

# Kromatografska analiza aromatskih amina u bojilima za tekstilne materijale

---

Povodnik, Juraj

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Textile Technology / Sveučilište u Zagrebu, Tekstilno-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:201:204064>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-25**



Repository / Repozitorij:

[Faculty of Textile Technology University of Zagreb - Digital Repository](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Tekstilno-tehnološki fakultet  
Završni rad

Završni rad

**KROMATOGRAFSKA ANALIZA AROMATSKIH AMINA U BOJILIMA ZA  
TEKSTILNE MATERIJALE**

JURAJ POVODNIK

Zagreb, srpanj 2017. godine

Sveučilište u Zagrebu  
Tekstilno-tehnološki fakultet  
Zavod za tekstilno-kemijsku tehnologiju i ekologiju

Završni rad

**KROMATOGRAFSKA ANALIZA AROMATSKIH AMINA U BOJILIMA ZA  
TEKSTILNE MATERIJALE**

Izv. prof. dr. sc. ANA SUTLOVIĆ

JURAJ POVODNIK, 9957/TTI

Zagreb, srpanj 2017. godine

Sveučilište u Zagrebu  
Tekstilno-tehnološki fakultet  
Zavod za tekstilno-kemijsku tehnologiju i ekologiju

Broj stranica: 37

Broj tablica: 3

Broj slika: 28

Broj formula: 2

Broj literature: 18

Članovi povjerenstva: 1. Izv. prof. dr. sc. Livio Racane, predsjednik

2. Izv. prof. dr. sc. Ana Sutlović, član - mentor

3. Izv. prof. dr. sc. Martinia Ira Glogar, član

4. Izv. prof. dr. sc. Branka Vojnović, zamjenik člana

Datum predaje rada: 10.7. 2017.

Datum obrane rada: 14.7.2017.

Eksperimentalni dio rada proveden je na opremi i uređajima ispitnog laboratorija tvrtke Mirta-kontrol d.o.o.

## **SAŽETAK**

U radu su provedeni postupci ekstrakcije bojila sa vlakana pamučnog i poliesterskog uzorka, postupci tankoslojne i tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, a sve u svrhu kvalitativne i kvantitativne analize determinacije potencijalno po zdravlje štetnih aromatskih amina.

Tankoslojnom kromatografijom se dokazuje dolazi li do redukcije azo veze u bojilu na aromatske amine, a tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti je li redukcijom stvoren potencijalno štetni amin i u kojoj koncentraciji.

Dobiveno je da koncentracija detektiranog benzidina daleko prekoračuje definiranu graničnu vrijednost od 30 mg/kg tj. da uzorci sadrže veliku količinu navedenog amina jer je na uzorke prije ispitivanja nanešena poviša količina čistog amina.

**Ključne riječi:** Azo-bojila, aromatski amini, ekstrakcija, kromatografija

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OPĆI DIO.....</b>	<b>2</b>
2.1. Azo-bojila .....	2
2.1.1. Toksičnost azo-bojila.....	3
2.2. Kromatografija i kromatografske metode.....	7
2.2.1. Tankoslojna kromatografija.....	7
2.2.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.....	11
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>17</b>
3.1. Rad na HPLC uređaju i izrada kalibracijskih krivulja.....	17
3.1.1. Pokretanje rada uređaja i rad na programu Istrument1 Online.....	18
3.1.2. Propuštanje amina kroz HPLC uređaj .....	20
3.1.3. Izrada kalibracijske krivulje u Instrument1 Online .....	21
3.1.4. Isključivanje HPLC uređaja iz rada.....	22
3.2. Ekstrakcije vlakana.....	22
3.2.1. Ekstrakcija vlakana s pamučnog uzorka – postupak rada.....	24
3.2.2. Ekstrakcija vlakana s poliesterskog uzorka – postupak rada.....	25
3.3. Kromatografska analiza.....	26
3.3.1. Tankoslojna kromatografija – postupak rada.....	27
3.3.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti – postupak rada .....	28
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>30</b>
<b>5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>35</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>36</b>

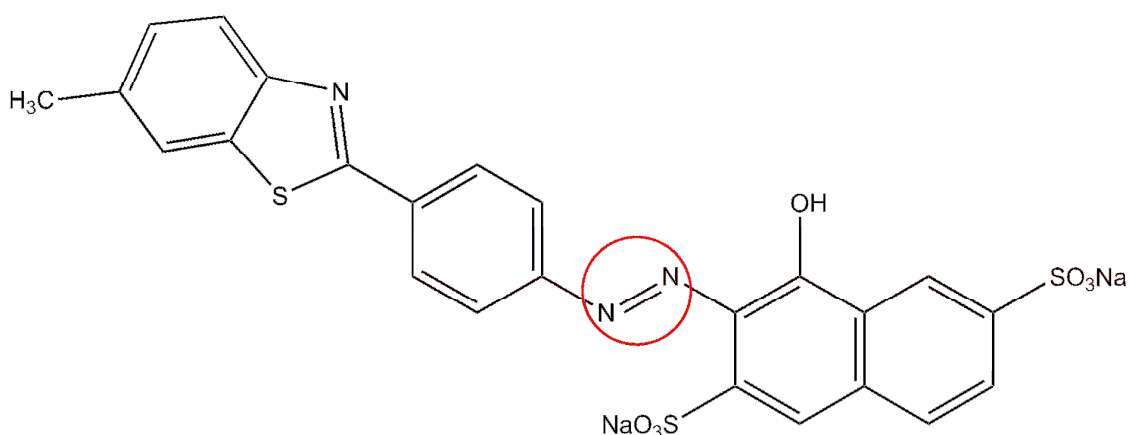
## 1. UVOD

Azo bojila su jedna od najbrojnijih skupina bojila koja se koriste u bojadisanju tekstila. Neka od azo bojila u slučaju slabe postojanosti silaze s obojenog materijala i penetriraju kroz epitel kože u krv, gdje može doći do redukcije azo skupina i nastajanja aromatskih amino spojeva. Direktiva 2002/61/EC utvrđuje 22 aromatska amina koji mogu biti kancerogeni te radi osiguranja zaštite zdravlja potrošača, određuje se prisutnost tih amina i njihova koncentracija kromatografskim metodama. Tankoslojnom kromatografijom se utvrđuje je li redukcijom došlo do stvaranja aromatskih amina nanošenjem uzorka na TLC pločicu i uranjanjem dijela pločice u otapalo. Otapalo je mobilna faza i amin će se zajedno s njom kretati po stacionarnoj fazi (adsorbentu) pločice. Rezultat su pikovi, odnosno tragovi amina vidljivi pod UV lampom. Tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) određuje se o kojem je aminu riječ i u kojoj je koncentraciji prisutan. U ovom kromatografskom postupku uzorak (amin) prolazi s mobilnom fazom kroz kolonu punjenju sitnim česticama stacionarne faze pumpanjem mobilne faze pod visokim tlakom. Samome određivanju amina prethodi izrada kalibracijskih krivulja propisanih amina te je potrebno HPLC metodom definirati sve propisane amine tako da se svaki amin propušta u minimalno tri koncentracije. Kako bi se moglo pristupiti kromatografskoj analizi potrebno je bojilo odvojiti od materijala (uzorka) koji se ispituje, a to se postiže ekstrakcijom bojila. U ovome radu će se upoznati s metodom ekstrakcije bojila sa vlakana, postupkom tankoslojne kromatografije prema normi HRN EN ISO 14362-1 te s radom na HPLC uređaju u svrhu identifikacije i kvantifikacije utvrđenih aromatskih amina.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Azo bojila

Azo bojila spadaju u skupinu sintetskih bojila koja se danas koriste i kojima se može postići široka paleta tonova. Postoji nekoliko načela prema kojima se sintetska bojila mogu svrstati u skupine. Jedno od načela je podjela bojila prema kemijskom sastavu. Ovom podjelom, bojila dobivaju naziv prema osnovnom kromoforu u molekuli. Na slici 1. prikazan je primjer azo-bojila s označenim kromoforom i auksokromima [1].



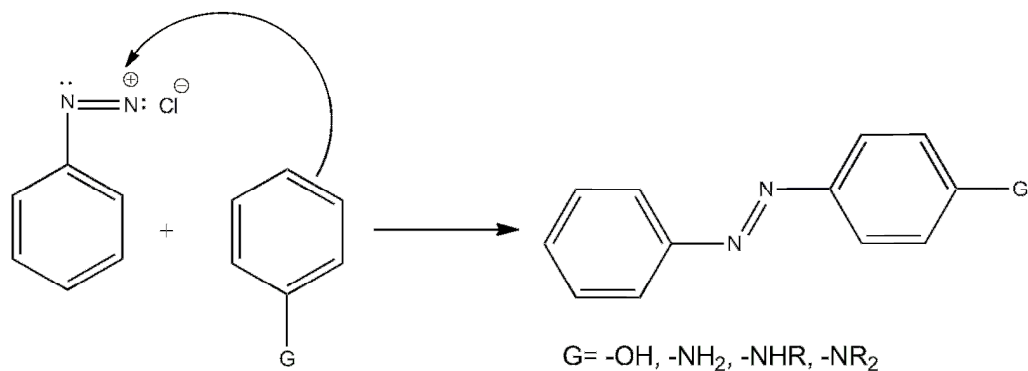
Slika 1. Kondenzirana strukturna formula direktnog bojila sa crveno označenim kromoforom

Tako je svim azo bojilima zajednička azo ( $-\text{N}=\text{N}-$ ) veza koja je vezana na dva  $\text{sp}^2$  hibridizirana C atoma. U većini slučajeva, azo-skupinom se povezuju dva aromatska prstena. Većina komercijalno važnih bojila sadrže jednu azo-skupinu, pa ih se stoga naziva monoazo bojilima, ali također mogu sadržavati dvije (diaz) ili pak tri (triaz) skupine [2].

Azo-bojila, odnosno azo-spojevi općenito nastaju reakcijom diazo-kopuliranja (slika 2.). To je reakcija u kojoj arendiazonijeve soli djeluju kao elektrofilu u aromatskim supstitucijama. Arendiazonijev ion je slabi elektrofil koji djeluje samo ako je aromatski prsten aktiviran supstituentom s jakim +I efektom. Tako reakcija kopuliranja teče samo onda kada je aromatski prsten aktiviran elektro-donorskim supstituentom, npr.  $-\text{OH}$ ,  $-\text{NH}_2$  jer je arendiazonijev kation slabi elektrofil koji napada benzenski prsten samo na



mjestu povećane elektronske gustoće, a to je u p-položaju prema skupini supstituentu. [3].



Slika 2. Reakcija diazo-kopuliranja

### 2.1.1. Toksičnost azo-bojila

Prije pojave sintetskih bojila ljudi su bojadili tekstil bojilima dobivenim iz raznih prirodnih biljnih i mineralnih izvora. Sve se promijenilo kada je W.H.Perkin 1856. sintetizirao prvo sintetičko bojilo, bazno bojilo movein. Nakon sinteze moveina počinje i sinteza drugih bojila koja gotovo u potpunosti potiskuju prirodna bojila iz upotrebe [1].

Nedugo nakon otkrića prvog sintetskog bojila, točnije 1884. godine objavljeno je da nova anilinska bojila, pri nošenju obojene odjeće, djelovanjem znoja, uzrokuju alergijske reakcije [4].

U dvadesetome stoljeću (1940. godine) pojavom prvih najlonskih (PA vlakno) čarapa uočeno je da pri nošenju istih kod nekih osoba dolazi do pojave dermatitisa, ali 1947. godine dokazano je da takvu senzibilnost pri nošenju nisu uzrokovala poliamidna vlakna već neka bojila kojima su vlakna obojena. Utvrđeno je da je to azo disperzno bojilo C.I.Disperse Yellow 3 i p-phenilendiamin komponenta u bojilu [4].

1950. godine epidemiolozi su otkrili da među osobama koje su radile u sintezi bojila ima oboljelih od karcinoma krvi.

1974. godine vodeći europski proizvođači bojila, radi osiguranja sigurnosti proizvodnje i zaštite okoliša osnovali su Ekološko i toksikološko udruženje industrije za proizvodnju bojila, ETAD sa sjedištem u Baselu, Švicarska [4].

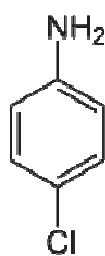
Prema istraživanjima ETAD-a više od 10 % bojila pripada skupini proizvoda koji su za zdravlje opasni ili toksični. Azo-bojila nisu jedina bojila koja mogu biti opasna po zdravlje ali su zastupljena više od 60 % od svih bojila. Dokazano je da neka azo bojila, ukoliko imaju slabu postojanost na znoj i slinu, silaze s vlakna i prodiru kroz epitel kože u krv. U krvi može doći do redukcije, oksidacije ili enzimatske razgradnje azo skupina pa nastaju aromatski amino spojevi koji često mogu dovesti do kancerogenih posljedica. Azo veza često je najslabiji dio molekule azo bojila i lako može doći do enzimskog raspada u organizmu. Zbog raznih enzima i bakterija koje se nalaze u probavnom traktu ali i enzima u jetri, bubrezima, plućima, srcu, mozgu dolazi do redukcije azo-bojila, do reduktivnog cijepanja azo veze i nastaju kancerogeni aromatski amini. Nastali amini apsorbiraju se u crijevima i vežu i za DNA što može uzrokovati mutacije i stvaranje tumora. Izloženost aromatskim aminima može uzrokovati i oksidaciju željeza u hemoglobinu ( $Fe^{2+}$  u  $Fe^{3+}$ ) što blokira vezanje kisika i rezultira slabošću i vrtoglavicom. Aromatski amini, osim djelovanjem bakterija i enzima, mogu se isti tako dobiti i kao posljedica raspada azo bojila pod utjecajem topline ili sunčeve svjetlosti [4].

Kancerogenost aromatskih amina varira s obzirom na njihovu strukturu ali se stvaranje elektrofilnih čestica u organizmu smatra kao najčešći mehanizam njihovog kancerogenog djelovanja. Veliki potencijal kancerogenosti imaju aromatski amini koji se sastoje od dva ili više aromatska prstena te amini supstituirani nitro, metilnim i metoksi skupinama koje povećavaju toksičnost bojila. Supstitucije s halogenim elementima također povećavaju toksičnost. Smanjenje ili potpuno ukidanje toksičnost postiže se supstitucijom s karboksilnim i sulfo skupinama [4].

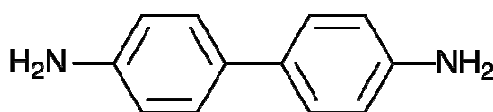
Kancerogeni aromatski amini koji se izvode iz pojedinih azo bojila mogu biti:

- kancerogeni derivati anilina
- kancerogeni derivati benzidina
- kancerogeni derivati toluidina [4].

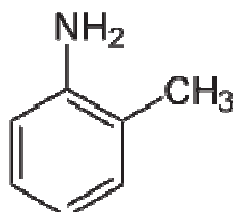
Na slikama 3-5 prikaze su strukturme formule gore navedenih amina.



Slika 3. Derivat anilina 4-kloroanilin [5]



Slika 4. Derivat benzidina 4,4'-diaminobifenil [6]



Slika 5. Derivat toluidina 2-aminotoluen [7]

Direktiva 2002/61/EC utvrđuje dvadeset i dva potencijalno kancerogena amina izdvojena iz pojedinih azo-bojila a navedenih u tablici 1.

Tablica 1. Amini propisani Direktivom 2002/61/EC [8]

Br.	CAS broj	Indeks broj	EC broj	Tvar
1	92-67-1	612-072-00-6	202-177-1	bifenil-4-ilamin 4-aminobifenil ksenilamin
2	92-87-5	612-042-00-2	202-199-1	benzidin
3	95-69-2		202-441-6	4-kloro-o-toluidin
4	91-59-8	612-022-00-3	202-080-4	2-naftilamin
5*	97-56-3	611-006-00-3	202-591-2	o-aminoazotoluen 4-amino-2',3-dimetilazobenzen 4-o-tolilazo-o-toluidin

6*	99-55-8		202-765-8	5-nitro- <i>o</i> -toluidin
7	106-47-8	612-137-00-9	203-401-0	4-kloroanilin
8	615-05-4		210-406-1	4-metoksi- <i>m</i> -fenilendiamin
9	101-77-9	612-051-00-1	202-974-4	4,4'-metilendianilin 4,4'-diaminodifenilmetan
10	91-94-1	612-068-00-4	202-109-0	3,3'-diklorobenzidin 3,3'-diklorobifenil-4,4'-ilendiamin
11	119-90-4	612-036-00-X	204-355-4	3,3'-dimetoksibenzidin <i>o</i> -dianisidin
12	119-93-7	612-041-00-7	204-358-0	3,3'-dimetilbenzidin 4,4'- <i>bi-o</i> -toluidin
13	838-88-0	612-085-00-7	212-658-8	4,4'-metilendi- <i>o</i> -toluidin
14	120-71-8		204-419-1	6-metoksi- <i>m</i> -toluidin <i>p</i> -krezidin
15	101-14-4	612-078-00-9	202-918-9	4,4'-metilen-bis-(2-kloro-anilin) 2,2'-dikloro-4,4'-metilen-dianilin
16	101-80-4		202-977-0	4,4'-oksidianilin
17	139-65-1		205-370-9	4,4'-tiodianilin
18	95-53-4	612-091-00-X	202-429-0	<i>o</i> -toluidin 2-aminotoluen
19	95-80-7	612-099-00-3	202-453-1	4-metil- <i>m</i> -fenilendiamin
20	137-17-7		205-282-0	2,4,5-trimetilanilin
21	90-04-0	612-035-00-4	201-963-1	<i>o</i> -anisidin 2-metoksianilin
22**	60-09-3	611-008-00-4	200-453-6	4-aminoazobenzen
<p>* CAS brojevi 97-56-3 (Br. 5) i 99-55-8 (Br. 6) dalje reduciraju na CAS brojeve 95-53-4 (Br. 18) i 95-80-7 (Br.19).</p> <p>** Azo bojila koja mogu tvoriti 4-aminoazobenzen, proizvode pod uvjetima ove metode anilin i 1,4-fenilendiamin. Prisutnost ovih bojila ne može biti pouzdano utvrđena bez dodatnih informacija, npr. kemijske strukture korištenih bojila.</p>				

Osim što utvrđuje kancerogene aromatske amine, ista definira i njihovu graničnu vrijednost. Azo-bojila koja otpuštaju jedan ili više aromatskih amina u detektiranoj koncentraciji iznad 30 ppm-a (30 mg/kg) u uzorku materijala se ne smiju koristiti u tekstilnim i kožnim proizvodima koji mogu doći u neposredan doticaj s kožom ili usnom šupljinom., kao na primjer:

- odjeća, krevetnina, dijelovi za kosu, vlasulje, šeširi, pelene i drugi sanitarni predmeti, vreće za spavanje,
- obuća, rukavice, trake za ručne satove, ručne torbe, novčanici, aktovke, pokrivači za stolac, torbice koje se nose oko vrata,
- tekstilne i kožne igračke te igračke koje sadrže tekstilne ili kožne predmete,
- pređe i tkanine namijenjene za finalnu upotrebu [8].

U svrhu utvrđivanja eventualne prisutnosti navedenih amina, mogu se koristiti dvije kromatografske metode:

- Tankoslojna kromatografija
- Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC).

## 2.2. Kromatografija i kromatografske metode

Kromatografija je postupak odvajanja smjesa tvari na komponente od kojih je ta smjesa sastavljena.

To je metoda odjeljivanja koja se zasniva na različitoj razdiobi (distribuciji) tvari između pokretne i nepokretne faze sustava, odnosno mobilne i stacionarne.

### 2.2.1. Tankoslojna kromatografija

Tankoslojna kromatografija (TLC) je jedna od najraznovrsnijih i najbržih tehnika odvajanja. Kod tankoslojne kromatografije odvajanje komponenata se odvija na tankom sloju stacionarne faze presvučenom na staklenoj, aluminijskoj ili plastičnoj pločici dok se mobilna faza, otapalo, kreće po istoj. U organskoj kemiji odvajanje komponenata zasniva se na adsorpciji pa će se tako u ovome odlomku govoriti o TLC-u kao adsorpcijskoj kromatografiji.

Kod tankoslojne kromatografije otopljeni se uzorak nanese kapilarnom na adsorbens. Nakon što otapalo ishlapi, pločica se uroni u mobilnu fazu. Mobilna se faza zbog kapilarnih sila uspinje po adsorbensu i nosi komponente iz nanese smjese. Mobilna će faza različitim brzinama nositi tvari po pločici zbog specifičnih interakcija komponenata s mobilnom fazom. Sam postupak odvajanja tvari tankoslojnom kromatografijom detaljno je opisan u eksperimentalnom djelu [9].

### Proces adsorpcije

Adsorpcija je proces u kojem su molekule plina, tekućine ili krutine u otopini u interakciji s molekulama na površini čvrste tvari, adsorbenta. Adsorpcija je isključivo

površinski proces koji ovisi o elektrostatskim silama između adsorbensa i uzorka. Te sile dolaze od dipol-dipol i ion-dipol interakcija te vodikovih veza. Treba napomenuti da je površina adsorbenta daleko od savršeno glatke, karakterizirana je pukotinama i izbočina s mjestima pozitivne i negativne gustoće naboja. Adsorbat (tvar koja se adsorbira) se na adsorbent najčešće veže vodikovim vezama i Van der Waalsovima silama.

Najčešće korišteni adsorbenti kod tankoslojne kromatografije su silikagel ( $\text{SiO}_2$ ) i aluminijski oksid ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). Interakcije između mobilne faze i otopljenog uzorka mogu se smatrati poprilično jednakima stoga ne igraju ključnu ulogu u procesu separacije. Veze važne za proces su one između mobilne faze i uzorka te one između mobilne i stacionarne faze. Ako su veze između mobilne faze i adsorbenta jače od onih između adsorbenta i pojedine komponente uzorka, mobilna faza odmiče te komponente od površine adsorbenta i odnosi ih sa sobom duž TLC pločice.

#### Odvajanje komponenata

Adsorptivnost ne ovisi samo o kemijskoj prirodi adsorbenta već i o veličini njegovih čestica i o količini vode koju sadrži. Molekule vode reagiraju s adsorbensom vodikovim vezama i tako smanjuju adsorbtivnost adsorbensa. Količina vode na adsorbensu koja može dosegnuti 15% smanjuje se zagrijavanjem adsorbensa na visokim temperaturama i taj se proces zove aktivacija. Aktivnost adsorbenta označuje se rimskim brojevima od I do V. I je za adsorbent s velikom aktivnošću a V za adsorbent s malom aktivnošću. Neki od adsorbenta navedeni su i poredani po padajućoj jakosti u tablici 2. Drugi parametar koji igra ključnu ulogu je polarnost mobilne faze. Dielektrična konstanta se obično koristi kao pokazatelj polarnosti pa su tako u tablici 3. pojedina otapala poredana po rastućoj polarnosti [9].

Tablica 2. Adsorbenti poredani po padajućoj jakosti [9, 10, 11].

Adsorbent	Dielektrična konstanta
Activatvi ugljen	12.0
Aluminijev oksid	4.5
Silika gel	4.5
Diatomejska zemlja	1.4

Tablica 3. Otapala poredana po rastućoj polarnosti [9]

Otapalo	Dielektrična konstanta
Heksan	1.89
Cikloheksan	2.02
Toluen	2.38
Dietil eter	4.34
Etil acetat	6.02
Metilen klorid	8.93
Aceton	20.7
Metanol	32.7
Voda	80.1

Upotreba mješavina otapala za mobilne faze je česta kod tankoslojne kromatografije. Polarnost mobilne faze može se jako promijeniti miješanjem otapala različite polarnosti. Za dobar učinak TLC-a odvajanje jako polarnih komponenata je bolje provesti adsorbensima slabe adsorptivnosti i polarnim otapalima. Korištenje jakih adsorbensa za odvajanje polarnih komponenata nije pogodno jer bi veze između takvih adsorbenta i komponenata bile tako jake da ih ni jako polarno otapalo ne bi moglo prekinuti. Polarna se otapala preporučuju kod odvajanja polarnih komponenata kako bi se te polarne komponente što lakše zajedno s otapalom tj. mobilnom fazom kretale po

adsorbentu. S druge strane, odvajanje nepolarnih komponenata se provodi bolje aktivnim adsorbensima i ne polarnim otapalima [9].

#### Utjecajni faktori na kromatografski proces

Kod tankoslojne kromatografije prisutni su razni faktori koji utječu na realni kromatografski proces neki od najvažnijih su:

- adsorptivnost adsorbenta koja, kao što je već navedeno, ovisi o veličini njegovih čestica
- geometrija čestica kod koje zbog nepravilnog oblika i nejednolične površine čestice, odnosno zrnaca stacionarne faze, strujanje ne može biti jednoliko po čitavoj površini zrna. U nekim zonama zrnaca praktički nema strujanja mobilne faze pa jedan dio otapala iz mobilne faze postaje stacionarna faza. Kromatografski proces će biti uspješniji što su zrna pravilnija. Oblik zrna stacionarne faze utječe i na turbulenciju strujanja a ona ima nepovoljno djelovanje na kromatografski proces.
- Otparavanje otapala koje je u tankoslojnoj kromatografiji nemoguće spriječiti tijekom kromatografskog procesa.
- fizikalno kemijska svojstva površine ploče na kojoj se nalazi sloj adsorbenta također utječu na kromatografski proces.

Osim fizičkih faktora koji utječu na proces prisutni su i oni termodinamički ali oni se u ovom radu ne obrađuju [12].

#### Vizualizacija i analiza kromatografa

Nakon nanošenja smjese na TLC pločicu i nakon što je mobilna faza u koju je pločica uronjena približi gornjem rubu pločice, pločica se vadi iz komore s mobilnom fazom. Ako sada razdvojene komponente već nisu obojene tj. ako nisu vidljive treba ih učiniti vidljivima a to se može postići ultraljubičastim svjetlom, sublimacijom joda ili prskanjem specifičnih tvari za različite funkcionalne grupe. Za vizualizaciju UV svjetlom silikagel i aloks mogu sadržavati fluorescentne indikatore koji adsorbiraju UV



zrake i emitiraju plavi i zelenu fluorescenciju pa će se tako na mjestima adsorbirane tvar pojaviti zatamnjenja. Vizualizacija jodom se postiže tako da on sublimira i s adsorbiranom komponentom tvori smeđe komplekse. Mjesto na pločici na koje se nanosi uzorak zove se start a područje najveće udaljenosti mobilne faze od starta fronta. Omjer udaljenosti komponente od starta (x) i udaljenosti fronte od starta (y) zove se R<sub>f</sub> faktor (engl. related to the front) koji ukazuje na brzinu prolaska pojedine komponente. Formula za izračunavanje R<sub>f</sub> vrijednosti glasi: [13].

$$R_f = x / y \quad (1)$$

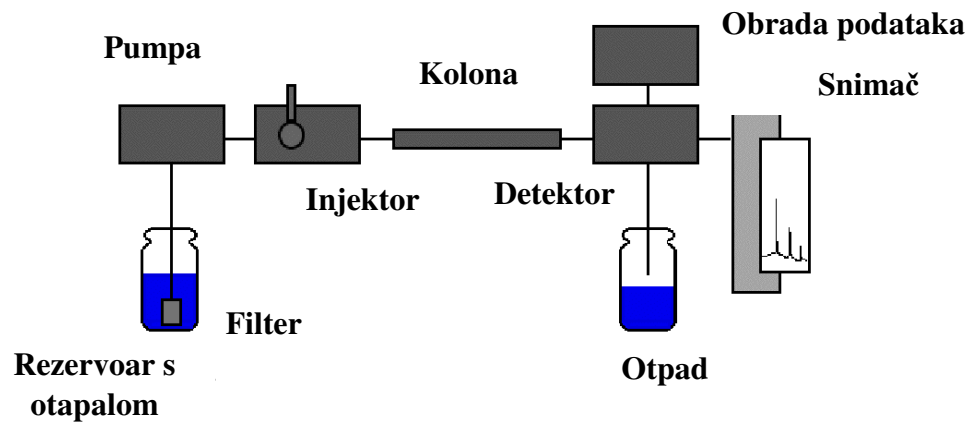
### 2.2.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) je postupak u kojem se uzorak, smjesa odvaja na komponente prolaskom uzorka ili smjese kroz kolonu punjenju sitnim česticama stacionarne faze pumpanjem tekućine (mobilne faze) pod visokim tlakom kroz sam stupac. Komponente se detektiraju eluirajući iz kolone korištenjem pojedinih detektora, fizikalnih svojstava koje ih odvajaju od pozadine mobilne faze (UV detektor ili "Diode array" detektor (DAD), elektrokemijski, fluorescencijski, detektor indeksa loma svjetlosti, detektor raspršenja svjetlosti u uparenom uzorku te maseni detektor). Ovisno o tipu stacionarne faze, HPLC postupak odvajanja se može temeljiti na razdiobi, adsorpciji, ionskoj izmjeni, raspodjeli prema veličini čestica te kromatografiji obrnutih faza. Ovim radom obrađuje se kromatografija obrnutih faza jer se analiza aromatskih amina provodi tom vrstom HPLC-a. Ono po čemu je HPLC tako posebna su izrazito male čestice stacionarne faze, za razliku od kromatografije na stupcu (LC) kod koje su one puno veće. Još jedna od razlika između ove dvije kromatografske metode je ta da je kromatografija na stupcu preparativna (komponente se na kraju izoliraju) a HPLC se koristi u analitičke svrhe [9, 14].

#### HPLC uređaj

HPLC uređaj sastoji se od rezervoara s otapalom (mobilna faza), jedne ili više pumpi, komore za miješanje, priključak za ubrizgavanje (injektor), kolone, detektora i snimača (slika 6.). Miješanje otapala se može provesti prije i nakon prolaska kroz pumpu. Tako

postoje dva tipa sistema miješanja: jedan se zove sistem niskotlačnog miješanja a drugi sistem visokotlačnog miješanja. Kada se otapala miješaju prije pumpe riječ je o niskotlačnom miješanju a kada se miješaju nakon zasebnog prolaska kroz pumpu govorimo o visokotlačnom miješanju [9].



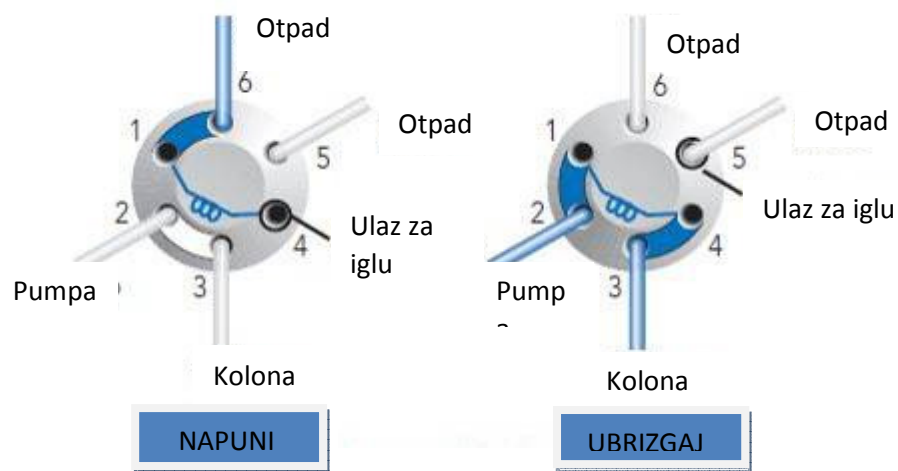
Slika 6. Shematski prikaz HPLC sustava [14]

#### Pumpe

HPLC pumpe bi trebale dovesti otapalo pod tlakovima od 470 atm a glava pumpe bi trebala imati mali volumen (<1 mL) kako bi omogućila brzu promjenu u otapalu. Materijali od kojih je izgrađen unutrašnji dio pumpe trebaju biti inertni a otapala kao što su hidrokloridna i hidrobromidna kiselina se trebaju izbjegavati jer nagrizzaju i nehrđajući čelik. S pumpama se treba oprezno rukovati i nikada ne smiju raditi na suho.

#### Priključak za ubrizgavanje

Priključak za ubrizgavanje koji se najviše koristi kod HPLC-a je ventil sa šest ulaza. Ventil ima dvije pozicije: napuni i ubrizgaj. Kada je ventil u poziciji za punjenje, uzorak se uvodi u injekciju i odlazi direktno u petlju specifičnog volumena. U poziciji „napuni“ otapalo iz pumpe ide direktno u kolonu. Nakon punjenja, ručica na ventilu se prebaci u položaj za ubrizgavanje u kojem je petlja sada spojena na pumpu i kolonu. Prije nego je novi uzorak napunjen, petlja u početnoj poziciji mora biti oprana nekoliko puta s otapalom te ni jedna otopina pufera ne smije preko noći ostati u petlji. Ventil sa šest ulaza u obje pozicije prikazan je na slici 7. [9]



Slika 7. Ventil sa šest ulaza [15]

## Kolone

Kvaliteta odvajanja ovisi o korištenom tipu stacionarne faze. HPLC kolone su uobičajeno izrađene od nehrđajućeg čelika i imaju promjere od 2-7 mm i duljine od 6-10 cm. Kolone moraju biti punjene materijalima koji mogu podnijeti visoke tlakove. Različite stacionarne faze imaju različite granice tlaka koji mogu podnijeti pa će tako izlaganje tlakovima višim od onih maksimalno preporučenih trajno oštetiti kolonu. Kompatibilnost mobilne i stacionarne faze mora biti provjerena prije korištenja kolone jer neka otapala mogu prouzročiti nepovratnu štetu stacionarnoj fazi. Kako bi se osigurala dugotrajnost kolone, između ubriznog ventila i kolone uobičajeno je ugrađena zaštitna kolona s identičnom stacionarnom fazom. Zaštitna kolona je kraća verzija glavne kolone i sprječava česticama i zagađivačima da dospiju do glavne kolone. Kolona prije upotrebe mora biti uravnotežena s mobilnom fazom a to se postiže propuštanjem otapala volumena najmanje pet puta većeg od volumena kolone [9].

## Detektori

Postoje tri glavne vrste detektora: UV-vidljivi, fluorescentni i detektor indeksa prijeloma. U detektoru, uzorak ulazi u malu ćeliju za protok u kojoj se mjere fizikalna

svojstva. HPLC metoda koristi više valni UV-vidljivi detektor koji koristi deuterijevu i tungstenovu lampu kao izvor svjetlosti. Deuterijeva lampa emitira kontinuirano UV zračenje do 340 nm, dok tungstenova lampa emitira u vidljivom rasponu valnih duljina i blizu UV područja (340-850 nm). Rotacija rešetke određuje valnu duljinu koja će pratiti odvajanje uzorka. Rešetka je disperzivni instrument koji odvaja zračenje u zasebne frekvencije. Svjetlost je podijeljeno u dva snopa, jedna ide u čeliju za protok uzorka, a druga u referentnu čeliju, koja uobičajeno sadrži samo zrak. Količina zračenja koju je apsorbirao uzorak određena je uspoređivanjem intenziteta koji izlaze iz referentne i čelije s uzorkom. Aromatski spojevi, spojevi koji sadrže karbonilne skupine i konjugirani alkeni imaju sposobnost apsorpcije na valnim duljinama od oko 254 nm i mogu biti detektirani s merkurijevom lampom. Fluorescentni detektori su 10x osjetljiviji o onih UV-vidljivih. Većina aroamtskih spojeva, nukleinskih kiselina i proteina je fluorescentno [9].

## Otapala

Najčešća otapala koje se koriste su metanol, acetonitril, voda i vodena otopina pufera. Otapala ne smiju sadržavati nikakve čestice nečistoća ili prašine jer one mogu uzrokovati probleme na pumpi, a i začepiti kolonu. Filter papir ne smije se nikada koristiti za filtraciju otapala jer otpušta čestice celuloze već je potrebno koristiti specijalne polimerne membrane (0.45 mikrometara). Veliki problem koji se javlja kod HPLC-a je nastajanje mjehurića zraka u detektoru koji dovode do pogrešnih očitavanja rezultata. Mjehurići zraka nastaju kada se koriste mješavine otapala jer su kisik i dušik, dvije glavne komponente zraka, bolje topivi u samim otapalima nego u njihovim mješavinama. Tako će već samim miješanjem otapala zasićenih zrakom doći do stvaranja mjehurića. Stvaranje mjehurići može se spriječiti ako se otapala miješaju pod pritiskom, odnosno, kada se otapala miješaju nakon prolaska kroz pumpe (visokotlačno miješanje). Nastajanje mjehurića može se izbjeći otplinjavanjem otapala prije upotrebe. Međutim, neki se mjehurići zraka mogu i dalje stvoriti u detektoru kada tlak padne. To se može izbjeći ventilom za ograničavanje protoka koji sprječavaju nagli pad tlaka u detektoru a pozicionirani su nakon detektora na kraju otpadne cijevi (waste tubing). Svako otapalo ima graničnu vrijednost koja je najmanja preporučena valna duljina za otapalo. Na valnoj duljini ispod granične vrijednosti apsorpcija otapala je prevelika.

Ponekad otapalo sadrži nečistoće koje apsorbiraju u valnoj duljini ispod dopuštene. One se mogu izbjeći nabavom nadograđenog HPLC otapala koji ne trebaju biti filtrirani ako nisu miješani s drugim kemikalijama [9].

### Kromatografija obrnutih faza (RPC)

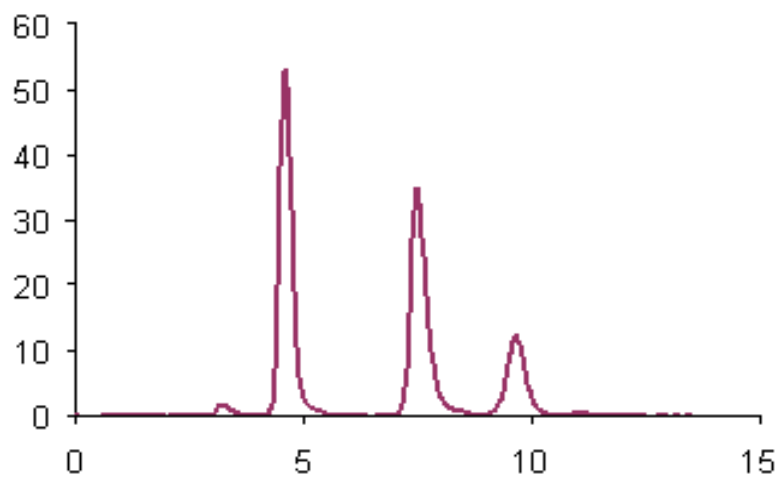
Kromatografija obrnutih faza jedna je od najuobičajenijih vrsta HPLC-a. U ovoj metodi stacionarna je faza relativno ne polarna i polarnost se mobilne faze ili drži konstantnom ili smanjuje tokom procesa. U RPC-u polarne komponente eluiraju prve iz kolone a nepolarne zadnje. Najčešće korištena stacionarna faza je kemijski modificirani silika gel. Odvajanje kromatografijom obrnutih faza temelji se na pregradnom mehanizmu između mobilne faze i stacionarne faze. Stacionarna se faza ponaša kao nepolarni sloj. Kada polarna mobilna faza prolazi kroz kolonu, nepolarne komponente su djelomično „zarobljene“ unutar nepolarne stacionarne faze jer su hidrofobne. Tako se polarne komponente kreću kroz kolonu brže i eluiraju prije nepolarnih. Kako bi se odvojile polarne komponente preporučuju se stacionarne faze s jedan i s tri C atoma. Odvajanje nepolarnih komponenata je bolje provesti s dugolančanim fazama (C<sub>18</sub>) [9].

Kvantitativno određivanje: metoda standardne krivulje

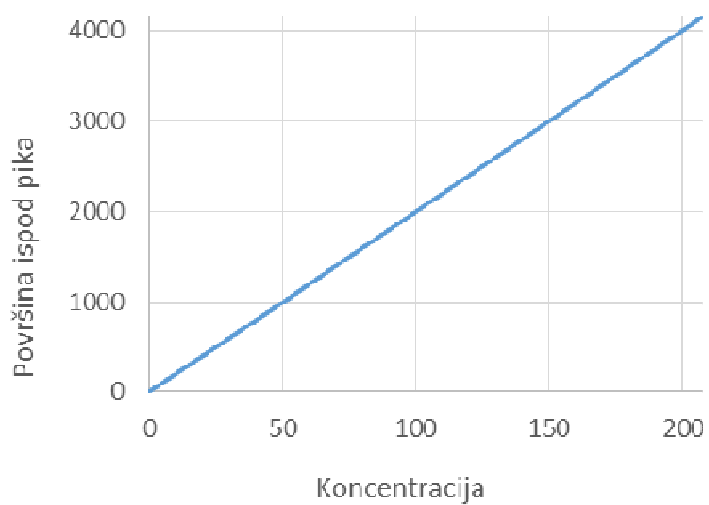
Rezultat provedene HPLC analize predstavlja kromatogram (slika 8), a može se definirati kao niz simetričnih elucijskih krivulja odnosno pikova koji nastaju nakon prolaska analita kroz kolonu i detektor. Područje ispod HPLC pika, A, je direktno proporcionalno s koncentracijom uzorka (komponente) C, i ubrizganim volumenom V. Jednadžba glasi:

$$A = f \cdot V \cdot C \quad (2)$$

gdje je f apsolutni faktor odaziva. Kod HPLC-a može se odrediti f za danu kemikaliju mjereći područja dobivena za različite koncentracije uzorka i stavljanjem u omjer A i C (A/C) i dobivenim pravcem, standardnom krivuljom (slika 9) analizirati uzorak nepoznate koncentracije [9, 14].



Slika 8. Kromatogram - x os: vrijeme u minutama  
y os: mili apsorbirane jedinice (mAU) [16]



Slika 9. Kalibracijska krivulja

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

Samom određivanju prisutnosti i koncentracije nepoznatog amina kromatografskim metodama u određenom materijalu, odnosno bojilu kojim je taj materijal obojadisan, prethode sljedeći procesi:

- izrada kalibracijskih krivulja za sve aromatske amine na HPLC uređaju
- ekstrakcija bojila sa vlakana

Ekperimentalni dio proveden je na opremi i uređajima ispitnog laboratorija tvrtke Mirta-kontrol d.o.o.

#### 3.1. Rad na HPLC uređaju i izrada kalibracijskih krivulja

U ovome radu korišten je HPLC uređaj Havlet Packard series II 1090 (slika 10.).

Sastoji se od u 2.2.2. navedenih i opisanih komponenata:

- rezervoara mobilnih faza,
- pumpe
- priključka za ubrizgavanje,
- kolone (Zorbax Eclipse XDB C18) [17]
- detektora ("Diode array" detektor (DAD)) [17]



Slika 10. HPLC uređaj [18]

Prije početka rada s uređajem treba provjeriti da li su rezervoari za mobilne faze puni. U rezervoaru A se nalazi metanol (HPLC gradient grade), Fisher Chemical

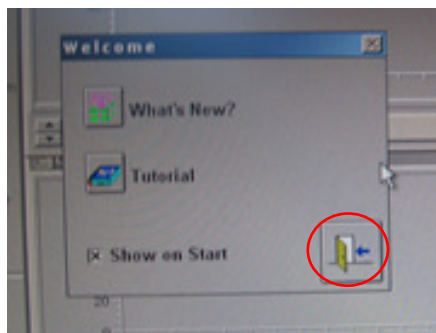
B pufer (HPLC gradient grade), Fisher Chemical

C voda (HPLC gradient grade), Fisher Chemical

Metanol i pufer služe kao mobilne faze, a voda za ispiranje kolone.

### 3.1.1. Pokretanje rada uređaja i rad na programu Instrument1 Online

Nakon provjere rezervoara uključi se računalo. Potrebno je otvoriti bocu sa zrakom i helijem te otvoriti ručicu za helij na uređaju koja se nalazi sa stražnje strane. Helij se pušta desetak minuta da se otklone mjehurići zraka u bocama s mobilnim fazama i nakon toga se zatvori (ventil na boci i ručica na uređaju sa stražnje strane). Pali se uređaj (stražnja strana). Nakon prethodno navedenih radnji u računalu na Desktopu ulazi se u program "Instrument1 Online", a zatim na ikonu prikazanu na slici 11.

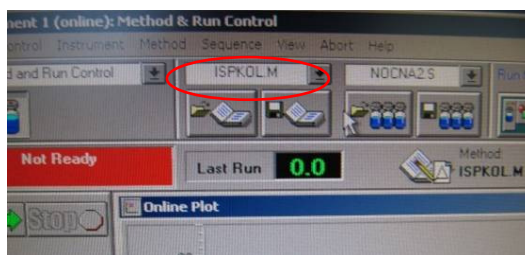


Slika 11. Odabir označene ikone

Na alatnoj traci odabere se "Instrument" => "System On" i tada se uključe i pumpa i detektor te je HPLC uređaj spreman za rad.

Bitno je prvo isprati kolonu zbog mogućih zaostataka nečistoća. Za ispiranje kolone postupa se kako je prikazano na slici 12. Kolona se mora ispirati barem 10 minuta.





Slika 12. Odabir ispiranja kolone

Nakon ispiranja kolone potrebno je u prozorčiću gdje se određuje metoda odabrati metodu koja će se koristiti. Za podizanje određene metode na traci s alatima odabere se Method => Load method. U ovome slučaju odabire se metoda AZO\_T.M (slika 13). Nakon odabira metode pristupa se izradi nove sekvence [18].



Slika 13. Odabir metode AZO\_T.M

Izrada nove sekvence:

Traka s alatima - Sequence => New sequence,

Zatim Sequence => Sequence table.

Nakon otvaranja tabele upisuju se podaci:

- u 'Location': lokacija tj. mjesto (kiveta s uzorkom) iz kojeg će se uzimati uzorak.
- u 'Sample name': ime uzorka
- u 'Method name': odabire se metodu koja će se koristiti
- u 'Inject/Location': koliko će se puta uzorak uzeti iz kivete i ispitivati
- u 'Inject volumen' koliki volumen uzorka će pumpa uzeti.
- u 'Append line': dodaje se novi red u tablicu (onoliko puta koliko ima uzoraka).

Za svaki uzorak je potrebno ispuniti sve parametre u tablici.

Nakon što je tablica završena => 'OK'.

Zatim slijedi spremanje sekvence:

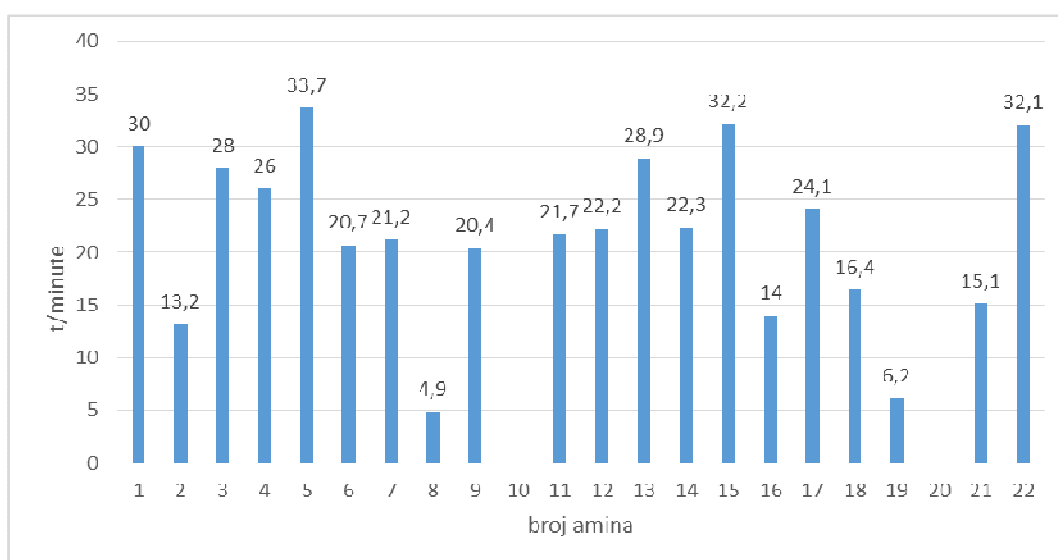
Sequence => Save sequence as (upiše se ime sekvence) => 'Subdirectory' (upiše se ime ili datum pod kojim će se ta sekvenca spremiti).

Za podizanje sekvence: Sequence => Load sequence.

Prije puštanja sekvence u rad treba provjeriti ima li u rezervoarima A, B i C dosta tekućina [18].

### 3.1.2. Propuštanje amina kroz HPLC uređaj

Nakon što je sekvenca izrađena potrebno je svaki propisani aromatski amina propustiti pojedinačno kroz uređaj u tri koncentracije (25 mg/mL, 50 mg/mL i 100 mg/mL) te svaku koncentraciju propuštati tri do četiri puta u svrhu ponovljivosti rezultata mjerenja. Koncentracije amina se stavljaju u kivete i polažu u uređaj a uređaj potom uzima 5  $\mu$ L uzorka i šalje ga kroz kolonu koja se prethodno mora zagrijati na 32 °C. Svaki od propuštenih amina imat će različito vrijeme zadržavanja u koloni uređaja i služiti će kod identifikacije nepoznatog amina. Na slici 14. prikazan je stupičasti grafikon na čijoj su vodoravnoj osi smješteni brojevi amina onako kako su označeni u direktivi 2002/61/EC a na okomitoj vremena prolaza, odnosno zadržavanja amina u koloni. Amini 10 (3,3'-diklorobenzidini) i 20 (2,4,5-trimetilanilin) nisu propušteni jer ih laboratorij ne posjeduje.



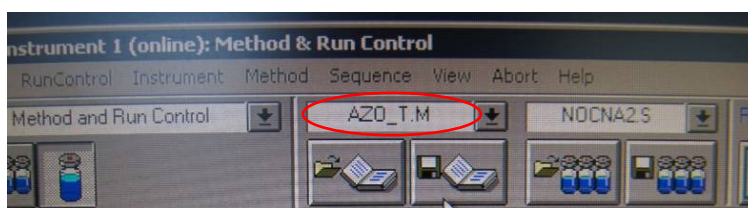
Slika 14. Stupičasti grafikon

### 3.1.3. Izrada kalibracijske krivulje u Instrument1 Online

Za izradu kalibracijske krivulje na alatnoj traci odabere se:

View => Data analysis

Method => Load method (ili se u kućici metoda odabere metoda u kojoj su snimljeni amini pojedinačno u različitim koncentracijama, slika 15.)



Slika 15. Odabir metode AZO\_T.M sa snimljenim aminima

'Load data file' (odabiru se uzorci amina) => Calibration => New calibration table gdje se upisuju parametri:

u 'Automatic set up' redni broj koncentracije ovisno o tome kako se zada da budu poredane (od najmanje pa do najveće ili obrnuto)

u 'Default amount' upisuje se izrađena koncentracija a po završetku odabire se 'OK'.

Na ekranu će se prikazati tablica sa svim pikovima na onim valnim duljinama na kojima emitira detektor a to su 240.4 nm, 280.4 nm, 305.4 nm i 380.4 nm. Da bi se tablicu moglo spremi potrebno je uzeti uzorke na istim valnim duljinama. Nakon odabira željene valne duljine ostale se brišu.

Odabirom 'Load data file' odabire se isti uzorak, ali druge koncentracije na istoj valnoj duljini kao i prethodni.

Odabirom Calibration => Add level upišu se parametri (redni broj koncentracije i koncentracija). Takav postupak obavlja se za sve koncentracije.

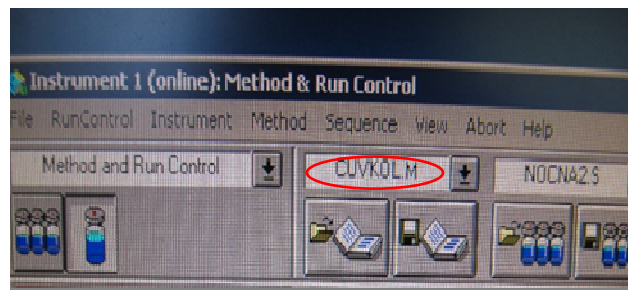
Nakon završetka prethodnih radnji sve koncentracije trebaju biti na linearnom pravcu ili u blizini njega da nagib pravca iznosi oko 1. Također je važno da koncentracija bude u mg/ml, a to se postiže odabirom na Calibration => Calibration settings i u kućici 'Amount units' upiše se mg/ml ili jedinice u kojima se radila koncentracija.

Kalibracijska krivulja se sprema na File => Save as => Method i upiše se ime za kalibracijsku krivulju.

Nakon snimljenih svih 22 amina i napravljenih 22 kalibracijskih krivulja može se pustiti uzorak kroz kolonu. Dobiveno vrijeme zadržavanja amina u koloni se uspoređi s vremenima pojedinih amina. Podizanje metode tj. kalibracijske krivulje amina za koji smo odredili da se nalazi u uzorku opisano je u poglavlju rezultati i rasprava [18].

#### 3.1.4. Isključivanje HPLC uređaja iz rada

Nakon ispiranja kolone koje traje 10 minuta, u prozorčiću gdje se određuje metoda odabere se čuvanje kolone (slika 16.)



Slika 16. Odabir čuvanja kolone

Zatim se ode na Instrument => System off, te na File => Exit. Nakon toga se na uređaju odabere 'OFF', ugasi se prekidač iza uređaja i zatvori se ventil na boci sa zrakom [18].

### 3.2. Ekstrakcija bojila sa vlakana

Kako bi se analizirali Direktivom 2002/61/EC utvrđeni aromatski amini, odnosno kako bi im se odredila prisutnost i koncentracija u određenom tekstilnom materijalu potrebno je ukloniti bojilo s materijala (uzorka) na kojem se namjerava napraviti kromatografska analiza amina. U svrhu upoznavanja s kromatografskim postupcima i postupcima ekstrakcije na jedan pamučni i jedan poliesterski uzorak je od strane djelatnika laboratorija nanešen u određenoj mjeri čisti amin (jedan od Direktivom propisanih amina).

U ovome će se dijelu rada opisati postupak ekstrakcije bojila sa tekstilnih uzoraka prema normi HRN EN ISO 14362-1. Kao materijali su izabrani pamuk i poliester jer se obje vrste vlakana bojadišu azo bojilima, pamuk direktnim i reaktivnim a poliester disperznima. Stoga postoji mogućnost redukcije azo-bojila i nastajanja potencijalno kancerogenih aromatskih amina (direktiva 2002/61/EC).

#### Pribor i posuđe

- Čaše (100, 200, 400, 600 ml), Ilmabol TGI
- Erlenmeyerova tikvica (50 ml), Schott
- Pipete (20, 5, 0.2 ml), Hirschmann
- Propipeta
- Menzura (200 ml), Simax
- Hladilo po Allihnu (kuglasto hladilo), Surlan
- Liebigovo hladilo, Surlan
- Okrugla tikvica s ravnim dnom (250 ml), Intos
- Staklena kolona
- Bočica za uzorke

#### Kemikalije [17].

- Puferska otopina pH=6,00, Itrij
- Natrijev-ditionit, Merck
- Natrijev hidroksid, Itrij
- Dijatomejska zemlja, Sigma - Aldrich
- Staklena vuna (staklena vlakna), Merck
- Tert-butil metil eter, Merck
- Metanol, (HPLC gradient grade), Fisher Chemical

- Klorobenzen, Merck

#### Uređaji

- Analitička vaga ABS-220-4, Kern & Sohn GmbH
- Magnetska mješalica s termostatom, P. Heidolph
- Vakumski rotacioni uparivač s vodenom kupelji, P. Heidolph
- Ultrazvučni uparivač, Bandelin, Sonorex Digitec

#### 3.2.1. Ekstrakcija vlakana s pamučnog uzorka: Postupak rada

Na samome početku potrebno je usitniti 1g uzorka pamučne tkanine na kojem će se vršiti ekstrakcija. Nakon što je uzorak usitnjen stavlja se u Erlenmeyerovu tikvicu i dodje se 15 ml puferske otopine a tikvica se stavlja na 30 minuta u vodenu kupelj zagrijanu na 70°C . Nakon 30 minuta tikvica se vadi iz vodene kupelji i dodaje se 3 ml prethodno priređenog natrijevog ditionita koncentracije 200 mg/ml. Tikvica se dobro protrese i vrati u kupelj (30 min, 70 °C). U ovom dijelu dolazi do skidanja bojila s materijala, u ovom slučaju amina. Natrijev ditionit služi i za redukciju bojila na amine. U tako ohlađenu tikvicu dodaje se 0,2 ml 10%-tne natrijeve lužine (10 g NaOH otopljenog u 100 ml destilirane vode). Otopina se prenosi u staklenu kolonu prethodno napunjenu s diatomejskom zemljom i staklenom vunom (slika 17.) i otavi 15 minuta. U međuvremenu se u tikvicu s uzorkom dodaje 10 ml tert-butil metil etera i nakon isteklih 15 minuta prenosi se iz tikvice u kolonu. Uzorak se još jednom ispiri s 10 ml tert-butil metil etera i nakon isteka novih 15 minuta se prenosi se zajedno s uzorkom u kolonu. Kolona se otvara i otopina ističe u čašu postavljenu ispod kolone. U čaši se sada nalazi tert-butil metil eter i bojilo koje se u njemu otopilo a sve ostalo je zaostalo u koloni (stacionarnoj fazi).

Sadržaj čaše prelije se u tikvicu s okruglim dnom (250 ml) i stavi se na isparavanje do suha u rotacioni uparivač. Nakon što je svo otapalo isparilo dobije se 1 ml čistog bojila/ amina. Na kraju se u bočicu s bojilom dodaje 1 ml metanola i dobiveni se sadržaj prenosi u bočicu za uzorke [17].



Slika 17. Staklena kolona s diatomejskom zemljom

### 3.2.2. Ekstrakcija vlakana s poliesterskog uzorka - postupak rada

Postupak ekstrakcije sintetskih materijala prema normi je nešto drugačiji jer procesu redukcije bojila Na-ditionitom prethodi ekstrakcija bojila od materijala (uzorka) klorobenzenom. Postupak je sljedeći:

1 g neusitnjenog uzorka zakvači se na metalnu žičicu i stavi se da visi iznad kuglastog hladila. U tikvicu s ravnim dnom se zatim doda 25 ml klorobenzena i tikvica se spoji s hladilom (spoji se aparatura za ekstrakciju). Kada klorobenzen počne ključati uzorak je potrebno otparavati 30 minuta. Nakon 30 minuta tikvica se odvoji od hladila a sadržaj tikvice je potrebno ohladiti do sobne temperature. U slučajevima kada se bojilo ne skine s uzorka postupak se zaustavlja. Nakon što se sadržaj tikvice ohladio potrebno je otpariti klorobenzen, skoro do suha kako je prikazano na slici 18. Klorobenzen će kapati u čašu a u tikvici će ostati bojilo. Kad se bojilo ohladi u tikvicu dodati 1 ml tert-butil metil etera koji služi kao mobilna faza.

Tikvica se promućka, sadržaj se prenese u ermenmeyerovu tikvicu, doda se 15 ml pufera i stavi u ultrazvučnu kupelj (ultrazvučni uparivač) (slika 19.) na 30 minuta, zagrijanu na 70 °C gdje se velike molekule bojila cijepaju na manje. Nakon pola sata potrebno je dodati Na-ditionit i vratiti u kupelj na novih 30 minuta [17].

Daljnji postupak rada je isti kao i za pamučne materije.



Slika 18. Otparivanje klorobenzena



Slika 19 . Ultrazvučni uparivač, Bandelin

### 3.3. Kromatograska analiza

Kada je bojilo u ovome slučaju amin, odvojen, pristupa se tankoslojnoj kromatografiji kojom se utvrđuje je li redukcijom došlo do stvaranja bilo kakvih aromatskih amina.

Kada se utvrdi njihova prisutnost, pristupa se HPLC-u propuštanjem uzorka kroz HPLC uređaj.



### Pribor i posuđe

- Menzura (200 ml), Simax
- Piteta (5 ml), Hirschmann
- Propipeta
- Kada za TLC
- TLC-pločica s fluorescentnim indikatorom F254, Merck [17].

### Kemikalije [17].

- Kloroform, Kemika
- Octena kiselina, Lachner
- Natrijev nitrit, Alkaloid Skopje
- Sumporna kiselina, Itrij
- Kalijev hidroksid, Alkaloid Skopje
- $\alpha$ -naftol, Sigma - Aldrich

### Uređaji

- UV-lampa, Sylvania
- HPLC uređaj, Havlet Packard series II 1090

#### 3.3.1. Tankoslojna kromatografija- Postupak rada

Postupak tankoslojne kromatografije također se izvodi prema normi HRN EN ISO 14362-1.

Na pločici za tankoslojnu kromatografiju, TLC pločica, olovkom se označi start i to 1 cm od ruba te se kapilarom nanese uzorak na dva mjesta na označenoj liniji (startu). Pločica se zatim stavi u kadu s otopinom kloroforma i octene kiseline u omjeru 90:10 ( 90 ml kloroforma i 10 ml octene kiseline). Kada kupelj razvije fazu do visine 1 cm od kraja pločice, ona se izvadi i ostavlja se sušiti na zraku. Zatim se u praznu kadu dodaje  $\text{NaNO}_2$  (1 žličica) i prelije sa 1 ml sumpornom kiselinom prilikom čega nastaje žuti plin. Osušena se pločica s nanesenim uzorkom stavlja ponovno u kadu. Kada se zatvori i ostavi 5 minuta. U međuvremenu je potrebno 5,611 g kalijevog hidroksida (KOH) i

0,2 g  $\alpha$ -naftola otopiti u 100ml metanola. Tako priređenom otopinom pošprica se TLC pločica koja se potom stavi pod UV-lampu. Na pločici su pod lampom vidljivi pikovi, odnosno tragovi aromatskih amina [17].

### 3.3.2. HPLC- postupak rada

Nakon tankoslojne kromatografije potrebno je dokazati o kojem je aminu riječ te u kojoj se koncentraciji nalazi.

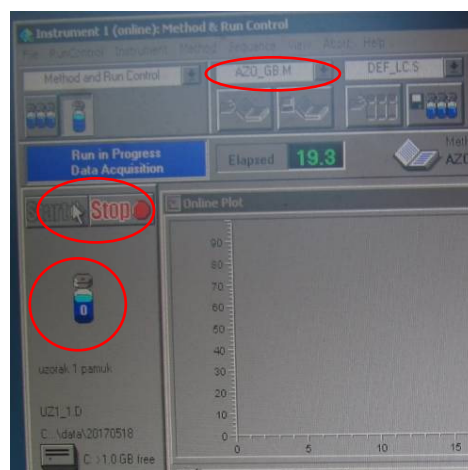
Postupak je sljedeći:

Prije svega se bočica s uzorkom postavi na za nju predviđeno mjesto u HPLC uređaju a zatim je na računalu spojenom na isti potrebno odabrati ikonu Instrument1 online.

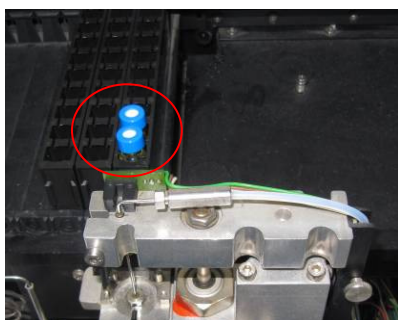
Ulaskom u program u jednom se od prozorčića odabere AZO-GMB zatim lijevi klik na ikonu bočice => semple info i START kako je prikazano na lici 20.

U semple info upisuje se:

- vrijeme propuštanja,
- datum,
- broj bočice, odnosno mjesto na koje će uzorak biti postavljen unutar uređaja (vidi sliku 21.) te komentar (npr. uzrak 1 pamuk).



Slika 20. Pripremanje uređaja za propuštanje amina

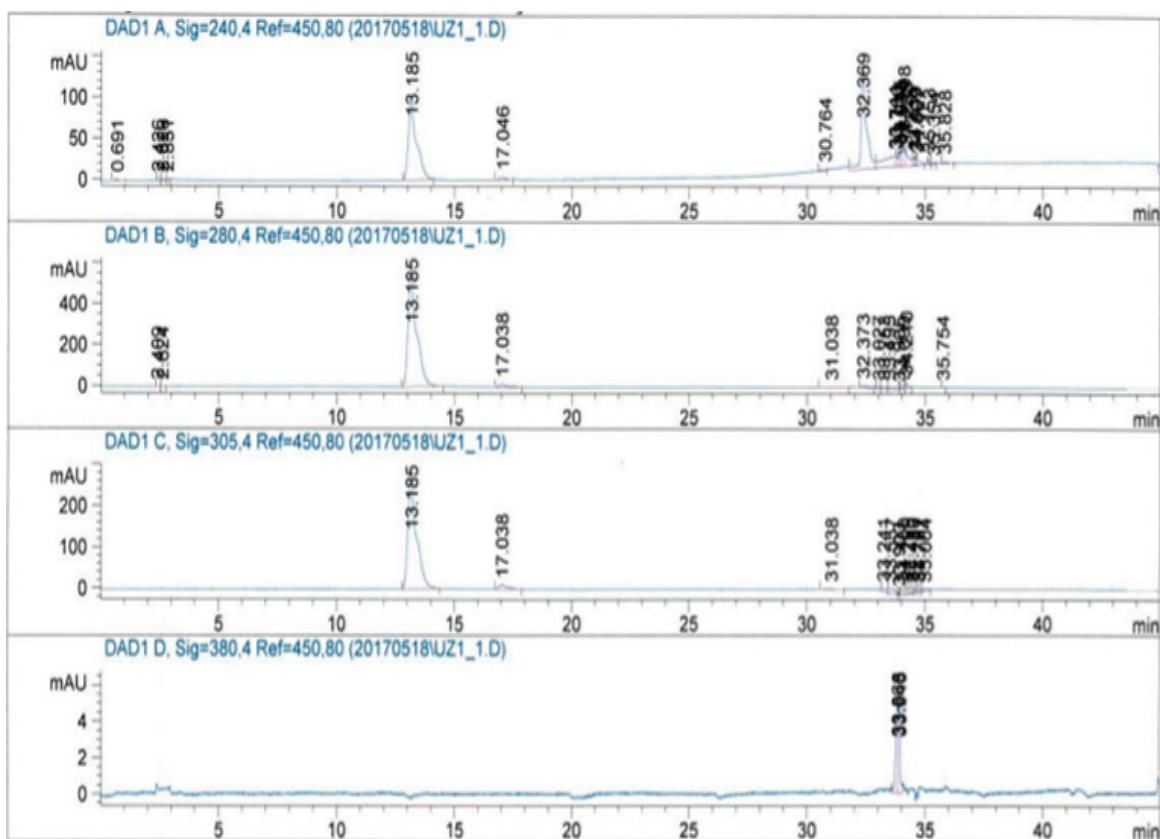


Slika 21. Mjesto postavljanja uzoraka

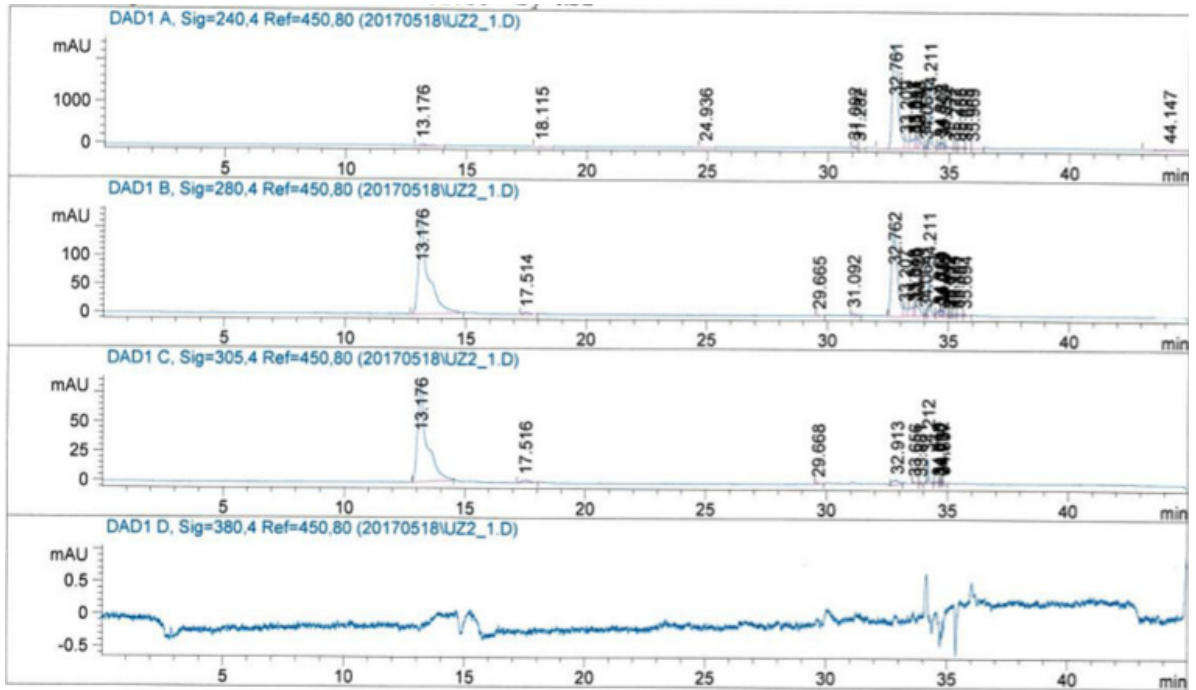
Nakon odabira START te nakon zagrijavanja kolone na radnu temperaturu (32 °C) [10] uređaj šalje 5 $\mu$ L uzorka ga kroz kolonu [10] uz protoke od 0.6-2.0 ml/min [10] i propušta se 45 minuta.

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

Različite tvari imaju različite interakcije s pokretnom i nepokretnom fazom u nekom kromatografskom procesu. Tako će i pojedini amin imati različite interakcije s metanolom i kolonom uređaja. Nakon završetka procesa, nakon proteklih 45 minuta dobiju se kromatogrami na četiri valjne duljine (240, 280, 305 i 380 nm) na kojima će pojedine komponente koje su prošle kroz kolonu apsorbirati emitiranu svjetlost detektora. Na kromatogramima (slika 22. i 23.) je dobiveno više pikova i su uz pikove prikazana različita vremena u kojima je detektor očitao pojedinu komponentu koja je prošla kroz kolonu.



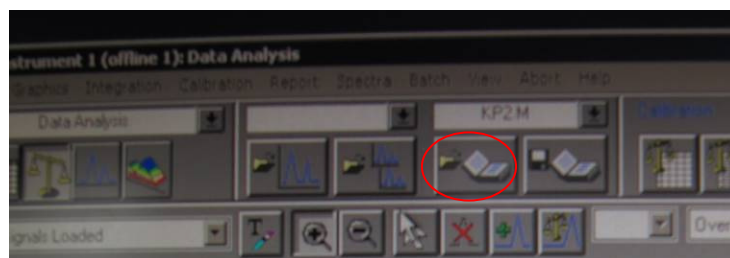
Slika 22.- Kromatogram apsorbiranih komponenata detektorom analizom bojila skinutog s pamučnom uzorka



Slika 23.- Ispis apsorbiranih komponenta detektorom analizom bojila skinutog s poliesterskog uzorka

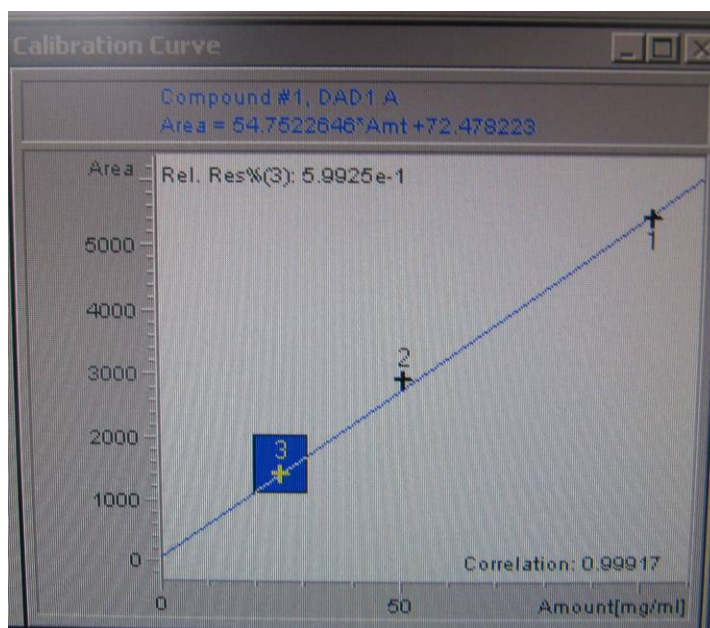
Kako bi se znalo pripada li koji od pikova jednom od pripisana aromatska amina i ako pripada, u kojoj je koncentraciji prisutan provodi se sljedeći postupak:

U programu Instrument1 offline odabere se View => Data analysis  
Zatim odabir ikone označene na slici 24.



Slika 24. Odabir ikone

Vremena od 13.185 minuta (vidi sliku 22.) i 13.176 minuta (vidi sliku 23.) poklapaju se s vremenom od 13.2 minute (vidi sliku 14.) kalibracijske krivulje amima pod oznakom kk 2 koja se potom odabire i potrebna je za izračunavanje koncentracije prisutnog amina. Slika 25. prikazuje podignutu kalibracijsku krivulju.

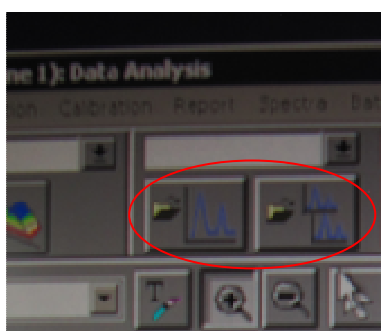


Slika 25. Odabrana kalibracijska krivulja

Pod oznakom kk2 je spremljena kalibracijska krivulja benzidina te se na taj način dokazalo da su oba uzorka bojadisana azo bojilima čijom se redukcijom stvaradirektivom 2002/61/EC propisani amin.

Na samome kraju na označim ikonama na slici 26. odabiru se analizirani amini, zatim Raport => Specifi raport u kojem je dobije točna koncentracija amina, o ovome slučaju benzidina. Na slikama 27. i 28. su prikazani izvještaji s točnim koncentracijama za oba analizirana uzorka.

Tako količina bezidina s pamučnog uzorka iznosi 40.18877 mg/ml, a s poliesterskog 13.39976 mg/ml.



Slika 26. Odabir ikona

```

=====
External Standard Report (Sample Amount is 0!)
=====
Sorted By      :      Retention Time
Calib. Data Modified :      6. June 2017 13:28:40
Multiplier    :      1.0000
Dilution      :      1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=240,4 Ref=450,80
Signal 2: DAD1 B, Sig=280,4 Ref=450,80
Signal 3: DAD1 C, Sig=305,4 Ref=450,80
Signal 4: DAD1 D, Sig=380,4 Ref=450,80

RetTime Sig Type      Area      Amt/Area      Amount      Grp      Name
 [min]  |---|-----|-----|-----|-----|-----|
-----|---|-----|-----|-----|-----|-----|
13.185  2 PB      1.43124e4  2.80797e-3  40.18877
-----|---|-----|-----|-----|-----|-----|

Totals :                               40.18877

Results obtained with enhanced integrator!
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)

=====
*** End of Report ***

```

Slika 27. Izvještaj za pamučni uzoraka

```

=====
External Standard Report (Sample Amount is 0!)
=====
Sorted By      :      Retention Time
Calib. Data Modified :      6. June 2017 13:28:40
Multiplier    :      1.0000
Dilution      :      1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=240,4 Ref=450,80
Signal 2: DAD1 B, Sig=280,4 Ref=450,80
Signal 3: DAD1 C, Sig=305,4 Ref=450,80
Signal 4: DAD1 D, Sig=380,4 Ref=450,80

RetTime Sig Type      Area      Amt/Area      Amount      Grp      Name
 [min]  |---|-----|-----|-----|-----|-----|
-----|---|-----|-----|-----|-----|-----|
13.176  2 PB      4760.20752  2.81495e-3  13.39976
-----|---|-----|-----|-----|-----|-----|

Totals :                               13.39976

Results obtained with enhanced integrator!
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)

=====
*** End of Report ***

```

Slika 28. Izvještaj za poliesterski uzorak

Dobivene vrijednost koncentracija su izuzetno velike te značajno prekoračuju propisanu vrijednost od 30 mg/kg, odnosno 30 ppm-a. Preračunate iz mg/ml u mg/kg iznose 40188.77 mg/kg i 13399.76 mg/kg.

Posljedica tako nerealnih rezultata je kontaminacija uzoraka s popriličnom količinom amina.

Poučeni štetnim djelovanjima na zdravlje raznih spojeva na tekstilnim materijalima doneseni su razni propisi kojima se nastoji kontrolirati i smanjiti potencijalno po zdravlje štetne spojeve koji mogu biti prisutni u tekstilnim proizvodima. Upravo se zbog toga u današnje vrijeme sve rjeđe nalazi štetnih i potencijalno štetnih spojeva u tekstilnim proizvodima, a pogotovo u onima koji dolaze u neposredan doticaj s kožom. Tako je u zadnje vrijeme prisutno sve manje bojila koja redukcijom azo veze stvaraju po zdravlje potencijalno štetne aromatske amine pa su analize u vrlo maloj mjeri pozitivnih rezultata, a i postoji mogućnost da se u procesu ekstrakcije bojilo ne odvoji od uzorka. Zato je ekstrakcija provedena na aminom zagađenim uzorcima.



## 5. ZAKLJUČAK

Direktiva 2002/61/EC Europskog parlamenta utvrđuje aromatske amine čijim nastajanjem može doći do štetnih djelovanja po ljudsko zdravlje. Da bi se mogli utvrditi donesena je norma (HRN EN 14362-1). Tako su u normi dani postupci za ekstrakcije vlakana te za tankoslojnu kromatografiju.

Iako su ekstrakcija i tankoslojna kromatografija neophodne metode, HPLC metoda je ključna za identifikaciju direktivom 2002/61/EC propisane amine te za njihovu koncentraciju u bojilu.

Zbog negativnih rezultata kromatografske analize, u svrhu ispitivanja, uzeti su jednim od propisanih amina zagađeni uzorci.

Cilj ovoga rada bio je upoznati se s metodama i postupcima analize aromatskih amina za krajnju identifikaciju i kvantifikaciju onih potencijalno kancerogenih.

Dobivene koncentracije benzidina od 40.18877 mg/ml i 13.39976 mg/ml nisu realne i daleko prekoračuju graničnu vrijednost od 30 mg/kg jer je analiza rađena na čistom aminu kojim je pamučni i poliesterski uzorak bio zagađen u većoj mjeri.

## 6. LITERATURA

- [1] Soljačić I., Katović D., Grancarić A. M.: Osnove oplemenjivanja tekstila: Procesi mokre apreture, bojadisanja i tiska, amstel, Zagreb, 1994.
- [2] Meštrović P. Sinteza novih heterocikličkih azo naftolsulfonskih bojila i njihova primjena na tekstilnim supstratima, Sveučilište u Zagrebu – Tekstilno – tehnološki fakultet, Zagreb, 2013.
- [3] Tralić-Kulenović V., Karaman B., Fišer-Jakić L., Uvod u organsku kemiju TTF, Zagreb, 2004.
- [4] Parac-Osterman Đ., Karaman, B.: Osnove teorije bojenja tekstila, Sveučilište u Zagrebu, Tekstilno-tehnološki fakultet, (2013)
- [5] <https://en.wikipedia.org/wiki/4-Chloroaniline>
- [6] <https://hu.wikipedia.org/wiki/Benzidin>
- [7] <https://en.wikipedia.org/wiki/O-Toluidine>
- [8] Directive 2002/61/EC of the European Parliament and of the council of 19 July 2002 amending for the nineteenth time Council Directive 76/769/EEC relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (azocolourants)
- [9] Palleros D. R., Experimental Organic Chemistry, John Wiley & Sons Inc., New york, 2000.
- [10] [https://www.vega.com/home\\_nl/-/media/PDF-files/List\\_of\\_dielectric\\_constants\\_EN.ashx](https://www.vega.com/home_nl/-/media/PDF-files/List_of_dielectric_constants_EN.ashx)

- [11] <http://www.clippercontrols.com/pages/Dielectric-Constant-Values.html>
- [12] Turina S., Tankoslojna kromatografija, Savez kemičara i tehnologa Hrvatske, Kemija u industriji, Zagreb, 1984.
- [13] Borčić S., Kronja O., Praktikum preparativne organske kemije, Školska knjiga, Zagreb, 1991.
- [14] Lalić M., Razvoj i validacija HPLC metode za određivanje sadržaja 10-hidroksi-2-decenske kiseline u proizvodima s matičnom mliječi, Sveučilište u Zagrebu-Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2013.
- [15] <http://kinesis.co.uk/wp-content/uploads/2013/10/flow-path-dual-mode-injector.jpg>
- [16] <http://enfo.agt.bme.hu/drupal/en/node/2764>
- [17] HRN EN 14362-1, Tekstil – Metode za određivanje određenih aromatskih amina izdvojenih iz azo bojila – 1. dio: Dokazivanje uporabe određenih azo bojila koja su dostupna s ekstrakcijom vlakana i bez nje (EN 14362-1: 2012)
- [18] Uputa za rad na HPLC uređaju, Mirta-kontrol, Zagreb, 2015