

1087.

Na osnovu člana 44 stav 2 i člana 49 stav 4 Zakona o hemikalijama ("Službeni list CG", broj 18/12), Ministarstvo održivog razvoja i turizma uz saglasnost Ministarstva zdravlja, donijelo je

P R A V I L N I K O METODAMA ISPITIVANJA BIORAZGRADLJIVOSTI POVRŠINSKI AKTIVNE SUPSTANCE, NAČINU OBILJEŽAVANJA I SASTAVU DETERGENTA

Član 1

Ovim pravilnikom propisuju se metode ispitivanja biorazgradljivosti površinski aktivne supstance u detergentima, način obilježavanja detergenta i sadržaj liste o sastavu detergenta za medicinske potrebe.

Član 2

Ovaj pravilnik primjenjuje se i na pomoćne smješe za pranje koje sadrže površinski aktivne supstance.

Član 3

Izrazi upotrijebljeni u ovom pravilniku imaju sljedeća značenja:

1) **analitički reagens** (Analytical grade reagent - AR) je reagens sa odgovarajućim stepenom čistoće koji je potreban za izvođenje analitičke metode;

2) **pomoćne smješe za pranje** su sredstva namijenjena za predpranje, ispiranje ili izbjeljivanje odjeće, veša iz domaćinstva, omekšivač za veš kao i smješa za čišćenje u domaćinstvu i za čišćenja površina (npr. materijala, proizvoda, mašina, mehaničkih alata, prevoznih sredstava i prateće opreme, instrumenata, aparatura, itd.) i druga sredstva za čišćenje i pranje namijenjena za sve druge procese pranja i čišćenja;

3) **sastojak detergenta** je svaka supstanca, sintetičkog ili prirodnog porijekla koja se dodaje u detergent;

4) **inherentna biorazgradljivost** je razgradnja površinski aktivne supstance upotrebom predadaptiranog inokuluma u periodu dužem od 28 dana do razgradnje 60% molekula površinski aktivne supstance na ugljen-dioksid, vodu i mineralne soli (mineralizacija).

Član 4

Površinski aktivna supstanca je potpuno aerobno biorazgradljiva (mineralizacija) ukoliko dejstvom mikroorganizama u periodu od 28 dana dođe do potpune razgradnje 60% molekula na: ugljen-dioksid, vodu i mineralne soli.

Površinski aktivna supstanca ispunjava kriterijume primarne biorazgradljivosti ako dejstvom mikroorganizama dođe do strukturne promjene 80% molekula u periodu od tri sata, pri čemu površinski aktivna supstanca gubi površinski aktivno svojstvo.

Biorazgradljivost površinski aktivnih supstanci iz st. 1 i 2 ovog člana određuje se metodama datim u Prilogu 1 koji je sastavni dio ovog pravilnika.

Ograničenja o sadržaju fosfora u detergentima data su u Prilogu 2 koji je sastavni dio ovog pravilnika.

Član 5

Inherentna biorazgradljivost određuje se sljedećim metodama:

- 1) Metoda S.12.- MEST ISO 9887 - Procjena potpune aerobne biorazgradljivosti organskih jedinjenja u vodenoj sredini - Modifikovana semikontinualna metoda sa aktivnim muljem (SCAS) metoda;
- 2) Metoda S.9.-MEST ISO 9888 - Statička proba - Zahn-Wellens metoda - Procjena potpune aerobne biorazgradljivosti organskih jedinjenja u vodenoj sredini.

Inherentna biorazgradljivost ima potencijalnu perzistentnost površinski aktivne materije, ako rezultati ispitivanja utvrde da ispitivana površinski aktivna materija ne postiže 60% razgradljivosti molekula.

Biorazgradljivost se određuje Metodom S.10. - MEST ISO 11733, odnosno metodom simulacije aktivnog mulja.

Član 6

Na ambalaži detergenta namijenjenog za opštu upotrebu pored oznaka kojima se označavaju hemikalije u skladu sa propisom o klasifikaciji, označavanju i pakovanju supstanci i smješa nalaze se i sljedeći podaci:

- 1) naziv i trgovačko ime detergenta;
- 2) naziv ili zaštićeni znak, adresa i broj telefona proizvođača odnosno distributera odgovornog za stavljanje detergenta u promet;
- 3) ime i prezime, adresa i broj telefona lica od koga se može dobiti Lista o sastavu detergenta;
- 4) sastav detergenta u skladu sa Prilogom 3 koji je sastavni dio ovog pravilnika.

Odredba stava 1 ovog člana primjenjuju se i na detergente koji se stavljaju u promet u rasutom stanju.

Na etiketi, odnosno ambalaži detergenta namijenjenog za opštu upotrebu ne smije se nalaziti slikovni prikaz kojim se mogu dovesti potrošači u zabludu.

Na ambalaži detergenta koji se koristi u industriji ili za profesionalne svrhe ne navode se podaci iz stava 1 tačka 4 ovog člana.

Član 7

Lista o sastavu detergenta za medicinske potrebe, sadrži sljedeće podatke o:

- 1) nazivu detergenta;
- 2) sastojcima detergenta (hemijski naziv ili naziv prema IUPAC nomenklaturi; CAS broj; naziv prema nomenklaturi INCI (Međunarodna nomenklatura kozmetičkih sastojaka) ukoliko je dostupan; i naziv iz evropske farmakopeje);
- 3) proizvođaču (naziv i sjedište, adresa, e-mail, broj telefona);
- 4) svim sastojcima detergenta, prema zastupljenosti masenog udjela izraženog u procentima, od najvećeg do najmanjeg, sa opsezima:

- više ili jednako od 10% ($\geq 10\%$),
- od 1% do 10% (1-10%),
- od 0,1% do 1% (0,1 - 1%),
- manje od 0,1% ($< 0,1\%$);

5) pojedinačnim sastojcima mirisa, etarskih ulja ili agenasa za bojenje.

U Listi iz stava 1 ovog člana ne navode se supstance koje ulaze u sastav mirisa, etarskih ulja ili agensa za bojenje, osim alergena koji ulaze u sastav mirisa, kada su prisutni u koncentraciji većoj od 0.01%, kao i nečistoće.

Nazivi alergena iz stava 2 ovog člana navode se prema propisima kojima su uređena kozmetička sredstva.

Član 8

Ovaj pravilnik stupa na snagu osmog dana od dana objavljivanja u „Službenom listu Crne Gore“.

Broj: 10-105/ 166

Podgorica, 24. oktobra 2013. godine

Ministar,
Branimir Gvozdenović, s.r.

METODE ISPITIVANJA BIORAZGRADLJIVOSTI POVRŠINSKI AKTIVNIH SUPSTANCI U DETERGENTIMA

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 hemetičkim 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.

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

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-hemijska 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 dažnije; 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 biokonzentraciju kao i njihova raspodjela u sedimentu. Navedene metode date su u propisu kojim se uređuju metode ispitivanja svojstava hemikalija.

što su visoko efikasna tečna hromatografija (high performance liquid chromatography - HPLC) ili gasna hromatografija (gas chromatography - GC).

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).

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 primame biorazgradljivosti površinski aktivne supstance

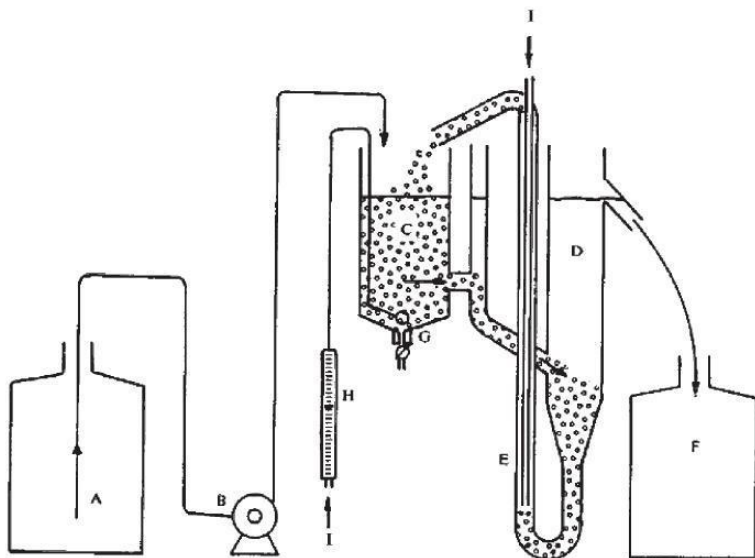
1.1. Metoda

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.

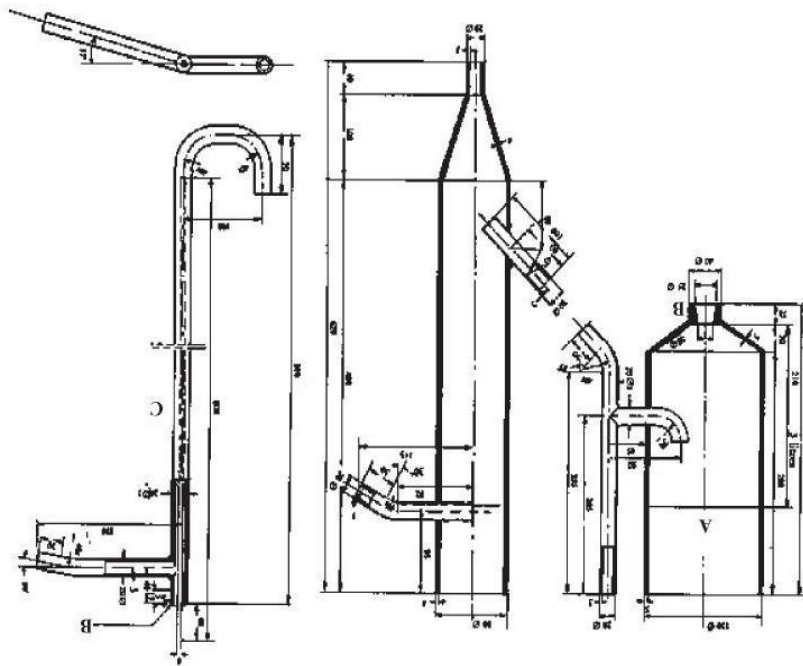
1.2. Oprema potrebna za ispitivanje

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 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, $\text{K}_2 \text{HPO}_4$,
- 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.

Pjenušanje sadržaja posude za aeraciju (C) se sprječava odgovarajućim sredstvima, stiče se da se ne koriste sredstva protiv stvaranja pjene koja inhibiraju aktivni mulj ili sadrže površinski aktivne supstance.

Pumpa za aeraciju (E) se podešava tako da se aktivni mulj iz taložnika kontinualno reciklira u posudu za aeraciju (C). Mulj se može sakupljati na vrhu posude (C), na dnu taložnika (D), ili bilo gdje u procesu cirkulacije da se vraća u cirkulaciju, najmanje jednom dnevno, četkanjem ili nekim drugim odgovarajućim sredstvom. Taloženje mulja se poboljšava dodavanjem 2 ml 5% rastvora gvožđe (III)-hlorida.

Efluent iz taložnika (D) se sakuplja u posudi (F) u toku 24 sata. Uzorak se uzima nakon dobrog miješanja, s tim da se posuda (F) mora pažljivo čistiti.

1.6. Provjera mjeme opreme

Sadržaj površinski aktivne supstance (u mg/l) u sintetičkoj otpadnoj vodi određuje se neposredno prije upotrebe.

Sadržaj površinski aktivne supstance (u mg/l) u efluentu koji je sakupljen u toku 24 sata u posudi (F), određuje se uvijek istom analitičkom metodom, neposredno nakon sakupljanja. Ako se određivanje ne vrši neposredno nakon sakupljanja uzorak se zamrzava radi zaštite. Koncentracije se određuju sa tačnošću od 0,1 mg/l površinski aktivne supstance.

Radi provjere efikasnosti procesa određuje se hemijska potrošnja kiseonika - HPK ili rastvoreni organski ugljenik (dissolved organic carbon - DOC) u efluentu sakupljenom u posudi (F) i profiltriranom kroz staklena vlakna i u filtriranoj sintetičkoj otpadnoj vode iz posude (A).

Provjera efikasnosti vrši se najmanje dva puta nedeljno.

Smanjenje nivoa COD ili DOC se ustali, kada je dostignuta približno ujednačena dnevna razgradnja površinski aktivne supstance na kraju procesa uvođenja i prilagođavanja (period A Slika 3).

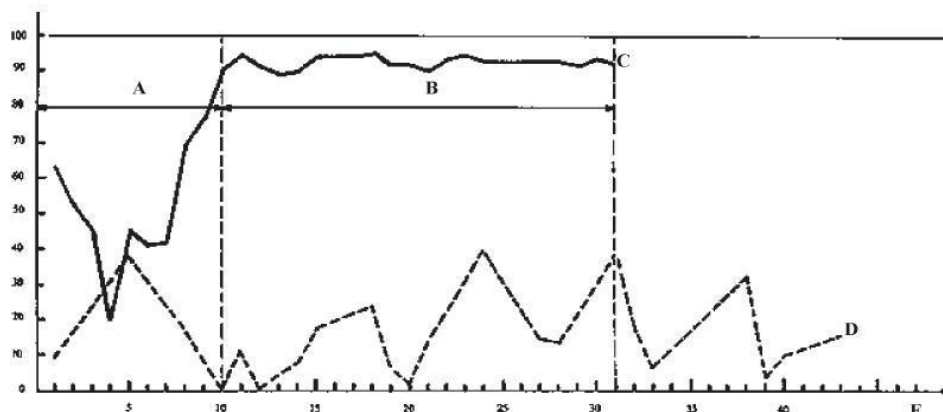
Sadržaj suve materije (u g/l) u aktivnom mulju u posudi za aeraciju (C) određuje se dva puta nedeljno. Ako je količina suve materije veća od 2,5 g/l, višak aktivnog mulja se odstranjuje.

Određivanje razgradnje vrši se na sobnoj temperaturi, koja je ustaljena i u opsegu od 19 - 24 °C.

1.7. Izračunavanje biorazgradljivosti

Procenat razgradnje površinski aktivne supstance računa se svaki dan na osnovu sadržaja površinski aktivne supstance (mg/l) u sintetičkoj otpadnoj vodi i dobijenog efluenta sakupljenog u posudi (F).

Dobijene vrijednosti razgradnje predstavljaju se grafički prema Slici 3.



Slika 3. Računanje biorazgradljivosti – test za dokazivanje

Razgradnja površinski aktivne supstance računa se kao aritmetička sredina vrijednosti dobijenih tokom 21 dana (period V Slika 3), nakon perioda uvođenja i prilagođavanja (period A Slika 3). U periodu od 21 dana (period V) razgradnja u postrojenju se odvija pravilno i ujednačeno.

U svakom slučaju, period uvođenja i prilagođavanja (period A) nije duži od šest nedelja.

Vrijednosti dnevne razgradnje se računaju približno na 0,1%, ali konačni rezultati se daju kao cijeli broj.

U nekim slučajevima se smanjuje učestalost uzorkovanja, ali se pri izračunavanju srednje vrijednosti koristi najmanje 14 rezultata dobijenih u periodu od 21 dan.

2. Određivanje anjonskih površinski aktivnih supstanci u testovima biorazgradljivosti

2.1. Metoda

Metoda je zasnovana na činjenici da katjonska boja metilensko plavo (MBAS) gradi plavo obojene soli sa anjonskim površinski aktivnim supstancama koje se ekstrahuju hloroformom. Radi otklanjanja smetnji, prvo se vrši ekstrakcija iz alkalnog rastvora i ekstrakt se zatim promućka sa kiselim rastvorom metilenskog plavog. Apsorbanca izdvojene organske faze mjeri se fotometrijski na talasnoj dužini 650 nm (maksimum apsorpcije).

2.2. Reagensi i oprema

Reagensi i oprema koji se koriste za određivanje anjonskih površinski aktivnih supstanci u testovima biorazgradljivosti su:

2.2.1. Puferski rastvor pH 10;

24g natrijum-hidrogenkarbonata (natrijum-bikarbonat) (NaHCO_3) AR i 27 g bezvodnog natrijum-karbonata (Na_2CO_3) AR, rastvori se u dejonizovanoj vodi i dopuni do 1000 ml dejonizovanom vodom.

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 H_2SO_4 ($d=1,84 \text{ g/ml}$) 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, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$;

2.2.8. Sulfatna kiselina, H_2SO_4 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 µg i 150 µg 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 mućka jedan minut. Poslije razdvajanja slojeva,

hlorofomski 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 mućka jedan minut. Hlorofomski sloj se filtrira u normalni sud kroz filter od pamučne vate, koji je prethodno očišćen i nakvašen hlorofomom.

Alkalni i kiseli rastvori ekstrahuju se 3 puta, koristeći 10 ml hlorofoma za drugu i treću ekstrakciju. Spojeni hlorofomski ekstrakti filtriraju se u normalni sud zapremine 50 ml kroz isti filter od pamučne vate i razblažuju do crte hlorofomom korišćenim za ispiranje filtera. Mjeri se apsorbanca hlorofomskog rastvora na 650 nm u kiveti od 1 cm do 5 cm u odnosu na hlorofom. 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 fenoltalein 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:

$$\frac{E * 1.023 \text{ mgMBAS (ml)}}{20000} \text{ gdje je E masa uzorka u mg.}$$

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 očitava se sa kalibracione krive. Sadržaj MBAS u uzorku izračunava se prema sljedećoj formuli:

$$\text{MBAS mg/l} = \frac{1000 * \text{MBASmg}}{V} \text{ gdje je V = zapremina korišćenog uzorka izražena u ml.}$$

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 µg. 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 (KBiI₄ + BaCl₂ + glacijalna sirćetna kiselina).

Talog 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, $\text{BiONO}_3 \times \text{H}_2\text{O}$ 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, $\text{BaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 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 ($d=0,910$ 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 ($d=0,910$ 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, $\text{C}_5\text{H}_8\text{NNaS}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 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, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ AR, pomiješa sa 50 ml 0,5 M sumporne kiseline i dopuni vodom do 1000 ml.

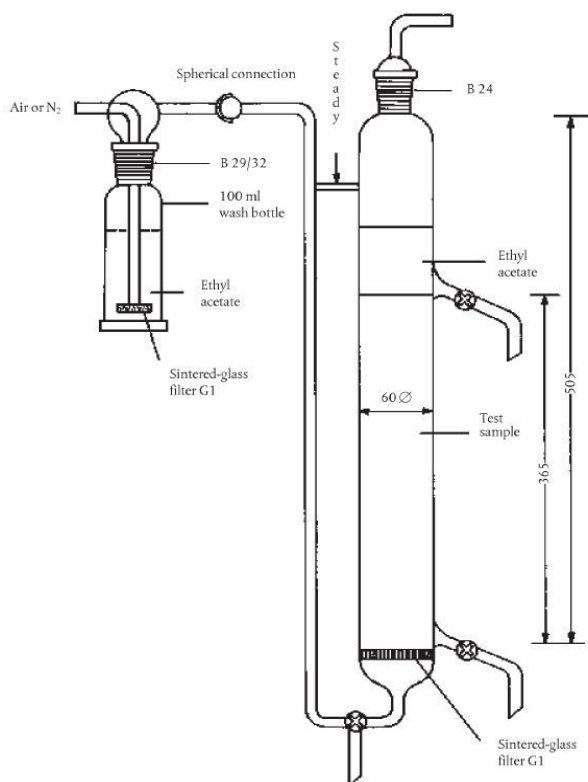
3.2.12.2 Standardni rastvor

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)

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 μm ;

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

3.2.20. Potenciometar 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 μg 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, stim 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. Menzutom 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 ispere 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 potencijometrijske 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 detergentski prije određivanja primarne biorazgradljivosti obrađuju se na sljedeći način:

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

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

4.1.2. Postupak jonske izmjene

Radi 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 eluena 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 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 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);

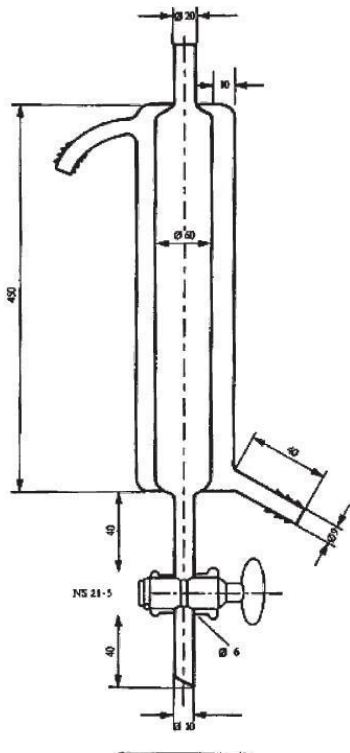
4.3.9. Balon sa okruglim dnom zapremine 2000 ml sa staklenim čepom i povratnim kondenzatorom;

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)

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 uzorci, uzorak ne sadrži više od 55 g anjonski površinski aktivne supstance i 35 g sapuna. Odmjereni uzorak upari se do suva. Svi 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 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.

Svi 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 hloriga. 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 hloriga.

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 nijesu 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 detergents prije određivanja primarne biorazgradljivosti obrađuju se na sljedeći način:

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

Svrha alkoholne ekstrakcije je uklanjanje nerastvornih i neorganskih sastojaka detergenata 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 detergenata 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 katjionskog jonoizmjenjivača i makroporoznog anjionskog jonoizmjenjivača, da bi se spriječilo taloženje masnih kiselina koje se mogu pojaviti u kiseloj sredini. Nejonske površinski aktivne supstance dobiju se uparavanjem otpadnog rastvora. Katjionske površinski aktivne supstance koji mogu uticati na ispitivanje biorazgradljivosti i analitički postupak, uklanjaju se pomoću katjionskog jonoizmjenjivača postavljenog iznad anjionskog 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. Katjionski jonoizmjenjivač (KAT): kiseo, otporan na alkohol (50-100 mesh);

5.3.6. Anjionski 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 anjionske 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 katjionsku izmjenu

600 ml smole za katjionsku 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 anjionsku izmjenu

600 ml smole za anjionsku 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 hloriga.

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 postavljaju 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
Komercijalni detergent za veš ¹	Ne stavljaju se u promet ako ukupan sadržaj fosfora je jednak ili veći od 0,5 grama u preporučenoj količini detergenta koji se koriste u glavnom ciklusu za pranje procesa za standardno opterećenje mašine	30. jun 2013.
Komercijalni detergent za automatsko pranje posuda ²	Ne stavljaju se u promet ako je ukupan sadržaj fosfora jednak ili veći od 0,3 grama u standardnoj dozi	1. januar 2017.

¹ Komercijalni detergent za veš je detergent koji se nalazi na tržištu za upotrebu od strane ne-profesionalaca, uključujući i javnost;

² Komercijalni detergent za automatsko pranje posuda je detergent koji se nalazi na tržištu za upotrebu u automatskim mašinama za pranje posuda od strane ne-profesionalaca;

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;

NAČIN OBILJEŽAVANJA DETERGENTA

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.

Odredba stava 1 ovog priloga primjenjuje se na sljedeće supstance:

- fosfate;
- fosfonate (fosfiti);
- 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;
- r-dihlorbenzen;
- 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.

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.

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

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 punjenje 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 detergente;
- 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.