

## Opracowanie metodyki oznaczania WWA w próbkach gleb z wykorzystaniem chromatografii cieczowej HPLC

### Development of a methodology for the determination of PAH in soil samples using HPLC

Katarzyna Wojtowicz

*Instytut Nafty i Gazu – Państwowy Instytut Badawczy*

**STRESZCZENIE:** W artykule przedstawione zostały zagadnienia związane z opracowaniem metodyki chromatograficznego oznaczania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w próbkach gleb. Do tego celu stosowano chromatograf cieczowy serii Vanquish Core firmy Thermo Scientific wyposażony w detektor fluorescencyjny (FLD) i detektor UV-ViS. W ramach prowadzonych badań określono optymalne parametry pracy chromatografu, takie jak: objętość próbki, rodzaj eluentów, szybkość przepływu eluentów, gradient eluentów w trakcie analizy chromatograficznej i czas analizy, oraz dobrano kolumnę chromatograficzną umożliwiającą selektywny rozdział analitów. Następnie wykonano kalibrację układu chromatograficznego i walidację metody analitycznej oznaczania WWA, stosując roztwory kalibracyjne opracowane na podstawie roztworu wzorcowego PAH-Mix nr ref. 722393 firmy Macherey-Nagel. Walidacja metody analitycznej obejmowała wyznaczenie liniowości, odchylenia standardowego, względnego odchylenia standardowego, granicy wykrywalności (LOD) i granicy oznaczalności (LOQ) badanych WWA. Chromatograficzna metoda identyfikacji WWA w próbkach gleb wymaga przeprowadzenia analitów z matrycy stałej do matrycy ciekłej (etap izolacji), oczyszczenia próbki z substancji przeszkadzających oraz zagęszczenia ekstraktu (etap wzbogacania). W celu opracowania metody oznaczania WWA w próbkach gleb sprawdzono 3 metody przygotowania próbek do analizy chromatograficznej HPLC: metodę A (metoda QuEChERS), metodę B (ekstrakcja rozpuszczalnikiem w aparacie Soxhleta) i metodę C (ekstrakcja rozpuszczalnikiem wspomaganą wytrząsaniem). Otrzymane ekstrakty były następnie oczyszczane na wybranym materiale sorpcyjnym:  $MgSO_4$  i PSA (metoda A), CN/SiOH (metoda B) i  $Al_2O_3$  (metoda C). Do przetestowania wybranych metod przygotowania próbek gleby do analizy chromatograficznej HPLC wykorzystano glebę wzorcową PAHs by HPLC40g (SQC017-40G) firmy Sigma Aldrich, o znanych stężeniach analitów. Oczyszczone ekstrakty poddano analizie chromatograficznej HPLC, obejmującej identyfikację oraz ilościowe oznaczenie poszczególnych WWA, oraz obliczono stopnie odzysku analitów. Na podstawie analiz chromatograficznych i stopni odzysku wytypowano optymalną metodykę przygotowania próbek gleb do analizy chromatograficznej pod kątem oznaczania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Opracowaną metodykę oznaczania WWA w próbkach gleb przetestowano na rzeczywistych próbkach gruntu pobranych z 2 otworów badawczych zlokalizowanych na terenie kopalni ropy naftowej usytuowanej w południowo-wschodniej Polsce.

**Słowa kluczowe:** chromatografia HPLC, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, metoda QuEChERS, ekstrakcja, ekstrakcja do fazy stałej SPE.

**ABSTRACT:** The article presents issues related to the development of a methodology for the chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil samples. For this purpose, a Vanquish Core series liquid chromatograph by Thermo Scientific equipped with a fluorescence detector (FLD) and UV-ViS detector was used. As part of the research, the optimal parameters of the chromatograph work were determined, such as sample volume, type of eluents, eluent flow rate, eluent gradient during the chromatographic analysis and analysis time, and the chromatographic column was selected to enable selective separation of analytes. Then, the chromatographic system was calibrated and the analytical method for PAH determination was validated using calibration solutions prepared on the basis of the PAH-Mix standard solution ref. 722393 from Macherey-Nagel. The validation of the analytical method included the determination of results linearity, standard deviation and relative standard deviation, as well as limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of the tested method. The chromatographic method of identifying PAHs in soil samples requires the transfer analytes from a solid matrix to a liquid matrix (isolation stage), removal of interfering substances from the sample and concentration of extracts (enrichment stage). Soil samples were tested with 3 methods of sample preparation for HPLC analysis: method A (QuEChERS method), method B (solvent extraction in a Soxhlet apparatus), method C (solvent extraction with shaking). The obtained extracts were then purified on the selected sorption material:  $MgSO_4$  and PSA (method A), CN/SiOH (method B) and  $Al_2O_3$  (method C). Standard soil PAHs by HPLC40g (SQC017-40g) from Sigma Aldrich with known analyte concentrations was used to test selected methods of preparing soil samples for HPLC chromatographic analysis. The purified extracts were subjected to HPLC chromatographic analysis including identification and

Autor do korespondencji: K. Wojtowicz, e-mail: [katarzyna.wojtowicz@inig.pl](mailto:katarzyna.wojtowicz@inig.pl)

Artykuł nadesłano do Redakcji: 24.11.2021 r. Zatwierdzono do druku: 09.02.2022 r.

quantification of individual PAHs, and the recovery rates of the analytes were calculated. On the basis of chromatographic analyzes and degrees of recovery, the most optimal methodology for preparing soil samples for chromatographic analysis for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons was selected. The developed methodology for determination of PAHs in soil samples was tested on real soil samples collected from 2 boreholes located in an oil mine site in south-eastern Poland.

Key words: high-performance liquid chromatography, polycyclic aromatic hydrocarbons, QuEChERS method, extraction, solid phase extraction SPE.

## Wprowadzenie

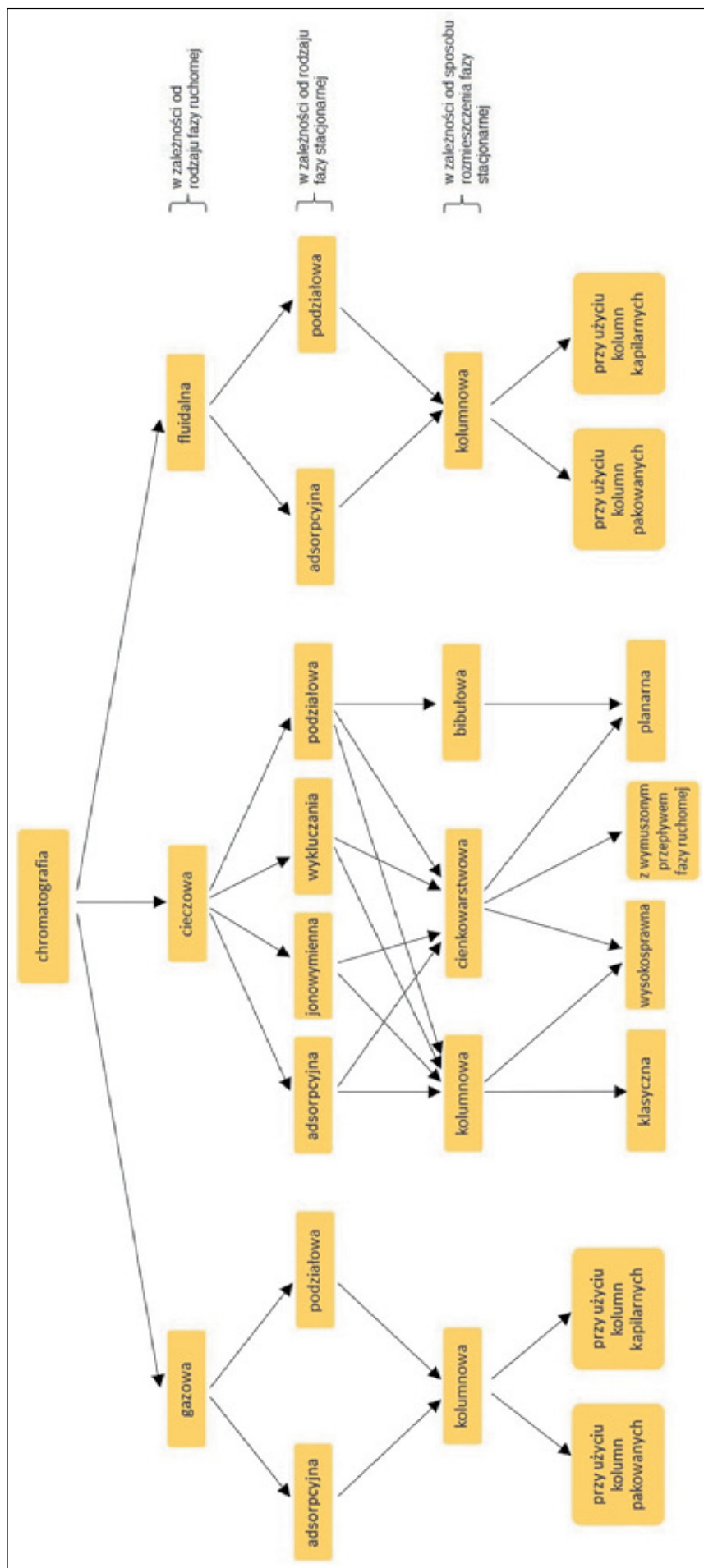
Metody chromatograficznego rozdzielania i oznaczania substancji w próbkach osiągnęły tak wysoki stopień rozwoju, że należą do najbardziej rozpowszechnionych metod instrumentalnych w chemii analitycznej. Taką pozycję wśród metod analitycznych chromatografia uzyskała dzięki możliwościom wykrywania analizowanych substancji i oznaczania ich ilości w próbce na bardzo niskim poziomie stężeń w obecności innych składników (Witkiewicz, 1995). Diagram przedstawiający klasyfikację technik chromatograficznych zamieszczono na rysunku 1.

Jedną z najczęściej wykorzystywanych metod chromatograficznych jest wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. *high-performance liquid chromatography*, HPLC). W ostatnich latach metoda HPLC znalazła zastosowanie w chemii, biochemii i farmacji. Do najczęściej spotykanych zastosowań HPLC należą: analizy środowiskowe (wykrywanie związków fenolowych w wodzie przeznaczonej do spożycia, zanieczyszczeń takich jak: WWA, PCB, pestycydy) (Opeolu et al., 2010; Tanaselia et al., 2017; Pirsahab i Fattahi, 2018; Dong, 2019; Kalbe et al., 2019), analizy farmaceutyczne (kontrola stabilności leku, badanie rozpuszczania tabletek oraz określenie dawkowania, kontrola jakości farmaceutycznej, oznaczanie leków w matrycach biologicznych) (Baker et al., 2017; Pinder et al., 2017; Sankar et al., 2019; Cruz-Angeles et al., 2021), analizy kryminalistyczne (identyfikacja sterydów we krwi, moczu itp., analiza kryminalistyczna barwników tekstylnych, oznaczanie narkotyków we krwi, moczu itp.) (Fernandez et al., 1996; Locatelli et al., 2018; Vinkovic et al., 2018), analizy w przemyśle spożywczym (pomiar jakości napojów bezalkoholowych i wody, analiza cukru w sokach owocowych, analiza związków wielopierścieniowych w warzywach, analiza środków konserwujących, analiza cholesterolu i innych steroli w produktach spożywczych, analiza związków toksycznych w produktach spożywczych) (Bishnoi et al., 2006; Odumosu i Dayol, 2015; Tfouni et al., 2018; Dong, 2019; Kolaric i Simko, 2020), testy kliniczne (analiza moczu, analiza antybiotyków we krwi, analiza bilirubiny, biliwerdyny w chorobach wątroby, wykrywanie endogennych neuropeptydów w płynie pozakomórkowym mózgu) (Stolk i Hoogtanders, 1999; Locatelli et al., 2018; Rehm i Rentsch, 2020) oraz kontrola czystości i jakości produktów przemysłowych i chemikaliów wysokowartościowych.

Chromatografia cieczowa HPLC jest obecnie najczęściej wykorzystywaną metodą analityczną pozwalającą na oznaczenie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w próbkach środowiskowych. Oznaczenie WWA w glebach metodą HPLC wymaga przeniesienia analitów z matrycy stałej do matrycy ciekłej. Jest to etap przygotowania próbki do analizy chromatograficznej, który obejmuje: przygotowanie próbki gleby do ekstrakcji (suszenie, rozdrabnianie, homogenizacja), wybór sposobu prowadzenia ekstrakcji, oczyszczanie otrzymanych ekstraktów oraz zateżenie próbki. Tak przygotowane ekstrakty mogą zostać poddane analizie jakościowej i ilościowej metodą HPLC. Zasada rozdzielania składników próbki metodą HPLC opiera się na podziale analitu pomiędzy fazą ruchomą (eluent) i fazą stacjonarną (materiał wypełniający kolumny). Faza ruchoma jest zwykle mieszaniną rozpuszczalników, np. wody, acetonitrylu i/lub metanolu. Jej skład i temperatura odgrywają główną rolę w procesie separacji, wpływając na interakcje zachodzące między składnikami próbki a adsorbentem. Oddziaływania te mają charakter fizyczny, np. hydrofobowe (dyspersyjne), dipolowo-dipolowe i jonowe, najczęściej w połączeniu. Specyficzne interakcje międzycząsteczkowe między cząsteczkami próbki a materiałem wypełniającym określają czas analitów „na kolumnie”. Aktywnym składnikiem kolumny, adsorbentem, jest zazwyczaj materiał ziarnisty złożony z cząstek stałych (np. krzemionki, polimerów itp.) o wielkości 2–50 µm. Składniki mieszaniny próbki są oddzielone od siebie ze względu na ich różne stopnie oddziaływania z cząstkami adsorbentu. W związku z tym poszczególne składniki próbki są eluowane w różnym czasie. W ten sposób uzyskuje się rozdzielanie składników próbki.

## Opracowanie metodyki chromatograficznego oznaczania WWA

Prawidłowo opracowana metodyka oznaczania WWA w próbkach środowiskowych umożliwia określenie stężenia wybranych WWA w badanych próbkach na poziomie nanogramów na decymetr sześcienny (zgodnie z rozporządzeniem Ministra Środowiska z dnia 1 września 2016 r.). Pozwala to na określenie poziomu skażenia środowiska wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi i w razie konieczności na wdrożenie działań zapobiegawczych (eliminacja źródła



**Rysunek 1.** Klasyfikacja technik chromatograficznych (Witkiewicz, 1995)

**Figure 1.** Classification of chromatographic techniques (Witkiewicz, 1995)

skażenia) lub naprawczych (np. remediacja) na skażonym terenie.

Do analizy WWA zastosowano wysokociśnieniowy chromatograf cieczerw (HPLC) serii Vanquish Core firmy Thermo Scientific, którym dysponuje Zakład Technologii Eksploatacji Płynów Złożowych INiG – PIB. W ramach opracowania metodyki badawczej chromatograficznego oznaczania WWA w próbkach środowiskowych określono parametry pracy urządzenia, takie jak:

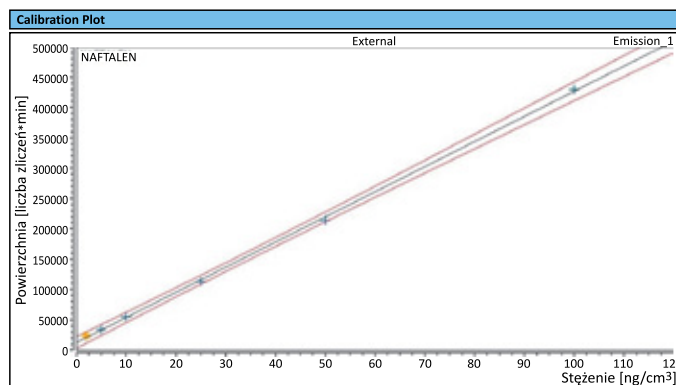
- rodzaj dozownika: automatyczny;
- dozowana objętość próbki (ekstrakt): 10 µl;
- kolumna: NUCLEODUR C18 PAH, 125 × 4 mm, 3 µm;
- eluenty: A – metanol 70%, B – acetonitryl;
- przepływ: 1,5 ml/min;
- gradient: 20% B przez 1,5 min, 20–50% B w 1,5 min, 50–100% B w 1 min, 100% B przez 1 min, 100–0% B w 3 min, 100% A przez 3 min;
- detektory: UV-VIS i fluorymetryczny (FLD).

### Kalibracja układu chromatograficznego

Kalibrację układu chromatograficznego pod względem oznaczania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych wykonano z użyciem roztworu wzorcowego PAH standard nr ref. 722393 firmy Macherey-Nagel o stężeniu każdego składnika w acetonitrylu równym 10 µg/cm<sup>3</sup>. Wykorzystując roztwór wzorcowy, przygotowano serię 7 próbek kalibracyjnych o stężeniach poszczególnych WWA w zakresie 0–100 ng/cm<sup>3</sup> (0 ng/cm<sup>3</sup>, 2 ng/cm<sup>3</sup>, 5 ng/cm<sup>3</sup>, 10 ng/cm<sup>3</sup>, 25 ng/cm<sup>3</sup>, 50 ng/cm<sup>3</sup>, 100 ng/cm<sup>3</sup>). W tym celu do kolbki miarowej o pojemności 5 cm<sup>3</sup> odmierzone odpowiednią ilość wzorca i uzupełniono kolbkę do kreski acetonitrylem, otrzymując roztwór

podstawowy. Kolejne roztwory kalibracyjne przygotowano przez rozcieńczenie roztworów o wyższych stężeniach WWA. Na podstawie uzyskanych wyników oznaczeń (wielkości pól powierzchni pików odpowiednich analitów) w programie Chromeleon wykreślono krzywe kalibracyjne zależności wielkości powierzchni pików chromatograficznych od stężenia poszczególnych analitów w roztworach wzorcowych. Graficzny obraz tych zależności dla naftalenu przedstawiono na rysunku 2.

Do opisu krzywych kalibracyjnych zastosowano wielomian stopnia pierwszego  $y = ax + b$ , który wystarczająco dobrze odwzorowywał zależność wielkości sygnału detektora FLD od stężenia oznaczanych WWA. Współczynnik regresji zawierał się w przedziale od 0,9992 do 0,9999, co świadczy o dobrym dopasowaniu krzywych do punktów pomiarowych. Zestawienie krzywych kalibracyjnych oraz wartości współczynników regresji dla poszczególnych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych zamieszczono w tabeli 1.



Rysunek 2. Krzywa kalibracyjna naftalenu (wykres wygenerowany w programie Chromeleon)

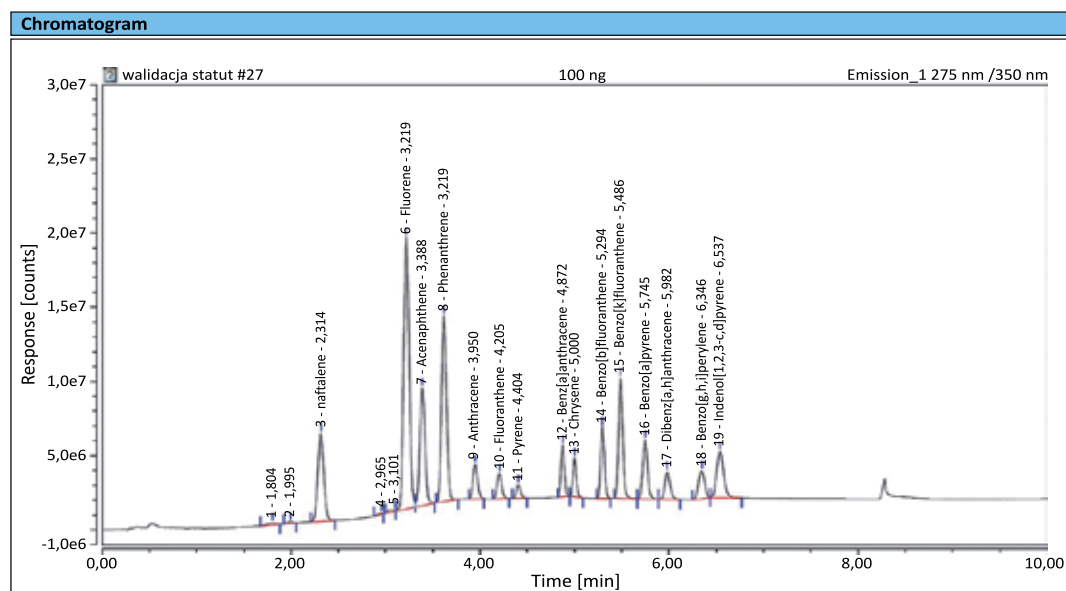
Figure 2. Naphthalene calibration curve (graph generated in the Chromeleon program)

Tabela 1. Zestawienie krzywych kalibracyjnych stosowanych do obliczeń ilościowych WWA oraz współczynników regresji  
Table 1. Calibration curves used for the quantitative calculations of PAHs and regression coefficients

Składnik	Równanie krzywej kalibracyjnej	Współczynnik regresji R <sup>2</sup>
Naftalen	$y = 4139,682x + 12458,754$	0,9995
Acenaften	$y = 5026,997x + 437,613$	0,9994
Fluoren	$y = 11995,442x + 11442,697$	0,9992
Fenantren	$y = 7624,186x + 2076,234$	0,9997
Antracen	$y = 1328,094x + 158,029$	0,9999
Fluoranten	$y = 936,021 - 192,750$	0,9999
Piren	$y = 459,919 - 20,929$	0,9992
Benzo(a)antracen	$y = 1436,082 - 848,000$	0,9998
Chryzen	$y = 1072,635 + 1766,205$	0,9999
Benzo(b)fluoranten	$y = 2068,983 + 10132,696$	0,9999
Benzo(k)fluoranten	$y = 3957,558 + 2932,935$	0,9999
Benzo(a)piren	$y = 2271,902 - 353,720$	0,9998

cd. Tabela 1/cont. Table 1

Składnik	Równanie krzywej kalibracyjnej	Współczynnik regresji $R^2$
Dibenzo(a,h)antracen	$y = 1175,781 + 2562,873$	0,9994
Benzo(g,h,i)perylen	$y = 1426,826 + 709,365$	0,9999
Indeno(1,2,3-c,d)piren	$y = 2595,419 + 1729,546$	0,9998



**Rysunek 3.** Chromatogram rozdziłu wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w próbce o stężeniu każdego WWA równym 100 ng/cm<sup>3</sup> (chromatogram wygenerowany w programie Chromeleon)

**Figure 3.** Chromatogram of the separation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a sample with a concentration of each PAH equal to 100 ng/cm<sup>3</sup> (chromatogram generated in the Chromeleon software)

W wyniku przeprowadzonej analizy chromatograficznej uzyskano rozdział oznaczanych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w próbce kalibracyjnej o stężeniu każdego WWA równym 100 ng/cm<sup>3</sup>, który został przedstawiony na rysunku 3.

### Walidacja metody chromatograficznej

Dla przetestowania metody chromatograficznego oznaczania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych przeprowadzono jej walidację. W tym celu wykonano serię analiz, posługując się roztworami wzorcowymi sporządzonymi z mieszaniny wzorcowej PAH standard nr ref. 722393 firmy Macherey-Nagel. Dla każdej z mieszanin wykonano serię analiz (po 10 pomiarów). Na podstawie uzyskanych wyników obliczono średnie wartości stężeń, odchylenie standardowe oraz względne odchylenie standardowe [%] dla poszczególnych WWA (tabela 2). Miało to na celu określenie dokładności, precyzji i powtarzalności wykonywanych oznaczeń. Przy obliczaniu ilościowym WWA brano pod uwagę uprzednio sporządzone krzywe kalibracyjne.

Analizując otrzymane wyniki, można stwierdzić, że testowany układ chromatograficzny jest stabilny w badanych zakresach stężeń, czego dowód stanowi fakt, że żaden z otrzymanych wyników analiz WWA nie odbiega o więcej niż o trzykrotną wartość odchylenia standardowego. Obliczone wartości względnego odchylenia standardowego, które są miarą precyzji metody analitycznej, zawierają się w granicach: od 1,0926% do 14,7697% w roztworze o stężeniu każdego ze składników wynoszącym 5 ng/cm<sup>3</sup>, od 0,9660% do 5,6195% w roztworze o stężeniu badanych WWA wynoszącym 10 ng/cm<sup>3</sup>, od 0,0865% do 1,1315% w roztworze o stężeniu każdego ze składników wynoszącym 50 ng/cm<sup>3</sup> oraz od 0,1180% do 0,5398% w roztworze o stężeniu badanych WWA wynoszącym 100 ng/cm<sup>3</sup> (tabela 2).

Prawidłowe opracowanie metody chromatograficznej HPLC do oznaczania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w próbkach środowiskowych wymaga określenia granicznych stężeń detekcji. O zakresie stosowania każdej metody chromatograficznej HPLC decydują: właściwości oznaczanego składnika, właściwości stosowanej aparatury (rodzaj zastosowanego detektora, a dokładnie jego zakres i czułość), warunki pomiarowe, a także dopuszczalny błąd oznaczenia.

**Tabela 2.** Zestawienie parametrów walidacyjnych w roztworach wzorcowych (liczba powtórzeń  $n = 10$ )  
**Table 2.** List of validation parameters in standard solutions (repetition number  $n = 10$ )

	Naftalen	Acenafthen	Fluoren	Fenantren	Antracen	Fluoranten	Piren	Benzo(a)antracen	Chryzen	Benzo(b)fluoranten	Benzo(k)fluoranten	Benzo(a)piren	Dibenz(a,h)-antracen	Benzo(g,h,i)perylene	Indeno(1,2,3-c,d)piren
Stężenie w glebie wzorcowej [ng/cm <sup>3</sup> ]	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Wartość średnia [ng/cm <sup>3</sup> ]	5,5103	5,1969	5,7731	5,2031	4,8243	5,3684	5,3491	5,3220	5,5715	5,6921	5,2905	5,4389	6,3583	5,1185	5,3023
Odczylenie standardowe	0,2600	0,5634	0,8527	0,0569	0,1619	0,1434	0,3730	0,1264	0,4070	0,2759	0,0671	0,0717	0,3554	0,3137	0,1536
Względne odchylenie standardowe [%]	4,7179	10,8405	14,7697	1,0926	3,3566	2,6721	6,9731	2,3746	7,3043	4,8473	1,2678	1,3178	5,5893	6,1295	2,8961
Błąd względny [%]	9,2610	3,7890	13,3910	3,9030	3,6420	6,8620	6,5260	6,0500	10,2580	12,1590	5,4910	8,0700	21,3630	2,3150	5,7010
Stężenie w glebie wzorcowej [ng/cm <sup>3</sup> ]	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Wartość średnia [ng/cm <sup>3</sup> ]	10,5775	10,6191	10,7412	10,3688	10,1728	10,2304	10,0966	10,0821	10,2701	10,7195	10,2365	10,2524	10,0200	9,9559	10,2241
Odczylenie standardowe	0,1281	0,5967	0,4516	0,1756	0,1457	0,1373	0,3725	0,1371	0,3130	0,1207	0,1357	0,1327	0,0968	0,1101	0,1200
Względne odchylenie standardowe [%]	1,2110	5,6195	4,2044	1,6939	1,4325	1,3423	3,6892	1,3594	3,0481	1,1261	1,3255	1,2940	0,9660	1,1060	1,1737
Błąd względny [%]	5,4600	5,8300	6,9010	3,5570	1,6990	2,2520	0,9570	0,8140	2,6300	6,7120	2,3100	2,4620	0,2000	0,4430	2,1920
Stężenie w glebie wzorcowej [ng/cm <sup>3</sup> ]	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Wartość średnia [ng/cm <sup>3</sup> ]	50,1504	50,3495	50,0214	50,1902	50,7706	50,8359	51,1872	50,1744	49,7619	50,3037	50,0076	49,8025	51,3382	48,8609	50,2278
Odczylenie standardowe	0,2640	0,5322	0,5660	0,0434	0,3857	0,4258	0,3213	0,2465	0,2077	0,3544	0,1263	0,1087	0,1005	0,4474	0,2239
Względne odchylenie standardowe [%]	0,5265	1,0570	1,1315	0,0865	0,7597	0,8377	0,6277	0,4913	0,4174	0,7045	0,2526	0,2183	0,1958	0,9157	0,4457
Błąd względny [%]	0,3000	0,6940	0,0430	0,3790	1,5180	1,6440	2,3190	0,3480	0,4780	0,6040	0,0150	0,3970	2,6070	2,3310	0,4540
Stężenie w glebie wzorcowej [ng/cm <sup>3</sup> ]	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Wartość średnia [ng/cm <sup>3</sup> ]	101,9110	101,4406	100,8934	100,2482	102,1193	101,8761	101,5711	100,7554	100,2498	101,1847	101,1242	100,3641	100,8551	98,4766	101,7199
Odczylenie standardowe	0,2778	0,1353	0,2181	0,5411	0,4608	0,4083	0,2970	0,1558	0,3027	0,3380	0,1194	0,2751	0,3393	0,4944	0,3881
Względne odchylenie standardowe [%]	0,2726	0,1334	0,2162	0,5398	0,4513	0,4008	0,2924	0,1546	0,3019	0,3341	0,1180	0,2741	0,3364	0,5020	0,3816
Błąd względny [%]	1,8750	1,4200	0,8850	0,2480	2,0750	1,8420	1,5470	0,7500	0,2490	1,1710	1,1120	0,3630	0,8480	1,5470	1,6910

W opracowanej metodzie oznaczania WWA wykorzystano dwa detektory: detektor fluorescencyjny (FLD), charakteryzujący się bardzo niską granicą wykrywalności w stosunku do wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych ( $\text{ng}/\text{dm}^3$ ), oraz detektor UV-VIS, charakteryzujący się granicą wykrywalności WWA na poziomie mikrogramów na decymetr sześcienny. To właśnie granica wykrywalności oraz granica oznaczalności decydują o zakresie stosowania danej metody analitycznej. Granica wykrywalności (LOD) to najmniejsze stężenie / najmniejsza ilość analitu możliwe do wykrycia za pomocą danej procedury analitycznej z określonym prawdopodobieństwem, natomiast granica oznaczalności (LOQ) definiowana jest jako najmniejsze stężenie / najmniejsza ilość substancji możliwe do ilościowego oznaczenia za pomocą danej procedury analitycznej z założoną dokładnością i precyzją (Kania i Janiga, 2011; Szlęk i Król, 2013; Wojtowicz i Jakubowicz, 2019). Wartości granicy wykrywalności i granicy oznaczalności każdego z badanych analitów WWA obliczono, wykorzystując równania (1) i (2) (Wojtowicz i Jakubowicz, 2019). Zestawienie wartości granic wykrywalności i oznaczalności badanych WWA zamieszczono w tabeli 3.

$$\text{LOD} = (3,3 \times s)/b \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = (10 \times s)/b \quad (2)$$

gdzie:

$s$  = odchylenie standardowe dla ślepej próby (próbki gleby wolnej od WWA),

$b$  = nachylenie krzywej kalibracyjnej.

### Zastosowanie metodyki chromatograficznego oznaczania WWA w próbkach gleby

Oznaczanie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) w próbkach środowiskowych stanowi nie lada wyzwanie dla współczesnej analityki. Ze względu na skomplikowany skład tego typu próbek pełna procedura badawcza obejmuje kilka etapów, do których należą (Steliga i Kluk, 2017):

- pobieranie i wstępne przygotowanie próbki;
- ekstrakcja analitów z matrycy;
- oczyszczanie próbki z substancji przeszkadzających;
- analiza chromatograficzna.

#### Material badawczy

Do przetestowania wybranych metod przygotowania próbek gleby do analizy chromatograficznej HPLC wykorzystano glebę wzorcową PAHs by HPLC40g (SQC017-40G) firmy Sigma Aldrich, o znanych stężeniach analitów (tabela 4).

#### Metodyka badawcza

Chromatograficzna metoda identyfikacji WWA w próbkach gleb wymaga przeprowadzenia analitów z matrycy stałej do matrycy ciekłej (etap izolacji), oczyszczenia próbki z substancji przeszkadzających (zazwyczaj z wykorzystaniem metody ekstrakcji na złożu sorpcyjnym – SPE) oraz zwiększenia stężenia analitów do poziomu wyższego niż granica oznaczalności stosowanych urządzeń (etap wzbogacania).

**Tabela 3.** Granice wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ) badanych WWA (liczba powtórzeń  $n = 10$ )  
**Table 3.** Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of the of the tested PAHs (repetition number  $n = 10$ )

Składnik	Symbol	Granica wykrywalności (LOD)	Granica oznaczalności (LOQ)
		$[\mu\text{g}/\text{dm}^3]$	$[\mu\text{g}/\text{dm}^3]$
Naftalen	N	$6,89 \times 10^{-5}$	$2,09 \times 10^{-4}$
Acenaften	Ac	$4,25 \times 10^{-3}$	$1,29 \times 10^{-2}$
Fluoren	Fluo	$2,46 \times 10^{-4}$	$7,45 \times 10^{-4}$
Fenantren	Fen	$9,04 \times 10^{-5}$	$2,74 \times 10^{-4}$
Antracen	A	$3,38 \times 10^{-3}$	$1,02 \times 10^{-2}$
Fluoranten	F	$2,46 \times 10^{-3}$	$7,44 \times 10^{-3}$
Piren	Pir	$5,88 \times 10^{-2}$	$1,78 \times 10^{-1}$
Benzo(a)antracen	BaA	$4,92 \times 10^{-4}$	$1,49 \times 10^{-3}$
Chryzen	CH	$7,60 \times 10^{-4}$	$2,30 \times 10^{-3}$
Benzo(b)fluoranten	BbF	$8,99 \times 10^{-5}$	$2,72 \times 10^{-4}$
Benzo(k)fluoranten	BkF	$7,55 \times 10^{-5}$	$2,29 \times 10^{-4}$
Benzo(a)piren	BaP	$6,69 \times 10^{-4}$	$2,03 \times 10^{-3}$
Dibenzo(a,h)antracen	DahA	$4,58 \times 10^{-4}$	$1,33 \times 10^{-3}$
Benzo(g,h,i)perylene	BghiP	$1,46 \times 10^{-3}$	$4,42 \times 10^{-3}$
Indeno(1,2,3-c,d)piren	Ind123P	$2,93 \times 10^{-4}$	$8,88 \times 10^{-4}$

**Tabela 4.** Porównanie wartości stopni odzysku w próbkach gleby ekstrahowanych i oczyszczanych metodami A, B i C (liczba powtórzeń  $n = 10$ )

**Table 4.** Comparison of recovery rates in soil samples extracted and treated with A, B and C (methods repetition number  $n = 10$ )

Składnik	Symbol	Wartość z certyfikatu	Metoda A		Metoda B		Metoda C	
			oznaczona wartość	stopień odzysku	oznaczona wartość	stopień odzysku	oznaczona wartość	stopień odzysku
			[µg/kg]	[%]	[µg/kg]	[%]	[µg/kg]	[%]
Naftalen	N	339 ± 6	274,59	81	257,640	76	267,30	79
Acenaften	Ac	311 ± 5	292,34	94	273,680	88	265,91	86
Acenaftylen	AcI	559 ± 5	531,05	95	497,510	89	493,88	88
Fluoren	Fluo	401 ± 4	392,98	98	376,940	94	361,90	90
Fenantren	Fen	654 ± 8	621,30	95	621,300	95	584,02	89
Antracen	A	609 ± 11	554,19	91	560,280	92	526,48	86
Fluoranten	F	361 ± 7	364,61	101	368,220	102	336,09	93
Piren	Pir	316 ± 10	331,80	105	328,640	104	306,20	97
Benzo(a)antracen	BaA	278 ± 6	269,66	97	261,320	94	237,69	86
Chryzen	CH	116 ± 5	107,88	93	110,200	95	95,87	83
Benzo(b)fluoranten	BbF	271 ± 14	233,06	86	246,610	91	218,83	81
Benzo(k)fluoranten	BkF	342 ± 10	290,70	85	318,060	93	263,17	77
Benzo(a)piren	BaP	345 ± 9	286,35	83	303,600	88	258,92	75
Dibenzo(a,h)antracen	DahA	187 ± 5	172,04	92	173,910	93	166,99	89
Benzo(g,h,i)perylene	BghiP	314 ± 9	263,76	84	279,460	89	244,61	78
Indeno(1,2,3-c,d)piren	Ind123P	118 ± 5	95,58	81	89,368	76	93,22	79

Biorąc pod uwagę sprzęt, którym dysponuje Zakład Technologii Eksploatacji Płynów Złożowych INiG – PIB Oddział Krosno, oraz dane literaturowe, sprawdzono trzy metody przygotowania próbek do analizy chromatograficznej HPLC: metodę A (metoda QuEChERS), metodę B (ekstrakcja rozpuszczalnikiem w aparacie Soxhleta) oraz metodę C (ekstrakcja rozpuszczalnikiem wspomagana wytrząsaniem). Otrzymane ekstrakty były następnie oczyszczane na wybranym materiale sorpcyjnym: MgSO<sub>4</sub> i PSA (metoda A), CN/SiOH (metoda B) i Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (metoda C). Oczyszczone ekstrakty poddano analizie chromatograficznej HPLC, obejmującej identyfikację oraz ilościowe oznaczenie poszczególnych WWA, a także obliczono stopnie odzysku analitów.

#### Metoda A

W celu izolacji analitów metodą A (QuEChERS – opracowana na podstawie aplikacji firmy Thermo Scientific *Analysis of 18 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil Using QuEChERS Method*) (Khan, 2014) do fiolki o pojemności 50 ml odważono 5 g gleby w stanie powietrznie suchym, po czym dodano do niej 5 cm<sup>3</sup> wody destylowanej oraz 10 cm<sup>3</sup> acetonitrylu. Następnie do fiolki dodano zawartość saszetki z mieszaniną ekstrakcyjną MgSO<sub>4</sub> + NaCl firmy Interchim (SSTT640 Extraction kit 4 g MgSO<sub>4</sub>/1 g NaCl original pouch 50 – gotowa mieszanina dostępna w handlu). Tak przygotowane próbki wytrząsano

przez 5 minut, a następnie wirowano przez 10 minut przy prędkości 3500 obr/min.

Oczyszczanie ekstraktu przeprowadzono metodą dSPE z wykorzystaniem fiolek do oczyszczania wypełnionych MgSO<sub>4</sub> i PSA firmy Interchim (JO3930 Clean-up kit fruit and vegetables AOAC 2007.01 2MLW). 1 cm<sup>3</sup> ekstraktu glebowego przeniesiono do fiolki do oczyszczania, którą następnie wytrząsano przez 5 minut oraz wirowano przez 10 minut przy prędkości 8000 obr/min. Otrzymany ekstrakt przesączono przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 25 µm i poddano analizie chromatograficznej.

Procedurę przeprowadzono w serii 10 powtórzeń.

#### Metoda B

W metodzie B (opracowana na podstawie PN-ISO 13877:2004 *Jakość gleby. Oznaczanie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Metoda z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej*) izolację analitów przeprowadzono z wykorzystaniem ekstrakcji rozpuszczalnikiem w aparacie Soxhleta. W tym celu do gilzy odważono 15 g powietrznie suchej gleby, po czym do kolby okrągłodennej dodano 100 ml toluenu. Ekstrakcję w aparacie Soxhleta prowadzono przez 4 godziny.

Oczyszczanie ekstraktu wykonano metodą dSPE z użyciem kolumnienek adsorpcyjnych SPE PAH CN/SiOH firmy



Chromabond zawierających fazy: 500 mg cyjano/100 mg Silica Gel (nr ref. 730135). Rozdział związków na kolumnkach SPE prowadzono z wykorzystaniem systemu próżniowego BAKER SPE do przygotowania próbek. Oczyszczony ekstrakt zatężono na próżniowej wyparce obrotowej do objętości 1 cm<sup>3</sup>.

Procedurę przeprowadzono w serii 10 powtórzeń.

### Metoda C

W celu dokonania ekstrakcji WWA z gleby metodą C (ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika wspomaganą wytrząsaniem – opracowana na podstawie PN-ISO 13877:2004 *Jakość gleby. Oznaczanie wielopierścieniowych węglodorów aromatycznych. Metoda z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej*) odważono 20 gramów powietrznie suchej gleby do kolb Erlenmeyera o poj. 500 cm<sup>3</sup>.

Próbki gleb następnie zalano 200 cm<sup>3</sup> acetonu i szczelnie zamknięto korkiem. Ekstrakcję przeprowadzono na wytrząsarce DOS-20 L firmy Conbest przez 15 minut z prędkością wytrząsania 150 RPM. Następnie do mieszaniny gleby i acetonu dodano 100 cm<sup>3</sup> eteru naftowego i wytrząsano przez kolejne 15 minut. Uzyskany ekstrakt przesączono, usunięto z niego aceton i związki polarne oraz zatężono na wyparce Chemland RE100-Pro.

### Ocena efektywności opracowanej metodyki oznaczania WWA w próbkach gleby

W celu określenia optymalnych warunków przygotowania próbek do analizy chromatograficznej należy dokonać interpretacji otrzymanych chromatogramów. Chcąc uzyskać prawidłowe wyniki, należy zwrócić uwagę na prawidłowy rozdział analitów oraz brak interferencji pików. Dodatkowo otrzymane chromatogramy powinny charakteryzować się jak największą eliminacją pików pochodzących od substancji przeszkadzających.

Na etapach izolacji, wzbogacania i oczyszczania możliwa są straty analitów, spowodowane ich odparowaniem lub oddziaływaniem z matrycą. Dlatego w celu korekty otrzymanych wyników oraz określenia optymalnych parametrów przygotowania próbek do analizy chromatograficznej obliczono stopnie odzysku poszczególnych WWA. Wyniki analiz chromatograficznych oraz wartości stopni odzysku WWA w badanych próbkach gleb zamieszczono w tabeli 4 i na rysunku 4.

Odzysk analitu, definiowany jako stosunek oznaczonego stężenia analitu w eluacie (na podstawie analizy próbki) do rzeczywistego (znanego) stężenia analitu w eluacie, obliczano zgodnie z równaniem (3) (Wojtowicz, 2018):

$$\text{odzysk [\%]} = C_{zm}/C_o \cdot 100\% \quad (3)$$

gdzie:

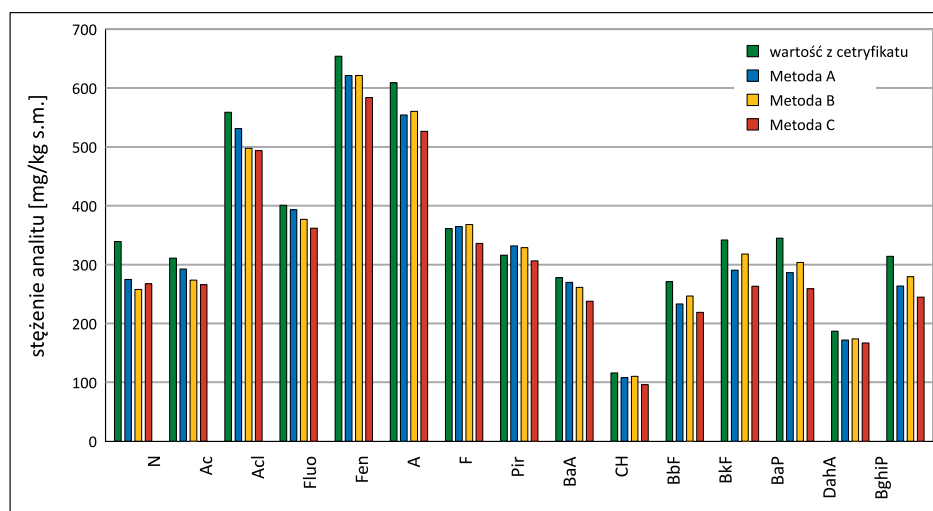
$C_{zm}$  – stężenie analitu w eluacie uzyskane na podstawie analizy próbki,  
 $C_o$  – rzeczywiste stężenie analitu w eluacie (wartość z certyfikatu).

Niezależnie od sposobu przygotowania próbek do analizy chromatograficznej udało się wyekstrahować każdy z badanych wielopierścieniowych węglodorów aromatycznych.

W wyniku zastosowania różnych metod ekstrakcji, rozpuszczalników i sposobu oczyszczania ekstraktów z substancji przeszkadzających uzyskano różne wartości stopni odzysku poszczególnych analitów.

Porównując testowane metody przygotowania próbek do analizy chromatograficznej, należy stwierdzić, że

najbardziej skuteczna pod kątem ekstrakcji naftalenu, acenaftenu, acenaftyleny, fluorenu, pirenu, benzo(a)antracenu i indeno(1,2,3-c,d)pirenu była metoda A. Najwyższe stopnie odzysku antracenu, fluorantenu, chryzenu, benzo(b)fluorantenu, benzo(k)fluorantenu, benzo(a)pirenu, dibenzo(a,h)antracenu i benzo(g,h,i)perylenu uzyskano, stosując metodę B. Metoda C była najmniej efektywna spośród testowanych.



**Rysunek 4.** Porównanie zawartości WWA we wzorcowej próbce gleby przy zastosowaniu różnych metod przygotowania próbki do analizy chromatograficznej HPLC

**Figure 4.** Comparison of PAH content in a standard soil sample using different sample preparation methods for HPLC chromatographic analysis

Oczyszczanie ekstraktu wykonano metodą dSPE z wykorzystaniem kolumnek adsorpcyjnych wypełnionych tlenkiem glinu. Rozdział związków na kolumnkach SPE prowadzono z wykorzystaniem systemu próżniowego BAKER SPE do przygotowania próbek. Oczyszczony ekstrakt zatężono na próżniowej wyparce obrotowej do objętości 1 cm<sup>3</sup>.

Procedurę przeprowadzono w serii 10 powtórzeń.

W opracowaniu optymalnej metodyki przygotowania próbek gleby do analizy chromatograficznej HPLC należy brać pod uwagę czas ekstrakcji, koszty prowadzenia procesu oraz ilość użytych rozpuszczalników. Metoda A (QuEChERS) jest szybka, tania i nie wymaga użycia dużej ilości rozpuszczalników (5 cm<sup>3</sup> wody i 10 cm<sup>3</sup> acetonitrylu) – w przeciwieństwie do metody B, która z kolei jest metodą długotrwałą, ze względu na długi czas ekstrakcji pojedynczej próbki (4 h) oraz możliwość ekstrakcji tylko jednej próbki w jednym aparacie Soxhleta. Ponadto metody B i C wymagają stosowania dużej ilości toksycznych rozpuszczalników (100 cm<sup>3</sup> toluenu – metoda B, 200 cm<sup>3</sup> acetonu i 100 cm<sup>3</sup> eteru naftowego – metoda C), co w konsekwencji prowadzi do wysokich kosztów analizy.

Porównując uzyskane wartości odzysku analitów we wzorcowych próbkach gleby zanieczyszczonej WWA (PAHs by HPLC40g SQC017-40G firmy Sigma Aldrich) oraz koszty (czas, ilość użytych rozpuszczalników) przygotowania próbek do analizy chromatograficznej HPLC pod kątem oznaczania WWA w matrycach glebowych, stwierdzono, że optymalna jest metoda A (QuEChERS).

### Walidacja metodyki oznaczania WWA w próbkach gleby

W celu walidacji wybranej (na podstawie wartości stopni odzysku analitów, kosztów i czasu prowadzenia procesu) metodyki oznaczania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w próbkach gleby (metoda A) wykonano serię 10 analiz próbki gleby wzorcowej PAHs by HPLC40g SQC017-40G firmy Sigma Aldrich, na podstawie których wyznaczono średnie wartości stężeń, odchylenie standardowe, względne odchylenie standardowe [%] oraz niepewność dla poszczególnych WWA (tabela 5). Miało to na celu określenie dokładności, precyzji i powtarzalności wykonywanych oznaczeń w próbkach gleb.

Obliczone wartości względnego odchylenia standardowego, które są miarą precyzji metody analitycznej, należą do przedziału od 0,052% do 0,455%. Wartości błędu względnego zawierają się w granicach od 1,00% do 19,00%, co wynika z wartości stopni odzysku analitów i zostało uwzględnione jako poprawka w analizie WWA w próbkach gleb. Wartości niepewności rozszerzonej kształtują się w przedziale od 0,267 do 1,212.

Niskie wartości odchylenia standardowych, względnych odchylenia standardowych oraz niepewności, a także możliwość wyeliminowania błędów poprzez wprowadzenie odpowiedniej poprawki (uwzględnia stopień odzysku analitów) pozwalają stwierdzić, że opracowana metodyka jest metodą wiarygodną pod kątem oznaczania WWA w próbkach gleb.

### Zastosowanie opracowanej metodyki chromatograficznej na rzeczywistych próbkach środowiskowych

Opracowaną metodykę chromatograficzną przetestowano na rzeczywistych próbkach gruntu pobranych z dwóch otworów badawczych zlokalizowanych na terenie kopalni Grabownica (teren przemysłowy). Z wytypowanych otworów badawczych pobierano próbki z trzech interwałów głębokościowych:

- warstwy powierzchniowej od 0,00 do 0,25 m p.p.t. (próbki 1A, 2A);
- interwału głębokościowego 0,25–1,00 m p.p.t. (próbki 1B, 2B);
- interwału głębokościowego 1,00–2,5 m p.p.t. (próbki 1C, 2C).

Pobrane próbki gruntu były przenoszone do szczelnie zamkniętych pojemników, opisywane i dostarczane do laboratorium w celu wykonania analiz chromatograficznych HPLC. W przypadku każdej badanej próbki postępowano analogicznie, tzn. uzyskany materiał doprowadzono do stanu powietrznie suchego, zmielono, a następnie przesiano przez sito o średnicy oczek 1 mm.

Na podstawie badań prowadzonych na próbce wzorcowej jako optymalną metodę przygotowania próbek gleby do analizy chromatograficznej wytypowano metodę A. Analogicznie do badań na próbce wzorcowej wykonano badania na próbkach rzeczywistych, tj. według układu:

- pobór próbek gruntu;
- suszenie próbki gruntu do stanu powietrznie suchego;
- izolacja analitów (WWA) poprzez zastosowanie metody QuEChERS;
- oczyszczanie ekstraktu metodą dSPE w fiolkach do oczyszczania wypełnionych MgSO<sub>4</sub> i PSA;
- analiza chromatograficzna HPLC.

METODA A

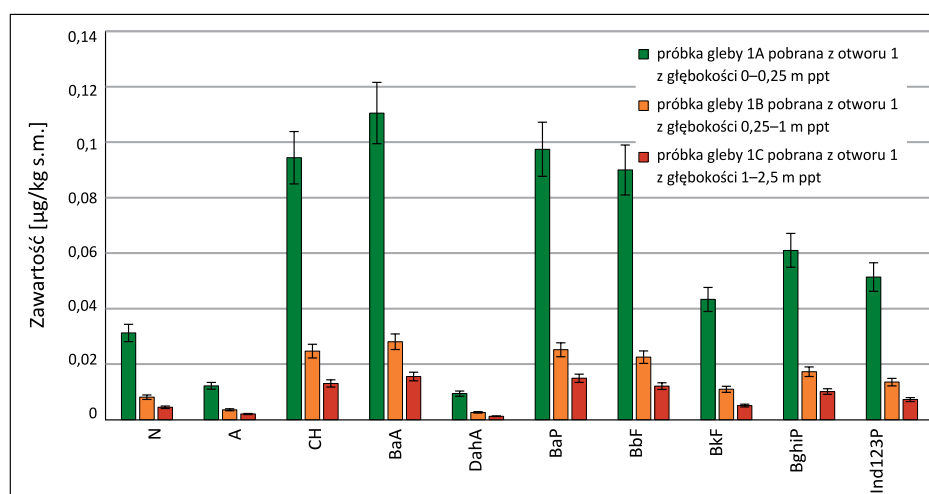
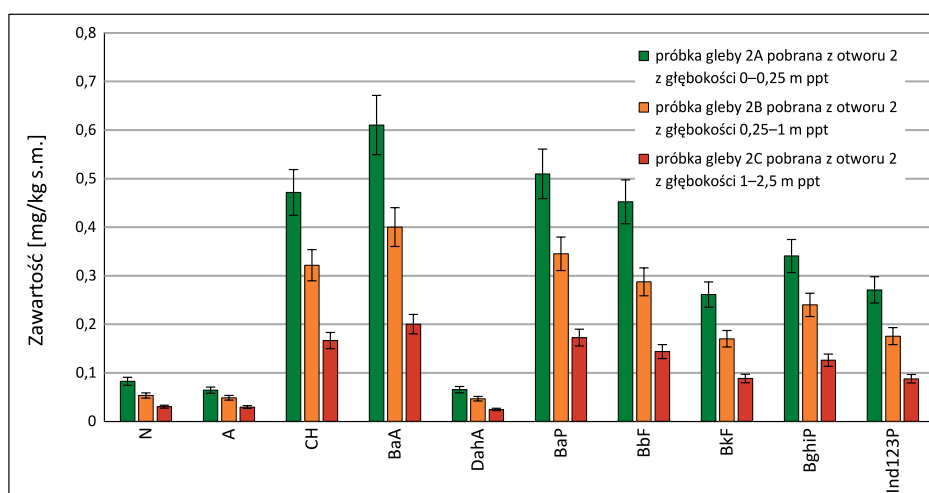
Na podstawie rozporządzenia Ministra Środowiska w sprawie sposobu prowadzenia oceny zanieczyszczenia powierzchni ziemi z dnia 1 września 2016 r. (poz. 1395) w pobranych próbkach gruntów oznaczono zawartość dziesięciu wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, do których należą: naftalen, antracen, chryzen, benzo(a)antracen, dibenzo(a,h)antracen, benzo(a)piren, benzo(b)fluoranten, benzo(k)fluoranten, benzo(g,h,i)perylen, indeno(1,2,3-c,d)piren.

W otrzymanych wynikach wzięto pod uwagę wartość niepewności rozszerzonej pomiaru przy poziomie ufności 95% i poziomie rozszerzenia  $k = 2$  (z uwzględnieniem etapu pobierania próbek) oraz poprawkę wynikającą ze stopnia odzysku analitów z matrycy glebowej.

Wyniki analiz rzeczywistych próbek gleby zanieczyszczonych wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi przedstawiono w tabeli 6 i na rysunkach 5–6.

**Tabela 6.** Zawartość oznaczonych WWA w próbkach środowiskowych**Table 6.** Content of determined PAHs in environmental samples

Próbka nr:	1A	1B	1C	2A	2B	2C	
Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA)							
Składnik	Symbol	Zawartość [mg/kg s.m.]					
Naftalen	N	0,031	0,008	0,004	0,082	0,053	0,030
Antracen	A	0,012	0,004	0,002	0,064	0,049	0,029
Chryzen	CH	0,094	0,025	0,013	0,472	0,322	0,166
Benzo(a)antracen	BaA	0,111	0,028	0,016	0,610	0,400	0,200
Dibenzo(a,h)antracen	DahA	0,009	0,003	0,001	0,065	0,047	0,024
Benzo(a)piren	BaP	0,097	0,025	0,015	0,510	0,345	0,173
Benzo(b)fluoranten	BbF	0,090	0,023	0,012	0,452	0,287	0,144
Benzo(k)fluoranten	BkF	0,043	0,011	0,005	0,261	0,170	0,088
Benzo(g,h,i)perylen	BghiP	0,061	0,017	0,010	0,341	0,240	0,126
Indeno(1,2,3-c,d)piren	Ind123P	0,051	0,014	0,007	0,271	0,176	0,088

**Rysunek 5.** Rozkład zawartości zidentyfikowanych wielopierścieniowych węglodorów aromatycznych (WWA) w próbkach gruntu z otworu 1**Figure 5.** Distribution of the content of identified polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil samples from borehole 1**Rysunek 6.** Rozkład zawartości zidentyfikowanych wielopierścieniowych węglodorów aromatycznych (WWA) w próbkach gruntu z otworu 2**Figure 6.** Distribution of the content of identified polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil samples from borehole 2

W próbkach gruntu pobranych z otworów badawczych na terenie kopalni ropy naftowej w miejscowości Grabownica Starzeńska stwierdzono obecność wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, jednak ich zawartości kształtowały się na bardzo niskim poziomie (<1 mg/kg s.m.).

W próbce powierzchniowej nr 1A w największej ilości występowały: benzo(a)antracen (0,111 mg/kg s.m.), benzo(a)piren (0,097 mg/kg s.m.) i chryzen (0,094 mg/kg s.m.), z kolei najniższe stężenia odnotowano dla dibenzo(a,h)antracenu (0,009 mg/kg s.m.) i antracenu (0,012 mg/kg s.m.). W próbkach wgłębnych pobranych z otworu 1 rozkład zawartości oznaczonych WWA w próbce był podobny, a ich stężenia zawierały się w granicach od 0,003 mg/kg s.m. (dibenzo(a,h)antracen) do 0,028 mg/kg s.m. (benzo(a)antracen) – w próbce pobranej z głębokości 0,25–1 m p.p.t. oraz od 0,001 mg/kg s.m. (dibenzo(a,h)antracen) do 0,016 mg/kg s.m. (benzo(a)antracen) – w próbce pobranej z głębokości 0,25–1 m p.p.t.

W próbkach gruntu z otworu 2 w największej ilości występował benzo(a)antracen: 0,610 mg/kg s.m. (próbka 2A), 0,400 mg/kg s.m. (próbka 2B), 0,200 mg/kg s.m. (próbka 2C). Nieznacznie mniejsze stężenia oznaczono dla chryzenu, benzo(a)pirenu i benzo(a)fluorantenu (0,452–0,510 mg/kg s.m. – w próbce powierzchniowej, 0,287–0,345 mg/kg s.m. – w próbce z głębokości 0,25–1 m p.p.t., 0,144–0,173 mg/kg s.m. – w próbce z głębokości 1–2,5 m p.p.t.). Najniższe stężenia w próbkach pobranych z otworu 2 odnotowano dla dibenzo(a,h)antracenu (0,065 mg/kg s.m. – próbka 2A, 0,047 mg/kg s.m. – próbka 2B, 0,024 mg/kg s.m. – próbka 2C) i antracenu (0,064 mg/kg s.m. – próbka 2A, 0,049 mg/kg s.m. – próbka 2B, 0,029 mg/kg s.m. – próbka 2C).

Analizując stężenia poszczególnych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w badanych próbkach gleb rzeczywistych, stwierdzono, że na badanym terenie kopalni w miejscowości Grabownica Starzeńska zawartość WWA nie przekraczała dopuszczalnych wartości dla IV grupy gruntów – teren przemysłowy. Dopuszczalne stężenia WWA na terenach przemysłowych podano w rozporządzeniu Ministra Środowiska w sprawie sposobu prowadzenia oceny zanieczyszczenia powierzchni ziemi z dnia 1 września 2016 r. (Dz.U. z 2016 r. poz. 1395).

### Podsumowanie i wnioski

Chromatografia HPLC jest obecnie najbardziej rozpowszechnioną metodą analityczną umożliwiającą wykonanie analiz jakościowych i ilościowych wybranych analitów obecnych w próbce w trakcie trwania jednego cyklu pomiarowego.

Opracowana metodyka oznaczania WWA metodą chromatografii cieczowej HPLC umożliwia wykonywanie oznaczeń

wybranych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w szerokim zakresie stężeń.

Przeprowadzona walidacja układu chromatograficznego z wykorzystaniem certyfikowanych roztworów wzorcowych WWA gwarantuje wysoką dokładność i powtarzalność uzyskanych wyników.

Wysokie wartości stopni odzysku analitów (81–105%) oraz selektywny rozdział poszczególnych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych na kolumnie chromatograficznej świadczą o prawidłowo opracowanej metodyce przygotowania próbek gleb zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi do analizy chromatograficznej.

Wykorzystanie metody chromatografii cieczowej HPLC do identyfikacji WWA umożliwia uzyskanie precyzyjnych oznaczeń analitów w próbkach środowiskowych.

Dane analityczne dotyczące zawartości WWA w rzeczywistych próbkach gleby dostarczają cennych informacji o poziomie skażenia środowiska naturalnego. Szybkie wykrycie substancji niebezpiecznych pozwala na podjęcie odpowiednich kroków umożliwiających przeciwdziałanie dalszemu skażeniu środowiska.

Artykuł powstał na podstawie pracy statutowej pt. *Ocena możliwości zastosowania chromatografii HPLC do oznaczeń WWA w próbkach środowiskowych* – praca INiG – PIB na zlecenie MEiN, nr zlecenia: 0036/KE/2021, nr archiwalny: DK-4100-0021/2021.

### Literatura

- Baker M.M., El-Kafrawy D.S., Bela T.S., 2017. Validated stability-indicating HPLC-DAD method for determination of the recently approved hepatitis C antiviral agent daclatasvir. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 75(3): 176–184. DOI: 10.1016/j.pharma.2016.12.005.
- Bishnoi N., Mehta U., Pandit G.G., 2006. Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in fruits and vegetables using high performance liquid chromatography. *Indian Journal of Chemical Technology*, 13: 30–35.
- Cruz-Angeles J., Martinez L.M., Videa M., Rodriguez-Rodriguez J., Martinez-Jimenez C., 2021. Development and Validation of a Rapid Analytical Method for the Simultaneous Quantification of Metabolic Syndrome Drugs by HPLC-DAD Chromatography. *Scientia Pharmaceutica*, 89(1). DOI: 10.3390/scipharm89010008.
- Dong M., 2019. HPLC Applications in Food, Environmental, Chemical, and Life Sciences Analysis. [W:] Dong M. HPLC and UHPLC for Practicing Scientists, Second Edition. *Wiley Online Library*. DOI: 10.1002/9781119313786.ch13.
- Fernandez P., Lafuente N., Bermejo A.M., Lopez-Rivadulla M., Cruz A., 1996. HPLC Determination of Cocaine and Benzoylcegonine in Plasma and Urine from Drug Abuser. *Journal of Analytical Toxicology*, 20: 224–228.
- Kalbe U., Lechnik-Habrink P., Bandow N., Sauer A., 2019. Validation of European horizontal methods for the analysis of PAH, PCB and dioxins in sludge, treated biowaste and soil. *Environmental Sciences Europe*, 31(29): 1–10. DOI: 10.1186/s12302-019-0211-3.
- Kania M., Janiga M., 2011. Elementy walidacji metody analitycznej oznaczania w mieszaninie gazowej związków węglowodorowych

- oraz N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, CO i CO<sub>2</sub> za pomocą dwukanałowego, zaworowego chromatografu gazowego AGILENT 7890A. *Nafta-Gaz*, 67(11): 812–824.
- Khan A.I., 2014. Analysis of 18 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil Using the QuEChERS Method. *Thermo Fisher Scientific, Runcorn, Cheshire, UK*.
- Kolaric L., Simko P., 2020. Determination of Cholesterol Content in Butter by HPLC: Up-to-Date Optimization, and In-House Validation Using Reference Materials. *Foods*, 9: 1–11. DOI: 10.3390/foods9101378.
- Locatelli M., Tinari N., Grassadonia A., Tartaglia A., Macerola D., Piccolantonio S., Sperandio E., D'Ovidio C., Carradori S., Ulusoy H.I., Furton K.G., Kabir A., 2018. FPSE-HPLC-DAD method for the quantification of anticancer drugs in human whole blood, plasma, and urine. *Journal of Chromatography B*, 1095: 204–213. DOI: 10.1016/j.jchromb.2018.07.042.
- Odumoso P., Dayol A.D., 2015. Determination of the sugar content in fruit flavoured drinks by HPLC. *Journal of Pharmacy & Bioresources*, 12: 144–149. DOI: 10.4314/jpb.v12i2.9.
- Opeolu B.O., Fatoki O.S., Odendaal J., 2010. Development of a solid-phase extraction method followed by HPLC-UV detection for the determination of phenols in water. *International Journal of Physical Sciences*, 5(5): 576–581.
- Pinder N., Brenner T., Swoboda S., Weigand M., Hoppe-Tichy T., 2017. Therapeutic drug monitoring of beta-lactam antibiotics – Influence of sample stability on the analysis of piperacillin, meropenem, ceftazidime and flucloxacillin by HPLC-UV. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 143: 86–93. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.05.037.
- Pirsaheb M., Fattahi N., 2018. Development of a liquid-phase micro-extraction based on the freezing of a deep eutectic solvent followed by HPLC-UV for sensitive determination of common pesticides in environmental water samples. *Royal Society of Chemistry*, 8: 11412–11418. DOI: 10.1039/C8RA00912K.
- Rehm S., Rentsch K.M., 2020. A 2D HPLC-MS/MS method for several antibiotics in blood plasma, plasma water, and diverse tissue samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412: 715–725. DOI: 10.1007/s00216-019-02285-0.
- Sankar R., Snehalatha K.S., Firdose S.T., Babu P.S., 2019. Applications in HPLC in pharmaceutical analysis. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 59: 117–124.
- Steliga T., Kluk D., 2017. Ocena składu zanieczyszczeń gleb skażonych TPH i WWA pod kątem opracowania technologii ich bioremediacji. *Prace Naukowe Instytutu Nafty i Gazu – Państwowego Instytutu Badawczego*, 215: 1–212. DOI: 10.18668/PN2017.2015.
- Stolk L.M.L., Hoogtanders K., 1999. Detection of laxative abuse by urine analysis with HPLC and diode array detection. *Pharmacy World and Science*, 21: 40–43.
- Szłęk M., Król A., 2013. Opracowanie metody analitycznej oznaczania siloksanów w biogazie. *Nafta-Gaz*, 69(11): 851–857.
- Tanaselia C., Becze A., Cadar O., Roman M., Simedru D., 2017. Evaluation of metals and PAH (polycyclic aromatic hydrocarbons) contamination level from Cluj-Napoca soil. *Agriculture – Science and Practice*, 101(1–2): 37–42.
- Tfouni S.A.V., Reis R.M., Kamikata K., Gomes F.M.L., Morgano M.A., Furlani R.P.Z., 2018. Polycyclic aromatic hydrocarbons in teas using QuEChERS and HPLC-FLD. *Food Additives & Contaminants, Part B*, 11(2): 146–152. DOI: 10.1080/19393210.2018.1440638.
- Vinkovic K., Galic N., Schmid M.G., 2018. Micro-HPLC–UV analysis of cocaine and its adulterants in illicit cocaine samples seized by Austrian police from 2012 to 2017. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 41(1): 6–13. DOI: 10.1080/10826076.2017.1409237.
- Witkiewicz Z., 1995. Podstawy chromatografii. *WNT, Warszawa*.
- Wojtowicz K., 2018. Ocena możliwości zastosowania chromatografii gazowej z detektorem ECD do oznaczania PCB w próbkach gleby. *Praca statutowa INiG – PIB, nr zlec. 005/KE/2018, Archiwum Instytutu Nafty i Gazu – Państwowego Instytutu Badawczego, Kraków*.
- Wojtowicz K., Jakubowicz P., 2019. Opracowanie metodyki oznaczania polichlorowanych bifenyli w próbkach gleb. *Nafta-Gaz*, 75(7): 420–429. DOI: 10.18668/NG.2019.07.06.

#### Akty prawne i dokumenty normatywne

- PN-ISO 13877:2004 Jakość gleby. Oznaczanie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Metoda z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej.
- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 1 września 2016 r. w sprawie sposobu prowadzenia oceny zanieczyszczenia powierzchni ziemi (Dz.U. z 2016 r. poz. 1395).



Mgr Katarzyna WOJTOWICZ  
Asystent w Zakładzie Technologii Eksploatacji  
Płynów Złożowych  
Instytut Nafty i Gazu – Państwowy Instytut Badawczy  
ul. Lubicz 25 A  
31-503 Kraków  
E-mail: [katarzyna.wojtowicz@inig.pl](mailto:katarzyna.wojtowicz@inig.pl)