

# Određivanje pseudoestrogenih spojeva u realnim uzorcima termokromnih boja

---

**Butorac, Mario**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:367616>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-09**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Mario Butorac

# ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Mario Butorac

**ODREĐIVANJE PSEUDOESTROGENIH SPOJEVA U REALNIM  
UZORCIMA TERMOKROMNIH BOJA**

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada:  
prof. dr. sc. Danijela Ašperger

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Danijela Ašperger  
prof. dr. sc. Irena Škorić  
doc. dr. sc. Dragana Vuk

Zagreb, rujan 2023.

Izražavam svoju iskrenu zahvalu mentorici, prof. dr. sc. Danijeli Ašperger, na nesebičnom vodstvu, susretljivosti i ponajviše strpljenju koje mi je pružila tijekom izrade ovog rada. Također, želim zahvaliti dr. sc. Kristinki Vinković na neprocjenjivoj podršci, stručnim savjetima te predanosti koje je uložila u ovaj rad.

Veliku zahvalnost dugujem i Bruni Babić Visković, mag. ing. oecoling. za neizmjernu podršku koju je uložila u eksperimentalnom dijelu rada.

Na kraju, želim zahvaliti svojoj obitelji na razumijevanju i neprekidnoj podršci koju su mi pružili.

## SAŽETAK

### Određivanje pseudoestrogenih spojeva u realnim uzorcima termokromnih boja

Cilj ovog rada bio je odrediti maseni udio traženih analita, bisfenola A, benzofenona i 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenola u uzorcima termokromnih boja te u uzorcima otisaka termokromne boje na papir kao i u uzorcima otisaka termokromne boje na papiru nakon izlaganja uvjetima anaerobne razgradnje u tlu.

U ovom radu analizirani su uzorci četiri termokromne boje: Green curing flexo 25C UV, Red 75/80 irreversible, Magenta MB 60 i Blue-2 W50-0. Od navedenih uzoraka određeno je da samo boja Green curing flexo 25C UV sadrži traženi analit 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenol u masenom udjelu od 0,1 % te također sadrži 0,7 % bisfenola A. U ostalim uzorcima nisu pronađeni traženi analiti. Potom je slijedila analiza uzorka Offset green to yellow otisnutog na više vrsta papira, bezdrvni premazani (BP), bezdrvni nepremazani (BN), te 33 % reciklirani (R33). Ovi uzorci bili su izloženi anaerobnoj razgradnji u tlu tako da je za svaku vrstu papira provedena analiza za sljedeći broj dana trajanja anaerobne razgradnje u tlu: 14, 32, 50 te 80 dana. Ovom analizom utvrđeno je da udio analita 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenola raste u opisanim uvjetima anaerobne razgradnje u tlu.

**Ključne riječi:** *termokromna boja, bisfenol A, benzofenon, 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenol, anaerobna razgradnja, tlo, utjecaj na okoliš, upravljanje otpadom, ljudsko zdravlje*

## SUMMARY

### Determination of pseudoestrogenic compounds in real samples of thermochromic printing inks

The aim of this work was to determine concentration of selected analytes which are bisphenol A, benzophenone and 4,4'-(4-methylpentane-2,2-diyl)diphenol in thermochromic printing inks and in their prints on papers which have also been exposed to anaerobic decomposition in soil.

In this analysis four samples of thermochromic printing ink have been analyzed: Green curing flexo 25C UV, Red 75/80 irreversible, Magenta MB 60 and Blue-2 W50-0. From the analysis of these samples it was found that only sample Green curing flexo 25C UV has selected analytes: 4,4'-(4-methylpentane-2,2-diyl)diphenol in mass fraction of 0,1 % and 0,7 % of bisphenol A. Other samples were found to be free from selected analytes. Then the analysis of thermochromic prints on paper using Offset green to yellow ink followed. The prints were made on various types of papers: wood-free coated (BP), wood-free uncoated (BN) and 33 % recycled (R33). Samples of these printed papers were subjected to anaerobic decomposition in soil, which was terminated at different time periods: 14, 32, 50 and 80 days. In these analyses, it was found that concentration of analyte 4,4'-(4-methylpentane-2,2-diyl)diphenol rises in described conditions of anaerobic decomposition in soil.

**Key words:** *thermochromic ink, bisphenol A, benzophenone, 4,4'-(4-methylpentane-2,2-diyl)diphenol, anaerobic decomposition, soil, environmental impact, waste management, human health*

# Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. Termokromne boje .....	2
2.2. Kromatografija.....	4
2.2.1. Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti .....	5
2.2.2. Detektori korišteni u kromatografiji .....	6
2.2.3. Razvoj kromatografske metode .....	6
2.3. Validacija .....	7
2.3.1. Točnost .....	8
2.3.2. Preciznost.....	8
2.3.3. Selektivnost.....	9
2.3.4. Linearnost .....	9
2.3.5. Granica detekcije i granica kvantifikacije.....	9
2.3.6. Koncentracijski raspon primjene metode.....	10
2.4. Bisfenol A .....	10
2.5. 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenol .....	11
2.6. Benzofenon.....	11
2.7. Toksičnost bisfenola A i njemu analognih spojeva.....	12
2.8. Anaerobna razgradnja bisfenola A.....	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	14
3.1. Kemikalije .....	14
3.2. Instrumenti.....	14
3.2.1. Analitička vaga.....	14
3.2.2. Ultrazvučna kupelj .....	15
3.2.3. HPLC Varian ProStar .....	15
3.3. Upravljački programi i programi za obradu podataka.....	17
3.4. Uzorci .....	17
3.4.1. Uzorci termokromnih boja.....	17
3.4.2. Uzorci papira.....	18
3.5. Priprava otopina.....	19

3.5.1. Priprava standardne otopine za analizu uzoraka termokromnih boja .....	19
3.5.2. Priprava kalibracijskih otopina za određivanje uzoraka termokromnih boja .....	19
3.5.3. Priprava otopina uzoraka termokromnih boja za kromatografsku analizu .....	19
3.5.4. Priprava kalibracijskih otopina za analizu uzoraka termokromne boje Offset green to yellow otisnute na papir .....	20
3.5.5. Priprava otopina za analizu uzorka termokromne boje Offset green to yellow otisnute na papir .....	20
3.5.6. Priprava otopina za određivanje točnosti .....	21
3.5.7. Priprava otopina za određivanje preciznosti .....	21
3.6. Kromatografski uvjeti .....	22
3.7. Shematski prikaz eksperimentalnog rada .....	23
4. Rezultati i rasprava .....	24
4.1. Kalibracijske krivulje za određivanje pseudoestrogenih spojeva u uzorcima boje .....	24
4.2. Rezultati analize uzoraka termokromnih boja .....	26
4.3. Rezultati verifikacije metode za određivanje 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenola i analize uzoraka papira s termokromnim otiscima .....	28
5. Zaključak .....	32
6. Literatura .....	34
7. Dodatci .....	38
7.1 Popis slika .....	38
7.2 Popis tablica .....	38
ŽIVOTOPIS .....	39



## 1. UVOD

Termokromne boje imaju sposobnost promjene boje pri određenoj aktivacijskoj temperaturi. Termokromne leuko-boje su trokomponentne boje koje su sastavljene od otapala, bojila te razvijaa. Aktivacijska temperatura ovisi o temperaturi tališta otapala termokromne boje. Kao otapalo najviše se koriste alkoholi i esteri. Bojila u leuko-bojama su elektron-donorske molekule poput spiro-laktona, fluorana, spiro-pirana i fulgida. Razvijaači su slabe kiseline poput bisfenola A. [1, 2, 3]

Termokromne boje se koriste kao indikatori temperature. Na primjer ukazuju na dovoljno rashlađenu bocu pića pomoću otisnute termokromne boje na etiketi koja promjeni boju prilikom hlađenja na definiranu temperaturu. Međutim, one predstavljaju problem zbog uporabe bisfenola A i njemu sličnih spojeva, kao što su benzofenon i 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenol koji kao i bisfenol A imaju pseudoestrogeno djelovanje na čovjeka. [3, 4, 5] Pseudoestrogeni učinak bisfenola A i njemu sličnih spojeva objašnjen je interakcijom bisfenola A s receptorima estrogena  $\alpha$  i  $\beta$  što dovodi do promjena stanica poput brzine rasta ili stanične smrti, a svi ti učinci olakšavaju odnosno omogućuju razvoj neoplazme. Bisfenol A također pokazuje interakciju i s androgenim receptorima, pa tako osim raka dojke i jajnika, izlaganje bisfenolu A može uzrokovati i rak prostate. [6] Uporaba Bisfenola A već je strogo regulirana, no novi spojevi slične strukture još nisu dovoljno istraženi, pa ni regulirani, a svakim danom pojavljuje se sve više spojeva sličnih bisfenolu A. [1, 7]

Iako je bisfenol A podložan procesima raspadanja u prirodi, zbog neprestane primjene u proizvodnji plastičnih smola kontinuirano se unosi u okoliš te mu je prisutnost u okolišu pseudo-konstantna. [8] Za spojeve slične bisfenolu A nije istraženo podliježu li istim procesima raspadanja kao i bisfenol A te su oni potencijalno opasniji ako dođe do njihovog nagomilavanja u prirodi. [9]

U ovom radu određuje se prisutnost bisfenola A, 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenola te benzofenona u termokromnim tiskarskim bojama te u papirima s termokromnim otiscima tijekom anaerobne razgradnje papira u tlu pomoću tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (**eng.** *High-performance liquid chromatography*, HPLC).

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Termokromne boje

Termokromne boje su boje koje mijenjaju boju s promjenom temperature. Promjena boje može biti reverzibilna ili ireverzibilna. Postoje različite vrste termokromnih boja: leuko boje, boje na bazi tekućih kristala, termokromni pigmenti te fotokromne boje. Leuko boje postoje u dva stanja, bezbojnom ili "leuko" stanju te obojenom. Do promjene iz bezbojnog stanja u obojeno dolazi prilikom povećanja temperature. Suprotno, hlađenjem iz obojenog stanja prelazi u bezbojno stanje. Boje na bazi tekućih kristala mijenjaju boju prilikom manje promjene temperature, od 3 do 5 °C, što ih čini osjetljivijim indikatorima naspram leuko boja. Do promjene boje dolazi zbog promjene u apsorpciji i emisiji svjetla na molekuli ili kristalu prilikom promjene temperature. Primjeri uporabe prikazani su na **Slici 1**. Prikazani primjeri pokazuju različite načine na koje se termokromne boje može primijeniti u svakodnevnom životu kako bi se unaprijedilo iskustvo korisnika i poboljšala učinkovitost različitih procesa. Na primjer, naljepnice na bocama koje mijenjaju boju kada je piće dovoljno hladno mogu biti korisne u restoranima i barovima gdje se brzo poslužuju napitci, omogućujući osoblju da brzo prepozna koji su napitci spremni za posluživanje. Trake za indicaciju temperature akvarija mogu pomoći vlasnicima kućnih ljubimaca da održavaju optimalnu temperaturu u akvariju, što je ključno za zdravlje riba i drugih vodenih organizama. Smjese nalik plastelinu namijenjene za igru mogu biti korisne u različitim obrazovnim i terapijskim okruženjima za razvijanje kreativnosti, finih motoričkih sposobnosti i smanjenje stresa. Ovi primjeri samo su neki od mnogih načina na koje tehnologija može biti primijenjena u različitim sektorima kako bi se unaprijedila kvaliteta života ljudi. Često se u takvim bojama nalaze štetni spojevi koji spadaju po svom učinku na čovjeka u pseudoestrogene spojeve, poput bisfenola A, benzofenona te 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenola. [3]

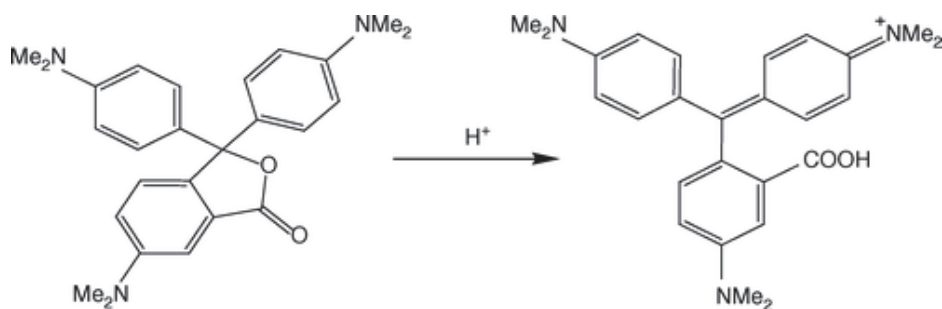
Pseudoestrogeni spojevi su poznati po svojoj sposobnosti da se vežu za receptore estrogena u tijelu i izazovu negativan učinak po zdravlje ljudi i životinja. Ovo može dovesti do različitih zdravstvenih problema, uključujući smanjenje plodnosti, probleme u trudnoći, razvoj raka dojke i drugih hormonski ovisnih tumora, kao i poremećaje u pubertetu i razvoju reproduktivnog sustava kod muškaraca i žena. Stoga je važno biti svjestan prisutnosti ovih spojeva u proizvodima koje koristimo te provjeriti sastojke prije nego što ih upotrijebimo kako

bi se izbjegli zdravstveni rizici. Pronalazimo ih u različitim proizvodima npr. u plastičnim masama, pesticidima te proizvodima za osobnu njegu. Određivanje pseudoestrogenih spojeva u realnim uzorcima bitno je područje istraživanja jer nam pomaže identificirati izvore izlaganja te postaviti odgovarajuće regulative za uporabu spojeva s tim učinkom. Termokromne boje obrađene u ovom radu su Green curing flexo 25C UV, Thermosil Red 75/80 irreversible, Screen ink magenta MB 60 te W50-0 Blue-2. [3]

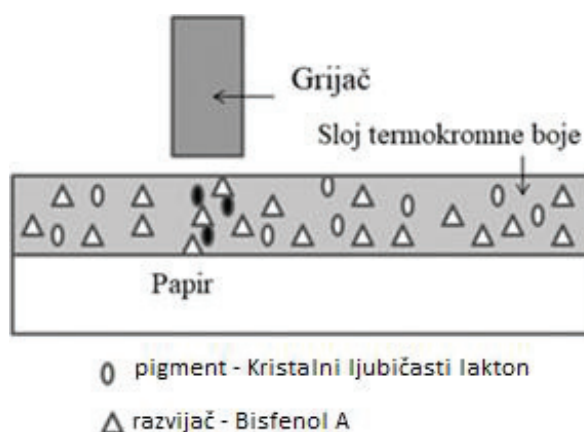


**Slika 1.** Primjeri uporabe termokromnih boja [10,11,12]

Bisfenol A i njegovi srodni spojevi u termokromnim bojama služe kao razvijajući boje. Smjesa termokromne boje sastoji se od bisfenola A i termokromnog pigmenta od kojih su mnogi spiro-laktone. Na primjer često se koristi kristalni ljubičasti lakton (**eng.** *Crystal violet lactone*, CVL) koji je u osnovnom stanju bezbojan. Kada se termokromni sloj zagrije otapalo se rastalo i otopi ostale komponente te dolazi do miješanja bisfenola A i kristalnog ljubičastog laktone što dovodi do protoniranja laktonekog prstena čime se povećava konjugacija sustava te termokromni sloj postaje obojen plavo, što je prikazano na **Slici 2**. Shematski prikaz kako funkcionira otiskivanje pomoću termokromne boje prikazano je na **Slici 3**. Iako su štetni učinci bisfenola A već neko vrijeme poznati i dalje ima široku uporabu zbog svoje efikasnosti, dostupnosti i cijene. [3, 13]



**Slika 2.** Prikaz protoniranja kristalnog ljubičastog laktona [13]



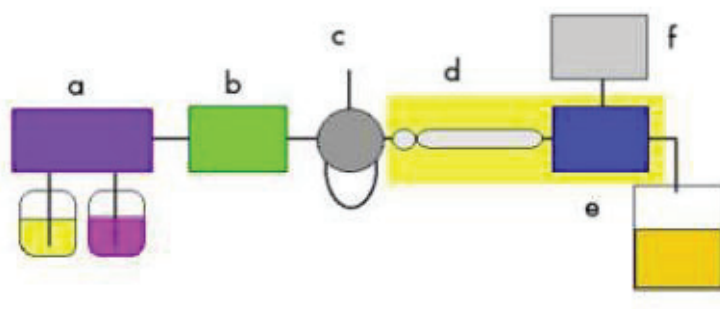
**Slika 3.** Shematski prikaz mehanizma otiskivanja pomoću termokromne boje [13]

Za praćenje navedenih pseudoestrogenih spojeva u uzorcima iz okoliša i drugima najbolje je koristiti kromatografske metode zbog visoke učinkovitosti razdvajanja komponenti iz smjese.

## 2.2. Kromatografija

Kromatografija je analitička metoda odjeljivanja smjese, identifikaciju te kvantitativno određivanje tvari temeljena na različitom afinitetu tvari na prikladnom sorbensu. Njome se smjesa uspješno razdvaja na svoje individualne komponente. Postoji mnogo različitih vrsta kromatografije, no sve djeluju na istom principu: smjesa koja se razdvaja se otapa u pokretnoj fazi koja vodi smjesu kroz nepokretnu fazu. Svaka komponenta smjese putuje kroz nepokretnu fazu različitom brzinom što rezultira odvajanjem smjese na individualne komponente. Tijekom analize ispitivani spoj je u dinamičkoj ravnoteži između te dvije faze, pokretne i nepokretne. Zbog različitog afiniteta pojedinih tvari u ispitivanoj smjesi prema nepokretnoj fazi dolazi do

razdjeljivanja smjese na njene komponente. Kromatografske tehnike prema ravnoteži između pokretne i nepokretne faze dijelimo na razdjelnu, adsorpcijsku, afinitetnu, kromatografiju isključenjem te ionsku kromatografiju. Također, kromatografske tehnike možemo razvrstati po vrsti pokretne, odnosno nepokretne faze. Prema vrsti pokretne faze postoji plinska, tekućinska te fluidna kromatografija u superkritičnim uvjetima. Prema obliku nepokretne faze postoji plošna te kromatografija na stupcu odnosno u koloni. Kao rezultat kromatografije dobiva se kromatogram iz kojeg je moguće identificirati i kvantificirati traženi analit. Na **Slici 4** shematski je prikazan kromatografski sustav visoke djelotvornosti. [14]



**Slika 4.** Shematski prikaz kromatografskog sustava visoke djelotvornosti [14]  
a-kontrola miješanja komponenti pokretne, faze b-pumpa, c-uređaj za unošenje uzorka,  
d-pretkolona/kolona, e-detektor, f-računalo

### 2.2.1. Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti

Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti, kao što joj ime ukazuje, razdvaja tekuće uzorke na sastavne komponente te koristi pumpu visokog tlaka kako bi izgurala pokretnu fazu kroz kolonu ispunjenu sorbentom odnosno nepokretnom fazom. Pokretna faza je tekućina, a nepokretna faza je sorbens. Ovisno o prirodi sorbenta govori se o kromatografiji normalnih i obrnutih faza. Kromatografija normalnih faza sadrži sorbens koji je polaran, na primjer silikagel ili aluminijev oksid, a pokretna faza je nepolaran odnosno radi se o organskom nepolarnom otapalu. Kromatografija obrnutih faza sadrži sorbens koji je nepolaran, na primjer modificirani silikagel, a kao pokretna faza koristi se polarno otapalo koje je često smjesa vode i polarnog organskog otapala. Učinkovitost odnosno mogućnost razdjeljivanja smjese tekućinskom kromatografijom ovisi o temperaturi, brzini protoka, duljini kolone, veličini čestica sorbenta te

o radnom tlaku sustava. Kako komponente smjese iskazuju različite afinitete prema sorbensu dolazi do razdvajanja smjese te pojedine komponente izlaze iz kolone u različitom vremenu što omogućava identifikaciju i kvantifikaciju komponenata smjese. HPLC ima široku uporabu u farmaceutskoj, prehrambenoj i kemijskoj industriji za analizu i pročišćavanje smjesa.[14]

### 2.2.2. Detektori korišteni u kromatografiji

Ovisno o potrebi u kromatografskim sustavima moguće je koristiti različite detektore. Postoji osnovna podjela na univerzalne i specifične detektore u HPLC sustavima. Primjer univerzalnog detektora je refraktometar koji mjeri indeks refrakcije mobilne faze. Jednostavan je i jeftin, no ima slabu osjetljivost te je primjenjiv samo pri analizi komponenata koje imaju izrazito veliku razliku indeksa refrakcije od mobilne faze. Specifični detektori su rasprostranjeniji i daju više informacija od refraktometara. Među njih spadaju detektori UV/Vid, fluorescentni (**eng.** *fluorescence detector*, FLD), detektor s nizom dioda (**eng.** *diode array detector*, DAD) i konduktometrijski te spektrometar masa. UV/Vid (**eng.** *ultraviolet/visible*, UV/Vis) detektori mjere apsorbanciju ultraljubičastog ili vidljivog elektromagnetskog zračenja analiziranih komponenti te imaju široku uporabu u analizi lijekova i organskih tvari koje imaju mogućnost apsorbirati elektromagnetsko zračenje odgovarajućih valnih duljina, od 200 do 800 nm. Fluorescentni detektori (FLD) mjere fluorescenciju emitiranu od komponente nakon što je komponenta pobuđena odgovarajućim elektromagnetnim zračenjem. Ovi detektori su jako osjetljivi i selektivni no primjenjivi su samo na komponente koje fluoresciraju. Detektori spektrometrije masa identificiraju i kvantificiraju komponente na osnovu njihovog omjera masa-naboj. Visoko su osjetljivi i selektivni te istovremeno kompleksni i skupi. Konduktometrijski detektori mjere vodljivost, jednostavni su i jeftini, ali imaju slabu osjetljivost i primjenjivi su u analizama samo kada postoji velika razlika u vodljivosti između komponente i pokretne faze. [14]

Međutim, svaka kromatografska metoda bez obzira na detektor, nepokretnu i pokretnu fazu te analit i uzorak prije uporabe mora se validirati.

### 2.2.3. Razvoj kromatografske metode

Razvoj kromatografske metode je proces dizajniranja i optimiranja kromatografske metode za specifičnu analizu. Sastoji se od odabira prikladne kromatografske kolone, pokretne faze te

detektora za analizu željenog analita. Cilj razvoja metode je postići najvišu moguću učinkovitost razdvajanja i osjetljivost te istovremeno svesti vrijeme i trošak analize na minimum. Koraci pri razvoju kromatografske metode su sljedeći:

1. Definirati cilj analize kao i karakteristike komponenata koje se analiziraju.
2. Odabrati prikladan tip kromatografske kolone i nepokretne faze na temelju fizikalno-kemijskih svojstava komponenti koje se analiziraju.
3. Odabrati pokretnu fazu uzimajući u obzir topljivost i stabilnost svih komponenti koje se analiziraju.
4. Optimirati protok i temperaturu kolone kako bi se postigla što bolja učinkovitost razdvajanja.
5. Odabrati prikladan detektor te optimirati ga obzirom na osjetljivost i selektivnost.
6. Validirati metodu kako bi parametri točnosti, preciznosti, reproducibilnosti, granice detekcije, granice kvantifikacije, selektivnost te linearnost bili zadovoljavajući. [15]

### 2.3. Validacija

Validacija je postupak koji se provodi prilikom razvoja nove metode za određivanje analita. Također ju je važno provesti bilo nakon modifikacije ili servisa uređaja, kao i kada se provodi analiza analita izvan prethodno validiranog područja mjerenja. Tim postupkom dokazujemo je li metoda za određivanje analita prikladna za njegovo precizno određivanje. Prilikom provođenja validacije potrebno je odrediti granicu detekcije (**eng. limit of detection, LOD**), granicu kvantifikacije (**eng. limit of quantification, LOQ**), točnost, preciznost, linearnost, područje primjene, selektivnost te robusnost. U **Tablici 1** prikazane su izvedbene značajke ili validacijski parametri koji se određuju kod pojedine vrste analitičkog određivanja: kvalitativna (detekcija i identifikacija) i/ili kvantitativna analiza. [16, 17]

**Tablica 1.** Evaluacija validacijskih karakteristika [16]

Karakteristika	Vrsta analitičkog određivanja			
	Identifikacija	Detekcija nečistoća		Kvantitativni Testovi
		Kvantitativno	Limit	
<b>Točnost</b>	Ne određuje se	Određuje se	Ne određuje se	Određuje se
<b>Preciznost</b>	Ne određuje se	Određuje se	Ne određuje se	Određuje se
<b>Selektivnost</b>	Određuje se	Određuje se	Određuje se	Određuje se
<b>Granica detekcije</b>	Ne određuje se	Ne određuje se	Određuje se	Ne određuje se
<b>Granica kvantifikacije</b>	Ne određuje se	Određuje se	Ne određuje se	Ne određuje se
<b>Linearnost</b>	Ne određuje se	Određuje se	Ne određuje se	Određuje se
<b>Raspon</b>	Ne određuje se	Određuje se	Ne određuje se	Određuje se

### 2.3.1. Točnost

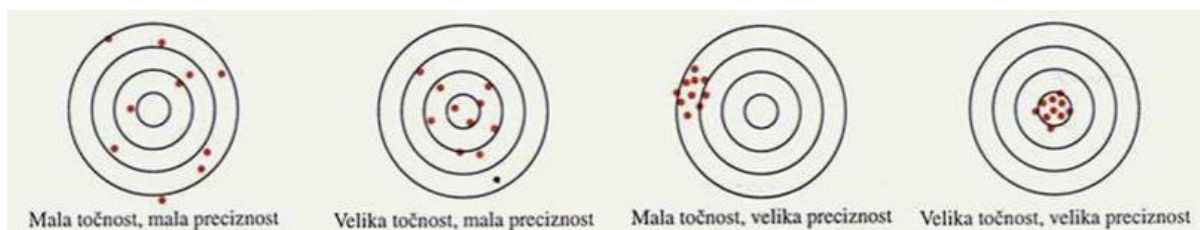
Točnost je definirana kao mjera podudarnosti između izmjerenog rezultata pomoću analitičke metode i prave vrijednosti. Ispitivanje točnosti provodi se na najmanje 9 mjerenja na najmanje 3 koncentracijska nivoa. Točnost se izražava u postocima gdje 100 % predstavlja idealnu podudarnost između mjerenog rezultata i prave koncentracije. [16, 17] To se može izraziti formulom:

$$Točnost = 1 - \frac{|izmjerena\ vrijednost - stvarna\ vrijednost|}{stvarna\ vrijednost} \quad (1)$$

### 2.3.2. Preciznost

Preciznost analitičke metode definirana je kao stupanj podudaranja između individualnih mjerenja na većem setu homogenih uzoraka na istom uređaju provedenih od strane analitičara. Preciznost se uglavnom iskazuje pomoću relativne standardne devijacije (RSD). Općenito RSD ne bi smio biti veći od 2 %. [16, 17] Na **Slici 5** prikazana je razlika između točnosti i preciznosti.





**Slika 5.** Prikaz razlike između točnosti i preciznosti [18]

### 2.3.3. Selektivnost

Selektivnost metode je karakteristika koja govori o mogućnosti određivanja željenog analita u uvjetima očekivanih nečistoća koje se mogu pronaći u matici bilo da je riječ o onečišćenjima iz samog izvora uzorka ili o produktima raspada željenog analita ili drugih onečišćivala. U kromatografskim metodama mjera selektivnosti je rezolucija pikova. [16, 17]

### 2.3.4. Linearnost

Linearnost metode odnosi se na svojstvo analitičkih metoda da pokazuju linearnu vezu između koncentracije analita i njihovog odziva na detektoru. To znači da se promjena u koncentraciji analita proporcionalno odražava kao promjena u mjerenoj veličini, kao što je apsorbancija u spektrofotometriji. Prihvatljiva linearnost sustava je ona kojoj regresijski pravac udovoljava uvjetu da je koeficijent korelacije  $R$  što bliži vrijednosti 1. [16, 17]

### 2.3.5. Granica detekcije i granica kvantifikacije

Granica detekcije (LOD) opisana je kao najniža koncentracija analita koja se u uzorku može detektirati te je mjera osjetljivosti metode, a granica kvantifikacije (LOQ) je najniža koncentracija analita u uzorku koju možemo pouzdano kvantitativno odrediti te je mjera osjetljivosti i preciznosti metode. LOD je definiran kao omjer signal/šum u omjeru 3:1, a LOQ kao omjer signal/šum 10:1. [16, 17]

Jednadžbe za određivanje LOD i LOQ pomoću jednadžbe umjernog pravca glase:

$$LOD = \frac{3,3 \cdot SD}{b} \quad (2)$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot SD}{b} \quad (3)$$

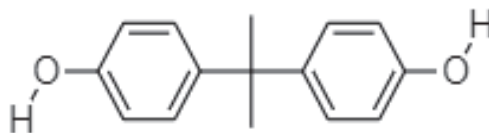
gdje je SD standardna devijacija, a  $b$  nagib umjernog pravca.

### 2.3.6. Koncentracijski raspon primjene metode

Raspon metode je koncentracijski raspon unutar kojeg razvijena metoda zadovoljava uvjete linearnosti, točnosti i preciznosti. Raspon je specifičan za svaki analit i maticu uzorka koji se analizira. Raspon treba pokrivati linearno područje koncentracija analita koje se mogu očekivati u uzorku. [16, 17]

## 2.4. Bisfenol A

Molekulska formula bisfenola A (**eng.** *Bisphenol A*, BPA) je  $C_{15}H_{16}O_2$  ( $M = 228,29$  g/mol) s prikazanom strukturom na **Slici 6**. Dolazi u obliku bijelog ili blijedo smeđeg praha, gustoće  $\rho = 1,2$  g/cm<sup>3</sup> Temperatura vrenja bisfenola A iznosi  $T_v = 360,5$  °C, a temperatura taljenja  $T_l = 153$  °C. Topljivost bisfenola A u vodi pri 25 °C iznosi 300 mg/L, tj. slabo je topljiv u vodi. Međutim, dobro je topljiv u alkoholima poput metanola i etanola te je dobro topljiv i u acetonu. Konstanta disocijacije bisfenola A iznosi  $pK_a = 9,6$ . BPA je kemikalija koja ima široku uporabu u proizvodnji plastičnih masa, uključujući polikarbonatne plastike te epoksidne smole. Već se dugi niz godina primjenjuje u proizvodnji ambalaže za hranu i pića. BPA je u posljednje vrijeme intenzivno istraživana zbog svojeg negativnog utjecaja na zdravlje. Studije su pokazale postojanje BPA u okolišu te da posjeduje pseudoestrogeni učinak u tijelu koji dovodi do negativnog utjecaja na zdravlje. Zbog toga su mnoge države ograničile uporabu BPA te su razvijene alternativne komponente kako bi ga se zamijenilo.[19]

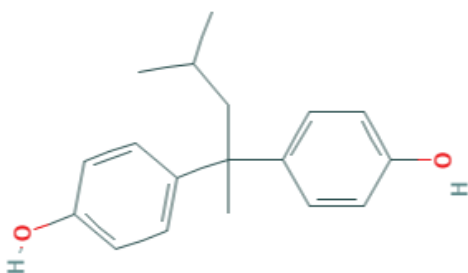


**Slika 6.** Strukturni prikaz bisfenola A [19]

## 2.5. 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenol

Molekulska formula 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenola glasi  $C_{18}H_{22}O_2$  ( $M = 270,4$  g/mol) s prikazanom strukturom na **Slici 7**. Temperatura taljenja mu je  $T_1 = 154$  °C. Konstanta disocijacije je pretpostavljena na  $pK_a = 10,24 \pm 0,10$ , te je dobro topljiv u metanolu. Strukturno je jako sličan bisfenolu A (BPA). Razlikuju se po tome što 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenol ima izobutilnu skupinu vezanu na ugljikov atom koji spaja dva difenola umjesto metilne.[20]

4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenol spada pod klasu spojeva koji se nazivaju bisfenoli te se koristi kao monomer u sintezi polimera, kao intermedijer u proizvodnji drugih kemikalija. Poput ostalih bisfenola predmet je istraživanja zbog potencijalnog negativnog utjecaja na zdravlje. Poput BPA pokazuje pseudoestrogeni učinak u tijelu što dovodi do negativnog utjecaja na zdravlje.

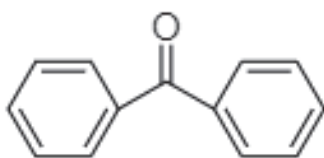


**Slika 7.** Strukturni prikaz 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenola [20]

## 2.6. Benzofenon

Molekulska formula benzofenona je  $C_{13}H_{10}O$  ( $M = 182,22$  g/mol), a strukturna se može vidjeti na **Slici 8**. Dolazi u obliku bijele krutine sa slatkim floralnim mirisom s temperaturom vrenja  $T_v = 305$  °C i temperaturom taljenja  $T_1 = 47,8$  °C. Topljivost u vodi je slaba te iznosi 137 mg/L pri 25 °C, te je kao i bisfenol A dobro topljiv u alkoholima poput metanola i etanola, te acetonu i benzenu. [21]

Benzofenon se koristi kao sirovina u proizvodnji drugih spojeva, te kao komponenta nekih kozmetičkih proizvoda poput krema za zaštitu od sunca. Međunarodna agencija za istraživanje raka (**eng.** *International Agency for Research on Cancer*, IARC) klasificirala ga je kao tvar s mogućim kancerogenim učinkom na ljude, a Europska agencija za kemikalije (**eng.** *The European Chemicals Agency*, ECHA) kao tvar s toksičnim učinkom na reproduktivne organe. Neka istraživanja indiciraju da izlaganje benzofenonu može imati negativan učinak na zdravlje poput iritacije kože, alergijskih reakcija te poremećaja hormonske ravnoteže. [22]



**Slika 8.** Strukturni prikaz benzofenona [21]

## 2.7. Toksičnost bisfenola A i njemu analognih spojeva

Zbog stroge kontrole uporabe BPA u industriji se pojavljuju analogni spojevi koji ne garantiraju nižu toksičnost za okoliš i čovjeka. Zbog iznimno brzog razvoja takvih analognih spojeva regulativa nije u stanju pratiti sve nove spojeve koji se pojavljuju u industriji te ih adekvatno kategorizirati. Tako kontrola novog spoja 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenola postaje sve veća zbog njegovog značajnog pseudoestrogenog djelovanja na čovjeka. Slično djelovanje ima većina analoga bisfenola A. Bisfenol A i njegovi analozi su tvari koje mogu narušiti normalan rad endokrinog sustava zbog sličnog učinka koji ima estrogen u ljudskom tijelu. Izlaganje bisfenolu A kod žena može utjecati na kvalitetu oocite. Bisfenol A ima citotoksično djelovanje, ali ne i genotoksično. Istraživanje na miševima pokazalo je da je izlaganje ploda tijekom gestacije niskim koncentracijama bisfenola A momentalno i dugotrajno djelovalo na mRNA u mozgu i društveno ponašanje jedinki. Ovaj učinak primijećen je i u narednim generacijama. [23, 24]

Svjetska zdravstvena organizacija (**eng.** *World Health Organization*, WHO) klasificira BPA kao potencijalno kancerogenu tvar. Europska unija klasificira BPA kao “tvar posebno

zabrinjavajućih svojstava”. Nasuprot tome, američka Uprava za hranu i lijekove (**eng.** *Food and Drug Administration*, FDA) odredila je da je BPA siguran za uporabu u ambalaži hrane i pića pri trenutnim razinama izlaganja. Da bi potencijalni rizik koji predstavlja izlaganje BPA i njemu analognih spojeva bio jasniji potrebno je provesti više istraživanja. [25]

## **2.8. Anaerobna razgradnja bisfenola A**

Anaerobna razgradnja BPA odnosi se na raspadanje BPA u sustavu odsutnosti kisika gdje biva razgrađen pomoću mikroorganizama poput bakterija i gljivica. Ovaj proces može se provesti u anaerobnom mediju poput tla ili vode te je bitan put uklanjanja BPA iz okoliša. [3]

Studije su pokazale da anaerobna razgradnja BPA pomoću mikroorganizama ovisi o uvjetima u kojima se provodi. Različiti uvjeti pokazali su da brzina razgradnje ovisi o specifičnim mikroorganizmima te okolišnim uvjetima. Potrebno je provesti dodatna istraživanja kako bi se bolje razumio mehanizam i faktori koji utječu na anaerobnu razgradnju BPA kako bi se razvila metoda uklanjanja BPA iz okoliša. [3, 26, 27]

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Kemikalije

Sve kemikalije korištene u ovom radu navedene su u **Tablici 2**.

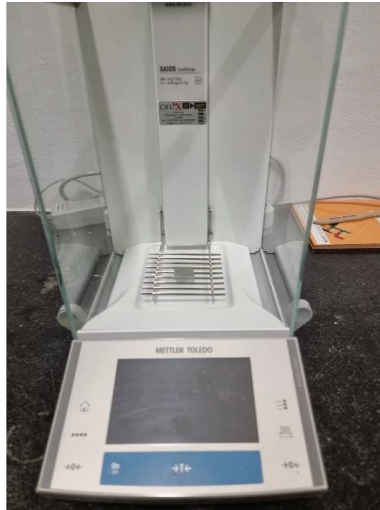
**Tablica 2.** Kemikalije korištene u ovom radu

Naziv	Molekulska formula	Čistoća	Proizvođač
Bisfenol A	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	97 %	Sigma-Aldrich, SAD
4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenol	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	p.a.	Sigma-Aldrich, SAD
Benzofenon	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> O	p.a.	Sigma-Aldrich, SAD
Acetonitril	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N	HPLC čistoće	Kemika
Metanol	CH <sub>3</sub> OH	HPLC čistoće	J.T.Baker, Nizozemska
Ultra čista voda	H <sub>2</sub> O	HPLC čistoće	Milipore Corporation, USA

#### 3.2. Instrumenti

##### 3.2.1. Analitička vaga

Za potrebu preciznog vaganja korištena je analitička vaga američkog proizvođača Mettler Toledo modela XA105 prikazana na **Slici 9**. Visoko precizna vaga XA105 dizajnirana je za širok raspon primjene, uključujući istraživanje i razvoj, kontrolu kvalitete te proizvodnju.



**Slika 9.** Analitička vaga Mettler Toledo XA105

### 3.2.2. Ultrazvučna kupelj

Za pripremu otopina korištena je ultrazvučna kupelj njemačkog proizvođača Bandelin model Sonorex digital 10 P prikazana na **Slici 10**.



**Slika 10.** Ultrazvučna kupelj Bandelin Sonorex digital 10 P

### 3.2.3. HPLC Varian ProStar

HPLC sustav koji se koristio za odjeljivanje uzoraka bio je američkog proizvođača Varian, model ProStar 500, prikazan na **Slici 11**. Ovaj uređaj ima širok raspon primjene, uključujući analizu farmaceutskih preparata, kemikalija i uzoraka iz okoliša. Osim toga, ima mogućnost detektiranja putem različitih detektora poput UV/Vid, FLD-a i refraktometra, te ugrađeni auto-sampler koji omogućuje obradu velikog broja uzoraka s minimalnim nadzorom uređaja. Sustav

se sastoji od ProStar 230 tercijarne pumpe, ProStar 500 termostatiranog kućišta za kolonu, DAD detektora ProStar 330 te boce s pokretnom fazom i otpadom. Ovaj instrument je povezan na računalo te se sustavom upravlja pomoću programa STAR verzije 5.2.



**Slika 11.** HPLC sustav Varian ProStar

Za kromatografiju je korištena kolona američkog proizvođača Agilent modela Eclipse XDB-C18, 5  $\mu\text{m}$ , serijskog broja USKH010800, **Slika 12**. Ova kolona pripada kolonama za HPLC kromatografiju obrnutih faza. Napravljena je od sferičnih čestica silicijevog dioksida visoke čistoće na koje su pričvršćeni C18 ugljikovodični lanci koji čine nepokretnu fazu. Dizajn kolone omogućava odjeljivanje velikog broja spojeva uključujući male molekule, peptide i proteine. C18 nepokretna faza je visoko nepolarna i ima visok afinitet za nepolarne spojeve, što čini kolonu dobrim odabirom za odvajanje takve vrste spojeva. [28]



**Slika 12.** Kolona američkog proizvođača Agilent model Eclipse XDB-C18



### 3.3. Upravljački programi i programi za obradu podataka

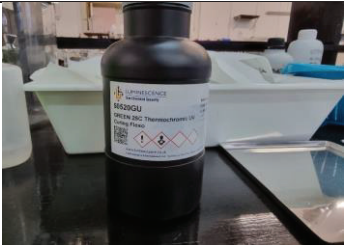
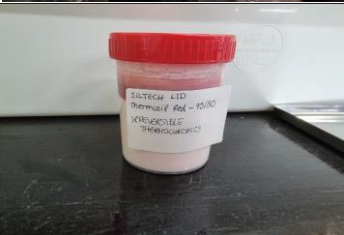


- Star Chromatography Workstation verzija 5.2
- OpenChrom 1.5.0
- Microsoft Excel

### 3.4. Uzorci

#### 3.4.1. Uzorci termokromnih boja

U **Tablici 3** prikazane su fotografije termokromnih boja s njihovim nazivima koje su korištene tijekom eksperimentalnog istraživanja u ovom radu.

**Tablica 3.** Uzorci termokromnih boja

<b>Green curing flexo 25C UV</b>	
<b>Red 75/80 irreversible</b>	
<b>Magenta MB 60</b>	
<b>Blue-2 W50-0</b>	

### 3.4.2. Uzorci papira

#### 3.4.2.1. Uzorci papira s otiskom termokromne boje Offset green to yellow

U ovom radu koristili smo različite vrste papira kako bismo testirali njihovu sposobnost zadržavanja pseudoestrogenih spojeva koji se nalaze u termokromnim bojama. Papiri su odabrani zbog njihove raznolikosti u sastavu i teksturi te kako bismo mogli testirati njihovu sposobnost zadržavanja kemikalija. Bezdrvni premazani i nepremazani papir su odabrani zbog svoje široko rasprostranjene upotrebe u tiskanju i pakiranju. Također smo uključili i 33 % reciklirani papir kako bismo testirali njegovu sposobnost zadržavanja traženih analita nakon recikliranja.

Uzorci papira iz **Tablice 4** s otiskom termokromne boje su podvrgnuti anaerobnoj razgradnji u tlu kako bi simulirali uvjete u kojima se ti papiri mogu razgraditi u prirodi. Razgradnja je prekidana nakon 14, 32, 50 i 80 dana kako bi vidjeli kako se traženi analiti iz termokromne boje zadržavaju na različitim vrstama papira tijekom anaerobne razgradnje u tlu. Ovaj rad omogućava bolje razumijevanje kako vrsta papira utječe na zadržavanje pseudoestrogenih spojeva u stvarnim uvjetima, te kako se traženi analiti iz termokromne boje razgrađuju nakon odlaganja u prirodi.

**Tablica 4.** Uzorci papira s otiskom termokromne boje Offset green to yellow

Vrsta papira	Oznaka	Proizvođač	Specifična težina, g/m <sup>2</sup>	Opis
Bezdrvni premazani	BP	Maxi Satin	115	Papir s premazom, visokokvalitetni
Bezdrvni nepremazani	BN	Amber Graphic	80	Papir bez premaza
33 % reciklirani	R33	Mondi	80	Sadrži 33 % reciklirana vlakna

### 3.5. Priprava otopina

#### 3.5.1. Priprava standardne otopine za analizu uzoraka termokromnih boja

Standardna otopina priprema se tako da u odmjernu tikvicu od 25 mL odvažemo po 10 mg standarda bisfenola A, 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenola i benzofenona, potom se tikvica dopunjuje do oznake s metanolom te se stavlja u ultrazvučnu kupelj na 10 minuta. Takvom pripravom dobivamo standardnu ili izvornu otopinu s masenom koncentracijom  $\gamma = 400 \text{ mg/L}$  za svaki standard.

#### 3.5.2. Priprava kalibracijskih otopina za određivanje uzoraka termokromnih boja

Od izvorne otopine pripremamo četiri kalibracijske otopine tako da pipetiramo volumen izvorne otopine u odmjerne tikvice od 10 mL te tikvice dopunjujemo do vrha s otopinom metanola i vode u omjeru 1:1. Volumeni za pripravu kalibracijskih otopina prikazani su u **Tablici 5**.

**Tablica 5.** Prikaz pipetiranih volumena za pripravu kalibracijskih otopina

Otopina	Volumen dodane standardne otopine, mL	Ukupan volumen, mL	Koncentracija standarda, mg/L
CB1	0,25 (CB3)	10	1
CB2	0,25	10	10
CB3	1	10	40
CB4	2,5	10	100

Potrebno je pripremiti i slijepu probu za analizu, ovdje je slijepa proba pripremljena kao otopina metanola i vode u omjeru 1:1.

#### 3.5.3. Priprava otopina uzoraka termokromnih boja za kromatografsku analizu

U odmjernu tikvicu od 50 mL odvaži se 100 mg uzorka termokromne boje pomoću šprice ili špatule, ovisno o viskoznosti boje. Za viskoznije boje koristi se špatula, a za manje viskozne

boje šprica. Potom se u tikvicu doda 30 mL metanola te se stavlja u ultrazvučnu kupelj na 120 minuta. Pazi se da se ultrazvučna kupelj ne pregrije. Nakon što se otopina ohladi na sobnu temperaturu tikvica se dopuni ultra čistom vodom do oznake. Tikvica se zbog dodatka vode zagrijava i zamuti. Kada se ohladi na sobnu temperaturu filtrira se kroz PTFE filtar u vialu.

#### 3.5.4. Priprava kalibracijskih otopina za analizu uzoraka termokromne boje Offset green to yellow otisnute na papir

U odmjernu tikvicu od 50 mL odvaži se 10 mg bisfenola A i 10 mg 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenola i otopi u metanolu. Tako pripremljena otopina je izvorna otopina (**IOP**). Daljnja razrjeđenja rade se u smjesi metanola i vode u volumnom omjeru 1:1 kao što je prikazano u **Tablici 6**.

**Tablica 6.** Priprava kalibracijskih otopina za određivanje analita u otiscima uzorka termokromne boje na papiru

Kalibracijska otopina	Pipetirani volumen, mL	Pipetirana otopina	Ukupni volumen, mL	Nazivna koncentracija $\gamma$ (analit), mg/L
CP4	0,25	CP8	25	0,050
CP5	0,20	CP8	10	0,100
CP7	2,00	CP8	10	1,000
CP8	0,625	IOP	25	5,000
CP9	5	CP8	10	2,500

#### 3.5.5. Priprava otopina za analizu uzorka termokromne boje Offset green to yellow otisnute na papir

Odvagati uzorak papira s otiskom termokromne boje mase 30 mg, narezati odvagani uzorak na komadiće veličine 2 mm x 2 mm te prenijeti u odmjernu tikvicu od 10 mL. Dodati 6 mL metanola te staviti u ultrazvučnu kupelj na 60 minuta. Nakon ultrazvučne kupelji tikvice se

trebaju ohladiti na sobnu temperaturu te nakon hlađenja dodati vodu do oznake. Tako pripremljena otopina filtrira se kroz PTFE-filtre u bočice za analizu.

### 3.5.6. Priprava otopina za određivanje točnosti

Za pripravu otopina za određivanje točnosti pripravljeno je 7 otopina s papirom R33 bez otiska boje. Otopine su pripravljene prema **Tablici 7**. U pripravi korištena je otopina CP8 pripravljena prema **Tablici 6**. Oko 30 mg papira R33 narezanog na komadiće 2 mm x 2 mm odvagan je u odmjernu tikvicu od 10 mL. U tikvice dodana otopina CP8 i metanol kako je prikazano u **Tablici 7**. Tikvice su stavljene u ultrazvučnu kupelj na 60 minuta, ohlađene na sobnu temperaturu i dopunjene vodom do oznake. Tako pripremljene otopine filtrirane su kroz PTFE-filtre u bočice za analizu.

**Tablica 7.** Priprava otopina za određivanje točnosti

Uzorci	Masa papira, mg	Pipetirani volumen CP8 otopine, mL	Pipetirani volumen metanola, mL	Ukupni volumen, mL	Nazivna koncentracija $\gamma$ (analit), mg/L
1	30	0	6	10	0
2-4		0,5	5,5	10	0,25
5-7		2	4	10	1

### 3.5.7. Priprava otopina za određivanje preciznosti

Ispitivanje preciznosti pripreve otopine i određivanja analita kromatografskom metodom uključivalo je analizu šest uzastopno pripremljenih otopina uzorka otiska termokromne boje na papiru R33. Za procjenu preciznosti kromatografskog mjerenja, jedna otopina uzorka R33 je injektirana šest puta za redom.

### 3.6. Kromatografski uvjeti

**Kolona:** Zorbax Eclipse XDB C<sub>18</sub>, 150 mm × 4,6 mm, 5 μm ili slična C<sub>18</sub> kolona

**Temperatura kolone:** 30 °C ili sobna

**Vrijeme analize:** 28 min

**Protok pokretne faze:** 1 mL min<sup>-1</sup>

**Pokretna faza:** ultračista voda u kanalu A i acetonitril u kanalu B uz gradijentno ispiranje što je prikazano u **Tablici 8**.

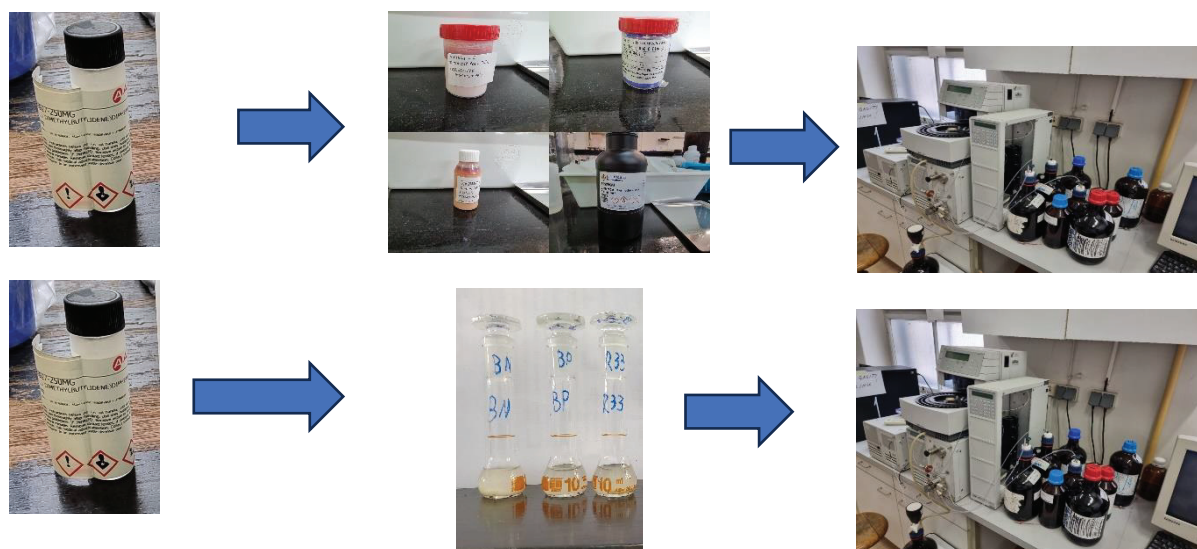
**Tablica 8.** Gradijentno ispiranje za analizu termokromnih boja

<i>t<sub>r</sub></i> , min	<i>φ</i> (A), %	<i>φ</i> (B), %	Ispiranje
0-3	53	47	Izokratno
3-11	53-25	47-75	Linearni gradijent
11-23	25	75	Izokratno
23-23,5	25-53	75-47	Linearni gradijent
23,5-28	53	47	Izokratno

Pri analizi uzoraka termokromnih boja volumen injektiranja iznosi 5 μL, dok kod analize uzoraka termokromnih boja otisnutih na papiru volumen injektiranja iznosi 50 μL. Za određivanje bisfenola A i 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenola mjerimo apsorbanciju pri 226 nm, dok za određivanje benzofenona mjerimo apsorbanciju pri 254 nm.

### 3.7. Shematski prikaz eksperimentalnog rada

Na Slici 13 prikazana je shema redoslijeda eksperimentalnog rada, gdje se može vidjeti da su prvo analizirani uzorci termokromnih boja pomoću prethodno konstruiranih kalibracijskih krivulja za njihovo određivanje. Potom je slijedila analiza uzoraka otisnutih termokromnih boja na papiru za koju je također konstruirana zasebna kalibracijska krivulja kako bi mogli odrediti tražene analite. Prisutnost analita u uzorcima provjerena je korištenjem programa Star Chromatography Workstation verzije 5.2, koji je omogućio precizno i pouzdano mjerenje karakterističnih parametara boja.



Slika 13. Shematski prikaz redoslijeda rada

## 4. Rezultati i rasprava

### 4.1. Kalibracijske krivulje za određivanje pseudoestrogenih spojeva u uzorcima boje

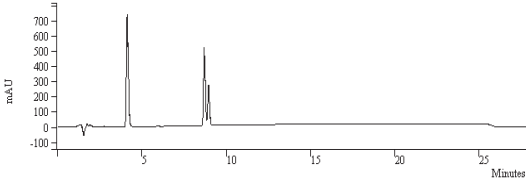
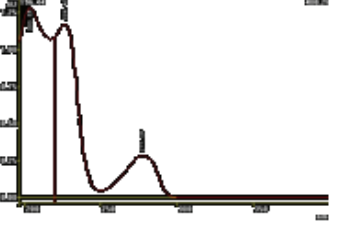
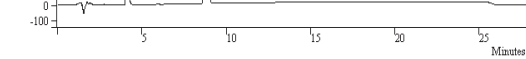
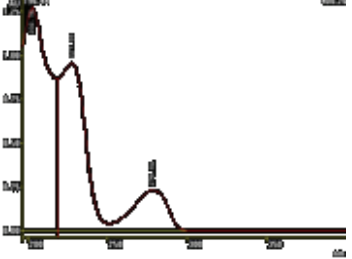
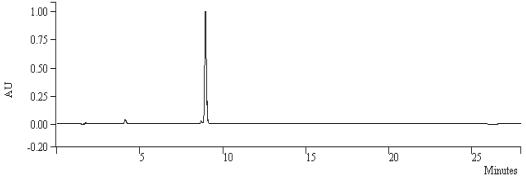
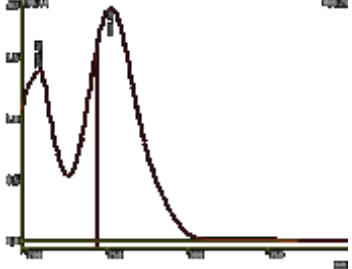
Prije primjene bilo koje metode za analizu istraživanih analita u bilo kojoj vrsti uzoraka nužno je metodu nakon postupka optimizacije validirati. Validacija metode za određivanje 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenola u termokromnim bojama je provedena u diplomskom radu G. Prišćan. Validacija, kao što je već ranije istaknuto, podrazumijeva određivanje parametara koji će potvrditi je li izabrana metoda adekvatna za željenu svrhu. Parametri metode koje se uvijek određuju su linearnost odnosno određivanje raspona koncentracije analita kojeg možemo odrediti izabranom metodom. Potom se određuju obavezno granica detekcije i granica kvantifikacije, ponovljivost metode, iskoristivost, robusnost ili otpornost metode i drugo. [28]

U području linearnosti, određenom u diplomskom radu G. Prišćan, izabrane su četiri koncentracijske točke. Prema tim točkama konstruirane su umjerne krivulje kako bi se mogle odrediti koncentracije traženih analita u analiziranim bojama. Da bi dobivene umjerne krivulje bile prihvaćene moraju zadovoljavati kriterij prihvatljivosti što je u ovom slučaju  $R^2 > 0,99$ . U ovom istraživanju umjerni pravci su određeni metodom vanjskog standarda i za sva tri ispitivana analita umjerni pravci zadovoljavaju zadani kriterij da je  $R^2 > 0,99$ . Umjerni pravac pri analizi bisfenola A ima  $R^2 = 0,9985$ , za benzofenon  $R^2 = 0,9959$ , te za 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenol  $R^2 = 0,9994$ . Podatci iz kromatograma za bisfenol A i 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenol očitavani su na 226 nm, dok za benzofenon pri 254 nm. Razlog snimanja kromatograma pri različitim valnim duljinama je različita vrijednost maksimuma apsorpcije elektromagnetskog zračenja ( $\lambda_{\max}$ ). Benzofenon ima maksimalnu apsorpciju pri  $\lambda_{\max} = 254$  nm dok bisfenol A i 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenol imaju  $\lambda_{\max} = 226$  nm što se može vidjeti u **Tablici 9**. U **Tablici 10** prikazane su pripadajuće vrijednosti granice detekcije (LOD), granice određivanja (LOQ) te jednadžbe umjernih pravaca za svaki traženi analit. [28]

U **Tablici 9** prikazani su kromatogrami i spektri traženih analita kao i prosječna vremena zadržavanja, pri čemu su spektri i vrijeme zadržavanja korišteni kao kvalitativni parametri za detekciju ispitivanih analita.

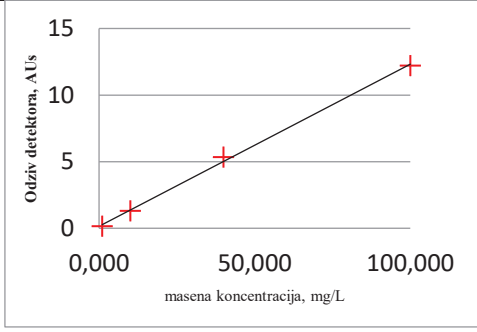
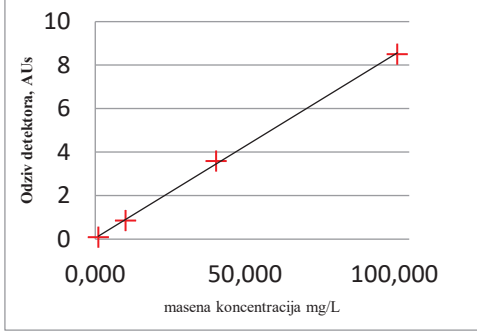
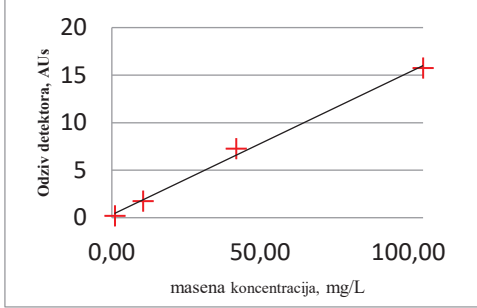


**Tablica 9.** Kromatogrami, spektri te prosječno vrijeme zadržavanja ispitivanih analita

Analit	$t_R$ , min	Kromatogram	Spektar
Bisfenol A	4,24		
4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil) difenol	8,81		
Benzofenon	9,04		

U **Tablici 10** prikazani su umjerni pravci za svaki specifični analit koji se koriste u procesu određivanja uzoraka termokromnih boja.

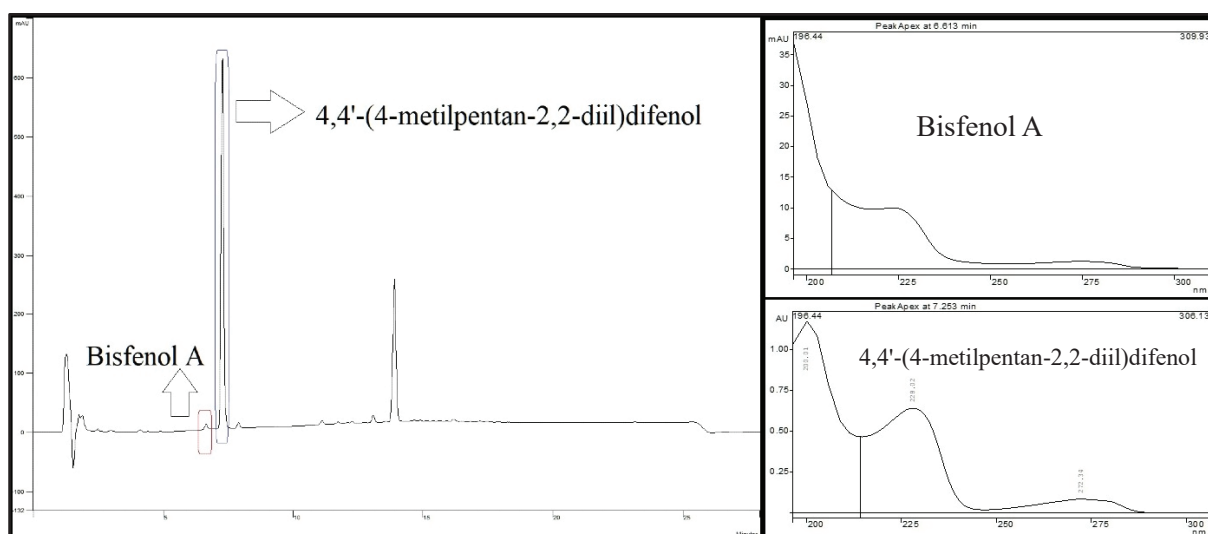
**Tablica 10.** Parametri za određivanje koncentracije analita u termokromnim bojama

Analit	Umjerni pravac	Jednadžba pravca	Granica detekcije, mg/L	Granica određivanja, mg/L
Bisfenol A		$y = 0,1217x + 0,145$	0,0907	0,2751
4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenol		$y = 0,0843x + 0,0507$	0,0577	0,1749
Benzofenon		$y = 0,1494x + 0,3106$	0,1496	0,4534

#### 4.2. Rezultati analize uzoraka termokromnih boja

U **Tablici 11** prikazani su rezultati mjerenja iz kojih se vidi da u uzorku #1 odnosno uzorku Green curing flexo 25C UV postoji bisfenol A s masenim udjelom  $w(\text{bisfenol A}) = 0,7 \%$  te

4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenolu s masenim udjelom  $w(4,4'-(4\text{-metilpentan-2,2-diil)difenolu}) = 0,1\%$ . U uzorku #2 to jest uzorku Red 75/80 irreversible i uzorku #3 odnosno uzorku Magenta MB 60 nije pronađen ni jedan od traženih analita, te u posljednjem uzorku #4 odnosno Blue-2 W50-0 nije pronađen ni jedan od traženih analita, ali su uočene srodne komponente slične bisfenolu A i 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenolu koje su prikazane na **Slici 14**. Komponenta slična bisfenolu A pokazuje vrijeme zadržavanja od  $t_R = 6,613$  min te time ukazuje na polarniji karakter naspram bisfenola A, dok komponenta nalik 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenolu ima  $t_R = 7,253$  min te time ukazuje da je ova komponenta manje polarna naspram 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenola.



**Slika 14.** Kromatogram uzorka Blue-2 W50-0 snimljen na 226 nm te spektri srodnih spojeva bisfenolu A i 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenolu

**Tablica 11.** Rezultati analize uzoraka termokromnih boja

Uzorak	w(bisfenol A), %	w(benzofenon), %	w(4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenol), %
Green curing flexo 25C UV	0,7	< GD	0,1
Red 75/80 irreversible	< GD	< GD	< GD
Magenta MB 60	< GD	< GD	< GD
Blue-2 W50-0	< GD	< GD	< GD

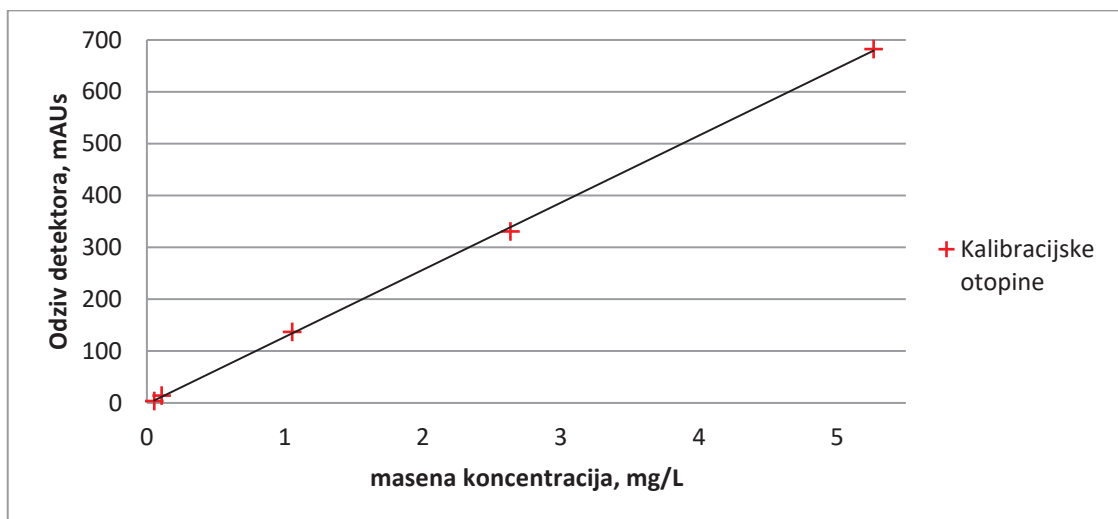
Boje u kojima je koncentracija analita ispod granice detekcije označene su oznakom < GD

#### 4.3. Rezultati verifikacije metode za određivanje 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenola i analize uzoraka papira s termokromnim otiscima

U **Tablici 12** i **Slici 15** prikazani su parametri dobiveni za određivanje analita 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenola u papiru s termokromnim otiskom.  $R^2$  vrijednost umjernog pravca iznosi 0,9997 te zadovoljava kriterij prihvatljivosti.

**Tablica 12.** Linearnost za određivanje analita 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenola u uzorcima papira s termokromnim otiskom

Analit	Jednadžba pravca	Granica detekcije, mg/L	Granica određivanja, mg/L
4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenol	$y = 129,4x - 2,034$	0,0007	0,0021



**Slika 15.** Umjerni pravac za određivanje analita 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenola u uzorcima otisnute boje

U **Tablici 13.** prikazani su rezultati mjerenja točnosti metode za analit 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenol.

**Tablica 13.** Rezultat mjerenja točnosti za analit 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenol

Uzorak	Nazivna koncentracija analita, mg/L	Točnost, %
2	0,25	107,84
3		105,57
4		102,84
5	1,00	95,49
6		98,52
7		96,62

U **Tablicama 14 i 15** prikazan je parametar preciznosti u obliku relativne standardne devijacije. **Tablica 14** prikazuje parametar preciznosti pripreve otopina uzorka papira R33 s

termokromnim otiskom boje Offset green to yellow. **Tablica 15** prikazuje parametar preciznosti kromatografske analize tako da se jedna otopina injektirala šest puta uzastopno. Parametri za preciznost pripreve otopina i kromatografske analize prihvatljivih su vrijednosti.

**Tablica 14.** Preciznost pripreve otopina

<b>Uzorak</b>	<b>Prosječna vrijednost površine krivulje, mAUxs</b>
<b>1</b>	172,5
<b>2</b>	176,5
<b>3</b>	180
<b>4</b>	189,5
<b>5</b>	174,5
<b>6</b>	170,5
<b>RSD, %</b>	<b>4,18</b>

**Tablica 15.** Preciznost kromatografske analize

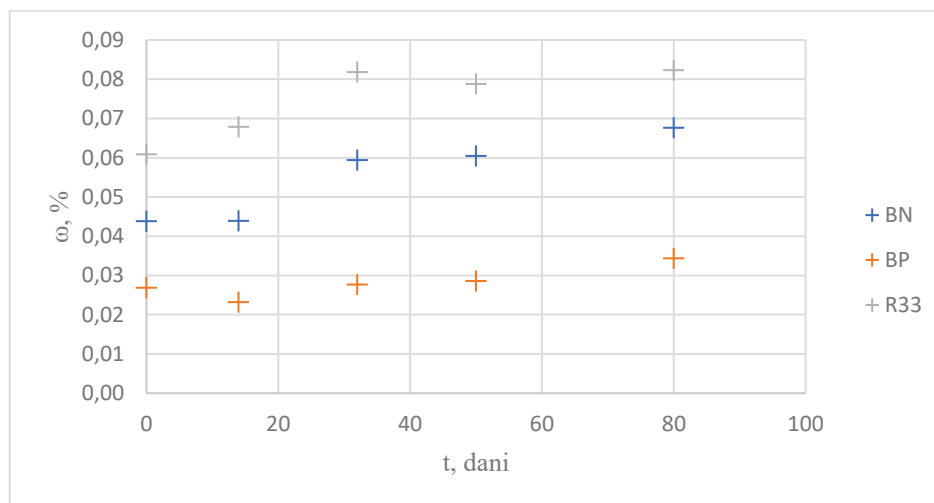
<b>Injektiranje</b>	<b>Prosječna vrijednost površine krivulje, mAUxs</b>
<b>1</b>	191
<b>2</b>	191
<b>3</b>	190
<b>4</b>	189
<b>5</b>	191
<b>6</b>	191
<b>RSD, %</b>	<b>0,44</b>

U uzorcima otiska termokromne boje Offset green to yellow, koja prema ranijem određivanju sadrži 0,25 % spoja 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenola, na papiru utvrđena je prisutnost

analita 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenola tako da je za kvantitativnu analizu ovog uzorka određen umjerni pravac s odgovarajućim kriterijem prihvatljivosti koji iznosi  $R^2 = 0,9997$ . Prema tom umjernom pravcu određeni su maseni udjeli analita 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenola u papiru tijekom 80 dana anaerobne razgradnje u tlu te su prikazani u **Tablici 16**, promjene masenog udjela tijekom vremena anaerobne razgradnje prikazane su i na **Slici 16**. Iz ovih podataka vidljivo je da se zastupljenost analita 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenola povećala tijekom 80 dana, što bi sugeriralo da analit ne podliježe anaerobnoj razgradnji u tlu, no potrebno je provesti dodatna ispitivanja kako bi ovo mogli tvrditi sa sigurnošću.

**Tablica 16.** Promjena masenog udjela analita 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenola u različitim uzorcima papira s termokromnim otiskom boje Offset green to yellow tijekom 80 dana anaerobne razgradnje u tlu

Uzorak	$\omega(0 \text{ dana}), \%$	$\omega(14 \text{ dana}), \%$	$\omega(32 \text{ dana}), \%$	$\omega(50 \text{ dana}), \%$	$\omega(80 \text{ dana}), \%$
BN	0,044	0,044	0,059	0,060	0,068
BP	0,027	0,023	0,028	0,029	0,034
R33	0,061	0,068	0,082	0,079	0,082



**Slika 16.** Grafički prikaz promjene masenog udjela analita 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenola u različitim uzorcima papira tijekom 80 dana anaerobne razgradnje u tlu  
BP – bezdrvni premazani, BN – bezdrvni nepremazani, R33 – 33 % reciklirani,

## 5. Zaključak

Glavni cilj ovog rada je utvrditi prisutnost pseudoestrogenih spojeva, bisfenola A i njegovih analoga u uzorcima termokromnih boja te utvrditi podliježu li traženi analiti anaerobnoj razgradnji u tlu. Pseudoestrogeni spojevi su vrsta spojeva koji imitiraju djelovanje estrogena u tijelu. Pronalazimo ih u raznim proizvodima od plastike, pesticidima te proizvodima za osobnu njegu. Pseudoestrogeni spojevi su tvari koje mogu narušiti normalan rad endokrinog sustava, što znači da ometaju normalnu funkciju hormonskog sustava. Zbog toga su uzrok brojnih zdravstvenih problema uključujući rak te probleme s reproduktivnim organima.

Određivanjem prisutnosti pseudoestrogenih spojeva u termokromnim bojama pomažemo identificirati potencijalne izvore izlaganja tim spojevima te procijeniti potencijalni rizik za ljudsko zdravlje. Ove informacije pomažu regulatornim tijelima donijeti ispravne odluke o ograničavanju uporabe ovih spojeva u cilju zaštite života i okoliša.

Važno je naglasiti da potencijalni rizik pseudoestrogenih spojeva u termokromnim bojama nije potpuno razjašnjen te je potrebno provesti još dodatnih ispitivanja kako bi se potpuno razumjela prijetnja koju predstavljaju ovi spojevi na čovjekovo zdravlje i okoliš.

Provedena je verifikacija metode određivanja analita 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenola kako bi osigurali da su mjerenja u skladu s prethodno razvijenom metodom za određivanje analita BPA. Verifikacijom je utvrđeno da razvijena metoda primjenjiva do masene koncentracije analita 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenola u iznosu od 1,00 mg/L.

Prvo su analizirana četiri uzorka termokromnih boja kako bi se utvrdila prisutnost traženih analita, bisfenola A, 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenola ili benzofenona. Od četiri analizirane boje, kao što je prikazano u **Tablici 11**, samo boja Green curing flexo 25C UV sadrži razvijaače termokromnih boja bisfenol A kao i 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenol u sljedećim razinama  $\omega(\text{bisfenol A}) = 0,7\%$  te  $\omega(4,4'-(4\text{-metilpentan-2,2-diil)difenola}) = 0,1\%$ . Analiti su razdvojeni pomoću kromatografije obrnutih faza pomoću HPLC sustava Varian ProStar uz korištenje kolone Zorbax Eclipse XDB C18 te detektirani pomoću DAD detektora.

Nakon utvrđivanja da boja Green curing flexo 25C UV sadrži razvijaač 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenol analizirani su otisci navedene boje na različitim vrstama papira, navedenim u **Tablici 4**, koji su podvrgnuti anaerobnoj razgradnji u tlu tijekom 80 dana. Uzorci anaerobne



razgradnje papira s otiskom termokromne boje prekidani su na 14, 32, 50 i 80 dana. Iz grafičkih prikaza rezultata na **Slici 16** vidi se trend porasta koncentracije 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenola s vremenom koji treba provjeriti daljnjim istraživanjem.

## 6. Literatura

- [1] M. A. Spirache, P. Marrec, A. J. D. Parola, C. A. Tonicha Laia, *Reversible thermochromic systems based on a new library of flavylum spirolactone leuco dyes*, *Dyes and Pigments*, Volume 214, 2023, 111208, ISSN 0143-7208, preuzeto s <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2023.111208>
- [2] Leuko bojila <https://ymdchem.com/en/publics/index/133/> (preuzeto 20. srpnja 2022.)
- [3] K. Vinković, (2019). *Analiza bisfenola a u termokromnim tiskarskim bojama, njihovim otiscima na papiru i uzorcima tla tijekom anaerobne razgradnje papira* (Disertacija). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet. Preuzeto s <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:260968>
- [4] D. Merić M. Üreyen. (2017). *The research of the usage of thermochromic leuco dyes in textile printing*, 157-158 str.
- [5] M. I. Fonseca, M. Lorigo, E. Cairrao, (2022). *Endocrine-Disrupting Effects of Bisphenol A on the Cardiovascular System: A Review*. *Journal of xenobiotics*, 12(3), 181–213. Preuzeto s <https://doi.org/10.3390/jox12030015>
- [6] H. Gao, B. J. Yang, N. Li, L. M. Feng, X. Y. Shi, W. H. Zhao, S. J. Liu, (2015). *Bisphenol A and hormone-associated cancers: current progress and perspectives*. *Medicine*, 94(1), e211. Preuzeto s <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000211>
- [7] N. Andújar, Y. Gálvez-Ontiveros, A. Zafra-Gómez, L. Rodrigo, M. J. Álvarez-Cubero, M. Aguilera, C. Monteagudo, A. A. Rivas, (2019). *Bisphenol A Analogues in Food and Their Hormonal and Obesogenic Effects: A Review*. *Nutrients*, 11(9), 2136. Preuzeto s <https://doi.org/10.3390/nu11092136>
- [8] S. Flint, T. Markle, S. Thompson, E. Wallace, *Bisphenol A exposure, effects, and policy: A wildlife perspective*, *Journal of Environmental Management*, Volume 104, 2012, Pages 19-34, ISSN 0301-4797, preuzeto s <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.03.021>

- [9] Y. J. Choi, L. Lee, (2017). *Aerobic Soil Biodegradation of Bisphenol (BPA) Alternatives Bisphenol S and Bisphenol AF Compared to BPA*. Environmental Science & Technology. 51. 10.1021/acs.est.7b03889.
- [10] Etiketa s termokromnom bojom, <https://www.actinpak.eu/showcase/thermochromic-ink/>, (preuzeto 5. siječnja 2023.)
- [11] Plastelin s termokromnom bojom, <https://www.vat19.com/item/heat-sensitive-hypercolor-putty>, (preuzeto 5. siječnja 2023.)
- [12] Termometar traka s tekućim kristalima, <https://www.svezapivo.hr/proizvod/767>, (preuzeto 5. siječnja 2023.)
- [13] T. Mendum, E. Stoler, H. VanBenschoten, J. C. Warner, (04. Kolovoz 2021). *Concentration of bisphenol A in thermal paper*, Green Chemistry Letters and Reviews, 4:1, 81-86, preuzeto s <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17518253.2010.502908>
- [14] Kromatografija, [https://www.fkit.unizg.hr/\\_download/repository/3\\_predavanje\\_KIM-KM-2019-2020-Asperger\\_Danijela.pdf](https://www.fkit.unizg.hr/_download/repository/3_predavanje_KIM-KM-2019-2020-Asperger_Danijela.pdf) (pristupio 20. srpnja 2022.)
- [15] M. Azim, M. Moloy, P. Bhasin, (2015). *HPLC method development and validation: a review*. International Research Journal of Pharmacy. 4. 39-46. 10.7897/2230-8407.04407.
- [16] P. C. Gupta; *Method Validation of Analytical Procedures*; PharmaTutor; 2015; 3(1); 32-39
- [17] J. Božić, (2020). *Validacija analitičkih metoda* (Završni rad). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet. Preuzeto s <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:581055>

- [18] Preciznost i točnost, [https://www.pmf.unizg.hr/\\_download/repository/4\\_AK2\\_stat.pdf](https://www.pmf.unizg.hr/_download/repository/4_AK2_stat.pdf) (pristupio 20. srpnja 2022.)
- [19] National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 6623, Bisphenol A. Preuzeto s <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bisphenol-A>. (pristupio 5. svibnja 2022.)
- [20] U.S. National Library of Medicine. (04. Kolovoz 2021). PubChem Compound Summary for CID 81259, 4,4'-(4-Methylpentane-2,2-diyl)diphenol. Preuzeto s [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4\\_4\\_-4-Methylpentane-2\\_2-diyl\\_diphenol](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4_4_-4-Methylpentane-2_2-diyl_diphenol) (pristupio 5. svibnja 2022.)
- [21] U.S. National Library of Medicine. (04. Kolovoz 2021). *PubChem Compound Summary for CID 3102, Benzophenone.* Preuzeto s <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benzophenone> (pristupio 5. svibnja 2022.)
- [22] Benzofenon, <https://echa.europa.eu/brief-profile/-/briefprofile/100.003.943> (pristupio 17. siječnja 2023.)
- [23] M. Susiarjo, T. J. Hassold, E. Freeman, P. A. Hunt (2007) *Bisphenol A Exposure In Utero Disrupts Early Oogenesis in the Mouse*. PLoS Genet 3(1): e5. Preuzeto s <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030005>
- [24] J. R. Rochester, *Bisphenol A and human health: A review of the literature*, Reproductive Toxicology, Volume 42, 2013, Pages 132-155, ISSN 0890-6238, preuzeto s <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.08.008>
- [25] Bisfenol A, <http://www.bisphenol-a-europe.org/wp-content/uploads/2017/04/Bisphenol-A-and-Regulatory-Assessments.pdf> (pristupio 12. siječnja 2022.)

- [26] J. Im, F. Löffler, (2016). *Fate of Bisphenol A in Terrestrial and Aquatic Environments*. Environmental Science and Technology. 50. 10.1021/acs.est.6b00877. Preuzeto s <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00877>
- [27] M. Noszczyńska, M. Chodór, Ł. Jałowiecki, Z. Piotrowska-Seget, (2021). *A comprehensive study on bisphenol A degradation by newly isolated strains Acinetobacter sp. K1MN and Pseudomonas sp. BG12*. Biodegradation, 32(1), 1–15. Preuzeto s <https://doi.org/10.1007/s10532-020-09919-6>
- [28] Kolona XDB-C18, <https://www.agilent.com/cs/library/packageinsert/public/820652-002d.pdf> (pristupio 12. siječnja 2023)
- [29] G. Priščan, (2020). *Određivanje pseudoestrogenih spojeva u termokromnim tiskarskim bojama* (Diplomski rad). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije. Preuzeto s <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:454599>

## 7. Dodatci

### 7.1 Popis slika

- Slika 1.** Primjeri uporabe termokromnih boja  
**Slika 2.** Prikaz protoniranja kristal violet laktona  
**Slika 3.** Shematski prikaz mehanizma otiskivanja pomoću termokromne boje  
**Slika 4.** Shematski prikaz kromatografskog sustava visoke djelotvornosti  
**Slika 5.** Prikaz razlike između točnosti i preciznosti  
**Slika 6.** Strukturni prikaz bisfenola A  
**Slika 7.** Strukturni prikaz 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenola  
**Slika 8.** Strukturni prikaz benzofenona  
**Slika 9.** Analitička vaga Mettler Toledo XA105  
**Slika 10.** Ultrazvučna kupelj Bandelin Sonorex digital 10 P  
**Slika 11.** HPLC sustav Varian ProStar  
**Slika 12.** Kolona američkog proizvođača Agilent model Eclipse XDB-C18  
**Slika 13.** Shematski prikaz redosljeda rada  
**Slika 14.** Kromatogram uzorka Blue-2 W50-0 snimljen na 226 nm te spektri srodnih spojeva bisfenolu A i 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenolu  
**Slika 15.** Umjerni pravac za određivanje analita 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenola u uzorcima otisnute boje  
**Slika 16.** Grafički prikaz promjene masenog udjela analita 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenola u različitim uzorcima papira tijekom 150 dana anaerobne razgradnje u tlu

### 7.2 Popis tablica

- Tablica 1.** Evaluacija validacijskih karakteristika  
**Tablica 2.** Kemikalije korištene u ovom radu  
**Tablica 3.** Uzorci termokromnih boja  
**Tablica 4.** Uzorci papira s otiskom termokromne boje Offset green to yellow  
**Tablica 5.** Prikaz pipetiranih volumena za pripravu kalibracijskih otopina  
**Tablica 6.** Priprava kalibracijskih otopina za određivanje analita u otiscima uzorka na papiru  
**Tablica 7.** Priprava otopina za određivanje točnosti  
**Tablica 8.** Gradijentno ispiranje za analizu termokromnih boja  
**Tablica 9.** Kromatogrami, spektri te prosječno vrijeme zadržavanja ispitivanih analita  
**Tablica 10.** Parametri za određivanje koncentracije analita u termokromnim bojama  
**Tablica 11.** Rezultati analize uzoraka termokromnih boja  
**Tablica 12.** Parametar linearnosti za određivanje analita 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenola u uzorcima otisnute boje na različitim papirima  
**Tablica 13.** Rezultat mjerenja točnosti za analit 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenol  
**Tablica 14.** Preciznost priprave otopina  
**Tablica 15.** Preciznost kromatografske analize  
**Tablica 16.** Promjena masenog udjela analita 4,4'-(4-metilpentan-2,2-diil)difenola u različitim uzorcima papira tijekom 150 dana anaerobne razgradnje u tlu

## ŽIVOTOPIS

Mario Butorac [REDACTED] Osnovnu školu završava u Osnovnoj školi Milana Langa u Bregani nakon koje upisuje Opću gimnaziju Antuna Gustava Matoša u Samoboru. Nakon završene srednje škole upisuje Agronomski fakultet sveučilišnog preddiplomskog studija Biljne znanosti Sveučilišta u Zagrebu, godinu dana kasnije mijenja fakultet te upisuje preddiplomski studij Primijenjena kemija Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije. Dobitnik je Rektorove nagrade za akademsku godinu 2020./2021. Stručnu praksu odradio je u 2022. godine u Yasenki d.o.o. na odjelu Kontrole kvalitete. Tečno govori engleski, posjeduje vozačku dozvolu B kategorije te je računalno pismen.