

METODE ISPITIVANJA BIORAZGRADLJIVOSTI POVRŠINSKI AKTIVNIH SUPSTANCI U DETERGENTIMA

Dio 1. - Metode ispitivanja potpune aerobne biorazgradljivosti (mineralizacije) za površinski aktivne supstance u detergentima

A. Referentna metoda za laboratorijsko određivanje potpune aerobne biorazgradljivosti površinski aktivne supstance prema standardu MEST ISO 14593 (ispitivanje parne faze CO₂).

Nivo potpune aerobne biorazgradivosti određuje se prema jednoj od sljedećih metoda:

- 1) standard MEST EN ISO 14593 - Kvalitet vode - Procjena potpune aerobne biorazgradljivosti organskih jedinjenja u vodenoj sredini - Metoda određivanja neorganskog ugljenika u hermetičkim posudama (ispitivanje parne faze CO₂), bez pred-adaptacije i utvrđivanja biorazgradljivosti za period od 10 dana nakon dostizanja 10% razgradnje (u daljem tekstu, desetodnevni period).
- 2) metoda S.4-S. - MEST EN ISO 9439 - Kvalitet vode - Procjena potpune aerobne biorazgradljivosti organskih jedinjenja u vodenoj sredini - Ispitivanje razvijanjem ugljenik (IV) oksida. [Ugljenik (IV) oksid (CO₂), Modifikovani Sturm test: bez pred-adaptacije i primjene desetodnevnog perioda.
- 3) metoda S.4-E. - MEST EN ISO 10707- Kvalitet vode - Procjena potpune aerobne biorazgradljivosti organskih jedinjenja u vodenoj sredini - Metoda određivanja biohemijske potrošnje kiseonika (metoda zatvorene boce), bez pred- adaptacije i primjene desetodnevnog perioda.
- 4) metoda S.4-D. - MEST EN ISO 9408 - Kvalitet vode - Procjena potpune aerobne biorazgradljivosti organskih jedinjenja u vodenoj sredini određivanjem potrošnje kiseonika u zatvorenom respirometru, bez pred-adaptacije i primjene desetodnevnog perioda.
- 5) metoda S.4-F. (MITI: Ministarstvo međunarodne trgovine i industrije - Japan): bez pred-adaptacije i primjene desetodnevnog perioda.
- 6) metoda MEST ISO 10708:1997 – Kvalitet vode – Procjena konačne aerobne biorazgradivosti organskih jedinjenja u vodenom medijumu – određivanje potrebe za biohemijskim kiseonikom u dvofaznom testu u zatvorenoj boci. Prethodna adaptacija se ne koristi. „10-day window principle” se ne primjenjuje.

B. U zavisnosti od fizičkih svojstava površinski aktivne supstance za određivanje potpune aerobne biorazgradljivosti primjenjuju se metode rastvorenog organskog ugljenika koji mogu dati promjenljive rezultate koji se ne odnose samo na biorazgradljivost. Kriterijum od najmanje 70% razgradljivosti kod primjene ovih metoda treba smatrati ekvivalentnim kriterijumu od najmanje 60% razgradljivosti za referentne metode iz tačke A. Metoda C.4-D i Metoda C.4-F ne mogu se primjenjivati za svaki uzorak, jer velika početna koncentracija može biti inhibirajuća.

- 1) Metoda S.4-A.- MEST EN ISO 7827 - Kvalitet vode - Procjena "potpune" aerobne biorazgradljivosti organskih jedinjenja u vodenoj sredini - Metoda određivanja rastvorenog organskog ugljenika (DOC), bez pred-adaptacije i primjene desetodnevnog perioda.

Nivo biorazgradljivosti određen ovom metodom je najmanje 70% za 28 dana.

- 2) Metoda S.4-V.- (Modifikovana OECD metoda - Rastvorni organski ugljenik - (do nestajanja)): bez pred-adaptacije i primjene desetodnevnog perioda.

Nivo biorazgradljivosti određene ovom metodom je najmanje 70% za 28 dana.

Dio 1B. Metode ispitivanja primarne biorazgradljivosti za površinski aktivne supstance u detergentima

Referentna metoda za laboratorijsko određivanje primarne biorazgradljivosti površinski aktivne supstance iz Dijela 1C tačka 1 ovog priloga, vrši se prema standardu MEST EN ISO 11733 Kvalitet vode - Određivanje obima eliminacije i biorazgradljivosti organskih jedinjenja u vodenoj sredini. Ispitivanje simulacijom aktivnog mulja.

Primarna biorazgradljivost mjeri se određivanjem sadržaja preostale površinski aktivne supstance u biorazgrađenom likvoru¹.

Prema vrstama površinski aktivne supstance primjenjuju se sljedeće analitičke metode i to:

- a) Analitičke metode za anjonske površinski aktivne supstance

Anjonski površinski aktivne supstance određuju se analizom metilensko plavo aktivna supstanca (Methylene Blue Active Substance - MBAS).

Za anjonske površinski aktivne supstance koji ne reaguju sa MBAS, ili kada je podesnije, u cilju poboljšanja efikasnosti ispitivanja ili dobijanja preciznijih podataka, primjenjuju se odgovarajuće specifične metode instrumentalne analize, kao što su visoko efikasna tečna hromatografija (high performance liquid chromatography - HPLC) ili gasna hromatografija (gas chromatography - GC).

Podaci o biotičkoj razgradnji dobijaju se korišćenjem Metode S. 5., a podaci o abiotičkoj razgradnji dobijaju se korišćenjem Metode S.7. pri čemu se uzima u obzir potencijal metabolita za biokoncentraciju kao i njihova raspodjela u sedimentu. Navedene metode date su u propisu kojim se uređuju metode ispitivanja svojstava hemikalija.

- b) Analitičke metode za nejonske površinski aktivne supstance

Nejonski površinski aktivne supstance određuju se analizom bizmut aktivna supstanca (Bismuth Active Substance - BiAS).

Za nejonske površinski aktivne supstance koji ne reaguju sa reagensom BiAS, ili kada je podesnije, u cilju poboljšanja efikasnosti ispitivanja ili dobijanja preciznijih podataka, primjenjuju se odgovarajuće specifične metode instrumentalne analize, kao što su visoko efikasna tečna hromatografija (high performance liquid chromatography - HPLC) ili gasna hromatografija (gas chromatography - GC).

- c) Analitičke metode za katjonske površinski aktivne supstance

Katjonski površinski aktivne supstance određuju se analizom disulfinsko plavo aktivna supstanca (Disulfine Blue Active Substance - DBAS), kao i odgovarajuće specifične metode instrumentalne analize, kao što su visoko efikasna tečna hromatografija (high performance liquid chromatography - HPLC) ili gasna hromatografija (gas chromatography - GC).

¹ Rezultati ispitivanja toksičnosti likvora koji nastaje pri biorazgradnji sadrži podatke o hemijskim i fizičkim svojstvima, o efektima na organizme i podatke o različitim vrstama razgradnje. Podaci o hemijskim i fizičkim svojstvima sadrže: identitet metabolita i analitičku metodu kojom je utvrđen; glavna fizičko-hemij ska svojstva (rastvorljivost u vodi, koeficijent raspodjele oktanol: voda (Log Po/w) itd.). Podaci o efektima na organizme dobijaju se korišćenjem sljedećih metoda: Metoda S.1. - za efekte na ribe; Metoda S.2. - za efekte na dafnije; Metoda S.3. - za efekte na alge; Metoda S.11. - za efekte na bakterije. Podaci o biotičkoj razgradnji dobijaju se korišćenjem Metode S. 5., a podaci o abiotičkoj razgradnji dobijaju se korišćenjem Metode S.7. pri čemu se uzima u obzir potencijal metabolita za biokoncentraciju kao i njihova raspodjela u sedimentu. Navedene metode date su u propisu kojim se uređuju metode ispitivanja svojstava hemikalija.

d) Analitičke metode za amfoterne površinski aktivne supstance

Amfoterni površinski aktivne supstance određuju se analizom DBAS kada u likvoru nema katjona. Ukoliko su u likvoru prisutni katjoni koristi se metoda Oranž II.

Za amfoterne površinski aktivne supstance koji ne daju reakciju metodama, ili kada je podesnije, u cilju poboljšanja efikasnosti ispitivanja ili dobijanja preciznijih podataka, primjenjuju se specifične metode instrumentalne analize, kao što su visoko efikasna tečna hromatografija (high performance liquid chromatography - HPLC) ili gasna hromatografija (gas chromatography - GC).

Dio 1C. Metode ispitivanja i analitičke metode

1. Referentna metoda za laboratorijsko određivanje primarne biorazgradljivosti površinski aktivne supstance

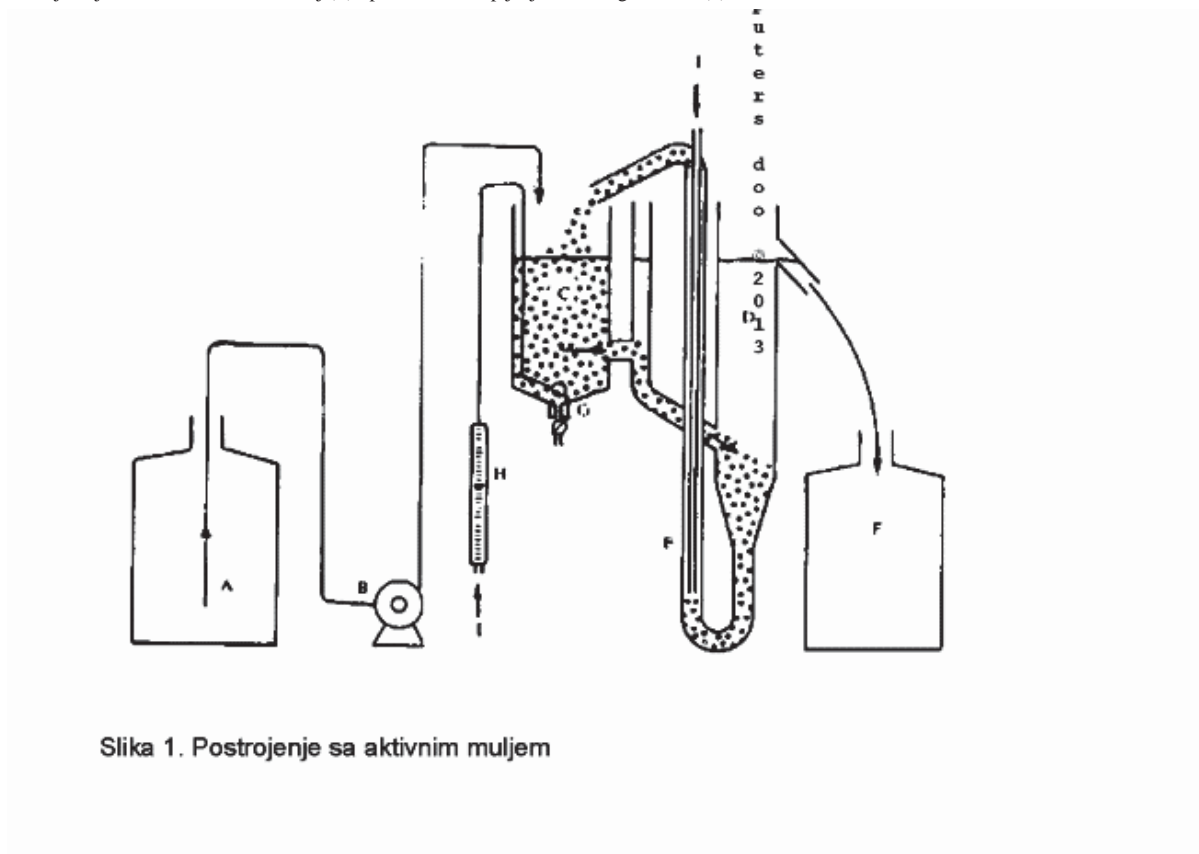
1.1. Metoda

Ova metoda obuhvata laboratorijsko ispitivanje aktivnog mulja i sekundarnog taložnika koji je napravljen tako da simulira tretman komunalnih otpadnih voda. Prilikom primjene ove metode koriste se poboljšani operativni uslovi ove metode opisani u MEST EN ISO 11733.

1.2. Oprema potrebna za ispitivanje

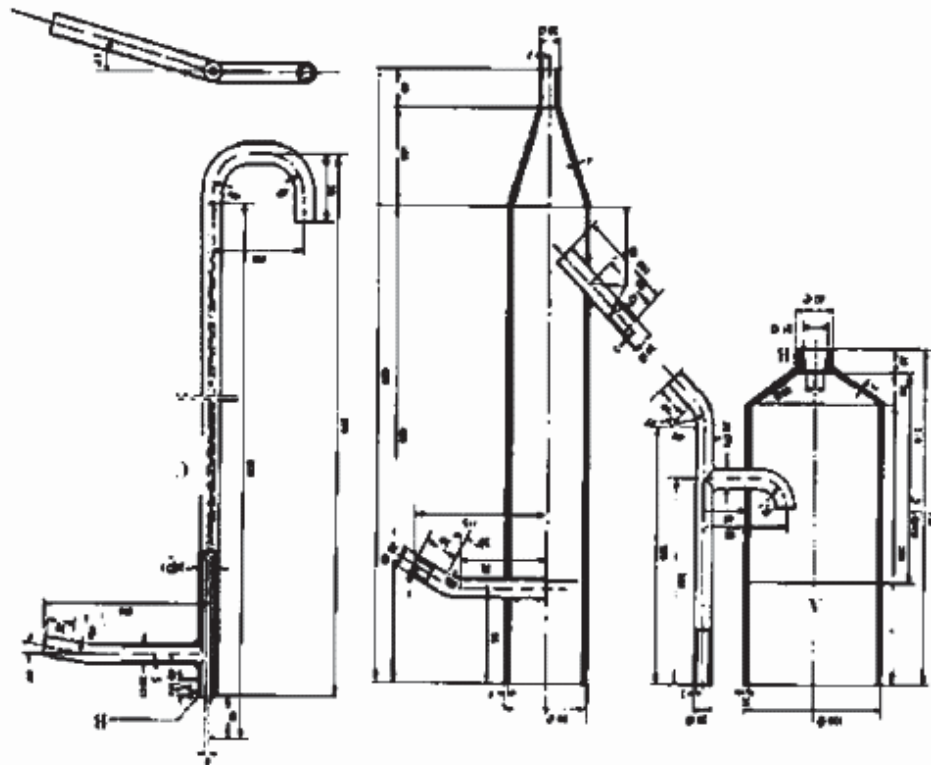
Za sprovođenje ove metode koristi se postrojenje sa aktivnim muljem čija je shema data na Slici 1. a prikaz ovog postrojenja dat na Slici 2.

Postrojenje se sastoji od: posude za sintetičku otpadnu vodu (A), uređaja za doziranje (B), posude za aeraciju (C), taložnika (D), pumpe za aeraciju kojom se reciklira aktivni mulj (E) i posude za sakupljanje tretiranog efluenta (F).



Slika 1. Postrojenje sa aktivnim muljem

Slika 1. Postrojenje sa aktivnim muljem



Slika 2. Precizan prikaz postrojenja sa aktivnim muljem N
e

Slika 2. Precizan prikaz postrojenja sa aktivnim muljem

Posude (A) i (F) su od stakla ili odgovarajućeg plastičnog materijala i zapremine najmanje 24 litra. Uređaj za doziranje (B) omogućava konstantan protok sintetičke otpadne vode u posudi za aeraciju (E) koja tokom normalnog rada sadrži 3 litra tečnosti. Sinterovani uvodnik za vazduh (G) nalazi se na najnižoj tački posude (C). Količina vazduha koja se ubacuje kroz pumpu za aeraciju (E) prati se preko mjerača protoka (H).

1.3. Sintetička otpadna voda

Sintetička otpadna voda priprema se tako što se na litar vode sa slavine dodaje:

- 160 mg peptona,
- 110 mg ekstrakta mesa,
- 30 mg uree $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$,
- 7 mg natrijum-hlorida NaCl ,
- 4 mg kalcijum-hlorida $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,
- 2 mg magnezijum-sulfata $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,
- 28 mg kalijumhidrogen fosfata, K_2HPO_4 ,
- 10 ± 1 mg površinski aktivne supstance.

Sintetička otpadna voda se priprema posebno za svaki eksperiment.

1.4. Priprema uzorka

Uzorak površinski aktivne supstance koji se ispituje je u obliku u kakvom će se koristiti u detergentu i nije pomiješan sa drugim sastojcima detergenta.

1.5. Postupak

Sintetičkom otpadnom vodom puni se posuda za aeraciju (C) i taložnik (D). Taložnik (D) se postavlja tako da zapremina sadržaja u posudi (C) iznosi 3 litra i inokulira se sa 3 ml sekundarnog efluenta dobrog kvaliteta, svježe sakupljenog iz postrojenja za tretman pretežno komunalne otpadne vode.

Efluent se čuva pod aerobnim uslovima, između uzorkovanja i primjene. Nakon toga aktivira se sinterovani uvodnik za vazduh (G), pumpa za aeraciju (E) i uređaj za doziranje (B). Sintetička otpadna voda propušta se kroz posudu za aeraciju (C) sa protokom od 1 litra po satu tako da je prosječno retenciono vrijeme 3 sata.

Aeracija se reguliše tako da se sadržaj posude za aeraciju (C), konstantno održava u suspenziji i da sadržaj rastvorenog kiseonika bude najmanje 2 mg/l.

- 2.2.2. Neutralni rastvor metilenskog plavog; 0,350 g metilenskog plavog AR rastvori se u dejonizovanoj vodi i dopuni dejonizovanom vodom do 1000 ml. Rastvor se pravi najmanje 24 sata prije upotrebe. Apsorbanca slijepe hloroformske probe ne prelazi 0,015 po 1 cm debljine sloja na 650 nm.
- 2.2.3. Kiseli rastvor metilenskog plavog; 0,350 g metilenskog plavog rastvori se u 500 ml dejonizovane vode i pomiješa sa 6,5 ml H₂SO₄ (d=1,84 g/ml) i dopuni dejonizovanom vodom do 1000 ml. Rastvor se pravi najmanje 24 sata prije upotrebe. Apsorbanca slijepe hloroformske probe ne prelazi 0,015 po 1 cm debljine sloja na 650 nm.
- 2.2.4. Hloroform (trihlorometan) AR, destilovan neposredno prije korišćenja;
- 2.2.5. Metil estar dodecil benzen sulfonske kiseline;
- 2.2.6. Etanolni rastvor kalijum-hidroksida KOH 0,1 mol/dm³
- 2.2.7. Etanol, čist, C₂H₅OH;
- 2.2.8. Sulfatna kiselina, H₂SO₄ 0,5 mol/dm³;
- 2.2.9. Rastvor fenolftaleina: 1 g fenolftaleina rastvori se u 50 ml etanola i doda 50 ml dejonizovane vode uz stalno miješanje. Nastali talog odstranjuje se filtriranjem.
- 2.2.10. Metanolni rastvor hloridne kiseline: 250 ml hlorovodonične kiseline i 750 ml metanola;
- 2.2.11. Lijevak za odvajanje zapremine 250 ml;
- 2.2.12. Normalni sudovi zapremine 50 ml, 500 ml i 1000 ml;
- 2.2.13. Balon za destilaciju sa okruglim dnom zapremine 250 ml, stakleni čep i povratni kondenzator, granule za ključanje;
- 2.2.14. pH metar;
- 2.2.15. Spektrofotometar za mjerenje na 650 nm, sa kivetama od 1 cm do 5 cm;
- 2.2.16. Kvalitativni filter papir.

2.3. Postupak

Uzorci za analizu ne uzimaju se iz sloja pjene.

Poslije ispiranja vodom, oprema koja se koristi za analize ispira se metanolnim rastvorom hloridne kiseline (2.2.10.) i dejonizovanom vodom neposredno prije korišćenja.

Uzorci influenta i efluenta iz postrojenja aktivnog mulja filtriraju se nakon uzorkovanja, a prvih 100 ml filtrata se odbacuje.

U lijevak za odvajanje zapremine 250 ml prenosi se izmjerena zapremina uzorka i po potrebi neutrališe.

Zapremina uzorka sadrži između 20 l/jg i 150 l/jg metilensko plavo aktivne supstance. Pri nižem sadržaju MBAS koristiti se do 100 ml uzorka. Kada je odmjerena zapremina manja od 100 ml, uzorak se razblažuje dejonizovanom vodom do 100 ml. U uzorak se dodaje 10 ml rastvora pufera (2.2.1.), 5 ml neutralnog rastvora metilenskog plavog (2.2.2) i 15 ml hloroforma (2.2.4.). Smješa se ravnomjerno i ne previše snažno mučka jedan minut. Poslije razdvajanja slojeva, hloroformski sloj se prenosi u drugi lijevak za odvajanje u koji se dodaje 110 ml dejonizovane vode i 5 ml kiselog rastvora metilenskog plavog (2.2.3.). Smješa se mučka jedan minut. Hloroformski sloj se filtrira u normalni sud kroz filter od pamučne vate, koji je prethodno očišćen i nakvašen hloroformom.

Alkalni i kiseli rastvori ekstrahuju se 3 puta, koristeći 10 ml hloroforma za drugu i treću ekstrakciju. Spojeni hloroformski ekstrakti filtriraju se u normalni sud zapremine 50 ml kroz isti filter od pamučne vate i razblažuju do crte hloroformom korišćenim za ispiranje filtera. Mjeri se apsorbanca hloroformskog rastvora na 650 nm u kiveti od 1 cm do 5 cm u odnosu na hloroform. Slijepa proba se određuje istim postupkom.

2.4. Kalibraciona kriva

Rastvor za kalibraciju priprema se od supstance metil estra dodecilbensulfonske kiseline (tetrapropilen tip mol. mase 340) nakon saponifikacije u kalijumovu so.

MBAS se izračunava kao natrijum dodecilbensulfonat (mol. mase 348).

Mikropipetom se, u balon sa okruglim dnom, sa tačnošću 400 - 450 mg metil estra dodecilsulfonske kiseline odmjeri 0,1 ml, doda se 50 ml etanolnog rastvora kalijum-hidroksida i nekoliko granula za ključanje. Postavi se povratni kondenzator i smješa se ostavi da ključa jedan sat. Nakon hlađenja, kondenzator i šlif se isperu sa oko 30 ml etanola koji se sjedini sa sadržajem balona. Rastvor se titruje sulfatnom kiselinom, uz fenolftalein kao indikator, do obezbojenja, titrovani rastvor prebaci se u sud zapremine 1000 ml i razblaži dejonizovanom vodom do crte i promiješa.

Dio rastvora površinski aktivne supstance dalje se razblažuje. Odmjeri se 25 ml ovog rastvora, prebaci u sud zapremine 500 ml i razblaži vodom do crte i promiješa.

Rastvor sadrži:

$$\frac{E \times 1,023 \text{ mg MBAS} - a \text{ na ml}}{20000} \text{ gdje je E masa uzorka u mg.}$$

Za pripremu kalibracione krive odmjerava se 1 ml, 2 ml, 4 ml, 6 ml, i 8 ml rastvora i razblaži do 100 ml dejonizovanom vodom i sprovodi postupak dat u tački 2.3 uključujući i slijepu probu.

2.5. Izračunavanje rezultata

Količina anjonske površinski aktivne supstance (MBAS) u uzorku izračunava se sa kalibracione krive. Sadržaj MBAS u uzorku izračunava se prema sljedećoj formuli:

$$\frac{\text{mgMBAS} \times 1000}{V} A = \text{MBASmg/l}$$

gdje je V = zapremina korišćenog uzorka izražena u ml.

Rezultati se izražavaju kao natrijum dodecilbenzen sulfonat (molekulska masa 348).

2.6. Prikazivanje rezultata

Rezultati se izražavaju kao MBAS mg/l sa tačnošću 0,1.

3. Određivanje nejonskih površinski aktivnih supstanci u testovima biorazgradljivosti

3.1. Metoda

Površinski aktivne supstance se koncentruju i izoluju ekstrakcijom uz pomoć gasa.

U korišćenom uzorku količina nejonske površinski aktivne supstance je u opsegu od 250 - 800 jg. Tako odvojena površinski aktivna supstanca rastvara se u etil acetatu.

Nakon faze odvajanja i isparavanja rastvora nejonski površinski aktivna supstanca taloži se u vodenom rastvoru modifikovanim Dragendorfovom reagensom ($\text{KBiI}_4 + \text{BaCl}_2 + \text{glacijalna sirćetna kiselina}$).

Talag se odvaja filtriranjem, ispira glacijalnom sirćetnom kiselinom i na kraju rastvara u rastvoru amonijum-tartarata. Bizmut, u rastvoru, se titruje potenciometrijskom titracijom, rastvorom pirolidin ditiokarbamata, pH 4 - 5, koristeći platinsku indikatorsku elektrodu i kalomelovu referentnu elektrodu ili srebro/srebro-hlorid referentnu elektrodu. Metoda se primjenjuje na nejonske površinske aktivne supstance koje sadrže od 6 do 30 grupa alkilen oksida.

Rezultat titracije množi se empirijskim faktorom 54 radi konverzije u referentnu supstancu nonilfenol kondenzovan sa 10 mola etilen oksida (NP 10).

3.2 Reagensi i oprema

Reagensi koji se koriste za određivanje nejonskih površinski aktivnih supstanci u testovima biorazgradljivosti pripremaju se sa dejonizovanom vodom i to:

3.2.1. Etil-acetat, čist, destilovan neposredno prije upotrebe;

3.2.2. Natrijumhidrogen karbonat, NaHCO_3 AR;

3.2.3. Hloridna kiselina, razblažena (20 ml koncentrovane kiseline (HCl) razblažiti vodom do 1000 ml);

3.2.4. Metanol AR, destilovan neposredno prije upotrebe, u staklenoj boci;

3.2.5. Bromkrezol ljubičasto, 0,1 g u 100 ml metanola;

3.2.6. Sredstvo za taloženje:

Sredstvo za taloženje je smješa dva zapreminska dijela rastvora A i jednog zapreminskog dijela rastvora B. Smješa se čuva u tamnoj flaši i koristi se najviše mjesec dana nakon što se pripremi.

3.2.6.1. Rastvor A

1,7 g bizmut-nitrata, $\text{BiONO}_3 \cdot x \text{H}_2\text{O}$ AR, rastvara se u 20 ml glacijalne sirćetne kiseline i dopuni vodom do 100 ml. Zatim se 65 g kalijum-jodida AR rastvori u 200 ml vode. Ovi rastvori miješaju se u sudu zapremine 1000 ml, doda se 200 ml glacijalne sirćetne kiseline (3.2.7) i sud dopuni vodom do 1000 ml.

3.2.6.2 Rastvor B

290 g barijum-hlorida, $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ AR, rastvori se u 1000 ml vode.

3.2.7. Glacijalna sirćetna kiselina 99-100% (niže koncentracije nisu pogodne);

3.2.8. Rastvor amonijum-tartarata:

Pomiješa se 12,4 g vinske kiseline AR i 12,4 ml rastvora amonijaka AR ($d=0,910 \text{ g/ml}$) i dopuni vodom do 1000 ml (ili se upotrijebi ekvivalentna količina amonijum-tartarata AR);

3.2.9. Razblažen rastvor amonijaka:

40 ml rastvora amonijaka AR ($d=0,910 \text{ g/ml}$) razblaži se vodom do 1000 ml;

3.2.10. Standardni acetatni pufer:

40 g čvrstog natrijum-hidroksida AR rastvori se u 500 ml vode u čaši i ostavi da se ohladi. U to se doda 120 ml glacijalne sirćetne kiseline (3.2.7.), dobro promiješa, ohladi i prebaci u sud zapremine 1000 ml i dopuni vodom do crte;

3.2.11. Rastvor pirolidin ditiokarbamata (poznat kao "karbat rastvor"):

103 mg natrijum pirolidin ditiokarbamata, $\text{C}_3\text{H}_8\text{NNaS}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, rastvori se u oko 500 ml vode, doda se 10 ml n-amil alkohola AR i 0,5 g NaHCO_3 i dopuni vodom do 1000 ml;

3.2.12. Rastvor bakar-sulfata (za standardizaciju reagensa iz tačke 3.2.11.):

3.2.12.1 Osnovni rastvor

Odmjeri se 1,249 g bakar-sulfata, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ AR, pomiješa sa 50 ml 0,5 M sumporne kiseline i dopuni vodom do 1000 ml.

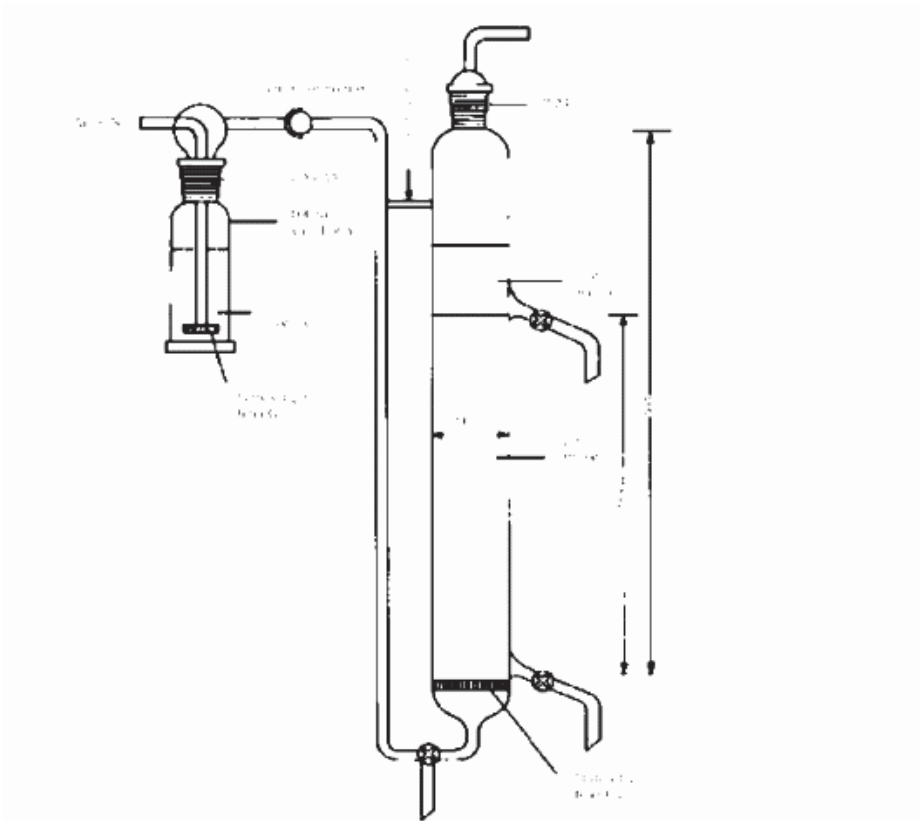
3.2.12.2 Standardni rastvor

Odmjeri se 50 ml osnovnog rastvora, pomiješa sa 10 ml 0,5 M H_2SO_4 i dopuni vodom do 1000 ml.

3.2.13. Natrijum-hlorid AR;

Oprema koja se koristi za određivanje nejonskih površinski aktivnih supstanci u testovima biorazgradljivosti je:

3.2.14. Oprema za ekstrakciju uz pomoć gasa data je na Slici 5;



Slika 5. Oprema za ekstrakciju uz pomoć gasa (mjere su u milimetrima)

Slika 5. Oprema za ekstrakciju uz pomoć gasa (mjere su u milimetrima)

Prečnik sinterovane ploče je jednak unutrašnjem prečniku cilindra.

3.2.15. Lijevak za odvajanje, 250 ml;

3.2.16. Magnetna mješalica sa magnetom 25-30 mm;

3.2.17. Guč za žarenje, prečnik perforiranog dna = 25 mm, tip G4;

3.2.18. Okrugli filter-papiri od staklenih vlakana, prečnika 27 mm s prečnikom vlakna 0,3-1,5 ljm;

3.2.19. Dvije flaše za filtriranje zapremine 250 ml i 500 ml sa adapterima i gumenim kragnama;

3.2.20. Potencijometar koji bilježi rezultate mjerenja, sa ugrađenom platinskom indikatorskom elektrodom i kalomelovom ili srebro/srebro-hlorid referentnom elektrodom, mjernog opsega 250 mV, sa automatskom biretom zapremine 20 - 25 ml ili odgovarajućom ručnom opremom.

3.3. Postupak

3.3.1. Koncentrovanje i izolovanje površinski aktivne supstance

Vodeni uzorak se filtrira kroz kvalitativni filter-papir, ukloni se prvih 100 ml filtrata. U opremu za ekstrakciju uz pomoć gasa, prethodno ispranu etil-acetatom, stavi se izmjerena količina uzorka koja sadrži 250-800 jg nejonski površinski aktivne supstance, zatim se doda 100 g natrijum-hlorida i 5 g natrijum-bikarbonata da bi se poboljšalo izolovanje površinski aktivne supstance.

Ako zapremina uzorka prelazi 500 ml, ove soli se dodaju u čvrstom stanju i rastvaraju propuštanjem azota ili vazduha. Ako je uzorak manji, soli se rastvore u 400 ml vode i prebace u opremu za ekstrakciju uz pomoć gasa. Voda se dodaje dok se nivo ne podigne do gornje slavine.

Površina vode se pažljivo prelije sa 100 ml etil acetata. Boca za ispiranje u gasnoj cijevi (za azot ili vazduh) napuni se etil acetatom do dvije trećine.

Kroz opremu se propušta gas i to brzinom protoka od 30-60 l/h; preporučuje se upotreba mjerača protoka. U početku se brzina uvođenja vazduha postupno povećava. Brzina protoka se podešava tako da su faze i dalje vidljivo odvojene kako bi miješanje faza bilo što manje, a time i rastvaranje etil-acetata u vodi. Protok gasa se zaustavlja nakon pet minuta.

Ako se zapremina organske faze rastvaranjem u vodi smanji za više od 20%, postupak se ponavlja, stin što se posebna pažnja posvećuje brzini protoka gasa.

Organska faza se zatim ispusti u lijevak za odvajanje. Voda koja se tom prilikom ulije u lijevak za odvajanje (samo nekoliko ml) odvoji se i vrati u opremu za ekstrakciju. Faza etil-acetata filtrira se kroz suvi kvalitativni filter papir u bocu od 250 ml. U opremu za ekstrakciju uz pomoć gasa stavi se još 100 ml etil-acetata i ponovo se propušta azot ili vazduh dodatnih pet minuta. Ispusti se organska faza u prethodno korišćen lijevak za odvajanje, ukloni se vodena faza i propusti se organska faza kroz isti filter kao i prva količina etil-acetata. Lijevak za odvajanje i filter se ispiraju sa 20 ml etil-acetata.

Ekstrakt etil-acetata uparava se do suva na vodenom kupatilu. Preko površine ekstrakta usmjeri se blago strujanje vazduha radi bržeg isparavanja.

3.3.2. Taloženje i filtriranje

Suvi ostatak preostao nakon uparavanja rastvori se u 5 ml metanola, doda 40 ml vode i 0,5 ml razblažene HCl (3.2.3). Smješa se miješa na magnetnoj mješalici. Menzurom se odmjeri 30 ml sredstva za taloženje (3.2.6) i doda tom rastvoru. Talog pada miješanjem. Nakon deset minuta

miješanja, smješa se ostavi da odstoji najmanje pet minuta. Smješa se filtrira kroz guč filter čije je dno prekriveno filter-papirom od staklenih vlakana. Filter se isperu sa približno 2 ml glacijalne sirćetne kiseline pod vakuumom. Zatim se erlenmajer, magnet i guč za žarenje isperu sa oko 40-50 ml glacijalne sirćetne kiseline. Ostatak taloga na zidovima erlenmajera nije potrebno potpuno prenijeti na filter-papir, jer se rastvor taloga za titraciju vraća u erlenmajer gdje se preostali talog rastvara.

3.3.3. Rastvaranje taloga

Talog sa filtera rastvara se dodavanjem 10 ml vrućeg rastvora amonijum-tartarata (oko 80° C) (3.2.8), ostavi se da stoji nekoliko minuta, zatim se rastvor usisa u vakuum-bocu za filtraciju. Ovaj postupak se ponavlja tri puta.

Sadržaj vakuum-boce prebacuje se u erlenmajer upotrijebljen za taloženje. Zidovi erlenmajera se ispiraju sa još 20 ml rastvora amonijum-tartarata kako bi se rastvorio ostatak taloga.

Guč filter, adapter i vakuum-boca isperu se sa 150-200 ml vode i voda od ispiranja se prenese u erlenmajer upotrijebljen za taloženje.

3.3.4. Titracija

Rastvor se miješa na magnetnoj mješalici (3.2.16.), doda se nekoliko kapi brom krezol ljubičastog (3.2.5) i razblaženi rastvor amonijaka (3.2.9.) sve dok rastvor ne postane ljubičast (rastvor je u početku blago kiseo od ostatka sirćetne kiseline za ispiranje). Zatim se dodaje 10 ml standardnog acetatnog pufera (3.2.10.). U rastvor se urone elektrode i titruje se potenciometrijskim standardnim rastvorom pirolidin ditiokarbamata (3.2.11), pri čemu se vrh birete uroni u rastvor.

Brzina titracije nije veća od 2 ml/min.

Završna tačka titracije je presjek tangenti dvije grane potenciometrijske krive. Povremeno se primjenjuje smanjenje zakrivljenosti potenciometrijske krive što se otklanja pažljivim čišćenjem (papirom za brušenje) platinske elektrode.

3.3.5. Slijepa proba

Od faze taloženja i filtriranja (3.3.2) istovremeno prema istom postupku se radi slijepa proba sa 5 ml metanola i 40 ml vode. Zapremina standardnog rastvora pirolidin ditiokarbamata (3.2.11) utrošena za titraciju slijepa probe je manja od 1 ml. Ukoliko je ova zapremina veća reagensi (3.2.3, 3.2.7, 3.2.8, 3.2.9, 3.2.10.) nisu adekvatne čistoće, posebno im je povećan sadržaj teških metala. Ovi reagensi se zamjenjuju. Slijepa proba se uzima u obzir pri izračunavanju rezultata.

3.3.6. Provjera faktora standardnog rastvora pirolidin ditiokarbamata

Faktor "f" za rastvor pirolidin ditiokarbamata određuje se na dan upotrebe. Da bi se odredio faktor "f" u 10 ml rastvora bakar-sulfata (3.2.12) doda se 100 ml vode i 10 ml standardnog acetatnog pufera (3.2.10) titruje se standardnim rastvorom pirolidin ditiokarbamata.

Ako je upotrijebljena količina standardnog rastvora pirolidin ditiokarbamata "a" ml, faktor "f" iznosi: $f = 10/a$, i svi rezultati titracije množe se tim faktorom.

3.4. Izračunavanje rezultata

Svaka nejonska površinski aktivna supstanca ima svoj faktor u zavisnosti od sastava, posebno od dužine lanca alkenoksida. Koncentracija nejonske površinski aktivne supstance izražava se u odnosu na standardnu supstancu nonilfenol sa deset jedinica etilen oksida (NP 10), sa faktorom konverzije 0,054.

Primjenom ovog faktora računa se količina površinski aktivne supstance sadržane u uzorku, izražene u mg ekvivalenta NP 10:

$(b-c) \times f \times 0,054 = \text{mg nejonske površinski aktivne supstance kao NP 10}$ gdje je: b - zapremina standardnog rastvora pirolidin ditiokarbamata upotrijebljena za titraciju uzorka (ml), c - zapremina standardnog rastvora pirolidin ditiokarbamata upotrijebljena za titraciju slijepa probe (ml) i f - faktor standardnog rastvora pirolidin ditiokarbamata.

3.5. Izražavanje rezultata

Rezultati se izražavaju u mg/l kao NP 10 zaokruživanjem na 0,1.

4. Priprema anjonskih površinski aktivnih supstanci koje treba ispitati

4.1 Priprema uzorka

4.1.1. Obrada uzoraka

Anjonski površinski aktivne supstance i detergents prije određivanja primarne biorazgradljivosti obrađuju se na sljedeći način:

Proizvodi	Obrada
Anjonske površinski aktivne supstance	Ne obrađuju se
Detergents koji sadrže površinski aktivne supstance	Alkoholna ekstrakcija, zatim izolovanje anjonskih površinski aktivne supstance jonskom izmjenom

Svrha alkoholne ekstrakcije je uklanjanje nerastvornih i neorganskih sastojaka detergents kakav se stavlja na tržište, a koji utiču na određivanje biorazgradljivosti.

4.1.2. Postupak jonske izmjene

Rad pravilnog određivanja biorazgradljivosti izolovati i odvojiti anjonske površinske aktivne supstance od sapuna, nejonskih i katjonskih površinski aktivnih supstanci što se postiže tehnikom jonske izmjene uz upotrebu makroporozne jonoizmjenjivačke smole i odgovarajućih eluenata za frakciono eluiranje, čime se sapuni, anjonski i nejonski površinski aktivne supstance izoluju odjednom.

4.1.3. Analitička kontrola

Koncentracija anjonskih površinski aktivnih supstanci u sintetičkim detergentima određuje se nakon homogenizovanja, analitičkom metodom za MBAS. Sadržaj sapuna određuje se odgovarajućom analitičkom metodom. Ova analiza služi za izračunavanje potrebnih količina za pripremu frakcija za ispitivanje biorazgradljivosti.

Za određivanje biorazgradljivosti dovoljno je ekstrahovati više od 80% anjonski površinski aktivne supstance.

4.2. Princip metode

Iz homogenog uzorka (praška, ostatka nakon sušenja detergenata koji su u obliku paste ili tečnosti) dobija se etanolni ekstrakt koji sadrži površinski aktivne supstance, sapun i druge sastojke uzorka sintetičkog detergents rastvorne u alkoholu. Etanolni ekstrakt se uparava do suvog ostatka koji se rastvori u smješi izopropanol/voda, a dobijeni rastvor, zagrijan na 50°C, propusti se kroz kombinaciju kiselog katjonskog jonoizmjenjivača i makroporoznog anjonskog jonoizmjenjivača, da bi se spriječilo taloženje masnih kiselina koje se mogu pojaviti u kiseloj sredini. Sve nejonske

površinski aktivne supstance ostaju u efluentu. Masne kiseline sapuna odvajaju se ekstrakcijom etanolom koji sadrži CO₂. Anjonske površinski aktivne supstance se dobijaju u obliku amonijumove soli, eluiranjem pomoću rastvora amonijum-bikarbonata u smješi izopropanola i vode. Dobijene amonijumove soli se koriste za ispitivanje biorazgradljivosti. Katjonski površinski aktivne supstance koji utiču na ispitivanje biorazgradljivosti, uklanjaju se pomoću katjonskog jonoizmjenjivača postavljenog iznad anjonskog jonoizmjenjivača.

4.3. Reagensi i oprema

Reagensi i oprema koji se koriste za pripremnu obradu anjonske površinski aktivne supstance u testovima biorazgradljivosti su:

4.3.1. Dejonizovana voda;

4.3.2. Etanol, 95% (v/v) C₂H₅OH (sredstva koja se mogu koristiti za denaturaciju su metiletilketon ili metanol);

4.3.3. Smješa izopropanol/voda (50/50 v/v):

- 50 zapreminskih djelova izopropanola, CH₃CHOHCH₃, i

- 50 zapreminskih djelova vode (4.3.1);

4.3.4. Rastvor ugljenik (IV)oksida u etanolu (oko 0,1% CO₂):

Ugljenik(IV)oksid (CO₂) se deset minuta propušta kroz etanol (4.3.2), pomoću dovodne cijevi sa ugrađenim sinterovanim staklom, i koristi se samo svježe pripremljen;

4.3.5. Rastvor amonijumhidrogenkarbonata (60/40 v/v):

0,3 mol NH₄HCO₃ rastvori se u 1000 ml smješe izopropanol/voda koja se sastoji od 60 zapreminskih djelova izopropanola i 40 zapreminskih djelova vode (4.3.1);

4.3.6. Katjonski jonoizmjenjivač (KAT):

veoma kiseo, otporan na alkohol (50-100 mesh);

4.3.7. Anjonski jonoizmjenjivač (AAT):

makroporozan, Merck Lewatit MP 7080 (70-150 mesh) ili odgovarajući jonoizmjenjivač drugog proizvođača;

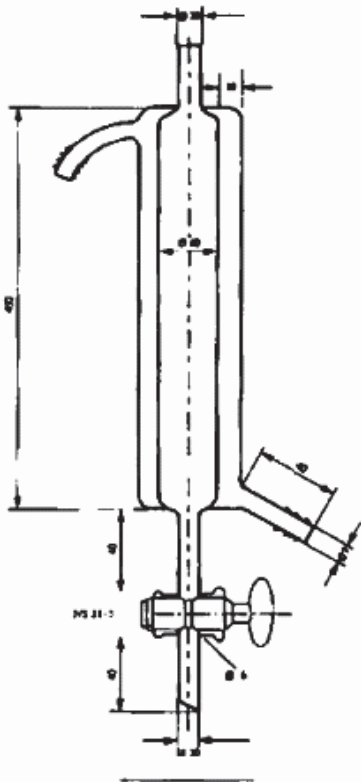
4.3.8. Hloridna kiselina, 10% HCl (m/m);

4.3.9. Balon sa okruglim dnom zapremine 2000 ml sa staklenim čepom i povratnim kondenzatorom;

4.3.10. Usisni (vakuum) filter (koji se može zagrijavati) prečnika 90 mm za filter-papir;

4.3.11. Vakuum boca zapremine 2000 ml;

4.3.12. Kolone za jonsku izmjenu sa oblogom za zagrijavanje i slavinom: unutrašnja cijev prečnika 60 mm, visine 450 mm (Slika 4.);



Slika 4. Kolone za jonsku izmjenu (mjere su u milimetrima)

11
*

Slika 4. Kolone za jonsku izmjenu (mjere su u milimetrima)

4.3.13. Vodeno kupatilo;

4.3.14. Vakuum sušnica;

4.3.15. Termostat;

4.3.16. Rotacioni vakuum uparivač.

4.4. Priprema ekstrakta i izolovanje anjonskih aktivnih agenasa

4.4.1 Priprema ekstrakta

Potrebna količina površinski aktivne supstance za ispitivanje biorazgradljivosti iznosi 50 g MBAS.

Količina proizvoda koji se ekstrahuje ne prelazi 1000g, dok se količina proizvoda koji služi za pripremu ekstrakata za ispitivanje biorazgradljivosti ograničava na 5000 g.

Naznačene količine jonoizmjenjivača predviđene su za 600 - 700 mmola površinski aktivne supstance i sapuna.

4.4.2 Izolovanje sastojaka rastvornih u alkoholu

U 1250 ml etanola, doda se 250 g sintetičkog detergenta koji se analizira, smješa se zagrije do tačke ključanja i refluktuje sat vremena uz miješanje. Alkoholni rastvor se, dok je vruć, brzo filtrira kroz vakuum filter sa širokim porama zagrijan na 50 °C. Balon i vakuum filter ispiraju se sa 200 ml vrućeg etanola. Filtrat i tečnost od ispiranja sakuplja se u vakuum bocu.

Ako se analiziraju paste ili tečni detergentski, uzorak ne sadrži više od 55 g anjonski površinski aktivne supstance i 35 g sapuna. Odmjereni uzorak upari se do suva. Suvi ostatak rastvori se u 2000 ml etanola i nastavi se po postupku jonske izmjene (4.1.2.).

Kod praškastog uzorka male gustine (< 300 g/l) udio etanola se povećava tako da iznosi 20:1. etanolni filtrat se, na rotacionom vakuum uparivaču, upari do suvog ostatka. postupak se ponovi ako je potrebna veća količina ekstrakta.

Suvi ostatak se rastvori u 5000 ml smješe izopropanol/voda.

4.4.3. Priprema kolona za jonsku izmjenu:

Kolona za katjonsku izmjenu

600 ml smole za katjonsku izmjenu (4.3.6) stavi se u bocu zapremine 3000 ml i prelije sa 2000 ml hloridne kiseline (4.3.8). Ostavi se da odstoji najmanje dva sata uz povremeno miješanje.

Nakon toga, kiselina se odlije i smola se pomoću dejonizovane vode, prebaci u kolonu (4.3.12) u koju je prethodno stavljen komadić staklene vune. Kolona se eluira dejonizovanom vodom sa protokom od 10-30 ml/min sve dok u eluatu više ne bude hlorida. Nakon toga eluira se sa 2000 ml smješe izopropanol/voda (4.3.3), sa protokom od 10-30 ml/min.

Kolona za anjonsku izmjenu

600 ml smole za anjonsku izmjenu (4.3.7) stavi se u bocu zapremine 3000 ml i prelije sa 2000 ml dejonizovane vode. Smola se ostavi da bubri najmanje dva sata, a zatim se pomoću dejonizovane vode prebaci u kolonu u koju je prethodno stavljen komadić staklene vune.

Kolona se eluira sa oko 5000 ml 0,3 M rastvora amonijumhidrogenkarbonata (4.3.5) sve dok u eluatu više ne bude hlorida.

Zatim se kolona ponovo eluira sa 2000 ml dejonizovane vode. Nakon toga eluira se sa 2000 ml smješe izopropanol/voda (4.3.3), sa protokom od 10 - 30 ml/min.

4.4.4. Postupak jonske izmjene

Jonoizmjenjivačke kolone se postavljaju tako da se kolona za katjonsku izmjenu nalazi iznad kolone za anjonsku izmjenu, i zagriju se na 50°C što se reguliše termostatom.

5000 ml rastvora dobijenog po postupku iz tačke 4.4.2. zagrije se na 60°C i propusti kroz jonoizmjenjivačke kolone uz protok od 20 ml/min. Kolone se eluiraju sa 1000 ml vruće smješe izopropanol/voda (4.3.3).

Za dobijanje anjonske površinski aktivne supstance (MBAS) katjonska jonoizmjenjivačka kolona KAT se odvoji. Pomoću 5000 ml rastvora etanol/SO₂ pri 50°C (4.3.4) eluiraju se masne kiseline sapuna iz katjonske jonoizmjenjivačke kolone. Eluat se baci. Zatim se MBAS eluiraju iz anjonske jonoizmjenjivačke kolone AAT pomoću 5000 ml rastvora amonijumhidrogenkarbonata (4.3.5.). Dobijeni eluat upari se na vodenom kupatilu ili u rotacionom vakuum uparivaču do suvog ostatka. Suvi ostatak sadrži MBAS (u obliku amonijum soli), a može da sadrži i anjonske supstance koje nisu površinski aktivne supstance i koji ne utiču na određivanje biorazgradljivosti. Ovom ostatku dodaje se

dejonizovana voda do definisane zapremine i odredi sadržaj MBAS u alikvotu. Rastvor se koristi kao standardni rastvor anjonskih sintetičkih detergenata za određivanje biorazgradljivosti. Rastvor se čuva na temperaturi nižoj od 5°C.

4.4.5 Regeneracija jonoizmjenjivačkih smola Katjonski izmjenjivač se nakon upotrebe baca.

Smola za anjonsku izmjenu regeneriše se eluiranjem rastvorom amonijumhidrogenkarbonata (4.3.5) uz protok od oko 10 ml/min sve dok u eluatu više ne bude anjonskih površinski aktivnih supstanci (test s metilenskim plavim). Zatim se anjonski izmjenjivač eluira sa 2000 ml smješe izopropanol/voda (4.3.3) i tada je opet spreman za upotrebu.

5. Priprema nejonske površinski aktivne supstance koje treba ispitati

5.1. Obrada uzoraka

5.1.1 Nejonske površinski aktivne supstance i detergentski prije određivanja primarne biorazgradljivosti obrađuju se na sljedeći način:

Proizvodi	Obrada
Nejonske površinski aktivne supstance	Ne obrađuju se
Detergentski koji sadrže površinski aktivne supstance	Alkoholna ekstrakcija, zatim izolovanje nejonske površinski aktivne supstance jonskom izmjenom

Svrha alkoholne ekstrakcije je uklanjanje nerastvornih i neorganskih sastojaka detergentski koji mogu uticati na određivanje biorazgradljivosti.

5.1.2 Postupak jonske izmjene

Izolovanje i odvajanje nejonske površinski aktivne supstance od sapuna, anjonske i katjonske površinski aktivne supstance je neophodno za tačno određivanje biorazgradljivosti, što se postiže postupkom jonske izmjene uz korišćenje makroporozne smole i odgovarajućih sredstava za frakcionu eluciju, čime se sapuni, anjonske i katjonske površinski aktivne supstance izoluju odjednom.

5.1.3 Analitička kontrola

Koncentracija anjonske i nejonske površinski aktivne supstance u detergentu određuje se nakon homogenizovanja, prema analitičkom postupku za MBAS i BiAS. Sadržaj sapuna određuje se odgovarajućom analitičkom metodom.

Ova analiza služi za izračunavanje potrebnih količina za pripremu frakcija za ispitivanje biorazgradljivosti.

Za određivanje biorazgradljivosti dovoljno je ekstrahovati više od 80% nejonske površinski aktivne supstance.

5.2. Princip metode

Iz homogenog uzorka (praška, ostatka nakon sušenja detergenata koji su u obliku paste ili tečnosti) dobija se etanolni ekstrakt koji sadrži površinski aktivne supstance, sapun i druge sastojke uzorka sintetičkog detergenta rastvorne u alkoholu. Etanolni ekstrakt se uparava do suvog ostatka koji se rastvori u smješi izopropanol/voda, a dobijeni rastvor, zagrijan na 50°C, propusti kroz kombinaciju kiselog katjenskog jonoizmjenjivača i makroporoznog anjonskog jonoizmjenjivača, da bi se spriječilo taloženje masnih kiselina koje se mogu pojaviti u kiseloj sredini. Nejonske površinski aktivne supstance dobiju se uparavanjem otpadnog rastvora. Katjonske površinski aktivne supstance koji mogu uticati na ispitivanje biorazgradljivosti i analitički postupak, uklanjaju se pomoću katjenskog jonoizmjenjivača postavljenog iznad anjonskog jonoizmjenjivača.

5.3. Reagensi i oprema

Reagensi i oprema koji se koriste za pripremu nejonske površinski aktivne supstance u testovima biorazgradljivosti su:

5.3.1. Dejonizovana voda;

5.3.2. Etanol, 95% (v/v) C₂H₅OH (sredstva koja se mogu koristiti za denaturaciju su metiletilketon ili metanol);

5.3.3. Smješa izopropanol/voda (50/50 v/v):

- 50 zapreminskih djelova izopropanola, CH₃CHOHCH₃, i

- 50 zapreminskih djelova vode (5.3.1);

5.3.4 Rastvor amonijumhidrogenkarbonata (60/40 v/v):

0,3 mol NH₄HCO₃ rastvori se u 1000 ml smješe izopropanol/voda koja se sastoji od 60 zapreminskih djelova izopropanola i 40 zapreminskih djelova vode (5.3.1);

5.3.5. Katjonski jonoizmjenjivač (KAT): kiseo, otporan na alkohol (50-100 mesh);

5.3.6. Anjonski jonoizmjenjivač (AAT): makroporozan, Merck Lewatit MP 7080 (70-150 mesh) ili odgovarajući jonoizmjenjivač drugog proizvođača;

5.3.7. Hloridna kiselina, 10% HCl (m/m);

5.3.8. Balon sa okruglim dnom zapremine 2000 ml sa staklenim čepom i povratnim kondenzatorom;

5.3.9. Usisni vakuum filter (koji se može zagrijavati) prečnika 90 mm za filter-papir;

5.3.10. Vakuum boca zapremine 2000 ml

5.3.11. Kolone za jonsku izmjenu sa oblogom za zagrijavanje i slavinom: unutrašnja cijev prečnika 60 mm, visine 450 mm (Slika 4.);

5.3.12. Vodeno kupatilo;

5.3.13. Vakuum sušnica;

5.3.14. Termostat;

5.3.15. Rotacioni vakuum uparivač.

5.4. Priprema ekstrakta i izolovanje nejonski aktivnih agenasa

5.4.1. Priprema ekstrakta

Potrebna količina površinski aktivne supstance za ispitivanje biorazgradljivosti iznosi oko 25 g BiAS.

Količina proizvoda potrebna za pripremu ekstrakta za određivanje biorazgradljivosti nije veća od 2000 g. Ponekad je potrebno ponoviti postupak dva ili više puta da bi se dobila dovoljna količina supstance za određivanje biorazgradljivosti.

5.4.2 Izolovanje sastojaka rastvornih u alkoholu

U 1250 ml etanola doda se 250 g sintetičkog detergenta koji se analizira, smješa se zagrije do tačke ključanja i reflektuje sat vremena uz miješanje. Vruć alkoholni rastvor se brzo filtrira kroz vakuum filter sa širokim porama zagrijan na 50°C. Balon i vakuum filter isperu se sa 200 ml vrućeg etanola. Filtrat i tečnost od ispiranja sakupljaju se u vakuum bocu.

Ako se analiziraju paste ili tečni detergentski, uzorak ne sadrži više od 25 g anjonske površinski aktivne supstance i 35 g sapuna. Odmjereni uzorak upari se do suvog ostatka. Suvi ostatak se rastvori u 500 ml etanola i nastavi se po postupku jonske izmjene (5.1.2.). Kod praškastog uzorka male gustine (< 300 g/l) udio etanola se poveća tako da iznosi 20:1. etanolni filtrat se, na rotacionom vakuum uparivaču, upari do suvog ostatka. postupak se ponovi ako je potrebna veća količina ekstrakta.

Suvi ostatak se rastvori u 5000 ml smješe izopropanol/voda.

5.4.3 Priprema kolona za jonsku izmjenu:

Kolona za katjonsku izmjenu

600 ml smole za katjonsku izmjenu (5.3.5) stavi se u bocu zapremine 3000 ml i prelije sa 2000 ml hloridne kiseline (5.3.7). Ostavi se da odstoji najmanje dva sata uz povremeno miješanje.

Nakon toga kiselina se odlije i smola, pomoću dejonizovane vode, prebaci u kolonu (5.3.12) u koju je prethodno stavljen komadić staklene vune. Eluirati kolonu dejonizovanom vodom sa protokom od 10-30 ml/min sve dok u eluatu više ne bude hlorida. Nakon toga eluira se sa 2000 ml smješe izopropanol/voda (5.3.3), čiji je protok od 10-30 ml/min.

Kolona za anjonsku izmjenu

600 ml smole za anjonsku izmjenu (5.3.6) stavi se u bocu i prelije sa 2000 ml dejonizovane vode.

Smola se ostavi da bubri najmanje dva sata, a zatim se pomoću dejonizovane vode prebaci u kolonu u koju je prethodno stavljen komadić staklene vune.

Kolona se eluira sa oko 5000 ml 0,3 M rastvora amonijumhidrogenkarbonata (5.3.4) sve dok u eluatu više ne bude hlorida.

Zatim se kolona ponovo eluira sa 2000 ml dejonizovane vode. Nakon toga eluira se sa 2000 ml smješe izopropanol/voda (5.3.3) sa protokom od 10-30 ml/min.

5.4.4. Postupak jonske izmjene

Jonoizmjenjivačke kolone se postave tako da se kolona za katjonsku izmjenu nalazi iznad kolone za anjonsku izmjenu. Jonoizmjenjivačke kolone se zagriju na 50°C što se reguliše termostatom.

5000 ml rastvora dobijenog po postupku iz tačke 5.4.2. zagrije se na 60°C i propusti se rastvor kroz jonoizmjenjivačke kolone uz protok od 20 ml/min. Kolone se eluiraju sa 1000 ml vruće smješe izopropanol/voda (5.3.3).

Za dobijanje nejonske površinski aktivne supstance prikupi se filtrat i rastvor od ispiranja filtera, i na rotacionom vakuum uparivaču upari do suva. Suvi ostatak sadrži BiAS. Ovom rastvoru dodaje se dejonizovana voda do definisane zapremine i odredi sadržaj BiAS u alikvotu. Rastvor se koristi kao standardni rastvor nejonske površinski aktivne supstance za određivanje biorazgradljivosti. Rastvor čuvati na temperaturi nižoj od 5°C.

5.4.5. Regeneracija jonoizmjenjivačkih smola Katjonski izmjenjivač se nakon upotrebe baca.

Smola za anjonsku izmjenu regeneriše se eluiranjem sa oko 5000 ml - 6000 ml rastvora amonijumhidrogenkarbonata (5.3.4) uz protok od oko 10 ml/min sve dok u eluatu više ne bude anjonske površinski aktivne supstance (test s metilenskim plavim). Zatim se anjonski izmjenjivač eluira sa 2000 ml smješe izopropanol/voda (5.3.3) i tada je opet spreman za upotrebu.

PRILOG 2

OGRANIČENJA SADRŽAJA FOSFORA U DETERGENTIMA

Detergent	Ograničenje	Datum od kada se ograničenje primjenjuje
Detergent za pranje ² veša koji se koriste u domaćinstvu ³	Ne stavljaju se na tržište ako je ukupan sadržaj fosfora jednak ili veći od 0,5 grama u preporučenoj količini detergenta koji se koriste u glavnom ciklusu za pranje procesa za standardno opterećenje mašine za veš, u skladu sa Prilogom 3 dio B, tvrdu vodu: - za "uobičajeno zaprljane tkanine" u slučaju univerzalnih detergenata; - za "umjereno zaprljane tkanine" u slučaju detergenata za osjetljive tkanine.	30. jun 2013.
Detergenti za mašinsko pranje posuda koji se koriste u domaćinstvu ⁴	Ne stavljaju se na tržište ako je ukupan sadržaj fosfora jednak ili veći od 0,3 grama u standardnoj dozi	1. januar 2017.

PRILOG 3

NAČIN OZNAČAVANJA DETERGENTA

Dio A - Označavanje sadržaja

Na ambalaži detergenta se navodi svaki sastojak čija je koncentracija veća od 0,2%, navođenjem opsega masenog udijela tog sastojka izraženog u procentima i to:

- manje od 5% (<5%)
- od 5% do 15% (5-15%)
- od 15% od 30% (15-30%)
- 30% i više.

Određba stava 1 ovog priloga primjenjuje se na sljedeće supstance:

- fosfate;
- fosfonate;
- anjonske površinske aktivne supstance;
- katjonske površinske aktivne supstance;
- amfoterne površinske aktivne supstance;
- nejonske površinske aktivne supstance;
- izbjeljivače na bazi kiseonika;
- izbjeljivače na bazi hlora;
- EDTA i njene soli;
- NTA (nitrilotriacetatna kiselina) i njene soli;
- fenole i halogenovane derivate fenola;
- paradihlorobenzen;

² Pranje je čišćenje veša, tkanina, posuda i drugih površina; Čišćenje je proces kojim se nepoželjni depozit istiskuje iz podloge ili je iz podloge doveden u stanje rastvora ili disperzije;

³ Detergent za pranje veša koji se koristi u domaćinstvu je detergent za veš koji se stavlja na tržište za neprofesionalne korisnike uključujući upotrebu u javnim perionice;

⁴ Detergent za mašinsko pranje posuda koji se koristi u domaćinstvu je detergent koji se stavlja na tržište za upotrebu u mašinama za posude za neprofesionalne korisnike.

- aromatične ugljovodonike;
- alifatične ugljovodonike;
- halogenovane ugljovodonike;
- sapune;
- zeolite;
- polikarboksilate.

Sastojci detergenta koji se navode na ambalaži bez obzira na njihovu koncentraciju su:

- enzimi;
- dezinficijensi;
- optička bjelila;
- mirisi;
- konzervansi.

Naziv konzervansa navodi se na ambalaži u skladu sa propisom kojim se uređuju kozmetički proizvodi, ako naziv nije dostupan, navodi se naziv kojim proizvođač raspolaže.

Alergeni kao i sastojci mirisa navode na ambalaži detergenta u koncentracijama koje prelaze 0,01 %, a naziv alergena navodi se u skladu sa propisom kojim se uređuju kozmetički proizvodi.

Za detergente koji se upotrebljavaju u industrijskom sektoru i za profesionalne potrebe, a nisu dostupni za široku upotrebu, zahtjeve iz stava 1 ovog dijela nije potrebno ispuniti ako su podaci sadržani u bezbjednosnim listovima.

Dio B - Označavanje podataka o doziranju

Na ambalaži detergenta za opštu upotrebu namijenjenog za pranje veša navode se sljedeće informacije i napomene:

- 1) preporučene količine i/ili uputstva u kojima su navedene doze izražene u mililitrima ili gramima potrebnim za standardno punjenje⁵ u mašinama za pranje veša, za meku, srednje tvrdu i tvrdu kategoriju vode sa podacima za jedan ili dva ciklusa pranja;
- 2) broj standardnih punjenja u mašinama za pranje veša za srednje zaprljan veš za univerzalne detergente⁶;
- 3) broj standardnih punjenja u mašinama za pranje veša za srednje zaprljan veš koji se može oprati sadržajem pakovanja uz upotrebu vode srednje tvrdoće (2,5 mmol CaCO₃/l) za detergente sa specifičnom namjenom za osjetljive tkanine;
- 4) ako se u pakovanju nalazi mjerna posuda - njena zapremina se navodi u mililitrima ili gramima, a ta posuda ima oznake za određivanje doze detergenta za standardno punjenje u mašinama za pranje veša za meku, srednje tvrdu i tvrdu kategoriju vode.

Na pakovanjima detergenata u prodaji za široku potrošnju koji su predviđeni kao detergentski za mašinsko pranje posuda navode se podaci o standardnoj dozi izraženoj u gramima ili ml ili s brojem tableta za glavni ciklus pranja normalno zaprljanog posuda u punoj mašini za pranje posuda za 12 kompleta poštujući prema potrebi prilagodavanja na meku, srednje tvrdu i tvrdu kategoriju vode.

⁵ Standardna punjenja mašine za pranje veša su 4,5 kg suve tkanine za jake detergente i 2,5 kg suve tkanine za blage detergente.

⁶ Detergent se smatra univerzalnim detergentom, osim ako proizvođač ne naglasi upotrebu njegu tkanine, npr. pranje na niskoj temperaturi, pranje osjetljivih i obojenih tkanina.