



**Centro Nazionale Sostanze Chimiche,
prodotti Cosmetici e protezione del Consumatore**

Valutazione dei metodi analitici per la ricerca di sostanze negli inchiostri

Convegno

“I tatuaggi: sicurezza d’uso e criteri di controllo”

23 Gennaio 2018

co-organizzato da

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

Ministero della Salute – Direzione Generale della Prevenzione Sanitaria

Marco Famele, Sonia D’Ilio

ACCORDO DI COLLABORAZIONE MINISTERO DELLA SALUTE E ISS

Accordo di Collaborazione ISS e Ministero della Salute

«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»

Inizio: 22/02/17

Nell'ambito dell'Accordo, il CNSC-ISS ha supportato il Ministero della Salute nella compilazione del fascicolo conforme alle prescrizioni dell'All. XV del Reg. REACH, contenente una proposta di restrizione all'uso di sostanze contenute in inchiostri per tatuaggi e PMU.

Nell'ambito delle attività svolte per la preparazione del fascicolo è stato effettuato un esame delle metodologie analitiche da utilizzare a scopo di controllo per la determinazione quantitativa delle sostanze incluse in detta proposta di restrizione negli inchiostri per tatuaggi e PMU

UNITA' OPERATIVE		
U.O.	Referente	Compiti
Coordinamento	Dott.ssa Rosa Draisci	Coordinamento delle attività del progetto, predisposizione di rapporti intermedi e finali
Unità Operativa 1	Dott.ssa Maria Letizia Polci Dott. Luca Palleschi, Dott. Marco Famelo	Coordinamento delle attività del progetto relativamente all'Obiettivo 1 e 3
Unità Operativa 2	Dott. Leonello Attias Dott.ssa Tiziana Catone Dott.ssa Maria Teresa Russo	Coordinamento delle attività del progetto nell'ambito dell'Obiettivo 2.

U.O.1

Obiettivo specifico 1:

- Individuazione dei criteri di selezione delle sostanze e selezione delle stesse

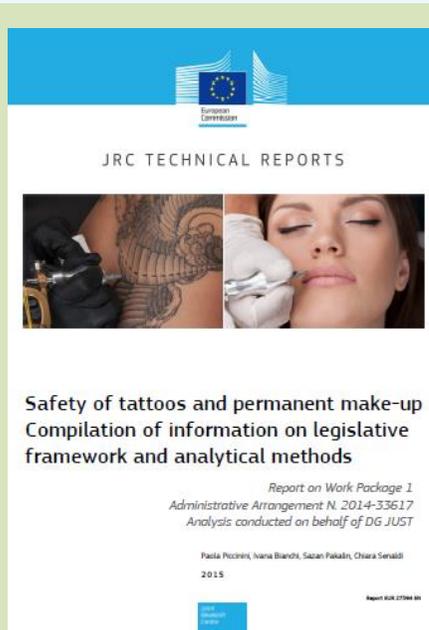
Obiettivo specifico 3:

- Valutazione delle *performance* (prioritariamente applicabilità) dei metodi analitici esistenti per la determinazione quantitativa di ammine aromatiche e metalli pesanti negli inchiostri, con particolare riferimento alla lista dei metodi contenuta nel rapporto conclusivo dello studio condotto dal JRC;
- Collaborazione con gli esperti designati dalla Regione Piemonte e dalla Provincia di Bolzano per il supporto all'attività di valutazione dei metodi analitici a garanzia dell'applicabilità della proposta di restrizione;
- Organizzazione di un evento per presentare la nuova misura regolatoria europea in corso di predisposizione ed esaminare le problematiche relative alle attività di controllo analitico da prevedere nei futuri PNC dei prodotti chimici

REPORT DEL JOINT RESEARCH CENTRE (JRC)

Il Joint Research Centre (JRC) della Commissione europea ha predisposto uno specifico studio con lo scopo di raccogliere:

- evidenze su i rischi per la salute connessi alla pratica del tatuaggio e PMU;
- informazioni sulle misure di gestione del rischio attuate dai Paesi europei per garantire la sicurezza degli inchiostri;
- informazioni sui processi utilizzati nei tatuaggi e nel trucco permanente.



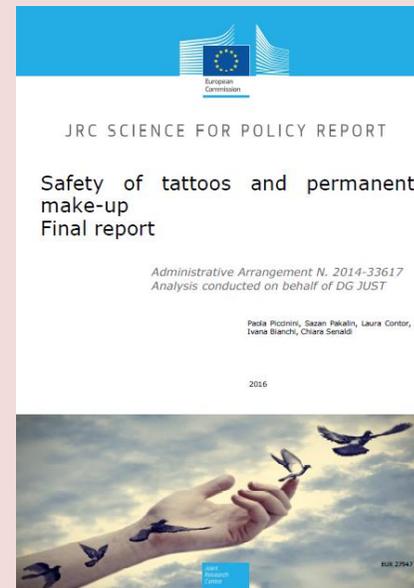
Revisione sistematica delle informazioni su metodi analitici esistenti (2015):

- Metodi normalizzati (altre matrici) (es. ISO, EN, DIN);
- Metodi interni;
- Metodi disponibili in letteratura.

↑
CNSC



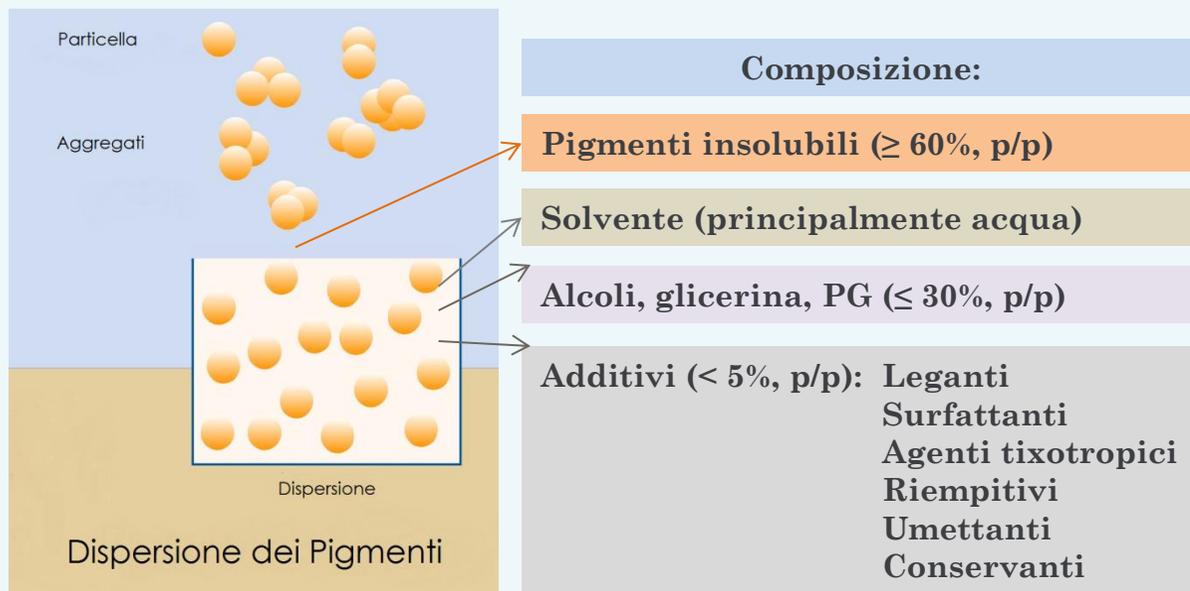
Valutazione delle performance (prioritariamente applicabilità)



«Final Report» (2016):

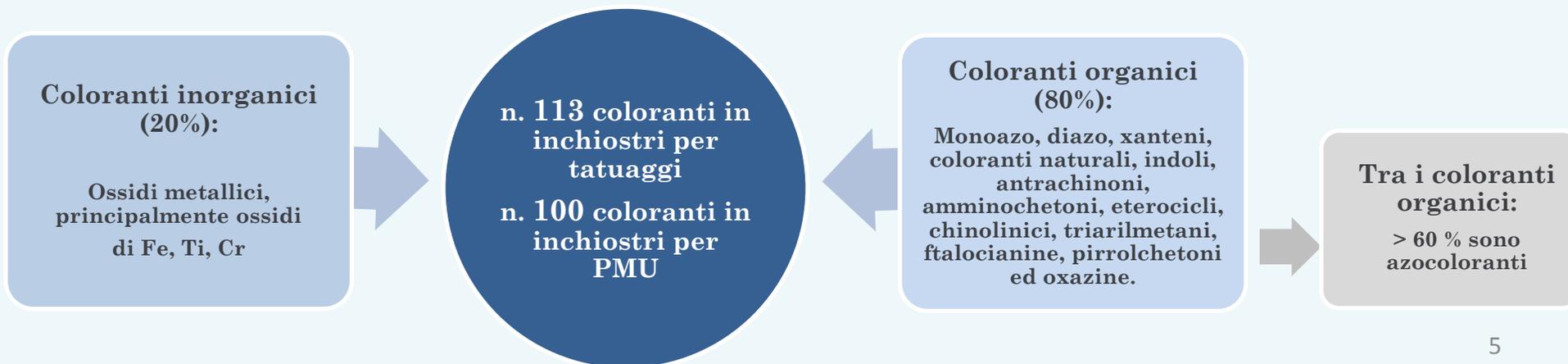
- Normative nazionali SM;
- Dati su composizione chimica;
- Statistiche;
- Dati inerenti a rischi per salute;
- Percezione del rischio;
- Comunicazione del rischio e dei pericoli;
- Metodi analitici.

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

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.



Purezza:
70 – 90 %¹

Impurezze determinate:

- Ammine aromatiche primarie (AA) in inchiostri a base di azocoloranti;
- IPA in inchiostri neri («*carbon black*»);
- Metalli in inchiostri a base di pigmenti inorganici ed organometallici;
- Ftalati;
- Nitrosammine.



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

Tab 3, ResAp(2008)1

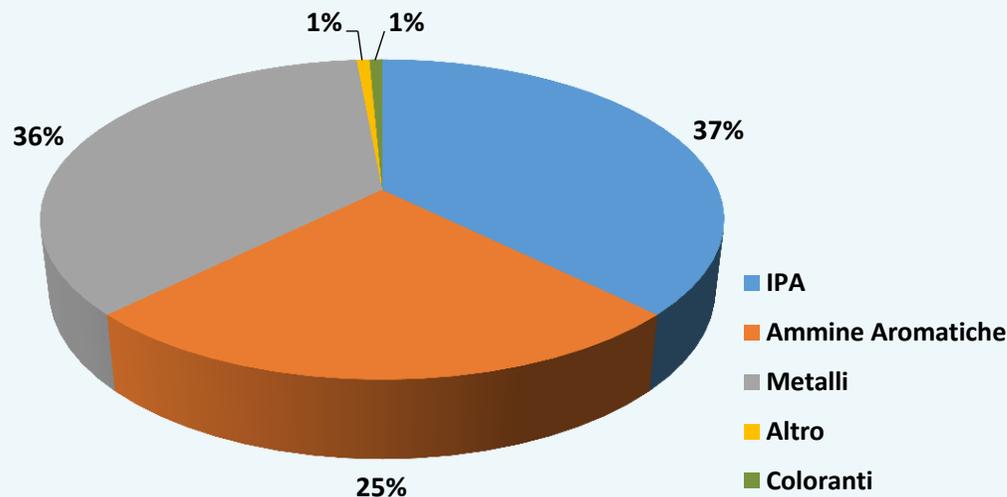
Elemento	Limiti consentiti (ppm)
As	2
Ba	50
Cd	0.2
Co	25
Cr (VI)	0.2
Cu solubile	25
Hg	0.2
Ni	As low as technically achievable
Pb	2
Se	2
Sb	2
Sn	50
Zn	50
As	2
Sostanza	Limiti consentiti
IPA	0,5 ppm
BaP	5 ppb

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

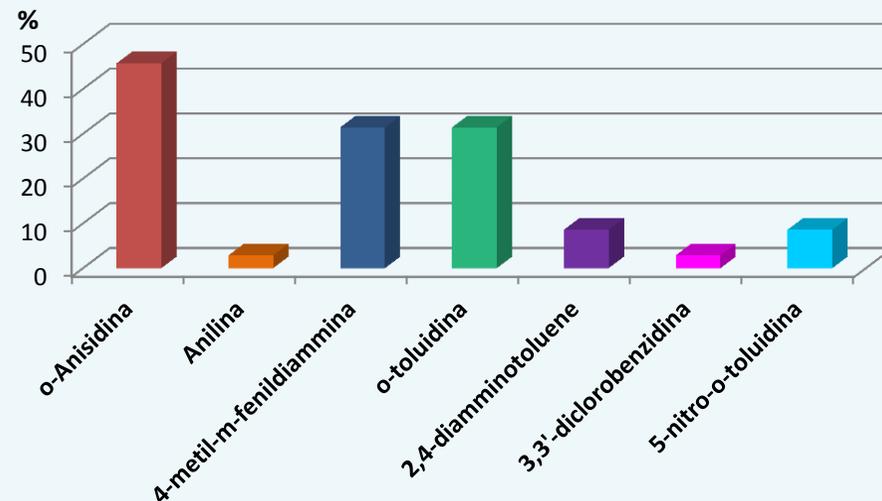
INCHIOSTRI PER TATUAGGI E PMU: NON CONFORMITÀ

ALLERTE RAPEX 2013-2018*

**NON CONFORMITÀ RILEVATE
AL ResAp(2008)1 (124 NOTIFICHE RAPEX**)**



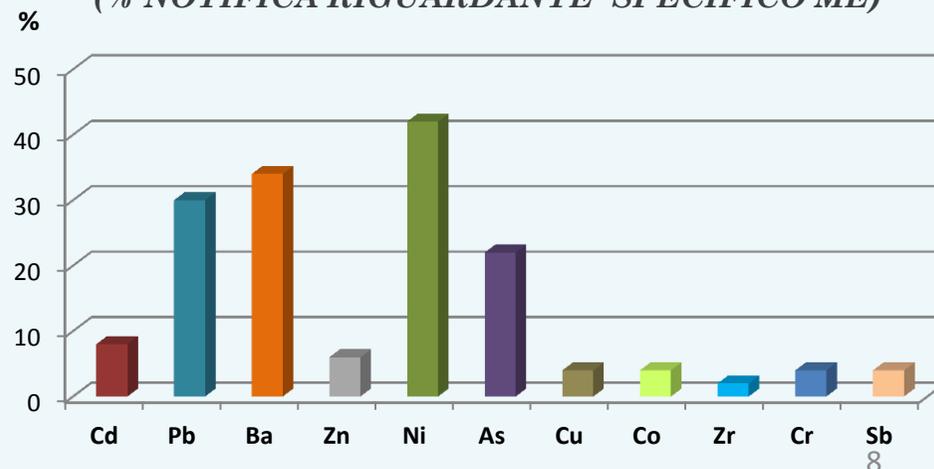
**AMMINE AROMATICHE
(% NOTIFICA RIGUARDANTE SPECIFICA AA)**



Sostanze chimiche:

- IPA (benzo[*a*]pirene, naftalene, Σ_{IPA});
- Ammine aromatiche primarie (o-anisidine, aniline, 4-metil-m-fenilendiammine, o-toluidina, 3,3'-diclorobenzidina, 5-nitro-o-toluidina, 2,4-diamminotoluene);
- Metalli (Ba, Pb, Cd, Zn, Ni, Cu, As, Cr, Co, Sb, Zr);
- Coloranti (CI 77260, CI 21110, CI 12477, CI 11740);
- Altro (fenolo).

**METALLI
(% NOTIFICA RIGUARDANTE SPECIFICO ME)**



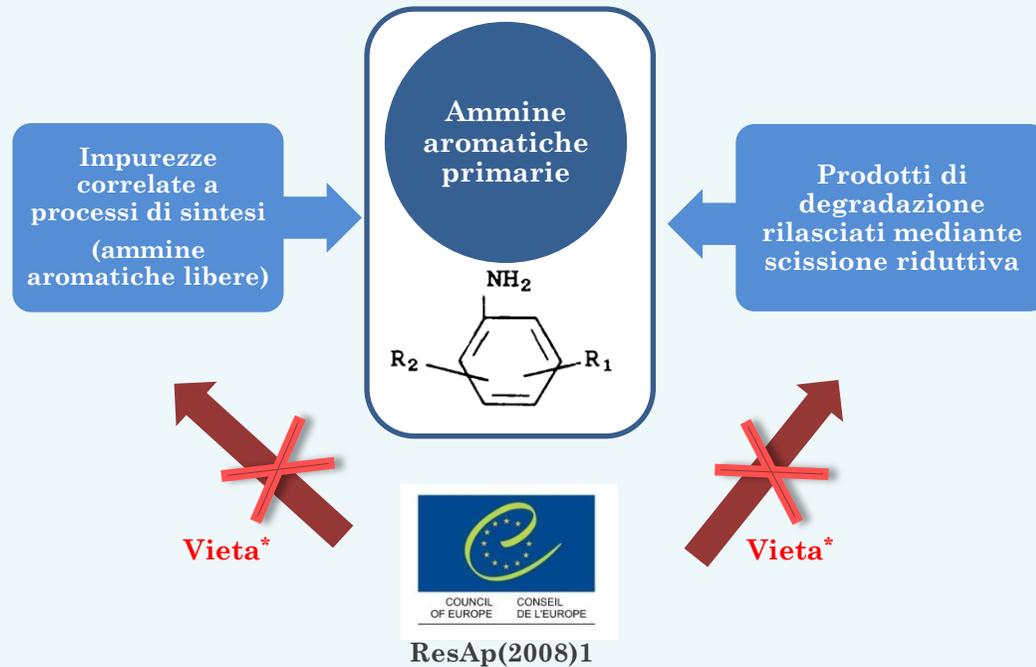
* Aggiornato alla data del 09.01.18

** 1 notifica non considerata riguarda una non conformità alla Direttiva Cosmetici 76/768/EEC per la presenza di cetrimide (mytrimonium bromide)

AMMINE AROMATICHE E COLORANTI AZOICI

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

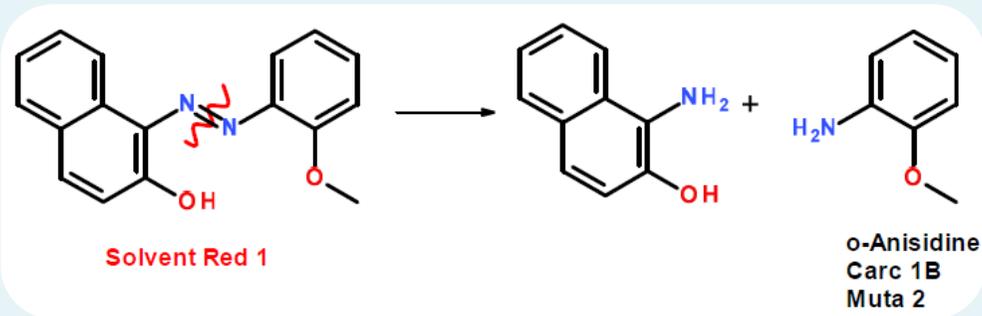
Gli azocoloranti sono prodotti a partire da una AA primaria che è trattata con NaNO_2 e HCl a formare un sale di arildiazonio instabile (reazione di diazotazione) che a sua volta reagisce con una ammina aromatica o fenolo a formare un colorante azoico stabile (reazione di azocopulazione)



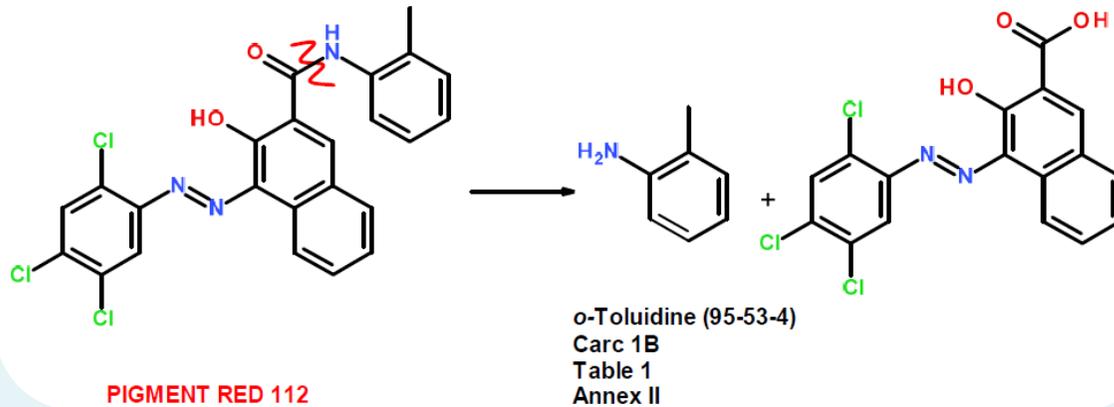
Necessità di disporre di metodi analitici idonei all'uso per:

1. Ammine libere (impurezze)
2. Ammine da rilasciate per scissione riduttiva

AMMINE AROMATICHE E COLORANTI AZOICI



Il 46% degli azo-coloranti (31/67) utilizzati negli inchiostri contengono e possono rilasciare una ammina aromatica inclusa nella lista negativa della ResAP (2008)¹ per **scissione riduttiva del legame N=N**



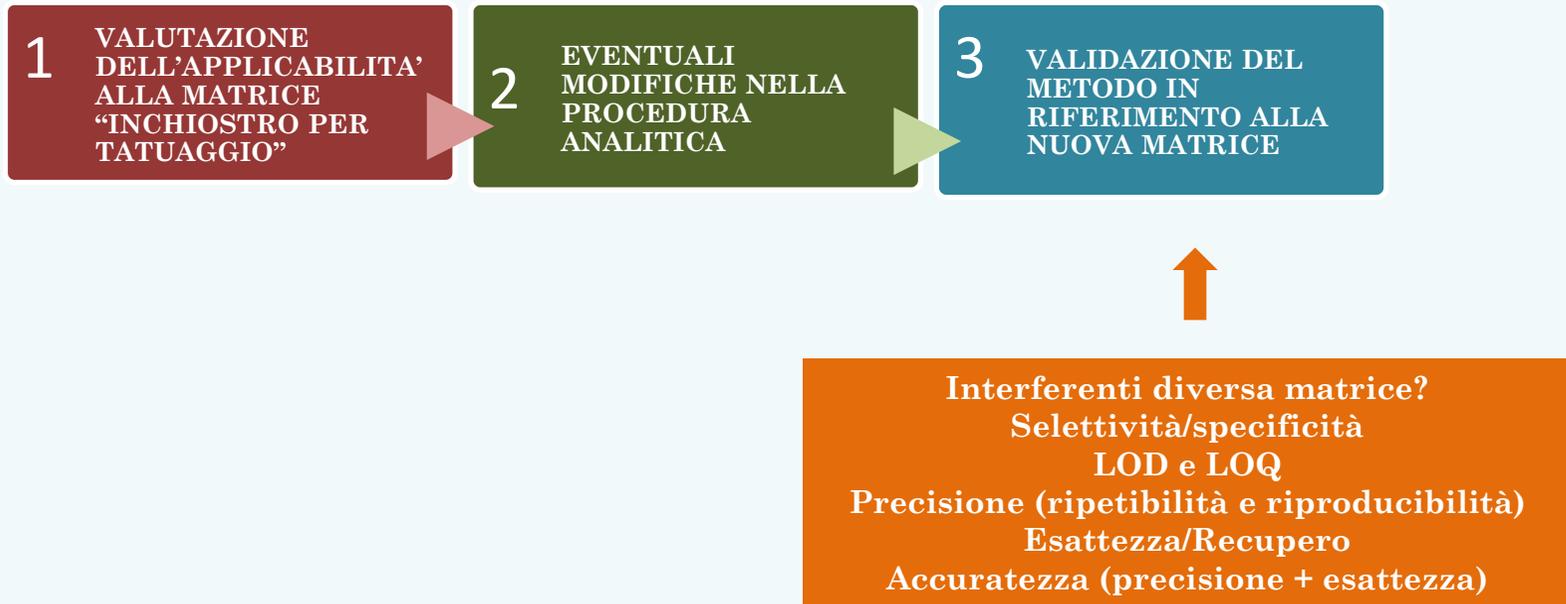
Alcuni coloranti possono rilasciare ammine incluse nella Risoluzione anche mediante **idrolisi del legame ammidico**

Se si tiene conto della scissione riduttiva e dell'idrolisi del legame ammidico, il numero degli azo-coloranti che possono rilasciare un'ammina presente nella Risoluzione sale al 66% (44/67)

METODI DI PROVA

Assenti metodi di prova standard internazionali ed europei (ISO, EN) per l'analisi di AA, coloranti, elementi chimici, IPA, ftalati e nitrosammine in inchiostri per tatuaggi e PMU. A garanzia dell'applicabilità della misura regolatoria in via di adozione risulta necessaria la disponibilità di metodi analitici idonei allo scopo per il controllo degli inchiostri per tatuaggi.

In assenza di metodi specifici, metodi sviluppati per altre matrici sono utilizzati con modifiche ai fini della sorveglianza dei prodotti sul mercato.



METODI DI PROVA PER AMMINE AROMATICHE



ResAp(2008)1

Al fine di armonizzare i test tra i vari Stati membri, la Risoluzione raccomanda due metodi analitici per la ricerca delle ammine primarie, modificati ai fini dell'applicabilità alla matrice «inchiostro per tatuaggi»:



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"



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

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

Ammine totali e Ammine libere

Dati di validazione assenti
LC/MS

Condizioni cromatografiche
da Hauri et al., 2005

METODI DI PROVA PER AMMINE AROMATICHE

Altri metodi standard internazionali sviluppati su altre matrici, ma adattati alla matrice “inchiostro per tatuaggio” dai vari Stati Membri, sono:



TESSUTI

EN 14362-3 “Metodo per la determinazione di particolari ammine aromatiche derivate da coloranti azoici. Parte 3: Rilevamento dell'utilizzo di particolari coloranti azoici che possono rilasciare 4-amminobenzene



CUOIO TINTO

EN ISO 17234-1 “Prove chimiche per la determinazione di particolari coloranti azoici nei cuoi tinti. Parte 1: Determinazione di particolari ammine aromatiche derivate da coloranti azoici”

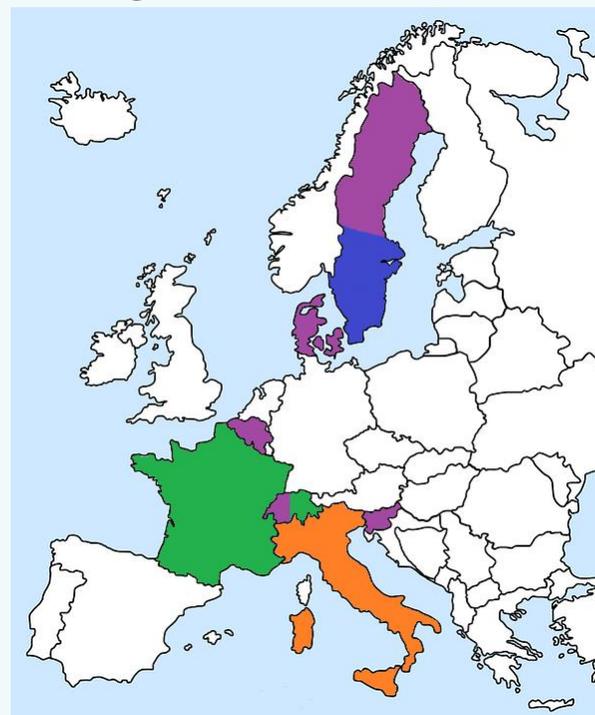
Metodi interni elencati nel report JRC

matrice	SM	Nome metodo
Campioni d'aria/panni per studio contaminazione superficiale	Inghilterra	“Aromatic amines in air and on surfaces” (MDHS 75/2)
Materiali a contatto con gli alimenti (test di migrazione)	Austria	“Determination of primary aromatic amines in acidic migration solutions by LC-MS/MS”

Metodi in letteratura elencati nel report JRC

matrice	Nome metodo
Inchiostri per stampanti	“Determination and Quantification of Primary Aromatic Amine in Printer Ink”
Materiali a contatto con gli alimenti (test di migrazione)	“Specific determination of 20 primary aromatic amines in aqueous food simulants by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry” (J. Chromatography A, 1091: 40-50)

Metodi basati su norme internazionali usati dagli SM



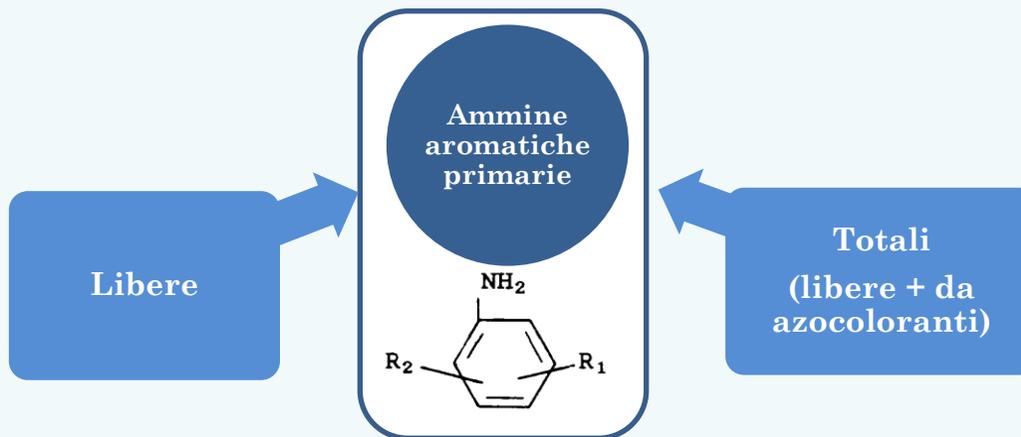
Non applicabili alla matrice «inchiostro»

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

METODI DI PROVA PER AMMINE AROMATICHE

Procedura:

Estrazione dell'inchiostro con opportuno solvente o soluzione estraente mediante sonicazione, in alcuni casi seguita da una fase di purificazione.



Procedura:

Trattamento a caldo dell'inchiostro con una soluzione di ditionito di sodio (agente riducente), seguito da una fase di purificazione della miscela di reazione.

Metodo tab 4. c
ResAp(2008)1 basato su
EN 71-7 (Giocattoli)

1. Procedura per la preparazione del campione per il rilascio delle ammine aromatiche come impurezze
2. Procedura per la preparazione del campione per le ammine aromatiche dopo scissione riduttiva

HCl 0,07 M
Sonicazione
Filtrazione
Iniezione HPLC/MS

«GC/MS analysis for p-phenyldiamine (PDD) and free PAA»
sviluppato da esperti
Danesi

Procedura basata sul metodo EN 14362-1 (per ammine rilasciate da azocoloranti) senza l'aggiunta della soluzione di ditionito di sodio

Tampone citrato
Sonicazione
Estrazione con MTBE
Iniezione HPLC/MS

METODI DI PROVA PER METALLI: CONSIDERAZIONI PRELIMINARI



ResAp(2008)1

La Risoluzione non raccomanda alcun metodo analitico per la ricerca di metalli.

Divesamente dalle ammine aromatiche e coloranti, la Risoluzione indica dei livelli massimi di concentrazione raccomandati per le impurezze quali metalli e IPA



Il Cr (VI) può essere presente come impurezza in pigmenti inorganici a base di ossidi di cromo. Il limite raccomandato di 0,2 ppm è riferito al Cr (VI) e non al Cr totale.



I metodi analitici pertanto devono consentire la speciazione del cromo e la separazione del Cr (VI) e Cr (III)



Limite raccomandato per il Cu: 25 ppm. La Risoluzione raccomanda che il Cu solubile debba essere determinato in seguito di estrazione con soluzione acquosa (pH 5,5).



Numerose ftalocianine (pigmenti organici di colore verde/blu) contengono Cu nella loro struttura, tuttavia il Cu è legato e non solubile nelle condizioni indicate per l'estrazione del Cu solubile.



Il Ni è spesso presente in pigmenti inorganici a base di ossidi di ferro. La Risoluzione raccomanda che la sua concentrazione debba essere la più bassa tecnicamente possibile. Questo requisito può generare contraddittori in quanto non è possibile confrontare il risultato analitico con un valore limite che consenta di stabilire se un prodotto sia conforme o meno.



Altamente raccomandato stabilire un valore limite.

METODI DI PROVA PER METALLI

Metodi standard internazionali sviluppati su altre matrici, ma adattati alla matrice “inchiostro per tatuaggio” dai vari Stati Membri, sono:

MATRICI AMBIENTALI



EPA 3051A *Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils*.*

EPA 3052 *Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices*.*

EPA 3060A *Alkaline Digestion for hexavalent chromium*

EPA 218.7 *Determination of Hexavalent Chromium in Drinking Water by Ion Chromatography with Post-Column Derivatization and UV-Visible Spectroscopic Detection*



CUOIO

EN ISO 17072-1 *Leather - Chemical determination of metal content - Part 1: Extractable metals*

EN ISO 17072-2 *Leather - Chemical determination of metal content - Part 2: Total metal content*



MATRICI ALIMENTARI

EN 13806 *Foodstuffs - Determination of trace elements - Determination of mercury by cold-vapour atomic absorption spectrometry (CVAAS) after pressure digestion*

EN 14083 *Foodstuffs - Determination of trace elements - Determination of lead, cadmium, chromium and molybdenum by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS) after pressure digestion*

METODI DI PROVA PER METALLI

Metodi standard internazionali sviluppati su altre matrici, ma adattati alla matrice “inchiostro per tatuaggio” dai vari Stati Membri, sono:



MATRICI AMBIENTALI - ACQUA (ANCHE SEDIMENTI, FANGHI)

EN ISO 17294-2 *Water quality - Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) - Part 2: Determination of selected elements including uranium isotopes*



MATRICI ALIMENTARI

EN 15763 *Foodstuffs - Determination of trace elements - Determination of arsenic, cadmium, mercury and lead in foodstuffs by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) after pressure digestion*



MATRICI AMBIENTALI - ACQUA (ANCHE SEDIMENTI, FANGHI)

EN ISO 11885 *Water quality - Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES)*

METODI DI PROVA IN-HOUSE E DA LETTERATURA PER METALLI

Metodi interni elencati nel report JRC

matrici	SM	Nome metodo
Cosmetici, materiali a contatto con gli alimenti	Slovacchia, Italia, Francia	//
Inchiostro per tatuaggio	Danimarca	ICP/MS screening analysis for metals and other elements *

Non applicati alla matrice «inchiostro»

Metodi in letteratura elencati nel report JRC

matrice	Nome metodo
tintura all'henné	Quantification of para-phenylenediamine and heavy metals in henna dye (Kang I-J, Lee M-H., Contact Dermatitis, 2006, 55(1), 26–29);
Inchiostro per tatuaggio	Survey of Selected Samples of Tattoo Inks for the Presence of Heavy Metals (Ministry of Health, 2013, Wellington);
Cosmetici	Determination of hexavalent chromium in cosmetic products by ion chromatography and post-column derivatisation (Kang et al., Contact Dermatitis, 2006, 54, 244–248);
Inchiostro per tatuaggio	Determination of heavy metals in tattoo inks (Eghbali K, Mousavi Z, Ziarati P., Bioscience Biotechnology Research Asia, 2014, 11(2), 941-946);

Non applicato alla matrice «inchiostro»

Metodi di prova utilizzati dagli SM



EPA (3051A; EPA 3052; EPA 3060A; 218.7) - matrici ambientali

EN ISO 17072-1 - cuoio

EN ISO 17072-2 - cuoio

EN 13806 – matrici alimentari

EN 14083 – matrici alimentari

ISO 17294-2 – matrici ambientali

EN ISO 11885 – matrici ambientali

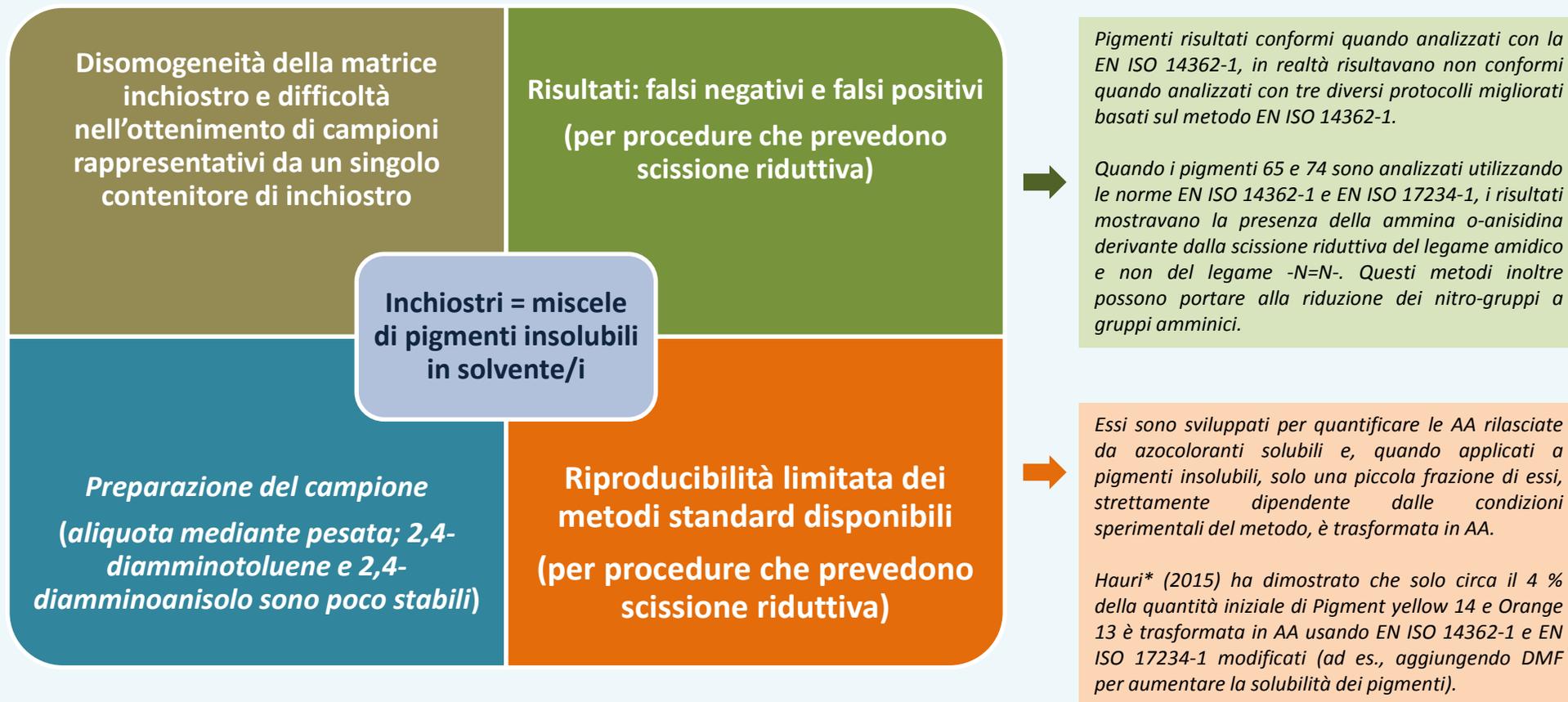
EN 15763 – matrici alimentari

Metodo interno in ICP/MS

*Chemical Substances in Tattoo Ink. Survey of chemical substances in consumer products, 116

METODI ANALITICI PER AMMINE AROMATICHE: CRITICITÀ

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



* 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: CRITICITÀ

In alcuni casi, i metodi utilizzati dagli Stati Membri e riportati nel JRC report (2015) presentano lacune nello studio di validazione:

- **caratteristiche di prestazione non sempre determinate e/o indicate nel JRC report**
- **esiguo numero di analiti nello studio di validazione**
- **tipologia della matrice utilizzata per lo studio di validazione non sempre esplicitata**

In alternativa all'utilizzo di materiale riferimento certificato, è auspicabile effettuare prove inter-laboratorio dei metodi di prova proposti effettuando, ad esempio studi collaborativi al fine di stabilirne l'affidabilità quando applicati alla matrice «inchiostro per tatuaggio/trucco permanente».

Metodi disponibili in letteratura nella maggior parte dei casi non applicabili poiché sviluppati su altre matrici e non verificata l'applicabilità alla diversa matrice.



Prospettive:

- Esperti APPA Bolzano e ARPA Piemonte: interconfronto mediante metodica basata su EN ISO 17234-1:2015 (cuoio) per 21 AA (libere e/o in seguito a scissione riduttiva) in 10 campioni di inchiostro di differenti marche e colori ... **in corso**
- **2018:** Nuovo Accordo Ministero della Salute-ISS «*PROGETTO: Sviluppo e validazione di metodi analitici per la determinazione di sostanze pericolose negli inchiostri per tatuaggi e trucco permanente*»:
 - sviluppo di metodi analitici idonei allo scopo di controllo di talune sostanze pericolose potenzialmente contenute negli inchiostri per tatuaggi e PMU (**ftalati e coloranti**), anche in collaborazione con esperti di altri Stati membri UE
 - studio di interconfronto con i laboratori europei (Danimarca, Germania, Olanda e Svizzera)

Valutazione dei metodi analitici per la ricerca di sostanze negli inchiostri

***GRAZIE PER LA
CORTESE ATTENZIONE***

Marco Famele, Sonia D'Ilio
marco.famele@iss.it
sonia.dilio@iss.it