

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Antonija Glavač

**Ultrazvučna i toplinska stabilnost euromarkera Solvent Yellow
124 i procjena toksičnosti razgradnih produkata**

Zagreb, travanj 2017.

Ovaj rad izrađen je pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Dragane Mutavdžić Pavlović sa Zavoda za analitičku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2016./2017.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Bojila	3
2.1.1. Podjela bojila	6
2.2. Azo bojila	9
2.2.1. Priprava azo bojila	10
2.2.2. Toksičnost azo bojila i njihov utjecaj na okoliš	12
2.2.2.1. Toksičnost razgradnih produkata azo bojila	16
2.3. Solvent Yellow 124 kao euromarker	19
2.3.1. „Pranje“ goriva	22
2.4. Obrada otpadnih voda	25
2.4.1. Postupci obrade s kemijskim promjenama sastojaka	27
2.4.1.1. Dezinfekcija klorom i njegovim derivatima	27
2.4.1.1.1. NaDCC	28
2.4.2. Napredni oksidacijski procesi	30
2.4.2.1. Ultrazvuk	30
2.4.2.1.1. Kavitacija u homogenim tekućinama	32
2.5. Metode analize	33
2.5.1. Plinska kromatografija	33
2.5.1.1. Pirolitička plinska kromatografija sa spektrometrijom masa	35
2.5.2. Tekućinska kromatografija	37
3. EKSPERIMENTALNI DIO	40
3.1. Materijali	40
3.1.1. Kemikalije	40
3.1.2. Solvent Yellow 124	41
3.2. Instrumenti	42
3.2.1. Analitička vaga	42
3.2.2. Plinski kromatograf sa spektrometrom masa	43
3.2.3. Pirolitički plinski kromatograf sa spektrometrom masa	44
3.2.4. Tekućinski kromatograf vezan s tandemnim spektrometrom masa	45
3.2.5. Ultrazvuk	46
3.3. Opis rada	47

3.3.1. Priprema standardnih otopina.....	47
3.3.2. Analiza uzoraka pirolitičkom plinskom kromatografijom sa spektrometrijom masa.....	48
3.3.3. Ultrazvuk.....	49
3.3.4. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom vezanom s tandemnom spektrometrijom masa	52
3.3.5. Analiza uzoraka plinskom kromatografijom sa spektrometrijom masa.....	53
4. REZULTATI I RASPRAVA	54
4.1. Rezultati pirolitičke razgradnje	54
4.1.1. Procjena toksičnosti nastalih produkata pirolitičke razgradnje.....	62
4.2. Rezultati oksidacijske razgradnje u vodenom mediju.....	67
4.2.1. Razgradnja pomoću ultrazvuka visoke snage	71
4.2.2. Razgradnja oksidacijom uz NaDCC	76
4.2.3. Razgradnja kombinacijom oksidacijskih procesa (UZV/NaDCC.....	83
4.2.4. Razgradnja u vodenom mediju - osvrt na dobivene rezultate	90
4.2.5. Procjena toksičnosti nastalih produkata oksidacijske razgradnje	93
5. ZAKLJUČAK	95
6. ZAHVALA	98
7. LITERATURA.....	99
8. SAŽETAK	104
9. SUMMARY	105
10. ŽIVOTOPIS	106

1. UVOD

Mnoge države primjenjuju različitu razinu poreza na dizelsko gorivo ovisno o njegovoj upotrebi. Razlikujemo goriva koja se primjenjuju za prijevozna sredstva te goriva za grijanje i pogon poljoprivrednih strojeva. Cijena goriva ovisit će o lokalnim propisima kojima je određena visina poreza. Cijena dizela koji se koristi za pogon automobila veća je za 3 kn/L u odnosu na plavi dizel koji se koristi u poljoprivredne svrhe i za koji nije potrebno plaćati porez. Iz tog razloga ne čudi da se ta situacija nastoji zloupotrijebiti. Uklanjanje obojenja i markera koje omogućuje razlikovanje goriva različitih poreznih razreda naziva se „pranjem“ goriva. To je česta praksa u svijetu kao i u Hrvatskoj što nas je potaknulo da se bolje upoznamo s tim problemom. U postrojenjima za „pranje“ goriva koriste se različite metode za uklanjanje obojenja i markera kako bi se ono korisnicima ilegalno prodalo po višoj cijeni.

Najčešće upotrebljavani marker u gorivima je bojilo C.I. Solvent Yellow 124 (SY124), čija je primjena propisana od strane Europske komisije. To je žuta monoazo boja koja nije vidljiva golim okom, već tek kad je ekstrahirana iz goriva klorovodičnom ili sulfatnom kiselinom pri čemu poprima ružičastu boju. Upravo su azo bojila najčešća zagađivala u industriji bojila i izrazito su opasna jer su sintetizirana tako da budu postojana na svjetlost, mikrobiološko i kemijsko djelovanje te su sklona nakupljanju u prirodi. Mnogi spojevi, sa strukturom sličnom kao što je ona SY124, su kancerogeni. Još veću opasnost predstavljaju aromatski amini i supstituirani azobenzeni koji nastaju njegovom razgradnjom. Upravo je to razlog, uz to što je najprimjenjiviji marker u gorivima, da smo ispitivali baš njegova svojstva i razgradne produkte.

Ilegalno „pranje“ goriva donosi znatne prihode onima koji se time bave, a država se tako oštećuje za milijunske iznose. Također, krajnji korisnici mogu pretrpjeti znatnu materijalnu štetu ukoliko je takvo gorivo loše kvalitete, a nepravilno zbrinut otpad koji je zaostao nakon „pranja“ može predstavljati ozbiljan ekološki i zdravstveni problem. Naime, odgovorni za „pranje“ goriva su kriminalci koji nemaju namjeru snositi troškove niti riskirati uhićenje prilikom pravilnog odlaganja zaostalog otpada. Na taj način znatne količine tekućeg, kiselog ostatka goriva dospijevaju u okoliš. Takva nagrizajuća kisela tekućina, koja sadrži različite ugljikovodike i dodatke gorivima može dospjeti u pitku vodu nagrivanjem cjevovoda, kao i u mora/rijeke/jezera prilikom čega ugrožava biljni i životinjski svijet.

Ne postoje nikakvi dostupni podaci o svojstvima, kao ni o ponašanju SY124 u prirodi. Pirolitičkom razgradnjom markera dobiveni su njegovi mogući razgradni produkti pri različitim temperaturama čime se željela dokazati visoka toksičnost nastalih produkata u odnosu na izvornu molekulu. Ispitano je njegovo uklanjanje iz vodenog medija pomoću

ultrazvuka visoke snage, kao jednom od metoda za obradu otpadnih voda, pri čemu su pripremljene otopine simulirale vodenu sredinu u kojoj se može naći SY124 nakon što nekontrolirano dospije u okoliš. Dobiveni uzorci analizirani su plinskom kromatografijom vezanom sa spektrometrom masa (GC-MS) te tekućinskom kromatografijom s tandemnim spektrometrom masa (LC-MS/MS).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Bojila

Boja je osjetilni doživljaj koji nastaje kada svjetlost karakterističnog spektra pobudi receptore u mrežnici oka, a prikazuje nam se u bezbroj različitih oblika i pojava. Prostim okom čovjek može raspoznati barem 2000 različitih nijansi, a kombinacija različitih boja stvara nam cjelovitu sliku i sinergiju prostora. Činjenica je da oko 87 % ukupnih osjetilnih dojmova dobijemo kroz svijet boja. Čovjek koristi boje još od davnina i preko njih izražava samoga sebe [1]. Tako su već stari Egipćani upotrebljavali cinober i željezni oksid kao crvenu boje, čađu kao crnu boju, a skupocjenu purpurnu boju vadili su iz nekih puževa [2].

Bojila su tvari koje apsorbiraju svjetlost u vidljivom dijelu spektra te su zbog toga obojene, a imaju sposobnost bojenja tekstilnih vlakana i drugih materijala vežući se na njih fizikalnim silama ili stvaranjem kemijskih veza. Neka tvar će biti obojena ako selektivno apsorbira vidljivo svjetlo, odnosno ako apsorbira elektromagnetsko zračenje određenih valnih duljina od 380 do 750 nm, a propušta ili reflektira elektromagnetsko zračenje ostalih valnih duljina u spektru (Tablica 2.1) [3, 4].

Tablica 2.1. Odnos između valnih duljina apsorbiranog svjetla i tona boje (komplementarni odnos) [4]

λ (nm)	Apsorbirana boja svjetla	Reflektirana boja svjetla
380-430	Ljubičasta	Zelena-žuta
430-480	Plava	Žuta
480-490	Zelena-plava	Narančasta
490-510	Plavo-zelena	Crvena
510-540	Zelena	Crveno-ljubičasta
540-570	Žuto-zelena	Ljubičasta
570-580	Žuta	Plava
580-600	Narančasta	Zelena-plava
600-680	Crvena	Plavo-zelena
680-700	Crveno-ljubičasta	zelena

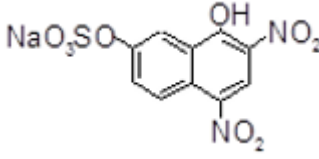
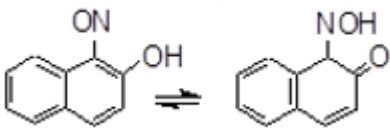
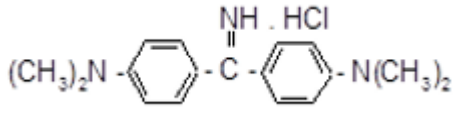
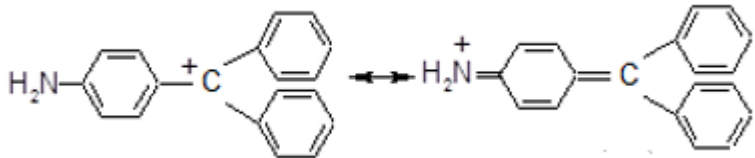
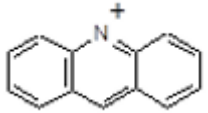
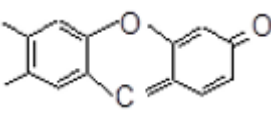
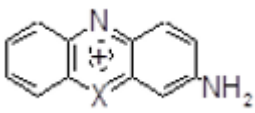
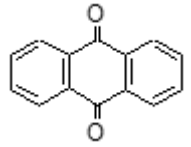
Zajedničko kemijsko svojstvo svih tvari koje pokazuju obojenost je nezasićenost veza u strukturi njihove molekule. Jednu od najranijih teorija o vezi konstitucije bojila i boje iznio je 1876. godine O. Witt. Prema toj teoriji, koja vrijedi još i danas, obojenost ovisi o broju i razmještaju dvostrukih veza i kromofora tj. o kemijskoj strukturi molekule. Naime, takve

skupine atoma koje uzrokuju apsorpciju svjetla u navedenom području te boju organskih spojeva Witt je nazvao kromofornim skupinama. Najvažnije kromoforne skupine prikazane su na Slici 2.1. Kromoforne skupine sadržavaju dvostruke i trostruke veze, što znači da su obojene tvari uvijek nezasićeni spojevi. Molekula nekog organskog spoja, da bi on bio obojen, mora sadržavati određeni broj kromofora povezanih međusobno tako da su im dvostruke veze konjugirane. Takav kemijski spoj koji sadrži samo kromofornu skupinu i sustav dvostrukih konjugiranih veza naziva se kromogen. To još uvijek nije bojilo u tehničkom smislu jer ne sadrži afinitet prema tekstilnom ili drugom materijalu. Ako se u sustav uvede auksokromna skupina, kromogen postaje tehničko bojilo jer zadobiva afinitet prema tekstilnom ili drugom materijalu što se postiže uvođenjem auksokromnih skupina u kromogen. Auksokromne skupine su, kako je Witt pokazao, one funkcionalne skupine koje mogu tvoriti soli, kao npr. $-\text{NH}_2$, $-\text{NHR}$, $-\text{NR}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, SO_3H , gdje je R alkilni ili arilni ostatak. Takve skupine ne mogu same po sebi uvjetovati obojenost, ali mogu izazvati obojenost bezbojnog kromogena ili produbiti obojenost nekog obojenog spoja. Neke skupine kao što su karboksilna ($-\text{COOH}$) i sulfonska ($-\text{SO}_3\text{H}$) mogu povećati topljivost bojila u vodi. Auksokromna skupina djeluje na dva načina: uzrokuje batokromni pomak u vidljivom dijelu spektra (mijenjanje nijanse bojila od žute preko narančaste sve do zelene) te primjenska svojstva bojila pri vezanju na različite materijale kao što su koža, papir, tekstil i sl. [5, 6]. Pomak apsorpcije prema većim valnim duljinama (batokromni pomak) uzrokovan je povećanjem broja aromatskih prstenova u spoju, a osim toga na valnu duljinu apsorpcije utječu i supstituenti, bez obzira jesu li elektron donori ili elektron akceptori [7].

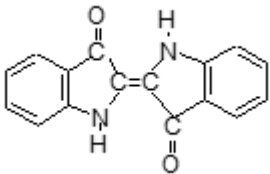
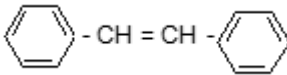
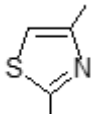
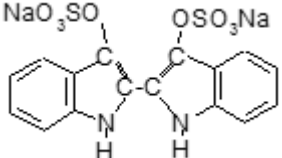
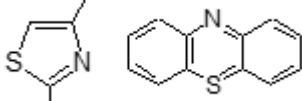
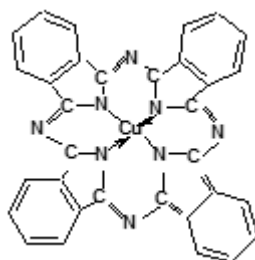
2.1.1. Podjela bojila

Prema podrijetlu boje se dijele na prirodne i sintetske no danas je ta podjela potpuno neodgovarajuća jer se gotovo sve prirodne boje mogu sintetizirati. Ova se podjela nadalje temelji na kemijskoj strukturi te području i metodama primjene, a uvrštena je u indeks boja (engl. *Colour Index* (C.I.)). U indeksu boja bojila i pigmenti su označeni dvjema oznakama. Prva oznaka odnosi se na područje primjene i način bojenja te se naziva C.I. generičko ime (npr. C.I. Solvent Yellow 124), dok se druga oznaka odnosi na strukturu bojila, topljivost i podatke o sintezi, a naziva se C.I. konstitucijski broj (npr. C.I. 111155) [9]. U indeksu boja je registrirano oko 8000 bojila koja uz generička imaju i više od 4000 komercijalnih imena (npr. Sudan 455 ili Somalia Yellow LBN ili T10 Yellow) [5]. Sintetska bojila proizvode se kemijskom sintezom zbog čega im je cijena znatno manja u odnosu na prirodna bojila, a osim toga su kemijski stabilnija i imaju veću učinkovitost bojenja [10]. Podjela sintetskih bojila moguća je prema kemijskoj klasifikaciji koja uključuje konstituciju, kromoforne grupe i postupak dobivanja, te prema svojstvima bojenja, odnosno prema mogućnostima primjene. U Tablici 2.2 dana je podjela bojila prema kemijskoj strukturi odnosno prema strukturi osnovnog kromofora ili funkcionalne skupine u molekuli bojila [4].

Tablica 2.2. Podjela bojila prema kemijskoj strukturi [4]

Skupine bojila	Kemijska struktura
Nitro	
Nitrozo	 kao metalkompleks
Difenilmetanska	
Trifenilmetanska	 -NH ₂ ili -OH skupine kao auksokromi u <i>p</i> -položaju
Akridinska	
Ksantenska	
Diazinska, Oksazinska, Tiazinska	 X: NR=Diazin, O=Oksazin, S=Tiazin
Metinska	$D - (CH = CH)_x - A$ D=elektron donor, A=elektron akceptor sposoban za konjugaciju
Antrakinonska	 + auksokrom

Tablica 2.2. Nastavak

Skupine bojila	Kemijska struktura
Indigoidna	 <p style="text-align: right;">Indigo</p>
Stilbenska	
Tiazolna	
Leukoestri (Indigosol)	
Azo: Monoazo Diazo Triazo Poliazo	$\text{Ar} - \text{N} = \text{N} - \text{Ar}$ $\text{Ar} - \text{N} = \text{N} - \text{R} - \text{N} = \text{N} - \text{Ar}$ $\text{Ar} - \text{N} = \text{N} - \text{R} - \text{N} = \text{N} - \text{R} - \text{N} = \text{N} - \text{Ar}$ $\text{Ar} - (\text{N} = \text{N})_x - \text{Ar}$
Sumporna	 <p>Struktura ovih bojila nije definirana. Opća formula je Ar-S-S-Ar. Kao kromofori se nalaze tiazol, tiazin itd.</p>
Ftalocijaninska	

Nadalje, bojila se prema načinu primjene te svojstvima bojenja dijele na:

- bojila topljiva u vodi – bazna, kisela, supstrantivna ili direktna, kiselomočilska, metalkompleksna, reaktivna i leuko-esterska
- bojila netopljiva u vodi – redukcijaska, disperzna, bojila topljiva u mastima i uljima, pigmentna i bojena lakovi, sumporna
- bojila koja se grade na vlaknu – bojila za višeslojnu fotografiju, bojila tipa naftola AS, oksidacijska bojila, acetatna bojila za razvijanje [11].

2.2. Azo bojila

Od svih nabrojanih skupina, azo bojila danas čine najveću i najraznovrsniju skupinu sintetskih organskih bojila. Azo boje pripadaju skupini umjetnih boja koje karakterizira jedna ili više azo skupina (-N=N-) kao kromofora uz prisutnost auksokromnih hidroksilnih ili amino skupina. Ta bojila pokazuju benzoidno-kinoidnu tautomeriju pri čemu nastaju odgovarajući kinon hidrazoni. To su analozi azobenzena ($C_6H_5N=NC_6H_5$) kao najjednostavnijeg aromatskog azo spoja. Azobenzen nastaje alkalnom redukcijom nitrobenzena ($C_6H_5NO_2$) i nema karakter bojila. Spoj s karakterom bojila nastaje ako se na azobenzenu nalaze supstituirane amino, hidroksilne, karboksilne, sulfonske ili sulfonamidne skupine ili pak ako se radi o sustavu izocikličkih ili heterocikličkih aromatskih prstena koji su kondenzirani ili supstituirani s aromatima ili navedenim skupinama.

Prema broju azo skupina u molekularnoj strukturi, azo boje dijele se na: monoazo, diazo, triazo i poliazo boje. Postoji i podjela prema primjeni azo boja koja obuhvaća azo boje topljive u vodi (bazične, kisele, direktne, kiselomočilske, reaktivne, metalkompleksne, leuko-esterske), azo boje netopljive u vodi (redukcijaska, disperzna, pigmentna, topljive u mastima i uljima, obojene lakove), te azo boje koje se grade na vlaknima (bojila tipa naftola AS, oksidacijska bojila te bojila za fotografije u boji).

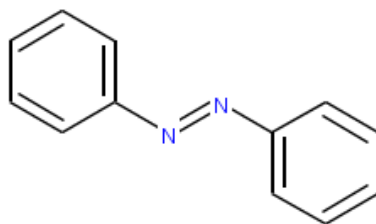
Za otkriće azo boja zaslužan je Perkin 1856. godine, od kada one postoje kao najzastupljenija komercijalna skupina bojila s ukupno 3000 različitih spojeva. Procjenjuje se da se 70 % mase svih bojila koja se proizvedu odnosi na azo bojila zbog čega su to bojila s kojima ljudi najčešće dolaze u kontakt te ih najčešće možemo naći u okolišu [12]. Uzrok tako široke upotrebe je lagana i jeftina sinteza, njihova stabilnost i velika raznolikost nijansi u odnosu na prirodna bojila. Azo boje imaju vrlo širok spektar primjene, a najčešće se primjenjuju u tekstilnoj industriji (za bojanje prirodnih i sintetskih materijala), potom u industriji papira, kože, plastičnih masa i dr. Bojenje tekstilnih vlakana vrši se adsorpcijom iz vodene otopine boje, a

azo boje koje se rabe za bojenje materijala iz nevodnih medija mogu se podijeliti na boje topljive u alkoholu, u mineralnim uljima i mastima te u organskim otapalima. Azo boje netopljive u vodi rabe se za bojenje kože, drva, plastike, lakova, prehrambenih proizvoda, alkoholnih tinti, masti, voskova te mineralnih ulja i naftnih derivata [8, 13-15].

2.2.1. Priprava azo bojila [5, 6]

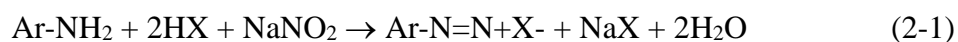
Aromatski spojevi kao što su benzen, toluen, fenol, ksilen, naftalen, antracen, krezol, piridin, difeniloksid i drugi, osnovne su sirovine za sintezu organskih bojila. Ove primarne komponente mogu se relativno jednostavnim kemijskim reakcijama prevesti u intermedijere za bojila. Najčešće reakcije su sulfoniranje, halogeniranje, nitriranje, oksidacija, redukcija i sl. Dobiveni intermedijeri daljnjim međusobnim reakcijama daju konačni produkt – sintetičko bojilo.

Azo bojila se teorijski izvode iz azo benzena (Slika 2.2), najjednostavnijeg aromatskog azo spoja, koji se dobiva redukcijom nitro-benzena i nema karakter bojila. Uvođenjem određenih supstituenata u molekulu dobivaju se spojevi s karakterom bojila.



Slika 2.2. Struktura azobenzena

Gotovo sva azo bojila se proizvode načelno na isti način, sintezom u dva reakcijska stupnja. Prvi reakcijski stupanj obuhvaća diazotaciju aromatskih i heteroaromatskih amina koja se provodi reakcijom natrijevog nitrita s nekim primarnim arilaminom (npr. sulfanilna kiselina) u vodenoj otopini mineralne kiseline pri približno 0 °C prema sljedećoj jednadžbi:



(Ar = benzenska jezgra, X= Cl⁻, Br⁻, NO₃⁻, HSO₄⁻...)

Obično se koristi klorovodična kiselina jer tvori topljive soli s aromatskim aminima. Dok se nitrit mora upotrebljavati u točno teorijski potrebnoj količini, kiselina se uvijek dodaje u suvišku i to u pravilu višak od 0,5 mola na teorijski potrebna 2 mola kiseline. Ako se provodi

diazotacija slabo bazičnih amina čije soli slabo hidroliziraju, potreban višak kiseline iznosi 1-3 mola, a ako ni suvišak kiseline nije dovoljan za otapanje, diazotacija se provodi u suspenziji. Nitrit se ne smije dodavati u suvišku jer bi došlo do diazotacije ili nitroziranja kopulacijske komponente, a u konačnici i do promjene strukture bojila.

Reakcija se provodi pri temperaturi od 0 °C do 5 °C jer su mnogi diazo spojevi nestabilni pri povišenim temperaturama i skloni polimerizaciji.

Drugi reakcijski stupanj pripreme azo bojila je proces azo kopulacije. Diazonijeva sol, dobivena u prvom reakcijskom stupnju spaja se, pod određenim uvjetima, s različitim aromatskim spojevima (komponente za kopulaciju) pri čemu nastaju azo spojevi općenite formule Ar-N=N-Ar', a proces se može prikazati sljedećom jednadžbom:



Svim komponentama za kopulaciju koje se upotrebljavaju u sintezi azo bojila zajedničko je da imaju aktivni vodikov atom vezan na ugljikovu atomu. Kopulacijske komponente mogu biti:

- aromatske hidroksi molekule (fenoli, naftoli...),
- keto spojevi skloni enolizaciji,
- tvari koje sadrže reaktivne metilenske skupine,
- aromatski amini (primarni, sekundarni, tercijarni),
- fenol- i naftol- eteri te,
- ugljikovodici.

Brzina kopulacije ovisit će o prirodi diazo molekule, prirodi kopulacijske komponente, temperaturi te pH vrijednosti sustava.

2.2.2. Toksičnost azo bojila i njihov utjecaj na okoliš

Sintetska bojila spadaju u veliku grupu organskih spojeva koji se upotrebljavaju u svim područjima ljudskog djelovanja. Procjenjuje se da je proizvodnja sintetskih bojila 2008. godine iznosila oko 7×10^5 tona. Danas su te brojke sigurno puno veće obzirom da je ta industrija u stalnom porastu [16]. Opasnost od sintetskih bojila je izrazito velika dijelom zbog njihove velike proizvodnje, a dijelom zbog sinteze novih bojila čiji je utjecaj na okoliš nepoznat. Svako bojilo mora proći odgovarajuću evaluaciju da bi se vidjelo je li pogodno za upotrebu i bezopasno za ljude, ali često se njihov štetan utjecaj uviđa tek nakon duljeg vremena upotrebe. Od svih zagađivala u industriji bojila, azo bojila su najveća zagađivala s udjelom od 80 % [17]. Problem leži u tome što se azo boje sintetiziraju tako da budu postojane tijekom pranja, na kemijsko i mikrobiološko djelovanje, kao i na djelovanje svjetlosti zbog čega su postojane, teško biorazgradive i sklone nakupljanju u prirodi. Azo veze se u strukturi azo boja najčešće nalaze unutar benzenskog ili naftalenskog prstena, a poznato je da su mnogi spojevi s takvom strukturom kancerogeni te da toksičnost sastojaka raste povećanjem broja benzenskih prstenova. Kancerogenost azo boja ovisi o strukturi molekule i mehanizmu razgradnje kako je prikazano u Tablici 2.3. Prilikom razgradnje azo boja često nastaju aromatski amini različitih struktura koji također mogu imati kancerogena svojstva. Istraživanja u svrhu najpogodnijih metoda za uklanjanje boja iz otpadnih voda privlače sve veću pozornost istraživača koji djeluju na području zaštite okoliša. Azo boje se teško razgrađuju i gube obojenje zbog svog umjetnog postojanja, izrazito složene strukture i izražene postojanosti zbog čega je nužno njihovo uklanjanje iz otpadnih voda prije ispuštanja u okoliš. Uklanjanje obojenja ne znači uvijek i uklanjanje toksičnosti. Razgradni produkti koji zaostaju u otpadnoj vodi često tu toksičnost mogu i povećati. Uspješnost razgradnje provjerava se raznim ekotoksikološkim testovima. Upravo su se neke od osnovnih azo i diazo-boja pokazale izrazito toksičnima. Negativan utjecaj boja iskazuje se kroz koncentraciju boje i trajnost izloženosti nekog organizma toj boji nakon kojeg nastupaju akutni i/ili trajni toksični učinci, zatim kroz obojenje vode već pri vrlo malim koncentracijama boje te kroz promjene na organizmima jer sprječavaju prijenos sunčeve svjetlosti kroz vodu i ometaju proces fotosinteze što za posljedicu ima promjene u hranidbenom lancu [3].

Tablica 2.3. Ovisnost kancerogenih svojstava o strukturi azo bojila [3]

Struktura	Topljivost	Mehanizam razgradnje	Kancerogenost
Diazo-sastavnica	voda ili organsko otapalo	redukcija -N=N- N-oksidacija amina	+
Azo-veza ostaje sačuvana	organsko otapalo	oksidacija prstena N-dealkilacija N-oksidacija	+/-
Sulfonske skupine	voda	redukcija -N=N-	-

Danas postoji niz zakonskih propisa i regulativa koji od proizvođača zahtijevaju definiranje štetnosti svakog proizvoda što uključuje njegovu akutnu toksičnost, iritabilnost kože i očiju, fotosenzibilnost, toksičnost nakon višekratne promjene, kancerogenost, mutagenost i teratogenost. ETAD, Ekološko i toksikološko udruženje industrije za proizvodnju bojila (engl. *Ecological and Toxicological Association of the Dyestuffs Manufacturing Industry*), je udruženje osnovano od strane vodećih europskih proizvođača bojila u svrhu izbjegavanja mogućih negativnih utjecaja bojila i drugih proizvoda na zdravlje i okoliš. Time se želi osigurati zaštita daljnjih proizvođača i krajnjih potrošača pri rukovanju tim proizvodima. 1974. godine tvrtke članice ETAD-a uvele su u praksu izradu i uporabu Sigurnosno-tehničkog lista (engl. *Safety Data Sheet*). To je dokument koji sadrži podatke karakteristične za svaku umjetno sintetiziranu boju na koju se odnose: identitet boje, mogući štetni sastojci, fizikalno-kemijski, toksikološki i ekološki podaci, koncentracije dopuštene izloženosti, mjere prve pomoći te upute za uporabu sredstva osobne zaštite pri radu. Toksikološki podaci podrazumijevaju poznavanje akutne oralne toksičnosti spoja dane vrijednošću LD_{50} (jedinica letalne doze) ili LC_{50} (jedinica letalne koncentracije) koja označava smrtonosnu količinu u mg/kg tjelesne težine, od koje, kod jednokratnog oralnog hranjenja, ugine 50 % pokusnih životinja u vremenu od 14 dana, odnosno, kod koje ugine 50 % izložene populacije.

Sve se više pozornosti pridaje ispitivanju kancerogenog i alergijskog djelovanja bojila. Međunarodna agencija za otkrivanje karcinoma IARC (engl. *International Agency for Research on Cancer*) napravila je klasifikaciju spojeva po grupama obzirom na toksičnost razgradnih produkata: 1 - kancerogeni, 2A - upitno kancerogeni, 2B - potencijalno kancerogeni, 3 - spojevi čije djelovanje nije u potpunosti potvrđeno (alergije i slično) i 4 - ne kancerogeni

spojevi. Još jedan dokaz važnosti ispitivanja humano-ekološke pouzdanosti kvalitete kemijskih proizvoda je MAK lista (njem. *Maximale Arbeitsplatz Konzentration*) koju je izradila "Senatska komisija za ispitivanje opasnih radnih tvari na zdravlje". Napravljena je podjela azo bojila na temelju njihove kemijske strukture jer se zbog svog redukcijskog djelovanja raspadaju na aromatske amine koji su mogući uzročnici oboljenja od raka ili alergije. Obzirom na toksičnost razgradnih produkata MAK lista sadrži tri skupine:

MAK *A1* - azo bojila čijom razgradnjom nastaju spojevi koji mogu prouzročiti karcinom kod ljudi;

MAK *A2* - azo bojila čijom razgradnjom nastaju spojevi koji prouzrokuju karcinom kod životinja;

MAK *B* - azo bojila čijom razgradnjom nastaju spojevi čije djelovanje nije u potpunosti potvrđeno (alergije i slično) [3, 4].

U Tablici 2.4. je dan popis nekih kancerogenih aromatskih amina klasificiranih prema MAK-u i IARC-u.

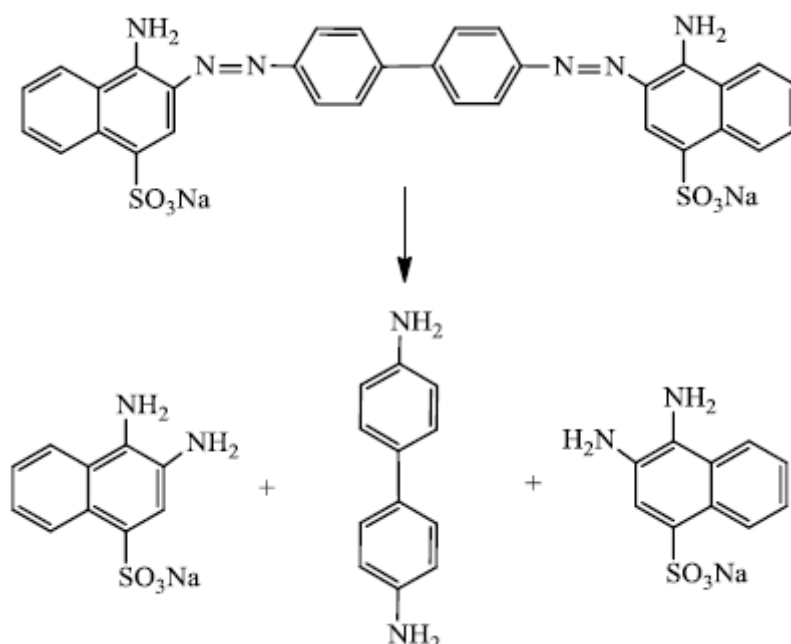
Tablica 2.4. Popis nekih kancerogenih amina [4]

	MAK klasifikacija	IARC klasifikacija
4-aminodifenil	A1	1
benzidin	A1	1
4-klor-2-toluidin	A1	2A
2-naftilamin	A1	1
2-aminoazotoluen	A2	2A
2-amino-4-nitrotoluen	A2	2A
2, 2'-diklor-4,4'-metilendianilin	A2	2A
4,4'-metilendianilin	A2	2B
4,4'-metilendi- <i>o</i> -toluidin	A2	2B
4-kloranilin	A2	2B
2,4-diaminoanisidin	A2	2B
4,4'-diaminodifenilmetan	A2	2B
3,3'-diklorbenzidin	A2	2B
3,3'-dimetoksibenzidin	A2	2B
3,3'-dimetilbenzidin	A2	2B
3,3'-dimetil-4,4'-diaminodifenilmetan	A2	2B
6-metoksi- <i>m</i> -toluidin	A2	2B
4-krezidin	A2	2B
4,4'-tiodianilin	A2	2B
4,4'-oksidianilin	A2	2B
2-toluidin	A2	2B
5-nitro- <i>o</i> -toluidin	A2	3
2,4,5-trimetilanilin	A2	3

2.2.2.1. Toksičnost razgradnih produkata azo bojila

Azo boje se povezuju s rakom ljudskog mjehura, slezene, pojavom sarkoma i nuklearnih anomalija kod eksperimentalnih životinja te kromosomskih promjena u stanicama sisavaca. Neke azo boje izazivaju čvorove na jetri kod životinja i dokazano je da postoji veća učestalost karcinoma mokraćnog mjehura kod radnika izloženih velikim količinama azo bojila [18].

Azo veza često je najslabiji dio molekule azo bojila i vrlo lako može doći do enzimskog raspada u organizmima sisavaca. U organizmu dolazi do redukcije azo bojila zbog bakterija koje se nalaze u probavnom traktu, ali i drugi organi kao što su jetra, bubrezi, pluća, srce ili mozak mogu reducirati azo bojila i stvarati kancerogene aromatske amine (Slika 2.3).



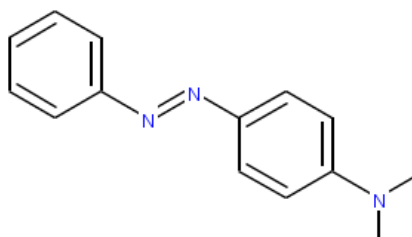
Slika 2.3. Reducijsko cijepanje azo bojila na primjeru C.I. Direct Red 28 (Kongo crvenilo) [19]

Produkti redukcije apsorbiraju se u crijevima i vežu na DNA što potom uzrokuje mutacije i stvaranje tumora. Isto tako izloženost aromatskim aminima može potaknuti oksidaciju dvovalentnog željeza hemoglobina u trovalentno željezo i blokirati vezanje kisika što rezultira slabošću i vrtoglavicom. Kancerogenost amina znatno varira ovisno o njihovoj strukturi, a znanstveno je dokazano da toksičnost raste povećanjem broja aromatskih prstenova u strukturi. Supstituenti također različito djeluju na toksičnost. Nitro, metilne, metoksi skupine ili halogeni

elementi povećavaju toksičnost bojila, dok karboksilne i sulfo skupine uglavnom smanjuju štetnost [19].

Osim djelovanjem bakterija aromatski amini mogu nastati i kao posljedica raspada bojila pod utjecajem topline ili sunčeve svjetlosti. Razni supstituirani aminobenzeni, aminonaftaleni i aminobenzidini nisu biološki razgradivi. Dokazano je da kancerogenost ovisi o metaboličkim promjenama pri kojima se ove strukture cijepaju na elektrofilne čestice koje reagiraju s područjima DNA bogatim elektronima, te tako utječu na sintezu proteina. Ustanovljena je i povezanost same strukture bojila s kancerogenim djelovanjem. Uspoređujući hidrofobna azo bojila koja sadrže amino skupinu u *orto*- i *para*- položaju, došlo se do zaključka da su *para*-izomeri kancerogeni, dok *orto*- izomeri nisu. Ova se pojava objašnjava time što *p*- izomeri reagiraju s DNA, a *o*- izomeri stvaraju zatvorene cikličke spojeve [20].

Mnoga istraživanja kancerogenosti provedena su na 4-dimetilamino azobenzenu (DAB) (Slika 2.4) i njegovim derivatima.



Slika 2.4. 4-dimetilamino azобенzen

Prilično velik broj spojeva strukturno vezanih uz DAB sada je testirano na kancerogeno djelovanje. Kako bi neki spoj imao relativnu aktivnost (proporcionalno kancerogenosti) veću od 1, spoj treba imati: 1) azo ili etilensku skupinu između dva aromatska prstena, 2) najmanje jednu *N*-metilnu skupinu, zajedno s drugim odgovarajućim amino supstituentom i 3) preferirani supstituent u položaju 3 na prstenu, ili biti bez supstituenta.

Kancerogenost derivata 4-dimetilamino azobenzena ovisit će o skupini/skupinama koje su vezane na osnovu molekule (4-aminoazobenzenu) što je prikazano u Tablici 2.5.

Tablica 2.5. Relativna kancerogena aktivnost određenih *N*-supstituiranih derivata 4-aminoazobenzena

Supstituent na 4-aminoazobenzenu	Relativna aktivnost
$\begin{array}{l} \text{N} \begin{array}{l} \diagup \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH}_3 \end{array} \end{array}$	6
$\begin{array}{l} \text{N} \begin{array}{l} \diagup \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH}_2\text{CH}_3 \end{array} \end{array}$	6
$\begin{array}{l} \text{N} \begin{array}{l} \diagup \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} \end{array} \end{array}$	0
$\begin{array}{l} \text{N} \begin{array}{l} \diagup \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CHO} \end{array} \end{array}$	1-2
$\begin{array}{l} \text{N} \begin{array}{l} \diagup \text{CH}_2\text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH}_2\text{CH}_3 \end{array} \end{array}$	0
$\begin{array}{l} \text{N} \begin{array}{l} \diagup \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} \\ \diagdown \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} \end{array} \end{array}$	0
$\begin{array}{l} \text{N} \begin{array}{l} \diagup \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{H} \end{array} \end{array}$	6
$\begin{array}{l} \text{N} \begin{array}{l} \diagup \text{CH}_3\text{CH}_2 \\ \diagdown \text{H} \end{array} \end{array}$	0
$\begin{array}{l} \text{N} \begin{array}{l} \diagup \text{CHO} \\ \diagdown \text{H} \end{array} \end{array}$	0
$\begin{array}{l} \text{N} \begin{array}{l} \diagup \text{H} \\ \diagdown \text{H} \end{array} \end{array}$	0

Iz Tablice 2.5 je vidljivo da ni jedan spoj, koji ne sadrži barem jednu *N*-metilnu skupinu, ne pokazuje kancerogenu aktivnost, a spojevi koji kao drugi supstituent na dušiku sadrže vodikov atom, te metilnu ili etilnu skupinu pokazuju visoku aktivnost. Spoj koji kao drugi supstituent na dušiku sadrži hidroksietil je nekancerogen, dok je spoj sa *N*-formilmetil supstituentom slabo kancerogen [21].

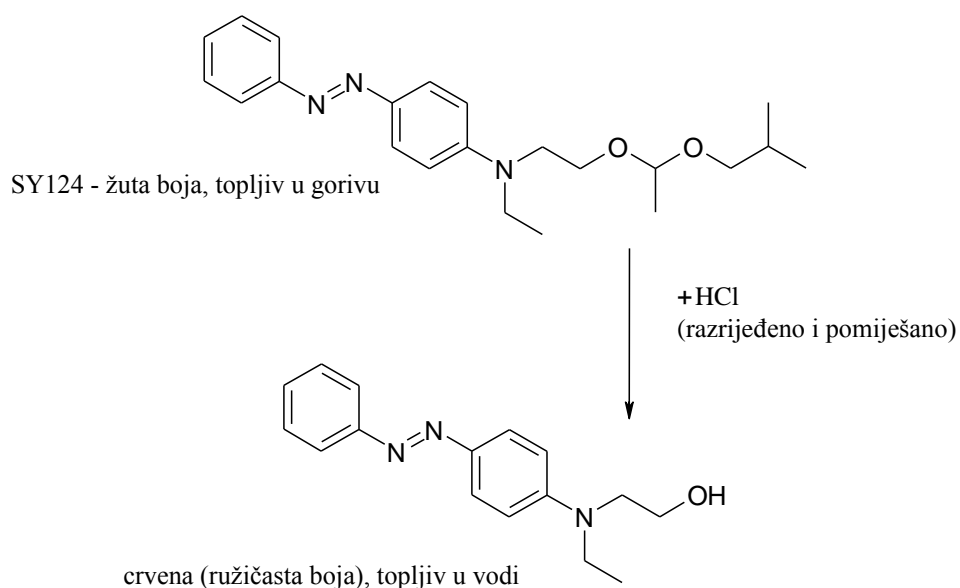
2.3. Solvent Yellow 124 kao euromarker

C.I. Solvent Yellow 124 (SY124), poznat još pod imenima Sudan 455, Somalia Yellow, T10 Yellow, je žuta monoazo boja koja se od 2002. godine upotrebljava kao marker za goriva u svrhu razlikovanja goriva različitih poreznih razreda (Slika 2.5) [22].



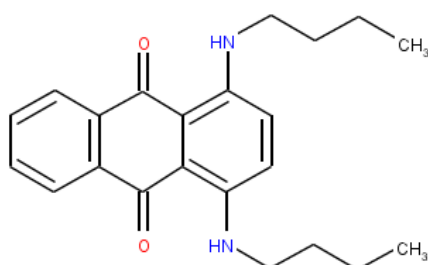
Slika 2.5. Solvent Yellow 124; *N*-etil-*N*-[2-(izobutoksietoksi) etil](4-fenilazofenil)amin [23]

Njegovo obojenje ovisi o pH području otopine pa je u lužnatom žute boje, a u kiselom ružičaste. Vrlo lako se može uočiti u gorivu ekstrakcijom s razrijeđenom klorovodičnom kiselinom (ili sulfatnom) i to već pri koncentracijama od 0,3 mg/L pri čemu žuta neutralna molekula SY124 topljiva u gorivu prelazi u ružičasti produkt topljiv u vodi. Acetalna skupina, koja doprinosi dobroj topljivosti molekule u nepolarnoj kapljevitini tj. gorivu, uklanja se kiselom hidrolizom molekule pri ekstrakciji, što također pospješuje prijelaz boje iz goriva u vodenu fazu (Slika 2.6) [24].



Slika 2.6. Hidrolizirani oblik molekule SY124 [24]

Prema Zakonu o trošarinama oporezivi su samo oni energenti koji se koriste kao goriva za grijanje, kao pogonska goriva ili električna energija. Porez na energent ovisit će o namjeni proizvoda te o ekološkim razlozima. Plinsko ulje (plavi dizel) namijenjeno je za upotrebu u poljoprivredi, ribolovu, ribogojstvu i akvakulturi te kao takvo ima visinu trošarine 0,0 što ga svrstava u energente sa smanjenom stopom poreza. Da bi se izbjegla zlouporaba ovog goriva on se označava prikladnom bojom i markerom. Plinsko ulje boji se plavom bojom C.I. Solvent Blue 35 (Slika 2.7) i mora sadržavati marker SY124 (*N*-etil-*N*-[2-(izobutoksietoksi) etil](4-fenilazofenil)amin) u količini ne manjoj od 6 mg/L, ali niti većoj od 9 mg/L. Fiskalni marker ne mijenja boju goriva i određuje se referentnom metodom Europske unije za određivanje markera (SY124) u plinskom ulju (metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornost, HPLC (engl. *High Performance Liquid Chromatography*) uz UV/DAD detekciju) [25, 26].



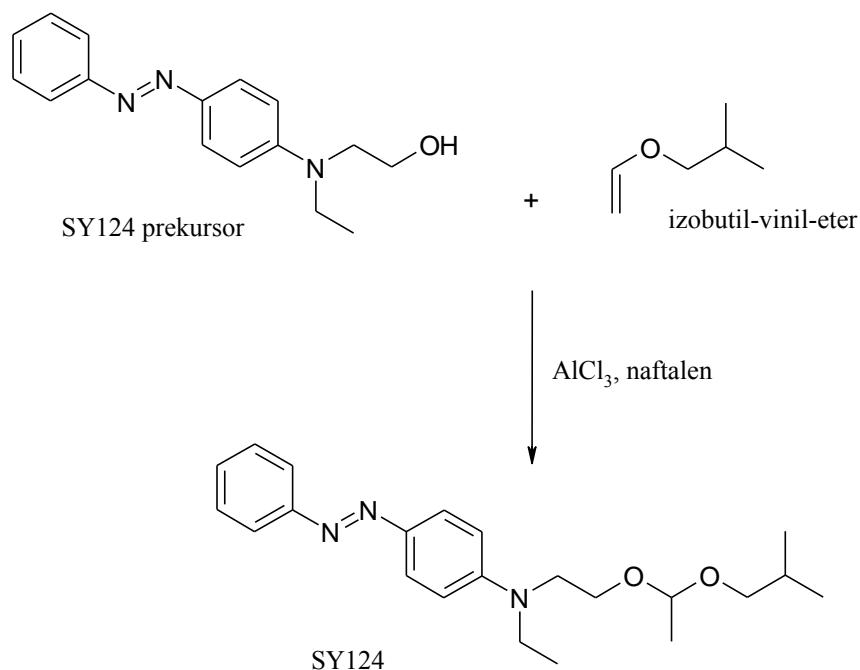
Slika 2.7. Solvent Blue 35; 1,4-bis(butilamino)-9,10-antrakinon [25]

Plinsko ulje obojeno plavom bojom korisnici koji posjeduju prava mogu koristiti za:

- namjene u poljoprivredi i to isključivo za pogon poljoprivrednih strojeva i registriranih vozila za prijevoz pčela
- namjene u ribolovstvu, ribogojstvu i akvakulturi samo za rad pogonskih i pomoćnih motora ribarskih plovila kojima se obavlja gospodarski ribolov te za rad pomoćnih i pogonskih motora registriranih plovila i strojeva u ribogojstvu i akvakulturi.

Plinsko ulje koje se nalazi u spremniku motornih vozila, plovnih objekata, plovila i drugih motora i/ili strojeva smatra se označenim ukoliko sadrži marker u bilo kojoj koncentraciji te bez obzira na boju. Plinskom ulju nije dozvoljeno odstraniti sredstva za označavanje, smanjiti njihove koncentracije ili dodavati tvari koje onemogućavaju utvrđivanje propisane označenosti jer su za nenamjensko korištenje označenih plinskih ulja propisane visoke kazne u prekršajnom, ali i upravnom postupku. Ako se prilikom kontrole motornih vozila i drugih motornih i plovnih objekata utvrdi da se označeno plinsko ulje koristi u druge svrhe osim u one propisane Zakonom o trošarinama, vlasniku tog vozila/objekta obračunava se trošarina na količine koje odgovaraju obujmu spremnika pogonskog goriva uvećane za sto puta, prema najvišem iznosu trošarine propisanom za energent koji se koristi kao pogonsko gorivo. Osim toga, ako se prilikom provjere knjigovodstvenih ili drugih isprava, ili pak na neki drugi način utvrdi da se energenti snižene trošarine, energenti na koje nije plaćena trošarina ili je primijenjeno oslobađanje od trošarine kupuju, prevoze, prerađuju, posjeduju, drže ili prodaju suprotno odredbama Zakon o trošarinama, toj osobi se trošarina obračunava na one količine koje su bile predmet nezakonitog postupanja i to uvećane za dvadeset puta osobi koja je kupovala energente te uvećano za sto puta osobi koja je posjedovala, prevozila, držala, prerađivala ili prodavala energente prema najvišem iznosu trošarine propisanom za energent koji se koristi kao pogonsko gorivo [27].

Solvent Yellow 124 proizvodi se industrijski u otopini (najčešće aromatskih ugljikovodika) iz SY124 prekursora i izobutil-vinil-etera kako je prikazano na Slici 2.8.



Slika 2.8. Reakcija nastajanja SY124 [28]

Neki korisnici su izrazili sumnju u čistoću industrijski proizvedenog SY124, koja se može mijenjati sa svakom novom smjesom. To je poseban problem za naftnu industriju koja mora osigurati da količina SY124 u gorivu bude u rasponu od 6 mg/L do 9 mg/L [28].

2.3.1. „Pranje“ goriva

Stalni porast potrošnje goriva, u cijelom svijetu, stvara znatnu dobit za naftnu industriju, ali isto tako uzrokuje porast cijene goriva. Osim ekonomskih faktora, cijena goriva ovisi o lokalnim propisima i zakonima koji određuju razinu poreza na dano gorivo. Mnoge države primjenjuju različitu razinu poreza na gorivo ovisno o njegovoj upotrebi. Porezi na goriva koja se koriste za grijanje ili pogon poljoprivrednih strojeva su puno manji u odnosu na dizelsko gorivo za redoviti prijevoz. Kako bi mogli razlikovati goriva ovisno o njihovoj upotrebi ona su namjerno označena bojom i markerom. Dodatak tih komponenata ne mijenja fizikalno-kemijska svojstva goriva niti smanjuje njegovu daljnju uporabu. Najčešće upotrebljavani marker u Europskoj Uniji je Solvent Yellow 124, čija je primjena zakonski propisana i u Hrvatskoj. Ujedno, on je daleko najrašireniji i najupotrebljavaniji marker za razlikovanje goriva u svijetu (Tablica 2.6).

Tablica 2.6. Popis država koje upotrebljavaju Solvent Yellow 124 kao marker za gorivo [29]

Država	Boja + marker
Austrija	Crvena boja + Solvent Yellow 124
Kanada	Crvena boja + Furfural + Solvent Yellow 124
Finska	Furfural + Solvent Yellow 124
Francuska	Solvent Yellow 124 + Solvent Red 24
Njemačka	Solvent Yellow 124 + Solvent red 19
Italija	Solvent Green 32 ili 33 + Solvent Yellow 124
Španjolska	Crvena boja + Solvent Yellow 124 ili plava boja + Solvent Yellow 124
Švedska	Solvent Blue 35 + Solvent Blue 79 + Solvent Blue 98 + Solvent Yellow 124
Ujedinjeno Kraljevstvo	Solvent Red 24 + Solvent Orange 86 + Solvent Yellow 124 + dodaci

Znatna financijska dobit koju je moguće ostvariti iz razlike poreza goriva različitih poreznih razreda potaknula je ilegalnu praksu uklanjanja komponenti (markera i boje) za razlikovanje goriva i njihovu prodaju po višoj cijeni. Takav postupak poznat je pod nazivom „pranje“ goriva. „Pranje“ goriva odvija se adsorpcijom markera i boje iz goriva široko dostupnim materijalima odnosno kemikalijama. Pranje komercijalno dostupnog goriva uzrokuje velike gubitke u državnom proračunu zbog čega se intenzivno radi na razvoju analitičkih postupaka za detekciju krivotvorenog dizelskog goriva [30, 31].

Upravo je jedan takav ilegalan proces zabilježen u Hrvatskoj krajem 2016. godine kada su policija i carina zatvorile najsofisticiraniju tvornicu za „pranje“ plavog dizela koju su ikad pronašli u Hrvatskoj (Slika 2.9). Odgovorne osobe su u toj ilegalnoj tvornici proizvele milijun i pol tisuća litara eurodizela „pranjem“ plavog dizela i na taj način oštetile državu za najmanje 10 milijuna kuna zbog neplaćenih trošarina i PDV-a. Zatvoreno je 5 benzinskih crpki u Osječko-baranjskoj, Brodsko-posavskoj, Vukovarsko-srijemskoj i Virovitičko-podravskoj županiji jer su prodavale korisnicima ilegalno gorivo i na taj način na trošarinama zarađivale 3 kune po litri.

Večernji list ZAGREB 12°C

PREMIUM VIJESTI SPORT ZAGREB SHOWBIZ BIZNIS KULTURA AUTO

HRVATSKA KAKVU TREBAMO HRVATSKA CRNA KRONIKA SVLJET EU ZANI

ČLANAK KOMENTARI 13 MULTIMEDIJA 7

OTVORENA ISTRAGA Objava: 7.10.2016 | 20:10

Trojici istražni zatvor: Kod Đakova otkrivena najsofisticiranija ilegalna tvornica za "pranje" plavog dizela

Policija i carina raskrinkale su, kako kažu, najsofisticiraniju tvornicu za "pranje" plavoga dizela koju su ikada pronašli u Hrvatskoj. Samo to postrojenje stajalo je milijune

Slika 2.9. Novinski članak o otkrivenoj ilegalnoj tvornici za „pranje“ goriva u Hrvatskoj [32]

Iako je materijalna šteta za državni proračun izrazito velika, još veći problem predstavlja ogromna šteta za okoliš. Naime, „pranje“ plavog dizela sastoji se u njegovu ispiranju sa sulfatnom kiselinom čime se nastoje ukloniti boja i marker iz goriva (Slika 2.10).



Slika 2.10. Dio opreme korišten za ilegalno „pranje“ goriva [33]

Otpadne tvari koje sadrže sulfatnu kiselinu s ostacima naftnih derivata te markera SY124 zakopavane su u zemlju u izrazito velikoj blizini cjevovoda odnosno kanala. Osim što su otpadne tvari kroz zemlju dospjele u vodotoke, također su nagrizele cjevovode i tako izazvale

ozbiljnu sumnju na zagađenje pitke vode [33]. Uz sulfatnu kiselinu koja je štetna za okoliš kao i naftne derivate, koji osim zasićenih i aromatskih ugljikovodičnih spojeva sadrže i razne dodatke koji se uobičajeno dodaju u gorivo za poboljšanje njegovih svojstava poput cetanskog broja, otpornosti na koroziju i sl., izrazito velik problem predstavlja marker SY124.

Njegova prisutnost u okolišu, osobito vodi, izaziva veliku zabrinutost. Česta pretpostavka i zabluda je da je obojenje indikator onečišćenja i da njegovim uklanjanjem rješavamo nastali problem. Međutim, obojena voda, kao očigledni znak onečišćenja organskim pigmentima, gubi boju prilikom pucanja $-C=C-$ i $-N=N-$ veza te nastanka heterocikličkih i aromatskih prstenova. Nastale molekule apsorbiraju UV ili IR svjetlost umjesto vidljive svjetlosti elektromagnetskog spektra koju apsorbira početna molekula markera [12]. Upravo zbog toga uklanjanje obojenja ne podrazumijeva uvijek i uklanjanje toksičnosti. Produkti nastali nepotpunom razgradnjom tu toksičnost mogu čak i povećati. Mnoge azo boje su kancerogene, mutagene i izazivaju alergijske reakcije kod ljudi, a njihovi razgradni produkti mogu imati i još izraženija navedena svojstva, osobito nastali aromatski amini [3].

2.4. Obrada otpadnih voda [34, 35]

Izbor postupaka pročišćavanja kojima će se podvrgnuti otpadna voda prije nego što se ispusti u prirodnu sredinu prvenstveno ovisi o količini i sastavu otpadne vode, ali i o zahtijevanoj kakvoći vode na mjestu ispuštanja. Kako bi se dobili što bolji krajnji rezultati obično se primjenjuju kombinirani postupci obrade otpadnih voda. Postupci obrade kojima se podvrgava otpadna voda najčešće se dijele na:

- prethodno pročišćavanje,
- prvi stupanj pročišćavanja,
- drugi stupanj pročišćavanja,
- treći stupanj pročišćavanja.

Prethodno pročišćavanje i prvi stupanj pročišćavanja nazivaju se mehaničkim postupcima pročišćavanja i podrazumijevaju postupke rešetanja, usitnjavanja, taloženja, isplivavanja, cijedenja. Ovim postupcima se prvenstveno uklanjaju krupne plivajuće tvari, raspršene tvari, pijesak (anorganske tvari) te masnoće.

Drugi stupanj pročišćavanja podrazumijeva biološke postupke obrade otpadne vode u koju svrhu se iskorištava aktivnost mikroorganizama, najčešće bakterija. U dijelovima uređaja za

biološko pročišćavanje stvoren je ekosistem složen od više vrsta, odnosno, grupa organizama u različitoj fazi razvoja koji potpomažu proces razgradnje. Najčešće upotrebljavani biološki postupci pročišćavanja svrstani su u tri skupine:

1) Uređaji s aktivnim muljem koji dolaze u više mogućih varijanti:

- konvencionalni uređaj,
- stupnjevito ozračivanje,
- stupnjevito dodavanje otpadne vode,
- visoko opterećeni uređaj,
- uređaj u dvije faze,
- Krausov uređaj,
- oksidacijski jarak,
- uređaj s čistim kisikom te različite kombinacije uređaja.

Biološki bazen s aktivnim muljem u lebdećoj fazi je osnovna značajka uređaja, a nužan je i naknadni taložnik za odvajanje mulja iz vode prije njezina ispuštanja u prirodnu sredinu.

2) Biološki filtri ili prokapanici, koji se sastoje od spremnika i od ispune (aktivni ugljen, kamen, drozga, sintetska ispuna) uz biološki obraštaj po površini ispune, a najčešći su:

- filtri s prirodnom ili prisilnom ventilacijom i
- rotacioni diskovi.

3) Lagune, odnosno bazeni u zemlji kojima je isključiva namjena pročišćavanje vode. U njima se usporedno s biološkim procesima zbivaju i fizikalni procesi taloženja i isplivavanja. Lagune mogu biti anaerobne, fakultativne (anaerobne-aerobne), aerobne i ozračene.

Uklanjanje dušika i fosfora, kao i postojanih organskih tvari te teških kovina i otopljenih anorganskih tvari provodi se trećim stupnjem pročišćavanja otpadne vode, a razlikuju se slijedeći postupci:

1) Postupci bez kemijskih promjena sastojaka:

- filtriranje,
- adsorpcija na kruti adsorbens (aktivni ugljen),
- ozračivanje (aeracija),
- inverzna osmoza,
- destilacija.

2) Postupci s kemijskim promjenama sastojaka:

- neutralizacija,
- flokulacija,
- koagulacija,
- kemijska precipitacija,
- ionska izmjena,
- oksidacija.

2.4.1. Postupci obrade s kemijskim promjenama sastojaka

Uklanjanje različitih sastojaka iz otpadne vode oksidansima naziva se oksidacija i ubraja se u kemijske procese obrade. Kao oksidansi najčešće se koriste klor, klor dioksid, ozon i vodikov peroksid. Ti se postupci obrade često koriste u kondicioniranju vode za piće, odnosno dezinfekciji. Dezinfekcijom se ne postiže potpuno uništenje svih živih mikroorganizama kao npr. sterilizacijom, ali se voda u bakteriološkom smislu dovede u stanje zdravstveno ispravne vode. Cilj dezinfekcije je uklanjanje infektivnih mikroorganizama (intestinalnih i fekalnih vrsta bakterija). Dezinfekcija je zadnji korak pri kondicioniranju vode, ponekad i jedini, ali uvijek obavezan. Od postupaka dezinfekcije najčešće se koriste: dezinfekcija klorom i njegovim derivatima, dezinfekcija ozonom i dezinfekcija ultraljubičastim zrakama [36].

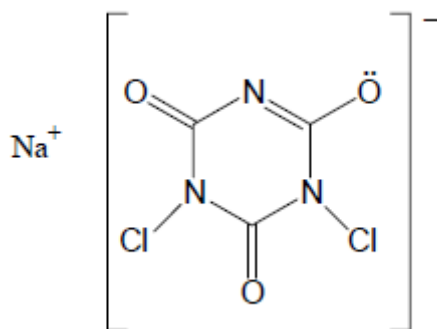
2.4.1.1. Dezinfekcija klorom i njegovim derivatima

Korištenje klora i njegovih derivata za dezinfekciju izaziva uništenje bakterija, određenih vrsta virusa i parazita, oksidaciju organske i anorganske tvari te suzbijanje okusa i stranih mirisa vode. Baktericidno svojstvo klora je u razaranju enzima koji pretvaraju škrob u šećer i koji su prijeko potrebni za život mikroorganizama. Klor je pogodan kao dezinfekcijsko sredstvo zbog učinka koji se postiže u relativno kratkom vremenu uz prihvatljive troškove, ali mu je loša

strana što može uzrokovati neugodan miris vode. Potrebna doza klora ovisi o ukupnoj organskoj i anorganskoj tvari u vodi koja oksidira. Pokazatelj klorne doze je količina neutrošenog, tzv. rezidualnog klora koja ostaje u vodi nakon izvršene oksidacije organske i anorganske tvari. Dodavanje klora u vodu se provodi dok se u kloriranoj vodi ne pojavi slobodni rezidualni klor. Orijehtacijska doza klora kod pitkih voda iznosi 0,5-1,0 mg/L. Danas se sve više koristi klor dioksid jer je manje opasan i duže zadržava baktericidna svojstva [37].

2.4.1.1.1. NaDCC [38, 39]

NaDCC, poznat kao natrijev dikloroizocijanurat, u širokoj je primjeni kao sredstvo za hitnu obradu vode (Slika 2.11).



Slika 2.11. Struktura natrijeve soli diizocijanuratne kiseline

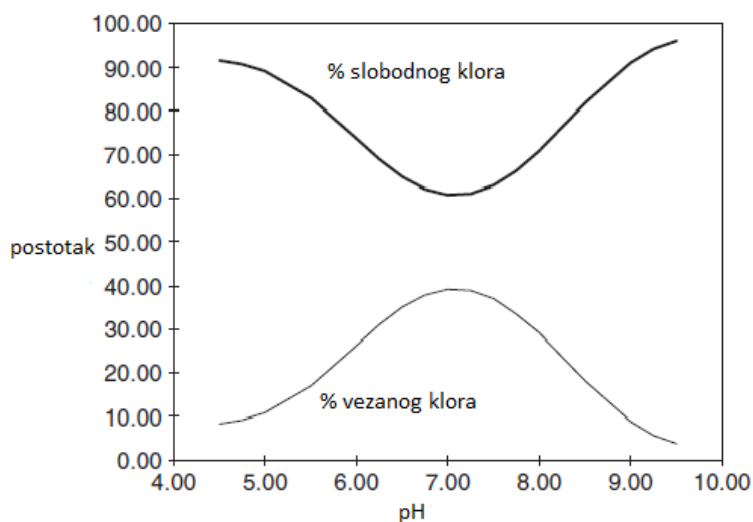
NaDCC je odobren od strane Agencije za zaštitu životne sredine Sjedinjenih Država (engl. *United States Environmental Protection Agency*, EPA) te Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO) za dezinfekciju pitke vode. Na temelju članka 23. stavka 1. Zakona o biocidnim pripravcima (»Narodne novine«, br. 63/07, 35/08 i 56/10) ministar zdravstva i socijalne skrbi donio je popis biocidnih pripravaka kojima je dano odobrenja za stavljanje na tržište, a među kojima je i NaDCC.

Proizvodi se u obliku bijelog kristalnog praha, granula ili tableta i otpušta blagi miris klora. Otapanjem u vodi stvara niz složenih ravnoteža između kloriranih i nekloriranih izocijanurata i slobodno raspoloživog klora (engl. *Free Available Chlorine*, FAC) u obliku hipokloraste kiseline (HOCl). Koristi se za obradu (dezinfekciju) pitke vode, otpadne vode, vode u bazenima i toplicama i za mnoge industrijske vodene sustave.

Najčešće korišteni izvori slobodno raspoloživog klora su elementarni klor, natrijev hipoklorit i kalcijev hipoklorit te kloroizocijanurati. Svi ovi spojevi dezinficiraju vodu na način da oslobađaju slobodni klor u obliku hipokloraste kiseline. Hipoklorasta kiselina je aktivni antimikrobni agens koji djeluje protiv velikog broja bakterija, gljivica, algi i virusa, kako je prikazano:



NaDCC nakon što dospije u vodu otpusti otprilike 50 % klora, u obliku slobodnog raspoloživog klora. Ostatak klora ostaje vezan kao „rezervni“ klor u obliku kloriranih izocijanurata. Kada se sav oslobođeni raspoloživi klor potroši i ravnoteža je narušena, dolazi do trenutnog otpuštanja vezanog slobodnog klora sve dok nije potrošen u potpunosti (Slika 2.12).



Slika 2.12. Slobodan i vezan raspoloživi klor u otopini 1 mg/L NaDCC-a

Da bi se postigao željeni efekt, potrebna koncentracija slobodnog raspoloživog klora u pitkoj vodi iznosi 1 mg/L. Iznad ove koncentracije vode više nije pitka. 1,6 mg/L NaDCC-a otpusti u vodu otprilike 1 mg/L slobodnog raspoloživog klora.

2.4.2. Napredni oksidacijski procesi

Za razliku od klasičnih procesa, napredni oksidacijski procesi (engl. *Advanced Oxidation Processes*, AOPs) su tehnologije koje se ubrajaju u grupu niskootpadnih i bezotpadnih tehnologija obrade otpadnih voda, pa se njihovom primjenom smanjuje potreba za sekundarnom obradom. Primjena naprednih oksidacijskih tehnologija za rješavanje problematike otpadnih voda u skladu je s načelima održivog razvitka [40]. To su procesi koji uključuju dovođenje kemijske, električne ili radioaktivne energije pri čemu nastaju vrlo reaktivni radikali. Takve čestice, odnosno radikali kao što je OH, imaju visok oksidacijski potencijal i mogu brzo i neselektivno reagirati s većinom organskih tvari. Od naprednih oksidacijskih procesa najčešći su: oksidacija vodikovim peroksidom katalizirana željezovim solima (Fentonov proces), ozonom (ozonoliza), UV-fotoliza, elektrokemijska oksidacija, „mokra“ oksidacija, radioliza vode i visokonaponsko električno pražnjenje [41].

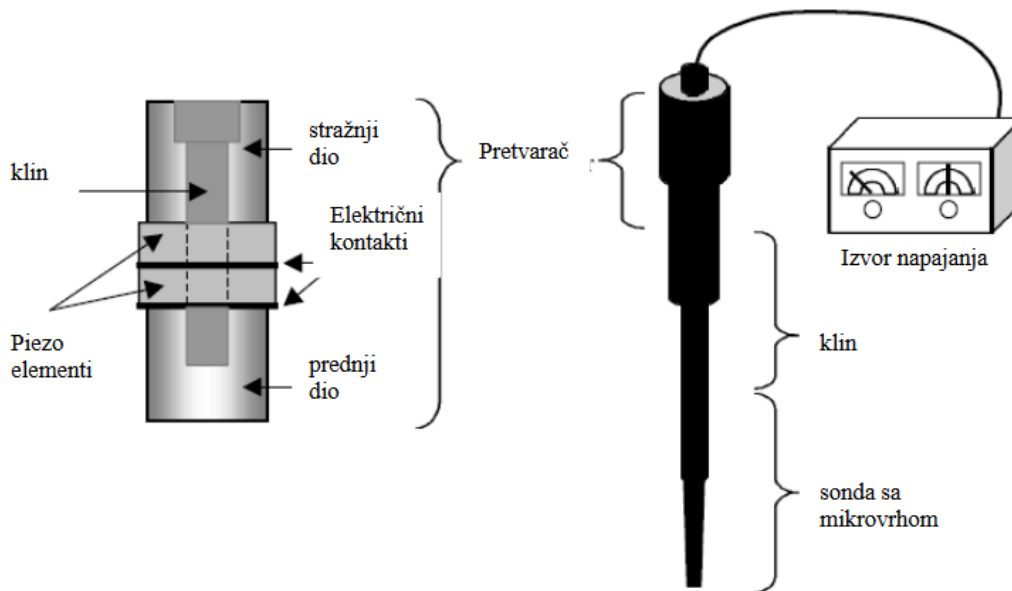
2.4.2.1. Ultrazvuk

Kao jedan od naprednih oksidacijskih procesa, utvrđeno je da je ultrazvuk vrlo prikladna metoda za razgradnju organskih spojeva. Iako je primjena ultrazvuka ranije bila ograničena na čišćenje i emulgiranje, danas se koristi na različitim područjima poput kristalizacije, ekstrakcije, sušenja, zamrzavanja, filtracije, homogenizacije, sterilizacije, degradacije itd.

Gruba klasifikacija ultrazvuka kao zvuka frekvencija od 20 kHz do 100 MHz može se podijeliti na dva bitno različita područja: dijagnostički ultrazvuk i ultrazvuk koji se primjenjuje u sonokemiji. Dijagnostički ultrazvuk tj. ultrazvuk niskog intenziteta (intenzitet manji od 1 W/cm²) djeluje u frekvencijskom rasponu od 2 MHz na više. Takav ultrazvuk ne uzrokuje kemijske niti fizičke promjene u svojstvima medija na koji je primijenjen zbog čega se smatra neinvazivnom tehnikom. Za razliku od njega, ultrazvuk primijenjen u sonokemiji je visokog intenziteta (u rasponu od 1 do 1000 W/cm²) s rasponom frekvencija od 20 do 100 kHz. Ultrazvuk takvog intenziteta može uzrokovati fizičke promjene materijala te određene kemijske reakcije u materijalima na kojima je primijenjen.

Ultrazvuk pokreće generator koji pretvara napon istosmjerne struje u visoke frekvencije od cca 25 kHz (25 000 ciklusa po sekundi) električne energije (Slika 2.13). Pomoću ultrazvučnih pretvarača, uglavnom piezoelektričnih, električna energija pretvara se u energiju zvuka. U nastalom električnom polju piezoelektrični kristali se šire i kontrahiraju. Uslijed privlačenja

polariziranih molekula dolazi do pojave mehaničkih vibracija koje se pojačavaju na pojačalu te se ultrazvučni valovi emitiraju sondom u medij. Prolaskom ultrazvučnog vala kroz medij dolazi do nastanka longitudinalnih valova što dovodi do stvaranja promjenjivih kompresija i ekspanzija tlaka [42].



Slika 2.13. Ultrazvuk visokog intenziteta u obliku sonde s piezoelektričnim pretvaračem [43]

Kemijske posljedice ultrazvučnog ozračivanja ne mogu biti posljedica izravne međureakcije ultrazvuka s molekularnim specijama zbog prevelikih valnih duljina ultrazvuka ($10\text{--}10^3$ cm). Razlog kemijskih efekata koje uzrokuje ultrazvuk je fenomen kavitacije tj. stvaranje, rast i snažan raspad šupljina u tekućini (Slika 2.14).



Slika 2.14. Fotografski prikaz kavitacijskog mjehurića [42]

Prolaskom ultrazvuka kroz tekućinu, u toku ekspanzijskih faza, ultrazvuk vrši negativan tlak na tekućinu. Kada negativan tlak premaši lokalnu površinsku napetost tekućine, dolazi do udaljavanja molekula tekućine i stvaranja šupljina koje se pune plinom ili parom. Šupljine ispunjene plinom apsorbiraju energiju od ultrazvučnih valova i rastu. Tokom brojnih ekspanzijskih i kompresijskih faza ultrazvuka, veličina šupljine oscilira. Kako je rast šupljine za vrijeme svake ekspanzije ultrazvuka nešto veći od smanjenja šupljine za vrijeme kompresije, tokom brojnih izmjena faza ekspanzije i kompresije, šupljina raste. Veličina šupljine može dostići kritičnu vrijednost koja ovisi o tekućini i o frekvenciji ultrazvuka (za 20 kHz iznosi otprilike 170 μm). Kada šupljina previše naraste, više ne može djelotvorno apsorbirati energiju i šupljina pukne [44].

Upravo je razaranje šupljine ono što kreira neuobičajene uvjete za odvijanje kemijskih reakcija. Kompresijom šupljina, plin ili para unutar šupljine, adijabatski se zagrijava. Raspadom šupljina nastaju udarni valovi velike energije, tlakova do nekoliko stotina MPa. Tekućina u okolini razorene šupljine ipak je hladna i brzo hladi zagrijanu tekućinu. Prema tome, ultrazvuk stvara kratkotrajne, lokalizirane vruće točke u inače hladnoj tekućini. Takve vruće točke izvor su homogene sonokemije i imaju temperaturu od 2000 do 5000 $^{\circ}\text{C}$, tlak od oko 100 MPa, a vrijeme trajanja znatno je manje od mikrosekunde. Brzine zagrijavanja/hlađenja kreću se oko 1010 K/s (za frekvencije ultrazvuka od 20 kHz) što dovodi do mijenjanja fizikalno-kemijskih svojstava lokalnih molekula [45].

2.4.2.1.1. Kavitacija u homogenim tekućinama [46]

Raspadom šupljina dolazi do termalne disocijacije molekula vode u šupljini i stvaranja visoko reaktivnih slobodnih radikala – primarno vodikovih i hidroksilnih radikala. Produkti sonolize vode su molekularni vodik (H_2), hidroksil radikali ($^{\circ}\text{OH}$), superoksid (HO_2), vodikovi radikali ($^{\circ}\text{H}$), vodikov peroksid (H_2O_2) i solvatizirani elektroni (e^-_{aq}).

Ekstremni uvjeti nastali zvučnom kavitacijom iniciraju tri različita načina razgradnje organskih molekula u vodi koji obuhvaćaju oksidaciju hidroksilnim radikalima, oksidaciju u vodi koja je u superkritičnom stanju te pirolizu.

Primarni mehanizam je oksidacija hidroksilnim radikalima. Zbog njihove velike reaktivnosti onemogućeno je njihovo putovanje u samu otopinu zbog čega su samo molekule prisutne vrlo blizu površine šupljine podvrgnute oksidaciji. Oksidacija hidroksilnim radikalima kao mehanizam razgradnje prevladava kod nehlapivih organskih spojeva.

Drugi mehanizam obuhvaća nastajanje lokalizirane vruće točke s ekstremno visokim temperaturama i tlačnim gradijentima prilikom raspada šupljine. Voda unutar gradijenta egzistira kao superkritični fluid u kojemu je topljivost organskih molekula znatno povećana. Zbog povećane topljivosti, organske molekule dolaze sasvim blizu površine šupljine gdje se oksidiraju hidroksilnim radikalima.

Treći mehanizam je pirolitička razgradnja organskih molekula u parnoj fazi šupljine. Organski spojevi s većim tlakovima pare imat će veću koncentraciju pare unutar šupljine pa se očekuje da će piroliza kao mehanizam razgradnje prevladavati kod organskih spojeva s većim tlakovima pare.

2.5. Metode analize

2.5.1. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija je osnovna metoda odjeljivanja spojeva na temelju njihove različite hlapivosti. Kromatografski sustav sastoji se od pokretne i nepokretne faze te ispitivane tvari koja se tijekom kromatografskog procesa nalazi u dinamičkoj ravnoteži između tih dviju faza. Ispitivana tvar se pri unošenju u kromatografski sustav prevodi u plinovito stanje i eluira s kromatografske kolone inertnom plinovitom pokretnom fazom. Pokretna faza je plin nosioc, koji mora biti inertan prema pokretnoj i nepokretnoj fazi te prema analitu. Najčešće se u tu svrhu rabe inertni plinovi visoke čistoće kao što su helij, argon, dušik i vodik. Na zadržavanje analiziranih spojeva u koloni utječu tlak i temperatura kolone. Zbog otpora kolone tlak plina na ulazu u kolonu veći je od tlaka na izlazu iz kolone. Uslijed stlačivosti plina protok plina nosioca povećava se s porastom razlike u tlaku uzduž kolone. Tlak plina nosioca kontrolira se regulatorima i ventilima u samom kromatografu. Protok plina nosioca mora biti konstantan da bi se osigurala ponovljivost kromatografskih analiza. Osnovni konstrukcijski dijelovi plinskog kromatografa su metalni rezervoar za plin nosioc, injektor (uređaj za unošenje uzorka), kolona za odjeljivanje u termostatiranom prostoru te detektor. Detektori mogu biti univerzalni, poput plameno-ionizacijskog detektora, ili specifični, kao što su detektor zahvata elektrona, plameni fotometar, FTIR (engl. *Fourier Transform Infrared*) ili spektrometar masa. Prednost metode je u brzini, mogućnosti odjeljivanja vrlo složenih smjesa (više od 100 sastojaka) te maloj masi uzorka (nanogrami). Nedostatak je što se mogu odjeljivati samo lako hlapljivi i toplinski stabilni spojevi [47, 48].

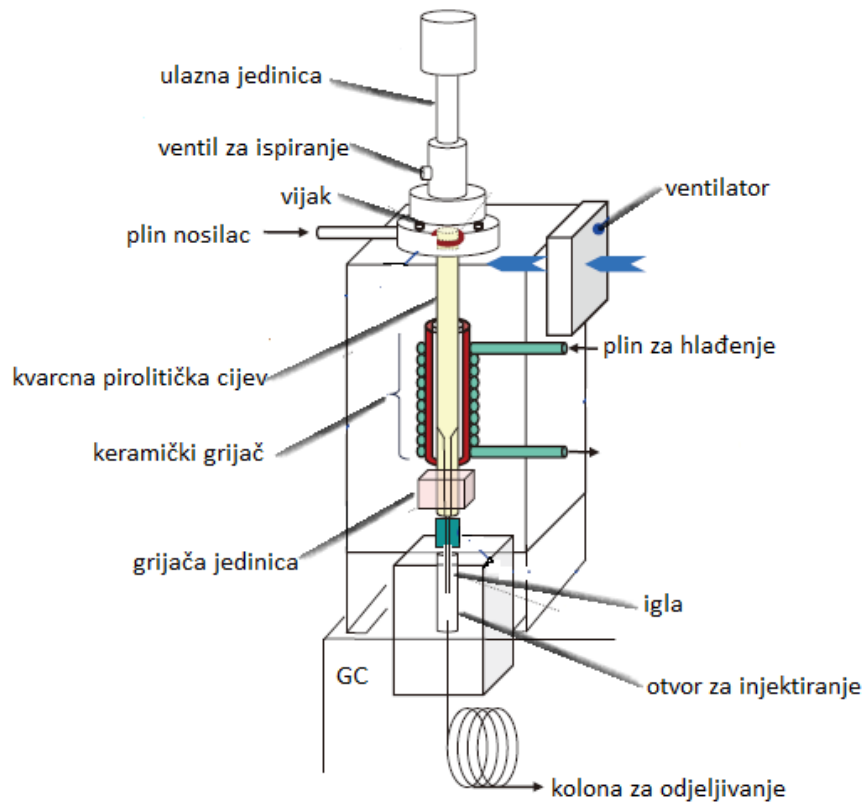
Sastav i struktura tvari i njihovih smjesa određuju se spektrometrijom masa u parnoj fazi mjerenjem relativne mase atoma ili molekula (omjer mase i naboja) i količine iona nastalih njihovom ionizacijom. Danas je to jedna od najvažnijih tehnika u analizi tragova i ultratragova u uzorcima iz okoliša [49].

U spektrometru masa molekule analita se sustavom za uvođenje uzorka dovode u ionizacijsku komoru uz minimalno narušavanje vakuuma. U ionizacijskoj komori (ionskom izvoru) molekule analita se ioniziraju i fragmentiraju, a nastali ioni usmjeravaju se u analizator masa gdje se odjeljuju u prostoru i vremenu na temelju njihovog omjera mase i naboja, m/z . Nastali ioni mogu biti jednostruko ili višestruko, pozitivno ili negativno nabijeni. Osim nabijenih čestica manje mase, fragmentiranjem nastaju i neutralne male molekule ili radikali koje uređaj ne registrira. Vakuum je potreban da bi se spriječila kolizija između iona i molekula, koja može uzrokovati ili nastajanje neželjenih produkata ili gubitak naboja iona analita. Ioni se nakon prolaska kroz analizator masa moraju detektirati i prevesti u mjerljivi signal. U tu svrhu koristi se nekoliko komercijalno dostupnih detektora. Danas se uglavnom koriste detektori koji pojačavaju signal, kao što su elektronski ili fotomultiplikator. Rezultat je spektar pikova čija je visina određena količinom fragmenata. Uređaj se sastoji od sustava za unošenje uzoraka, ionskog izvora, analizatora masa, detektora te sustava za obradu signala i prikaz rezultata. Velika prednost spektrometrije masa je niska granica dokazivanja (10^{-12} g) i dobra ponovljivost određivanja. Primjenjiva je u analizi uzoraka s niskom koncentracijom analita ili kada je na raspolaganju vrlo ograničena količina uzorka [50, 51].

2.5.1.1. Pirolitička plinska kromatografija sa spektrometrijom masa

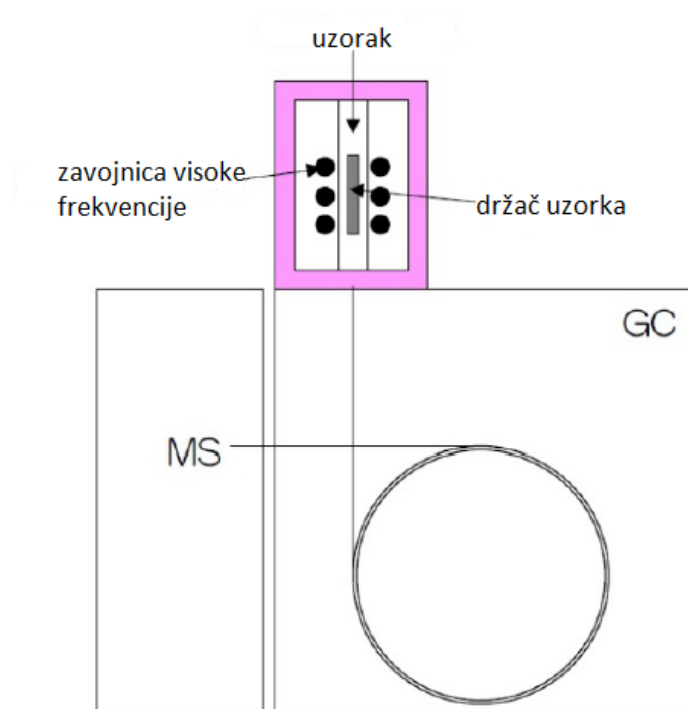
Organski pigmenti su u širokoj primjeni u raznim formulacijama boja i tinta. Analiza pigmenata je otežana zbog njihove veoma slične strukture. Pirolitička plinska kromatografija sa spektrometrijom masa (Py-GC-MS) je tehnika koja se već godinama uspješno primjenjuje za identifikaciju i analizu boja i pigmenata u industrijskoj proizvodnji, konačnim proizvodima i okolišu [52]. DeFelippis i suradnici su započeli pirolizu azo boja 1995. godine, a opsežnu karakterizaciju sintetički proizvedenih pigmenata proveo je Sonoda 1999. godine [53]. Osim karakterizacije pigmenata i boja u prehrambenoj, tekstilnoj, naftnoj industriji, Py-GC-MS je često upotrebljavana tehnika za analizu u forenzici (npr. automobilske boje) [54].

Analitička piroliza je proces kemijske razgradnje velikih složenih molekula djelovanjem visoke temperature u svrhu dobivanja manjih, ali hlapivih fragmenata. Proces se odvija, bez prisutnosti kisika i vode, u uređaju koji se zove pirolizator, a nastali produkti se pomoću plina nosioca unose u kolonu plinskog kromatografa. Prednosti upotrebe Py-GC-MS, kao analitičke tehnike za analizu organskih pigmenata u kompleksnim matricama kao što je boja, su kraće vrijeme analize, minimalna priprema uzorka te mala količina uzoraka za analizu (nekoliko desetaka mikrograma) što je moguće zbog izravnog uvođenja uzorka u kromatografsku kolonu i kromatografskog razdvajanja. Glavni nedostatak pirolize je njezina destruktivna priroda [55]. Pirolizator se sastoji od ulazne jedinice, kvarcne pirolitičke cijevi, keramičkih grijača i ventila kroz koji ulazi plin nosioc (Slika 2.15).



Slika 2.15. Osnovni dijelovi pirolizatora [56]

Nakon što uzorak prođe kroz pirolizator injektira se u plinski kromatograf (Slika 2.16), pri čemu je bitno da između pirolizatora i injektora kromatografa bude uspostavljena dovoljno visoka temperatura čime bi se spriječila kondenzacija uzorka. Osim toga, analizom malih količina uzoraka izbjegava se preopterećenje pirolizatora te njegova kontaminacija.



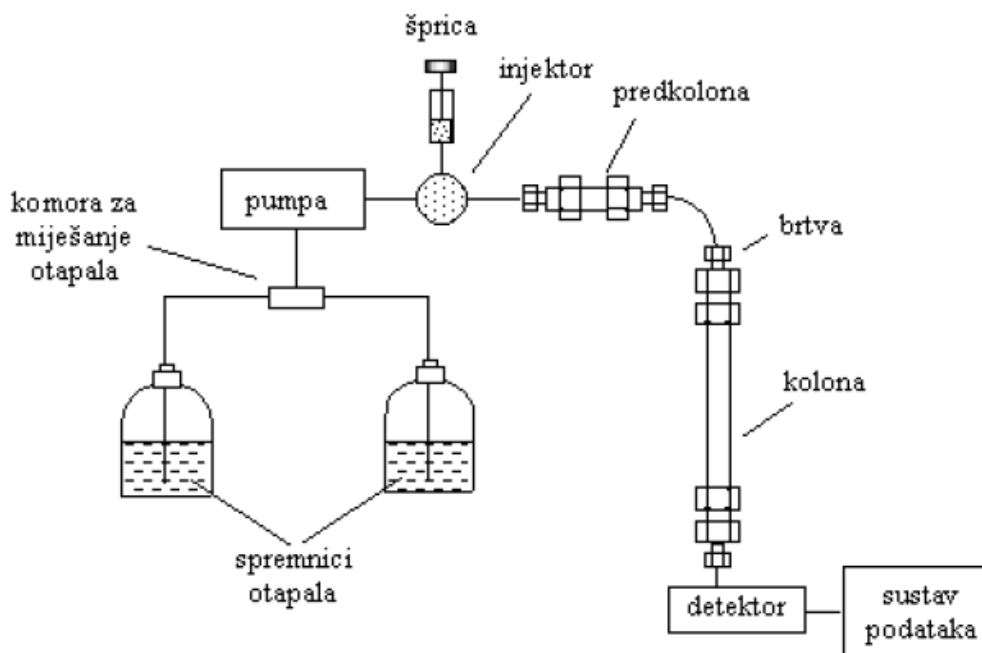
Slika 2.16. Shematski prikaz sustava Py-GC-MS [57]

2.5.2. Tekućinska kromatografija

Tekućinska kromatografija je tehnika koja se uspješno primjenjuje za razdvajanje širokog raspona molekula kao što su to polimeri, male molekule farmaceutika i/ili njihovih metabolita, proteina i sl. Prikladna je za odjeljivanje spojeva male i velike molekulske mase te termički nestabilnih spojeva. Zbog široke mogućnosti primjene koristi se u medicini, farmaciji, ekologiji, forenzici, suvremenim biološkim znanostima, srodnim područjima molekularne biologije te analitičkoj i preparativnoj kemiji. Tekućinski kromatograf može se spregnuti sa spektrometrom masa. Izvor iona, analizator ili kombinacija više analizatora u istom instrumentu, tzv. spregnuta ili tandemna spektrometrija masa i detektor iona odabiru se u ovisnosti o vrstama analita [58].

Pokretna faza je tekućina i u njoj se analizirani uzorak mora dobro otapati i ne smije miješati s tekućom nepokretnom fazom. Nepokretna faza je smještena u koloni.

Tekućinski kromatograf sastoji se od sustava za dovod pokretne faze, sustava za injektiranje, kolone i detektora (Slika 2.17).



Slika 2.17. Shematski prikaz tekućinskog kromatografa [59]

Sustav za dovod pokretne faze sastoji se od spremnika pokretne faze i pumpe (ili više njih) koja omogućuje potiskivanje pokretne faze u kromatografsku kolonu uz kontrolirani protok. U kromatografskoj analizi važan je pravilan odabir pokretne faze što znači da tekućine moraju biti visoke čistoće te ujedno ne smiju sadržavati otopljene plinove i čvrste čestice. Pumpa ubacuje pokretnu fazu u stupac pod visokim tlakom stalnom brzinom u rasponu od 0,1 do 10 mL/min, a uzorak se automatskim dodavanjem unosi u sustav za injektiranje, tzv. petlju obujma 5 – 500 μL u kojoj se održava stalan tlak. Otapalo prolazi kroz injektor te unosi uzorak u kolonu koja je obično cijev od nehrđajućeg čelika, duljine 50 – 250 mm, unutarnjeg promjera 2 – 4,6 mm, punjena česticama veličine 1,7 – 5 μm , a najčešće 4 ili 5 μm . Osim glavne kolone u sustavu postoje i pretkolone čija je uloga zaštita kromatografske kolone i postizanje boljeg razdvajanja sastojaka [60].

Detektori detektiraju sastojke na temelju njihovih svojstava kao što je fluorescencija, indeks loma, elektrokemijska reakcija, apsorpcija UV svjetla, vodljivost itd. Važni detektori su spektrometar masa, spektrofotometrijski u UV/VIS području elektromagnetskog zračenja, detektori na osnovi molekulske fluorescencije, indeksa loma, elektrokemijski detektori te oni koji se temelje na raspršenju elektromagnetskog zračenja na isparenom uzorku.

Do prije dvadesetak godina, tekućinska kromatografija i spektrometrija masa bile su dvije potpuno odvojene tehnike. Sedamdesetih i osamdesetih godina došlo je do uspješnog

povezivanja tih dviju tehnika uz primjenu ionizacije pri atmosferskom tlaku i primjene na raznim područjima kemije. Spregnuta (tandemna) spektrometrija masa (MS/MS, MS/MS/MS odnosno MSⁿ) je metoda u kojoj analiza masa slijede jedna za drugom. MS/MS instrumenti mogu biti spregnuti vremenski ili prostorno. Vremenski spregnuti uređaji sve stupnjeve MS/MS analize provode u istom analizatoru, ali vremenski odvojeno, dok prostorno spregnuti uređaji zahtijevaju odvojene analizatore masa u svakom stupnju MS/MS analize. Magnetni sektorski, kvadrupolni (Q, engl. *Quadrupole*) i uređaji mjerenja vremena preleta (TOF, engl. *Time of Flight*) uređaji su prostorno spregnuti, a mjerni uređaj s ionskim klopama (IT od engl. *Ion Trap*, FT-ICR od engl. *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*) primjeri su vremenski spregnutog sustava [61, 62].

Postoji više načina praćenja odjeljivanja spektrometrijom masa no najviše se koristi praćenje jednog ili više odabranih fragmenata (MRM, engl. *Multiple Reaction Monitoring*) koji služi i za snimanje iona produkata (PI, engl. *Product Ion*). Detektiranje odabrane reakcije odnosno fragmentacije osniva se na reakciji raspada iona koji su karakteristični za analizirani spoj. Praćenje tih reakcija sastoji se u propuštanju određenog iona u kolizijsku ćeliju, razlaganju odabranog iona kolizijom i praćenju jednog ili više iona fragmenata nastalih nakon kolizije. Podešavanjem parametara svih analizatora masa omogućen je prolaz samo onih iona koji nastaju reakcijom razlaganja spoja koji se prati u odabranome području reakcije. Ioni (općenito molekulski ioni, M^+ , $(M+H)^+$, $(M-H)^+$) nastali u ionskom izvoru ulaze u analizator masa gdje se u prvom analizatoru izdvaja željeni ion, zatim u tzv. kolizijskoj ćeliji, nakon disocijacije nastale sudarom molekuskog iona i inertnog plina (npr. dušika) (CID, engl. *Collision Induced Dissociation*), nastaju ioni produkti odabranog iona kojima se u drugom analizatoru (kvadrupolu) određuju omjeri m/z . Takvo serijsko povezivanje omogućuje analiziranje složenih smjesa, a donja granica detekcije određenih spojeva spušta se na pikogramske i femtogramske vrijednosti [63].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 Materijali

3.1.1. Kemikalije

Korištene kemikalije su:

- Heksan, C_6H_{14} ; proizvođač: Sigma Aldrich, Njemačka, stupanj čistoće *puriss. p.a.*
- Toluen, C_7H_8 ; proizvođač: Merck, Njemačka, stupanj čistoće *p.a.*
- Acetonitril, CH_3CN ; proizvođač: Merck, Njemačka, stupanj čistoće *LiChrosolv*
- NaDCC (Slika 3.1)

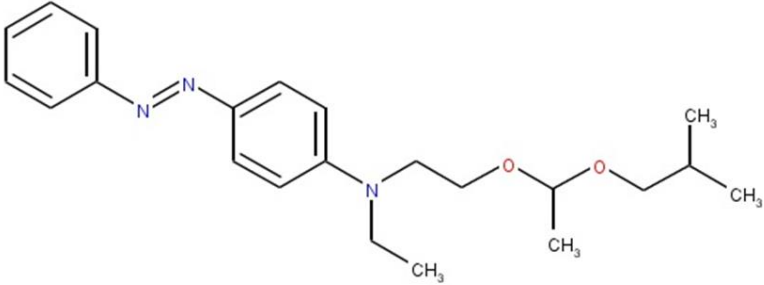


Slika 3.1. NaDCC u obliku tableta

3.1.2. Solvent Yellow 124

Iako se C.I. Solvent Yellow 124 najčešće dodaje kao marker za raspoznavanje goriva različitih poreznih razreda, jako je malo istražen i dostupno je malo podataka o njegovim svojstvima. Dostupni podaci za SY124 dani su u Tablici 3.1.

Tablica 3.1. Dostupni podaci za marker Solvent Yellow 124 [64]

Euromarker	Solvent Yellow 124
Naziv po IUPAC-u	<i>N</i> -etil- <i>N</i> -[2-(izobutoksietoksi) etil](4-fenilazofenil)amin
Sinonimi	Sudan 455, Somalia Yellow, T10
CAS broj	34432-92-3
Empirijska formula	C ₂₂ H ₃₁ N ₃ O ₂
Molekulska struktura	
Molarna masa, g/mol	369,5
T _v , °C	489
Gustoća, g/cm ³	1,02

3.2 Instrumenti

3.2.1. Analitička vaga

Analitička vaga je instrument koji se koristi za precizno određivanje mase uzoraka. Korištena je analitička vaga Mettler Toledo XA105DU (Slika 3.2), čiji je maksimalan kapacitet 120 g, a mogućnost očitavanja je 0,01 g.



Slika 3.2. Analitička vaga Mettler Toledo XA105DU

3.2.2. Plinski kromatograf sa spektrometrom masa

Analiza uzoraka nakon obrade ultrazvukom provedena je na GC-MS-QP2010 Ultra uređaju (Slika 3.3) tvrtke Shimadzu. Uređaj sadrži metalni rezervoar za plin nosioc (helij), automatski dodavač uzoraka (AOC-20i), kolonu za odjeljivanje u termostatiranom prostoru te detektor. Korištena je kolona HP-5-MS duljine 30 m, unutarnjeg promjera 0,25 μm i vanjskog promjera 0,25 mm.

Plinski kromatograf spojen je na kvadrupolni analizator masa (MS) kojim su detektirani analiti. Plinoviti produkti koji izlaze s plinsko-kromatografske kolone ulaze u ionski izvor, ioniziraju se udarom elektrona, EI (engl. *Electron Impact Ionization*), energije 70 eV, uz programsku podršku za obradu i upravljanje podataka LabSolutions GCMS solution verzija 2.7.1.



Slika 3.3. Plinski kromatograf GC-MS-QP2010 Ultra sa spektrometrom masa

3.2.3. Pirolitički plinski kromatograf sa spektrometrom masa

Toplinska razgradnja uzoraka provedena je na pirolitičkoj jedinici EGA/Py-3030D tvrtke Frontier Lab (Slika 3.4). Pirolitička jedinica sastoji se od ulazne jedinice, kvarcne pirolitičke cijevi, keramičkih grijača i ventila kroz koji ulazi plin nosioc (helij). Raspon radnih temperatura pirolizatora je od 10 °C do 1050 °C.

Oslobođeni plinoviti produkti analizirani su tandemnim sustavom plinskog kromatografa i spektrometra masa GC-MS-QP2010 Plus, tvrtke Shimadzu. Korištena je kolona Ultra ALLOY duljine 30 m, unutarnjeg promjera 0,25 µm i vanjskog promjera 0,25 mm.

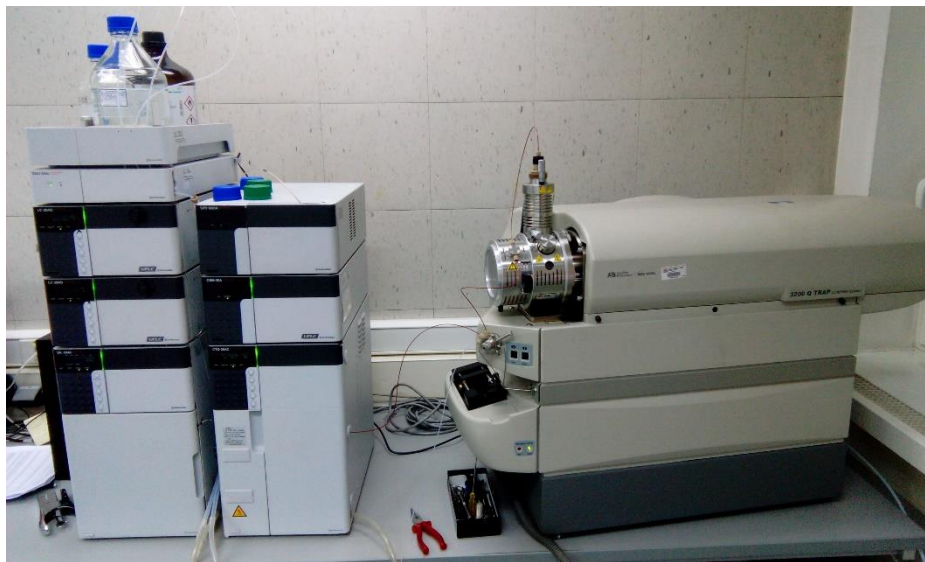
Plinski kromatograf spojen je na kvadrupolni spektrometar masa kojim su detektirani analiti. Plinoviti produkti u ionskoj komori spektrometra masa ionizirani su udarima elektrona, EI (engl. *Electron Impact Ionization*), energije 70 eV, uz programsku podršku za obradu i upravljanje podataka LabSolutions GCMS solution verzija 2.7.1.



Slika 3.4. Pirolitička jedinica EGA/Py-3030D povezana s GC-MS-QP2010

3.2.4. Tekućinski kromatograf vezan s tandemnim spektrometrom masa

Uzorci su, nakon obrade ultrazvukom, snimljeni na vezanom sustavu tekućinske kromatografije i spektrometrije masa HPLC-ESI-MS/MS (engl. *High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry*) koji se sastoji od HPLC uređaja Shimadzu Prominence serije 20 (Slika 3.5) i MS/MS spektrometra masa AB Sciex QTrap 3200 uz programsku podršku za upravljanje i obradu podataka Analyst 1.6.1. Ionizacija uzoraka provedena je elektroraspršenjem (eng. *Electrospray Ionization*) u pozitivnom načinu ionizacije. HPLC se sastoji od sustava za dovod pokretne faze, sustava za injektiranje, kolone i detektora. Korištena je kolona Agilent Technologies Poroshell 120 EC-C18. Kolona je punjena sorbansom promjera čestica 2,7 μm , a dimenzije kolone su 2,1 x 100 mm.



Slika 3.5. Tekućinski kromatograf HPLC (Shimadzu Prominence serije 20) vezan sa MS/MS (AB Sciex QTrap 3200)

3.2.5. Ultrazvuk

Ultrazvučna razgradnja otopina SY124 provedena je ultrazvučnim homogenizatorom SONOPULS HD 2200 (Bandelin, Njemačka) (Slika 3.6). Uređaj se sastoji od generatora, ultrazvučnog pretvornika (model SH70G; uključujući sondu, pojačivač i rog) te vrha sonde (tanki ploča) koja je načinjena od titanske legure (TT13; promjera 13 mm). Frekvencija ultrazvučnog homogenizatora iznosi 20 kHz, a izlazna snaga je do 200 W. Eksperimenti su provedeni u cilindričnom kotlastom reaktoru načinjenom od borosilikatnog stakla s rashladnim plaštem i maksimalnog radnog volumena od 0,75 L. Ultrazvučna sonda je postavljen okomito u sredinu reaktora.



Slika 3.6. Ultrazvučni homogenizator SONOPLUS HD 2200

3.3. Opis rada

3.3.1. Priprema standardnih otopina

Standardna otopina indikatora SY124, mase 50 mg, prenesena je kvantitativno višekratnim ispiranjem toluenom u petrijevu zdjelicu. Otopina je ostavljena kako bi sav toluen ispario. Preostali suhi ostatak indikatora je potom otopljen u acetonitrilu i kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu od 1 L čime je dobivena otopina SY124 koncentracije 50 mg/L.

Za analizu uzorka indikatora SY124 na pirolizatoru, u teflonske posudice otpipetirano je 50 μ L pripremljene otopine SY124 i otpareno do suha nakon čega je uzorak stavljen na snimanje.

Za provedbu eksperimenata s ultrazvukom prethodno pripremljena otopina SY124 u acetonitrilu je razrijeđena s deioniziranom vodom u omjeru 1:3. Nakon obrade ultrazvukom uzorci su analizirani tehnikama tekućinske i plinske kromatografije. Za potrebe snimanja na tekućinskom kromatografu neke su otopine prilagođene za snimanje razrjeđenjem s vodom. Otopine obrađene ultrazvukom iz eksperimenata 1, 3, 4, 5, 6 i 8 nisu razrjeđivane prije snimanja na LC-MS/MS-u. Otopina iz eksperimenta 7 te početna otopina eksperimenta 9 razrijeđene su vodom i faktor razrjeđenja iznosi 20, dok za otopinu iz eksperimenta 0 faktor razrjeđenja iznosi 11,1. Svi su uzorci nakon razrjeđenja homogenizirani na ručnoj miješalici 30 s.

Uzorci snimani na LC-MS/MS-u uzeti su za daljnje snimanje na GC-MS-u. Količina uzoraka preostala nakon snimanja na tekućinskom kromatografu ekstrahirana je s 500 μ L heksana i svaki je uzorak miješan 30 s na ručnoj miješalici. 400 μ L heksanskog sloja iz uzorka otpipetirano je u novu staklenu bočicu i upareno do suha u struji dušika. U upareni uzorak ponovno je dodano 50 μ L heksana. Svi uzorci pripremljeni su na isti način i stavljeni na snimanje.

3.3.2. Analiza uzoraka pirolitičkom plinskom kromatografijom sa spektrometrijom masa

Toplinska razgradnja standardne otopine SY124, čija je priprema opisana u poglavlju 3.3.1., provedena je u pirolitičkoj jedinici EGA/Py-330D tvrtke Frontier Lab. Piroliza svih uzoraka provedena je pri temperaturama od 100 do 500 °C tijekom 1 min.

Nakon pirolize uzorci su analizirani tandemnim sustavom plinskog kromatografa i spektrometra masa. Kao pokretna faza koristio se helij. Uvjeti kromatografskog odjeljivanja i mjerenja spektara masa navedeni su u Tablicama 3.2 i 3.3. Pojedini spojevi identificirani su usporedbom spektara masa iz ukupnog ionskog kromatograma (engl. *Total Ion Chromatogram*, TIC) sa spektrom masa poznatog spoja pohranjenog u certificiranim bazama podataka (NIST08, WILEY275).

Tablica 3.2. Uvjeti kromatografskog odjeljivanja

Kolona	Ultra ALLOY, 30 m, unutarnji promjer 0,25 μ m, vanjski promjer 0,25 mm
Temperatura injektora	250 °C
Način rada	Razdvajanje protoka (<i>split</i>)
„Split“ omjer	1:20
Tlak	100 kPa
Protok kroz kolonu	1,78 mL/min
Temperatura kolone	$T_{\min} = 40$ °C Brzina zagrijavanja kolone 20 °C/min $T_{\max} = 320$ °C, $t_{300} = 5$ min
Plin nosioc	Helij

Tablica 3.3. Uvjeti mjerenja spektara masa

Detektor	Kvadrupolni analizator masa
Energija elektrona	70 eV
Raspon m/z	35-500 Da
Temperatura međuspoja	295 °C
Temperatura ionskog izvora	230 °C

3.3.3. Ultrazvuk

U svrhu praćenja promjena koje se događaju kad marker Solvent Yellow 124 dospije u prirodnu vodenu sredinu osmišljeni su eksperimenti gdje su pripravane otopine markera koje su potom obrađene ultrazvukom. Svrha ultrazvuka je da ubrza kemijske reakcije koje bi se dogodile tokom određenog vremena koje marker provede u okolišu.

Pripremljene otopine stavljene su u reaktor hlađen ledom s ciljem održavanja konstantne temperature (tijekom obrade ultrazvukom dolazi do zagrijavanja reakcijske posude). Čaša u kojoj se nalazi otopina SY124 obložena je folijom kako ne bi došlo do razgradnje uzorka pod utjecajem svjetla. Napravljen je niz eksperimenata:

- 0) Otpipetirano je 150 mL otopine SY124 u deioniziranoj vodi (priprema opisana u poglavlju 3.3.1.) i stavljeno u čašu od 250 mL. Nakon što je ultrazvučna sonda uronjena u čašu s pripremljenom otopinom SY124, koja se nalazi unutar reaktora, uključen je generator. Uzet je početni uzorak (prije ultrazvuka), te uzorci nakon 1, 2, 5, 7, 10, 13 i 15 min ultrazvučne obrade. Na sličan način obrađene su i otopine iz daljnjih eksperimenata uz razliku sadržaja otopine i vremena prikupljanja ultrazvuka.
- 1) Otpipetiran je alikvot od 150 mL otopine SY124 u deioniziranoj vodi u što je dodana tableta NaDCC-a mase 13,4 mg (3,80 mg NaDCC-a). Kako je masa jedne tablete NaDCC u izvornom pakiranju 60 mg, a svaka tableta sadrži 17 mg NaDCC-a, slijedi da je maseni udio NaDCC-a u jednoj tableti 28,33 %. Otopina je obrađena ultrazvukom, a uzorci su prikupljeni nakon 1, 2, 5, 7, 10, 13 i 15 min.
- 2) Otpipetirano je 150 mL iste otopine SY124 u deioniziranoj vodi u koju je dodana tableta NaDCC-a mase 5 mg (1,42 mg NaDCC-a).
- 3) Otpipetiran je alikvot od 150 mL otopine SY124 u deioniziranoj vodi u što je dodana tableta NaDCC-a mase 15,0 mg (4,24 mg NaDCC-a). Ovaj eksperiment je bio sličan eksperimentu

- 1) s razlikom što nije primijenjen ultrazvuk već je miješanje rađeno miješalicom. Ovim eksperimentom želio se utvrditi utjecaj ultrazvuka na SY124, odnosno što se s analitom događa kad nema ultrazvuka. Uzet je početni uzorak, te uzorci nakon 2, 5, 10 i 15 min miješanja.
- 4) Budući su acetonitril i deionizirana voda sastavni dio otopine SY124 koja je korištena u svim prethodnim eksperimentima, cilj ovog eksperimenta bio je utvrditi postoji li utjecaj ultrazvuka na korištena otapala. U tu svrhu otpipetirano je 50 mL acetonitrila i 100 mL deionizirane vode. Uzorci su prikupljeni nakon 2, 5, 10 i 15 min ultrazvučne obrade. Početni pH otopine je 6,5-7 kao i konačni.
- 5) Kao i u prethodnom eksperimentu, ovdje se želio utvrditi utjecaj ultrazvuka na vodenu otopinu NaDCC-a. U tu svrhu uzeto je 150 mL vode i tableta NaDCC-a mase 18 mg (5,10 mg NaDCC-a). Uzorci su prikupljeni nakon 2, 5, 10 i 15 min ultrazvučne obrade.
- 6) Ovim eksperimentom želio se utvrditi utjecaj ultrazvuka na NaDCC, ali u prisutnosti oba otapala tj. acetonitrila i deionizirane vode. Iz tog razloga je ovaj eksperiment identičan eksperimentu 4) uz dodatak tablete NaDCC-a mase 15,4 mg. Uzorci su prikupljeni nakon 2, 5, 10 i 15 min ultrazvučne obrade.
- 7) Ovaj eksperiment sličan je eksperimentu 0) samo što je proveden u kiselim uvjetima. Otpipetirano je 150 mL otopine SY124 u deioniziranoj vodi u koju je dodana jedna kap klorovodične kiseline ($w = 37\%$). Početni pH tako pripremljene otopine bio je 4. Uzet je početni uzorak te uzorci nakon 1, 2, 5, 7, 10, 13 i 15 min ultrazvučne obrade.
- 8) U kiselu otopinu pripremljenu kao u eksperimentu 7) dodana je tableta NaDCC-a mase 2,7 mg (0,77 mg NaDCC-a). pH tako pripremljene otopine bio je između 3,5 i 4. Uzorci su prikupljeni nakon 1, 2, 5, 7, 10, 13 i 15 min ultrazvučne obrade.
- 9) U kiselu otopinu pripremljenu kao u eksperimentu 7) dodana je tableta NaDCC-a mase 2,7 mg (0,77 mg NaDCC-a). Za razliku od prethodnog eksperimenta otopina je samo miješana miješalicom bez primjene ultrazvuka. Uzet je početni uzorak, te uzorci nakon 5, 10 i 15 minuta miješanja.

Eksperimenti za praćenje stabilnosti markera SY124, zbog bolje preglednosti i praćenja analize rezultata, sažeti su u Tablici 3.4. U Tablici 3.4. nije prikazan eksperiment 2, jer se radi o eksperimentu potpuno identičnom eksperimentu 1 samo je eksperiment 2 rađen s manjom masom NaDCC. Eksperimenti 4-6 su eksperimenti u kojima nije bio prisutan marker SY124.

Tablica 3.4. Sažeti prikaz eksperimenata za praćenje stabilnosti markera SY124

Eksperimenti	Uvjeti provedbe eksperimenata
0	- neutralna otopina - UZV
1	- neutralna otopina - UZV - NaDCC
3	- neutralna otopina - miješalica - NaDCC
7	- kisela otopina - UZV
8	- kisela otopina - UZV - NaDCC
9	- kisela otopina - miješalica - NaDCC

Početni uzorci nisu uzimani u svakom eksperimentu, već je pretpostavljeno da bi početna koncentracija SY124 trebala biti ista za pojedine eksperimente budući da su pripremani na isti način.

U eksperimentima kojima se radilo s NaDCC-om početni uzorak nije uzet nakon njegovog dodavanja već prije (iako je NaDCC dodan na početku eksperimenta) jer su međueksperiment s običnom vodom, ali i kasniji eksperimenti sa SY124, pokazali trenutnu reakciju NaDCC-a s dodanim uzorkom, što se odrazilo kroz trenutnu promjenu žute ili ružičaste boje otopine u svjetliju.

3.2.3. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom vezanom s tandemnom spektrometrijom masa

Nakon obrade otopina SY124 ultrazvučnom metodom, dobiveni uzorci i standardne otopine snimljeni su na HPLC-MS/MS uređaju. Korištena je kromatografska kolona Poroshell na 40 °C uz čisti acetonitril kao pokretnu fazu, izokratno uz ukupni protok od 0,6 mL/min. Količina injektiranog uzorka u kolonu iznosila je 1 µL. Analiti su snimljeni u MRM načinu analize, a ionizacija uzoraka provedena je elektroraspršenjem u pozitivnom modu. FIA optimizacija (engl. *Flow Injection Acquisition*) i ugađanje spektrometra masa napravljeni su izravnim injektiranjem standarda analita otopljenih u acetonitrilu. Optimizirani naponi (DP, EP, CE) i ostale vrijednosti za MRM parove (prekursor/produkt) prikazani su u Tablicama 3.5 i 3.6.

Tablica 3.5. Optimizirani naponi i vrijednosti za MRM parove (prekursor/produkt)

Spoj	Ion prekursor, <i>m/z</i>	Ion produkt, <i>m/z</i>	DP	EP	CE
SY124	370,400	→ 270,500	51,00	4,50	39,00
	370,400	→ 252,200	46,00	5,50	27,00
	370,400	→ 132,200	36,00	12,00	39,00
	370,400	→ 77,00	41,00	5,50	75,00
SY124, hidrolizirani	270,400	→ 210,00	40,00	3,00	35,00
	270,400	→ 134,00	40,00	4,50	35,00
	270,400	→ 77,00	50,00	3,00	35,00
	270,400	→ 239,400	50,00	5,50	35,00

Tablica 3.6. Parametri mjerenja spektrometra masa MRM analizom

CUR	20,00
IS	5000,00
TEM	600,00
GS1	60,00
GS2	45,00
Ihe	ON
CAD	Medium

3.2.4. Analiza uzoraka plinskom kromatografijom sa spektrometrijom masa

Uzorci snimani na LC-MS/MS-u uzeti su za daljnje snimanje na GC-MS-u kako je opisano u poglavlju 3.3.1.

Snimanje je provedeno na GC-MS-QP 2010 Ultra tvrtke Shimadzu. Uvjeti kromatografskog odjeljivanja i mjerenja spektara masa navedeni su u Tablicama 3.7 i 3.8. Pojedini spojevi identificirani su usporedbom spektara masa iz ukupnog ionskog kromatograma (TIC) sa spektrima masa poznatih spojeva iz certificiranih baza podataka (NIST08, WILEY 275).

Tablica 3.7. Uvjeti kromatografskog odjeljivanja

Kolona	HP-5-MS, 30m, unutarnji promjer 0,25 μm , vanjski promjer 0,25 mm
Temperatura injektora	270 $^{\circ}\text{C}$
Način rada	Razdvajanje protoka (<i>split</i>)
„Split“ omjer	1:20
Tlak	50,8 kPa
Protok kroz kolonu	1 mL/min
Temperatura kolone	$T_{\text{min}} = 45\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_{45\text{ }^{\circ}\text{C}} = 3,7\text{ min}$ Brzina zagrijavanja kolone 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ $T_{\text{max}} = 295\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_{295\text{ }^{\circ}\text{C}} = 10\text{ min}$
Plin nosioc	Helij

Tablica 3.8. Uvjeti mjerenja spektara masa

Detektor	Kvadrupolni analizator masa
Energija elektrona	70 eV
Raspon m/z	45-550 Da
Temperatura međuspoja	295 $^{\circ}\text{C}$
Temperatura ionskog izvora	230 $^{\circ}\text{C}$
Odgoda snimanja	3,7 min

4. REZULTATI I RASPRAVA

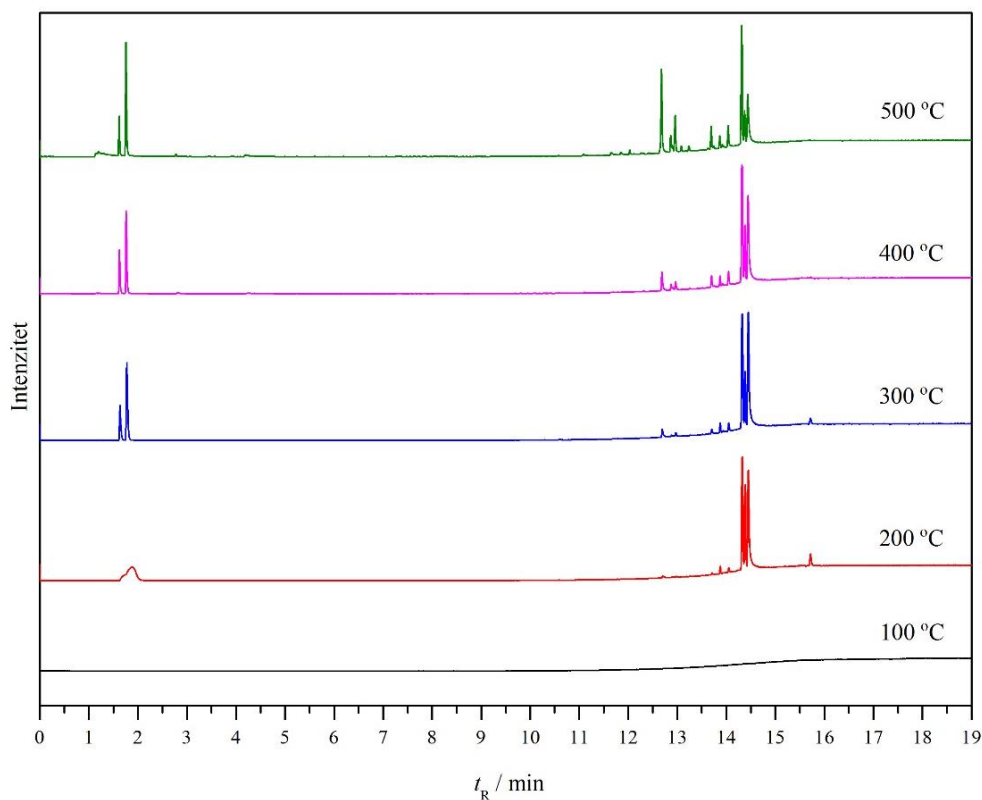
4.1. Rezultati pirolitičke razgradnje

Pirolitička plinska kromatografija sa spektrometrijom masa (Py-GC-MS) je destruktivna tehnika koja daje specifične fragmente piroliziranog uzorka koji ukazuju na njegovu strukturu i stabilnost. U ovom radu sustav Py-GC-MS korišten je za toplinsku razgradnju i identifikaciju razgradnih produkata markera Solvent Yellow 124. Toplinska razgradnja kojoj je podvrgnuta molekula markera SY124 tijekom pirolize karakterizirana je pucanjem veza u molekuli i stvaranjem slobodnih radikala. Put razgradnje ovisit će o vrsti veza unutar molekule podvrgnute pirolizi te stabilnosti manjih fragmenata nastalih razgradnjom.

Identifikacija dobivenih razgradnih produkata u kromatogramima (pirogramima) potpomognuta je usporedbom spektara masa iz ukupnog ionskog kromatograma sa spektrima masa poznatih spojeva pohranjenih u certificiranim bazama podataka (NIST08, WILEY275). Osim toga pojedinačno je analiziran spektar masa svakog razgradnog produkta kako bi se na osnovu prisutnih fragmenata u spektru moglo utvrditi njegovo karakteristično cijepanje što je ujedno bila potvrda njegove strukture.

U pirolitičkoj plinskoj kromatografiji temperatura pirolize jedan je od najvažnijih čimbenika koji utječe na rezultat analize. Izbor temperature prvenstveno ovisi o cilju analitičkog postupka. Temperatura analize mora se odabrati na način da omogući razgradnju uzoraka, a da pri tome fragmentacija uzoraka na bude pretjerana kako se ne bi izgubile informacije o uzorku.

Piroliza uzoraka SY124 provedena je pri temperaturama od 100 do 500 °C tijekom 1 min, a dobiveni pirogrami prikazani su na Slici 4.1.



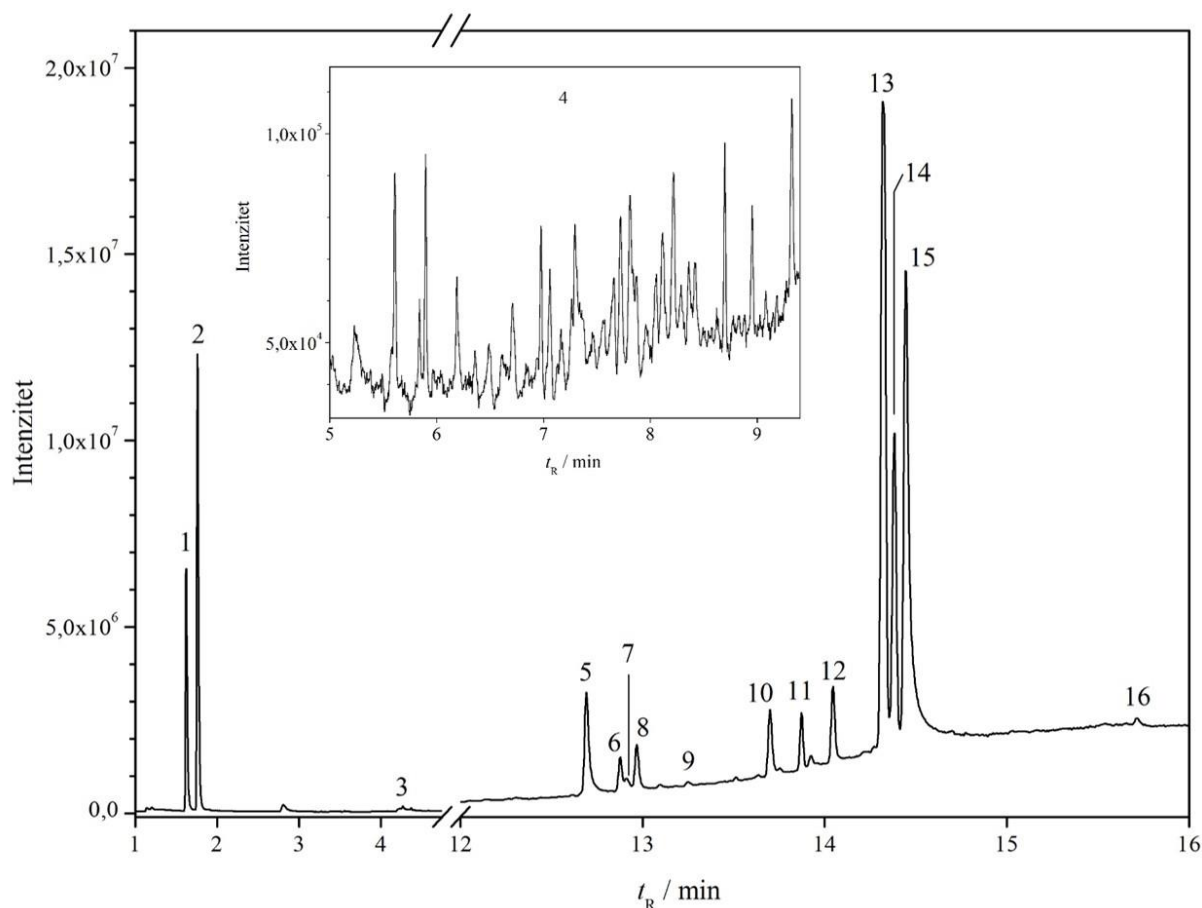
Slika 4.1. Pirogrami uzorka SY124 nakon pirolize pri temperaturama 100, 200, 300, 400 i 500 °C

Pri temperaturi od 100 °C u pirogramu nije prisutan ni jedan pik što znači da nije došlo do fragmentacije molekule C.I. SY124 jer je potpuno stabilna na temperaturama do 100 °C.

Povećanjem temperature pirolizatora na 200 °C uočen je drugačiji pirogram od onog pri 100 °C. Na 200 °C vidljiv je cijeli niz pikova u rasponu od 1,62 do 15,70 minuta. Pik na vremenu zadržavanja od 15,70 minuta predstavlja početnu molekulu SY124. Povećanjem temperature pirolizatora od 200 do 500 °C uočava se smanjenje intenziteta pika osnovne molekule što znači da se povećanjem temperature pirolizatora povećava stupanj fragmentacije početne molekule i pri 500 °C došlo je do njene potpune termičke razgradnje. Sukladno tome, intenzitet pikova na ostalim vremenima zadržavanja raste porastom temperature pirolizatora, te isto tako dolazi do pojave nekih novih pikova. Naime, povećanje temperature omogućuje bolju razgradnju početne molekule, nastanak većeg broja razgradnih produkata te porasta njihovih intenziteta. Razgradnjom pri 400 °C pikovi s početka pirograma postaju oštri i bolje razlučeni. Dublet oko 1,6 minuta znatno je bolje odijeljen, a intenzitet pika koji potječe od početne molekule markera znatno je slabijeg intenziteta.

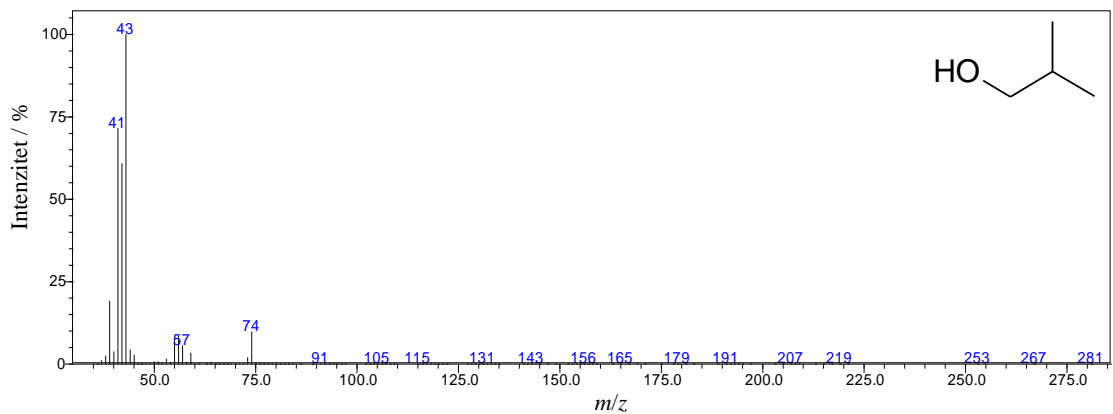
Posljednja istražena temperatura pirolize u ovom nizu, 500 °C, uzrokovala je promjene kromatografskog profila. Intenziteti pikova na početku kromatograma znatno rastu što više nije

posljedica samo razgradnje početne molekule markera, već dodatne fragmentacije odcijepljenih molekula. Dodatni produkti nastali razgradnjom pri 500 °C, a koji nisu vidljivi na pirogramima pri nižim temperaturama, fragmenti su već prethodno nastalih molekula, a ne početne molekule markera. Iz navedenog proizlazi da je optimalna temperatura pirolize za ovu vrstu markera 400 °C, pa se pirogram pri toj temperaturi pirolize koristi za identifikaciju produkata SY124 (Slika 4.2).

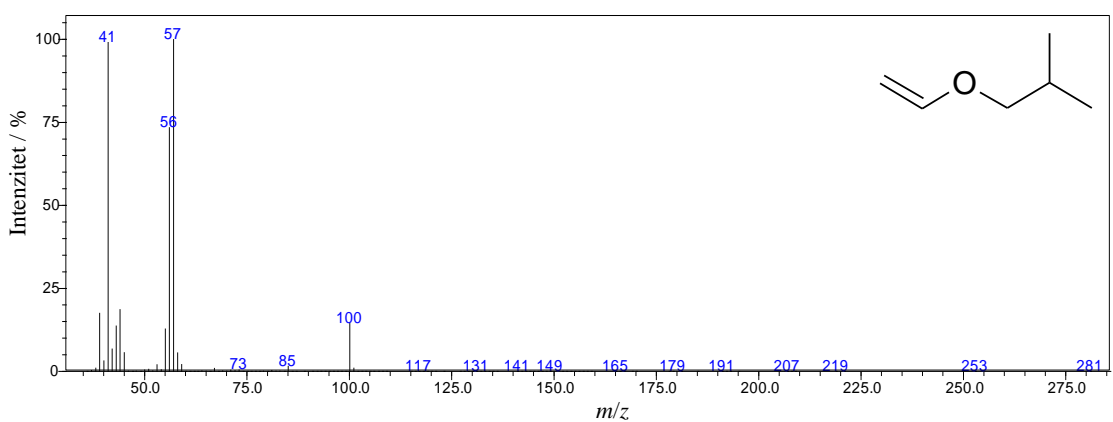


Slika 4.2. Pirogram uzorka SY124 nakon pirolize pri temperaturi od 400 °C

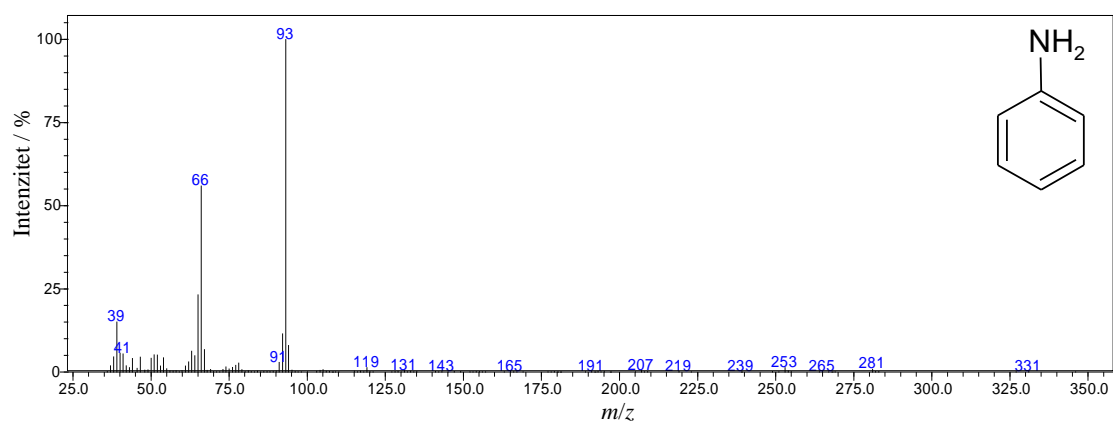
Pirolitičkom razgradnjom markera Solvent Yellow 124 na 400 °C identificirano je 15 produkata (pik pod brojem 16 je pik početne molekule SY124). Njihovi pikovi označeni su brojevima na pirogramu, a strukture su prikazane zajedno sa spektrima masa svakog pojedinog produkta na Slikama 4.3 – 4.18. Izuzev izobutilnog alkohola ($t_R = 1,62$ min), izobutil-vinil-etera ($t_R = 1,76$ min) i anilina ($t_R = 4,21$ min) razgradni produkti markera su molekule velike molekulske mase koje su zadržale azobenzen u svojoj strukturi, a do pregradnje je došlo na drugom kraju molekule.



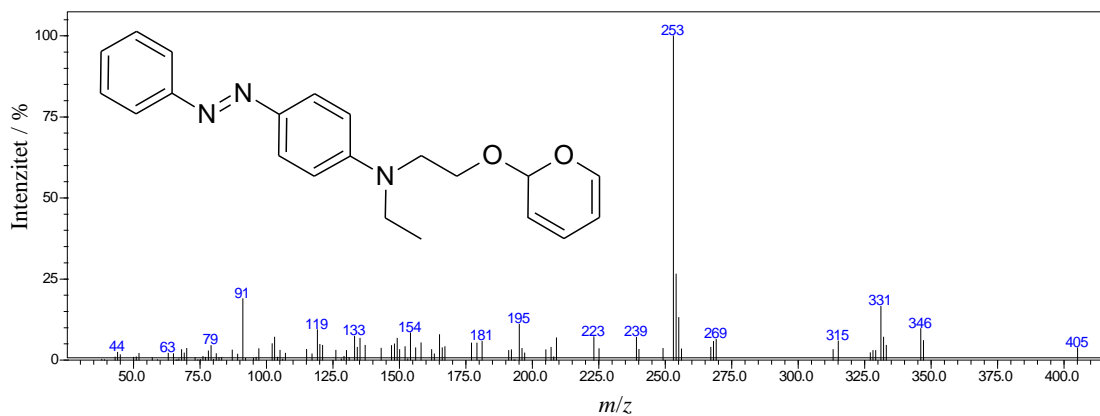
Slika 4.3. Spektar masa razgradnog produkta **1** molekule SY124 na $t_R = 1,62$ min



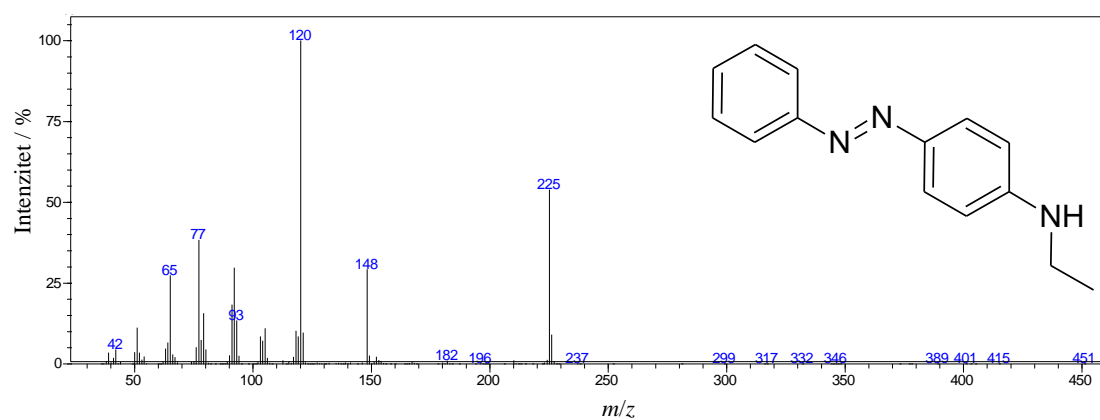
Slika 4.4. Spektar masa razgradnog produkta **2** molekule SY124 na $t_R = 1,76$ min



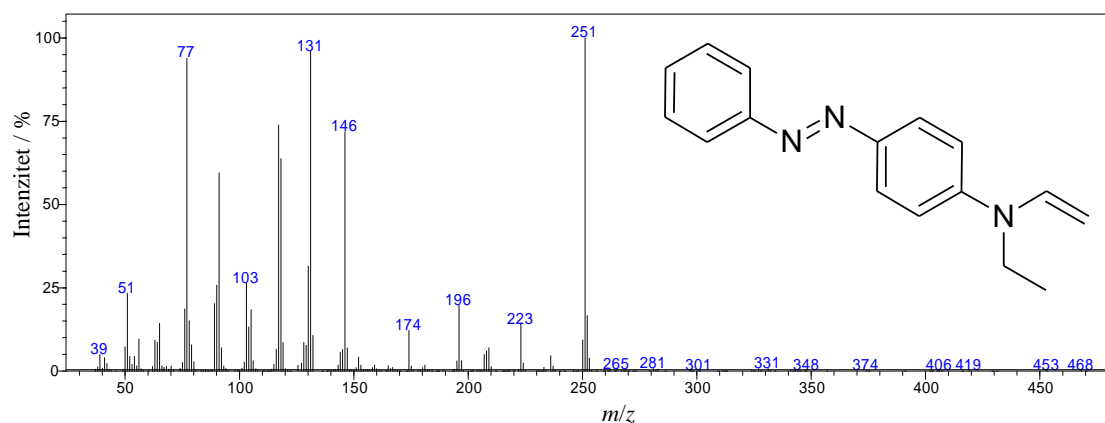
Slika 4.5. Spektar masa razgradnog produkta **3** molekule SY124 na $t_R = 4,21$ min



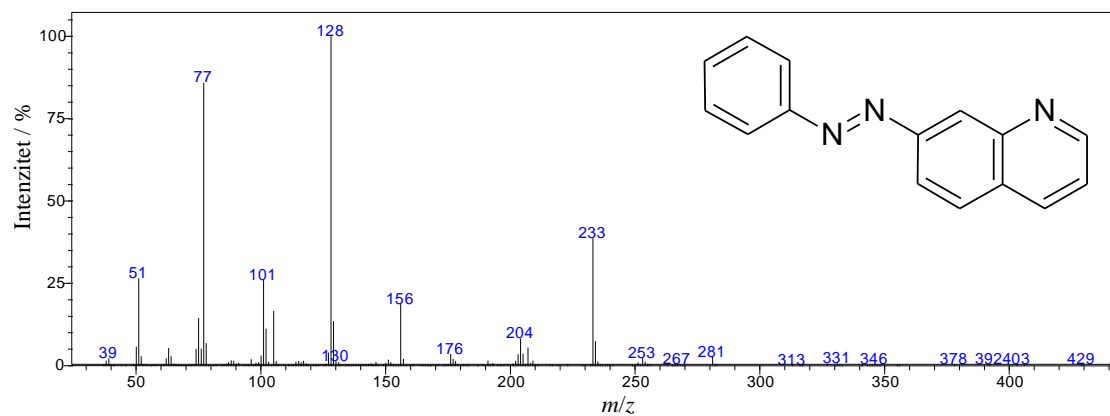
Slika 4.6. Spektar masa razgradnog produkta **4** molekule SY124 u raspnu $t_R = 5 - 9$ min



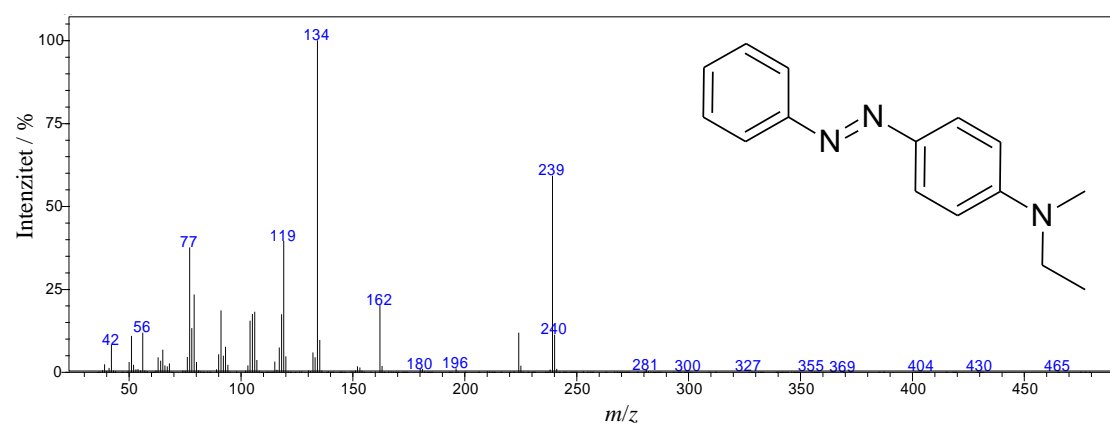
Slika 4.7. Spektar masa razgradnog produkta **5** molekule SY124 na $t_R = 12,68$ min



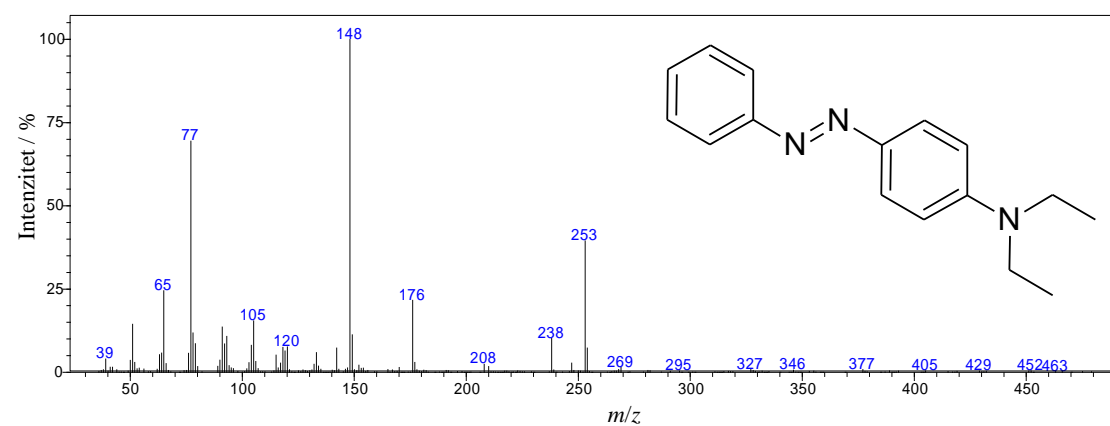
Slika 4.8. Spektar masa razgradnog produkta **6** molekule SY124 na $t_R = 12,88$ min



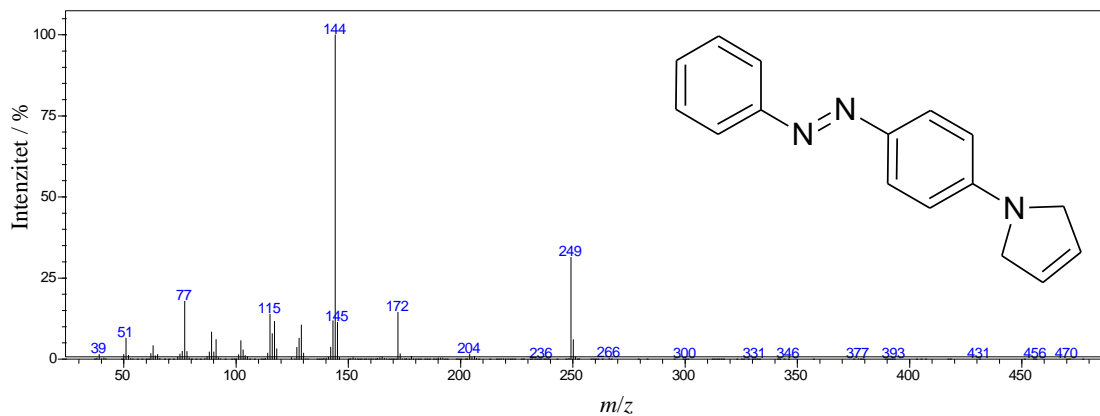
Slika 4.9. Spektar masa razgradnog produkta **7** molekule SY124 na $t_R = 12,91$ min



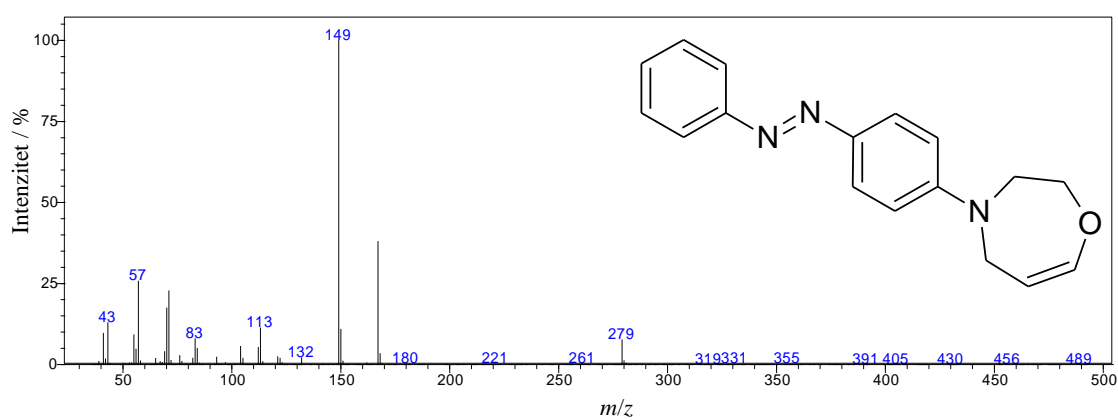
Slika 4.10. Spektar masa razgradnog produkta **8** molekule SY124 na $t_R = 12,96$ min



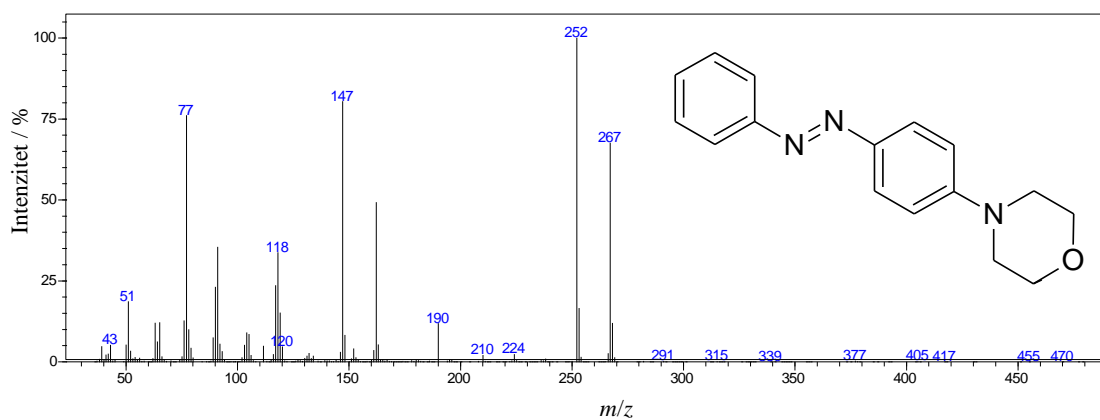
Slika 4.11. Spektar masa razgradnog produkta **9** molekule SY124 na $t_R = 13,25$ min



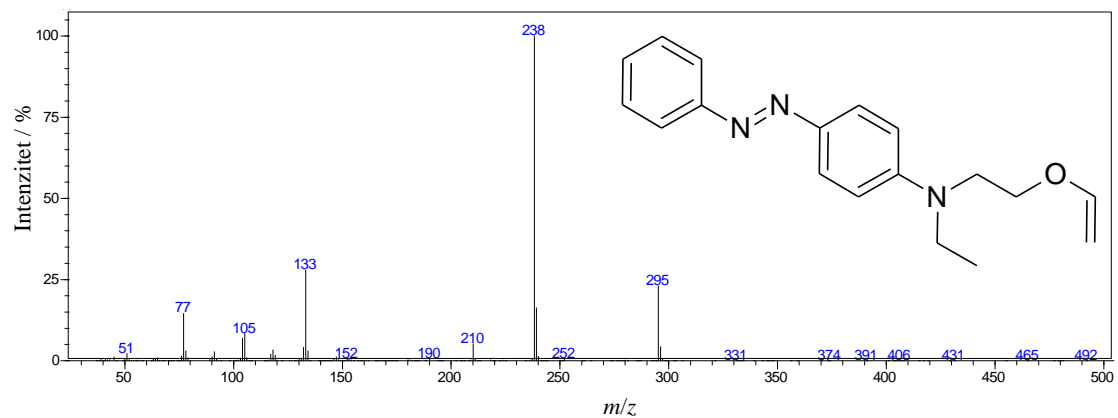
Slika 4.12. Spektar masa razgradnog produkt **10** molekule SY124 na $t_R = 13,70$ min



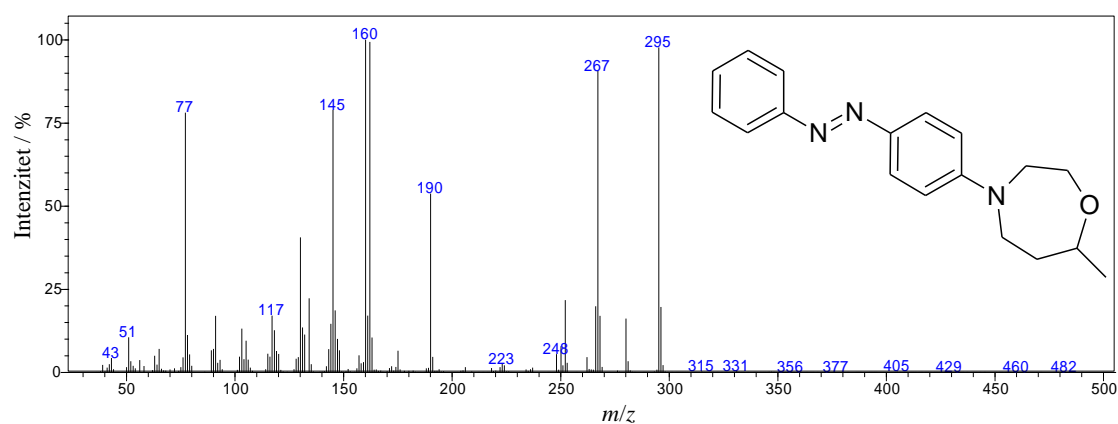
Slika 4.13. Spektar masa razgradnog produkta **11** molekule SY124 na $t_R = 13,87$ min



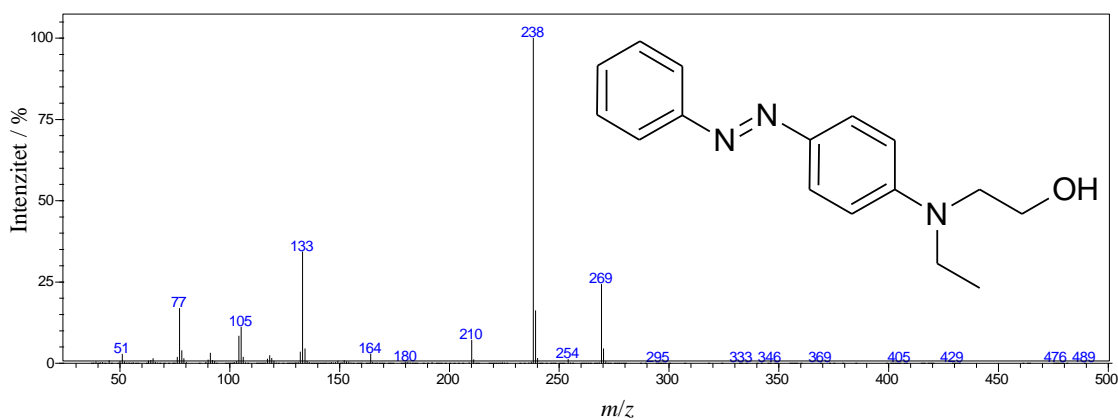
Slika 4.14. Spektar masa razgradnog produkta **12** molekule SY124 na $t_R = 14,04$ min



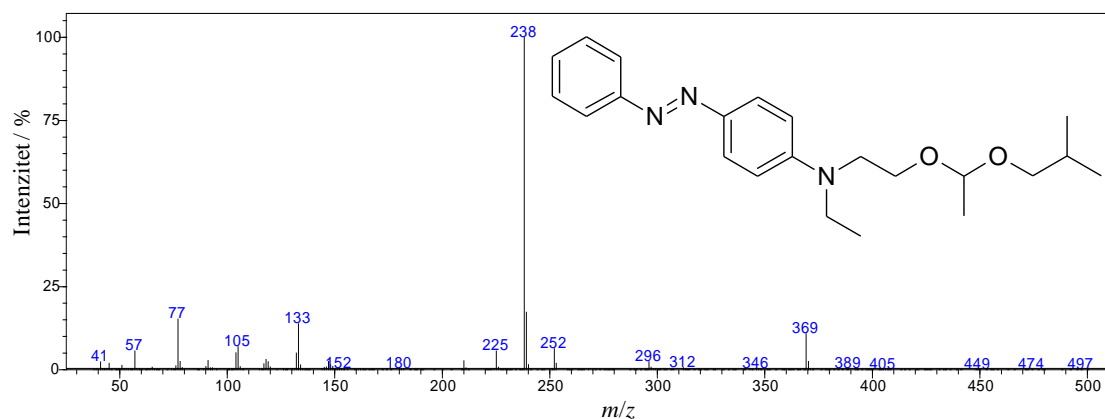
Slika 4.15. Spektar masa razgradnog produkta **13** molekule SY124 na $t_R = 14,32$ min



Slika 4.16. Spektar masa razgradnog produkta **14** molekule SY124 na $t_R = 14,38$ min



Slika 4.17. Spektar masa razgradnog produkta **15** molekule SY124 na $t_R = 14,44$ min



Slika 4.18. Spektar masa molekule SY124 na $t_R = 15,70$ min

4.1.1. Procjena toksičnosti nastalih produkata pirolitičke razgradnje

O toksičnosti azo bojila, kao i njihovih produkata govorilo se u poglavlju 2.2.2 i 2.2.2.1. Kod ovakvih vrsta bojila, kakav je C.I. Solvent Yellow 124, vrlo je važno odrediti što se događa s njim kad dospije u prirodu, a od osobite važnosti je odrediti štetnost njegovih produkata, bilo da oni nastaju raspadom u metabolizmu organizma, pod utjecajem svjetlosti, povišene temperature ili posredstvom kemikalija.

Redukcijom azo bojila nastaju kancerogeni aromatski amini. Poznato je da povećanjem broja aromatskih prstenova u molekuli raste njezin potencijal za kancerogenost. Najjednostavniji aromatski amin dobiven u našim eksperimentima je anilin (Slika 4.5). Dokazano je da pare anilina mogu proizvesti simptome trovanja u kratkom vremenu pri izlaganju koncentracijama nižim od 7 mg/L. Anilin djeluje na krv, pretvarajući hemoglobin u methemoglobin sa smanjenim kapacitetom prenošenja kisika što uzrokuje cijanozu. Također, djeluje na živčani sustav, srčane mišiće, a predugo izlaganje dovodi do pojave mentalne poremećenosti.

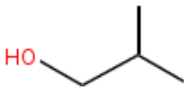
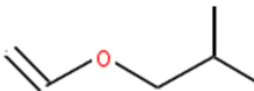
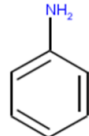
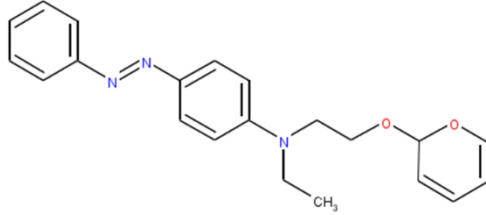
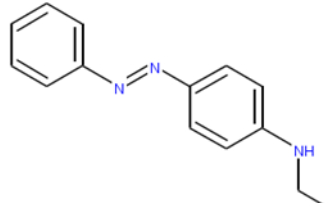
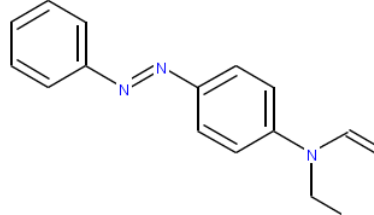
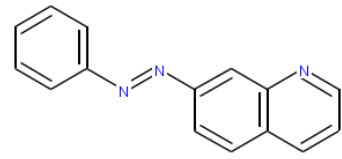
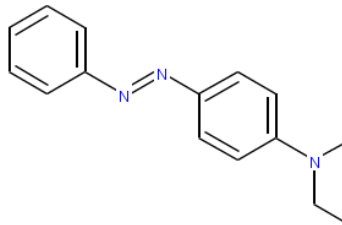
Na toksičnost aromatskih amina utječu supstituenti, pa tako nitro i metilne skupine, a osobito halogeni elementi povećavaju toksičnost tih spojeva.

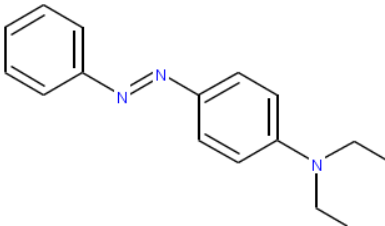
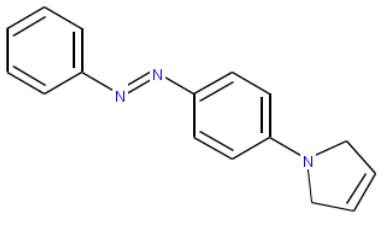
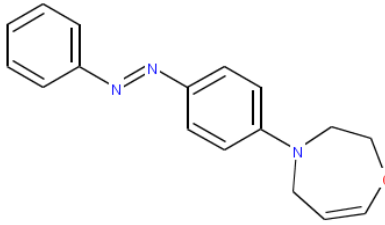
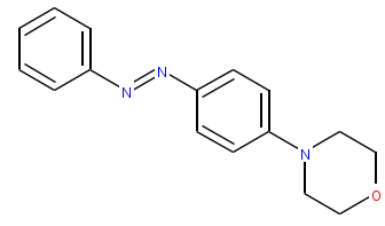
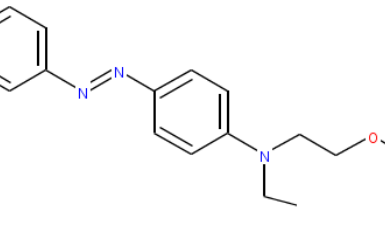
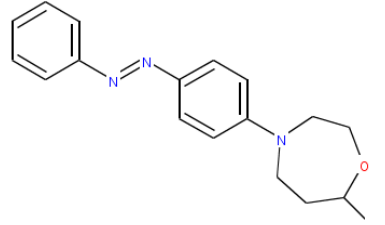
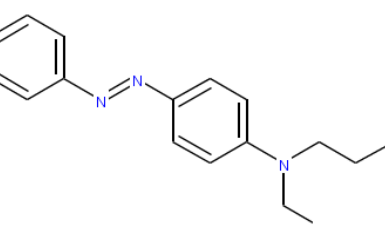
Kostur molekule SY124 sadrži aminoazobenzen, a kako su skoro svi produkti markera nakon pirolitičke obrade zadržali tu skupinu, važno nam je kako razni supstituenti i njihov položaj na toj molekuli mogu utjecati na toksičnost nastalog produkta. Supružnici Miller su 1953. godine proveli istraživanja o toksičnosti i kancerogenosti 4-dimetilamino azobenzena (DAB) i njegovih derivata, i utvrdili kako njihova toksičnost ovisi o skupini/skupinama koje su vezane na osnovu molekule (4-aminoazobenzen). Prema njihovim podacima mogli smo odrediti kancerogenost samo nekih naših produkata. Iz njihovog istraživanja poznato je da produkt 9

na $t_R = 13,25$ min ne pokazuje kancerogenu aktivnost, produkt **5** na $t_R = 12,68$ min pokazuje slabu kancerogenu aktivnost, a produkt **8** dobiven pri $t_R = 12,96$ min pokazuje izrazito veliku kancerogenu aktivnost.

Kako toksičnost ostalih produkata nije poznata, koristili smo se programom za procjenu toksičnosti TEST (engl. *Toxicity Estimation Software Tool*) [65]. Program je razvijen kako bi omogućio korisnicima da lako procijene toksičnost kemikalija pomoću modela kvantitativnih odnosa strukture i aktivnosti (engl. *Quantitative Structure Activity Relationships*, QSARs). QSAR su matematički modeli koji se koriste za predviđanje mjera toksičnosti na temelju fizičkih karakteristika strukture kemikalija (poznatih kao molekularnih deskriptora). Jednostavni QSAR modeli računaju otrovnost kemikalija pomoću jednostavne linearne funkcije. Za proračune smo koristili konsenzus metodu (engl. *Consensus method*) koja predviđa toksičnost na temelju prosjeka procjena toksičnosti ostalih navedenih metoda unutar QSAR modela. Za karakterizaciju produkata radila se procjena bioakumulacijskog faktora i razvojne toksičnosti, a rezultati su dani u Tablici 4.1.

Tablica 4.1. Analiza toksičnosti razgradnih produkata dobivenih pirolitičkom razgradnjom molekule SY124

	Produkt	Bioakumulacijski faktor	Razvojna toksičnost
$t_R = 1,62$ min		2,20	+ (0,84)
$t_R = 1,76$ min		5,46	+ (0,69)
$t_R = 4,21$ min		2,03	+ (0,69)
$t_R = 5-9$ min		26,60	+ (0,89)
$t_R = 12,68$ min		80,97	- (0,28)
$t_R = 12,88$ min		81,19	- (0,39)
$t_R = 12,91$ min		69,47	+ (0,58)
$t_R = 12,96$ min		91,93	- (0,45)

$t_R = 13,25$ min		71,28	+ (0,56)
$t_R = 13,70$ min		62,70	+ (0,59)
$t_R = 13,87$ min		52,15	+ (0,69)
$t_R = 14,04$ min		27,98	+ (0,55)
$t_R = 14,32$ min		19,05	- (0,36)
$t_R = 14,38$ min		104,99	+ (0,76)
$t_R = 14,44$ min		31,26	+ (0,52)

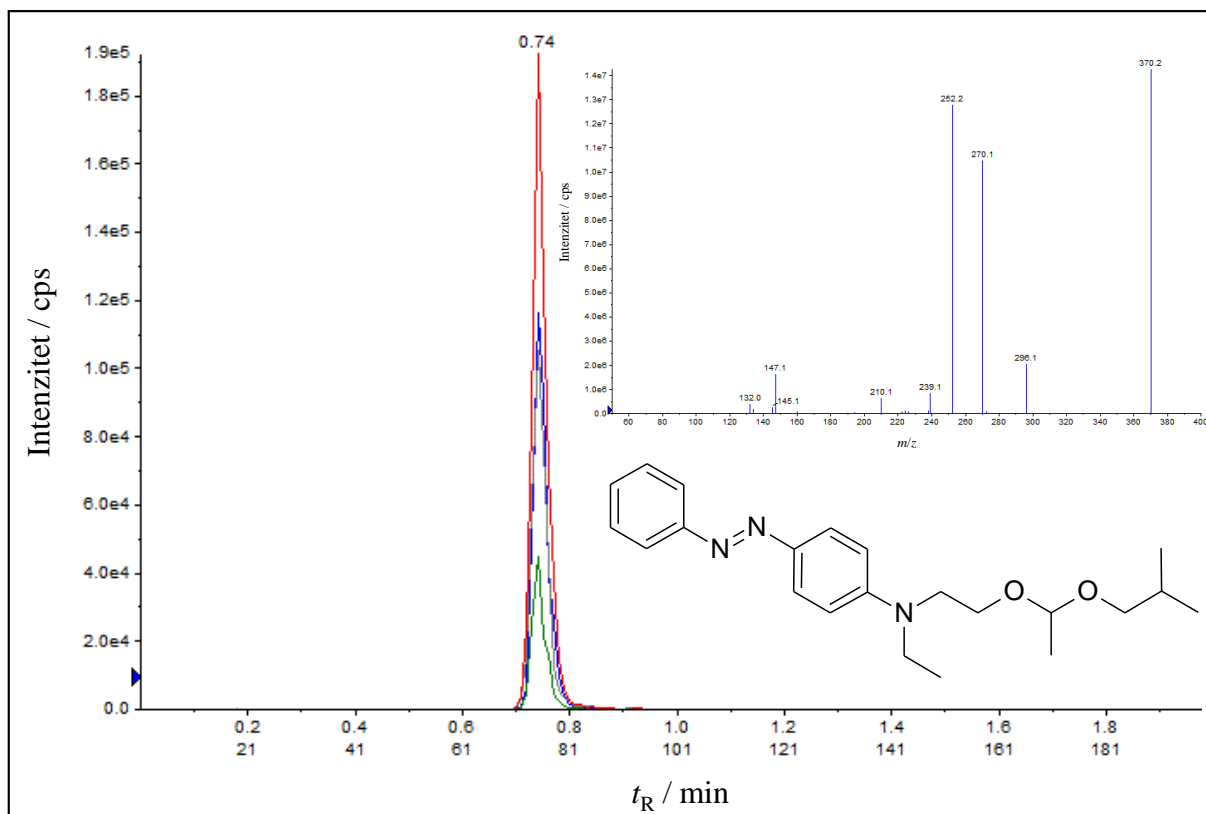
Bioakumulacijski faktor razgradnog produkta okarakteriziran je kao omjer koncentracije produkta u organizmu, kao rezultat apsorpcije kroz dišne puteve ili ishrane, te koncentracije tog produkta u vodenom mediju. Procjena BF pomoću ovakvih programa je dosta riskantna, jer bioakumulacija ovisi o mnogo faktora. Međutim, ova procjena može se uzeti kao smjernica za usporedbu bioakumulacije dobivenih razgradnih produkata. Parametri koje bismo morali razmatrati uz bioakumulacijski faktor, kako bismo dobili točnu vrijednost bioakumulacije, su vrijednosti faktora u specifičnim organima i tkivima organizama, vrijeme poluraspada produkta, način konzumacije štetne tvari (dišni putevi, ishrana ili koža) te njegova kinetika, stabilnost nastalih metabolita, difuzija kroz stanične membrane i sl. Dane su granice bioakumulacije gdje je navedeno da je za $BF < 30$ bioakumulacija slaba, za $BF = 30 - 100$ umjerena, $BF = 100 - 1000$ visoka, a za $BF > 1000$ jako visoka [66].

Najveće vrijednosti bioakumulacijskog faktora imaju produkti koji na 4-aminoazobenzenu sadrže dušik supstituiran metilnim ili etilnim skupinama. Suprotno tome, znatno manje vrijednosti dobivene su za produkte koji sadrže kisik ili hidroksilnu skupinu supstituiranu bilo u nastavku osnove molekule 4-aminoazobenzena ili u nekom prstenu nastalom pregradnjom pri povišenoj temperaturi. Produkt na vremenu zadržavanja 14,38 min, znatno odstupa s vrijednošću bioakumulacijskog faktora koji iznosi 104,99. Najmanje vrijednosti bioakumulacijskog faktora dobivene su za izobutilni alkohol, izobutil-vinil-eter i anilin.

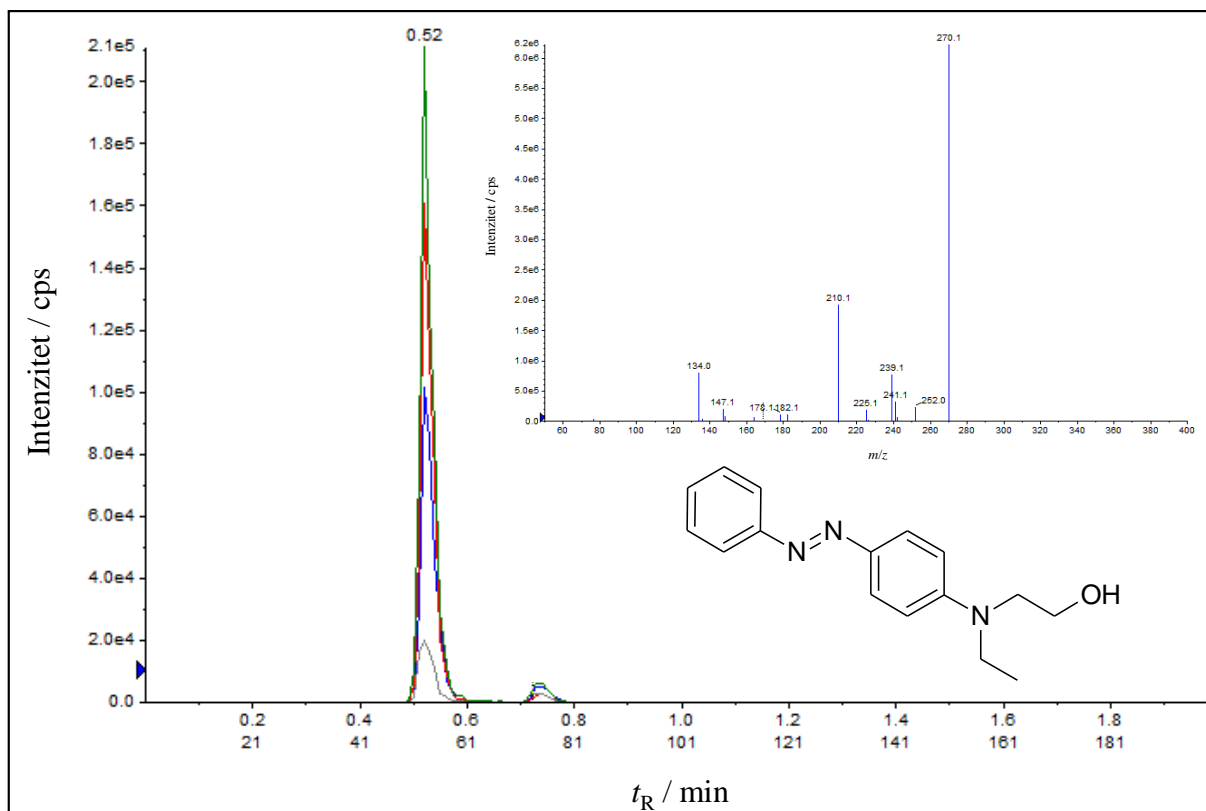
Razvojna toksičnost je pozitivna za 11 od 15 produkata dobivenih pirolitičkom razgradnjom. Pozitivna vrijednost razvojne toksičnosti znači da su za određeni produkt dobiveni pozitivni rezultati toksičnosti bilo istraživanjem na životinjama, bilo na ljudima, da su u doticaju sa životinjama/ljudima izazvali abnormalnosti ili da postoje dokazi fetalnog rizika na temelju ljudskog iskustva. Budući da 11 produkata pirolitičke razgradnje pokazuje toksičnu aktivnost, bilo je lako spoznati da je razgradnja SY124 opasna kako za žive organizme tako i za okoliš.

4.2. Rezultati oksidacijske razgradnje u vodenom mediju

Primarna ideja ovog rada bila je proučavanje otpadnog, tekućeg, kiselog ekstrakta markera SY124 koji biva odbačen u okoliš nakon „pranja“ goriva, zbog čega je odabrana tekućinska kromatografija kao metoda analize. Osim toga ovakav sustav tekućinskog kromatografa s tandemnim spektrometrom masa ima brojne prednosti kao što su: velika osjetljivost, robusnost, selektivnost i širi raspon m/z čime se proširuje paleta mogućih analiziranih tvari. Za praćenje promjena u otopinama markera nakon ultrazvučne obrade korišten je MRM (engl. *Multiple Reaction Monitoring*) način analize. Takav način prikupljanja podataka omogućuje visok stupanj selektivnost, specifičnosti i povećava osjetljivost određivanja, a praćenje odabranih reakcija sastoji se u biranju iona, razlaganju odabranog iona kolizijom i praćenju jednog ili više iona nastalih nakon kolizije. U našem slučaju odabrana su dva iona za praćenje, molekula SY124 ($m/z = 370,4$) te hidrolizirani oblik te molekule ($m/z = 270,4$). Kolizijom su nastala četiri iona molekule SY124 (Slika 4.19), $m/z = 270,5; 252,2; 132,2; 77,0$, te četiri iona hidroliziranog oblika molekule SY124 (Slika 4.20), $m/z = 210,0; 134,0; 77,0; 239,4$. Da bi se potvrdila struktura praćenih molekula snimljen je i *Product ion* (za eksperiment 0 i eksperiment 7 u nultom vremenu), kako bi se molekula SY124 i njezin hidrolizirani oblik mogle uvesti u bazu podataka. Za snimanje su praćena po dva od četiri iona nastala kolizijom molekule markera i njenog hidroliziranog oblika i pratila se njihova razgradnja. Spektri masa dobiveni EPI analizom dani su na Slikama 4.19 i 4.20.



Slika 4.19. Kromatogram odgovarajućih prijelaza (370,400 \rightarrow 270,500; 370,400 \rightarrow 252,200; 370,400 \rightarrow 132,200; 370,400 \rightarrow 77,00) s izdvojenim spektrom masa i molekulskom strukturom za SY124



Slika 4.20. Kromatogram odgovarajućih prijelaza (270,4 \rightarrow 210,0; 270,4 \rightarrow 134,0; 270,4 \rightarrow 77,0; 270,4 \rightarrow 239,4) s izdvojenim spektrom masa i molekulskom strukturom hidroliziranog oblika molekule SY124

Količina molekule SY124 te njenog hidroliziranog oblika kroz eksperimente opisane u poglavlju 3.3.3 praćena je pomoću površine ispod pika iz dobivenih kromatograma. Iz eksperimenata je moguće zaključiti na koji način ultrazvuk utječe na razgradnju SY124, na koji način NaDCC, a na koji prisustvo kiseline. Grafovi ovisnosti površine kromatografskog pika o vremenu za obje praćene molekule prikazani su u nastavku.

Na Slici 4.21 prikazana je boja standardne otopine SY124. U bazičnoj otopini marker SY124 je jarko žute boje zbog čega smo mogli pratiti razgradnju markera i kroz promjenu njegova obojenja.



Slika 4.21. Boja standardne otopine markera SY124 u acetonitrilu

Prilikom „pranja“ goriva, marker se iz goriva uklanja ekstrakcijom s kiselinom pa je dio eksperimenata proveden uz dodatak klorovodične kiseline. Na Slici 4.22 prikazana je boja markera SY124 u kiseljoj otopini.



Slika 4.22. Boja otopine markera SY124 uz dodatak klorovodične kiseline

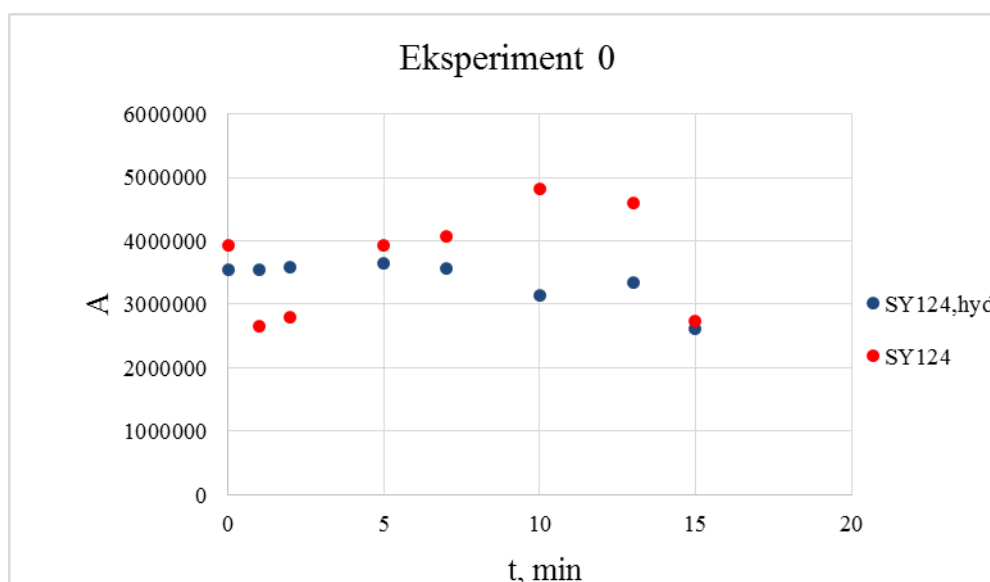
Preostali uzorci nakon snimanja na LC-MS/MS-u, snimljeni su i na GC-MS-u kako bi dobili spektre za svaki eksperiment u kojima bi bili vidljivi svi razgradni produkti nastali nakon ultrazvučne obrade. Kako smo prilikom snimanja na LC-MS/MS-u pratili samo molekulu SY124 i njezin hidrolizirani oblik, snimanje na plinskom kromatografu omogućilo nam je dobivanje spektara masa svakog pojedinog produkta.

Svi eksperimenti oksidacijske razgradnje SY124 u vodenom mediju mogu se podijeliti na one pod djelovanjem ultrazvuka visoke snage, na one dobivene kemijskom oksidacijom uz NaDCC te one dobivene kombinacijom oksidacijskih procesa UZV/NaDCC.

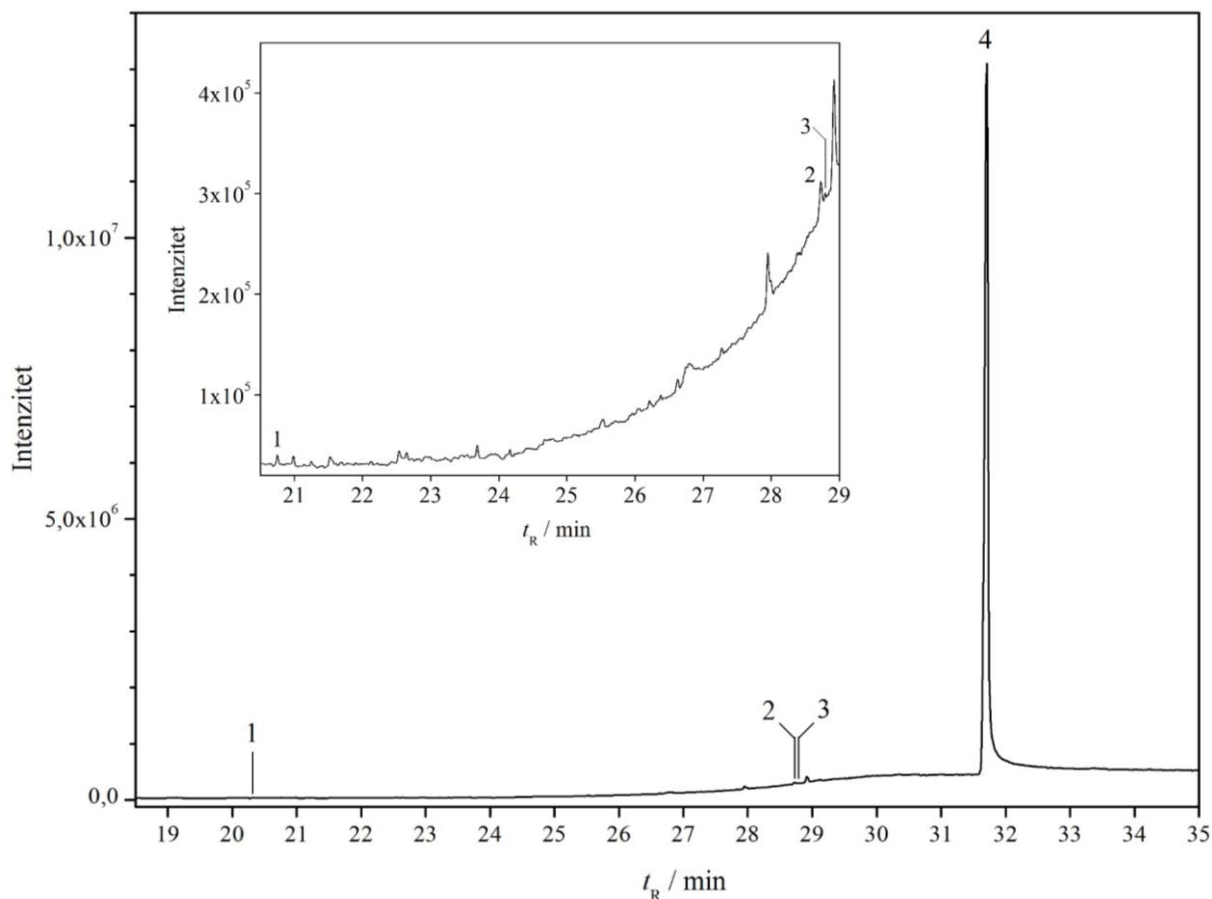
4.2.1. Razgradnja pomoću ultrazvuka visoke snage

Eksperimenti pod rednim brojem 0 i rednim brojem 7 provedeni su isključivo pod djelovanjem UZV visoke snage, s jedinom razlikom što je eksperiment 7 proveden u kiselim uvjetima.

Slika 4.23 prikazuje ponašanje molekule SY124 te njenog hidroliziranog oblika u vodi kroz 15 minuta ultrazvučne obrade u eksperimentu 0. U prvoj minuti vidljiv je pad količine SY124 naspram početne količine zbog još uvijek lokaliziranog markera u ispitivanoj otopini. S vremenom količina SY124 raste, sve do desete minute, što je posljedica sve boljeg miješanja otopine ultrazvukom. Nakon desete minute količina markera u otopini opada što se pripisuje njegovoj razgradnji, tj. pucanju azo veze uslijed reakcije s nastalim radikalima. Iz promjene količine hidroliziranog oblika molekule SY124 vidljivo je da dolazi do hidrolize markera u vodi, međutim jako slabo.

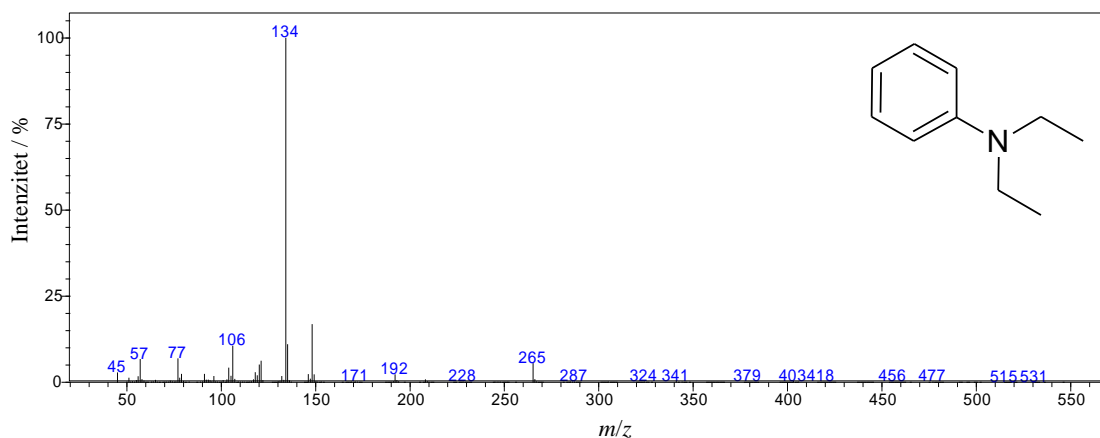


Slika 4.23. Grafički prikaz ovisnosti količine molekule SY124 i njezinog hidroliziranog oblika tijekom ultrazvučne obrade neutralne otopine markera

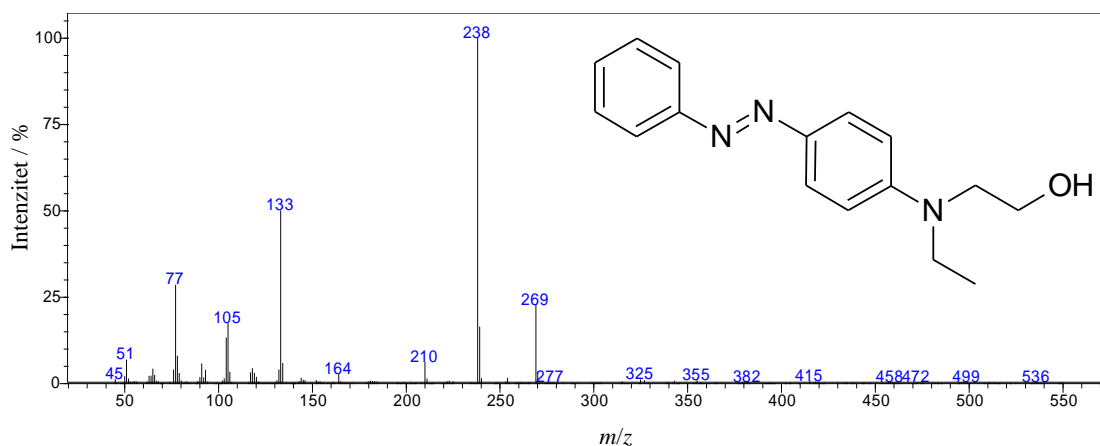


Slika 4.24. Kromatogram dobiven analizom na sustavu GC-MS za eksperiment 0

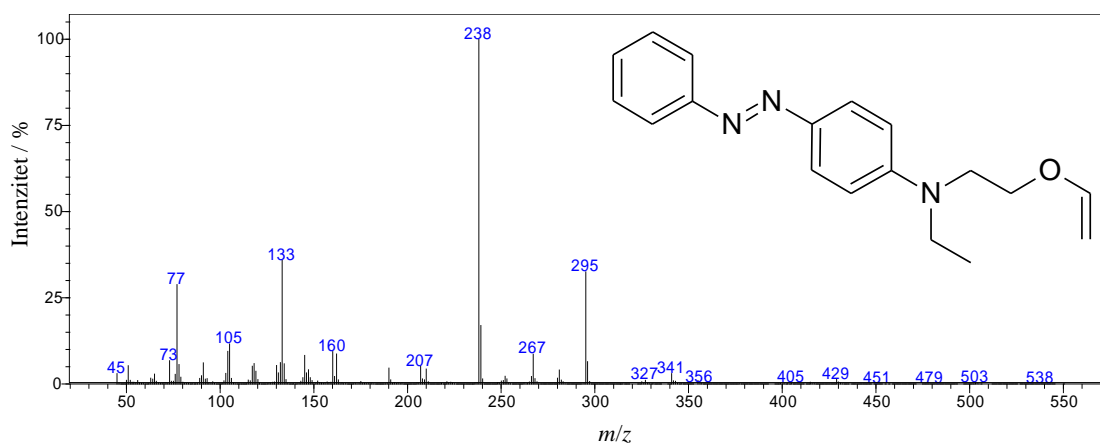
Slika 4.24 prikazuje kromatogram snimljen primjenom GC-MS-a nakon ultrazvučne obrade otopine iz eksperimenta 0. Razgradni produkti u eksperimentu 0 jednaki su za svih 15 minuta ultrazvučne obrade, kao i u početnom uzorku. U nultom eksperimentu, za otopinu SY124 u deioniziranoj vodi, dobivena su 3 razgradna produkta na vremenima zadržavanja 20,75 min, 26,92 min i 28,73 min. Kromatografska krivulja za $t_R = 31,71$ min odgovara molekuli SY124. Spektri masa dobivenih razgradnih produkata prikazani su na Slikama 4.25-4.28.



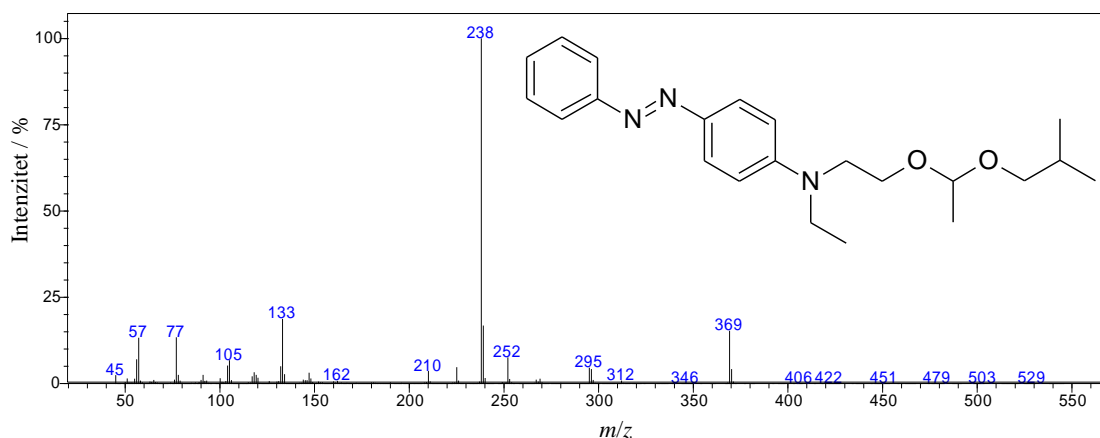
Slika 4.25. Spektar masa razgradnog produkta **1** iz eksperimenta 0 na $t_R = 20,75$ min



Slika 4.26. Spektar masa razgradnog produkta **2** iz eksperimenta 0 na $t_R = 26,92$ min



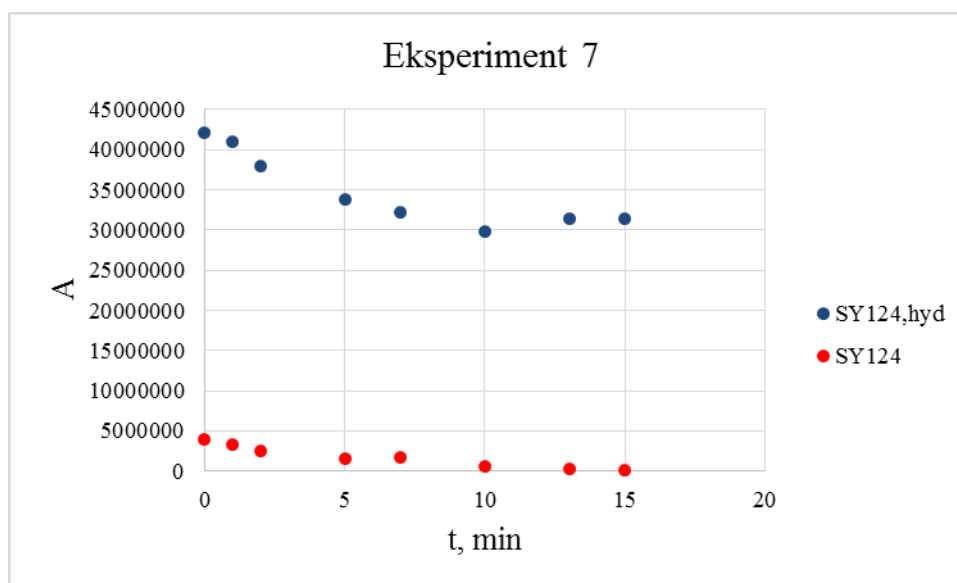
Slika 4.27. Spektar masa razgradnog produkta **3** iz eksperimenta 0 na $t_R = 28,73$ min



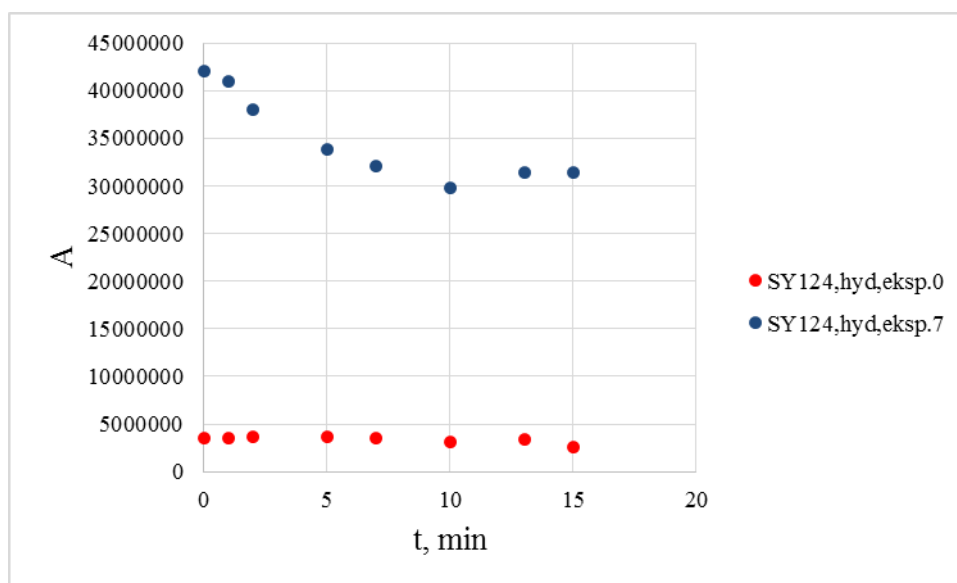
Slika 4.28. Spektar masa molekule SY124 u eksperimenta 0 na $t_R = 31,71$ min

Slika 4.29 prikazuje eksperiment 7. Iz grafičkog prikaza jasno je vidljivo da kiselina znatno pospješuje hidrolizu SY124 te je količina hidroliziranog oblika molekule znatno veća od

početne molekule markera. Također, količina hidrolizirane molekule markera znatno je veća u odnosu na eksperiment 0 što je vidljivo iz Slike 4.30.

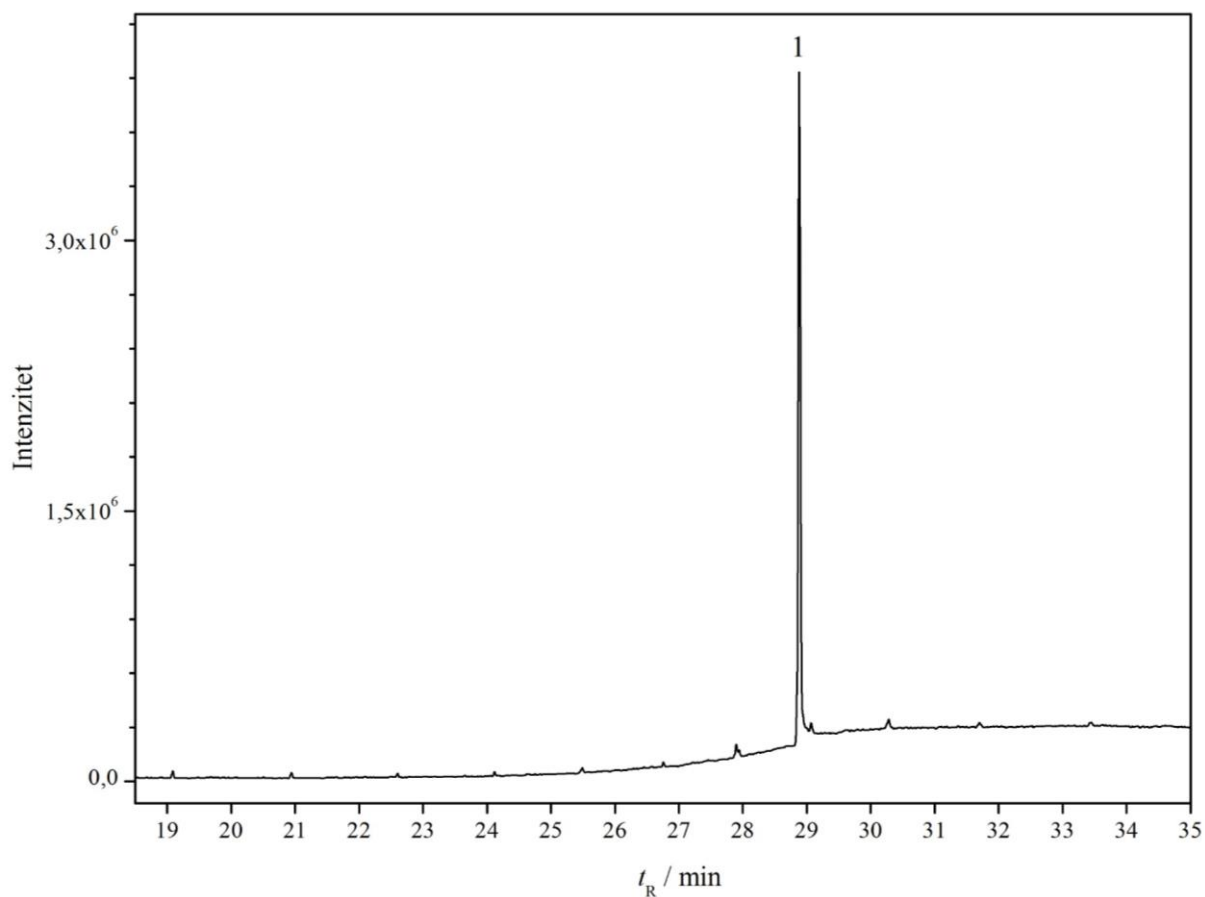


Slika 4.29. Grafički prikaz ovisnosti količine molekule SY124 i njezinog hidroliziranog oblika tijekom ultrazvučne obrade kisele otopine markera

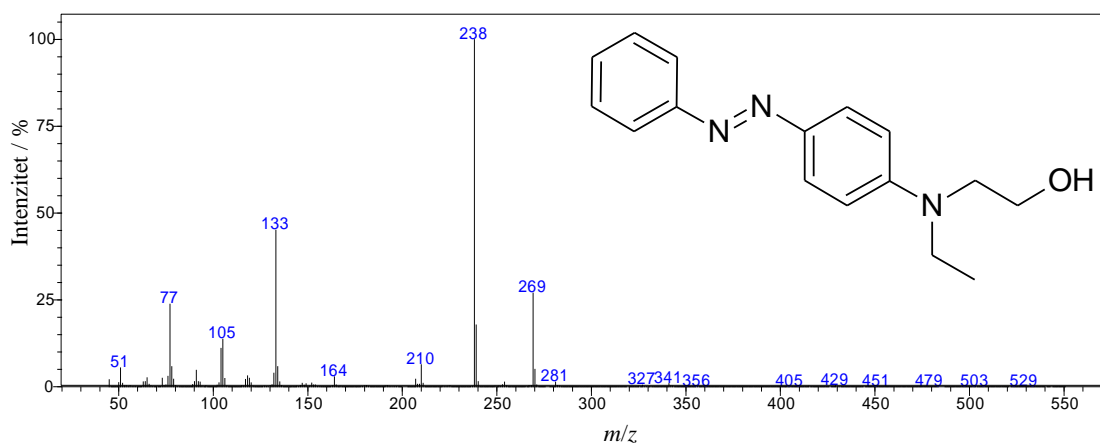


Slika 4.30. Grafički prikaz ovisnosti količine hidroliziranog oblika molekule SY124 tijekom ultrazvučne obrade neutralne i kisele otopine markera

U kiseloj otopini SY124 nakon 15 minuta ultrazvučne obrade dobiven je samo jedan razgradni produkt. Kromatogram za eksperiment 7 prikazan je na Slici 4.31, a spektar masa razgradnog produkta na Slici 4.32.



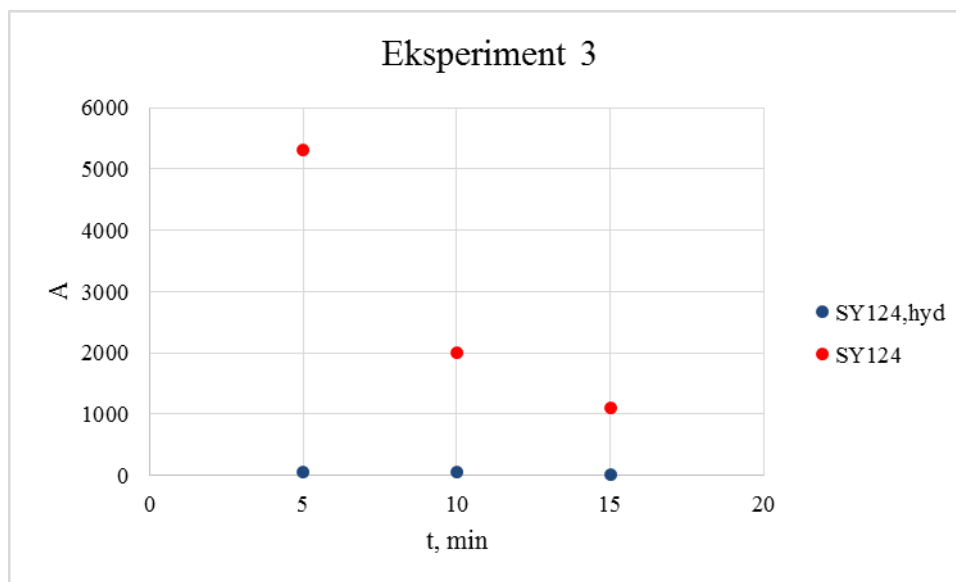
Slika 4.31. Kromatogram dobiven analizom na sustavu GC-MS za eksperiment 7



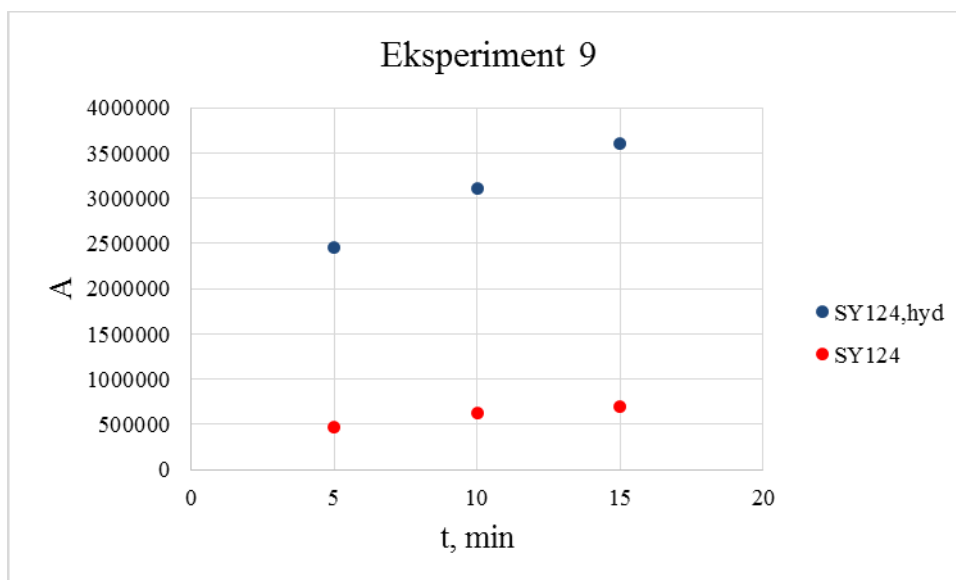
Slika 4.32. Spektar masa razgradnog produkta **1** iz eksperimenta 7 na $t_R = 28,88$ min

4.2.2. Razgradnja oksidacijom uz NaDCC

U eksperimentima 3 i 9 ispitana je promjena količine SY124 s vremenom u neutralnoj i kiseloj otopini, uz dodatak NaDCC-a, ali uz miješanje na miješalici (Slika 4.30 i 4.31), kako bi se dodatno razjasnio utjecaj ultrazvuka na otopinu markera.



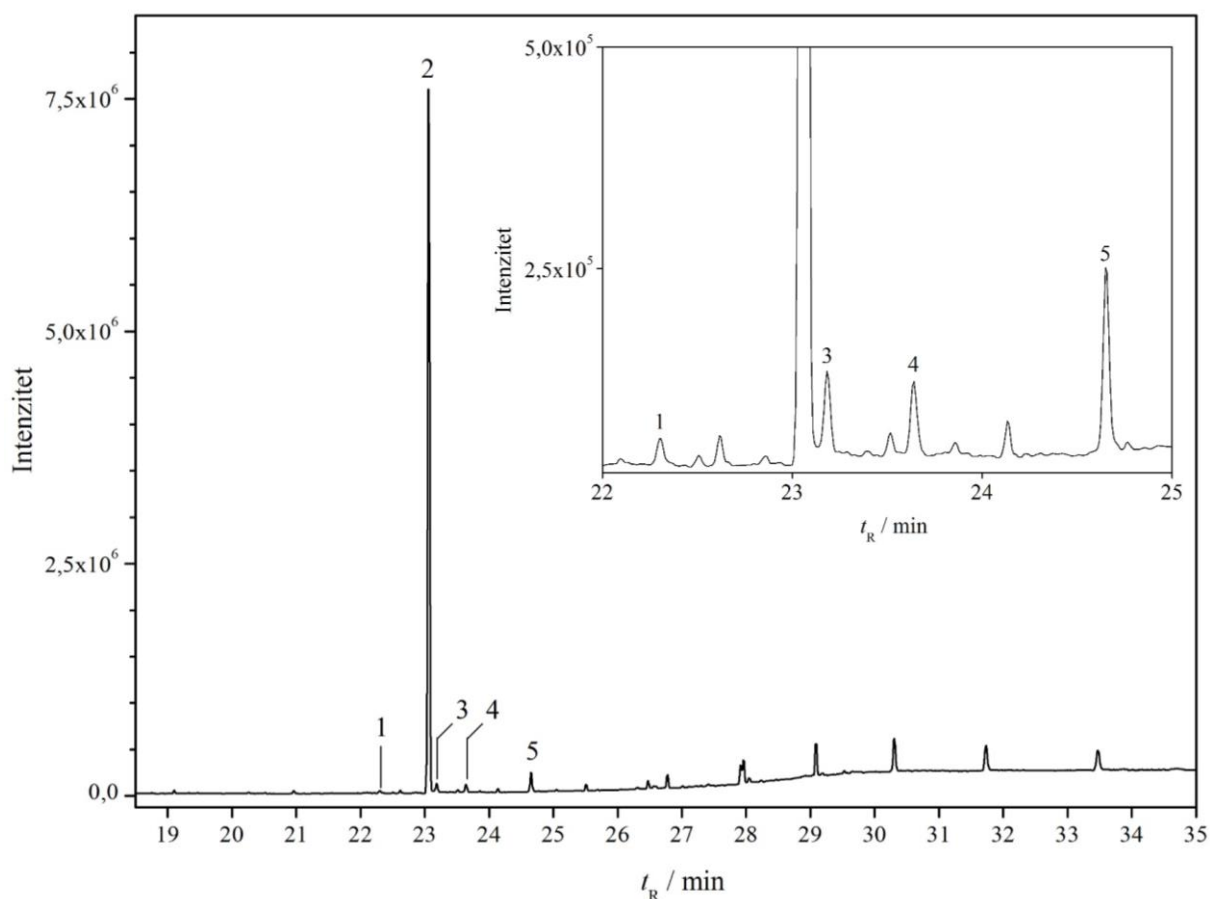
Slika 4.33. Grafički prikaz ovisnosti količine molekule SY124 i njezinog hidroliziranog oblika tijekom miješanja neutralne otopine markera, uz dodatak NaDCC-a, na miješalici



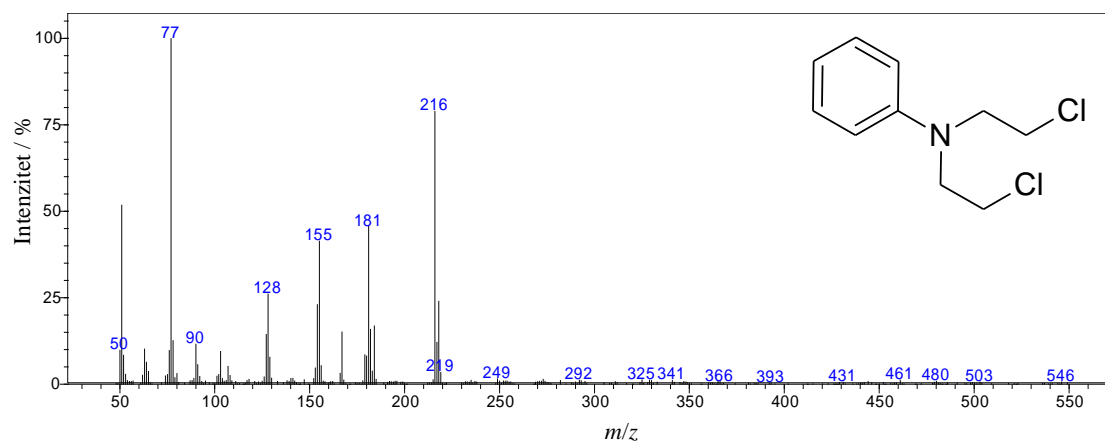
Slika 4.34. Grafički prikaz ovisnosti količine molekule SY124 i njezinog hidroliziranog oblika tijekom miješanja neutralne i kisele otopine markera, uz dodatak NaDCC-a, na miješalici

Količina SY124, u neutralnoj otopini uz dodatak NaDCC-a (eksperiment 3), miješanjem na miješalici opada s vremenom zbog jako male efikasnosti miješanja u odnosu na ultrazvuk. Kako je SY124 slabo topljiv u vodi, miješanjem na miješalici nije postignuta dobra homogenizacija otopine i SY124 ostaje lokaliziran u otopini. U eksperimentu 9 dolazi do vrlo blagog porasta količine markera u otopini miješanjem na miješalici, ali dolazi do značajnog porasta količine hidroliziranog oblika molekule jer je eksperiment proveden u kiselom mediju, a kiselina značajno pospješuje hidrolizu markera. Za razliku od količine hidroliziranog oblika molekule u kiselom mediju, u neutralnom mediju je njegova količina gotovo konstantna.

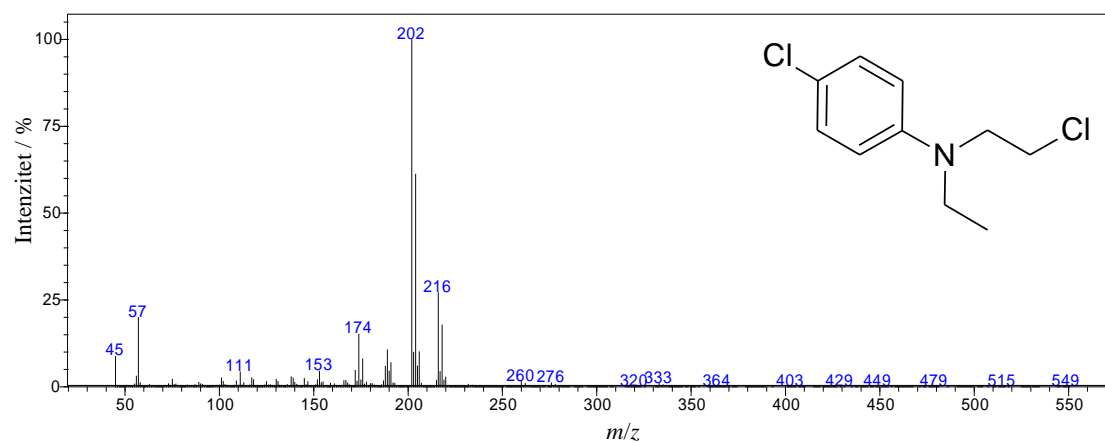
Za eksperiment 3, dobiveno je 5 razgradnih produkata (Slika 4.35). Razgradni produkti u eksperimentu 3 jednaki su za svih 15 minuta miješanja otopine na miješalici, kao i u početnom uzorku. Njihovi spektri masa prikazani su na Slikama 4.36-4.40.



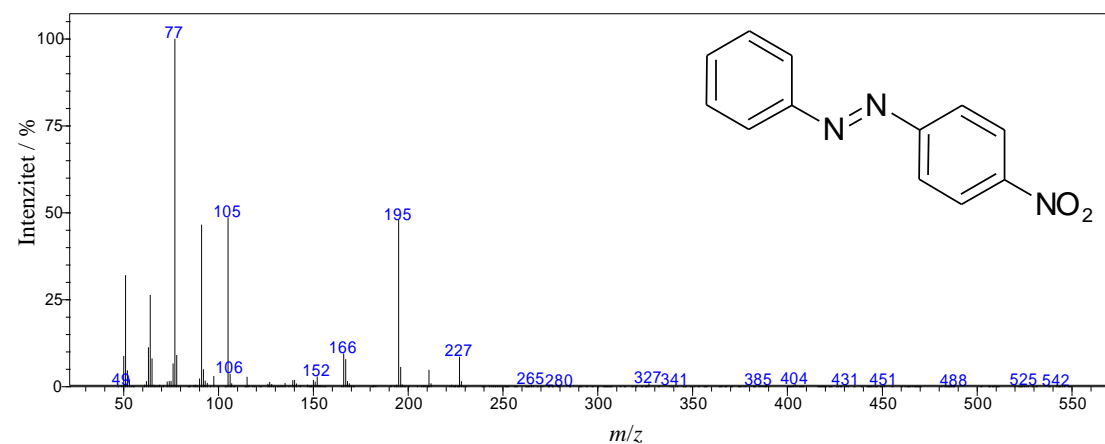
Slika 4.35. Kromatogram dobiven analizom na sustavu GC-MS za eksperiment 3



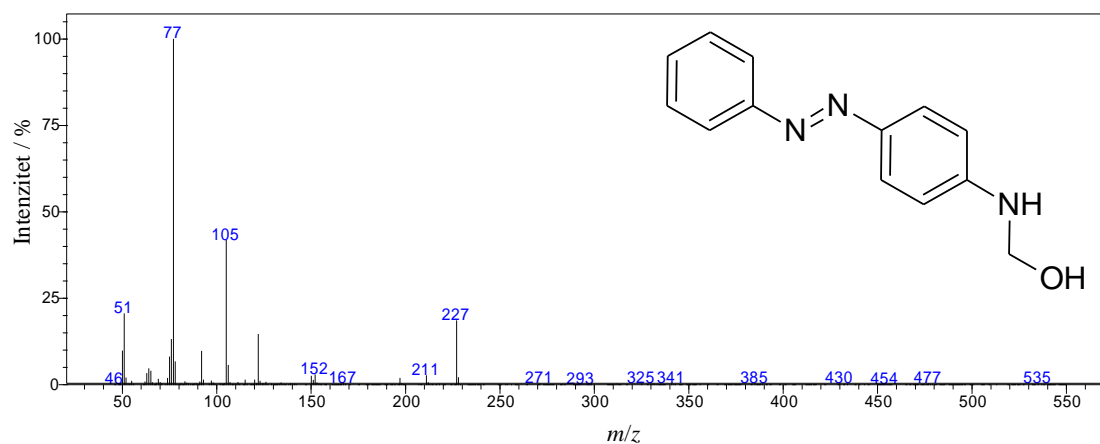
Slika 4.36. Spektar masa razgradnog produkta **1** iz eksperimenta 3 na $t_R = 22,30$ min



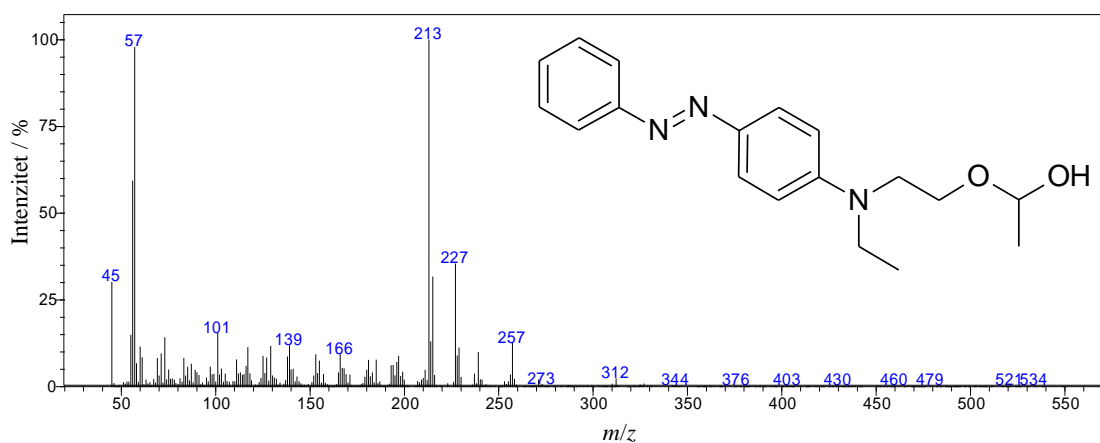
Slika 4.37. Spektar masa razgradnog produkta **2** iz eksperimenta 3 na $t_R = 23,05$ min



Slika 4.38. Spektar masa razgradnog produkta **3** iz eksperimenta 3 na $t_R = 23,18$ min

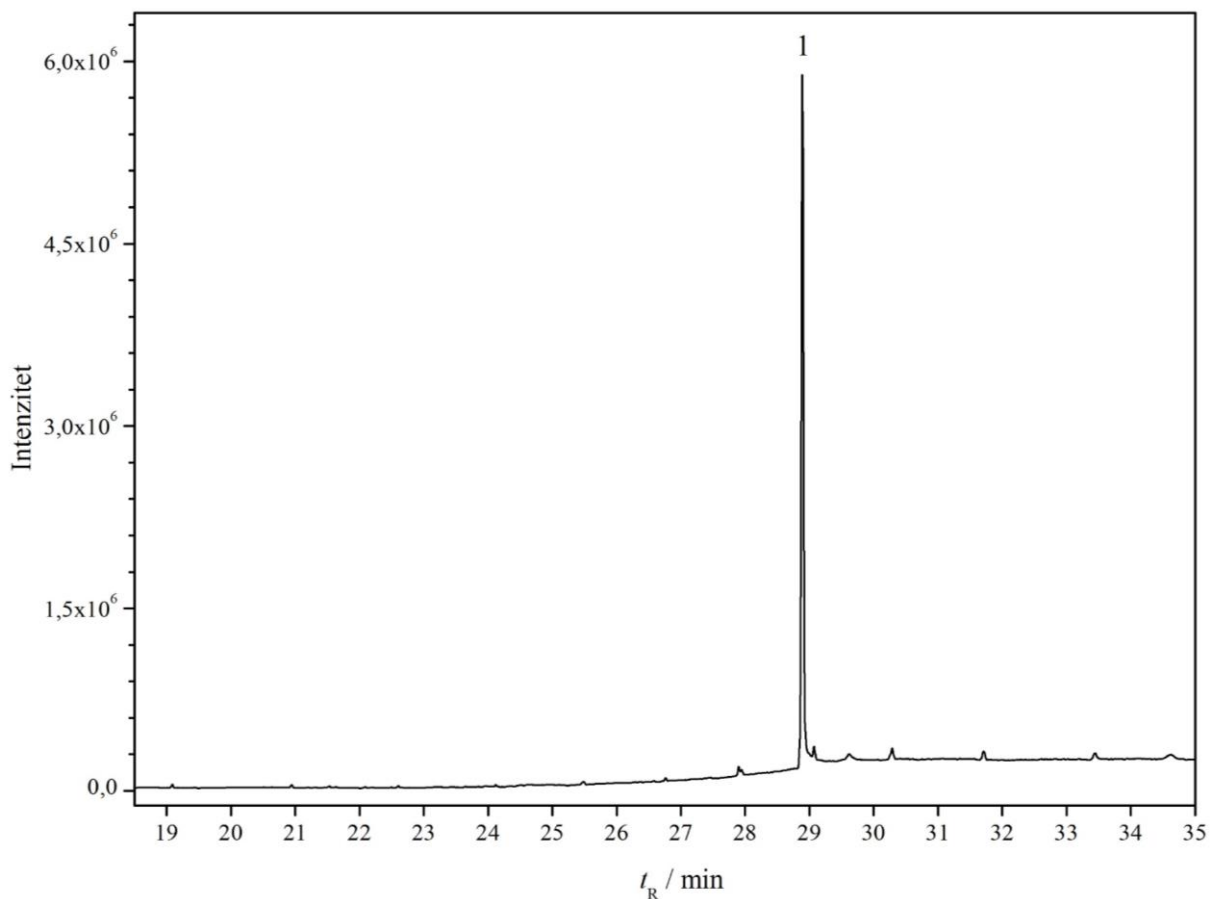


Slika 4.39. Spektar masa razgradnog produkta **4** iz eksperimenta 3 na $t_R = 23,64$ min

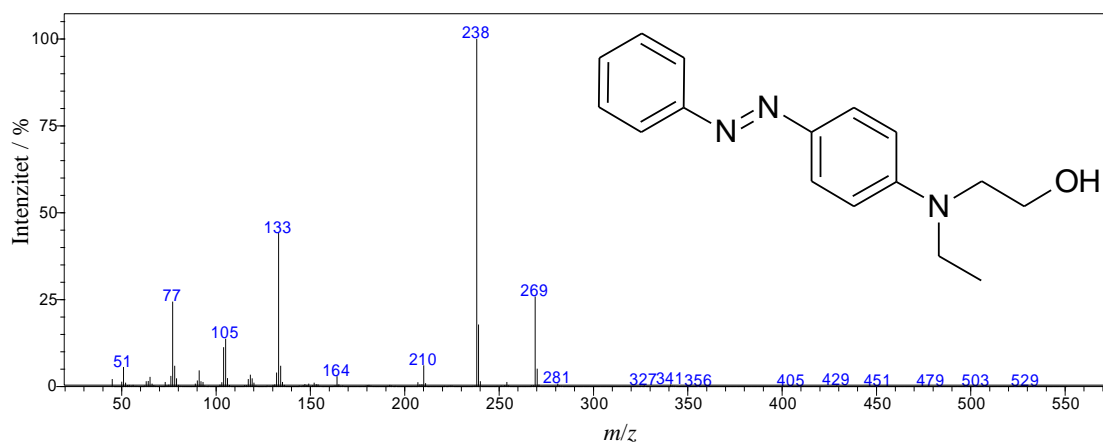


Slika 4.40. Spektar masa razgradnog produkta **5** iz eksperimenta 3 na $t_R = 24,66$ min

Za razliku od svih ostalih eksperimenata, gdje su razgradni produkti jednaki za svih 15 minuta provedbe eksperimenta, kao i za početne uzorke, u eksperimentu 9 nisu dobiveni jednaki razgradni produkti u svim vremenima. U nultom uzorku za eksperiment 9 (kisela otopina SY124 uz dodatak NaDCC-a miješana na miješalici) dobiven je jedan razgradni produkt, djelovanjem NaDCC-a odmah po dodatku u kiselu otopinu markera (Slika 4.41 i 4.42).

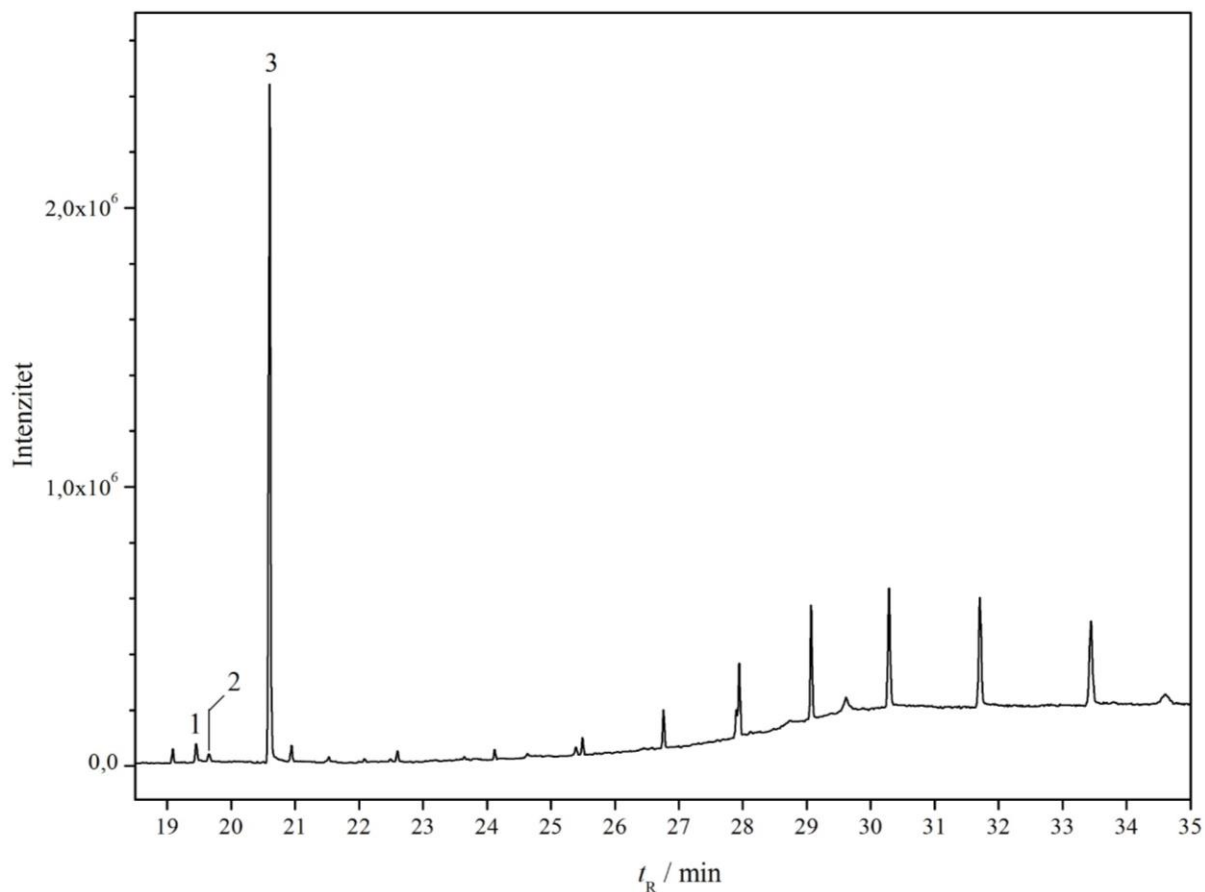


Slika 4.41. Kromatogram dobiven analizom na sustavu GC-MS za eksperiment 9 početnog uzorka otopine



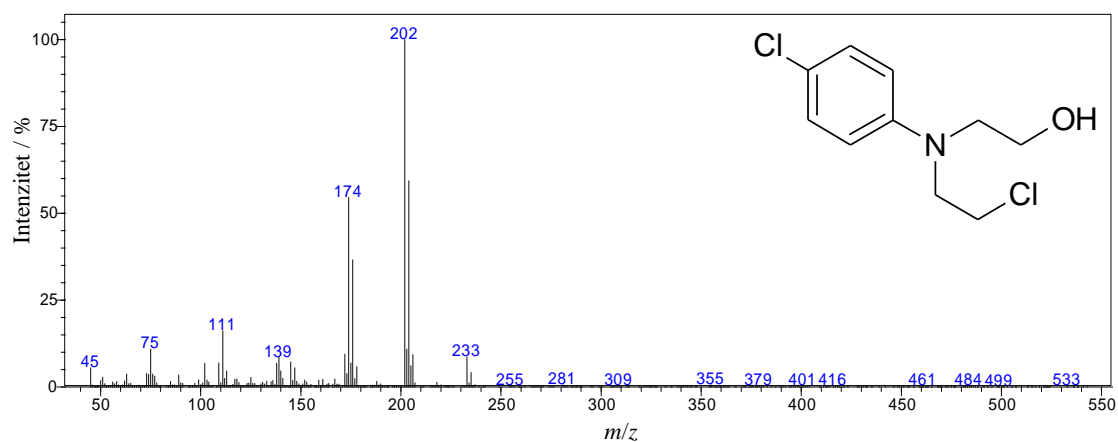
Slika 4.42. Spektar masa razgradnog produkta **1** iz eksperimenta 9 na $t_R = 28,89$ min

Nakon miješanja otopine iz eksperimenta 9, u svim ostalim vremenima obrade, dobivena su tri razgradna produkta (Slika 4.43).

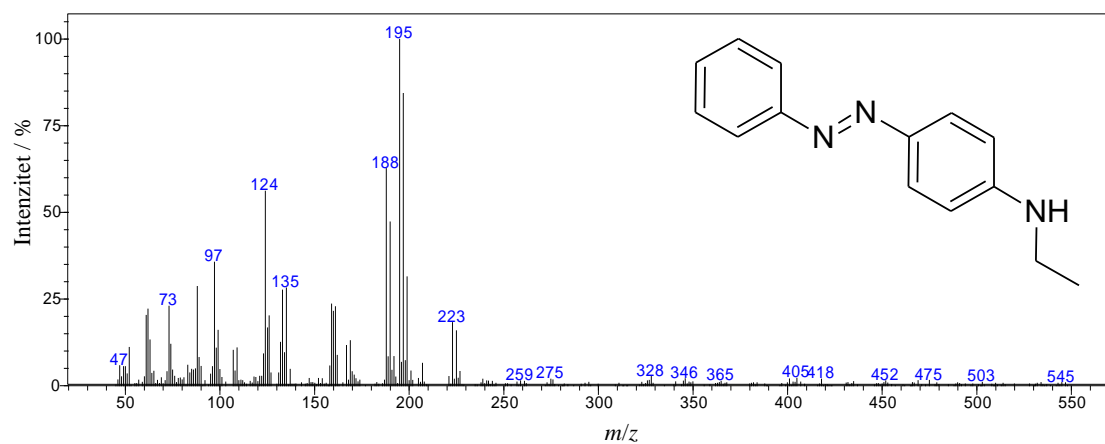


Slika 4.43. Kromatogram dobiven analizom na sustavu GC-MS za eksperiment 9 nakon miješanja na miješalici

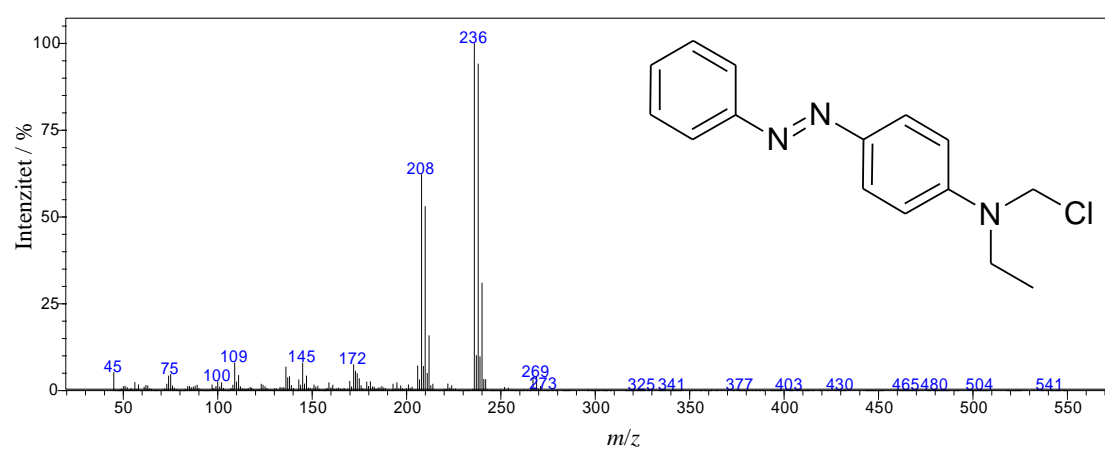
Spektri masa razgradnih produkata dani su na Slikama 4.44-4.46. Zanimljivo je napomenuti da se razgradni produkt iz nultog uzorka eksperimenta 9 (slika 4.41 i 4.42) ne pojavljuje kao razgradni produkt nakon završenog miješanja otopine na miješalici.



Slika 4.44. Spektar masa razgradnog produkta **1** iz eksperimenta 9 na $t_R = 19,45$ min



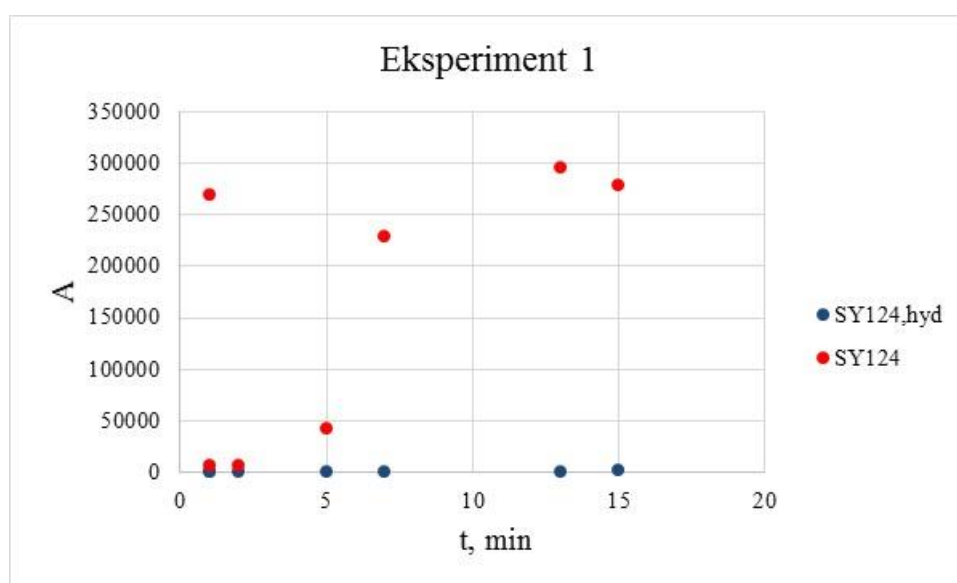
Slika 4.45. Spektar masa razgradnog produkta **2** iz eksperimenta 9 na $t_R = 19,66$ min



Slika 4.46. Spektar masa razgradnog produkta **3** iz eksperimenta 9 na $t_R = 20,61$ min

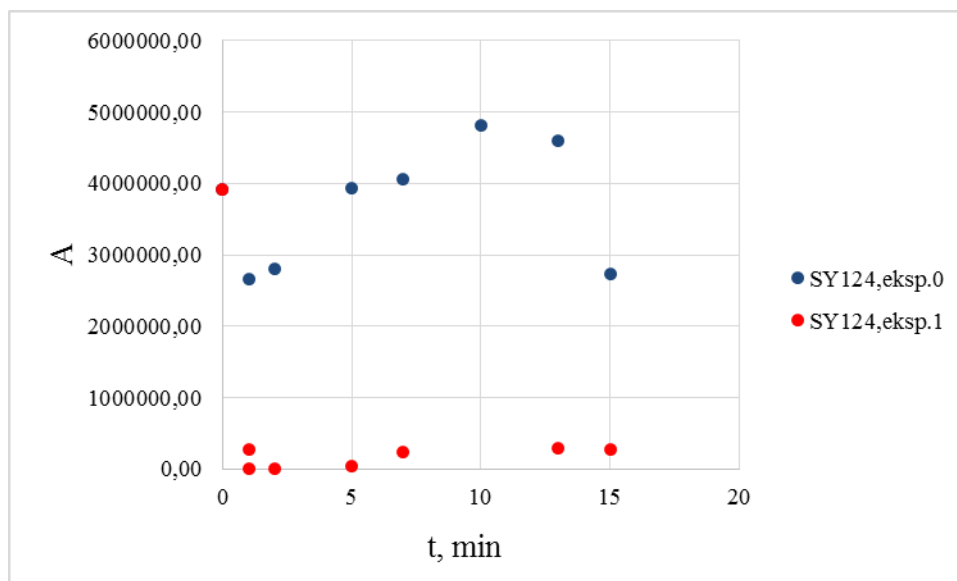
4.2.3. Razgradnja kombinacijom oksidacijskih procesa (UZV/NaDCC)

U eksperimentu 1 (Slika 4.47), u otopinu SY124 u deioniziranoj vodi, dodana je tableta NaDCC-a. Dodatkom NaDCC-a količina SY124 u otopini se drastično smanjila već nakon prve minute što ukazuje na činjenicu da NaDCC znatno utječe na razgradnju markera i to odmah po dodatku u otopinu. Daljnjom ultrazvučnom obradom otopine količina SY124 raste što se opet pripisuje sve boljoj homogenizaciji otopine ultrazvukom. Količina hidroliziranog oblika je gotovo konstantna kroz svih 15 minuta obrade.



Slika 4.47. Grafički prikaz ovisnosti količine molekule SY124 i njezinog hidroliziranog oblika tijekom ultrazvučne obrade neutralne otopine markera uz dodatak NaDCC-a

Utjecaj NaDCC-a na otopinu SY124 jasno je vidljiv na Slici 4.48.



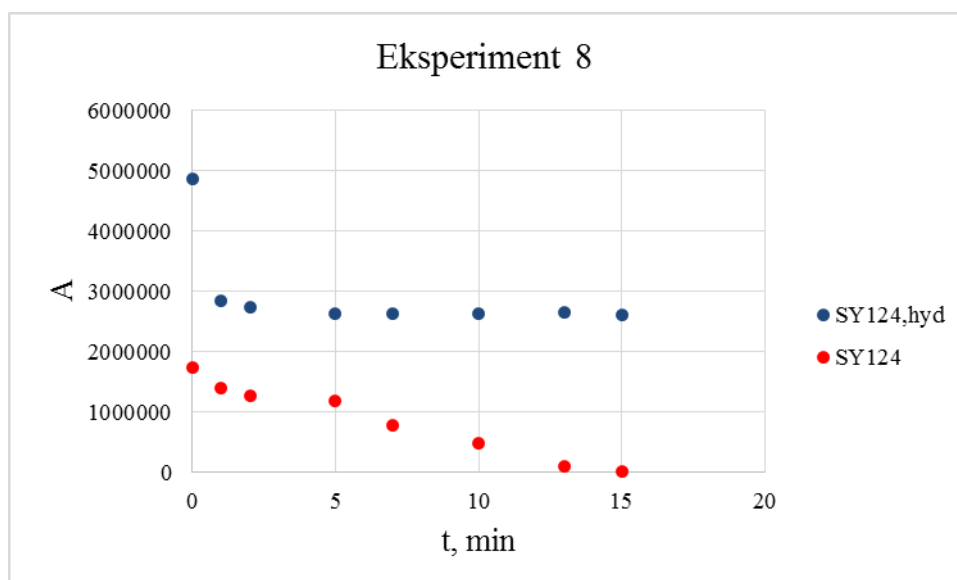
Slika 4.48. Grafički prikaz promjene količine molekule SY124 u otopini bez (eksp. 0) i sa (eksp. 1) dodatkom NaDCC-a

Slika 4.48 prikazuje promjenu količine SY124 u otopini sa i bez NaDCC-a. NaDCC, odmah po dodatku u otopinu, drastično smanjuje količinu markera jer uvelike utječe na njegovu razgradnju. Količina SY124 u otopini bez NaDCC-a, tokom prve minute, nije značajno promijenjena i ne dolazi do njegove razgradnje, već ultrazvuk samo pospješuje homogenizaciju markera u otopini. To je vidljivo i kod eksperimenta 1 gdje nakon pete minute količina SY124 počinje rasti jer ultrazvuk homogenizira preostalu količinu markera koja nije razgrađena pod utjecajem NaDCC-a. Koliko jako NaDCC utječe na razgradnju markera vidljivo je i iz Slike 4.49. Kako u eksperimentu 1 dolazi do razgradnje markera dodatkom NaDCC-a, na kraju ultrazvučne obrade, otopina je u potpunosti izgubila boju što znači da su nastali razgradni produkti cijepanjem azo veze koja je nosioc obojenja. U eksperimentu 0 u kojem nije bio prisutan NaDCC (poglavlje 4.2.1.), utvrđeno je da ultrazvuk vrlo sporo razgrađuje marker SY124 te je otopina iz tog razloga bila tek neznatno obojena.



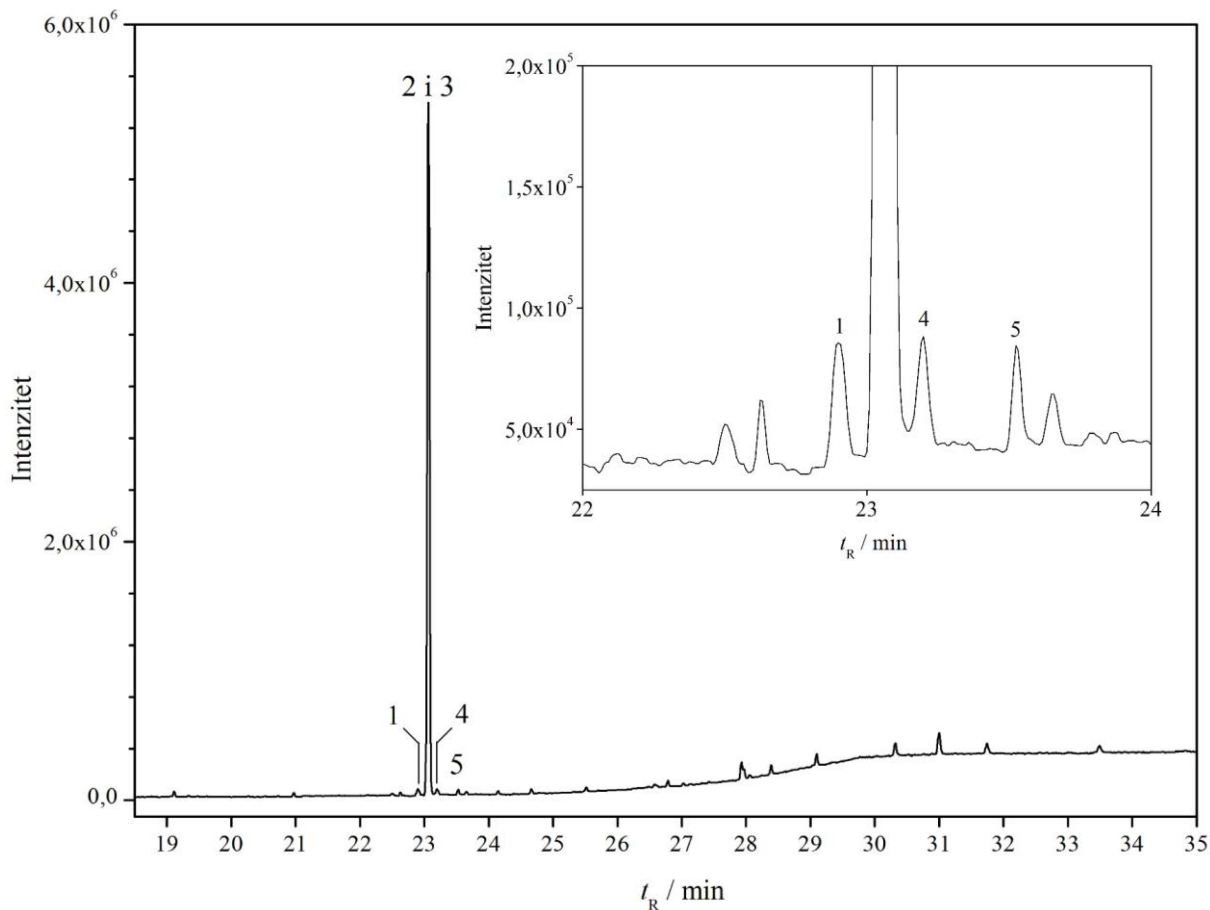
Slika 4.49. Usporedba obojenja otopine markera SY124 u eksperimentu 0 i 1 po isteku 15 min ultrazvučne obrade

Eksperiment 8 sličan je eksperimentu 1 uz razliku što je eksperiment 8 proveden u kiselim uvjetima (Slika 4.50). Količina SY124 u eksperimentu 8 znatno je manja u odnosu na eksperiment 7 (poglavlje 4.2.1.; eksperiment u kiselim uvjetima, ali bez NaDCC) zbog utjecaja NaDCC-a na njegovu razgradnju. Količina SY124 opada tokom svih 15 minuta ultrazvučne obrade jer kiselina, osim što pospješuje hidrolizu markera, također utječe i na bolju razgradnju markera, osobito uz prisustvo NaDCC-a.



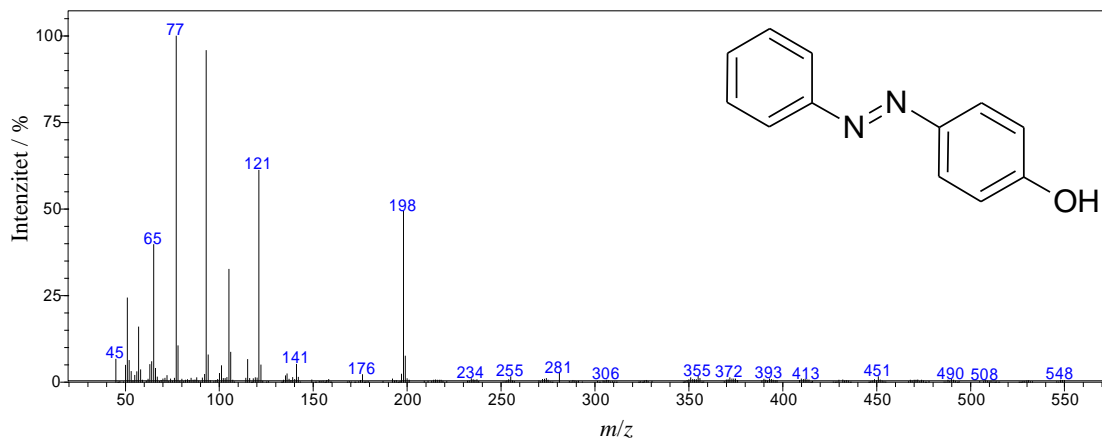
Slika 4.50. Grafički prikaz ovisnosti količine molekule SY124 i njezinog hidroliziranog oblika tijekom ultrazvučne obrade kisele otopine markera uz dodatak NaDCC-a

Prilikom obrade otopine SY124 u koju je dodana tableta NaDCC-a (eksperiment 1), dobiveno je 5 razgradnih produkata (Slika 4.51). Razgradni produkti u eksperimentu 1 jednaki su za svih 15 minuta ultrazvučne obrade, kao i u početnom uzorku.

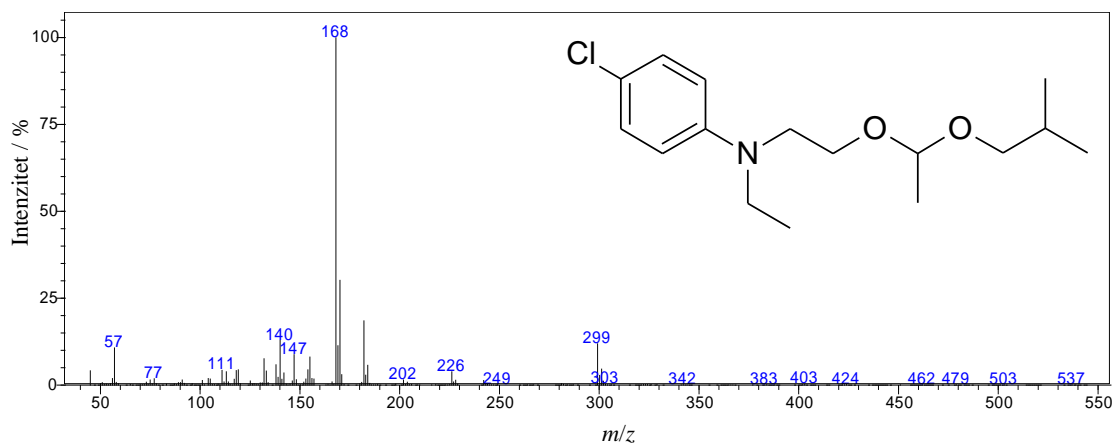


Slika 4.51. Kromatogram dobiven analizom na sustavu GC-MS za eksperiment 1

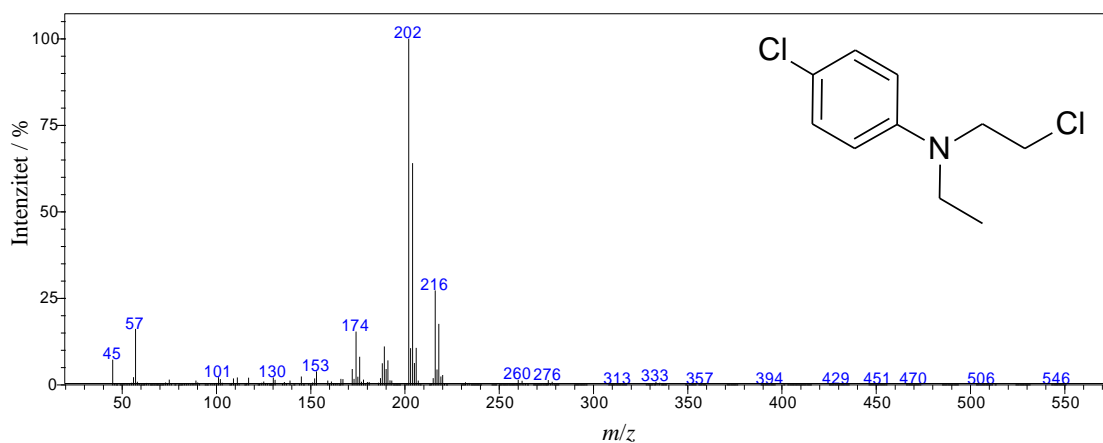
Spektri masa nastalih produkata prikazani su na Slikama 4.52-4.56.



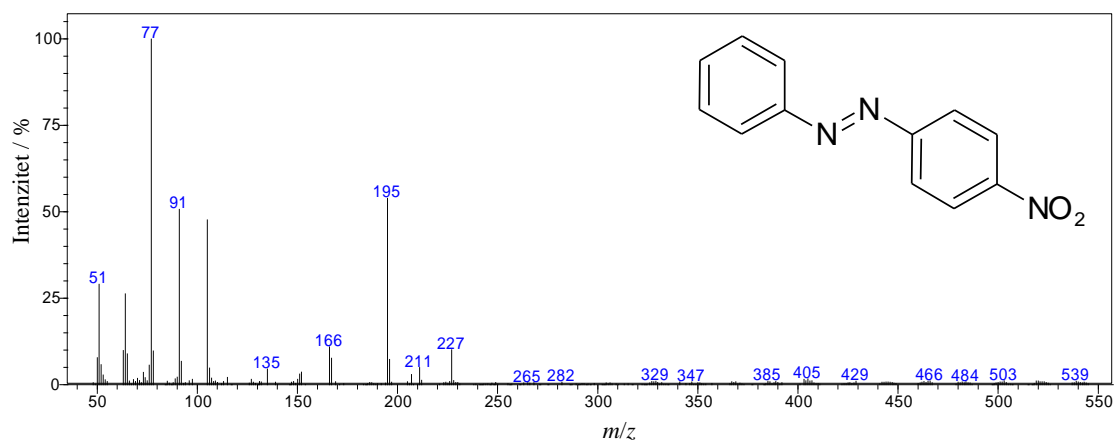
Slika 4.52. Spektar masa razgradnog produkta 1 iz eksperimenta 1 na $t_R = 22,90$ min



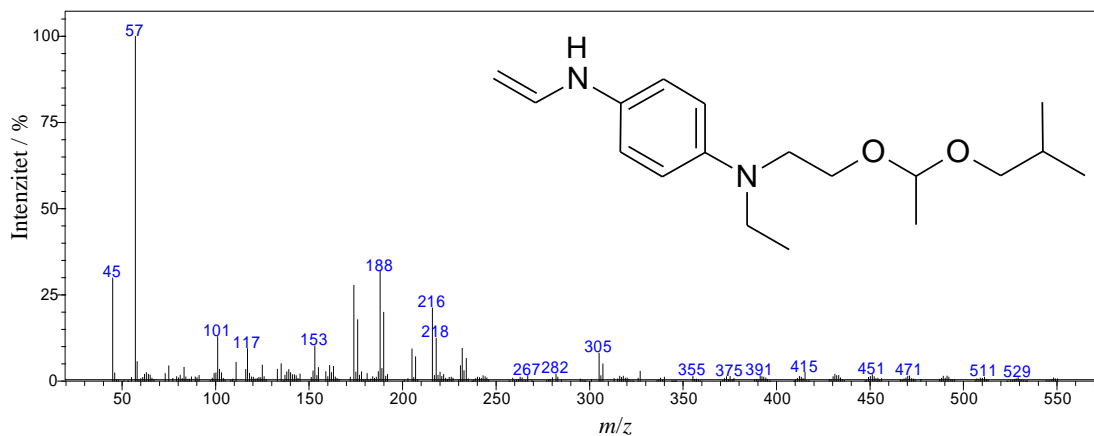
Slika 4.53. Spektar masa razgradnog produkta 2 iz eksperimenta 1 na $t_R = 23,06$ min



Slika 4.54. Spektar masa razgradnog produkta 3 iz eksperimenta 1 na $t_R = 23,07$ min

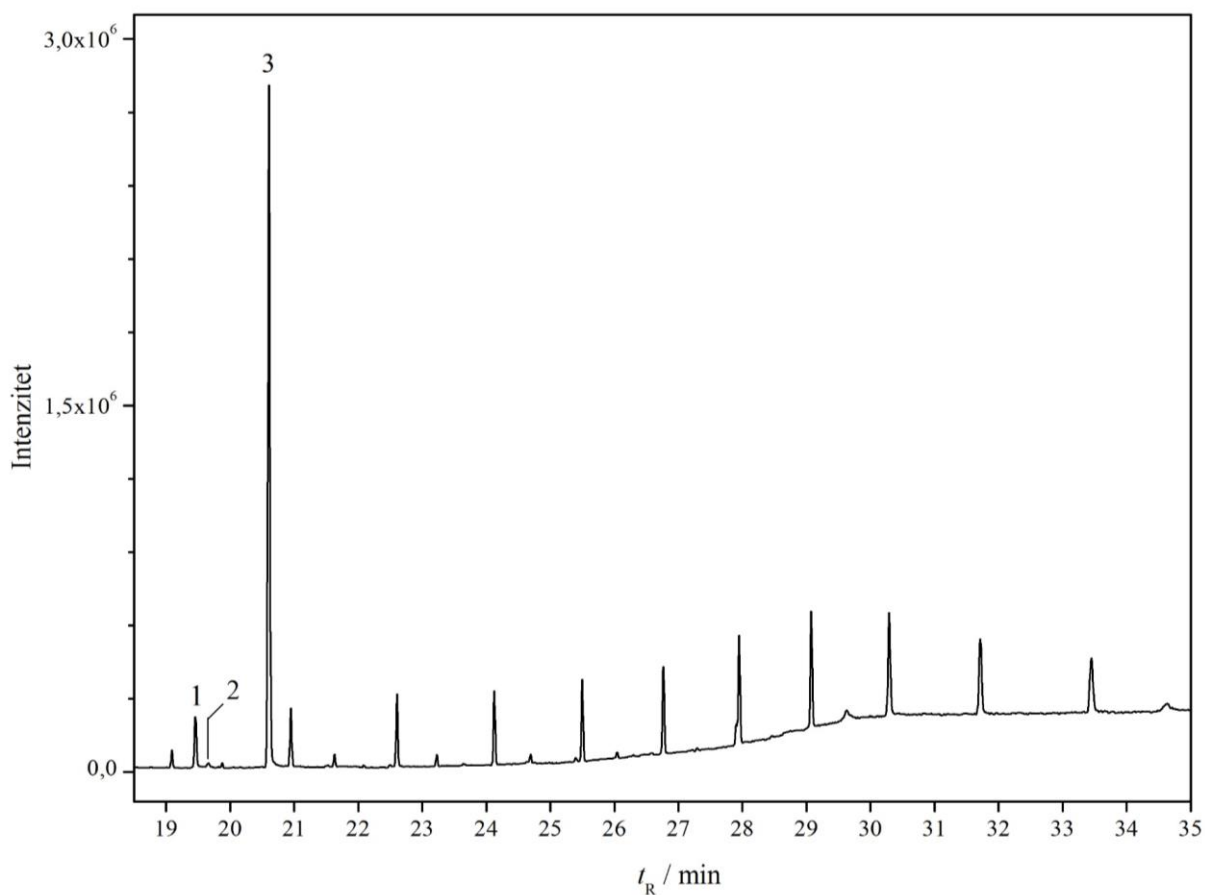


Slika 4.55. Spektar masa razgradnog produkta 4 iz eksperimenta 1 na $t_R = 23,19$ min



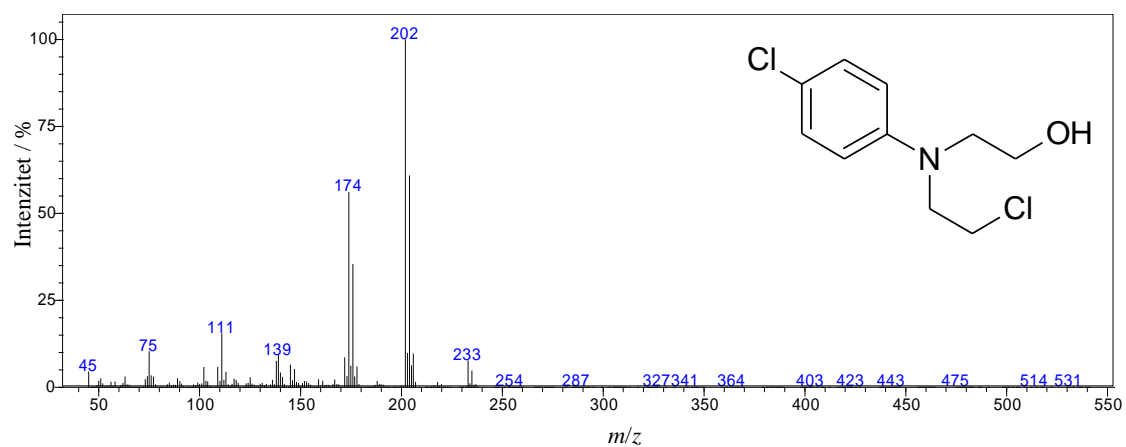
Slika 4.56. Spektar masa razgradnog produkta **5** iz eksperimenta 1 na $t_R = 23,55$ min

U kiseloj otopini SY124 uz dodatak NaDCC-a dobivena su tri razgradna produkta (Slika 4.57). Razgradni produkti u eksperimentu 8 jednaki su za svih 15 minuta ultrazvučne obrade te u početnom uzorku, što je trend i za sve prethodne eksperimente.

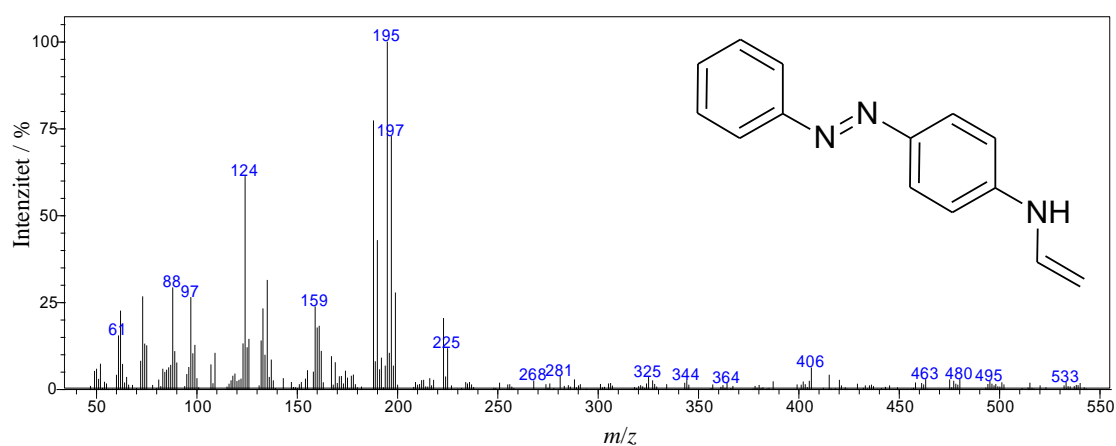


Slika 4.57. Kromatogram dobiven analizom na sustavu GC-MS za eksperiment 8

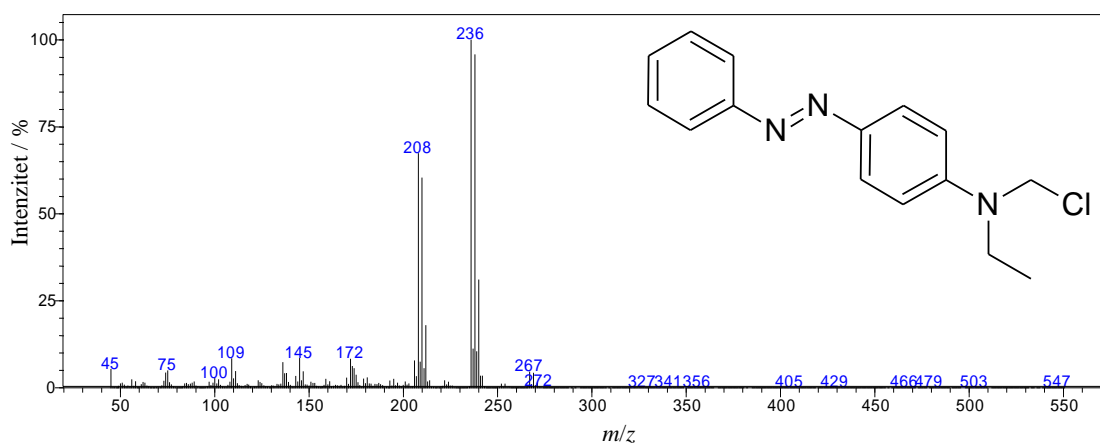
Spektri masa razgradnih produkata dobivenih ultrazvučnom obradom otopine iz eksperimenta 8 prikazani su na Slikama 4.58-4.60.



Slika 4.58. Spektar masa razgradnog produkta **1** iz eksperimenta 8 na $t_R = 19,46$ min



Slika 4.59. Spektar masa razgradnog produkta **2** iz eksperimenta 8 na $t_R = 19,67$ min



Slika 4.60. Spektar masa razgradnog produkta **3** iz eksperimenta 8 na $t_R = 20,60$ min

4.2.4. Razgradnja u vodenom mediju – osvrt na dobivene rezultate

Zbog saznanja o produktima koji nastaju u pojedinom eksperimentu vrlo jasno se da zaključiti koji produkti potječu kao rezultat utjecaja NaDCC-a, hidrolize markera, promjene pH otopine ili ultrazvuka.

U eksperimentu 0 dobivena su 3 razgradna produkta te molekula markera SY124. Kako se marker u izvornom obliku pojavljuje samo u eksperimentu 0 možemo zaključiti da do najslabije razgradnje markera dolazi upravo u neutralnoj otopini SY124 bez prisustva NaDCC-a. Razgradni produkt 2 iz eksperimenta 0 (Slika 4.26) nastao je također i u eksperimentu 7 (Slika 4.32) te eksperimentu 9 u početnoj otopini (Slika 4.42), i to u oba slučaja kao jedini produkt. Kako su u tim eksperimentima uvjeti različiti, miješanje provedeno djelovanjem ultrazvuka (eksp. 0 i 7; poglavlje 4.2.1.) i miješalicom (eksp. 9), pri čemu je samo eksperiment 0 proveden u neutralnom mediju, a samo eksperiment 9 (poglavlje 4.2.2.) sadrži NaDCC, jasno je da je razgradni produkt 2 nastao isključivo kao posljedica hidrolize osnovne molekule markera SY124.

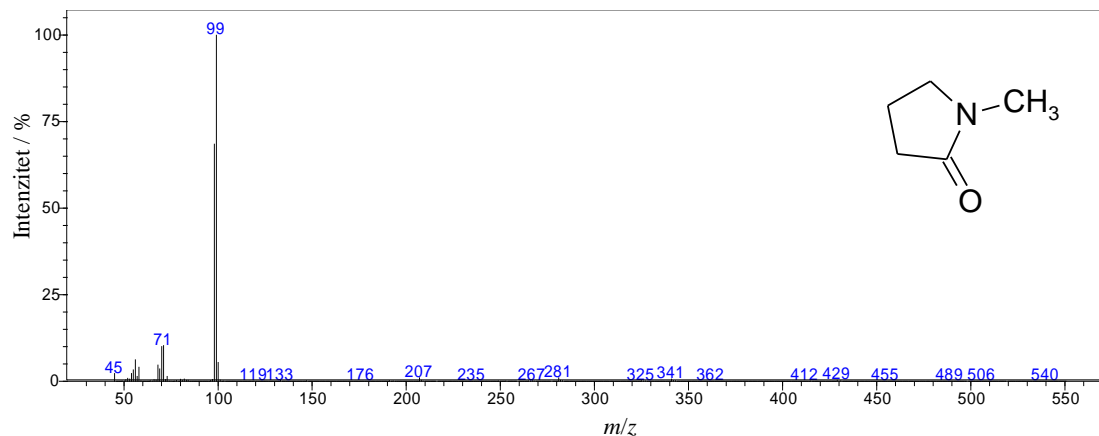
Ultrazvučnom obradom neutralne otopine SY124 uz dodatak NaDCC-a (eksperiment 1) nastalo je 5 razgradnih produkata. Klorirani produkti rezultat su razgradnje markera uz prisustvo NaDCC-a, jer se (isti ili različiti), javljaju samo u eksperimentima gdje smo dodali NaDCC, bez obzira na pH otopine i način miješanja. Neki klorirani produkti jednaki su kao i u eksperimentu 3 (poglavlje 4.2.2.; bez djelovanja UZV), što znači da ultrazvuk nema značajniji utjecaj na razgradnju produkta u prisutnosti NaDCC već više pospješuje homogenizaciju otopine. Razgradni produkt s $-\text{NO}_2$ skupinom vezanom na azobenzen (Slika 4.38 i Slika 4.55), javlja se razgradnjom neutralne otopine markera uz NaDCC bez obzira da li je miješanje provedeno miješalicom ili djelovanjem ultrazvuka pa se njegov nastanak također pripisuje djelovanju NaDCC-a.

Ultrazvučnom obradom kisele otopine SY124 uz dodatak NaDCC-a (eksperiment 8) nastala su 3 razgradna produkta od kojih su 2 klorirana. Zanimljivo je da analiza otopine iz eksperimenta 9, koja je miješana na miješalici, daje 3 potpuno identična razgradna produkta onima iz eksperimenta 8. Budući da je prethodno utvrđeno (poglavlje 4.2.1.) da ultrazvuk razgrađuje marker SY124 iako vrlo sporo u odnosu na NaDCC (poglavlje 4.2.2.) ili uslijed djelovanja kombiniranog oksidacijskog procesa (poglavlje 4.2.3.), ovakvi rezultati su dokaz sličnosti

mehanizma koji dominira tijekom oba procesa oksidacije (kemijska oksidacija – kombinirani oksidacijski procesi). Osim navedenog treba napomenuti da su spomenuti klorirani produkti dobiveni u kiseloj sredini te da se razlikuju od kloriranih produkata dobivenih u neutralnim otopinama (eksperiment 1 i 3) što znači da pH otopine utječe na razgradnju, odnosno na formiranje strukture razgradnih, kloriranih produkata.

Iz svih provedenih eksperimenata jasno je vidljiv utjecaj NaDCC na razgradnju osnovne molekule markera SY124, jer nastaju prvenstveno klorirani razgradni produkti koji se jednostavno mogu povezati upravo sa molekulom NaDCC (SY124 u svojoj strukturi nema klorove atome). S druge strane, utjecaj ultrazvuka na razgradnju ne može se tako jednostavno uočiti budući da je, kako smo već prije i rekli, vrlo slab (poglavlje 4.2.1; na kraju eksperimenta 0 primijećeno tek neznatno obezbojenje i pad koncentracije SY124). Koliki je njegov stvarni utjecaj na razgradnju molekule markera SY124 moglo bi se utvrditi praćenjem promjene koncentracije (ili omjerom koncentracija) nastalih razgradnih produkata (snimanjem na GC-MS utvrđena su 3 razgradna produkta) tijekom cijelog vremena trajanja eksperimenta. Ipak, u prilog pozitivnom djelovanju ultrazvuka ide saznanje da je u eksperimentu 9 (bez djelovanja ultrazvuka, samo miješanje uz NaDCC) u 0-tom vremenu identificiran samo jedan razgradni produkt, kojega nema u 0-tom vremenu eksperimenta 8 (uz djelovanje ultrazvuka i NaDCC). Radi se o razgradnom produktu koji potječe od hidrolize osnovne molekule markera SY124. Budući da su ostali razgradni produkti obje serije eksperimenata identični, dokaz je da ultrazvuk ipak pospješuje razgradnju osnovne molekule SY124, bez obzira što je dominacija NaDCC neusporedivo veća.

Budući da je u svim provedenim eksperimentima bio prisutan acetonitril (temeljna standardna otopina SY124 pripravljena je u acetonitrilu; vidi poglavlje 3.3.1) željelo se vidjeti da li i na koji način ultrazvuk i NaDCC utječu na acetonitril. S tim ciljem provedeni su eksperimenti 4, 5 i 6 (vidi poglavlje 3.3.3). U eksperimentima 4 i 6 (djelovanje ultrazvuka, bez i uz dodatak NaDCC) identificiran je jedan razgradni produkt koji se pojavljuje i u svim ostalim eksperimentima (0-3; 7-9), a koji očito potječe od razgradnje acetonitrila. Spomenuti razgradni produkt prikazan je na Slici 4.61.



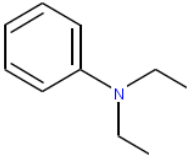
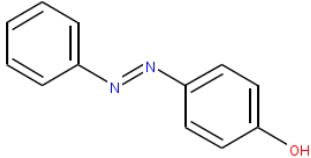
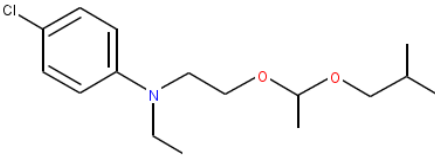
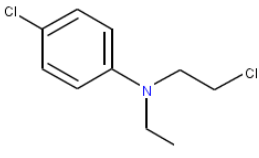
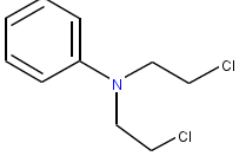
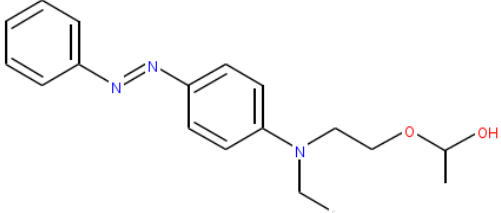
Slika 4.61. Spektar masa razgradnog produkta na $t_R = 9,61$ min koji potječe od acetonitrila

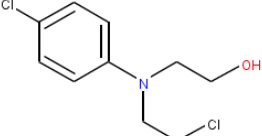
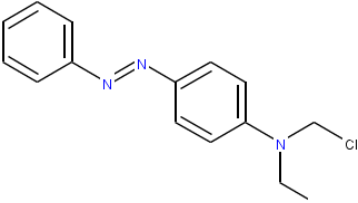
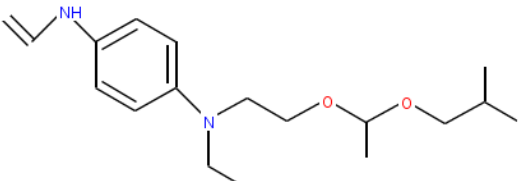
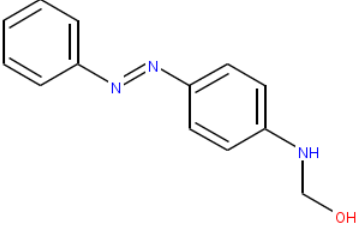
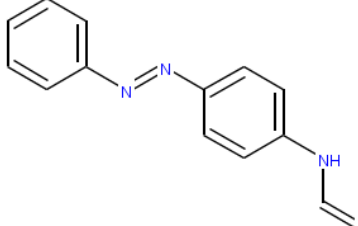
Na taj način spomenuti eksperimenti su nam omogućili lakšu identifikaciju razgradnih produkata jer smo upravo spomenuti razgradni produkt mogli odbaciti znajući da ne potječe od molekule SY124.

4.2.5. Procjena toksičnosti nastalih produkata oksidacijske razgradnje

Toksičnost razgradnih produkata dobivenih ultrazvučnom obradom otopina markera SY124 procijenjena je na isti način kao i u poglavlju 4.1.1. uz upotrebu programa za procjenu toksičnosti, *Toxicity Estimation Software Tool* (TEST). Za procjenu bioakumulacijskog faktora i razvojne toksičnosti svih produkata korištena je konsenzus metoda, a podaci su dani u Tablici 4.2.

Tablica 4.2. Analiza toksičnosti razgradnih produkata dobivenih ultrazvučnom obradom otopina SY124

Produkt	Bioakumulacijski faktor	Razvojna toksičnost
	116,17	+ (0,66)
	82,39	+ (0,62)
	84,94	+ (0,50)
	80,64	+ (0,67)
	69,99	+ (0,87)
	21,70	+ (0,87)

	21,93	+ (0,98)
	67,04	+ (0,58)
	55,53	+ (0,63)
	15,29	+ (0,75)
	37,77	- (0,21)

Produkti koji su već dobiveni pirolizom nisu ponovno navedeni u ovoj tablici. Svi produkti navedeni u Tablici 4.2. pokazuju razvojnu toksičnost, a veću kancerogenu aktivnost imaju klorirani produkti. Produkti s vrijednošću bioakumulacijskog faktora u rasponu od 30 do 100 spadaju u skupinu produkata umjerene bioakumulacije, a prisutnost kisika, u slučaju kloriranih produkata, ne smanjuje nužno njegovu vrijednost, kao što je bio slučaj kod produkata nastalih pirolizom. Samo produkt 1 iz eksperimenta 0 spada u skupinu produkata visoke bioakumulacije (BF = 116,17).

5. ZAKLJUČAK

„Pranje“ goriva postaje sve češća praksa u svijetu, kao i u Hrvatskoj. Provodi se s ciljem što većeg profita prilikom prodaje „pranog“ goriva, ali se nikakva pažnja ne posvećuje pravilnom zbrinjavanju nastalog otpada, koji često u obliku kiselog ekstrakta završava u okolišu. Najčešće upotrebljavani marker koji se ujedno koristi i u Hrvatskoj je Solvent Yellow 124. Njegovo ponašanje u okolišu izaziva veliku zabrinutost stručnjaka koji se bave problematikom azo bojila jer nikakvi podaci o SY124 nisu poznati ni dostupni. Potaknuti time odlučili smo ispitati ponašanje markera SY124 u raznim uvjetima kako bi dobili uvid u njegovu stabilnost u okolišu. Uz to smo proveli identifikaciju i karakterizaciju njegovih razgradnih produkata. Provedenim eksperimentima došli smo do sljedećih zaključaka:

- * Pri temperaturi pirolizatora od 100 °C molekula Solvent Yellow 124 je potpuno stabilna i ne dolazi do njezine fragmentacije.
- * Povećanje temperature pirolizatora omogućuje bolju razgradnju markera SY124, nastanak većeg broja razgradnih produkata te porast njihovih intenziteta.
- * Optimalna temperatura za identifikaciju razgradnih produkata markera je 400 °C jer pri višim temperaturama dolazi do razgradnje razgradnih produkata markera što uzrokuje promjene kromatografskog profila.
- * Pirolitičkom razgradnjom markera na 400 °C identificirano je 15 razgradnih produkata.
- * Većina produkata zadržala je azobenzen u svojoj strukturi, a do pregradnje je došlo u lančanom dijelu molekule markera.
- * Od nastalih produkata samo tri ne sadrže azobenzen u svojoj strukturi, a to su izobutilni alkohol, izobutil-vinil-eter te anilin.
- * Analizom toksičnosti produkata dobivenih pirolitičkom razgradnjom ustanovljeno je da 11 od 15 produkata pokazuje razvojnu toksičnost.
- * Produkti koji na 4-aminoazobenzenu sadrže dušik supstituiran metilnim ili etilnim skupinama imaju najveće vrijednosti bioakumulacijskog faktora, dok su najmanje vrijednosti dobivene za produkte koji u strukturi sadrže atom kisika ili hidroksilnu skupinu.

- * Na temelju dobivenih podataka o toksičnosti razgradnih produkata markera pri povišenoj temperaturi jasno je da spaljivanje markera nije dobar način njegova zbrinjavanja. Toksični produkti dospjeli bi u atmosferu čime bi stupanj onečišćenja znatno porastao.
- * Ultrazvukom visoke snage postiže se vrlo spora razgradnja SY124 te ostvaruje bolje miješanje otopine markera, odnosno bolja homogenizacija otopine. Spora razgradnja objašnjava se manjom količinom nastalih reaktivnih radikala (npr. OH radikala), otpornošću molekule SY124 na razgradnju uslijed djelovanja radikala, te neznatnom migracijom molekule u kavitacijski mjehurić gdje bi došlo do eventualne pirolitičke razgradnje bojila.
- * Oksidacija NaDCC-om znatno pospješuje razgradnju markera pri čemu nastaju klorirani produkti.
- * U kiseloj otopini SY124 količina hidroliziranog oblika molekule markera znatno je veća od početne molekule markera, a isto tako i od količine hidroliziranog oblika u neutralnoj otopini, iz čega je vidljivo da kiselina znatno pospješuje hidrolizu SY124.
- * Miješanjem neutralne otopine markera, uz dodatak NaDCC-a, na miješalici dolazi do pada njegove količine u vremenu što ukazuje na slabo miješanje otopine miješalicom, odnosno na jako malu efikasnost miješanja u odnosu na ultrazvuk. Nijedan razgradni produkt nije nastao kao posljedica miješanja otopine na miješalici što znači da nimalo ne utječe na razgradnju markera. Miješanjem kisele otopine pad količine markera SY124 nije toliko izražen jer prevladava hidroliza markera.
- * Razgradni produkti markera za svaki eksperiment jednaki su za svih 15 minuta ultrazvučne obrade, kao i u početnom uzorku, osim za eksperiment 9 gdje je razgradnja SY124 provedena samo oksidacijom uz NaDCC u kiselom mediju.
- * Ultrazvučnom obradom otopine iz eksperimenta 0 dobivena su 3 razgradna produkta te osnovna molekula markera. Analizom otopina iz eksperimenata 1 i 3 identificirano je 5 razgradnih produkata, otopine eksperimenta 7 samo jedan, otopinama eksperimenata 8 i 9 (15 min) 3 razgradna produkta, a otopinom eksperimenta 9 (0 min) identificiran je samo jedan razgradni produkt.

- * Najslabija razgradnja markera vidljiva je u njegovoj neutralnoj otopini, bez dodatka NaDCC-a što nam dokazuje pojavljivanje pika početne molekule SY124 u kromatogramu.
- * Produkt koji na 4-aminoazobenzenu uz etilne skupine ima supstituiranu –OH skupinu pojavljuje se u svim eksperimentima. On je nastao kao posljedica hidrolize i/ili hidroksiliranja uslijed adicije OH radikala na benzenski prsten.
- * Nastali klorirani produkti rezultat su razgradnje markera pod utjecajem NaDCC-a i pojavljuju se samo u otopinama gdje je on prisutan, dok pH otopine markera utječe na strukturu kloriranih produkata.
- * Razgradni produkt s –NO₂ skupinom vezanom na azobenzenu javlja se razgradnjom neutralne otopine markera uz dodatak NaDCC-a i kod ultrazvučne obrade otopine i kod miješanja otopine miješalicom pa se njegov nastanak također pripisuje oksidaciji azo skupine.
- * Analizom otopine iz eksperimenta 8 (kisela otopina SY124, kombinacija oksidacijskih procesa) dobivena su tri razgradna produkta potpuno jednaka onima iz eksperimenta 9 (kisela otopina SY124, samo kemijska oksidacija uz NaDCC). Ovakvi rezultati su dokaz sličnosti mehanizma koji dominira tijekom oba procesa oksidacije (kemijska oksidacija – kombinirani oksidacijski procesi).
- * Za većinu produkata nastalih obradom otopine markera SY124 dobivene su vrijednosti bioakumulacijskog faktora u rasponu od 30 do 100 pa spadaju u skupinu produkata umjerene bioakumulacije, a prisutnost kisika, u slučaju kloriranih produkata, ne smanjuje njegovu vrijednost, kao što je bio slučaj kod produkata nastalih pirolizom. Samo produkt 1 iz eksperimenta 0 spada u skupinu produkata visoke bioakumulacije (BF = 116,17).

6. ZAHVALA

Prije svega se želim zahvaliti mentorici, izv. prof. dr. sc. Dragani Mutavdžić Pavlović, na poticaju, podršci, pomoći i savjetima tijekom izrade ovog rada.

Od srca se zahvaljujem dr. sc. Ivani Bačić i dr. sc. Hrvoju Sarajliji iz Centra za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja "Ivan Vučetić", MUP RH, na snimanju uzoraka nakon provedenih eksperimenata i na izdvojenom vremenu te volji i trudu da me poduče i pomognu mi tijekom eksperimentalnog rada, a ponajprije na razgovoru kad mi je to najviše trebalo. Iskreno se nadam daljnjoj suradnji s vama.

Također hvala dr. sc. Ivani Grčić sa Zavoda za polimerno inženjerstvo i organsku kemijsku tehnologiju na pomoći pri mjerenjima te doc. dr. sc. Tatjani Gazivoda Kraljević, sa Zavoda za organsku kemiju, na pomoći pri identificiranju struktura razgradnih produkata.

Veliko hvala mojim roditeljima, sestri Luciji i ostatku obitelji što su uvijek uz mene, podržavaju me, potiču i uvijek guraju naprijed.

Mojim prijateljicama, Ivoni i Anamariji, što su tu u dobrim i lošim trenucima, uvijek i zauvijek.

Šećer na kraju, Matija, hvala ti što si moj oslonac, hvala ti što uvijek izvlačiš ono najbolje iz mene, hvala ti što zbog tebe ne skidam osmijeh s lica i hvala ti što zbog tebe uvijek imam snage za ići dalje.

7. LITERATURA

- [1] N. Kuliš Pušić, Uloga i značaj boje u interkulturalnoj komunikaciji, diplomski rad, Sveučilišni centar Varaždin, Studij komunikologija i odnosi s javnošću, Varaždin, 2016.
- [2] M. Krajčinović, Tehnologija bojila i analiza boja, Nakladni zavod Hrvatske, Zagreb 1947.
- [3] I. Gudelj, J. Hrenović, T. Landeka Dragičević, F. Delaš, V. Šoljan, H. Gudelj, Azo boje, njihov utjecaj na okoliš i potencijal biotehnoške strategije za njihovu biorazgradnju i detoksifikaciju, *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **62** (2011) 91-100
- [4] Đ. Parac-Osterman, Osnove o boji i sustavi vrednovanja, Tekstilno-tehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2007.
- [5] D. Vujević, Uklanjanje organskih tvari iz obojenih otpadnih voda primjenom naprednih oksidacijskih procesa, Doktorska disertacija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2007.
- [6] Bojila i bojenje, Interna skripta za studente Kemijsko-tehnološkog fakulteta Sveučilišta u Splitu, Zavod za organsku tehnologiju
- [7] V. Marinović, Fotokatalitička razgradnja azo bojila sol-gel filmovima titanijevog dioksida, Doktorska disertacija, Fakultet strojarstva i brodogradnje, Zagreb, 2012.
- [8] H. Zollinger, Color Chemistry: Syntheses, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments, Third edition, Wiley-VCH, Weinheim, 2003., str. 1-2.
- [9] D. Wasenberg, I. Kyriakides, S. N. Agathos, White-rot fungi and their enzymes for the treatment of the industrial dye effluents, *Biotechnology Advances* **22** (2003) 161-187
- [10] K. Novoselić, Obezbojenje kongo crvenila i malahintog zelenila pomoću *Trametes versicolor* na čvrstim supstratima, Diplomski rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2016.
- [11] A. Gređelj, Organska sintetska bojila u odabranim proizvodima za osobnu higijenu-negativan utjecaj na zdravlje i okoliš, Natječaj za rektorovu nagradu, Geotehnički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Varaždin, 2013.
- [12] Y. Anjaneyulu, N. Sreedhara Chary, D. S. Suman Raj, Decolourization of industrial effluents – available methods and emerging technologies, *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* **4** (2005) 245-273

- [13] Colour Index, The Society of Dyers and Colourists, Vol. IV, Bradford, West Yorkshire, 1971.
- [14] J. Griffiths, Colour and Constitution of Organic Molecules, Academic Press, London, 1976.
- [15] K. Hunger, Industrial Dyes-Chemistry, Properties, Applications, Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH, 2003.
- [16] C. A. Martínez-Huitle, E. Brillas, Decontamination of wastewaters containing synthetic organic dyes by electrochemical methods: A general review, *Applied Catalysis B: Environmental* **87** (2009) 105–145
- [17] Y. Z. Wang, A. J. Wang, W. Z. Lin, Q. Sun, Enhanced azo dye removal through anode biofilm acclimation to toxicity in single-chamber biocatalyzed electrolysis system, *Bioresource Technology* **142** (2013) 688-692
- [18] N. Puvaneswari, J. Muthukrishnan, P. Gunasekaran, Toxicity assessment and microbial degradation of azo dyes, *Indian Journal of Experimental Biology* **44** (2006) 618-626
- [19] F. P. Van der Zee, Anaerobic azo dye reduction, Doctoral Thesis, Wageningen University, The Netherlands, 2002.
- [20] K. T. Chung, Mutagenicity and carcinogenicity of aromatic amines metabolically produced from azo dyes, *Journal of Environmental Science and Health, Part C: Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews* **18:1** (2000) 51-74
- [21] J. A. Miller, E. C. Miller, The carcinogenic aminoazo dyes, *Advances in Cancer Research* **1** (1953) 339-396
- [22] European Commission Decision 2001/574/EC
- [23] https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Solvent_yellow_124#section=Information-Sources, (studeni 2016.)
- [24] G. Zadora, Laundering of „illegal“ fuels – a forensic chemistry perspective, *Acta Chim. Slov.* **54** (2007) 110-113
- [25] T. Tomić, N. Uzorinac Nasipak, Razvoj metode određivanja plave boje u plinskim uljima vezanim sustavom NP-HPLC/DAD, *goriva i maziva* **54,2** (2015) 94-100

- [26] D. Šeremišić, V. Rukavina, T. Tomić, N. Uzorinac Nasipak, Poboljšanje postojećeg postupka određivanja indikatora u plinskim uljima, *goriva i maziva* **50, 3** (2011) 243-250
- [27] Zakon o trošarinama, NN 22/13, Pravilnik o primjeni zakona o trošarinama što se odnosi na plinsko ulje obojano plavom bojom za namjene u poljoprivredi, ribolovu, ribogojstvu i akvakulturi, NN 156/13
- [28] T. L. Goff, S. Mazlum, S. Wood, Production of a Solvent Yellow 124 „euromarker“ reference material certified for purity, *Fuel* **88** (2009) 2025-2031
- [29] https://en.wikipedia.org/wiki/Fuel_dyes (ožujak 2017.)
- [30] J. Orzel, M. Daszykowski, I. Grabowski, G. Zaleszczyk, M. Sznajder, Identifying the illegal remove from diesel oil of certain chemical markers that designate excise duty, *Fuel* **117** (2014) 224-229
- [31] J. Orzel, M. Daszykowski, I. Grabowski, G. Zaleszczyk, M. Sznajder, B. Walczak, Simultaneous determination of Solvent Yellow 124 and Solvent Red 19 in diesel oil using fluorescence spectroscopy and chemometrics, *Talanta* **101** (2012) 78-84
- [32] <http://www.vecernji.hr/crna-kronika/pranje-plavog-dizela-benzinske-crpkе-kupovale-krivotvorinu-tvornica-onacistila-vode-visemilijunska-steta-1119364>, (ožujak 2017.)
- [33] <http://www.glas-slavonije.hr/314020/8/Na-podrucju-Djakova-otkrivena-ilegalna-tvornica-za-proizvodnju-eurodizela> (ožujak 2017.)
- [34] B. Tušar, Pročišćavanje otpadnih voda, Kigen d.o.o., Zagreb, 2009.
- [35] N. Ružinski, A. Anić Vučinić, Obrada otpadnih voda biljnim uređajima, Hrvatska sveučilišna naklada d.o.o., Zagreb, 2010.
- [36] <http://www.lenntech.com/processes/disinfection/what-is-water-disinfection.htm> (ožujak 2017.)
- [37] V. Lazarova, P. Savoye, M. L. Janex, E. R. Blatchey III, M. Pommepuy, Advanced wastewater disinfection technologies: State of the art and perspectives, *Wat. Sci. Tech.* **40** (1999) 203-213
- [38] T. Clasen, P. Edmondson, Sodium dichloroisocyanurate (NaDCC) tablets as an alternative to sodium hypochlorite for the routine treatment of drinking water at the household level, *Int. J. Hyg. Environ.-Health* **209** (2006) 173-181

- [39] P. M. Kuznesof, Sodium dichloroisocyanurate (NaDCC – anhydrous and dihydrate), Chemical and Technical Assessment (CTA), FAO 2004.
- [40] S. Esplugas, J. Gimenez, S. Contreras, E. Pascual, M. Rodriguez, Comparison of different advanced oxidation processes for phenol degradation, *Water Research*, **36** (2002) 1034-1042
- [41] R. Andreozzi, V. Caprio, A. Insola, R. Marotta, Advanced oxidation processes (AOP) for water purification and recovery, *Catalysis Today* **53** (1999) 51-59
- [42] H. Drmić, A. Režek Jambrak, Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva, *Croat. J. Food Sci. Technol.* **2** (2010) 22-33
- [43] A. Režek Jambrak, Utjecaj ultrazvuka na fizikalna i funkcionalna svojstva proteina sirutke, Doktorska disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2008.
- [44] Z. Eren, Ultrasound as a basic and auxiliary process for dye remediation: A review, *Journal of Environmental Management* **128** (2012) 127-141
- [45] M. Siddique, R. Farooq, Z. M. Khan, Z. Khan, S. F. Shaukat, Enhanced decomposition of reactive blue 19 dye in ultrasoundassisted electrochemical reactor, *Ultrasonic Sonochemistry* **18** (2011) 190-196
- [46] C. Wu, C. Chang, Decolorization of Reactive Red 2 by advanced oxidation processes: Comparative studies of homogeneous and heterogeneous systems, *Journal of Hazardous Materials* **B128** (2006) 265-272
- [47] E. Hoh, K. Mostovska, Large volume injection techniques in capillary gas chromatography, *Journal of Chromatography A* **1186** (2008) 2-15
- [48] <http://www.eag.com/gas-chromatography-mass-spectrometry-gc-ms/>, (ožujak 2017)
- [49] G. L. Glish, R. W. Vatchet, The basics of mass spectrometry in the twenty-first century, *Nature Reviews/Drug Discovery* **2** (2003) 140-150
- [50] M. L. Vestal, Methods of ion generation, *Chemical Reviews* **101** (2001) 361-375
- [51] N. Galić, Spektrometrija masa, skripta za internu upotrebu, Zavod za analitičku kemiju, Kemijski odsjek, PMF, Zagreb, 2011.
- [52] E. Gheraldi, I. Degano, M. Perla Colombini, J. Mazurek, M. Schilling, T. Learner, Py-GC-MS applied to the analysis of synthetic organic pigments: characterization and identification in paint samples, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **407** (2015) 1415-1431

- [53] Naoko Sonoda, Characterization of organic azo-pigments by pyrolysis–gas chromatography, *Studies in Conservation* **44:3** (1999) 195-20
- [54] J. Zieba-Palus, G. Zadora, J. M. Milczarek, P. Koscielniak, Pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry analysis as a useful tool in forensic examination of automotive paint traces, *J. Chromatogr.* (2008)
- [55] <http://www.chromatographyonline.com/application-pyrolysis-gas-chromatography-mass-spectrometry-identification-polymeric-materials-0> (ožujak 2017.)
- [56] Priručnik za rad s pirolizatorom EGA/Py-3030D, FRONTIER LAB, Saikon, Japan, 2012
- [57] X. M. Ma, R. Lu, T. Miyakoshi, Application of Pyrolysis Gas Chromatography/Mass Spectrometry in Lacquer Research: A Review, *Polymers* **6** (2014) 132-144
- [58] M. Cindrić, A. Marković, A. Horvatić, Sprengnute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene, *medicina* **45, 3** (2009) 218-232
- [59] http://free-zg.t-com.hr/Svjatlana_Luterotti/09/091/09131.htm (ožujak 2017.)
- [60] <http://www.bio-rad.com/en-hr/applications-technologies/liquid-chromatography-principles> (ožujak 2017.)
- [61] group of authors, Tandem mass spectrometry – Applications and principles, edited by Jeevan K. Prasain, InTech, 2010.
- [62] <https://nationalmaglab.org/user-facilities/icr/techniques/tandem-ms> (ožujak 2017.)
- [63] <http://www.jeolusa.com/DesktopModules/Bring2mind/DMX/Download.aspx?EntryId=78> (ožujak 2017.).
- [64] <https://www.lgcstandards.com/GB/en/Solvent-Yellow-124-SY124-Sudan-455-Somalia-Yellow-T10-/p/ERM-AC316> (ožujak 2017.)
- [65] <https://www.epa.gov/chemical-research/toxicity-estimation-software-tool-test> (ožujak 2017.)
- [66] B. Beek, S. Bohling, U. Bruckmann, C. Franke, U. Johncke, G. Studinger, The Assessment of bioaccumulation, *The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2, Part J*, 2000.

8. SAŽETAK

Ultrazvučna i toplinska stabilnost euromarkera Solvent Yellow 124 i procjena toksičnosti razgradnih produkata

C.I. Solvent Yellow 124 je najčešće upotrebljavani marker koji se dodaje u goriva u svrhu njihova razlikovanja obzirom na porezni razred. Kako se cijene goriva različitih poreznih razreda razlikuju i do 3 kn/L „pranje“ goriva postaje česta praksa u Hrvatskoj kao i u svijetu. „Pranje“ goriva je ilegalan proces uklanjanja markera za razlikovanje goriva različitih poreznih razreda ekstrakcijom s kiselinom i prodaja „pranog“ goriva po višoj cijeni. Takav način ilegalne prodaje goriva bez plaćanja poreza oštećuje državu za milijunske iznose. Osim države, oštećeni su i korisnici takvog goriva, a izrazitu štetu trpi i okoliš jer se otpadni, kiseli ekstrakt nakon „pranja“ odlaže u okoliš bez pravilnog zbrinjavanja. Glavni problem leži u činjenici da su razgradni produkti azo bojila, kakav je i SY124, često puno toksičniji od početne molekule, a ne daju vidljivo obojenje kada su prisutni u okolišu. Kako bi ispitali toksičnost razgradnih produkata markera SY124 provedena je njihova analiza u tri različita sustava.

Pirolitičkom razgradnjom markera na 400 °C dobiveno je 15 produkata, od kojih čak 11 pokazuje kancerogenu aktivnost.

Mogućnost razgradnje SY124 u vodi ispitana je primjenom napredne oksidacije pomoću ultrazvuka visoke snage, kemijskom oksidacijom uz NaDCC, te kombinacijom oksidacijskih procesa (UZV/NaDCC) na otopine kojima se simulirala vodena sredina u kojoj se može naći SY124 nakon što nekontrolirano dospije u okoliš. Razgradni produkti dobiveni oksidacijom molekule SY124 analizirani su pomoću plinske kromatografije vezane sa spektrometrom masa (GC-MS) te tekućinske kromatografije s tandemnim spektrometrom masa (LC-MS/MS). Svi produkti nastali ultrazvučnom obradom otopina markera su u većoj mjeri toksični.

Ključne riječi: Solvent Yellow 124, marker, „pranje“ goriva, razgradnja, toksičnost

9. SUMMARY

Sonochemical and Thermal Stability of Euromarker Solvent Yellow 124 and Toxicity Assessment of Degradation Products

C.I. Solvent Yellow 124 is the most commonly used marker that is added to the fuel in order to distinguish them due to the tax class. As the price of fuel different tax brackets vary up to 3 kn/L fuel "laundering" becomes common practice in Croatia as well as in the world. Fuel "laundering" is illegal process of removing markers to distinguish different fuel tax brackets by extraction with acid and sale of "laundered" fuel at a higher price. This procedure of illegal fuel sale, without paying taxes, damages the state for millions. Except the state, users of such fuel are also damaged and the substantial damage is made to the environment because the waste, acid extract after "laundering" is disposed in the environment without proper care. The main problem lies in the fact that the degradation products of azo dyes, such as SY124, are often much more toxic than the initial molecule, but do not provide visible color when they are present in the environment. To test the toxicity of the degradation products of marker SY124 we conducted their analysis in three different systems.

Pyrolysis of the marker at 400 °C yielded 15 products, of which 11 show carcinogenic activity. The potential for degradation of SY124 in water was tested by applying advanced oxidation by high-energy ultrasound, chemical oxidation with NaDCC and a combination of oxidation processes (UZV / NaDCC) to solutions which simulated the aqueous medium in which the SY124 can be found after being leaked uncontrollable into the environment. The degradation products obtained by oxidation of the SY124 molecule were analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometer (GC-MS) and liquid chromatography tandem mass spectrometer (LC-MS / MS). All the products obtained by ultrasonic treatment of marker solutions are to a greater extent toxic.

Keywords: Solvent Yellow 124, marker, fuel "laundering", degradation, toxicity

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 22. travnja 1994. godine u Zagrebu. Nakon završene osnovne škole, 2009. godine upisujem Gimnaziju Antun Gustav Matoš u Zaboku. Godine 2013. upisala sam Preddiplomski studij na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, smjer Kemijsko inženjerstvo. Na drugoj godini studija odradila sam demonstraturu na laboratorijskim vježbama kolegija Opća i anorganska kemija na zavodu za Opću i anorgansku kemiju fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije. Praksu sam odradila u Centru za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja „Ivan Vučetić“. 2016. godine završavam preddiplomski studij obranom završnog rada pod nazivom „Utjecaj pH na sorpciju albendazola“, i time stječem akademski naziv prvostupnice kemijskog inženjerstva. Iste godine upisujem Diplomski studij kemijskog inženjerstva, smjer Kemijsko procesno inženjerstvo.

Izrazito sam komunikativna osoba, mogu raditi samostalno, kao i u timu. Prilagodljiva sam novim okruženjima, voljna prihvatiti svaki novi zadatak, željna učenja i iskustva. Jako sam dobar govornik i prezentator. Materinski jezik mi je hrvatski. Od stranih jezika aktivno koristim engleski jezik, govorno i pismeno. Jako dobro se snalazim u radu na računalu, a od računalnih programa vrlo dobro sam upoznata s programima Microsoft Excel, Word, Power Point. Poznajem osnove programa Matlab.