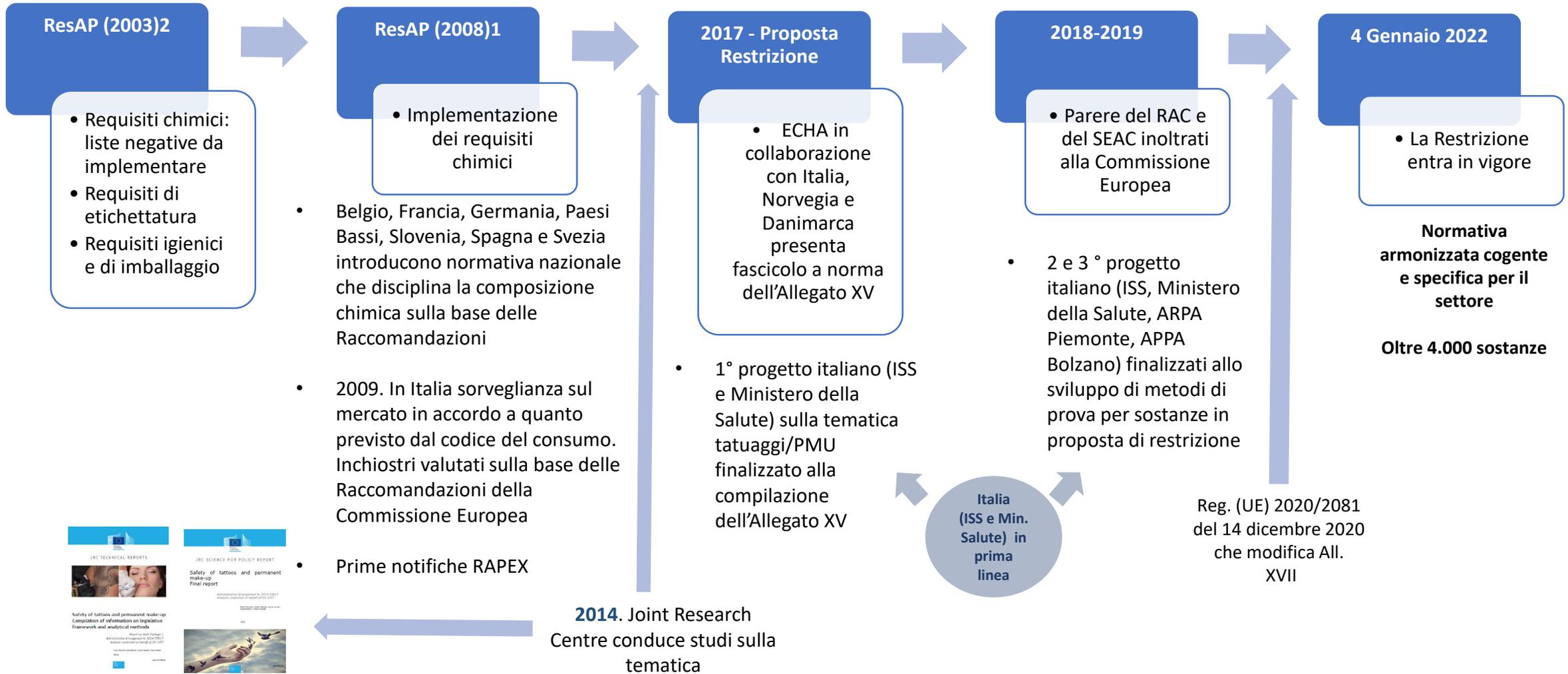
Possono essere pigmenti prodotti per esempio dall'industria tessile, plastica e automobilistica, che vengono poi utilizzati anche come inchiostri per tatuaggi¹.

sostanze con una classificazione armonizzata ai sensi del Regolamento CLP Reg (CE) N. 1272/2008 e classificati come CMR (cancerogeni, mutageni o tossici per la riproduzione) 1A, 1B e 2 o vietati dal Regolamento sui prodotti Cosmetici Reg. (CE) N. 1223/2009 o nelle lista negativa della Risoluzione.



¹ P. Piccinini, S. Pakalin, L. Contor, I. Bianchi, C. Senaldi; Safety of tattoos and permanent make-up. Final report; EUR 27947 EN; doi: 10.2788/011817

I passi verso una normativa armonizzata specifica per gli inchiostri tatuaggi e PMU: dal 2003 al 2022



Tatuaggi e PMU: necessità di un'azione a livello UE per garantire un elevato livello armonizzato di protezione della salute umana



Final Report JRC (2016):

- Assenti GMP per la produzione di inchiostri
- Assenti linee-guida per la valutazione del rischio. Mancanza di dati su valutazione del rischio per coloranti (incluso fototossicità, livelli di assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione, DNEL)
- Necessità di disporre metodi analitici armonizzati tra SM per garantire risultati riproducibili e consentire l'implementazione dei requisiti previsti dalla legislazione in vigore nei SM.
- Proseguire con le attività di sorveglianza sul mercato per identificare prodotti pericolosi (anche vendita *on-line*)
- Incrementare le campagne informative sui rischi per potenziali clienti, in particolare focalizzandosi su adolescenti/giovani garantendo loro una scelta consapevole ed informata.
- Corsi di Formazione per tatuatori obbligatori
- Altamente raccomandato: lineeguida armonizzate sulle pratiche di igiene e attività di ispezione presso gli studi dei tatuatori
- Fermare il fenomeno della pratica del tatuaggio illegale

rischi per la salute umana dovuti a esposizione a sostanze chimiche pericolose contenute negli inchiostri non controllati in modo adeguato



Necessità di un'azione a livello dell'UE al di là delle misure nazionali già in vigore in alcuni SM e delle misure basate sugli obblighi generali di sicurezza stabiliti nella direttiva 2001/95/CE:



ottenere un elevato livello armonizzato di protezione della salute umana e di libera circolazione delle merci all'interno dell'Unione.

ResAP(2008)1: La risoluzione del consiglio d'Europa sui requisiti e criteri per la sicurezza dei tatuaggi e del trucco permanente



ResAp(2008)1

La Risoluzione² intende:

- aggiornare la lista delle sostanze il cui uso è vietato nella formulazione dei tatuaggi e PMU
- fornire precise indicazioni sui limiti consentiti dei livelli di impurezza
- regolamentare metodi analitici per la determinazione e l'analisi delle ammine aromatiche.

Sostanze vietate:

n. 27 Ammine aromatiche

n. 35 Coloranti

Sostanze con limiti consentiti:

n. 13 Elementi chimici

Σ IPA e Benzo[a]pirene

Tab 1, ResAp(2008)1

Numero CAS	Sostanza	Numero CAS	Sostanza
293733-21-8	6-amino-2-ethoxynaphthaline	119-93-7	3,3'-dimethylbenzidine
--	4-amino-3-fluorophenol	120-71-8	6-methoxy-m-toluidine
60-09-3	4-aminoazobenzene	615-05-4	4-methoxy-m-phenylenediamine
97-56-3	o-aminoazotoluene	101-14-4	4,4'-methylenebis(2-chloroaniline)
90-04-4	o-anisidine	101-77-9	4,4'-methylenedianiline
92-87-5	Benzidine	838-88-0	4,4'-methylenedi-o-toluidine
92-67-1	Biphenyl-4-ylamine	95-80-7	4-methyl-m-phenylenediamine
106-47-8	4-chloroaniline	91-59-8	2-naphtylamine
95-69-2	4-chloro-o-toluidine	99-55-8	5-nitro-o-toluidine
91-94-1	3,3'-d-dichlorobenzidine	106-50-3	Para-phenylenediamine
119-90-4	3,3'-dimethoxybenzidine	139-65-1	4,4'-thiodianiline
101-80-4	4,4' - oxydianiline	95-53-4	o-toluidine
137-17-7	2,4,5-trimethylaniline	87-62-7	2,6-xylydine
95-68-1	2,4-xylydine	--	--

Tab 2, ResAp(2008)1

Nome CI	Numero CAS	Nome CI	Numero CAS	Nome CI	Numero CAS
Acid Green 16	12768-78-4	Disperse Red 1	2872-52-8	Basic Violet 10	81-88-9
Acid Red 26	3761-53-3	Disperse Red 17	3179-89-3	Basic Violet 3	548-62-9
Acid Violet 17	4129-84-4	Disperse Yellow 3	2832-40-8	Disperse Blue 1	2475-45-8
Acid Violet 49	1694-09-3	Disperse Yellow 9	6373-73-5	Disperse Blue 106	12223-01-7
Acid Yellow 36	587-98-4	Pigment Orange 5	3468-63-1	Disperse Blue 124	61951-51-7
Basic Blue 7	2390-60-5	Pigment Red 53	2092-56-0	Disperse Blue 3	2475-46-9
Basic Green 1	633-03-4	Pigment Violet 3	1325-82-2	Disperse Blue 35	12222-75-2
Basic Red 1	989-38-8	Pigment Violet 39	64070-98-0	Disperse Orange 3	730-40-5
Basic Red 9	569-61-9	Solvent Blue 35	17354-14-2	Solvent Yellow 3	97-56-3
Basic Violet 1	8004-87-3	Solvent Orange 7	3118-97-6	Disperse Orange 37	12223-33-5
Solvent Red 49	509-34-2	Solvent Red 24	85-83-6	Solvent Violet 9	467-63-0
Solvent Yellow 1	60-09-3	Solvent Yellow 2	60-11-7	---	---

Tab 3, ResAp(2008)1

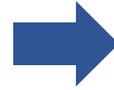
Elemento	Limiti consentiti (ppm)
As	2
Ba	50
Cd	0.2
Co	25
Cr (VI)	0.2
Cu solubile	25
Hg	0.2
Ni	As low as technically achievable
Pb	2
Se	2
Sb	2
Sn	50
Zn	50
As	2

Sostanza	Limiti consentiti
IPA	0,5 ppm
BaP	5 ppb

²https://search.coe.int/cm/Pages/result_details.aspx?ObjectID=09000016805d3dc4

Attività di sorveglianza sul mercato in Italia

Le miscele immesse sul mercato destinate alle pratiche di tatuaggio rientrano nell'ambito di applicazione del Codice del Consumo



è consentito immettere sul mercato soltanto prodotti sicuri.



In assenza di una specifica normativa nazionale a tutela della salute pubblica viene applicato l'articolo 105 del Dlgs 206/2005 (**Codice del Consumo**) comma 3 e comma 4:

«la sicurezza del prodotto è valutata [...] in base alle raccomandazioni della Commissione europea relative ad orientamenti sulla valutazione della sicurezza dei prodotti. Le Autorità competenti adottano le misure necessarie per limitare o impedire l'immissione sul mercato o chiedere il ritiro o il richiamo dal mercato del prodotto, se questo si rivela, nonostante la conformità, pericoloso per la salute e per la sicurezza del consumatore».

Raccomandazioni
della Risoluzione



Ritiro e richiamo
degli inchiostri
non sicuri

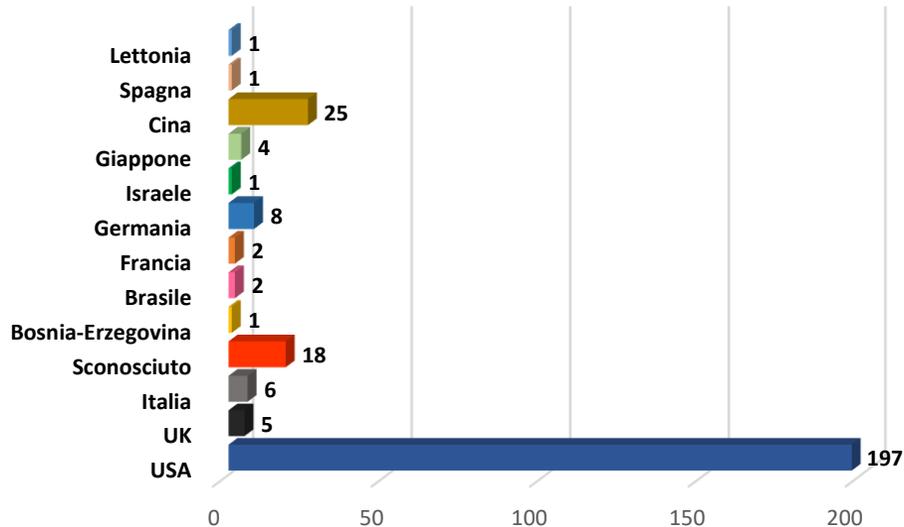


Notifiche
RAPEX

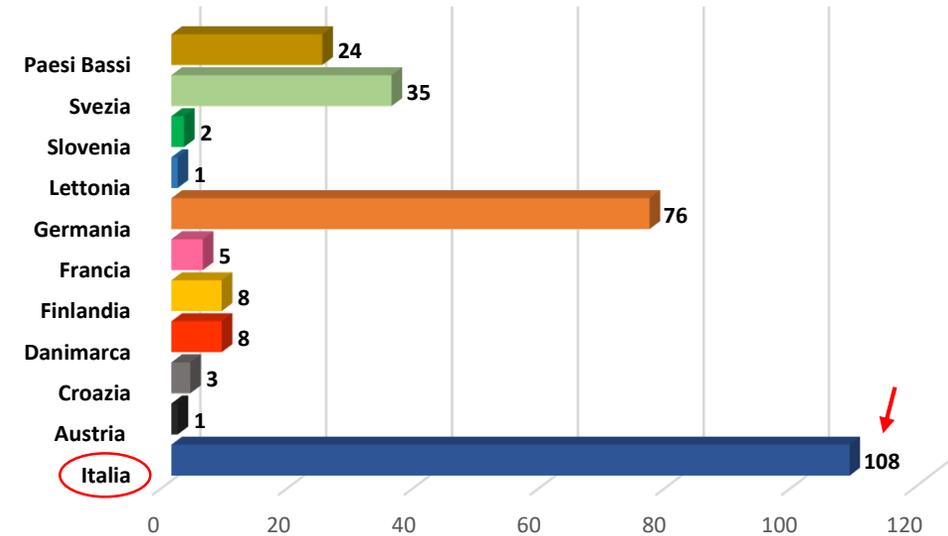
Sorveglianza sul mercato in Europa: RAPEX (1/2)

n. 271 notifiche RAPEX sottomesse per inchiostri per tatuaggi e PMU a partire dal 2007 ad oggi, categoria «rischio chimico» per non conformità alla Risoluzione:

Paese di produzione degli inchiostri notificati da SM in Europa



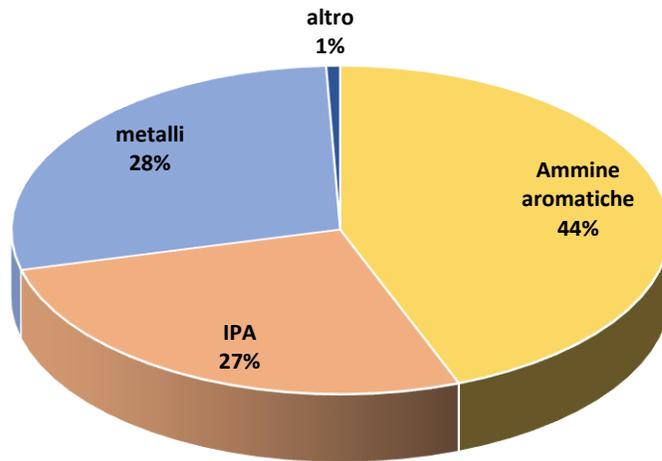
Notifiche per paesi notificanti



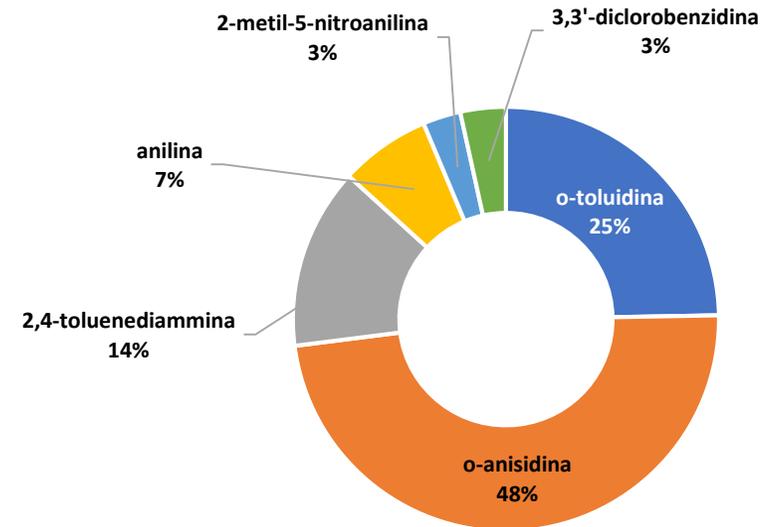
Sorveglianza sul mercato in Europa: RAPEX (2/2)

n. 271 notifiche RAPEX sottomesse per inchiostri per tatuaggi e PMU a partire dal 2007 ad oggi, categoria «rischio chimico» per non conformità alla Risoluzione:

Notifiche per tipologia sostanze chimiche



Ammine aromatiche primarie notificate



Metodi analitici a garanzia dell'applicabilità del Codice del Consumo e della nuova restrizione REACH

Sorveglianza sul mercato a partire dal 2008

Requisiti ResAP: per SM che hanno adottato normative conformemente ai requisiti ResAP

Nuova Restrizione REACH di prossima entrata in vigore (04/01/2022)

Nuovi limiti di concentrazione, nuove (e numerose) sostanze
Nuove sostanze possono aggiungersi in futuro alla restrizione



**Disponibili
metodi analitici idonei allo scopo?**



Nuova misura regolatoria
Nuove concentrazioni limite/Nuove sostanze = nuovi metodi analitici?

Assenza di metodi standardizzati ISO e EN specifici per l'analisi degli inchiostri

Già nel 2008...

Risoluzione ResAP(2008)1



Raccomanda n. 2 metodi analitici per l'analisi delle ammine aromatiche

Tentativo di armonizzazione dei metodi



Metodo tab 4. a – b ResAp(2008)1 basato su **TESSUTI**

EN 14362-1 "Metodo per la determinazione di particolari ammine aromatiche derivate da coloranti azoici. Parte 1: rilevamento dell'utilizzo di particolari coloranti azoici individuabili con o senza estrazione"



Ammine totali

matrice «*inchiostro per tatuaggio*»
8 AA
GC/MS
Recuperi: 65 – 114,2 %
r: 3,1 – 9,4 %

Tecniche analitiche: GC/MS o HPLC/MS o HPLC/MS/MS



Metodo tab 4. c ResAp(2008)1 basato su **GIOCATTOLI**

EN 71-7 "Sicurezza dei giocattoli - Pitture a dito - Requisiti e metodi di prova"



Ammine totali e Ammine libere

Dati di validazione assenti
LC/MS

Condizioni cromatografiche da Hauri et al., 2005

Assenza di metodi standardizzati ISO e EN specifici per l'analisi degli inchiostri

Già nel 2008...

Risoluzione ResAP(2008)1



Raccomanda n. 2 metodi analitici per l'analisi delle ammine aromatiche

Survey del JRC (2014)



Table 7.2: List of available international standard methods by chemical classes.

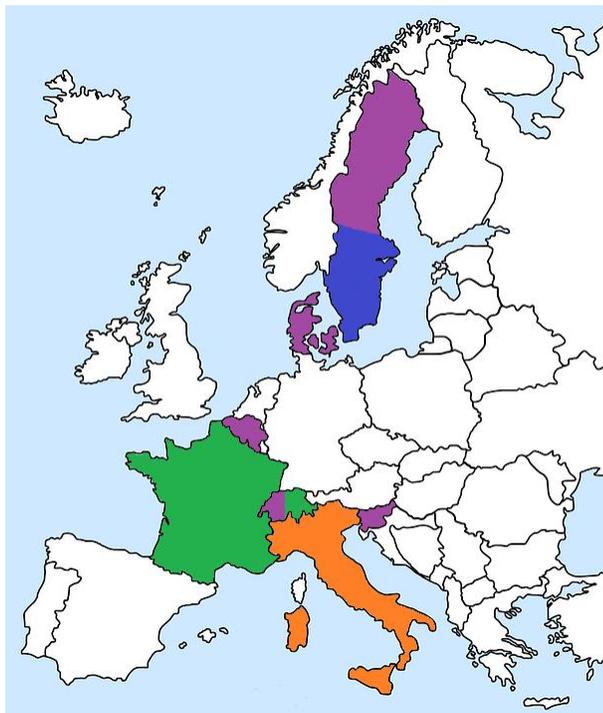
Field of application	Analytical technique(s)	Adapted to the analysis of tattoo inks
AROMATIC AMINES		
EN 71-11:2005	Toys	GC-MS
EN ISO 17234-1:2010	Leather	GC-MS
EN ISO 17234-2:2011	Leather	HPLC-DAD; HPLC/DAD/MS; CE/DAD; TLC; HPTLC
EN 14382-1:2012 (corresponding to ISO 24382-1:2014)	Textiles	HPTLC; HPLC-DAD or HPLC-MS; GC-FID or GC-MS; CE-DAD
EN 14382-3:2012 (corresponding to ISO 24382-3:2014)	Textiles	GC-MS; HPLC-DAD
EN 71-7:2014	Toys	GC-MS; HPLC-DAD
PAH		
EN 71-7:2014	Toys	GC-MS
CEN/TS 16621:2014	Food	HPLC-FD
COLORANTS		
EN 71-11:2005	Toys	HPLC-DAD; HPLC-MS
EN ISO 16373-2:2014	Textiles	HPLC-DAD; HPLC-MS
EN ISO 16373-3:2014	Textiles	HPLC-DAD; HPLC-MS
PHTALATES		
EN 16521:2014	Cosmetics	GC/MS
EN ISO 14389:2014	Textiles	GC/MS
ISO 8124-6:2014	Toys	
NITROSAMINES		
ISO 10130:2009	Cosmetics	HPLC
EN 71-12:2013	Toys	HPLC-MS/MS
ISO 15819:2014	Cosmetics	HPLC-MS-MS

INORGANIC IMPURITIES			
EN 13806:2002	Food	CVAAS (Hg)	Germany
EN 14082:2003	Food	AAS	
EN 14083:2003	Food	GFAAS (Pb, Cd, Cr, Mo)	Germany
EN 14084:2003	Food	AAS	
EN ISO 17294-2:2003	Water	ICP-MS	Austria and Sweden
EN 14332:2004	Food	GFAAS	
EN 14546:2005	Food	HGAAS	
EN 14627:2005	Food	HGAAS	
EN 15111:2007	Food	ICP-MS	
EN ISO 5398-1:2007	Leather	Titration	
EN ISO 5398-3:2007	Leather	AAS	
EN ISO 5398-4:2007	Leather	ICP-OES	
EN ISO 11885:2007	Water	ICP-OES (Total metal content)	Sweden
EN ISO 17075:2007	Leather		
EN 15517:2008	Food	HGAAS	
EN 15505:2008	Food	AAS	
EN ISO 5398-2:2009	Leather	Colorimetry	
EN 15763:2009	Food	ICP-MS (As, Cd, Hg, Pb)	Austria
EN 15764:2009	Food	FAAS; GFAAS	
EN 15765:2009	Food	ICP-MS	
EN ISO 17072-1:2011	Leather	ICP; AAS; SFA (All metals extractable in an acidic perspiration solution)	Italy
EN ISO 17072-2:2011	Leather	ICP; AAS; SFA (Total metal content)	Italy
EN ISO 12846:2012	Water	AAS (Hg)	
ISO/TR 17276:2014	Cosmetics		
EN 71-3:2013+A1:2014 (see also ISO 8124-3:2010)	Toys	ICP-MS; ICP-OES; CVAAS; GC-MS (General elements, Cr (III and VI), Sn)	
EN 13805:2014	Food		
EPA 3051A (and EPA 3051)	Environment	FLAAS, GFAA, ICP-AES, ICP-MS (Total metal content)	Italy
EPA 3052	Environment	FLAA, CVAA, GFAA, ICP-AES, ICP-MS (Total metal content)	Italy
EPA 3060A	Environment	Ion Chromatography with ICP-MS detection; HPLC-ICP-MS; CE-ICP-MS (Cr(VI))	Italy
EPA 218.7	Environment	Ion chromatography (Cr(VI))	Italy

Metodi standardizzati ISO e EN o interni adattati alla matrice inchiostri dagli SM (JRC 2016)

AMMINE AROMATICHE

Metodi basati su norme internazionali usati dagli SM



EN 14362-1 – Tessuti
EN 71-7 - Giocattoli
EN 14362-3 – Tessuti
EN ISO 17234-1 - Cuio

METALLI PESANTI

Metodi di prova utilizzati dagli SM

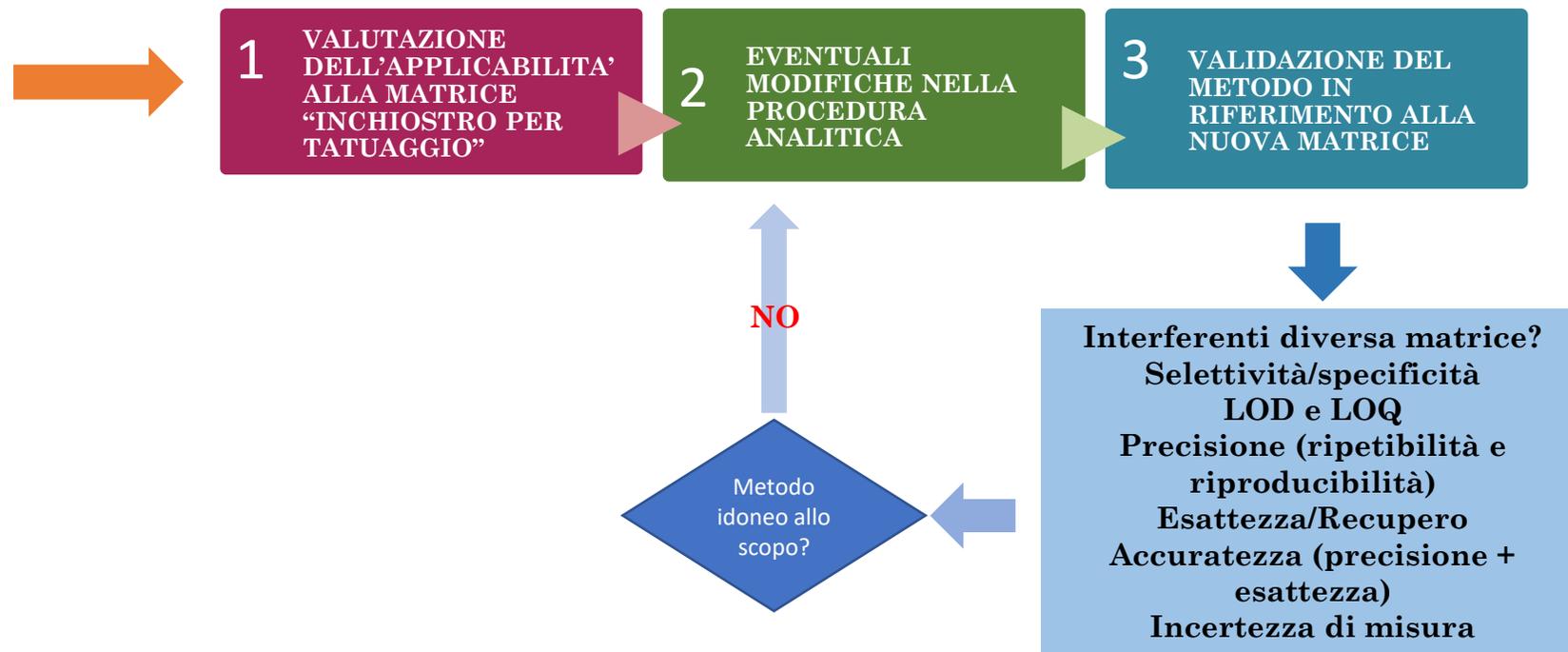


EPA (3051A; EPA 3052; EPA 3060A; 218.7) - matrici ambientali
EN ISO 17072-1 - cuio
EN ISO 17072-2 - cuio
EN 13806 – matrici alimentari
EN 14083 – matrici alimentari
ISO 17294-2 – matrici ambientali
EN ISO 11885 – matrici ambientali
EN 15763 – matrici alimentari
Metodo interno in ICP/MS

Valutazione applicabilità di metodi di prova esistenti per altre matrici agli inchiostri

Metodi applicati ad altre matrici possono richiedere “aggiustamenti” o modifiche sostanziali (variazioni delle condizioni cromatografiche, variazione tipologia/quantità reagente/i, diversa procedura preparativa)

Costi e tempi relativamente variabili, attività complessa da parte del laboratorio



Limiti di concentrazione previsti da restrizione REACH

Reg. (UE) 2020/2081 del 14 dicembre 2020:

l'allegato XVII del regolamento (CE) n. 1907/2006 è modificato con l'aggiunta della voce 75



- Restrizioni per oltre 4000 sostanze.
- Limiti di concentrazione per le sostanze in base alla loro classificazione di pericolo armonizzata Reg. CLP o se presenti in allegato II Reg 1223/2009 (cosmetici)
- Appendice 13 «Elenco delle sostanze con limiti di concentrazione specifici»
- Applicazione del limite di concentrazione più rigido
- info in etichetta obbligatori (elenco ingredienti, regolatori di pH, avvertenze e istruzioni)

Inoltre la restrizione riguarderà ...

anche le sostanze che in **futuro saranno classificate nelle rispettive classi di pericolo nell'allegato VI**, parte 3, del Reg. CLP a seguito di una modifica di tale parte con la quale si aggiunge o modifica la classificazione di una sostanza.

E le sostanze che saranno **inserite in futuro nell'allegato II o nell'allegato IV del regolamento (CE) n. 1223/2009** a seguito di una modifica di tali allegati con la quale viene aggiunta all'elenco una sostanza o ne viene modificata la classificazione.



Nuovi metodi per nuove sostanze in futuro



L'iniziativa italiana: attività sperimentali su inchiostri per tatuaggi e PMU

Italia: progetti su tatuaggi e PMU

Istituzioni coinvolte:



Ministero della Salute

Autorità competente
REACH

Finanziatore dei progetti



Centro Nazionale Sostanze Chimiche, Prodotti Cosmetici e Protezione Consumatore (CNSC)

designato dall'Autorità competente
REACH quale Laboratorio nazionale di
riferimento in materia di REACH e CLP
(Accordo Stato Regioni n.88 del 7
maggio 2015)

Tra le varie attività, esecuzione di
attività sperimentali



ARPA Piemonte e APPA Bolzano

n.2 laboratori ufficiali deputati a svolgere controlli
analitici ai sensi del regolamento REACH.

Le due Agenzie hanno acquisito negli anni esperienza
nelle determinazioni analitiche di talune sostanze
negli inchiostri per tatuaggi e condotto relativi
controlli sugli inchiostri disponibili sul mercato italiano

esecuzione di attività sperimentali

Italia: progetti su tatuaggi e PMU

2017-
2018

«Valutazione dei rischi per la salute umana delle sostanze presenti negli inchiostri per tatuaggi e trucco permanente (PMU) ed esame dei metodi analitici disponibili per la determinazione di talune sostanze pericolose contenute negli stessi inchiostri»

Tra i vari obiettivi:

- Supporto da parte dell'Italia alla redazione della proposta di restrizione per limitare l'uso di talune sostanze pericolose e impurezze negli inchiostri. Dossier preparato in accordo all'Allegato XV del Reg. REACH (CE) N. 1907/2006



2018-
2019

«Sviluppo e validazione di metodi analitici per la determinazione di sostanze pericolose negli inchiostri per tatuaggi e trucco permanente»

Tra i vari obiettivi:

- Sviluppare e validare metodi di prova idonei allo scopo per l'identificazione/quantificazione delle sostanze inserite nella proposta di restrizione.

Ftalati e PAA

Metodi analitici a supporto dell'enforcement della restrizione REACH in via d'adozione:

- Metodi di prova come strumento per verificare se gli inchiostri disponibili sul mercato siano conformi alla restrizione in via d'adozione

In corso

2020-
2021

«Sviluppo e validazione di metodi per la quantificazione di sostanze pericolose negli inchiostri per tatuaggi e trucco permanente nei controlli ufficiali finalizzati all'implementazione della prossima restrizione REACH»

Attività analitiche estese ad altre classi di sostanze chimiche

Sviluppo e validazione di metodi analitici per l'identificazione/quantificazione di:

Coloranti, IPA e conservanti

Progetto 2018-2019 «Sviluppo e validazione di metodi analitici per la determinazione di sostanze pericolose negli inchiostri per tatuaggi e PMU»

Obiettivo 1

Valutazione dei metodi analitici disponibili per la determinazione di AA primarie in inchiostri per tatuaggi/PMU. Validazione di un metodo di prova da utilizzare ai fini del controllo. Confronto interlaboratorio.

Obiettivo 2

Valutazione applicabilità di metodi analitici per la determinazione di ftalati/altre matrici (es. prodotti cosmetici) su inchiostri per tatuaggi/PMU. Sviluppo e validazione di un metodo in GC/MS.

Obiettivo 3

Costituzione di un gruppo di lavoro internazionale per favorire il confronto su aspetti tecnico-scientifici a supporto dell'applicazione delle nuove misure regolatorie sugli inchiostri. Affrontare criticità rilevate nell'ambito delle attività sperimentali

Ammine aromatiche primarie

Ftalati



Sostanze oggetto d'indagine - Progetto 2018-2019

n. 11 FTALATI

Nome	N. CAS	Class. arm. All.VI CLP
Benzilbutilftalato (BBP)	85-68-7	Repr. 1B
Ftalato di dibutile (DBP)	84-74-2	Repr. 1B
Ftalato di bis (2-etilesile) (DEHP)	117-81-7	Repr. 1B
Di-n-octyl phthalate (DNOP)	117-84-0	Repr. 2 (autoclassificazione)
Diisononyl phthalate (DINP)	28553-12-0, 68515-48-0	Repr. 2 (autoclassificazione)
Diisodecyl phthalate (DIDP)	26761-40-0, 68515-49-1	Skin Irrit. 2 Eye Irrit. 2 (autoclassificazione)
Ftalato di bis(2-metossietile) DMEP	117-82-8	Repr. 1B
di-n-pentilftalato (DPP) Diisopentilftalato (DiPP)	131-18-0, 605-50-5	Repr. 1B
ftalato di diesile (DnHP)	84-75-3	Repr. 1B
Diisobutyl phthalate (DIBP)	84-69-5	Repr. 1B

n. 21 AA estese nel corso del progetto a n. 29

Nome	N. CAS	Class. arm. All.VI CLP	Nome	N. CAS	Class. arm. All.VI CLP
4-aminoazobenzene	60-09-3	Carc. 1B	4-chloro-2-methylaniline	95-69-2	Carc. 1B Muta. 2
2,4-diaminotoluene	95-80-7	Carc. 1B Muta. 2 Repr. 2	4,4'-diaminodiphenyl sulfide	139-65-1	Carc. 1B
4,4'-diaminodiphenylmethane	101-77-9	Carc. 1B Muta. 2	4-aminobiphenyl	92-67-1	Carc. 1A
o-Aminoazotoluene	97-56-3	Carc. 1B	4,4'-oxydianiline	101-80-4	Carc. 1B Muta. 1B Rep.2
4,4'-methylene-bis(2-chloroaniline)	101-14-4	Carc. 1B	o-Dianisidine	119-90-4	Carc. 1B
o-Anisidine	90-04-0	Carc. 1B Muta. 2	Benzidine	92-87-5	Carc. 1A
4,4'-methylene-bis(2-methylaniline)	838-88-0	Carc. 1B	4-Chloraniline	106-47-8	Carc. 1B
2-methyl-5-nitroaniline	99-55-8	Carc. 2	3,3-Dichlorobenzidine	91-94-1	Carc. 1B
2-methoxy-5-methylaniline	120-71-8	Carc. 1B	1,4-Phenylenediamine	106-50-3	Eye Irrit. 2 Skin Sens. 1
o-Tolidine	119-93-7	Carc. 1B	2,4,5-Trimethylaniline	137-17-7	Carc. 1B
2,4-diaminoanisole	615-05-4	Carc. 1B Muta. 2	//	//	//

Progetto 2020-2021 «Sviluppo e validazione di metodi per la quantificazione di sostanze pericolose negli inchiostri per tatuaggi e PMU nei controlli ufficiali finalizzati all'implementazione della prossima restrizione REACH»



AUTONOME
PROVINZ
BOZEN
SÜDTIROL



PROVINCIA
AUTONOMA
DI BOLZANO
ALTO ADIGE



Obiettivo 1

Sviluppo e validazione di metodi di prova da utilizzare ai fini del controllo ufficiale per l'implementazione della restrizione REACH, per una serie di sostanze selezionate (cancerogene, mutagene e tossiche per la riproduzione di categoria 1A e 1B o 2 (CMR), sensibilizzanti cutanei di categoria 1, 1A e 1B, proibite nell'Allegato II del Regolamento (CE) N.1223/2009, che provocano gravi lesioni oculari/irritanti oculari di categoria 1 e 2 e altre sostanze considerate prioritarie come gli IPA e i coloranti azoici come da ResAP(2008)1.

IPA
Conservanti
Ammine aromatiche primarie
Coloranti azoici
metalli

Obiettivo 2

Gruppo di lavoro internazionale

Collaborazione laboratorio di APPA Bolzano-Laboratorio Cantonale di Basilea per analisi di screening di coloranti azoici in MALDI-TOF

studio di confronto laboratorio APPA Bolzano e CNSC per metodo per quantificazione di ftalati su inchiostri sul mercato italiano.



Alcune delle sostanze oggetto d'indagine - Progetto 2020-2021

n. 8 IPA

Nome	N. CAS	Classificazione armonizzata in Allegato VI CLP
Benzo[a]pyrene	50-32-8	Skin Sens. 1 Muta. 1B Carc. 1B Repr.1B
Benzo[e]pyrene	192-97-2	Carc. 1B
Benzo[a]anthracene	56-55-3	Carc. 1B
Chrysene	218-01-9	Muta. 2 Carc. 1B
Benzo[b]fluoranthene	205-99-2	Carc. 1B
Benzo[j]fluoranthene	205-82-3	Carc. 1B
Benzo[k]fluoranthene	207-08-9	Carc. 1B
Dibenz[a,h]anthracene	53-70-3	Carc. 1B

n. 14 conservanti

Nome	N. CAS	Regime di autoclassificazione	Nome	N. CAS	Class. armonizzata All.VI CLP
Ethylparaben	120-47-8	Skin Sens. 1 Eye Irrit. 2 Skin Irrit. 2	Fenossietanolo	122-99-6	Acute Tox. 4*, Eye Irrit. 2
Methylparaben	99-76-3	Skin Irrit. 2 Eye Irrit. 2	o-fenilfenolo	90-43-7	Skin Irrit. 2 Eye Irrit. 2
Isopropylparaben	4191-73-5	Eye Irrit. 2 Skin Irrit. 2 Acute Tox. 4 Eye Dam. 1	Metilcloroisotiazolinone + Metilisotiazolinone (3:1)	55965-84-9	Acute Tox. 3 Acute Tox. 2 Skin Corr. 1C Eye Dam. 1 Skin Sens. 1A Acute Tox. 2
Propylparaben	94-13-3	--	Metilisotiazolinone	2682-20-4	Acute Tox. 3 Skin Corr. 1B Eye Dam. 1 Skin Sens. 1A Acute Tox. 2
Butylparaben	94-26-8	Skin Sens. 1 Skin Irrit. 2 Eye Irrit. 2 Eye Dam. 1	Benzilisotiazolinone	2634-33-5	Acute Tox. 4 * Skin Irrit. 2 Eye Dam. 1 Skin Sens. 1
Isobutylparaben	4247-02-3	Skin Sens.	Octylisotiazolinone	247-761-7	Acute Tox. 3 Skin Corr. 1 Eye Dam. 1 Skin Sens. 1A Acute Tox. 2
Pentylparaben	6521-29-5	Skin Irrit. 2 Eye Irrit. 2			
Benzylparaben	94-18-8	Skin Sens. 1 Eye Irrit. 2 Skin Irrit. 2			

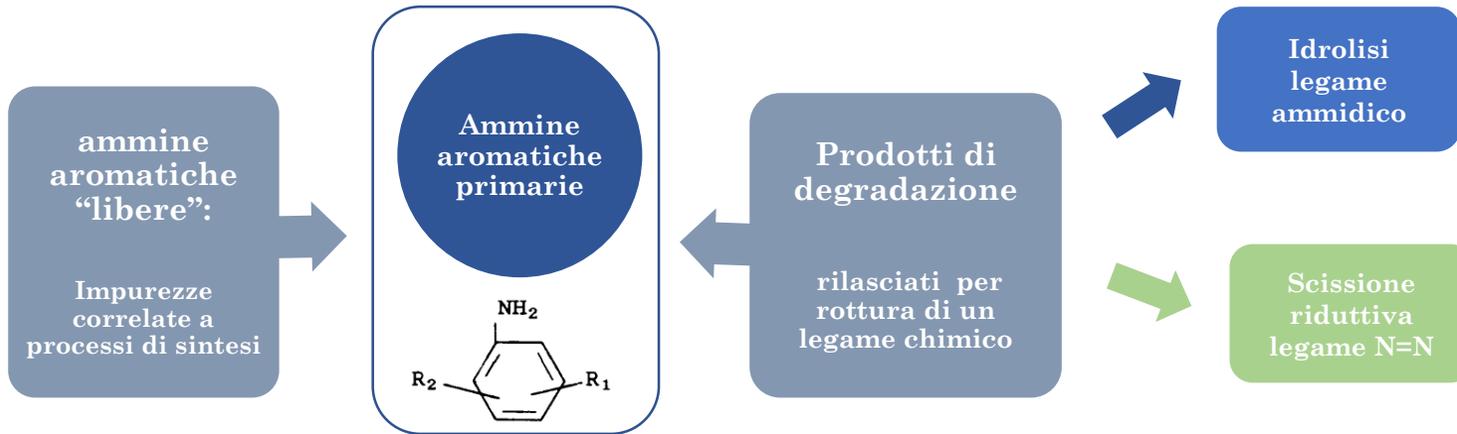
* classificazione minima di cui al punto 1.2.1 dell'allegato VI al regolamento CLP.

Ammine aromatiche e coloranti azoici

La presenza di AA primarie in inchiostri è correlata all'uso di azo-pigmenti

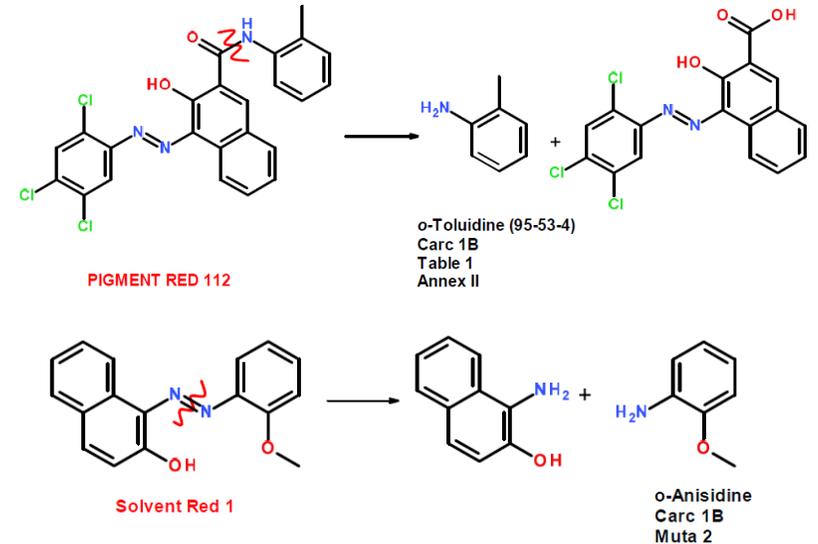
Gli azocoloranti sono prodotti a partire da una AA primaria che è trattata con NaNO_2 e HCl a formare un sale di arildiazonio instabile (reazione di diazotazione) che a sua volta reagisce con una ammina aromatica o fenolo a formare un colorante azoico stabile (reazione di azocopolazione)

2 tipologie:



Metodi analitici per:

1. Ammine libere
2. Ammine da rilasciate per scissione riduttiva (richiede utilizzo di ditionito di sodio a caldo)



Se si tiene conto della scissione riduttiva e dell'idrolisi del legame ammidico, il 66% degli azo-coloranti possono rilasciare un'ammina presente nella lista negativa ResAP(2008)1 [JRC, 2016]

Metodi analitici per ammine aromatiche primarie: criticità (1/3)

Altre criticità:

L'applicazione dei metodi standard europei ed internazionali (tessuti, cuoio e giocattoli) alla matrice "inchiostro per tatuaggi" ha messo in luce numerose criticità quali:



1. *Piccole variazioni ad una procedura (es. EN ISO 14362-1) possono rendere un campione conforme o non conforme*
2. *Una ammina aromatica primaria può essere liberata dall'idrolisi di un legame amidico e non del legame -N=N-, sebbene in condizioni di scissione riduttiva.*
3. *Può verificarsi una riduzione dei nitro-gruppi a gruppi amminici.*

1. *I metodi sono sviluppati per quantificare le AA rilasciate da azocoloranti solubili e, quando applicati a pigmenti insolubili, solo una piccola frazione di essi, strettamente dipendente dalle condizioni sperimentali del metodo, è trasformata in AA.*

Hauri et al (2015) ha dimostrato che solo circa il 4 % della quantità iniziale di Pigment yellow 14 e Orange 13 è trasformata in AA usando EN ISO 14362-1 e EN ISO 17234-1*

* Hauri, U. and Hohl, C., Photostability and breakdown products of pigments currently used in tattoo inks, in Tattooed Skin and Health, Curr. Probl. Dermatol. 2015, Serup J., Kluger N., Bäumlner W. (eds). Basel, Karger. p. 164-9.

Metodi analitici per ammine aromatiche primarie: criticità (2/3)

AUTONOME
PROVINZ
BOZEN
SÜDTIROL



PROVINCIA
AUTONOMA
DI BOLZANO
ALTO ADIGE

vs



Confronto interlaboratorio ARPA Piemonte e APPA Bolzano

10 differenti campioni

Metodo utilizzato: ISO 17234-1 (cuoio) con scissione riduttiva con sodio ditionito a caldo (70°C), estrazione con MTBE da colonna impaccata con Extrelut.
Analisi in GC/MS.

Quantificazione di ammine aromatiche libere + ammine rilasciate



Risultati confrontabili eccetto per 3 campioni

In alcuni campioni: difficoltà nel rilevare la o-toluidina o differenze nelle concentrazioni determinate.

o-toluidina potrebbe essere facilmente degradabile in alcune condizioni

Campione	APPA Bolzano	ARPA Piemonte
Arancione Marca B	2-toluidina 25,7 mg/Kg	..
Rosso Marca A	-	2-toluidina 1,6 mg/Kg
Rosso Marca A	2-toluidina 72,2 mg/Kg	2-toluidina 212,6 mg/Kg

Metodi analitici per ammine aromatiche primarie: criticità (3/3)



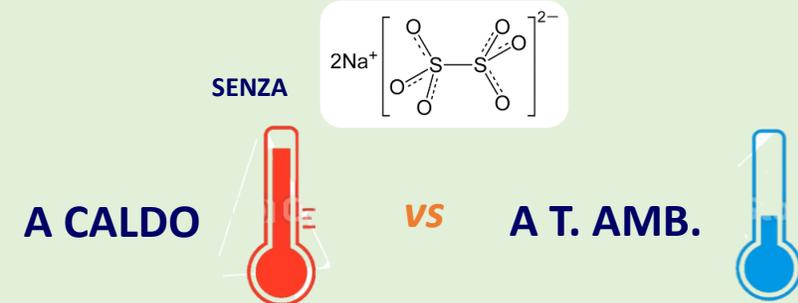
Confronto metodo CON e SENZA scissione riduttiva

Con scissione riduttiva tutti i campioni non erano conformi alla ResAP
Senza scissione, n.2 campioni conformi

AA primarie non rilevate con scissione riduttiva sono state invece rilevate senza scissione riduttiva:

- 2-aminonaphthalene (CAS 91-59-8)
- 5-nitro-o-toluidine (CAS 99-55-8)
- 3,3'-dichlorobenzidine (CAS 91-94-1)
- 4-chloro-o-toluidine (CAS 95-69-2)
- 2,4-diaminotoluene (CAS 95-80-7)

È possibile che con la scissione, le ammine a basse concentrazioni, non erano rivelabili per via della degradazione a seguito di scissione riduttiva e/o effetti della temperatura (es. o-toluidina).



Confronto metodo SENZA scissione riduttiva a caldo (70°C) e SENZA scissione riduttiva a T ambiente

Risultati confrontabili

Alcune ammine sembrano essere più degradabili in presenza di temperatura

Attività svolta da  **Arpa**
PIEMONTE
Agenzia Regionale
per la Protezione Ambientale

considerazioni finali

Da tenere presente quando si deve confrontare il dato analitico con un valore limite: cleavage e temperatura (70°C) potrebbe distruggere ammine a basse concentrazioni

Ammine aromatiche: verso la restrizione REACH



ResAp(2008)1

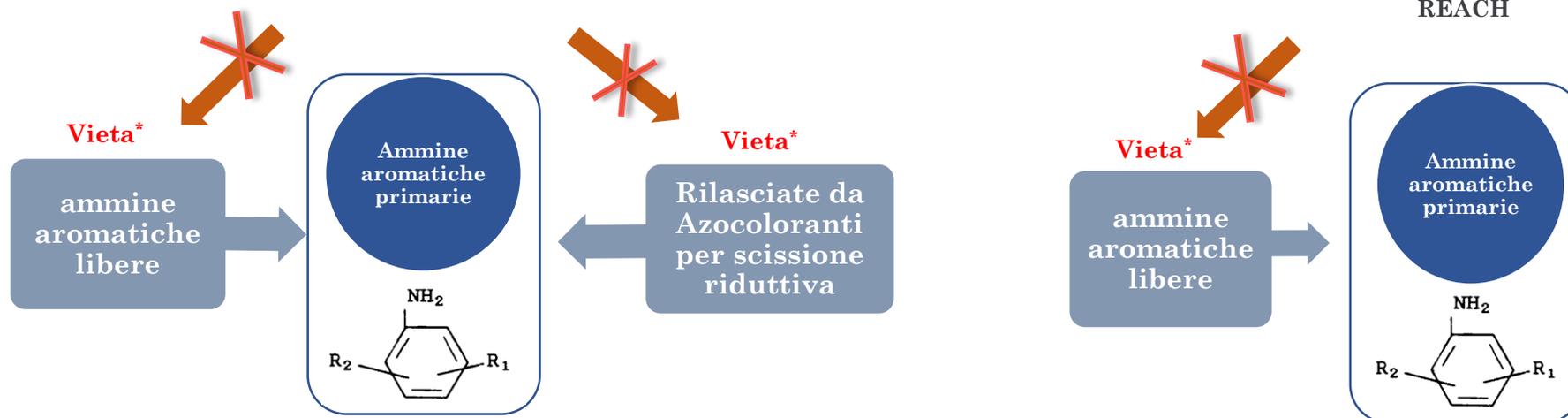
“[...] they do **not contain** or **release** the aromatic amines listed in Table 1”



v. 75 All. XVII
Restrizione
REACH

Non ne è ammessa l'immissione sul mercato nelle miscele destinate alle pratiche di tatuaggio: le miscele contenenti una qualsiasi di queste sostanze non devono essere usate nelle pratiche di tatuaggio successivamente al 4 gennaio 2022 se la sostanza o le sostanze in questione sono presenti nelle seguenti circostanze:

- nel caso delle sostanze classificate nell'allegato VI, parte 3, del regolamento (CE) n. 1272/2008 nella categoria di cancerogenicità 1 A, 1B o 2 oppure nella categoria di mutagenicità sulle cellule germinali 1 A, 1B o 2, se la sostanza è presente nella miscela in concentrazione pari o superiore a 0,00005 % in peso;
- nel caso delle sostanze classificate nell'allegato VI, parte 3, del regolamento (CE) n. 1272/2008 nella categoria di tossicità per la riproduzione 1 A, 1B o 2, se la sostanza è presente nella miscela in concentrazione pari o superiore a 0.001 % in peso;



Necessità di disporre di metodi analitici per:

1. Ammine libere
2. Ammine da rilasciate per scissione riduttiva



Necessità di disporre di metodi analitici per:

1. Ammine libere

Risolte in parte le criticità legate alla scissione riduttiva
No utilizzo di ditionito di sodio

* “[...] in concentrations that are technically avoidable according to good manufacturing procedures” (ResAp(2008)1)

Metodi analitici per gli azopigmenti: criticità

Attività svolta da



Analisi mediante LC-MS in inchiostri per tatuaggi di azopigmenti estraibili in miscela piridina/acqua.
Adattamento del metodo UNI EN ISO 16373-2:2014 (tessile)
Dissoluzione in piridina/acqua usando microonde
Analisi con HR-LC-MS (Orbitrap)

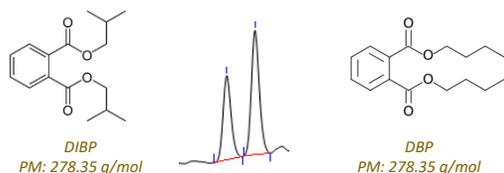
Criticità:

1. Bassa ionizzazione in ESI+/-
2. Ridotta solubilità di alcuni pigmenti (falsi negativi)
3. Scarsa disponibilità di standard analitici puri
4. Formazione di complessi con i metalli
5. Nessun database LC-MS
6. Nessun CMR o proficiency test

Metodi analitici per ftalati: criticità

1.

Individuare la metodica (metodo esistente per quali matrici?) e le condizioni cromatografiche ottimali per la separazione dei picchi tra isomeri strutturali



E altri isomeri come DnPP e DiPP o DEHP DNOP

2.

Ftalati sono ubiquitari: anche bassi livelli di contaminazione possono inficiare i risultati analitici.

Riduzione delle contaminazioni dovute alla preparazione dei campioni.

Solo vetreria scrupolosamente lavata.

Solventi testati per presenza di ftalati e analizzati periodicamente per monitorare eventuale contaminazione

Vetreria usa e getta raccomandata



3.

HPLC-DAD e LC-MS/MS tecniche analitiche non idonee

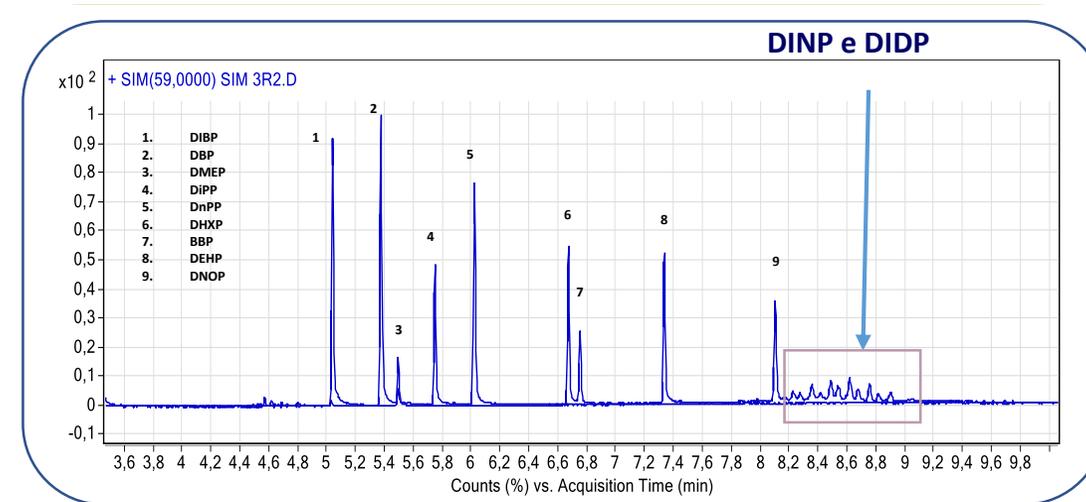
4.

Impossibilità nel risolvere cromatograficamente i picchi di DINP e DIDP: miscela di centinaia di isomeri

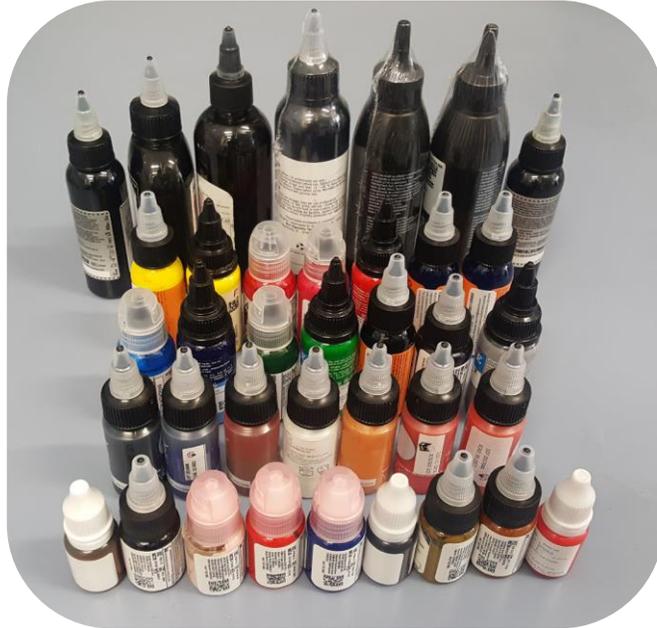
Attività svolta da



Metodo CPSC-CH-C1001-09.4 (parti in PVC di giocattoli) modificato.
GC-MS.
Validato per la nuova matrice



Risultati preliminari: ftalati



n. 37 inchiostri sul mercato nazionale di cui:

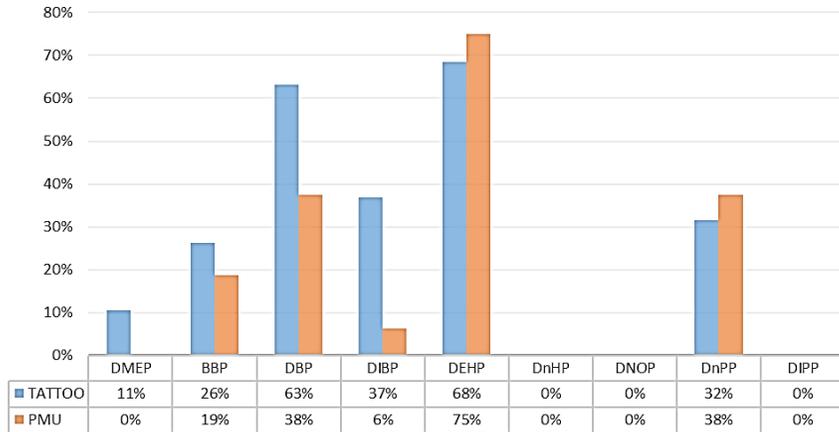
- n. 19 inchiostri per tatuaggi
- n. 16 PMU

Differenti colori e ditte:

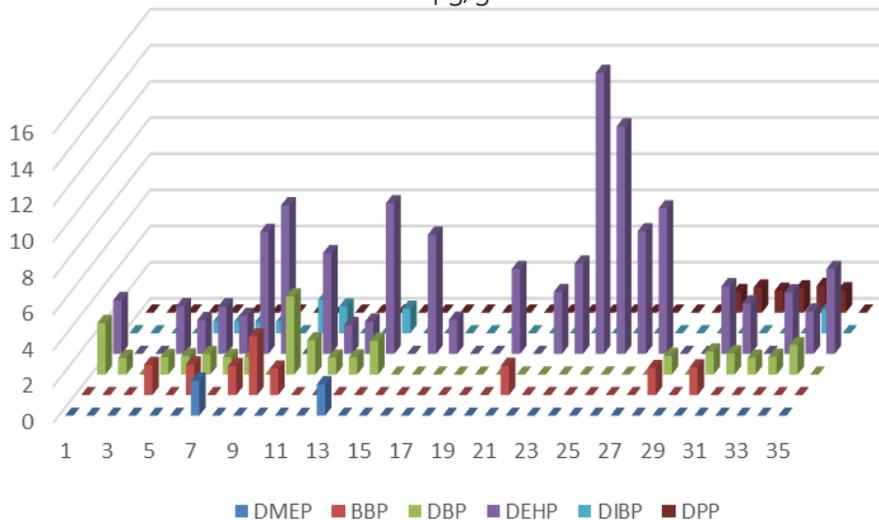
- n. 10 ditte

Risultati preliminari: ftalati

% presenza ftalati



µg/g



DnHP, DNOP, DIPP sono gli unici ftalati determinati sotto al LOD in tutti i campioni analizzati. Il DMEP è stato quantificato solo in alcuni campioni di inchiostri per tatuaggi e non negli inchiostri per PMU. I restanti 5 ftalati sono stati quantificati in entrambe le matrici in percentuali variabili. Il DEHP è stato quantificato nel maggior numero di campioni analizzati

In corso.

1. Ottimizzazione del metodo per incrementare la sensibilità della procedura analitica al fine di coprire i limiti della nuova restrizione REACH



**DMEP BBP DBP DIBP DEHP DnPP
DiPP DnHP**
sostanze elencate nell'Allegato II del
Reg. 1223/2009: 0,00005% p/p
(0,5 µg/g)

2. Prosecuzione delle attività analitiche su altri circa 100 campioni di inchiostri disponibili sul mercato nazionale

3. Confronto interlaboratorio tra ISS-CNSC e APPA Bolzano per analisi ftalati su circa 30 campioni

Risultati preliminari: conservanti (1/2)

1. Non ne è ammessa l'immissione sul mercato nelle miscele destinate alle pratiche di tatuaggio; le miscele contenenti una qualsiasi di queste sostanze non devono essere usate nelle pratiche di tatuaggio successivamente al 4 gennaio 2022 se la sostanza o le sostanze in questione sono presenti nelle seguenti circostanze:

- c) nel caso delle sostanze classificate nell'allegato VI, parte 3, del regolamento (CE) n. 1272/2008 nella categoria di sensibilizzazione cutanea 1, 1 A o 1B, se la sostanza è presente nella miscela in concentrazione pari o superiore a 0.001 % in peso;
- d) nel caso delle sostanze classificate nell'allegato VI, parte 3, del regolamento (CE) n. 1272/2008 nella categoria di corrosione cutanea 1, 1 A, 1B o 1C, di irritazione cutanea 2, di lesioni oculari gravi 1 oppure di irritazione oculare 2, se la sostanza è presente nella miscela in concentrazione pari o superiore a:
 - i) 0,1 % in peso, se la sostanza è usata unicamente come regolatore del pH;
 - ii) 0,01 % in peso in tutti gli altri casi;

Nome	Limite conc. REACH % (p/p)
BIT (skin sens 1)	0,001
MI (skin sens 1A)	0,001
FE (eye irritant 2)	0,01
OIT (skin sens. 1A)	0,001
o-FF (eye irritant 2, skin irritant 2)	0,01

Sviluppato e validato un metodo di prova per quantificazione simultanea di n. 14 conservanti tra cui BIT, MI, FE, OIT, o-FF

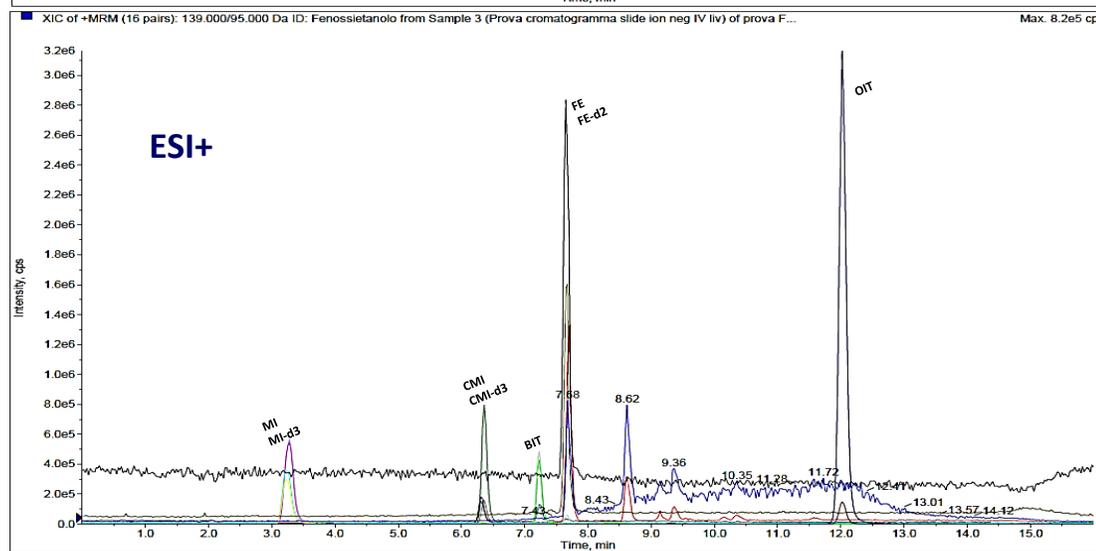
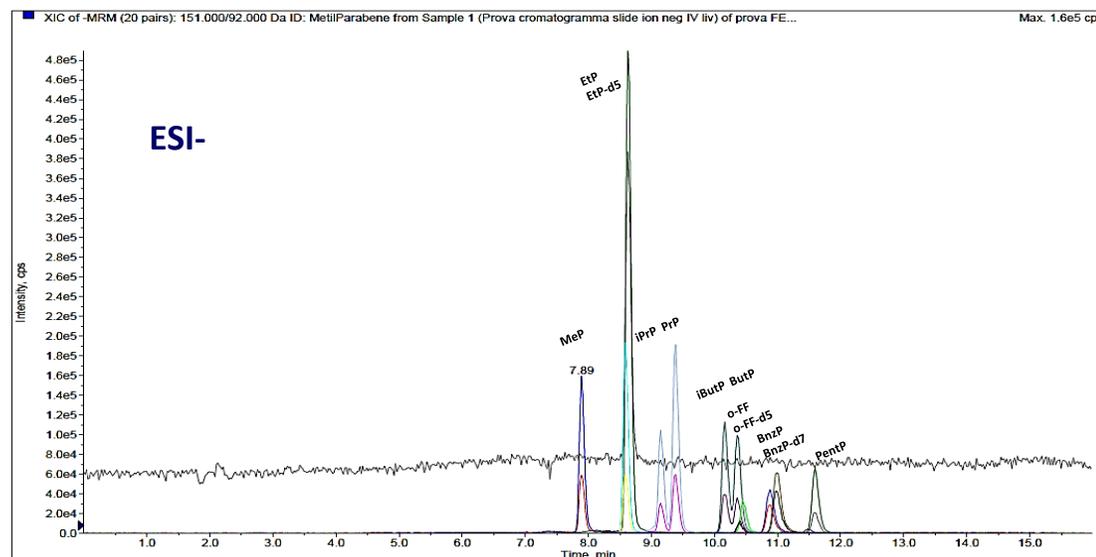
Attività svolta da



LC-MS/MS ESI+/- switch

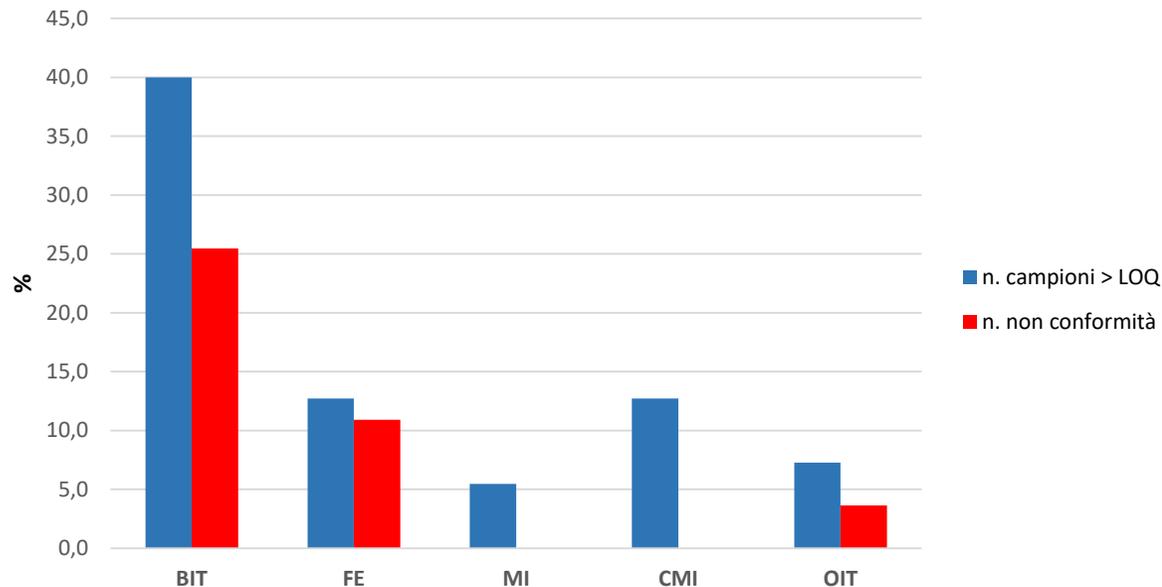
Criticità:

1. Linearità non soddisfacente del FE (problemi nella ionizzazione?), preferibile l'utilizzo di HPLC-DAD



Risultati preliminari: conservanti (2/2)

Inchiostri (n=55) con concentrazioni di conservanti rivelabili e NC rispetto alla nuova restrizione REACH in via di adozione



In corso.

1. Prosecuzione delle attività analitiche su altri circa n. 100 campioni di inchiostri disponibili sul mercato nazionale

- Il BIT è il conservante più utilizzato sia negli inchiostri per tatuaggi che per PMU e per il quale si evidenziano più N.C rispetto alla restrizione in via di adozione.
- Non rilevata la presenza di parabeni e dell'o-fenilfenolo;
- Numero di N.C. su campioni tatuaggi analizzati (48,6) > numero N.C. su campioni PMU analizzati (22,2%)



Maggiori NC per tatuaggi

- Solo n. 2 campioni pari al 3,6 % dei campioni analizzati presentano in etichetta l'indicazione di conservanti. In uno di essi, sebbene il FE è dichiarato non è rilevabile.



40 % dei campioni (tatuaggi+PMU) non conformi alla nuova restrizione REACH per la presenza di conservanti oltre ai limiti ammissibili



**Grazie
per l'attenzione**



**Centro Nazionale Sostanze Chimiche, Prodotti Cosmetici e
Protezione del Consumatore**

«Laboratorio per la Sicurezza Chimica»

Istituto Superiore di Sanità

**M. Famele, R. Lavallo, C. Leoni, C. Majorani, S. D'Ilio, C. Ferranti,
L. Palleschi, L. Fava, M.L. Polci, M. Alessi, R. Draisci**



Ministero della Salute

Ministero della Salute: M. Alessi, M. L. Polci
Finanziatore Accordi di Collaborazione



ARPA Piemonte: M. Fontana, M. Agnello, L. La Riccia



APPA Bolzano: F. Ciesa, L. D'Ambrosio, R. Burger

marco.famele@iss.it