

Oznaczenie zawartości antracenu w próbkach gleby pobranej z Ojcowskiego Parku Narodowego

Antracene signature in soil samples taken from Ojcowski National Park

Emilia Majkowska, Paulina Mucha, Beata Niemczyk, Dominika Trela
Praca wykonana pod kierunkiem dr inż. Ewy Niewiary

Abstract: *Polycyclic aromatic hydrocarbons belong to one of the most widespread sources of organic pollutants. One of their basic sources are anthropogenic pollutants emitted mainly into the atmosphere. Eventually they enter soils and cause their degradation. An increasing trend in PAHs content has been observed in areas with moderate anthropopressure for many years now. This is related to pollutant transportation from industrial regions. The results obtained allowed the conclusion to be drawn that the main source of PAHs pollution in the area studied was the coal incineration process.*

Słowa kluczowe: *wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, gleby, zanieczyszczenia.*

Key words: *polycyclic aromatic hydrocarbons, soils, contaminants.*

I. Wstęp

1. Ogólna charakterystyka wielopierścieniowych związków aromatycznych (WWA)

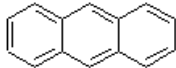
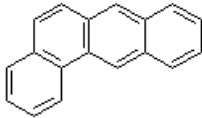
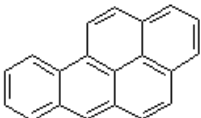
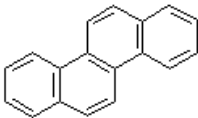
Od dłuższego czasu obserwuje się znaczne zainteresowanie specyficzną grupą zanieczyszczeń środowiska, a mianowicie związkami z grupy tak zwanych trwałych zanieczyszczeń organicznych. Związki te, emitowane są do środowiska głównie ze źródeł antropogenicznych, charakteryzują się wysoką toksycznością, trwałością oraz zdolnością do bioakumulacji. Do tej grupy zalicza się między innymi wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne [1].

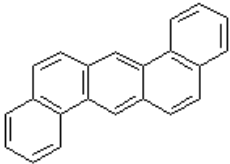
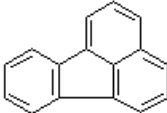
Wielopierścieniowe (policykliczne) węglowodory aromatyczne (WWA, PWA) - w literaturze angielskiej znane są pod nazwą *polycyclic aromatic hydrocarbons* (PAH), *polynuclear aromatics* (PNAs) lub *polycyclic organic matter* (POM) - stanowią liczną grupę związków o budowie pierścieniowej, zawierających w cząsteczce od dwóch do trzynastu skondensowanych pierścieni benzenowych. Obecnie zostało poznanych około 100 związków przynależnych do tej grupy, natomiast siedemnaście z nich powszechnie występuje

w środowisku. Właściwości fizykochemiczne oraz wzory wybranych WWA zostały przedstawione w tabeli 1 [2].

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, jako związki występujące w rozmaitych formach strukturalnych, są środowiskowo niezwykle istotne, ze względu na silne właściwości genotoksyczne, mutagenne, oraz kancerogenne. Związki WWA zawierające w swojej budowie pięć oraz więcej pierścieni aromatycznych określane są jako "ciężkie" WWA, podczas, gdy zbudowane z mniejszej liczby pierścieni określane są jako "lekkie" WWA. W postaci czystej wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne są substancjami stałymi, krystalicznymi, o białej lub bladożółto-zielonej barwie, posiadającymi wysokie temperatury topnienia i niskie prężności pary [3].

Tabela 1. Właściwości fizykochemiczne oraz wzory wybranych WWA [2].

Związek	Wzór sumaryczny	Wzór strukturalny	Postać	Temp. topn. [°C]	Temp. wrzenia [°C]
Antracen	C ₁₄ H ₁₀		bezbarwne súpki lub boczki o fioletowej fluorescencji	218	341
Benzo(a)antracen	C ₁₈ H ₁₂		płytki o żółtoniebieskiej fluorescencji	158,5	400
Benzo(a)piren	C ₂₀ H ₁₂		bladożółte płytki lub igły o żółtozielonej fluorescencji	179,3	310,8
Chryzen	C ₁₈ H ₁₂		bezbarwne lub czerwone płytki o niebieskiej fluorescencji	255,5	448

Dibenzo(a,h)antracen	C ₂₂ H ₁₄		bezbarwne płytki lub listki	262	269,5
Fluoranten	C ₁₆ H ₁₀		bezbarwne lub bladożółte igły lub płytki	111	375

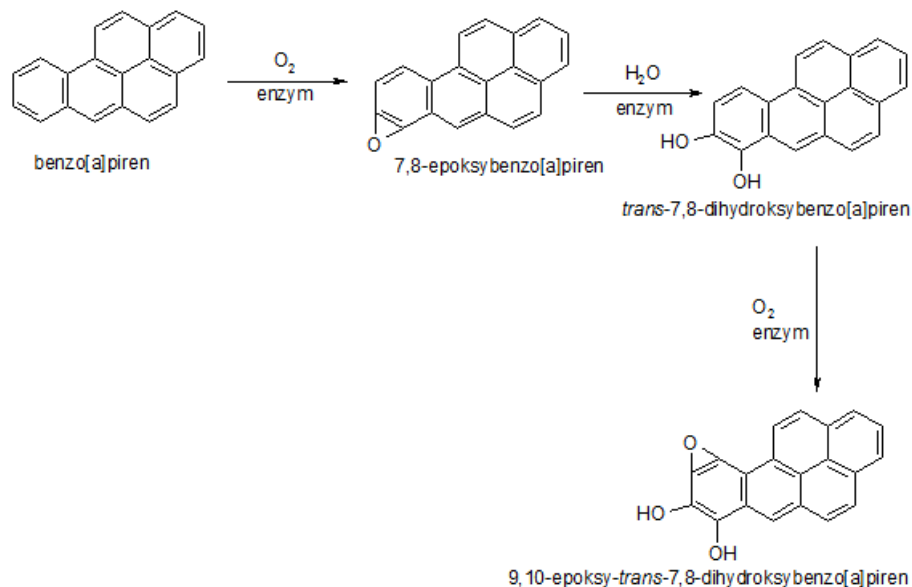
Policykliczne węglowodory aromatyczne charakteryzują się dobrą rozpuszczalnością w rozpuszczalnikach organicznych, takich jak: benzen, toluen, cykloheksan oraz aceton. Ich rozpuszczalność w wodzie jest niewielka. Przykładowo rozpuszczalność fenantrenu w wodzie posiadającej temperaturę 25°C wynosi 435 µg/l. Należy podkreślić, że obecność dodatkowych związków organicznych w wodzie sprawia, że rozpuszczalność omawianych zanieczyszczeń zwiększa się. Związki przynależne do grupy wielopierścieniowych węglodorów aromatycznych wykazują znacznie większe powinowactwo do powierzchni ciał stałych. Toteż powszechnie uważa się, że WWA w środowisku są zaadsorbowane na powierzchni stałych cząstek występujących zarówno w wodzie, glebie jak i powietrzu. Rozpatrując reakcje chemiczne jakim ulegają WWA, można je podzielić na dwie grupy: reakcje podstawiania oraz reakcje przyłączania, w czasie których wiązanie podwójne ulega zniszczeniu. Węglowodory z tej grupy wykazują dużą wrażliwość na działanie światła, tlenu, ozonu oraz innych utleniaczy. Pod wpływem tlenu oraz światła WWA ulegają reakcjom fotochemicznym, gdzie w końcowym etapie utworzone zostają diole, chinony oraz aldehydy. Właściwości tego rodzaju są niezmiernie znaczące, zwłaszcza podczas usuwania, tychże zanieczyszczeń ze środowiska [3].

2. Oddziaływanie wielopierścieniowych węglodorów aromatycznych na organizm człowieka

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne charakteryzują się bardzo dużą toksycznością. Oznaczeniu poddaje się najczęściej 17 z nich, ze względu na ich oddziaływanie na organizm człowieka. Są to: acenaftylen, acenaften, antracen, benz(a)antracen, benzo(e)piren, benzo(a)piren, benzo(b)fluoranten, benzo(k)fluoranten, benzo(j)fluoranten, benzo(g,h,i)perylene, dibenz(a,h)antracen, chryzen, fluoranten, fenantren, fluoren, piren oraz indeno(1,2,3-c,d)piren [4].

WWA są metabolizowane są do epoksydów poprzez systemy enzymatyczne. Metabolity WWA wykazują silne działanie kancerogenne. Mechanizm ich działania polega na alkirowaniu zasad DNA i RNA, a także innych receptorów o charakterze nukleofilowym.

Mechanizm działania WWA przedstawiono na podstawie działania benzo[a]pirenu (rysunek 1). Przeprowadzono badania, na podstawie których stwierdzono, że ostatni związek z przedstawionego schematu działa kancerogenicznie, a także reaguje z DNA [5].



Rysunek 1. Przemiany benzo[a]pirenu w organizmach żywych [4].

Badania wykazały również, że wielu pracowników mających kontakt z pyłami i dymami pochodzącymi z pieców węglowych, zachorowało na nowotwór płuc. Głównymi składnikami pyłów i dymów są benzo(a)piren, chryze, benzo(a)antracenu, benzo(a)fluoranten, dibenzo(a,h)antracenu i wiele innych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych [6].

3. Metody pozwalające oznaczać wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne

We współczesnej analizie śladowej mamy do czynienia z wykrywaniem substancji na poziomie ppm i ppb.

Aby oznaczyć tak małe ilości substancji chemicznych w skomplikowanej matrycy, jaką są próbki środowiskowe, niezbędne jest przygotowanie procedury składającej się z kilku etapów:

- pobieranie próbek
- przechowywanie
- wstępne przygotowanie obejmujące wyodrębnienie z matrycy, zateżanie czy przekształcanie analitu w postać bardziej trwałą lub dogodną dla końcowego oznaczania
- analiza właściwa
- obróbka danych [7]

Analizę WWA w matrycach środowiskowych wykonuje się używając różnych metod [8]. Oznaczenie chromatograficzne WWA w matrycach środowiskowych poprzedzone jest odpowiednim przygotowaniem próbki. Wśród nich wymienia się:

- możliwość doboru odpowiedniego ekstrahenta,
- wybór sposobu prowadzenia ekstrakcji,
- oczyszczanie ekstraktów,
- jakościową oraz ilościową analizę chromatograficzną [9].

Biorąc pod uwagę niski koszt aparatury często stosowaną techniką pozwalającą rozdzielić WWA jest chromatografia cienkowarstwowa TLC albo też jej modyfikacja-cisnieniowa chromatografia cienkowarstwowa HPTLC. W tym drugim przypadku wykorzystuje się specjalną komorę, wywierającą ciśnienie na złożę naniesione na płytkę do chromatografii cienkowarstwowej. Otrzymuje się w ten sposób płaską, cienką kolumnę, przez którą można tłoczyć eluent z optymalną prędkością niezależnie od sił kapilarnych i oporu eluentu przez warstwę adsorbentu. Intensywny rozwój wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC sprawił, że ta technika chromatograficzna jest najczęściej stosowaną techniką umożliwiającą rozdział WWA [8].

Ponadto rozdział otrzymanych węglowodorów można też wykonywać używając chromatografii gazowej połączonej ze spektrometrem mas (GC/MS). Ogromną zaletą GC/MS jest jej wysoka rozdzielczość, co jest niezmiernie korzystne przy rozdziale mieszanin, a także w trakcie ich identyfikacji. Wadą natomiast są trudności w analizie „ciężkich” (sześcio-,

siedmiopierścieniowych) WWA (kolumna może ulec rozkładowi). Analizę wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych przy użyciu HPLC prowadzi się w układzie faz odwróconych (faza stacjonarna jest niepolarna). Ta technika chromatografii zapewnia najlepszy rozdział mieszanin różniących się hydrofobowością związków [10].

3.1 Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)

Wysokosprawna chromatografia cieczowa kolumnowa stanowi jedną z najczęściej wykorzystywanych technik chromatograficznych. Wykorzystywana jest do oczyszczania, izolowania, oznaczania ilościowego oraz identyfikacji substancji chemicznych. Metoda znalazła zastosowanie głównie w analizie farmaceutycznej, biomedycznej, ochronie środowiska itp. HPLC (ang. *High Pressure Liquid Chromatography*) jest rodzajem cieczowej chromatografii kolumnowej, gdzie próbka poddawana analizie, jest rozpuszczana w rozpuszczalniku transportującym (eluencie) i w takiej formie jest kierowana do kolumny wypełnionej jest specjalnym, porowatym złożem. Fazą ruchomą jest roztwór ciekły wykazujący różny stopień polarności. Wskutek oddziaływań międzycząsteczkowych substancji chemicznych, wchodzących w skład analizowanej próbki, z fazą ruchomą i stacjonarną, następuje ich rozdzielanie [1]. Aparatura do chromatografii HPLC zawiera następujące elementy (rys. 1): zbiornik (lub zbiorniki) na fazę ruchomą (1), system odgazowywania fazy ruchomej (2), pompa (3), dozownik (4), kolumna (lub zestaw kilku kolumn) (5), detektor (6), połączonego z rejestratorem (komputer)(7) [11].



Rysunek 2. Chromatograf cieczowy HPLC, Agilent 1260.

II. Część badawcza

1. Cel

Celem projektu było określenie zawartości antracenu w glebach pobranych z terenu Ojcowskiego Parku Narodowego. Do badań wykorzystano próbki gleb z terenów na których mogą występować zanieczyszczenia z grupy WWA. Oznaczenie zawartości antracenu wykonano stosując wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC).

2. Opis punktów poboru próbek

Badaniu poddano ziemię pobraną z terenu Ojcowskiego Parku Narodowego. Aby lepiej zilustrować miejsca, z których pobrano próbki do analizy w niniejszej pracy zamieszczono mapę z zaznaczonymi obszarami, z których pobrano materiał do badań oraz zdjęcia niniejszych punktów pomiarowych.

Glebę pobrano 20.10.2015 roku, z czterech różnych miejsc zlokalizowanych na terenie Ojcowskiego Parku Narodowego. Poboru próbek dokonano w taki sposób, aby ilościowo ocenić zawartość antracenu w badanym gruncie. Materiał pobrano z wierzchniej warstwy gruntu z głębokości około 20 cm. Z danego miejsca do analizy pobrano kilka próbek pierwotnych, które po połączeniu stanowiły próbkę ogólną.



Rysunek 3. Mapa Ojcowskiego Parku Narodowego z zaznaczonymi punktami pomiarowymi.



Rysunek 4. *Palenisko centrum.*

Próbka nr 1

Teren położony w odległości kilku metrów od ruchliwej drogi. Wokół znajduje się las, parking oraz sklepik z pamiątkami. Glebę z tego obszaru pobrano z zgaszonego paleniska z trzech różnych punktów.



Rysunek 5. *Źródło Miłości.*

Próbka nr 2

Teren położony blisko drogi przejazdowej. Wokół znajduje się głównie las. Glebę z tego terenu pobrano przy "Źródelku Miłości" również z trzech różnych miejsc.



Rysunek 6. *Kaplica "Na Wodzie".*

Próbka nr 3

Obszar usytuowane w sąsiedztwie ruchliwej drogi. W odległości około 3 metrów płynie potok. Glebę z tego terenu pobrano przy Kaplicy "Na Wodzie" z trzech różnych punktów.



Rysunek 7. *Parking.*

Próbka nr 4

Teren położony u podnóża zamku "Ojciec u Skały". W odległości 10 metrów zlokalizowana jest ruchliwa droga. Glebę z tego terenu pobrano z parkingu w trzech różnych punktach.

3. Aparatura i odczynniki

Analiza dotycząca zawartości antracenu w próbkach gleb, prowadzona była przy użyciu chromatografu cieczowego firmy DIONEX (*ASI-100 Autosampler Series* oraz *P580 Pump*) zaopatrzonego w detektor UV-VIS (*UVD170U Dionex*, sprzężonego z kolumną ochronną *Thermo Scientific Part No 25005-154630*). Rozdział odbywał się na kolumnie RPC18 o wielkości ziarna 5 μm firmy DIONEX.

W procesie ekstrakcji antracenu z gleby wykorzystano myjkę ultradźwiękową *InterSonic IS-2*.

Podczas prowadzenia analizy antracenu w próbkach gleb, użyto również drobnego sprzętu laboratoryjnego:

- zlewki,
- pipet automatycznych
- wagi analitycznej,
- wialek.

Spośród odczynników użytych do analizy można wymienić:

- aceton (PAH),
- acetonitryl (firmy BAKER),
- antracen (wzorzec 10 ng/μl dr Ehrenstorfer),
- heksan (firmy BAKER),
- woda o czystości do HPLC firmy BAKER.

Odczynniki wykazywały czystość adekwatną do użytku podczas analiz w chromatografii HPLC.

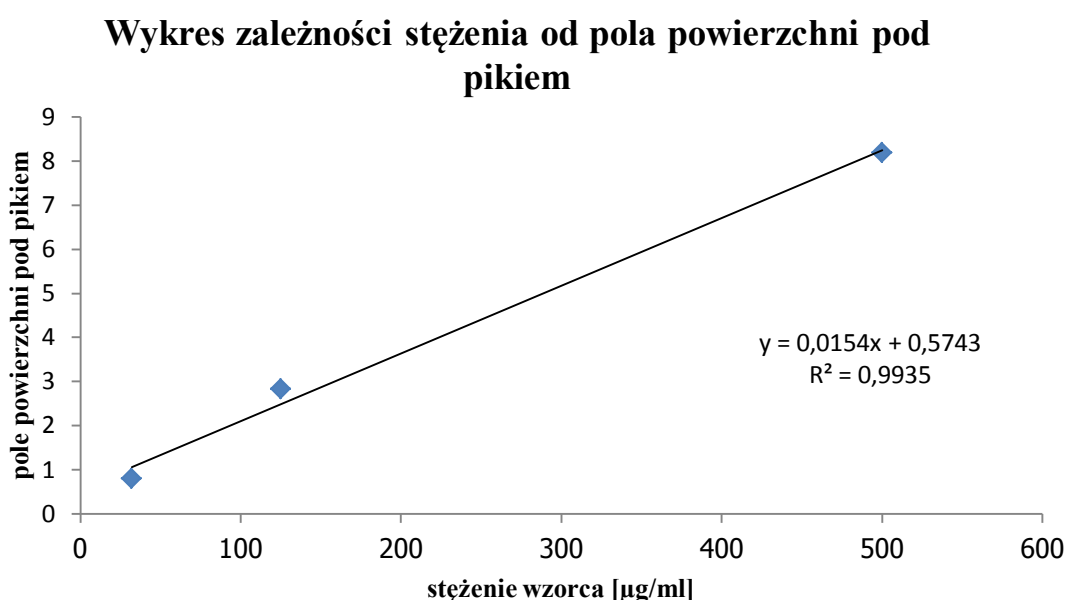
4. Metodyka postępowania analitycznego

Po pobraniu próbek z obranego do analizy terenu, glebę poddawano suszeniu przez okres dwóch tygodni, w temperaturze pokojowej oraz bez dostępu światła. Następnie dokonywano jej rozdrobnienia w młynku. Tak przygotowaną glebę przechowywano na szalkach bez dostępu światła.

Na wadze analitycznej odważono po 5 g wysuszonej na powietrzu i rozdrobnionej gleby. Glebę przeniesiono ilościowo do plastikowych probówek. Następnie pipetą automatyczną dodano do każdej z nich 100 μl roztworu podstawowego antracenu o stężeniu 10 μg/ml i po 5 ml acetonu i heksanu. Całość wytrząsano przez 10 min. Próbki odstawiono na kilkanaście minut w celu sedymentacji osadu. Kolejno pobrano do strzykawek 2 cm³ ekstraktów, przesączono przez filtr 0,45 μm do wialek chromatograficznych. Przeprowadzono chromatograficzne oznaczanie antracenu.

W celu wyznaczenia stężenia badanego analitu w ekstraktach glebowych wykorzystano metodę dodatku wzorca, która polegała na dodaniu do próbki znanych ilości substancji oznaczanych. Do wialek chromatograficznych przeniesiono przy pomocy pipety automatycznej 100 mm³ ekstraktów z gleby oraz 100 mm³ roztworu wzorcowego o stężeniu 50 µg/cm³ i po dokładnym wymieszaniu całość wprowadzono do kolumny chromatograficznej. W celu oszacowania, czy wartości stężeń w badanych próbkach mieszczą się w zakresie liniowości metody wykonano roztwory wzorcowe antracenu o stężeniach 50 µg/cm³, 125 µg/cm³, 500 µg/cm³. Na podstawie otrzymanych wyników wykonano wykres stężenia wzorca od pola powierzchni pod pikiem (wykres 1).

Wykres 1. Wykres zależności stężenia wzorca od pola powierzchni pod pikiem.



Dodatkowo podczas analizy stosowano elucję gradientową. Program gradientowy został przedstawiony w tabeli 2. Szybkość przepływu eluentu $v = 1$ ml/min. Objętość wstrzykniętej próbki $V = 20$ µl.

Tabela 2. Program elucji gradientowej zastosowany do rozdziału antracenu.

Czas [min]	Zawartość wody [%]	Zawartość acetonitrylu [%]
0-3	55	45
3-6	0	100

6-14	0	100
14-17	55	45
17-20	55	45

4. Wyniki pomiarów

Na podstawie uzyskanych sygnałów A_G (pole powierzchni piku uzyskanego dla ekstraktu glebowego o stężeniu antracenu C_G) oraz A_M (pole powierzchni piku mieszaniny 100 mm^3 ekstraktu glebowego i 100 mm^3 roztworu wzorcowego o stężeniu antracenu C_M) obliczono stężenie antracenu w ekstrakcie glebowym.

Między stężeniem a uzyskiwanym sygnałem istnieje zależność liniowa:

$$A_G = a \cdot C_G$$

$$A_M = a \cdot C_M$$

Stężenie antracenu w roztworze powstałym poprzez zmieszanie roztworu badanego i wzorcowego wyrażono równaniem:

$$C_M = \frac{V_G \cdot C_G + V_W \cdot C_W}{V_G + V_W}$$

a stężenie analitu w ekstrakcie glebowym:

$$C_G = \frac{A_G \cdot V_W \cdot C_W}{V_G \cdot A_M + V_W \cdot A_M - A_G \cdot V_G}$$

gdzie:

V_W – objętość dodanego wzorca

V_G – objętość roztworu badanego

C_W – stężenie dodanego wzorca.

W wyniku przeprowadzonej ekstrakcji antracenu z gleby, otrzymano frakcje tego związku, które analizowano następnie przy wykorzystaniu metody HPLC. Wyniki ilościowe z przeprowadzonej analizy w badanych próbkach środowiskowych zestawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Otrzymane wyniki.

Nazwa próbki	Miejsce poboru	Pole powierzchni pod pikiem	Średnie wartości uzyskanych stężeń antracenu [mg/kg s.m]	Odchylenia
A	<i>Kaplica na wodzie</i>	3,035	0,1341	0,0193
		2,608		
		2,644		
B	<i>Źródło miłości</i>	2,343	0,1230	0,0102
		2,282		
		2,146		
C	<i>Palenisko centrum</i>	2,754	0,1433	0,0022
		2,808		
		2,772		
D	<i>Parking</i>	1,584	0,0736	0,0049
		1,593		
		1,736		

5. Wnioski

Przeprowadzona analiza próbek pochodzących z terenu Ojcowskiego Parku Narodowego miała na celu określenie stopnia zanieczyszczenia gleby antracem pochodzącym z grupy wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Do identyfikacji zastosowano metodę HPLC. Zakres stężeń antracenu w próbkach zawierał się w przedziale od 0,0736 mg/kg s.m. do 0,1433 mg/kg s.m. Zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Środowiska z dnia 9 września 2002r. w sprawie standardów jakości gleby oraz standardów jakości ziemi

uzyskane stężenia znajdują się zarówno poniżej (próbka pobrana z parkingu) jak i powyżej (pozostałe próbki) dopuszczalnych wartości (0,1mg/kg suchej masy). Tak mała rozbieżność uzyskanych wyników spowodowana jest niewielką powierzchnią Ojcowskiego Parku Narodowego w związku z czym próbki zostały pobrane z miejsc położonych stosunkowo blisko siebie. Nadmiar antracenu w badanych próbkach gleb pobranych z Parku, może być spowodowane tym, że teren znajduje się w pobliżu Krakowa, gdzie panuje duże stężenie pyłów zawieszonych w powietrzu, przenoszonych wraz z ruchami powietrza na sąsiednie obszary (a wraz z nimi zaadsorbowane zanieczyszczenia). W niedalekim sąsiedztwie Ojcowskiego Parku Narodowego znajduje się także huta, która również ma wpływ na duże stężenie antracenu.

Bibliografia

- [1] Kaleta J., Papciak D., Puskarewicz A. *"Zastosowanie procesu biodegradacji do usuwania wybranych zanieczyszczeń organicznych z wody, ścieków i osadów ściekowych."*, Zeszyty Naukowe Politechniki Rzeszowskiej. Budownictwo i Inżynieria Środowiska (2010), str. 53-63.
- [2] Praca zbiorowa pod redakcją: Piotrowskiego J.K. *"Podstawy toksykologii kompendium dla studentów szkół wyższych- wydanie drugie"*. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2008, str. 312-317
- [3] Kubiak M.S. *"Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) – ich występowanie w środowisku i w żywności."*, Katedra Procesów i Urządzeń Przemysłu Spożywczego, Wydział Mechaniczny, Politechnika Koszalińska w Koszalinie, Probl High Epidemiol 2013, 94(1), str. 31-36
- [4] Pośniak, M., Makhniashvili I., Kowalska J. *"Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne w procesach stosowania asfaltów"*. Bezpieczeństwo pracy nauka i praktyka (2000): 7-8
- [5] Praca zbiorowa pod redakcją Piotrowskiego J.K. *"Podstawy toksykologii kompendium dla studentów szkół wyższych- wydanie drugie"*. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2008
- [6] Sapota A. *"Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (substancje smołowe rozpuszczalne w cykloheksanie.)". Dokumentacja proponowanych wartości*

- dopuszczalnych poziomów narażenia zawodowego*". Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy 2002, R. 18, nr 2(32), 179-208
- [7] Pracownia studencka Zakładu Analizy Środowiska „ Izolacja wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (wwa) z gleby” Gdańsk 2013
- [8] Macherzyński B., Włodarczyk-Makuła M. *"Przygotowanie próbek cieczy osadowych (przemysłowych) do oznaczania wybranych WWA"*. LAB Laboratoria, Aparatura, Badania 17 (2012): 27-30
- [9] Macherzyński B., Włodarczyk-Makuła M. *"Ekstrakcja WWA z osadów wydzielonych ze ścieków koksowniczych"*. Inżynieria i Ochrona Środowiska 14 (2011): 333-343
- [10] Praca magisterska: Suszek M. *"Oznaczanie wybranych węglowodorów aromatycznych (WWA) przy zastosowaniu chromatografii gazowej z detekcją mas (GC/MS) i wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych z detekcją fluorescencyjną(RP-HPLC-FLD)"*. Siedlce 2007
- [11] Praca doktorska: Płocharz P.W. *" Teoretyczne i praktyczne aspekty efektywności rozdzielania elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej"*. Lublin 2011