

На основу члана 73. става 5., члана 74. става 3. и члана 81. става 4. Закона о хемикалијама („Службени Гласник“ РС бр. 36/09), и тачке 8. став 5. подтачке 11) Одлуке о оснивању Агенције за хемикалије, („Службени гласник РС“ бр. 78/09), Управни одбор Агенције за хемикалије на седници одржаној дана 21. маја 2010. године донео је:

## ПРАВИЛНИК О ДЕТЕРГЕНТИМА

### I. ОСНОВНЕ ОДРЕДБЕ

#### Члан 1.

Овим правилником прописују се критеријуми и методе испитивања биоразградљивости сурфактанта, садржина техничког досијеа о сурфактанту, специфичан начин обележавања детергента, садржај Листе о саставу детергента, као и подаци из тог листа које треба учинити доступним јавности.

#### Члан 2.

Поједини изрази употребљени у овом правилнику имају следеће значење:

- 1) *аналитички реагенс* (Analytical grade reagent - AR) јесте реагенс са високим или довољним степеном чистоће која је потребна за извођење аналитичке методе;
- 2) *детергент за индустријске или професионалне сврхе* јесте детергент који користи само стручно оспособљено особље, а који се не користи у домаћинству;
- 3) *помоћне смеше за прање* јесу:
  - *помоћно средство за прање* - средство намењено за претпрање, испирање или избељивање одеће, веша из домаћинства, итд.;
  - *омекшивач за веш* - средство намењено за промену осећаја при додиру тканине које се користи у завршним процесима прања тканине;
  - *смеша за чишћење* - средство намењено за чишћење у домаћинству и за друга чишћење површина (нпр.: материјала, производа, машина, механичких алата, превозних средстава и пратеће опреме, инструмената, апаратура, итд.);
  - *остала средства за чишћење и прање* - средства намењена за све друге процесе прања и чишћења;
- 4) *сатојак детергента* јесте свака хемијска супстанца, синтетичког или природног порекла намењена за умешавање у детергент;
- 5) *инхерентна биоразградљивост* јесте разградња сурфактанта употребом пред-адаптираног инокулума у периоду дужем од 28 дана до разградње 60% молекула сурфактанта на угљен диоксид, воду и минералне соли (минерализација).

#### Члан 3.

Детергентима се сматрају и помоћне смеше за прање које садрже сурфактанте.

### Критеријуми и методе испитивања биоразградљивости сурфактанта

#### Члан 4.

Сурфактант испуњава критеријум потпуне аеробне биоразградљивости (минерализација) уколико дејством микроорганизама у периоду од 28 дана дође до потпуне разградње 60% молекула на: угљендиоксид, воду и минералне соли.

Сурфактант испуњава критеријум примарне биоразградљивости ако дејством микроорганизама дође до структурне промене 80% молекула у периоду од 3 сата, при чему сурфактант губи површински активно својство.

Биоразградљивост сурфактанта одређује се методама датим у Прилогу I који је одштампан уз овај правилник и чини његов саставни део.

## **Садржина техничког досијеа о сурфактанту**

### **Члан 5.**

Технички досије о сурфактанту садржи податке потребне за издавање одобрења за коришћење сурфактанта који не испуњава услове потпуне аеробне биоразградљивости.

Технички досије о сурфактанту садржи следеће делове:

1. Идентитет сурфактанта;
2. Резултати испитивања биоразградљивости сурфактанта;
3. Информације о сурфактанту;
4. Количине сурфактанта које се користе у детергентима;
5. Предвиђени начини коришћења;
6. Потенцијално тешко разградљиви метаболити;
7. Резултати додатних испитивања;
8. Предлог процене ризика сурфактанта.

### **Члан 6.**

Део техничког досијеа о идентитету сурфактанта садржи: назив сурфактанта, хемијски назив и/или назив по IUPAC номенклатури, трговачко име, синоним, CAS број и ЕС број (ако је доступан), податке који се односе на молекулску и структурну формулу као и податке о саставу сурфактанта.

### **Члан 7.**

Део техничког досијеа о резултатима испитивања биоразградљивости сурфактанта садржи податке о потпуној аеробној или примарној биоразградљивости, о степену биоразградљивости који је добијен испитивањем, коришћеном инокулуму, садржају сурфактанта који је коришћен у методи испитивања, називу методе којом је испитивана биоразградљивост и називу референтне лабораторије која је вршила испитивања.

### **Члан 8.**

Део техничког досијеа о информацијама о сурфактанту садржи физичко-хемијска својства од којих треба навести: агрегатно стање, тачку топљења, тачку кључања, релативну густину, коефицијент расподеле октанол/вода, критичну мицеларну концентрацију, растворљивост у води и рН вредност.

### **Члан 9.**

Део техничког досијеа о количинама сурфактанта које се користе у детергентима садржи податке о количини сурфактанта садржаног у свакој врсти детергента или помоћног средства за чишћење у којима се тај сурфактант користи.

### **Члан 10.**

Део техничког досијеа о предвиђеним начинима коришћења садржи податке на основу којих се врши процена утицаја коришћења тог сурфактанта у детергентима на животну средину, податке о социо-економској оправданости коришћења сурфактанта, о условима коришћења (сценарио испуштања), о укупно коришћеним количинама

сурфактанта, о доступности и применљивости алтернативног решења узимајући у обзир његов радни и економски учинак и процену битних података о животној средини.

#### **Члан 11.**

Део техничког досијеа о подацима који се односе на потенцијално тешко разградљиве метаболите који настају биоразградњом сурфактанта, садржи податке о токсичности тих метаболита.

Ако идентитет метаболита из става 1. овог члана није могуће утврдити, достављају се додатни подаци о ликвору који настаје при биоразградњи и то физичко-хемијска својства ликвора (растворљивост у води, коефицијент расподеле октанол: вода (Log Po/w) итд.) и остали подаци до којих се дошло током испитивања, као и називи аналитичких метода коришћених при овим испитивањима.

#### **Члан 12.**

Испитивања која се врше за добијање података за технички досије из члана 11. овог правилника, врше се према поступку постепеног спровођења испитивања, којим се обезбеђује максимално коришћење *in-vitro* метода и других метода којима се не врше испитивања на животињама.

#### **Члан 13.**

Када се на основу резултата испитивања из члана 7. овог правилника докаже да сурфактант испуњава критеријуме примарне биоразградљивости, морају се урадити додатна испитивања за тај сурфактант.

#### **Члан 14.**

Део техничког досијеа о додатним испитивањима садржи резултате испитивања:

1. инхерентне биоразградљивости;
2. биоразградљивости сурфактанта методом симулације активног муља,
3. токсичности ликвора који настаје при биоразградњи испитиваног сурфактанта.

Резултати испитивања из става 2. тачке 1. овог члана садрже и податке о пред-адаптираном инокулуму.

#### **Члан 15.**

За одређивање инхерентне биоразградљивости примењује се најмање једна од наведених метода:

- Метода С.12. - Процена потпуне аеробне биоразградљивости органских једињења у воденој средини - Модификована семиконтинуална метода са активним муљем (SCAS) метода – SRPS EN ISO 9887
- Метода С.9. - Zahn-Wellens метода - Процена потпуне аеробне биоразградљивости органских једињења у воденој средини – SRPS EN ISO 9888 – Статичка проба

Ако резултати испитивања инхерентне биоразградљивости докажу да испитивани сурфактант не постиже 60% разградљивости молекула, то указује на потенцијалну перзистентност сурфактанта.

#### **Члан 16.**

За одређивање биоразградљивости методом симулације активног муља примењује се Метода С.10. - SRPS ISO 11733.

Ако се резултатима испитивања биоразградљивости методом симулације активног муља докаже потенцијално ослобађање метаболита при обради отпадне воде, подносилац захтева дужан је да изврши додатну процену ризика.

### **Члан 17.**

Резултати испитивања токсичности ликвора који настаје при биоразградњи садржи податке о хемијским и физичким својствима, о ефектима на организме и податке о различитим врстама разградње.

Подаци о хемијским и физичким својствима садрже:

- идентитет метаболита и аналитичка метода којом је утврђен;
- главна физичко-хемијска својства (растворљивост у води, коефицијент расподеле октанол: вода (Log Po/w) итд.).

Подаци о ефектима на организме добијају се коришћењем следећих метода:

- Метода С.1. - за ефекте на рибе;
- Метода С.2. - за ефекте на дафније;
- Метода С.3. - за ефекте на алге;
- Метода С.11. - за ефекте на бактерије.

Подаци о биотичкој разградњи добијају се коришћењем Методе С. 5., а подаци о абиотичкој разградњи добијају се коришћењем Методе С.7. при чему се мора узети у обзир потенцијал метаболита за биоконцентрацију као и њихова расподела у седименту.

Методе из ст. 3 и 4. овог члана дате су у пропису којим се уређују методе испитивања својстава хемикалија.

### **Начин обележавања детергента**

#### **Члан 18.**

На етикети односно амбалажи детергента морају се налазити поред елемената обележавања који су у складу са прописима о класификацији, паковању и обележавању супстанци и смеша, и видљиво, неизбрисиво и на српском језику и следећи подаци:

- 1) назив и трговачко име детергента;
- 2) назив или заштићени знак, пуна адреса и телефонски број правног лица одговорног за стављање детергента у промет;
- 3) адреса, адресе електронске поште и интернет презентације, као и телефонски број из Листе о саставу детергента.

Подаци из става 1.овог члана морају бити наведени у документацији која иде уз детергент који се транспортује у расутом стању.

На етикети односно амбалажи детергента мора бити назначен састав детергента на начин дат у Делу 1А. Прилога II, као и упутство за коришћење и ако је то потребно, посебне мере предострожности.

На етикети односно амбалажи детергента који се користи за прање веша морају стајати информације и напомене за дозирање на начин дат у Делу 1Б. Прилога II.

Прилог II одштампан је уз овај правилник и чини његов саставни део.

Ако је детергент намењен за општу употребу на његовој етикети односно амбалажи не сме да се налази сликовни приказ воћа такав да може довести потрошача у заблуду у погледу коришћења тог детергента.

Изузетно од става 3. овог члана произвођач не мора да обележи детергент на начин дат у Делу 1А. Прилога II ако се тај детергент користи у индустрији или за професионалне сврхе, није намењен за општу употребу, и за њега је достављен безбедносни лист.

### **Листа о саставу детергента и подаци доступни јавности**

#### **Члан 19.**

Листа о саставу детергента намењеног за општу употребу, садржи следеће:

1. назив детергента;
2. податке о произвођачу ( адреса, е-маил, тел.број);

3. податке о свим састојцима детергента, датих по заступљености масеног удела израженог у процентима, од највећег до најмањег, приказаним у следећим опсезима:
- више од 10 % ( $\geq 10\%$ ),
  - од 1 % до 10 % (1-10%),
  - од 0,1 % до 1 % (0,1-1%),
  - мање од 0,1 % ( $< 0,1\%$ ).

Нечистоће се не сматрају састојцима и не наводе се.

За сваки састојак детергента наводи се: хемијски назив или назив према IUPAC номенклатури; CAS број; и ако су доступни назив према номенклатури INCI (Међународна номенклатура козметичких састојака); и назив из европске фармакопеје.

Мириси, етарска уља или агенси за бојење, наводе се као појединачни састојак, а супстанце које улазе у њихов састав не наводе се, осим алергена који улазе у састав мириса, када су присутни у концентрацији већој од 0.01%.

Називи алергена из става 4. овог члана наводе се према прописима којим се уређују козметичка средства.

#### **Члан 20.**

Произвођач детергента који је намењен општој употреби дужан је да на својој интернет страни објави следеће податке из Листе о саставу детергента:

- називе састојака детергента - називи се дају по INCI номенклатури или према Европској фармакопеји, а ако ови називи нису доступни уобичајени хемијски назив или назив према IUPAC номенклатури;

- за мирисе, етарска уља и агенсе за боју дају се подаци из члана 19. став 4. овог правилника.

Интернет страна мора бити доступна јавности и мора се редовно ажурирати.

### **Прелазне и завршне одредбе**

#### **Члан 21.**

Произвођач детергента дужан је да примењује одредбе члана 18. правилника о обележавању детергента, у року од годину дана од дана ступања на снагу овог правилника.

#### **Члан 22.**

Овај Правилник ступа на снагу осмог дана од дана објављивања у „Службеном гласнику Републике Србије”.

Број: 110-00-7/2010-01  
У Београду, 21.маја 2010. године

**Управни одбор Агенције за хемикалије**  
Председник,  
проф. др **Бранимир Јованчићевић**, с.р.

## МЕТОДЕ ИСПИТИВАЊА БИОРАЗГРАДЉИВОСТИ ЗА СУРФАКТАНТЕ У ДЕТЕРГЕНТИМА

### Део 1А. Методе испитивања потпуне аеробне биоразградљивости (минерализације) за сурфактанте у детергентима

**А.** Референтна метода за лабораторијско одређивање потпуне аеробне биоразградљивости сурфактаната усаглашена је са стандардом SRPS EN ISO 14593 (испитивање парне фазе CO<sub>2</sub>).

Ниво потпуне аеробне биоразградљивости одређује се према једној од 5<sup>1</sup> метода које су дате у посебном пропису којим се уређују методе испитивања својства хемикалија, и то:

1. Стандард SRPS EN ISO 14593 - Квалитет воде - Процена потпуне аеробне биоразградљивости органских једињења у воденој средини - Метода одређивања неорганског угљеника у херметичким посудама (испитивање парне фазе CO<sub>2</sub>). Без пред-адаптације. Не примењује се принцип утврђивања биоразградљивости према коме се прати период од 10 дана након достизања 10% разградње (у даљем тексту: десетодневни период)

2. Метода С.4-С. - SRPS EN ISO 9439 - Квалитет воде – Процена потпуне аеробне биоразградљивости органских једињења у воденој средини – Испитивање развијањем угљендиоксида. [Угљендиоксид (CO<sub>2</sub>), Модификовани Стурм тест]: Без пред-адаптације. Не примењује се десетодневни период.]

3. Метода С.4-Е. - SRPS EN ISO 10707- Квалитет воде – Процена потпуне аеробне биоразградљивости органских једињења у воденој средини – Метода одређивања биохемијске потрошње кисеоника (метода затворене боце). Без пред-адаптације. Не примењује се десетодневни период.

4. Метода С.4-Д. - SRPS EN ISO 9408 - Квалитет воде - Процена потпуне аеробне биоразградљивости органских једињења у воденој средини одређивањем потрошње кисеоника у затвореном респирометру. Без пред-адаптације. Не примењује се десетодневни период.

5. Метода С.4-Ф. [МИТИ: Министарство међународне трговине и индустрије – Јапан]: Без пред-адаптације. Не примењује се десетодневни период.

**Б.** У зависности од физичких својстава сурфактаната за одређивање потпуне аеробне биоразградљивости може се применити једна од наведених метода<sup>2</sup> уз одговарајуће образложење. Треба напоменути да критеријум од најмање 70% разградљивости код употребе ових метода треба сматрати еквивалентним критеријуму од најмање 60% разградљивости за референтне методе наведене у тачки А.

<sup>1</sup> ових 5 метода идентификоване су као најподесније за сурфактанте

<sup>2</sup> Методе растворног органског угљеника могу давати променљиве резултате који се не односе само на потпуну биоразградљивост. Метода С.4-Д и Метода С.4-Ф не могу се примењивати за сваки узорак јер велика почетна концентрација може бити инхибирајућа

1. Метода С.4-А.- SRPS EN ISO 7827 - Квалитет воде - Процена „потпуне“ аеробне биоразградљивости органских једињења у воденој средини - Метода одређивања раствореног органског угљеника (DOC). Без пред-адаптације. Не примењује се десетодневни период. Ниво биоразградљивости одређиване овом методом мора бити најмање 70% за 28 дана.

2. Метода С.4-В.- [Модификована OECD метода - Растворни органски угљеник – (до нестајања)]: Без пред-адаптације. Не примењује се десетодневни период. Ниво биоразградљивости одређиване овом методом мора бити најмање 70% за 28 дана.

## **Део 1Б. Методе испитивања примарне биоразградљивости за сурфактанте у детергентима**

Реферетна метода за лабораторијско одређивање примарне биоразградљивости сурфактанта дата је у тачки 1. дела 1 В овог прилога, а усаглашена је са стандардом SRPS EN ISO 11733 Квалитет воде - Одређивање обима елиминације и биоразградљивости органских једињења у воденој средини. Испитивање симулацијом активног муља.

Примарна биоразградљивост мери се одређивањем садржаја преосталог сурфактанта у биоразграђеном ликвору. За сваку врсту сурфактанта примењују се специфичне аналитичке методе и то:

### **а) Аналитичке методе за анјонске сурфактанте**

Анјонски сурфактанти одређују се анализом метиленско плаво активна супстанца (Methylene Blue Active Substance - MBAS). За анјонске сурфактанте који не реагују са MBAS, или када је подесније, у циљу побољшања ефикасности испитивања или добијања прецизнијих података, примењују се одговарајуће специфичне методе инструменталне анализе, као што су високо ефикасна течна хроматографија (high performance liquid chromatography - HPLC) или гасна хроматографија (gas chromatography - GC).

### **б) Аналитичке методе за нејонске сурфактанте**

Нејонски сурфактанти одређују се анализом бизмут активна супстанца (Bismuth Active Substance - BiAS). За нејонске сурфактанте који не реагују са реагенсом BiAS, или када је подесније, у циљу побољшања ефикасности испитивања или добијања прецизнијих података, примењују се одговарајуће специфичне методе инструменталне анализе, као што су високо ефикасна течна хроматографија (high performance liquid chromatography - HPLC) или гасна хроматографија (gas chromatography - GC).

### **в) Аналитичке методе за катјонске сурфактанте**

Катјонски сурфактанти одређују се анализом дисулфинско плаво активна супстанца (Disulfine Blue Active Substance – DBAS). Ова метода дата је у стандарду SRPS H.Z1.308 Квалитет воде – одређивање катјонских сурфактаната мерењем индекса дисулфинског плавог.

За катјонске сурфактанте који не реагују са реагенсом DBAS, или када је подесније, у циљу побољшања ефикасности испитивања или добијања прецизнијих података, примењују се одговарајуће специфичне методе инструменталне анализе, као што су високо ефикасна течна хроматографија (high performance liquid chromatography - HPLC) или гасна хроматографија (gas chromatography - GC).

### **г) Аналитичке методе за амфотерне сурфактанте**

Амфотерни сурфактанти одређују се анализом DBAS када у ликвору нема катјона. Уколико су у ликвору присутни катјони користи се метода Оранж II.

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



## Део 1В. Методе испитивања и аналитичке методе

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

#### 1.1. Увод

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

#### 1.2. Опрема потребна за испитивање

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

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

#### 1.3. Синтетичка отпадна вода

На литар воде са чесме додаје се:

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

Синтетичка отпадна вода мора бити свеже припремљена за сваки експеримент.

#### 1.4. Припрема узорка

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

#### 1.5. Поступак

Напуни се посуда за аерацију (С) и таложник (D) синтетичком отпадном водом. Таложник (D) треба поставити тако да запремина садржаја у посуду (С) износи 3 литра. Инокулира се са 3 ml секундарног ефлуента доброг квалитета, свеже сакупљеног из

постројења за третман претежно комуналне отпадне воде. Ефлуент се, између узорковања и примене, мора чувати под аеробним условима. Након тога активира се синтеровани уводник за ваздух (G), пумпа за аерацију (E) и уређај за дозирање (B). Синтетичка отпадна вода пропушта се кроз посуду за аерацију (C) са протоком од 1 литра по сату тако да је просечно ретенционо време 3 сата. Аерацију треба регулисати тако да се садржај посуде за аерацију (C), константно одржава у суспензији и да садржај раствореног кисеоника буде најмање 2 mg/l. Пенушање садржаја посуде за аерацију (C) се спречава одговарајућим средствима. Не смеју се користити средства против стварања пене која инхибирају активни муљ или садрже сурфактанте. Пумпа за аерацију (E) мора бити подешена тако да се активни муљ из таложника континуално рециклира у посуду за аерацију (C). Муљ који се може сакупљати на врху посуде (C), на дну таложника (D), или било где у процесу циркулације мора бити враћен у циркулацију, најмање једном дневно, четкањем или неким другим одговарајућим средством. Таложјење муља може се побољшати додавањем 2 ml 5% раствора гвожђе(III)-хлорида.

Ефлуент из таложника (D) се сакупља у посуду (F) у току 24 сата. Узорак се узима након доброг мешања. Посуда (F) се мора пажљиво чистити.

### 1.6. Провера мерне опреме

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

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

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

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

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

### 1.7. Израчунавање биоразградљивости

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

Добијене вредности разградње представљају се графички као на Слици 3.

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

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

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

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

## 2. Одређивање анјонских сурфактаната у тестовима биоразградљивости

### 2.1. Увод

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

### 2.2. Реагенси и опрема

Реагенси и опрема који се користе за одређивање анјонских сурфактаната у тестовима биоразградљивости су:

#### 2.2.1. Пуферски раствор рН 10;

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

#### 2.2.2. Неутрални раствор метиленског плавог;

0,350 g метиленског плавог AR раствори се у дејонизованој води и допуни дејонизованом водом до 1000 ml. Раствор се прави најмање 24 сата пре употребе. Апсорбанца слепе хлороформске пробе не сме прелазити 0,015 по 1 cm дебљине слоја на 650 nm.

#### 2.2.3. Кисели раствор метиленског плавог;

0,350 g метиленског плавог раствори се у 500 ml дејонизоване воде и помеша са 6,5 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $d=1,84 \text{ g/ml}$ ) и допуни дејонизованом водом до 1000 ml. Раствор се прави најмање 24 сата пре употребе. Апсорбанца слепе хлороформске пробе не сме прелазити 0,015 по 1cm дебљине слоја на 650 nm.

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

#### 2.2.5. Метил естар додецил бензен сулфонске киселине;

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

#### 2.2.7. Етанол, чист, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ;

#### 2.2.8. Сумпорна киселина, $\text{H}_2\text{SO}_4$ 0,5 M;

2.2.9. Раствор фенолфталеина: 1g фенолфталеина раствори се у 50 ml етанола и дода 50 ml дејонизоване воде уз стално мешање. Настали талог одстрањује се филтрирањем.

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

2.2.11. Левак за одвајање запремине 250 ml;

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

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

2.2.14. рН метар;

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

2.2.16. Квалитативни филтер папир.

### 2.3. Поступак

Узорци за анализу не узимају се из слоја пене.

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

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

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

Алкални и кисели раствори екстрахују се 3 пута, користећи 10 ml хлороформа за другу и трећу екстракцију. Спојени хлороформски екстракти филтрирају се у нормални суд запремине 50 ml кроз исти филтер од памучне вате и разблажују до црте хлороформом коришћеним за испирање филтера. Мери се апсорбанца хлороформског раствора на 650 nm у кивети од 1 cm до 5 cm у односу на хлороформ. Слепа проба се одређује истим поступком.

### 2.4. Калибрациона крива

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

MBAS се израчунава као натријум додецилбензенсулфонат (мол. масе 348).

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

Део овог основног стандардног раствора сурфактанта даље се разблажује. Одмери се 25 ml овог раствора и пребаци у нормалан суд запремине 500 ml, разблажи водом до црте и промеша.

Овај стандардни раствор садржи:

$$\frac{E \times 1,023 \text{ mg MBAS (y ml)}}{20\,000}$$

где је E маса узорка у mg.

За припрему калибрационе криве одмерава се 1 ml, 2 ml, 4 ml, 6 ml, и 8 ml стандардног раствора и разблажи до 100 ml дејонизованом водом. Даље се спроводи поступак дат у тачки 2.3 укључујући и слепу пробу.

## 2.5 Израчунавање резултата

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

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

где је V = запремина коришћеног узорка изражена у ml.

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

## 2.6 Приказивање резултата

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

# 3. Одређивање нејонских сурфактаната у тестовима биоразградљивости

## 3.1. Увод

Сурфактанти се концентрују и изолују екстракцијом уз помоћ гаса.

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

Након фазе одвајања и испаравања раствора нејонски сурфактант таложи се у воденом раствору модификованим Драгендорфовим реагенсом ( $\text{KBiI}_4 + \text{BaCl}_2 +$  глацијална сирћетна киселина).

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

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

## 3.2 Реагенси и опрема

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

Реагенси из става 1. ове тачке су:

- 3.2.1. Етил-ацетат, чист, дестилован непосредно пре употребе;
- 3.2.2. Натријум-бикарбонат,  $\text{NaHCO}_3$  AR;
- 3.2.3. Хлороводична киселина, разблажена (20 ml концентроване киселине (HCl) разблажити водом до 1000 ml);
- 3.2.4. Метанол AR, дестилован непосредно пре употребе, у стакленој боци;
- 3.2.5. Бромкрезол љубичасто, 0,1 g у 100 ml метанола;
- 3.2.6. Средство за таложење:

Средство за таложeње је смеша два запреминска дела раствора А и једног запреминог дела раствора Б. Смеша се чува у тамној боци и може се користити највише месец дана након што се припреми:

#### 3.2.6.1. Раствор А

1,7g бизмут-нитрата,  $\text{BiONO}_3 \times \text{H}_2\text{O}$  AR, раствара се у 20 ml глацијалне сирћетне киселине и допуни водом до 100 ml. Затим се 65 g калијум-јодида AR раствори у 200 ml воде. Ова два раствора помешају се у нормалном суду запремине 1000 ml, дода се 200 ml глацијалне сирћетне киселине (3.2.7) и нормални суд допуни водом до 1000 ml.

#### 3.2.6.2 Раствор Б

290 g баријум-хлорида,  $\text{BaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  AR, раствори се у 1000 ml воде.

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

3.2.8. Раствор амонијум-тартарата:

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

3.2.9. Разблажен раствор амонијака:

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

3.2.10. Стандардни ацетатни пуфер:

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

3.2.11. Раствор пиролидин дитиокарбамата (познат као „карбат раствор“):

103 mg натријум пиролидин дитиокарбамата,  $\text{C}_5\text{H}_8\text{NNaS}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , раствори се у око 500 ml воде, дода се 10 ml n-амил алкохола AR и 0,5 g  $\text{NaHCO}_3$  AR и допуни водом до 1000 ml;

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

##### 3.2.12.1 Основни раствор

Одмери се 1,249 g бакар-сулфата,  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  AR, помеша са 50 ml 0,5 M сумпорне киселине и допуни водом до 1000 ml.

##### 3.2.12.2 Стандардни раствор

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

3.2.13. Натријум-хлорид AR;

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

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

Пречник синтероване плоче мора бити једнак унутрашњем пречнику цилиндра.

3.2.15. Левак за одвајање, 250 ml;

3.2.16. Магнетна мешалица са магнетом 25-30 mm;

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

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

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

3.2.20. Потенциометар који бележи резултате мерења, са уграђеном платинском индикаторском електродом и каломеловом или сребро/сребро-хлорид референтном

електродом, мерног опсега 250 mV, са аутоматском биретом запремине 20-25 ml или одговарајућом ручном опремом.

### 3.3. Поступак

Овај поступак спроводи се у следећим фазама

#### 3.3.1. Концентровање и изоловање сурфактанта

Водени узорак се филтрира кроз квалитативни филтар-папир. Уклони се првих 100 ml филтрата. У опрему за екстракцију уз помоћ гаса, претходно испрану етил- ацетатом, стави се измерена количина узорка која садржи 250-800 µg нејонског сурфактанта.

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

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

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

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

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

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

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

#### 3.3.2. Таложeње и филтрирање

Суви остатак преостао након упаравања раствори се у 5 ml метанола, дода 40 ml воде и 0,5 ml разблажене HCl (3.2.3). Смеша се меша на магнетној мешалици. Мензуром се одмери 30 ml средства за таложeње (3.2.6) и дода том раствору. Талог пада мешањем. Након десет минута мешања, смеша се остави да одстоји најмање пет минута. Смеша се филтрира кроз Гуч филтер чије је дно прекривено филтер-папиром од стаклених влакана. Филтер се испере са приближно 2 ml глацијалне сирћетне киселине под вакуумом. Затим се ерленмајер, магнет и гуч за жарење добро исперу са око 40-50 ml глацијалне сирћетне киселине. Остатак талога на зидовима ерленмајера није потребно потпуно пренети на филтер-папир јер се раствор талога за титрирацију враћа у ерленмајер где се преостали талог раствара.

#### 3.3.3. Растварање талога

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

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

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

#### 3.3.4. Титрација

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

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

Завршна тачка титрације је пресек тангенти две гране потенциометријске криве. Повремено се може приметити смањење закривљености потенцијометријске криве што се може отклонити пажљивим чишћењем (папиром за брушење) платинске електроде.

#### 3.3.5. Слепа проба

Од фазе таложења и филтрирања (3.3.2) истовремено према истом поступку се ради слепа проба са 5 ml метанола и 40 ml воде. Запремина стандардног раствора пиридин дитиокарбамата (3.2.11) утрошена за титрацију слепе пробе треба да буде мања од 1ml. Уколико је ова запремина већа реагенси (3.2.3, 3.2.7, 3.2.8, 3.2.9, 3.2.10.) нису адекватне чистоће, посебно им је повећан садржај тешких метала. Ови реагенси морају се заменити. Слепа проба се мора узети у обзир при израчунавању резултата.

#### 3.3.6. Провера фактора стандардног раствора пиридин дитиокарбамата

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

Ако је употребљена количина стандардног раствора пиридин дитиокарбамата „a” ml, фактор „f” износи:  $f = 10/a$ , и сви резултати титрације множе се тим фактором.

### 3.4. Израчунавање резултата

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

Применом овог фактора рачуна се количина сурфактанта садржаног у узорку, изражена у mg еквивалента NP 10:

$$(b-c) \times f \times 0,054 = \text{mg нејонског сурфактанта као NP 10}$$

при чему су:

b - запремина стандардног раствора пиридин дитиокарбамата употребљена за титрацију узорка (ml),

c - запремина стандардног раствора пиридин дитиокарбамата употребљена за титрацију слепе пробе (ml),

f - фактор стандардног раствора пиридин дитиокарбамата.



### 3.5. Изражавање резултата

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

## 4. Припрема анјонских сурфактаната које треба испитати

### 4.1 Увод

#### 4.1.1. Обрада узорака

Анјонски сурфактанти и детергенти пре одређивања примарне биоразградљивости обрађују се на следећи начин:

Производи	Обрада
анјонски сурфактанти	не обрађују се
детергенти који садрже сурфактанте	алкохолна екстракција, затим изоловање анјонских сурфактанта јонском изменом

Сврха алкохолне екстракције је уклањање нерастворних и неорганских састојака детергента какав се ставља на тржиште а који могу утицати на одређивање биоразградљивости.

#### 4.1.2. Поступак јонске измене

Због правилног одређивања биоразградљивости потребно је изоловати и одвојити анјонске сурфактанте од сапуна, нејонских и катјонских сурфактаната. То се постиже техником јонске измене уз употребу макропорозне јоноизмењивачке смоле и одговарајућих елуената за фракционо елуирање. Овим поступком сапуни, анјонски и нејонски сурфактанти изолују се одједном.

#### 4.1.3. Аналитичка контрола

Концентрација анјонских сурфактаната у синтетичким детергентима одређује се након хомогенизовања, аналитичком методом за MBAS. Садржај сапуна одређује се одговарајућом аналитичком методом. Ова анализа служи за израчунавање потребних количина за припрему фракција за испитивање биоразградљивости.

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

### 4.2. Принцип методе

Из хомогеног узорка (прашка, остатка након сушења детергената који су у облику пасте или течности) добија се етанолни екстракт који садржи сурфактанте, сапун и друге састојке узорка синтетичког детергента растворне у алкохолу. Етанолни екстракт се упарава до сувог остатка који се раствори у смеси изопропанол/вода, а добијени раствор, загрејан на 50 °C, пропусти се кроз комбинацију веома киселог катјонског јоноизмењивача и макропорозног анјонског јоноизмењивача. Ова температура је потребна да би се спречило таложње масних киселина које се могу појавити у киселој средини. Сви нејонски сурфактанти остају у ефлуенту. Масне киселине сапуна одвајају се екстракцијом етанолом који садржи CO<sub>2</sub>. Анјонски сурфактанти се затим добијају у облику амонијумове соли, елуирањем помоћу раствора амонијум-бикарбоната у смеси изопропанола и воде. Добијене

амонијумове соли се користе за испитивање биоразградљивости. Катјонски сурфактанти који могу утицати на испитивање биоразградљивости, уклањају се помоћу катјонског јоноизмењивача постављеног изнад ањонског јоноизмењивача.

### 4.3. Реагенси и опрема

Реагенси и опрема који се користе за припремну обраду ањонских сурфактаната у тестовима биоразградљивости су:

4.3.1. Дејонизована вода;

4.3.2. Етанол, 95%(v/v)  $C_2H_5OH$  (средства која се могу користити за денатурацију су метилетилкетон или метанол);

4.3.3. Смеша изопропанол/вода (50/50 v/v):

- 50 запреминских делова изопропанола,  $CH_3CHONCH_3$ , и
- 50 запреминских делова воде (4.3.1);

4.3.4. Раствор угљен диоксида у етанолу (око 0,1%  $CO_2$ ):

Угљен диоксид ( $CO_2$ ) се десет минута пропушта кроз етанол (4.3.2), помоћу доводне цеви са уграђеним синтерованим стаклом; Овај раствор користи се само свеже припремљен;

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

0,3 mol  $NH_4HCO_3$  раствори се у 1000 ml смеше изопропанол/вода која се састоји од 60 запреминских делова изопропанола и 40 запреминских делова воде (4.3.1);

4.3.6. Катјонски јоноизмењивач (КАТ):

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

4.3.7. Ањонски јоноизмењивач (ААТ):

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

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

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

4.3.10. Усисни (вакуум) филтер (који се може загревати) пречника 90 mm за филтер-папир;

4.3.11. Вакуум боца запремине 2000 ml;

4.3.12. Колоне за јонску измену са облогом за загревање и славином:

унутрашња цев пречника 60 mm, висине 450 mm ( Слика 4.);

4.3.13. Водено купатило;

4.3.14. Вакуум сушница;

4.3.15. Термостат;

4.3.16. Ротациони вакуум упаривач.

### 4.4. Припрема екстракта и изоловање ањонских активних агенаса

4.4.1 Припрема екстракта

Потребна количина сурфактаната за испитивање биоразградљивости износи 50g MBAS.

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

Назначене количине јоноизмењивача предвиђене су за 600-700 mmola сурфактаната и сапуна.

#### 4.4.2 Изоловање састојака растворних у алкохолу

У 1250 ml етанола, дода се 250 g синтетичког детергента који треба анализирати, смеша се загреје до тачке кључања и рефлукује сат времена уз мешање. Овај алкохолни раствор се, док је још врућ, брзо филтрира кроз вакуум филтер са широким порама загрејан на 50 °C. Балон и вакуум филтер испирају се са 200 ml врућег етанола. Филтрат и течност од испирања сакупља се у вакуум боцу.

Ако се анализирају пасте или течни детергенти, узорак не треба да садржи више од 55g анјонског сурфактанта и 35 g сапуна. Одмерени узорак упари се до сува. Суви остатак раствори се у 2000 ml етанола и настави се по горе описаном поступку.

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

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

#### 4.4.3. Припрема колона за јонску измену:

##### Колона за катјонску измену

600 ml смоле за катјонску измену (4.3.6) стави се у боцу запремине 3000 ml и прелије са 2000 ml хлороводичне киселине (4.3.8). Остави се да одстоји најмање два сата уз повремено мешање.

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

##### Колона за анјонску измену

600 ml смоле за анјонску измену (4.3.7) стави се у боцу запремине 3000 ml и прелије са 2000 ml дејонизоване воде.

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

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

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

#### 4.4.4. Поступак јонске измене

Јоноизмењивачке колоне се поставе тако да се колона за катјонску измену налази изнад колоне за анјонску измену. Јоноизмењивачке колоне се загреју на 50 °C што се регулише термостатом.

5000 ml раствора добијеног по поступку из тачке 4.4.2. загреје се на 60 °C и пропусти кроз јоноизмењивачке колоне уз проток од 20 ml/min. Колоне се елуирају са 1000 ml вруће смеше изопропанол/вода (4.3.3).

За добијање анјонских сурфактаната (MBAS) катјонска јоноизмењивачка колона КАТ се одвоји. Помоћу 5000 ml раствора етанол/CO<sub>2</sub> при 50 °C (4.3.4) елуирају се масне киселине сапуна из катјонске јоноизмењивачке колоне. Елуат се баци. Затим се MBAS елуирају из анјонске јоноизмењивачке колоне ААТ помоћу 5000ml раствора амонијум-бикарбоната (4.3.5.). Добијени елуат упари се на воденом купатилу или у ротационом вакуум упаривачу до сувог остатка. Суви остатак садржи MBAS (у облику амонијум соли), а може да садржи и

анјонске супстанце које нису сурфактанти и који не утичу на одређивање биоразградљивости. Овом остатку додаје се дејонизована вода до дефинисане запремине и одреди садржај MBAS у аликвоту. Раствор се користи као стандардни раствор анјонских синтетичких детергената за одређивање биоразградљивости. Раствор треба чувати на температури нижој од 5 °C.

#### 4.4.5 Регенерација јоноизмењивачких смола

Катјонски измењивач се након употребе баца.

Смола за анјонску измену регенерише се елуирањем раствором амонијум-бикарбоната (4.3.5) уз проток од око 10 ml/min све док у елуату више не буде анјонских сурфактаната (тест с метиленским плавим). Затим се анјонски измењивач елуира са 2000 ml смеше изопропанол/вода (4.3.3) и тада је опет спреман за употребу.

## 5. Припрема нејонских сурфактаната које треба испитати

### 5.1. Обрада узорака

5.1.1 Нејонски сурфактанти и детергенти пре одређивања примарне биоразградљивости обрађују се на следећи начин:

Производи	Обрада
нејонски сурфактанти	не обрађују се
детергенти који садрже сурфактанте	алкохолна екстракција, затим изоловање нејонских сурфактанта јонском изменом

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

#### 5.1.2 Поступак јонске измене

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

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

#### 5.1.3 Аналитичка контрола

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

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

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

## 5.2. Принцип методе

Из хомогеног узорка (прашка, остатка након сушења детергената који су у облику пасте или течности) добија се етанолни екстракт који садржи сурфактанте, сапун и друге састојке узорка синтетичког детергента растворне у алкохолу. Етанолни екстракт се упарава до сувог остатка који се раствори у смеси изопропанол/вода, а добијени раствор, загрејан на 50 °С, пропусти кроз комбинацију веома киселог катјонског јоноизмењивача и макропорозног ањонског јоноизмењивача. Ова температура је потребна да би се спречило таложење масних киселина које се могу појавити у киселој средини. Нејонски сурфактанти добију се упаравањем отпадног раствора. Катјонски сурфактанти који могу утицати на испитивање биоразградљивости и аналитички поступак, уклањају се помоћу катјонског јоноизмењивача постављеног изнад ањонског јоноизмењивача.

## 5.3. Реагенси и опрема

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

5.3.1. Дејонизована вода;

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

5.3.3. Смеша изопропанол/вода (50/50 v/v):

– 50 запреминских делова изопропанола, CH<sub>3</sub>CHOHCH<sub>3</sub>, и

– 50 запреминских делова воде (5.3.1);

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

0,3 мол NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> раствори се у 1000 ml смеше изопропанол/вода која се састоји од 60 запреминских делова изопропанола и 40 запреминских делова воде (5.3.1);

5.3.5. Катјонски јоноизмењивач (КАТ):

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

5.3.6. Ањонски јоноизмењивач (ААТ):

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

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

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

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

5.3.10. Вакуум боца запремине 2000ml

5.3.11. Колоне за јонску измену са облогом за загревање и славином:

унутрашња цев пречника 60 mm, висине 450 mm ( Слика 4.);

5.3.12. Водено купатило;

5.3.13. Вакуум сушница;

5.3.14. Термостат;

5.3.15. Ротациони вакуум упаривач.

## 5.4. Припрема екстракта и изоловање нејонски активних агенаса

### 5.4.1. Припрема екстракта

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

Количина производа потребна за припрему екстракта за одређивање биоразградљивости не треба да буде већа од 2000 g. Понекад је потребно поновити поступак

два или више пута да би се добила довољна количина супстанце за одређивање биоразградљивости. Искуство је показало да боље резултате даје вишеструка екстракција са мањим количинама него једна екстракција са већом количином растварача.

#### 5.4.2 Изоловање састојака растворних у алкохолу

У 1250 ml етанола дода се 250 g синтетичког детергента који треба анализирати, смеша загреје до тачке кључања и рефлукује сат времена уз мешање. Врућ алкохолни раствор се брзо филтрира кроз вакуум филтер са широким порама загрејан на 50 °C. Балон и вакуум филтер исперу се са 200 ml врућег етанола. Филтрат и течност од испирања сакупљају се у вакуум боцу.

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

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

#### 5.4.3 Припрема колона за јонску измену:

##### Колона за катјонску измену

600 ml смоле за катјонску измену (5.3.5) стави се у боцу запремине 3000 ml и прелити са 2000 ml хлороводичне киселине (5.3.7). Остави се да одстоји најмање два сата уз повремено мешање.

Након тога киселина се одлије и смола, помоћу дејонизоване воде, пребаци у колону (5.3.12) у коју је претходно стављен комадић стаклене вуне. Елуирати колону дејонизованом водом са протоком од 10-30ml/min. све док у елуату више не буде хлорида. Након тога елуира се са 2000 ml смеше изопропанол/вода (5.3.3), чији је проток од 10-30ml/min. Овако припремљена колона је спремна за коришћење.

##### Колона за анјонску измену

600ml смоле за анјонску измену (5.3.6) стави се у боцу и прелити са 2000ml дејонизоване воде.

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

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

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

#### 5.4.4. Поступак јонске измене

Јоноизмењивачке колоне се поставе тако да се колона за катјонску измену налази изнад колоне за анјонску измену. Јоноизмењивачке колоне се загреју на 50 °C што се регулише термостатом.

5000 ml раствора добијеног по поступку из тачке 5.4.2. загреје се на 60 °C и пропусти се раствор кроз јоноизмењивачке колоне уз проток од 20 ml/min. Колоне се елуирају са 1000 ml вруће смеше изопропанол/вода (5.3.3).

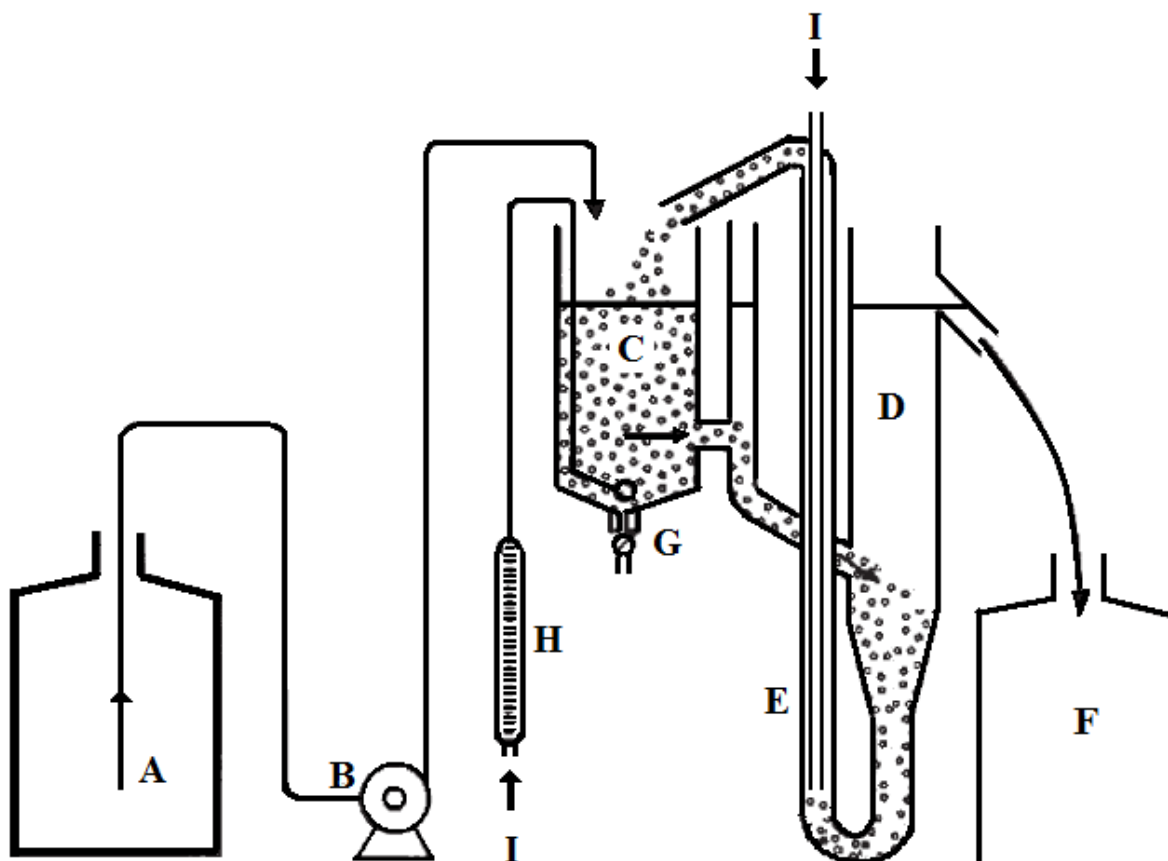
За добијање нејонских сурфактаната прикупи се филтрат и раствор од испирања филтера, и на ротационом вакуум упаривачу упари до сувог. Суви остатак садржи BiAS.

Овом раствору додаје се дејонизована вода до дефинисане запремине и одреди садржај ВiAS у аликвоту. Раствор се користи као стандардни раствор нејонских сурфактаната за одређивање биораградљивости. Раствор треба чувати на температури нижој од 5 °C.

#### 5.4.5. Регенерација јоноизмењивачких смола

Катјонски измењивач се након употребе баца.

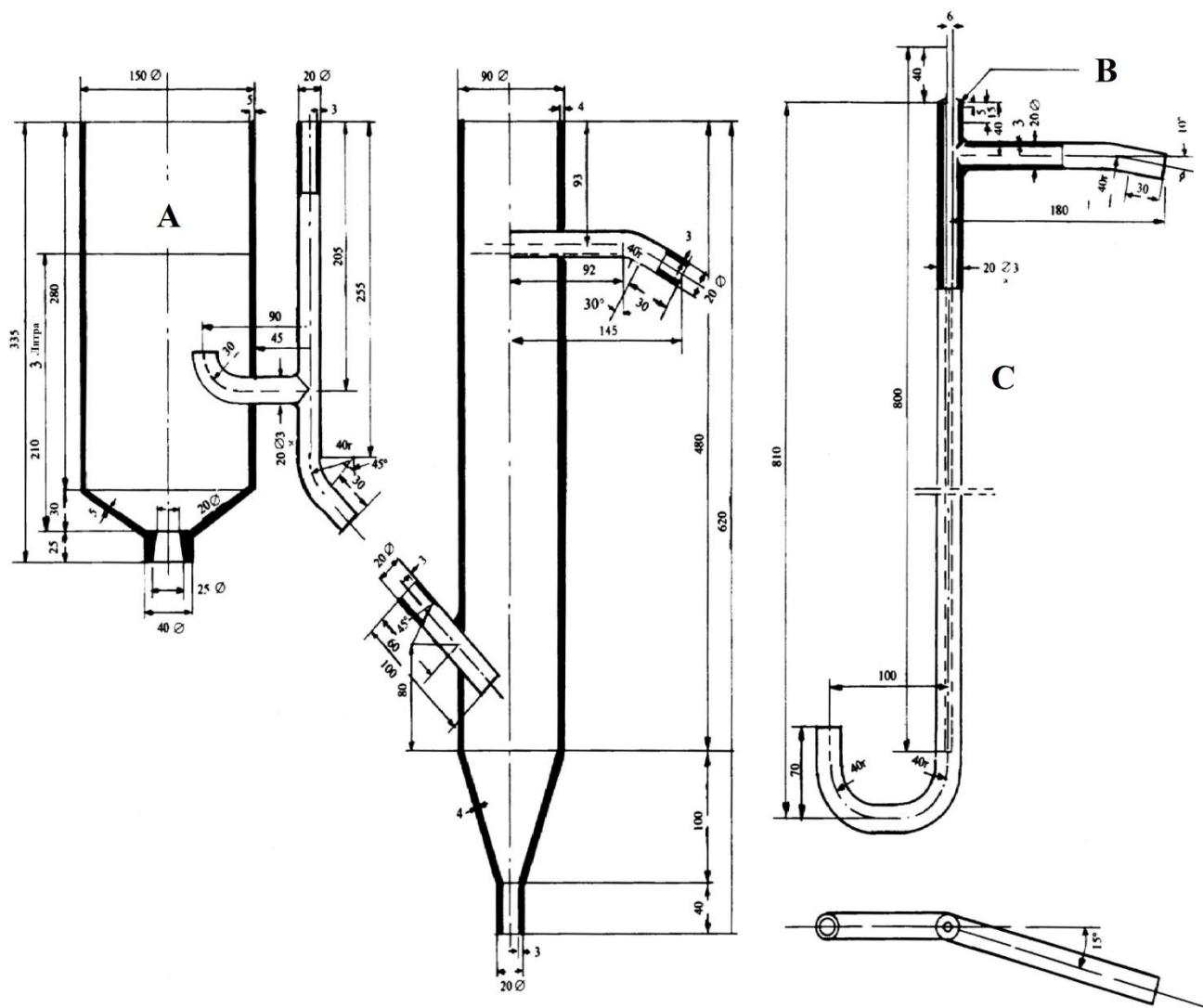
Смола за анјонску измену регенерише се елуирањем са око 5000 ml - 6000 ml раствора амонијум-бикарбоната (5.3.4) уз проток од око 10 ml/min све док у елуату више не буде анјонских сурфактаната (тест с метиленским плавим). Затим се анјонски измењивач елуира са 2000 ml смеше изопропанол/вода (5.3.3) и тада је опет спреман за употребу.



**Слика 1. -Постројење са активним муљем – шематски приказ**

- A - Посуда за чување синтетичке отпадне воде
- B - Уређај за дозирање
- C - Посуда за аерацију
- D - Таложник
- E - Пумпа за аерацију
- F - Посуда за сакупљање третираног ефлуента
- G - Синтеровани уводник за ваздух
- H - Мерач протока ваздуха
- I - Ваздух



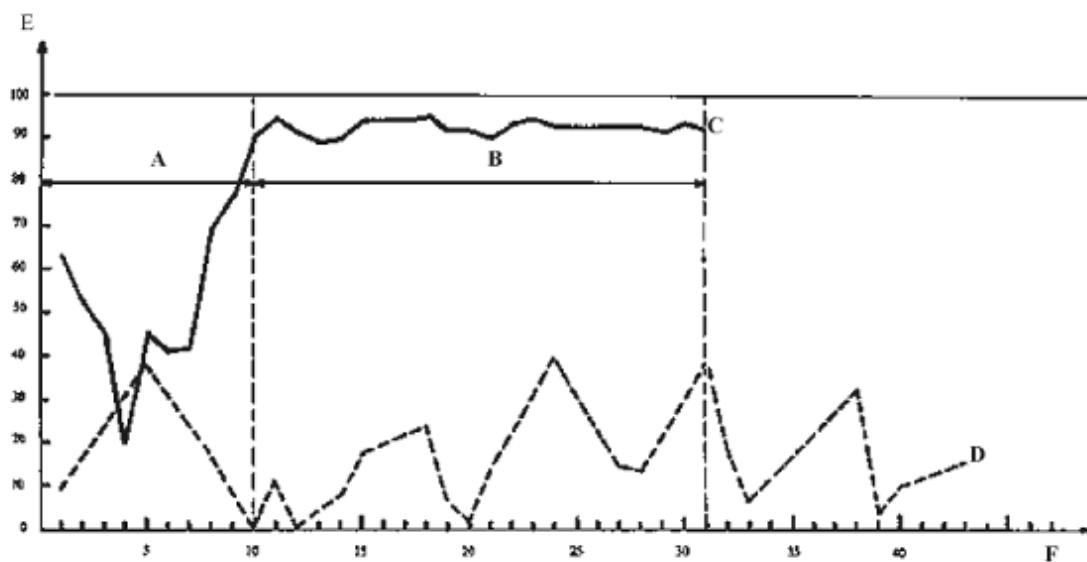


Слика 2. -Уређај са активним муљем: детаљан приказ

A - Ниво течности

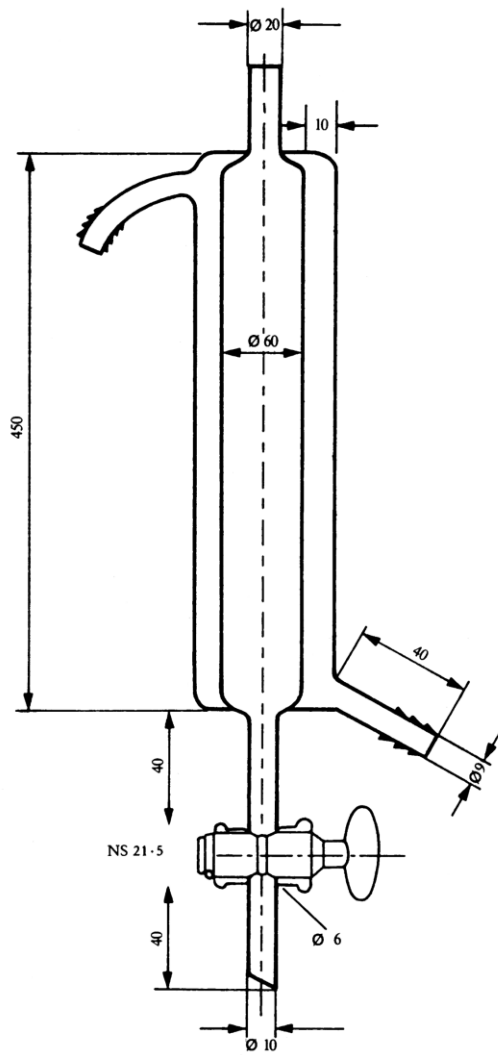
B - Тврди PVC

C - Стакло или водоотпорни пластични материјал (тврди PVC)

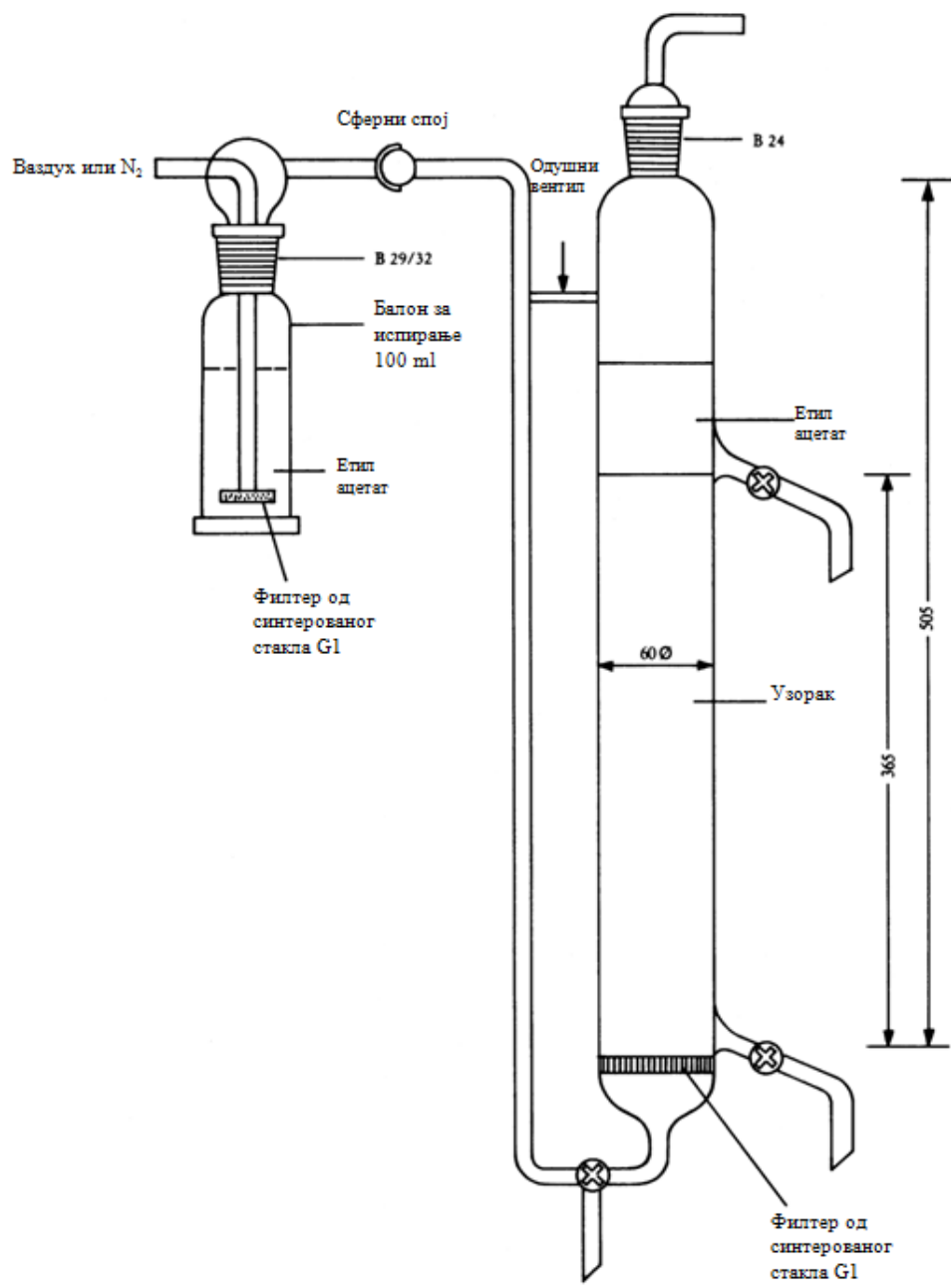


**Слика 3.- Одређивање биоразградљивости – тест за доказивање**

- A - Период увођења и прилагођавања
- B - Период одређивања биоразградљивости (двадесет и један дан)
- C - Лако биоразградљив сурфактант
- D - Тешко биоразградљив сурфактант
- E - Биоразградљивост (%)
- F - Време (број дана)



Слика 4.- Колона за јонску измену са облогом за загревање



Слика 5.- Опрема за екстракцију уз помоћ гаса

## НАЧИН ОБЕЛЕЖАВАЊА ДЕТЕРГЕНТА

### Део 1А. Састав детергента

Састав детергента мора бити назначен на етикети, односно амбалажи тако што се наводи сваки састојак детергента чија је концентрација већа од 0,2 %, и то навођењем опсега масеног удела тог састојка израженог у процентима и то:

- мање од 5 % (<5%)
- од 5 % до 15 % (5-15%)
- од 15 % од 30 % (15-30%)
- 30 % и више.

Правило из става 1. овог прилога примењује се на следеће супстанце :

- фосфати,
- фосфонати (фосфити),
- анјонски сурфактанти,
- катјонски сурфактанти,
- амфотерни сурфактанти,
- нејонски сурфактанти,
- избељивачи на бази кисеоника,
- избељивачи на бази хлора,
- ЕДТА и њене соли,
- НТА (нитрило трисирћетна киселина) и њене соли,
- феноли и халогеновани деривати фенола,
- *p*-дихлорбензен,
- ароматични угљоводоници,
- алифатични угљоводоници,
- халогеновани угљоводоници,
- сапун,
- зеолити,
- поликарбоксилати.

Састојци детергента који се морају навести на етикети, односно амбалажи без обзира на њихову концентрацију су:

- ензими,
- дезинфицијенси,
- оптичка белила,
- мириси,
- конзерванси.

Алергени као састојци мириса наводе на етикети односно амбалажи детергента ако су додати у концентрацијама које прелазе 0,01 % а назив алергена наводи се у складу са прописом којим се уређују козметички производи

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

## Део 1Б. Информације и напомене о дозирању

На етикети, односно амбалажи детергента за општу употребу намењеног за прање веша наводе се следеће информације и напомене:

- препоручене количине и/или упутства у којима су наведене дозе изражене у милилитрима или грамима потребним за стандардно пуњење у машинама за прање веша, за меку, средње тврду и тврду категорију воде и са подацима за један или два циклуса прања;
- за универзалне детергенте - број стандардних пуњења у машинама за прање веша за средње запрљан веш;
- за детергенте са специфичном наменом за осетљиве тканине - број стандардних пуњења у машинама за прање веша за средње запрљан веш који се може опрати садржајем паковања уз употребу воде средње тврдоће ( $2,5\text{mmol CaCO}_3/\text{l}$ );
- ако се у паковању налази мерна посуда - њена запремина се наводи у милилитрима или грамима, а та посуда мора имати ознаке за одређивање дозе детергента за стандардно пуњење у машинама за прање веша за меку, средње тврду и тврду категорију воде.

Стандардно пуњење у машинама за прање веша износи 4,5 kg сувог веша за универзалне детергенте и 2,5 kg сувог веша за детергенте са специфичном наменом. Детергент се сматра универзалним детергентом, осим ако произвођач препоручи потребну негу тканине, тј. прање на ниској температури, прање осетљивих тканина и прање обојених тканина.