

### МЕТОДЕ ИСПИТИВАЊА ПОТПУНЕ АЕРОБНЕ БИОРАЗ- ГРАДЉИВОСТИ (МИНЕРАЛИЗАЦИЈЕ) ЗА СУРФАКТАНТЕ У ДЕТЕРЦЕНТИМА

А. Референтна метода за лабораторијско одређивање потпуне аеробне биоразградљивости сурфактаната усаглашена је са стандардом BAS EN ISO 14593 (испитивање парне фазе  $\text{CO}_2$ ).

Ниво потпуне аеробне биоразградљивости одређује се према једној од следећих пет метода које су идентификоване као најпо-  
десније за сурфактанте:

1. Стандард BAS EN ISO 14593 - Квалитет воде - Процјена потпуне аеробне биоразградљивости органских једињења у воденој средини - Метода одређивања неорганског угљеника у херметичким посудама (испитивање парне фазе  $\text{CO}_2$  -  $\text{CO}_2$  headspace test). Без предадаптације. Не примјењује се принцип утврђивања биоразградљивости према коме се прати период од 10 дана након достизања 10% разградње (у даљем тексту: десетодневни период).

2. Метода C.4-C. - BAS EN ISO 9439 - Квалитет воде - Процје-  
на потпуне аеробне биоразградљивости органских једињења у во-  
деној средини - Испитивање развијањем угљен-диоксида. [Угљен-

диоксид ( $\text{CO}_2$ ), Модификовани Стурм тест]: Без предадаптације. Не примјењује се десетодневни период.

3. Метода C.4-E. - BAS EN ISO 10707 - Квалитет воде - Процјена потпуне аеробне биоразградљивости органских једињења у воденој средини - Метода одређивања биохемијске потрошње кисеоника (метода затворене боце). Без предадаптације. Не примјењује се десетодневни период.

4. Метода C.4-D. - BAS EN ISO 9408 - Квалитет воде - Процјена потпуне аеробне биоразградљивости органских једињења у воденој средини одређивањем потрошње кисеоника у затвореном респирометру. Без предадаптације. Не примјењује се десетодневни период.

5. Метода C.4-F. [МИТИ: Министарство међународне трговине и индустрије - Јапан]: Без предадаптације. Не примјењује се десетодневни период.

6. Метода C.5 - BAS ISO 10708 - Квалитет воде - Процјена потпуне биоразградљивости органских једињења у воденом медијуму - Одређивање биохемијске потрошње кисеоника у двофазном тесту затворене боце. Без предадаптације. Не примјењује се десетодневни период.

Б. У зависности од физичких својстава сурфактанта за одређивање потпуне аеробне биоразградљивости може се примијенити једна од наведених метода<sup>1</sup> уз одговарајуће образложење. Важно је напоменути да критеријум од најмање 70% разградљивости код употребе ових метода треба да се сматра еквивалентним критеријуму од најмање 60% разградљивости за референтне методе наведене у тачки А. овог прилога.

1. Метода C.4-A. - BAS EN ISO 7827 - Квалитет воде - Процјена "потпуне" аеробне биоразградљивости органских једињења у воденој средини - Метода одређивања раствореног органског угљеника (DOC). Без предадаптације. Не примјењује се десетодневни период. Ниво биоразградљивости одређиване овом методом мора бити најмање 70% за 28 дана.

2. Метода C.4-B. - [Модификована OECD метода - Растворни органски угљеник - (до нестајања)]: Без предадаптације. Не примјењује се десетодневни период. Ниво биоразградљивости одређиване овом методом мора бити најмање 70% за 28 дана.

---

<sup>1</sup> Методе растворног органског угљеника могу давати промјениве резултате који се не односе само на потпуну биоразградљивост. Метода C.4-D и Метода C.4-F не могу се примјењивати за сваки узорак јер велика почетна концентрација може бити инхибирајућа.

## ПРИЛОГ 2.

### МЕТОДЕ ИСПИТИВАЊА ПРИМАРНЕ БИОРАЗГРАДЉИВОСТИ ЗА СУРФАКТАНТЕ У ДЕТЕРЦЕНТИМА

Референтна метода за лабораторијско одређивање примарне биоразградљивости сурфактанта дата је у Прилогу 3. тачка 1. овог правилника, а усаглашена је са стандардом BAS EN ISO 11733 Квалитет воде - Одређивање обима елиминације и биоразградљивости органских једињења у воденој средини. Испитивање симулацијом активног муља.

Примарна биоразградљивост мјери се одређивањем садржаја преосталог сурфактанта у биоразграђеном ликвору. За сваку врсту сурфактанта примјењују се специфичне аналитичке методе:

#### А. Аналитичке методе за ањонске сурфактанте

Ањонски сурфактанти одређују се анализом метиленско плаво активне супстанце (Methylene Blue Active Substance - MBAS). За ањонске сурфактанте који не реагују са MBAS или, када је подесније, с циљем побољшања ефикасности испитивања или добијања прецизнијих података примјењују се одговарајуће специфичне методе инструменталне анализе, као што су високоефикасна течна хроматографија (high performance liquid chromatography - HPLC) или гасна хроматографија (gas chromatography - GC).

#### Б. Аналитичке методе за нејонске сурфактанте

Нејонски сурфактанти одређују се анализом бизмут активне супстанце (Bismuth Active Substance - BiAS). За нејонске сурфактанте који не реагују са реагенсом BiAS или, када је подесније, с циљем побољшања ефикасности испитивања или добијања прецизнијих података примјењују се одговарајуће специфичне методе инструменталне анализе, као што су високоефикасна течна хроматографија (high performance liquid chromatography - HPLC) или гасна хроматографија (gas chromatography - GC).

#### В. Аналитичке методе за катјонске сурфактанте

Катјонски сурфактанти одређују се анализом дисулфинско плаво активне супстанце (Disulfine Blue Active Substance - DBAS). Ова метода примјењује се у Савезној Републици Њемачкој (1989) DIN 38 409 - Ausgabe: 1989-07.

За катјонске сурфактанте који не реагују са реагенсом DBAS или, када је подесније, с циљем побољшања ефикасности испи-

тивања или добијања прецизнијих података примјењују се одговарајуће специфичне методе инструменталне анализе, као што су високоефикасна течна хроматографија (high performance liquid chromatography - HPLC) или гасна хроматографија (gas chromatography - GC).

#### Г. Аналитичке методе за амфотерне сурфактанте

Амфотерни сурфактантни одређују се анализом DBAS када у ликову нема катјона. Уколико су у ликову присутни катјони, користе се метода Оранж II.

За амфотерне сурфактанте који не дају реакцију према наведеним методама или, када је подесније, с циљем побољшања ефикасности испитивања или добијања прецизнијих података примјењују се одговарајуће специфичне методе инструменталне анализе, као што су високоефикасна течна хроматографија (high performance liquid chromatography - HPLC) или гасна хроматографија (gas chromatography - GC).

### ПРИЛОГ 3.

#### МЕТОДЕ ИСПИТИВАЊА И АНАЛИТИЧКЕ МЕТОДЕ

##### 1. Референтна метода за лабораторијско одређивање примарне биоразградљивости сурфактанта

###### 1.1. Увод

Ова метода описује лабораторијски модел активног муља и секундарног таложника који је направљен тако да симулира третман комуналних отпадних вода. Приликом примјене ове методе могу се користити побољшани оперативни услови ове методе описани у стандарду BAS EN ISO 11733.

###### 1.2. Опрема потребна за испитивање

За спровођење ове методе користи се мало постројење са активним муљем, чија је шема дата на Слици 1. овог прилога, а прецизан приказ тог постројења дат је на Слици 2. овог прилога. Постројење се састоји од: посуде за синтетичку отпадну воду (А), уређаја за дозирање (В), посуде за аерацију (С), таложника (D), пумпе за аерацију којом се рециклира активни муљ (Е) и посуде за сакупљање третираног ефлуента (F).

Посуде (А) и (F) морају бити од стакла или одговарајућег пластичног материјала и запремине најмање 24 литра. Уређај за дозирање (В) мора да омогући константан проток синтетичке отпадне воде у посуду за аерацију (Е), која током нормалног рада садржи 3 l течности. Синтеровани уводник за ваздух (G) налази се на најнижој тачки посуде (C). Количина ваздуха која се убацује кроз пумпу за аерацију (Е) прати се преко мјерача протока (H).

###### 1.3. Синтетичка отпадна вода

На литар воде са чесме додаје се:

- 160 mg пептона,
- 110 mg екстракта меса,
- 30 mg урее ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ),
- 7 mg натријум-хлорида ( $\text{NaCl}$ ),
- 4 mg калцијум-хлорида ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ),
- 2 mg магнезијум-сулфата ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ),
- 28 mg дикалијум-хидрогенфосфата ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ),
- $10 \pm 1$  mg сурфактанта.

Синтетичка отпадна вода мора бити свјеже припремљена за сваки експеримент.

###### 1.4. Припрема узорка

Узорак сурфактанта који се испитује мора бити у онаком облику у којем ће се користити у детергенту, али не смије бити помијешан са другим састојцима детергента. За припрему одговарајуће синтетичке отпадне воде потребно је одредити активни садржај сурфактанта у узорку.

###### 1.5. Поступак

Напуне се посуде за аерацију (C) и таложник (D) синтетичком отпадном водом. Таложник (D) треба поставити тако да запремина садржаја у посуду (C) износи 3 l. Инокулира се са 3 ml секундарног ефлуента доброг квалитета, свјеже сакупљеног из постројења за третман претежно комуналне отпадне воде. Ефлуент се, између узорковања и примјене, мора чувати под аеробним условима. Након тога, активира се синтеровани уводник за ваздух (G), пумпа за аерацију (Е) и уређај за дозирање (В). Синтетичка отпадна вода пролазила се кроз посуду за аерацију (C) са протоком од 1 l по часу, тако да је просјечно ретенционо вријеме 3 часа. Аерација се регулише тако да се садржај посуде за аерацију (C) константно одржава у суспензији и да садржај раствореног кисеоника буде најмање 2 mg/l. Пјенушање садржаја посуде за аерацију (C) спречава се одговарајућим средствима. Не смију се користити средства

за против стварања пјене која инхибирају активни муљ или издржавају сурфактанте. Пумпа за аерацију (Е) мора бити подешена тако да се активни муљ из таложника континуално рециклира у посуду за аерацију (C). Муљ који се може сакупљати на врху посуде (C), на дну таложника (D) или било гдје, у процесу циркулације мора бити враћен у циркулацију, најмање једном дневно, четкањем или неким другим одговарајућим средством. Таложне муља може се побољшати додавањем 2 ml 5% раствора гвожђе(III)-хлорида.

Ефлуент из таложника (D) сакупља се у посуду (F) у току 24 часа. Узорак се узима након доброг мијешања. Посуда (F) мора се пажљиво очистити.

###### 1.6. Провјера мјерне опреме

Садржај сурфактанта (у mg/l) у синтетичкој отпадној води одређује се непосредно прије употребе. Садржај сурфактанта (у mg/l) у ефленту који је сакупљен у току 24 часа у посуду (F) одређује се увијек истом аналитичком методом, непосредно након сакупљања. Када се одређивање не врши непосредно након сакупљања, узорак се мора заштитити, најбоље замрзавањем. Концентрације се одређују са тачношћу од 0,1 mg/l сурфактанта.

Ради провјере ефикасности процеса одређује се хемијска потрошња кисеоника (chemical oxygen demand - COD) или растворени органски угљеник (dissolved organic carbon - DOC) у ефленту сакупљеном у посуду (F) и профилираним кроз стаклена влакна и у филтрираној синтетичкој отпадној води из посуде (A). Провјера ефикасности врши се најмање два пута седмично.

Смањење нивоа COD или DOC морало би се усталило када је достигнута приближно уједначена дневна разградња сурфактанта на крају процеса увођења и прилагођавања (период A на Слици 3. овог прилога).

Садржај суве материје (у g/l) у активном муљу у посуду за аерацију (C) одређује се два пута седмично. Ако је количина суве материје већа од 2,5 g/l, вишак активног муља мора се одстранити.

Одређивање разградње врши се на собној температури, која мора бити утањена и у опсегу од 19 °C до 24 °C.

###### 1.7. Израчунавање биоразградљивости

Процент разградње сурфактанта рачуна се сваки дан на основу садржаја сурфактанта (mg/l) у синтетичкој отпадној води и добијеног ефлуента сакупљеног у посуду (F).

Добијене вриједности разградње представљају се графички као на Слици 3. овог прилога.

Разградња сурфактанта рачуна се као аритметичка средина вриједности добијених током 21 дана (на Слици 3. овог прилога означен као период B), након периода увођења и прилагођавања (на Слици 3. овог прилога означен као период A). У току периода од 21 дана (период B) разградња се у постројењу одвија правилно и уједначено.

У сваком случају, трајање периода увођења и прилагођавања (период A) не смије бити дужи од шест седмица.

Вриједности дневне разградње рачунају се приближно на 0,1%, али коначни резултати дају се као најближи цијели број.

У неким случајевима може се смањити учесталост узорковања, али се, при израчунавању средње вриједности, мора користити најмање 14 резултата добијених у периоду од 21 дана.

##### 2. Одређивање анијонских сурфактанта у тестовима биоразградљивости

###### 2.1. Увод

Метода је заснована на чињеници да катјонска боја метиленско плаво (MBAS) гради плаво обојене соли са анијонским сурфактантима које могу бити екстраховане хлороформом. Ради отклањања сметњи, најприје се врши екстракција из алкалног раствора, затим се екстракт промућка са киселим раствором метиленског плавог. Апсорбанца издвојене органске фазе мјери се фотометријски на таласној дужини 650 nm (максимум апсорпције).

###### 2.2. Реагенси и опрема

Реагенси и опрема који се користе за одређивање анијонских сурфактанта у тестовима биоразградљивости су:

###### 2.2.1. Пуферски раствор pH 10

Раствор се припрема тако да се 24 g натријум-хидрогенкарбоната (натријум-бикарбонат), ( $\text{NaHCO}_3$ ) AR и 27 g безводног натријум-карбоната ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) AR раствори у дејонизованој води и допуни до 1000 ml дејонизованом водом;

###### 2.2.2. Неутрални раствор метиленског плавог

Раствор се припрема тако да се 0,350 g метиленског плавог AR раствори у дејонизованој води и допуни дејонизованом водом до 1000 ml. Раствор се прави најмање 24 часа прије употребе. Апсор-

банца слијепа хлороформске пробе не смије прелазити 0,015 по 1 cm дебљине слоја на 650 nm;

#### 2.2.3. Кисели раствор метиленског плавог

Раствор се припрема тако да се 0,350 g метиленског плавог AR раствори у 500 ml дејонизоване воде и помијеша са 6,5 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (d = 1,84 g/ml) и допуни дејонизованом водом до 1000 ml. Раствор се прави најмање 24 часа прије употребе. Асорбанца слијепа хлороформске пробе не смије прелазити 0,015 по 1 cm дебљине слоја на 650 nm;

2.2.4. Хлороформ (трихлорометан) AR, дестилован непосредно прије коришћења;

2.2.5. Метил-естар додецил-бензен сулфонске киселине;

2.2.6. Етанолни раствор калијум-хидроксида KOH, 0,1 M;

2.2.7. Етанол, чист, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH;

2.2.8. Сумпорна киселина, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5 M;

2.2.9. Раствор фенол-фталейна: раствор се прави тако да се 1 g фенол-фталейна раствори у 50 ml етанола и дода 50 ml дејонизоване воде уз стално мијешање. Настали талог одстрањује се филтрирањем;

2.2.10. Метанолни раствор хлороводоничне киселине: 250 ml хлороводоничне киселине и 750 ml метанола;

2.2.11. Лијевак за одвајање запремине 250 ml;

2.2.12. Нормални судови запремине 50 ml, 500 ml и 1000 ml;

2.2.13. Балон за дестилацију са округлим дном запремине 250 ml, стаклени чеп и повратни кондензатор, грануле за кључање;

2.2.14. pH метар;

2.2.15. Спектрофотометар за мјерење на 650 nm, са киветама од 1 cm до 5 cm;

2.2.16. Квалитативни филтер-папир.

### 2.3. Поступак

Узорци за анализу не узимају се из слоја пјене.

Послије испирања водом, опрема која се користи за анализе мора бити темељно испрана метанолним раствором хлороводоничне киселине (2.2.10) и дејонизованом водом непосредно прије коришћења.

Узорци инфлуента и ефлуента из постројења активног муља филтрирају се одмах након узорковања, а првих 100 ml филтрата се одбацује.

У лијевак за одвајање запремине 250 ml преноси се измјерена запремина узорка и по потреби неутралише. Одмјерена запремина узорка треба да садржи између 20 g и 150 g метиленско плаво активне супстанце. При нижем садржају MBAS може се користити до 100 ml узорка. Када је одмјерена запремина мања од 100 ml, узорак треба разблажити дејонизованом водом до 100 ml. У узорак се додаје 10 ml раствора пуфера (2.2.1), 5 ml неутралног раствора метиленског плавог (2.2.2) и 15 ml хлороформа (2.2.4). Смјеша се равномерно и не превише снажно мућка један минут. Послије раздвајања слојева, хлороформски слој се преноси у други лијевак за одвајање у који се додаје 110 ml дејонизоване воде и 5 ml киселог раствора метиленског плавог (2.2.3). Смјеша се мућка један минут. Хлороформски слој се филтрира у нормални суд кроз филтер од памучне вате, који је претходно очишћен и наквашен хлороформом.

Алкални и кисели раствори екстрахују се три пута, користећи 10 ml хлороформа за другу и трећу екстракцију. Спојени хлороформски екстракти филтрирају се у нормални суд запремине 50 ml кроз исти филтер од памучне вате и разблажују до црте хлороформом коришћењем за испирање филтера. Мјери се апсорбанца хлороформског раствора на 650 nm у кивети од 1 cm до 5 cm у односу на хлороформ. Слијепа проба се одређује истим поступком.

### 2.4. Калибрациона крива

Раствор за калибрацију припрема се од стандардне супстанце метил-естра додецилбензенсулфонске киселине (тетрапропилен тип мол. масе 340) након сапонификације у калијумову со.

MBAS се израчунава као натријум-додецилбензен-сулфонат (мол. масе 348).

Микропипетом се у балон са округлим дном одмјери 400-450 mg метил-естра додецилсулфонске киселине са тачношћу 0,1 ml, дода се 50 ml етанолног раствора калијум-хидроксида и неколико гранула за кључање. Постави се повратни кондензатор и смјеша се остави да кључа један час. Након хлађења, кондензатор и шлиф се исперу са око 30 ml етанола, који се сједини са садржајем балона. Раствор се титрује сумпорном киселином, уз фенол-фталейн као индикатор, до обезбојења. Титровани раствор пребаци се у нормални суд запремине 1000 ml, разблажи дејонизованом водом до црте и помијеша.

Дио овог основног стандардног раствора сурфактанта даје се разблажује. Одмјери се 25 ml тог раствора и пребаци у нормалан суд запремине 500 ml, разблажи водом до црте и помијеша.

Такав стандардни раствор садржи:

$$\frac{E \cdot 1,023 \text{ mg MBAS (no ml)}}{20.000}$$

при чему се E маса узорка исказује у милиграмима.

За припрему калибрационе криве одмјерава се 1 ml, 2 ml, 4 ml, 6 ml и 8 ml стандардног раствора и разблажи до 100 ml дејонизованом водом. Даље се спроводи поступак наведен у тачки 2.3. овог прилога, укључујући и слијепу пробу.

### 2.5. Израчунавање резултата

Количина анијонског сурфактанта (MBAS) у узорку читава се са калибрационе криве. Садржај MBAS у узорку израчунава се по једначини:

$$\frac{\text{mg MBAS} \cdot 1000}{V} = \text{MABS mg/l,}$$

при томе је V запремина коришћеног узорка изражена у милилитрима.

Резултати се изражавају као натријум-додецилбензен сулфонат (молекулска маса 348).

### 2.6. Приказивање резултата

Изразити резултате као MBAS mg/l са тачношћу 0,1.

## 3. Одређивање нејонских сурфактаната у тестовима биоразградљивости

### 3.1. Увод

Сурфактанти се концентрују и изолију екстракцијом уз помоћ гаса.

У коришћеном узорку количина нејонског сурфактанта треба да буде у опсегу од 250 g до 800 g. Тако одвојен сурфактант раствора се у етил-ацетату.

Након фазе одвајања и испаравања раствора, нејонски сурфактант таложи се у воденом раствору модификованим Драгендорфовим реагенсом (KBiI<sub>4</sub> + BaCl<sub>2</sub> + глацијална сирћетна киселина).

Талог се одваја филтрирањем, испира глацијалном сирћетном киселином и на крају раствора у раствору амонијум-тартарата. Бизмут, у раствору, титрује се потенциометријском титрацијом, раствором пиридин-дитиокарбамата, pH 4-5, користећи платинску индикаторску електроду и каломелову референтну електроду или сребро/сребро-хлоридну референтну електроду. Метода се може примјенити на нејонске сурфактанте који садрже од 6 до 30 група алкилен оксида.

Резултат титрације множи се емпиријским фактором 54 ради конверзије у референтну супстанцу нонилфенол кондензован са 10 мола етилен-оксида (NP 10).

### 3.2. Реагенси и опрема

Реагенси који се користе за одређивање нејонских сурфактаната у тестовима биоразградљивости припремају се са дејонизованом водом.

Наведени реагенси су:

3.2.1. Етил-ацетат, чист, дестилован непосредно прије употребе;

3.2.2. Натријум-бикарбонат (NaHCO<sub>3</sub> AR);

3.2.3. Хлороводична киселина, разблажена (20 ml концентроване киселине - HCl разблажити водом до 1000 ml);

3.2.4. Метанол AR, дестилован непосредно прије употребе, у стакленој боци;

3.2.5. Бром-крезол љубичасто, 0,1 g у 100 ml метанола;

3.2.6. Средство за таложење

Средство за таложење је смјеша два запреминска дијела раствора А и једног запреминског дијела раствора Б. Смјеша се чува у тамној боци и може се користити највише мјесец дана након што се припреми:

#### 3.2.6.1. Раствор А

Раствор се припрема тако да се 1,7 g бизмут-нитрата (BiONO<sub>3</sub> · H<sub>2</sub>O AR) раствора у 20 ml глацијалне сирћетне киселине и допуни водом до 100 ml. Затим се 65 g калијум-јодида AR раствори у 200 ml воде. Ова два раствора помијешају се у нормалном суду запремине 1000 ml, дода се 200 ml глацијалне сирћетне киселине (3.2.7) и нормални суд допуни водом до 1000 ml.

#### 3.2.6.2. Раствор Б

Раствор се припрема тако да се 290 g баријум-хлорида (BaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O AR) раствори у 1000 ml воде;

3.2.7. Глацијална сирћетна киселина од 99% до 100% (ниже концентрације нису погодне);

#### 3.2.8. Раствор амонијум-тартарата

Помијеша се 12,4 г винске киселине AR и 12,4 ml раствора амонијака AR ( $d = 0,910 \text{ g/ml}$ ) и допуни водом до 1000 ml (или се употрејеби еквивалентна количина амонијум-тартарата AR);

#### 3.2.9. Разблажен раствор амонијака

Раствор се припрема тако да се 40 ml раствора амонијака AR ( $d = 0,910 \text{ g/ml}$ ) разблажи се водом до 1000 ml;

#### 3.2.10. Стандардни ацетатни пуфер

Раствор се припрема тако да се 40 г чврстог натријум-хидроксидна AR раствори у 500 ml воде у чаши и остави да се охлади. У то се дода 120 ml глацијалне сирћетне киселине (3.2.7), добро промијеша, охлади и пребаци у нормални суд запремине 1000 ml и допуни водом до црте;

3.2.11. Раствор пирилодин дитиокарбамата (познат као “карбат раствор”)

Раствор се припрема тако да се 103 mg натријум-пирилодин дитиокарбамата ( $\text{C}_5\text{H}_9\text{NNaS}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) раствори са око 500 ml воде, дода се 10 ml п-амил алкохола AR и 0,5 г  $\text{NaHCO}_3$  AR и допуни водом до 1000 ml;

3.2.12. Раствор бакар-сулфата (за стандардизацију реагенса из тачке 3.2.11);

##### 3.2.12.1. Основни раствор

Одмјери се 1,249 г бакар-сулфата ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  AR), помијеша са 50 ml 0,5 M сумпорне киселине и допуни водом до 1000 ml.

##### 3.2.12.2. Стандардни раствор

Одмјери се 50 ml основног раствора, помијеша са 10 ml 0,5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и допуни водом до 1000 ml;

##### 3.2.13. Натријум-хлорид AR

Опрема која се користи за одређивање нејонских сурфактаната у тестовима биоразградљивости је:

##### 3.2.14. Опрема за екстракцију уз помоћ гаса (Слика 5)

Пречник синтероване плоче мора бити једнак унутрашњем пречнику цилиндра;

3.2.15. Лијевак за одвајање, 250 ml;

3.2.16. Магнетна мјешалица са магнетом од 25 mm до 30 mm;

3.2.17. Гуч за жарење, пречник перфорираног дна = 25 mm, тип G4;

3.2.18. Округли филтер-папири од стаклених влакана, пречника 27 mm с пречником влакна од 0,3  $\mu\text{m}$  до 1,5  $\mu\text{m}$ ;

3.2.19. Двије боце за филтрирање запремине 250 ml и 500 ml са адаптерима и гуменим крагнама;

3.2.20. Потенциометар који бљежи резултате мјерења, са уграђеном платинском индикаторском електродом и каломеловом или сребро/сребро-хлорид референтном електродом, мјерног опсега 250 mV, са аутоматском биретом запремине од 20 ml до 25 ml или одговарајућом ручном опремом.

### 3.3. Поступак

Поступак спроводи се у сљедећим фазама:

#### 3.3.1. Концентровање и изоловање сурфактанта

Водени узорак се филтрира кроз квалитативни филтер-папир. Уклоните првих 100 ml филтрата. У опрему за екстракцију уз помоћ гаса, претходно испрану етил-ацетатом, стави се измјерена количина узорка коју садржи од 250 г до 800 г нејонског сурфактанта.

У то се дода 100 г натријум-хлорида и 5 г натријум-бикарбоната да би се побољшало изоловање сурфактанта. Ако запремина узорка прелази 500 ml, те соли се додају у чврстом стању и растварају пропуштањем азота или ваздуха.

Ако је узорак мањи, соли се растворе у 400 ml воде и пребаце у опрему за екстракцију уз помоћ гаса. Вода се додаје док се ниво не подигне до горње славине.

Површина воде се пажљиво прелије са 100 ml етил-ацетата. Боца за испирање у гасној цијеви (за азот или ваздух) напуни се етил-ацетатом до двије трећине.

Кроз опрему се пропушта гас, и то брзином протока од 30 l/h до 60 l/h; препоручује се употреба мјерача протока. У почетку се брзина увођења ваздуха поступно повећава. Брзина протока подешава се тако да су фазе и даље видљиво одвојене како би мијешање фазе било што мање, а време и растварање етил-ацетата у води. Проток гаса се зауставља након пет минута.

Ако се запремина органске фазе растварањем у води смањи за више од 20%, поступак се мора поновити, а посебну пажњу треба посветити брзини протока гаса.

Органска фаза се затим испусти у лијевак за одвајање. Вода која се том приликом улије у лијевак за одвајање (требало би да је буде само неколико милилитара) одвоји се и врати у опрему за екстракцију. Фаза етил-ацетата филтрира се кроз суви квалитативни филтер-папир у боцу од 250 ml. У опрему за екстракцију уз помоћ гаса стави се још 100 ml етил-ацетата и поново се пропушта азот или ваздух додатних пет минута. Испусти се органска фаза у претходно коришћен лијевак за одвајање, уклони се водена фаза и пропушти се органска фаза кроз исти филтер, као и прва количина етил-ацетата. Лијевак за одвајање и филтер испирају се са 20 ml етил-ацетата.

Екстракт етил-ацетата упарава се до сувог на воденом купатилу. Преко површине екстракта усмјери се благо струјање ваздуха ради бржег испаравања.

#### 3.3.2. Таложење и филтрирање

Суви остатак преостао након упаравања раствори се у 5 ml метанола, дода 40 ml воде и 0,5 ml разблажене HCl (3.2.3). Смјеша се мијеша на магнетној мјешалици. Мезуром се одмјери 30 ml средства за таложење (3.2.6) и дода том раствору. Талог пада мијешањем. Након десет минута мијешања, смјеша се остави да одстоји најмање пет минута. Смјеша се филтрира кроз гуч филтер чије је дно прекривено филтер-папиром од стаклених влакана. Филтер се испере са приближно 2 ml глацијалне сирћетне киселине под вакуумом. Затим се ерленмајер, магнет и гуч за жарење добро исперу са 40 ml до 50 ml глацијалне сирћетне киселине. Остатак талога на зидовима ерленмајера није потребно потпуно пренијети на филтер-папир јер се раствор талога за титрацију враћа у ерленмајер гдје се преостали талог раствара.

#### 3.3.3. Растварање талога

Талог са филтера раствара се додавањем 10 ml врућег раствора амонијум-тартарата (око 80°C), (3.2.8), остави се да стоји неколико минута, затим се раствор усиса у вакуум-боцу за филтрацију. Тај поступак се понавља три пута.

Садржај вакуум-боце пребацује се у ерленмајер употребијелен за таложење. Зидови ерленмајера се испирају са још 20 ml раствора амонијум-тартарата како би се растворио остатак талога.

Гуч филтер, адаптер и вакуум-боца добро се исперу са 150 ml до 200 ml воде и вода од испирања се пренесе у ерленмајер употребијелен за таложење.

#### 3.3.4. Титрација

Раствор се мијеша на магнетној мјешалици (3.2.16), дода се неколико капи бром-крезол љубичастог (3.2.5) и разблажени раствор амонијака (3.2.9) све док раствор не постане љубичаст (раствор је у почетку благо кисео од остатка сирћетне киселине за испирање). Затим се додаје 10 ml стандардног ацетатног пуфера (3.2.10). У раствор се уроне електроде и титрује се потенциометријским стандардним раствором пирилодин-дитиокарбамата (3.2.11), при чему се врх бирете урони у раствор.

Брзина титрације не смије бити већа од 2 ml/min.

Завршна тачка титрације је пресјек тангенти двије гране потенциометријске криве. Повремено се може примјенити смањење закривљености потенциометријске криве, што се може отклонити пажљивим чишћењем (папиром за брушење) платинске електроде.

#### 3.3.5. Слијепа проба

Од фазе таложења и филтрирања (3.3.2), истовремено, према истом поступку, ради се слијепа проба са 5 ml метанола и 40 ml воде. Запремина стандардног раствора пирилодин-дитиокарбамата (3.2.11) утрошена на титрацију слијепе пробе треба да буде мања од 1 ml. Уколико је та запремина већа, реагенси (3.2.3, 3.2.7, 3.2.8, 3.2.9, 3.2.10) нису адекватне чистоће, посебно им је повећан садржај тешких метала. Такви реагенси морају се замјенити. Слијепа проба се мора узети у обзир при израчунавању резултата.

3.3.6. Провјера фактора стандардног раствора пирилодин-дитиокарбамата

Фактор “f” за раствор пирилодин-дитиокарбамата одређује се на дан употребе. Да би се одредио фактор “f”, у 10 ml раствора бакар-сулфата (3.2.12) дода се 100 ml воде и 10 ml стандардног ацетатног пуфера (3.2.10) и титрује се стандардним раствором пирилодин-дитиокарбамата.

Ако је употребијелена количина стандардног раствора пирилодин-дитиокарбамата “a” ml, фактор “f” износи:  $f = 10/a$ , и сви резултати титрације множе се тим фактором.

### 3.4. Израчунавање резултата

Сваки нејонски сурфактант има свој фактор у зависности од састава, посебно од дужине ланца алкеноксида. Концентрација нејонског сурфактанта изражава се у односу на стандардну супстанцу – нонилфенол са десет јединица етилен-оксида (NP 10), са фактором конверзије 0,054.

Примјеном тог фактора рачуна се количина сурфактанта садржаног у узорку, изражена у милиграмима еквивалента NP 10:

- (b - c) · f · 0,054 = mg нејонског сурфактанта као NP 10, при чему су:
- b - запремина стандардног раствора пиролидин-дитиокарбама-та употребљена за титрацију узорка (ml),
  - c - запремина стандардног раствора пиролидин-дитиокарбама-та употребљена за титрацију слијепе пробе (ml),
  - f - фактор стандардног раствора пиролидин-дитиокарбамата.

3.5. Изражавање резултата

Резултати се изражавају у mg/l као NP 10 заокруживањем на 0,1.

4. Припрема анијонских сурфактаната које је потребно испитати

4.1. Увод

4.1.1. Обрада узорака

Анијонски сурфактанти и детерџенти прије одређивања при-марне биоразградљивости обрађују се на следећи начин:

| Производи                           | Обрада                                                                           |
|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| анијонски сурфактанти               | не обрађује се                                                                   |
| детерџенти који садрже сур-фактанте | алкохолна екстракција, затим изоловање анијонских сурфакта-ната јонском измјеном |

Сврха алкохолне екстракције је уклањање нерастворних и не-органских састојака детерџента какав се ставља на тржиште, а који могу утицати на одређивање биоразградљивости.

4.1.2. Поступак јонске измјене

Због правилног одређивања биоразградљивости, потребно је изоловати и одвојити анијонске сурфактанте од сапуна, нејонских и катјонских сурфактаната. То се постиже техником јонске измје-не уз употребу макропорозне јоноизмјењивачке смоле и одгова-рајућих елуената за фракционо елуирање. Тим поступком сапуни, анијонски и нејонски сурфактанти изолују се одједном.

4.1.3. Аналитичка контрола

Концентрација анијонских сурфактаната у синтетичким де-терџентима одређује се након хомогенизовања, аналитичком ме-тодом за MBAS. Садржај сапуна одређује се одговарајућом аналитичком методом. Та анализа служи за израчунавање потребних ко-личина за припрему фракција за испитивање биоразградљивости.

За одређивање биоразградљивости довољно је екстраховати више од 80% анијонских сурфактаната. У пракси се обично добије 90% или више.

4.2. Принцип методе

Из хомогеног узорка (прашака, остатака након сушења де-терџента који су у облику пасте или течности) добија се етанолни екстракт који садржи сурфактанат, сапун и друге састојке узорка синтетичког детерџента растворне у алкохолу. Етанолни екстракт се упарава до сувог остатка који се раствори у смјеси изопропа-нол/вода, а добијени раствор, загријан на 50 °C, пропусти се кроз комбинацију веома киселог катјонског јоноизмјењивача и макро-порозног анијонског јоноизмјењивача. Та температура је потреб-на да би се спријечило таложење масних киселина које се могу појавити у киселој средини. Сви нејонски сурфактанти остају у ефлуенту. Масне киселине сапуна одвајају се екстракцијом етано-лом који садржи CO<sub>2</sub>. Анијонски сурфактанти се затим добијају у облику амонијумове соли, елуирањем помоћу раствора амонијум-бикарбоната у смјеси изопропанолa и воде. Добијене амонијумо-ве соли користе се за испитивање биоразградљивости. Катјонски сурфактанти који могу утицати на испитивање биоразградљиво-сти уклањају се помоћу катјонског јоноизмјењивача постављеног изнад анијонског јоноизмјењивача.

4.3. Реагенси и опрема

Реагенси и опрема који се користе за припремну обраду анијон-ских сурфактаната у тестовима биоразградљивости су:

- 4.3.1. Дејонизована вода;
- 4.3.2. Етанол, 95% (v/v) C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (средства која се могу кори-стити за денатурацију су метилетил-кетон или метанол);
- 4.3.3. Смјеша изопропанол/вода (50/50 v/v):
  - 50 запреминских дијелова изопропанолa, CH<sub>3</sub>CHONCH<sub>3</sub>, и
  - 50 запреминских дијелова воде (4.3.1);
- 4.3.4. Раствор угљен-диоксида у етанолу (око 0,1% CO<sub>2</sub>)

Угљен-диоксид (CO<sub>2</sub>) се десет минута пропушта кроз ета-нол (4.3.2), помоћу доводне цијеви са уграђеним синтерованим стаклом; тај раствор користи се само свјеже припремљен;

4.3.5. Раствор амонијум-бикарбоната (60/40 v/v)

Раствор се припрема тако да се 0,3 mol NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> раствори у 1000 ml смјеше изопропанол/вода која се састоји од 60 запре-минских дијелова изопропанолa и 40 запреминских дијелова воде (4.3.1);

- 4.3.6. Катјонски јоноизмјењивач (KAT):
  - веома кисео, отпоран на алкохол (50 mesh до 100 mesh);
- 4.3.7. Анијонски јоноизмјењивач (AAT):
  - макропорозан, Merck Lewatit MP 7080 (70 mesh до 150 mesh) или одговарајући јоноизмјењивач другог произвођача;
- 4.3.8. Хлороводична киселина, 10% HCl (m/m);
- 4.3.9. Балон са округлим дном запремине 2000 ml са стакленим чепом и повратним кондензатором;
- 4.3.10. Усисни (вакуум) филтер (који се може загријавати), пречника 90 mm за филтер-папир;
- 4.3.11. Вакуум-боца запремине 2000 ml;
- 4.3.12. Колоне за јонску измјену са облогом за загријавање и славином:
  - унутрашња цијев пречника 60 mm, висине 450 mm (Слика 4. овог прилога);
- 4.3.13. Водено купатило;
- 4.3.14. Вакуум-сушилица;
- 4.3.15. Термостат;
- 4.3.16. Ротациони вакуум-упаривач.

4.4. Припрема екстракта и изоловање анијонских активних агенаса

4.4.1. Припрема екстракта

Потребна количина сурфактаната за испитивање биора-зградљивости износи 50 g MBAS.

Количина производа који се екстрахује обично не прелази 1000 g. Препоручује се да се количина производа који служи за припрему екстракта за испитивање биоразградљивости ограничи на 5000 g. Искуство је показало да боље резултате даје вишеструка екстракција са мањим количинама, него једна екстракција са већом количином растворача.

Назначене количине јоноизмјењивача предвиђене су за 600 mmolа до 700 mmolа сурфактаната и сапуна.

4.4.2. Изоловање састојака растворних у алкохолу

У 1250 ml етанола дода се 250 g синтетичког детерџента који треба анализирати, смјеша се загрије до тачке кључања и рефлук-тује сат времена уз мијешање. Такав алкохолни раствор, док је још врућ, брзо се филтрира кроз вакуум-филтер са широким порама загријан на 50 °C. Балон и вакуум-филтер испирају се са 200 ml врућег етанола. Филтраг и течност од испирања сакупља се у ва-куум-боцу.

Ако се анализирају пасте или течни детерџенти, узорак не тре-ба да садржи више од 55 g анијонског сурфактанта и 35 g сапуна. Одмјерени узорак упари се до сувог. Суви остатак раствори се у 2000 ml етанола и настави се по описаном поступку.

Код прашкастог узорка мале густине (< 300 g/l) препоручује се да се удео етанола повећа тако да износи 20 : 1. Етанолни филтраг, на ротационом вакуум-упаривачу, упари се до сувог остатка. По-ступак се понови ако је потребна већа количина екстракта.

Суви остатак се раствори у 5000 ml смјеше изопропанол/вода.

4.4.3. Припрема колона за јонску измјену

Колона за катјонску измјену

Припрема се тако да се 600 ml смоле за катјонску измјену (4.3.6) стави у боцу запремине 3000 ml и прелије са 2000 ml хлоро-водичне киселине (4.3.8). Остави се да одстоји најмање два сата уз повремено мијешање.

Након тога, киселина се одлије и смола се помоћу дејонизоване воде пребаци у колону (4.3.12), у коју је претходно стављен комадић стаклене вуне. Колона се елуира дејонизованом водом са протоком од 10 ml/min до 30 ml/min све док у елуату више не буде хлорида. Након тога, елуира се са 2000 ml смјеше изопропанол/вода (4.3.3), са протоком од 10 ml/min до 30 ml/min. Овако припремљена колона је спремна за коришћење.

Колона за анијонску измјену

Припрема се тако да се 600 ml смоле за анијонску измјену (4.3.7) стави у боцу запремине 3000 ml и прелије са 2000 ml дејо-низоване воде.

Смола се остави да бубри најмање два сата, а затим се помоћу дејонизоване воде пребаци у колону у коју је претходно стављен комадић стаклене вуне.

Колона се елуира са око 5000 ml 0,3 M раствора амонијум-бикарбоната (4.3.5) све док у елуату више не буде хлорида.

Затим се колона поново елуира са 2000 ml дејонизоване воде. Након тога, елуира се са 2000 ml смјеше изопропанол/вода (4.3.3), са протоком од 10 ml/min до 30 ml/min. Овако припремљена колона заштићена је хидроксилним групама и спремна је за коришћење.

4.4.4. Поступак јонске измјене

Јоноизмјењивачке колоне поставе се тако да се колона за катјонску измјену налази изнад колоне за ањонску измјену. Јоноизмјењивачке колоне загрију се на 50 °C, а то се регулише термостатом.

Количина од 5000 ml раствора добијеног по поступку из тачке 4.4.2. овог прилога загрије се на 60 °C и пропусти кроз јоноизмјењивачке колоне уз проток од 20 ml/min. Колоне се елуирају са 1000 ml вруће смјеше изопропанол/вода (4.3.3).

За добијање ањонских сурфактаната (MBAS) катјонска јоноизмјењивачка колона KAT се одвоји. Помоћу 5000 ml раствора етанол/CO<sub>2</sub> при 50 °C (4.3.4) елуирају се масне киселине сапуна из катјонске јоноизмјењивачке колоне. Елуат се баци. Затим се MBAS елуирају из ањонске јоноизмјењивачке колоне AAT помоћу 5000 ml раствора амонијум-бикарбоната (4.3.5). Добијени елуат упари се на воденом купатилу или у ротационом вакуум-упаривачу до сувог остатка. Суви остатак садржи MBAS (у облику амонијум соли), а може да садржи и ањонске супстанце које нису сурфактанти и који не утичу на одређивање биоразградљивости. Овом остатку додаје се дејонизована вода до дефинисане запремине и одреди садржај MBAS у аликвоту. Раствор се користи као стандардни раствор ањонских синтетичких детерџената за одређивање биоразградљивости. Раствор треба чувати на температури нижој од 5 °C.

4.4.5. Регенерација јоноизмјењивачких смола

Катјонски измјењивач се након употребе баца.

Смола за ањонску измјену регенерише се елуирањем раствором амонијум-бикарбоната (4.3.5) уз проток око 10 ml/min све док у елуату више не буде ањонски сурфактаната (тест с метиленим плавином). Затим, ањонски измјењивач се елуира са 2000 ml смјеше изопропанол/вода (4.3.3) и тада је опет спреман за употребу.

5. Припрема нејонских сурфактаната које је потребно испитати

5.1. Обрада узорака

5.1.1. Нејонски сурфактанти и детерџенти прије одређивања примарне биоразградљивости обрађују се на следећи начин:

| Производи                          | Обрада                                                                           |
|------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| нејонски сурфактанти               | не обрађује се                                                                   |
| детерџенти који садрже сурфактанте | алкохолном екстракцијом, затим изоловање нејонских сурфактаната јонском измјеном |

Сврха алкохолне екстракције је уклањање нерастворних и неорганских састојака детерџента који могу утицати на одређивање биоразградљивости.

5.1.2. Поступак јонске измјене

Изоловање и одвајање нејонских сурфактаната од сапуна, ањонских и катјонских сурфактаната неопходно је за тачно одређивање биоразградљивости.

То се постиже поступком јонске измјене уз коришћење макропорозне смоле и одговарајућих средстава за фракциону елуацију. Овим поступком се сапуни, ањонски и катјонски сурфактанти изолују одједном.

5.1.3. Аналитичка контрола

Концентрација ањонских и нејонских сурфактаната у детерџенту одређује се након хомогенизовања, према аналитичком поступку за MBAS и BiAS. Садржај сапуна одређује се одговарајућом аналитичком методом.

Ова анализа служи за израчунавање потребних количина за припрему фракција за испитивање биоразградљивости.

За одређивање биоразградљивости довољно је екстраховати више од 80% нејонских сурфактаната. У пракси се обично добије 90% или више.

5.2. Принципи методе

Из хомогеног узорка (прашка, остатак након сушења детерџената који су у облику пасте или течности) добија се етанолни екстракт који садржи сурфактанте, сапун и друге састојке узорка синтетичког детерџента растворне у алкохолу. Етанолни екстракт се упарава до сувог остатка који се раствори у смјеси изопропанол/вода, а добијени раствор, загријан на 50 °C, пропусти кроз комбинацију веома киселог катјонског јоноизмјењивача и макропорозног ањонског јоноизмјењивача. Ова температура је потребна да би се спријечило таложење масних киселина које се

могу појавити у киселој средини. Нејонски сурфактанти добију се упаравањем отпадног раствора. Катјонски сурфактанти који могу утицати на испитивање биоразградљивости и аналитички поступак уклањају се помоћу катјонског јоноизмјењивача, постављеног изнад ањонског јоноизмјењивача.

5.3. Реагенси и опрема

Реагенси и опрема који се користе за припрему нејонских сурфактаната у тестовима биоразградљивости су:

5.3.1. Дејонизована вода;

5.3.2. Етанол, 95% (v/v) C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (средства која се могу користити за денатурацију су метилетилкетон или метанол);

5.3.3. Смјеша изопропанол/вода (50/50 v/v);

- 50 запреминских дијелова изопропанолa, CH<sub>3</sub>CHONCH<sub>3</sub>, и  
- 50 запреминских дијелова воде (5.3.1);

5.3.4. Раствор амонијум-бикарбоната (60/40 v/v)

Раствор се припрема тако да се 0,3 mol NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> раствори у 1000 ml смјеше изопропанол/вода, која се састоји од 60 запреминских дијелова изопропанолa и 40 запреминских дијелова воде (5.3.1);

5.3.5. Катјонски јоноизмјењивач (KAT):

- веома кисео, отпоран на алкохол (50 mesh до 100 mesh);

5.3.6. Ањонски јоноизмјењивач (AAT):

- макропорозан, Merck Lewatit MP 7080 (70 mesh до 150 mesh) или одговарајући јоноизмјењивач другог произвођача;

5.3.7. Хлороводична киселина, 10% HCl (m/m);

5.3.8. Балон са округлим дном запремине 2000 ml са стакленим чепом и повратним кондензатором;

5.3.9. Усисни вакуум-филтер (који се може загријавати), пречника 90 mm за филтер-папир;

5.3.10. Вакуум-боца запремине 2000 ml;

5.3.11. Колоне за јонску измјену са облогом за загријавање и славином:

- унутрашња цијев пречника 60 mm, висине 450 mm (Слика 4. овог прилога);

5.3.12. Водено купатило;

5.3.13. Вакуум-сушилица;

5.3.14. Термостат;

5.3.15. Ротациони вакуум-упаривач.

5.4. Припрема екстракта и изоловање нејонских активних агенаса

5.4.1. Припрема екстракта

Потребна количина сурфактаната за испитивање биоразградљивости износи око 25 g BiAS.

Количина производа потребна за припрему екстракта за одређивање биоразградљивости не треба да буде већа од 2000 g. Понекад је потребно поновити поступак два или више пута да би се добила довољна количина супстанце за одређивање биоразградљивости. Искуство је показало да боље резултате даје вишеструка екстракција са мањим количинама, него једна екстракција са већом количином растварача.

5.4.2. Изоловање састојака растворних у алкохолу

У 1250 ml етанола дода се 250 g синтетичког детерџента који треба анализирати, смјеша загрије до тачке кључања и рефлуктује сат времена уз мијешање. Врућ алкохолни раствор брзо се филтрира кроз вакуум-филтер са широким порама, загријан на 50 °C. Балон и вакуум-филтер исперу се са 200 ml врућег етанола. Филтрат и течност од испирања сакупљају се у вакуум-боцу.

Ако се анализирају пасте или течни детерџенти, узорак не треба да садржи више од 25 g ањонског сурфактанта и 35 g сапуна. Олмјерени узорак упари се до сувог остатка. Суви остатак се раствори у 500 ml етанола и настави се по претходно описаном поступку. Код прашкастог узорка мале густине (< 300 g/l) препоручује се да се удно етанола повећа тако да износи 20 : 1. Етанолни филтрат, на ротационом вакуум-упаривачу, упари се до сувог остатка. Поступак се понови ако је потребна већа количина екстракта.

Суви остатак се раствори у 5000 ml смјеше изопропанол/вода.

5.4.3. Припрема колона за јонску измјену

Колона за катјонску измјену

Припрема се тако да се 600 ml смоле за катјонску измјену (5.3.5) стави у боцу запремине 3000 ml и прелије са 2000 ml хлороводичне киселине (5.3.7). Остави се да одстоји најмање два сата уз повремено мијешање.

Након тога, киселина се одлије и смола се, помоћу дејонизоване воде, пребаци у колону (5.3.12), у коју је претходно стављен комадић

стаклене вуне. Елуирати колону дејонизованом водом са протоком од 10 ml/min до 30 ml/min све док у елуату више не буде хлорида. Након тога, елуира се са 2000 ml смјеше изопропанол/вода (5.3.3), чији је проток од 10 ml/min до 30 ml/min. Овако припремљена колона је спремна за коришћење.

Колона за ањонску измјену  
Припрема се тако да се 600 ml смоле за ањонску измјену (5.3.6) стави у боцу и прелије са 2000 ml дејонизоване воде.

Смола се остави да бубри најмање два сата, а затим се помоћу дејонизоване воде пребаци у колону у коју је претходно стављен комадић стаклене вуне.

Колона се елуира са око 5000 ml 0,3 М раствора амонијум-бикарбоната (5.3.4) све док у елуату више не буде хлорида.

Затим се колона поново елуира са 2000 ml дејонизоване воде. Након тога, елуира се са 2000 ml смјеше изопропанол/вода (5.3.3) са протоком од 10 ml/min до 30 ml/min. Овако припремљена колона засићена је хидроксилним групама и спремна је за коришћење.

5.4.4. Поступак јонске измјене  
Јоноизмјењивачке колоне поставе се тако да се колона за катјонску измјену налази изнад колоне за ањонску измјену. Јоноизмјењивачке колоне загрију се на 50 °C, а то се регулише термостатом.

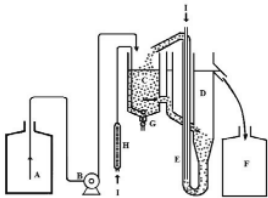
Припрема се тако да се 5000 ml раствора добијеног по поступку из тачке 5.4.2. овог прилога загрије на 60 °C и пропусти се раствор кроз јоноизмјењивачке колоне уз проток од 20 ml/min. Колоне се елуирају са 1000 ml вруће смјеше изопропанол/вода (5.3.3).

За добијање нејонских сурфактаната прикупи се филtrat и раствор од испирања филтера и на ротационом вакуум-упаривачу упари до сувог. Суви остатак садржи BiAS.

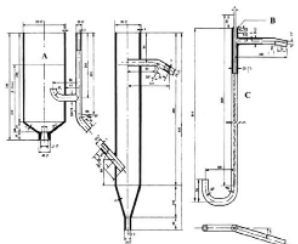
Том раствору додаје се дејонизована вода до дефинисане запремине и одреди садржај BiAS у аликвоту. Раствор се користи као стандардни раствор нејонских сурфактаната за одређивање биораграђљивости. Раствор треба да се чува на температури нижој од 5 °C.

5.4.5. Регенерација јоноизмјењивачких смола  
Катјонски измјењивач се након употребе баца.

Смола за ањонску измјену регенерише се елуирањем са око 5000 ml до 6000 ml раствора амонијум-бикарбоната (5.3.4) уз проток око 10 ml/min, све док у елуату више не буде ањонских сурфактаната (тест с метиленим плавим). Затим се ањонски измјењивач елуира са 2000 ml смјеше изопропанол/вода (5.3.3) и тада је опет спреман за употребу.

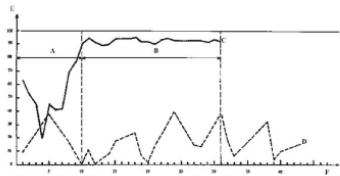


Слика 1 - Постројење са активним муљем - шематски приказ  
А - Посуда за чување синтетичке отпадне воде  
В - Уређај за дозирање  
С - Посуда за аерацију  
Д - Таложник  
Е - Пумпа за аерацију  
Ф - Посуда за сакупљање третираног ефлуента  
Г - Синтеровани инјектор ваздуха  
Н - Мјерач протока ваздуха  
И - Ваздух



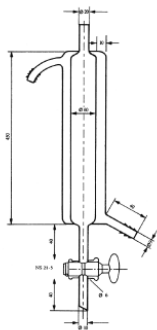
Слика 2 - Уређај са активним муљем: детаљан приказ

- А - Ниво течности
- В - Тврди PVC
- С - Стакло или водоотпорни пластични материјал (тврди PVC)

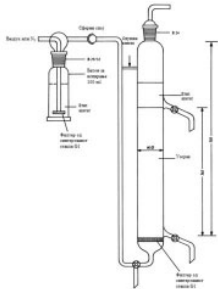


Слика 3 - Одређивање биоразграђљивости - тест за доказивање

- А - Период увођења и прилагођавања
- В - Период одређивања биоразграђљивости (21 дан)
- С - Лако биоразграђљив сурфактант
- Д - Тешко биоразграђљив сурфактант
- Е - Биоразграђљивост (%)
- Ф - Вријеме (број дана)



Слика 4 - Колона за јонску измјену са облогом за загријавање



Слика 5 - Опрема за екстракцију уз помоћ гаса

ПРИЛОГ 4.

ОБРАЗАЦ ТЕХНИЧКОГ ДОСИЈЕА О СУРФАКТАНТУ

| ТЕХНИЧКИ ДОСИЈЕ О СУРФАКТАНТУ                        |  |
|------------------------------------------------------|--|
| 1. ПОДАЦИ О ИДЕНТИТЕТУ СУРФАКТАНТА                   |  |
| 1.1. Назив сурфактанта                               |  |
| 1.1.1. Назив по IUPAC номенклатури                   |  |
| 1.1.2. Остали називи                                 |  |
| 1.1.3. CAS број и CAS назив, ако су доступни         |  |
| 1.1.4. ЕС број, ако је доступан                      |  |
| 1.2. Молекуларна и структурна формула                |  |
| 1.3. Састав сурфактанта                              |  |
| 2. ПОДАЦИ О УПОТРЕБИ СУРФАКТАНТА У ДЕТЕРЦЕНТУ        |  |
| 2.1. Количина сурфактанта употријебљена у детерценту |  |

|                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2.2. Подаци о начину употребе на основу којих се врши процје-на дјеловања и изложености животне средине сурфактанту у вези са употребом детерцента                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                 |
| Значај употребе (друштвена вриједност)                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                 |
| Услови употребе (сценарио испуштања)                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                 |
| Употријебљена количина                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                 |
| Доступност и прихватљивост алтер-натива (дјелотворност и економска оправданост)                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                 |
| Процјена одговарајућих података о утицају на животну средину                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                 |
| 3. ПОДАЦИ О ПОТЕНЦИЈАЛНО ТЕШКО РАЗГРАДЉИВИМ МЕТАБОЛИТИМА                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                 |
| [Наводе се подаци о токсичности испитиваних раствора. Уколи-ко нису доступни подаци о идентиту остатка, могу се тражити резултати додатних физичко-хемијских испитивања у зависно-сти од потенцијалног ризика, значаја и количине сурфактанта употријебљеног у детериенту.] |                                                                                                                                                                                                                                 |
| 4. ДОДАТНА ИСПИТИВАЊА                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                 |
| 4.1. Испитивање биоразградљивости                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                 |
| 4.1.1. Претходно прилагођен инокулум                                                                                                                                                                                                                                        | [Може се примијенити било која од метода наведених у Прилогу 1. овог правилника у сврху обезбјеђења доказа релевантности претходног прилагођавања сурфактанта.]                                                                 |
| 4.1.2. Испитивање природне (инхерент-не) биоразградљивости                                                                                                                                                                                                                  | [Користи се најмање једна од следећих метода:<br>1) C 12 – модификовани поликонтинуирани тест са активним муљем (semi-continuous activated sludge – SCAS) – BAS EN ISO 9887,<br>2) C 9 – Zahn-Wellensov test – BAS EN ISO 9888] |
| Напомена: уколико сурфактант не прође тестове из т. 4.1.1. и 4.1.2, сматра се потенцијално перзистентним, а то може бити основ за забрану стављања таквог сурфактанта на тржиште.                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                 |
| 4.1.3. Испитивање биоразградљивости тестом симулације активног муља                                                                                                                                                                                                         | [Користи се метода C 10 – BAS EN ISO 11733]                                                                                                                                                                                     |
| Напомена: уколико сурфактант не прође тест из тачке 4.1.3, може се претпоставити да ће доћи до испуштања метаболита током третмана отпадних вода, а то указује на потребу за додат-ном детаљнијом процјеном ризика.                                                         |                                                                                                                                                                                                                                 |
| 4.2. Испитивања токсичности испитних раствора за биораз-градљивост                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                 |
| 4.2.1. Подаци о хемијским и физичким својствима                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                 |
| Идентитет метаболита и аналитички начин којим је утврђен                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                 |
| Основне физичко-хемијске особине – растворљивост у води, коефицијент расподеле октано/вода (log Po/w)                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                 |
| Остало                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                 |
| 4.2.2. Ефекти на живе организме                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                 |
| Испитивање акутне токсичности за рибе                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                 |
| Испитивање акутне токсичности за дафније                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                 |
| Испитивање алгалне инхибиције за алге                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                 |

|                                                                                                                                                                                       |  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| Испитивање респираторне инхибиције активног муља за бактерије                                                                                                                         |  |
| 4.2.3. Подаци о разградњи                                                                                                                                                             |  |
| Биотичка: биохемијска потрошња ки-сеоника                                                                                                                                             |  |
| Абиотичка: хидролиза као функција рН. На основу ових информација раз-матра се потенцијал метаболита за биоконцентрацију и њихову расподелу у талогу                                   |  |
| Напомена: уколико се сумња да неки метаболити могу про-узроковати поремећај ендокрине активности, препоручује се испитивање да ли метаболити могу довести до оваквих штетних ефеката. |  |

ПРИЛОГ 5.

ЛИСТА СУРФАКТАНАТА ЗА КОЈЕ ЈЕ У ЕВРОПској УНИЈИ ОДОБРЕНА УПОТРЕБА

| Редни бр. | IUPAC назив                                                    | ЕС број         | CAS број    | Ограничења                                                                                                                                                       |
|-----------|----------------------------------------------------------------|-----------------|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.        | Алкохоли, Guerbet, C16-20, етоксило-вани, n-бутил етер (7-8EO) | Нема (поли-мер) | 147993-59-7 | Може бити кори-шћен у следећим индустријским примјенама до 27. јуна 2019. године:<br>– прање флаша,<br>– CIP прање (енгл. cleaning-in-place)<br>– чишћење метала |

ПРИЛОГ 6.

ЛИСТА ЗАБРАЊЕНИХ ИЛИ ОГРАНИЧЕНИХ СУРФАКТАНАТА ЗА КОЈЕ У ЕВРОПској УНИЈИ НИЈЕ ОДОБРЕНА УПОТРЕБА

| Редни бр. | IUPAC назив | ЕС број | CAS број | Ограничења |
|-----------|-------------|---------|----------|------------|
| 1.        |             |         |          |            |

ПРИЛОГ 7.

ОГРАНИЧЕЊА САДРЖАЈА ФОСФАТА И ДРУГИХ ФОСФОР-НИХ ЈЕДИЊЕЊА

| Детерцент                                             | Ограничење                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Детерценти за веш за општу употребу                   | Не смије се стављати на тржиште уколико је укупни садржај фосфора једнак или већи од 0,5 g у препорученој дози детерцента који се користи у главном циклусу прања за стан-дардно пуњење машине за тврду воду:<br>– за уобичајено запрљан веш за универзалне детерценте,<br>– за благо запрљан веш за благе детерценте за осјетљиву тканину. |
| Детерценти за машинско прање посуђа за општу употребу | Не смије се стављати на тржиште уколико је укупни садржај фосфора једнак или већи од 0,3 g у стандардном дозирању.                                                                                                                                                                                                                          |

ПРИЛОГ 8.

ОБИЈЕЖАВАЊЕ ДЕТЕРЦЕНАТА И ЛИСТА ПОДАТАКА О САСТАВУ

Дно А

Обијежаванье садржаја

Садржај састојака који су у детерценту намијењеном општој употреби присутни у концентрацији изнад 0,2% масених процена-та означава се следећим распонима:

- 1) мање од 5%,
- 2) од 5% до 15%,
- 3) од 15% до 30%,
- 4) 30% и више.

Састојци на које се односи обавеза означавања су:

- 1) фосфати,

- 2) фосфонати,
- 3) ањјонски сурфактанти,
- 4) катјонски сурфактанти,
- 5) амфотерни сурфактанти,
- 6) нејонски сурфактанти,
- 7) средства за бијељење на бази кисеоника,
- 8) средства за бијељење на бази хлора,
- 9) етилен-диаминотетрасирћетна киселина (енгл. ethylenediaminetetraacetic acid - EDTA) и њене соли,
- 10) нитрилотрисирћетна киселина (енгл. nitrilotriacetic acid - NTA) и њене соли,
- 11) феноли и халогеновани феноли,
- 12) парадихлор-бензен,
- 13) ароматски угљоводоници,
- 14) алифатски угљоводоници,
- 15) халогеновани угљоводоници,
- 16) сапуни,
- 17) зеолити,
- 18) поликарбоксилати.

Класе састојака које треба да буду означене на паковању, независно од концентрације у којој су присутни, су:

- 1) ензими,
- 2) дезинфицијенси,
- 3) средства за оптичко бијељење,
- 4) мирисне супстанце,
- 5) конзерванси.

Назив конзерванса наводи се на етикети, односно амбалажи у складу са прописом којим се уређују козметички производи. Ако такав назив није доступан, наводи се назив којим произвођач располаже.

Мирисне супстанце са алергеним својствима наводе се на етикети, односно амбалажи уколико су додате у концентрацији већој од 0,01 масених процената, а под називом у складу са прописом којим се уређују козметички производи.

За детергент намијењен искључиво за индустријску и институционалну употребу, који није доступан општој популацији, захтјеви наведени у овом дијелу не морају бити испуњени уколико су еквивалентни подаци достављени кроз технички лист, безбједносно-технички лист или на сличан начин.

## Дио Б

### Обиљежавање информација о дозирању

#### Обиљежавање детергента за веш за општу употребу

На паковању детергента за веш за општу употребу наведени су следећи подаци:

1) препоручене количине и/или упутство за дозирање изражено у милилитрима или грамима који одговарају стандардном пуњењу машине за прање, за меку, средње тврду и тврду воду, са подацима за један или два циклуса прања,

2) број стандардних пуњења машине за уобичајено запрљан веш за универзалне детергенте и број стандардних пуњења машине за благо запрљан веш за благе детергенте, који могу бити опрани садржајем паковања употребом воде средње тврдоће која одговара 2,5 милимола  $\text{CaCO}_3/\text{l}$  и

3) капацитет посуде за дозирање, уколико постоји, означен је у милилитрима или грамима, а ознакама су обиљежене дозе детергента које одговарају стандардном пуњењу машине за прање за меку, средње тврду или тврду воду.

Стандардно пуњење машине за веш износи 4,5 kg сувог веша за универзалне детергенте и 2,5 kg сувог веша за благе детергенте. Детергент се сматра универзалним детергентом, осим у случајевима када произвођач у први план ставља особине одржавања тканине као што су прање на ниској температури, прање осјетљивих и обојених тканина.

Обиљежавање детергента за машинско прање посуђа за општу употребу

На паковању детергента за машинско прање посуђа за општу употребу наведени су подаци о стандардном дозирању изражени у грамима или милилитрима, или броју таблета за главни циклус прања за уобичајено запрљано посуђе у пуној машини за прање 12 комплета посуђа, уз навођење података за меку, средње тврду или тврду воду, уколико је потребно.

## Дио В

### Листа података о саставу

Листа података о саставу детерцента садржи:

- 1) назив детерцента,
- 2) назив произвођача,
- 3) листу састојака наведених по опадајућем редослиједу масеног удјела.

Листа састојака подијељена је у следеће распоне масених процената:

- а) 10% или више,
- б) од 1% до 10%,
- в) од 0,1% до 1%,
- г) мање од 0,1%.

Парфем, есенцијално уље или средство за бојење сматрају се појединачним састојком, те се не наводе супстанце које они садрже, изузев мирисних супстанци са својствима алергена, које се наводе према прописима којим се уређују козметичка средства.

За сваки састојак наводи се уобичајени хемијски назив или IUPAC назив, као и назив према Међународној номенклатури козметичких састојака (енгл. International Nomenclature Cosmetic Ingredient - INCI) назив, CAS број и назив из европске фармакопеје, ако су доступни.

## Дио Г

### Објављивање Листе података о саставу

Произвођач листу података о саставу објављује на интернет страници, изузимајући податке о распону масених процената састојака и CAS бројеве.

Називи састојака наводе се по INCI номенклатури или, гдје она није доступна, по европској фармакопеји. Уколико није доступан ни један од ових назива, умјесто њих се користи уобичајени или IUPAC назив.

Пристап интернет страници је слободан, а садржај редовно ажуриран.

Наведено се не односи на детерценте који се користе за индустријску или институционалну употребу, као ни на сурфактанте који се користе у таквим детерцентима, а за које је доступан технички лист или безбједносно-технички лист.

---