

**Grzegorz BOCZKAJ<sup>1</sup>, Ewelina GILGENAST<sup>1</sup>, Paulina NOWICKA<sup>1</sup>,  
Andrzej PRZYJAZNY<sup>2</sup>, Marian KAMIŃSKI<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny, Katedra Inżynierii Chemicznej i Procesowej,  
80-233 Gdańsk, ul. Narutowicza 11/12, [mknkj@chem.pg.gda.pl](mailto:mknkj@chem.pg.gda.pl)

<sup>2</sup> Chemistry & Biochemistry Department, Kettering University,  
1700 West Third Avenue, Flint, MI 48504, USA.

## **PROCEDURA PRZYGOTOWANIA PRÓBK DO OZNACZANIA WIELOPIERŚCIENIOWYCH WĘGLOWODORÓW AROMATYCZNYCH W PRODUKTACH TECHNICZNYCH**

*W pracy opisano nową metodę przygotowania próbki w celu oznaczenia śladowych zawartości wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) w wysokowrzących produktach naftowych. Wartości granicy oznaczalności dla badanych WWA w materiałach tego typu mieściły się w przedziale od kilkudziesięciu ng/kg do poniżej dwudziestu ug/kg. Badania wykazały, że w celu oddzielenia większości zanieczyszczeń od analitów, bez ich znaczących strat, konieczne jest, w pierwszym etapie przygotowania próbki, zastosowanie chromatografii wykluczania (ang. Size exclusion chromatography - SEC) w skali semipreparatywnej albo preparatywnej. W kolejnym etapie zastosowano chromatografię adsorpcyjną w układzie faz normalnych, korzystnie, także w skali semipreparatywnej lub preparatywnej. Zastosowanie procedury rozdzielania ortogonalnego opisanego w pracy pozwala na wyizolowanie z badanego materiału jedynie grupy niepodstawionych węglowodorów aromatycznych w ściśle określonym zakresie masy molekularnej. Im niższa jest wymagana granica oznaczalności (LOQ) WWA, tym większą skalę preparatywnej chromatografii cieczowej należy zastosować w obu etapach wzbogacania próbki. Korzystne jest również zastosowanie metody dodatku wzorca, zapewniające analizę ilościową, skorygowaną o stopień odzysku WWA podczas etapu przygotowania próbki. Oznaczenie końcowe może być wykonane techniką HPLC-FLD albo GC-MS, przy czym w przypadku przygotowania próbki z zastosowaniem kolumn do preparatywnej chromatografii cieczowej, można do identyfikacji śladowych zawartości WWA, a także do wykonania oznaczenia, zastosować detektor UV-VIS/DAD, otrzymując widma UV-VIS oznaczanych analitów i dodatkową możliwość ich identyfikacji na tej podstawie.*

### **WSTĘP**

Przygotowanie próbki w celu oznaczenia śladowych zawartości analitów w złożonych matrycach na ogół zawiera dwa etapy: ekstrakcję analitów lub ekstrakcję z matrycy, a następnie oczyszczanie [1]. Pierwszy etap ma na celu selektywną izolację analitów z jednoczesnym uproszczeniem matrycy. Najczęściej wykorzystywane w tym celu procedury to ekstrakcja ciecz-ciecz, adsorpcja-desorpcja, hydroliza (np. zmydlanie) i precypitacja. Ekstrakcję można przeprowadzać poprzez kompleksowanie analitów, w celu uzyskania różnicy w rozpuszczalności pomiędzy frakcją izolowaną a matrycą. Etap

wzbogacania/oczyszczania jest często wykonywany z wykorzystaniem ekstrakcji do fazy stałej (SPE, ang. Solid Phase Extraction).

W pracy opisano nową procedurę, pozwalającą na oznaczanie WWA w złożonych matrycach tj. frakcje wysokowrzących produktów naftowych (pozostałość próżniowa, asphalt). Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne mogą powstawać podczas procesów produkcji/destylacji wysokowrzących produktów naftowych w wyniku krakingu termicznego. Oznaczanie WWA w produktach naftowych, jak również innych produktach, jest ważne w związku z ich karcinogenną i teratogenną naturą oraz wszechobecnością w środowisku, związaną z emisją pyłów, spalania paliw i innych rodzajów zanieczyszczeń. Problem oznaczania WWA na niskim poziomie stężeń jest coraz bardziej znaczący z uwagi na ostatnie ograniczenia prawne dotyczące maksymalnej dopuszczalnej zawartości WWA w różnych produktach. Przykładowo, w 2006 roku NIOSH przyjął limit zawartości wynoszący 10 ug/kg dla WWA i 1 ug/kg dla benzo [a] pirenu w produktach technicznych.

Główny problem stanowi oznaczanie zawartości WWA na niskich lub śladowych poziomach stężeń w skomplikowanych matrycach zawierających WWA podstawione grupami alifatycznymi i alicyklicznymi.

Standardowa metoda oznaczania zawartości frakcji policyklicznych związków aromatycznych, w tym WWA, została opisana przez Institute of Petroleum w normie IP346, która jest szeroko stosowana na całym świecie [2]. Procedura opiera się na oznaczaniu grawimetrycznym frakcji rozpuszczalnej w sulfotlenku dimetylowym (DMSO) w temperaturze pokojowej. Tym niemniej procedura nie jest dostatecznie selektywna do efektywnego przygotowania próbki produktów naftowych w celu oznaczania śladowych zawartości WWA, ponieważ przygotowany ekstrakt zawiera zbyt wiele węglowodórów aromatycznych.

Literatura fachowa opisuje wykorzystanie w celu przygotowania próbki chromatografii wykluczania (SEC). To podejście pozwala na izolację frakcji o określonym zakresie masy molekularnej. SEC znalazła wiele zastosowań w przygotowaniu próbki do oznaczania wielu niskomolekularnych zanieczyszczeń, tj. pestycydy, pozostałości leków i WWA w żywności, produktach naftowych, próbkach środowiskowych i wielu innych matrycach [3-5]. Nerin i Domeño stosowali chromatografię żelową podczas etapu przygotowania próbki do oznaczania zawartości WWA w przemysłowych olejach odpadowych [6]. Wyizolowana frakcja nadal zawierała jednak lipidy o niskich masach cząsteczkowych.

Technika ekstrakcji do fazy stałej (SPE, ang. Solid Phase Extraction) jest szeroko wykorzystywana w przygotowaniu próbki do oznaczania WWA, szczególnie w wodzie pitnej [7-9]. Technika SPE znalazła również zastosowanie przy oznaczaniu WWA w smole koksowniczej, co opisano w polskiej normie PN-C-82056 [10]. Wykorzystuje się szklaną kolumnę wypełnioną aktywowanym tlenkiem glinu oraz żelazem krzemionkowym, a do elucji frakcji zawierającej WWA stosuje się benzen. Alternatywnie stosuje się procedury, w których fazę stacjonarną stanowi Florisil lub Sphadex LH-20 i odpowiednio benzen lub metanol jako eluent. Nerin and Domeño używali pakowanych ko-

lumn szklanych wypełnionych tlenkiem glinu oraz mieszaniny heksanu i dichlorometanu (95:5 v/v) jako eluentu, w celu oczyszczenia frakcji uzyskanej z chromatografii wykluczania [6]. Tym niemniej metody wykorzystujące adsorpcję w sposób „klasyczny”, ze szklanymi kolumnami o niskiej sprawności są żmudne, czasochłonne oraz charakteryzują się niską dokładnością i precyzją. Również wysokie zużycie toksycznych rozpuszczalników oraz wymagane każdorazowe wypełnianie kolumn porcją aktywowanego sorbentu stanowi o minusach tych metod.

W literaturze technicznej istnieją także procedury przygotowania próbki oparte na zastosowaniu techniki SPE do wyodrębnienia grupy WWA z ropy naftowej. Proponuje się zastosowanie Florisilu, jako fazy stacjonarnej i heksanu jako eluentu [11]. Technika SPE z zastosowaniem mikrokolumnek ma wiele zalet, do najistotniejszych należą: znaczne zredukowanie ilości używanych rozpuszczalników, prostota wykonania, a także łatwość automatyzacji (połączenie *on-line* z HPLC lub GC). Jednakże w przypadku próbek o skomplikowanej matrycy pojawia się problem niskiego stopnia odzysku analitów oraz małej powtarzalności rezultatów, wywołane nieselektywną oraz niecałkowitą desorpcją. Niska sprawność kolumnek SPE powoduje nakładanie się frakcji składników przeszkadzających w analizie na frakcję analitów, szczególnie w przypadku bardzo złożonej matrycy.

Wady kolumnek SPE oraz klasycznych kolumn szklanych nasuwają wniosek, że techniką potencjalnie zdolną do zapewnienia zadowalającego stopnia rozdzielania grupowego skomplikowanych mieszanin może być technika wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz normalnych (NP-HPLC). Fazy stacjonarne w układach faz normalnych stosowanych w wysokosprawnej chromatografii cieczowej (NP-HPLC) do rozdzielania grupowego produktów naftowych to przede wszystkim: żel krzemionkowy, tlenek glinu [12-14], mieszanina żelu krzemionkowego [13] i tlenku glinu [14], Florisil [15] i fazy związane, takie jak: żel krzemionkowy modyfikowany grupami cyjanopropylowymi (CN) [16], aminopropylowymi (NH<sub>2</sub>) [17] i okadecylowymi (C18) [18].

Saravanabhavan i wsp. zaproponowali metodykę przygotowania próbki do jednoczesnego oznaczenia niepodstawionych i podstawionych łańcuchami alkilowymi WWA w „ciężkich” olejach napędowych (o temperaturze wrzenia 287-481°C). Pierwszym etapem analizy była precypitacja parafiny, a następnie podzielenie pozostałej frakcji na 5 grup z wykorzystaniem techniki adsorpcyjnej chromatografii cieczowej w układzie faz normalnych. Poszczególne grupy węglowodorów aromatycznych oznaczano następnie z wykorzystaniem techniki chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych (19). Na początku lat 80. Wise i wsp. (20-21) zaproponowali wykorzystanie HPLC w układzie faz normalnych na etapie przygotowania próbki do oznaczania śladowych zawartości WWA w omułkach.

Zastosowanie techniki NP-HPLC podczas drugiego etapu przygotowania próbki powinno zapewnić dobrą powtarzalność wyników, możliwość zastosowania przepływu zwrotnego eluentu w kolumnie chromatograficznej oraz możliwość monitowania procesu chromatograficznego z pomocą detektora.

Nasze badania wstępne wykazały brak w normach i w literaturze naukowej efektywnych procedur przygotowania próbki do analizy śladowych zawartości WWA w wysokowrzących produktach naftowych. Zastosowanie w tym celu dotychczas opisanych procedur przygotowania próbki do oznaczania WWA okazało się całkowicie nieskuteczne.

W odróżnieniu od efektywnych metod przygotowania próbki, metoda końcowego oznaczania WWA jest stosunkowo dobrze opanowana pod warunkiem, że próbka nie zawiera praktycznie pochodnych alifatycznych i alicyklicznych WWA. Można wtedy zastosować albo metody znormalizowane [7, 9], albo ich modyfikacje, opisane w literaturze naukowej. Obecnie najczęściej stosowanymi technikami są: chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS) lub z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (GC-FID), albo wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją fluorescencyjną (RP-HPLC/FLD). Możliwość jednoczesnej identyfikacji WWA, kosztem jednak wyższej granicy oznaczalności (LOQ), daje zastosowanie detektora UV z matrycą fotodiodową (RP-HPLC/UV-DAD). Rozdzielanie WWA techniką HPLC wykonuje się w warunkach układu faz odwróconych. Fazą stacjonarną jest z reguły oktadekan, związany z żelazem krzemionkowym (średnica ziaren wypełnienia 3  $\mu\text{m}$  albo 5  $\mu\text{m}$ ), natomiast fazą ruchomą mieszaniny acetonitrylu (AcCN) albo metanolu (MeOH) z wodą w różnych proporcjach. Elucję wykonuje się zwykle w sposób gradientowy. Najnowszym rozwiązaniem jest detekcja za pomocą spektrometru mas (LC-MS). W literaturze brakuje jednak danych dotyczących zależności granicy oznaczalności analitów z grupy WWA od warunków przygotowania próbki oraz warunków oznaczania i detekcji. Ten problem będzie przedmiotem kolejnej pracy, będącej obecnie w przygotowaniu.

W konsekwencji opracowano nową, dwuetapową procedurę przygotowania próbki, z wykorzystaniem najpierw - kolumnowej chromatografii wykluczania (GPC/SEC) i kolejno - rozdzielania grupowego z zastosowaniem elucyjnej, kolumnowej chromatografii cieczowej w układzie faz normalnych (NP-HPLC), która jest przedmiotem niniejszej pracy.

## **CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA**

### **Materiały**

Rozpuszczalniki i eluenty wykorzystane w pracy miały czystość odpowiednią do pracy z HPLC. Roztwory wzorcowe sporządzono w oparciu o substancje wzorcowe o czystości powyżej 98%. Próbki asfaltów i produktów z destylacji ropy naftowej wyprodukowane w Grupie LOTOS S.A..

Kolumny chromatograficzne i kolumnki SPE: Kolumny preparatywne 250x25 mm LiChrogel PSMIX, 10  $\mu\text{m}$ , (MERCK, Niemcy), 200x16.8 mm Lichrosorb Si60, 10  $\mu\text{m}$ , (MERCK, Niemcy); Kolumny analityczne 250x4.6 mm Spherisorb PAH, 5  $\mu\text{m}$ , kolumnka typu SPE z wypełnieniem Florisil – 1000 mg (Macherey – Nagel, Niemcy).

### **Aparatura i wyposażenie:**

- Gradientowy chromatograf cieczowy LaChrom (Merck-Hitachi, Niemcy) wyposażony w czterokanałowy system elucji gradientowej z zaworami proporcjonującymi (tzw. gradient niskociśnieniowy), pompę L-6200, zawór dozujący Rheodyne Rh-7725i z pętlą dozującą 100  $\mu$ l, kolumnę chromatograficzną, termostat, detektor UV - DAD 7450A, detektor fluorescencyjny F 1050, oprogramowanie HSM oraz, dodatkowo, w sześciodrogowy dwupołożeniowy zawór V 7226 (Knauer, Niemcy), do zmiany kierunku przepływu fazy ruchomej w kolumnie (backflash);
- Gradientowy chromatograf cieczowy (Merck-Hitachi) wyposażony w czterokanałowy system elucji gradientowej z zaworami proporcjonującymi (tzw. gradient niskociśnieniowy), pompę L-6200, zawór dozujący Rheodyne Rh-7161 z pętlą dozującą 1 ml, kolumnę chromatograficzną, termostat, detektor UV - DAD L-3000, detektor refraktometryczny 1037A, oprogramowanie HSM oraz, dodatkowo, w sześciodrogowy dwupołożeniowy zawór V 7226 (Knauer, Niemcy), do zmiany kierunku przepływu fazy ruchomej w kolumnie (backflash);
- Zestaw do odparowywania nadmiaru rozpuszczalnika w strumieniu azotu, w skład którego wchodzi: butla z gazem obojętnym (N<sub>2</sub>), pokrywa firmy J.T. Baker wykonana z poliamidu wyposażona w igły oraz podłączenie gazu;

### **METODYKA**

#### **Izolacja frakcji (grupy) o niskim zakresie masy cząsteczkowej**

Zastosowano preparatywną kolumnę typu PS MIX (250x25 mm,  $d_p = 10 \mu\text{m}$ ), dichlorometan, jako eluent oraz szeregowo połączone detektory: refraktometryczny i UV - DAD. Granice elucji grupy WWA wyznaczono w oparciu o wartości czasu retencji koronenu i benzenu. Roztwór asfaltu w dichlorometanie zmieszano w stosunku objętościowym 1:1 z roztworem wzorców koronenu i benzenu o stężeniu 0,025 g/ml w dichlorometanie. Rozdzielaniu w warunkach wykluczania poddano roztwór asfaltu z i bez dodatku wzorców benzenu i koronenu. Wszystkie mieszaniny rozdzielano w temperaturze 20°C. Objętościowe natężenie przepływu fazy ruchomej wynosiło 4,5 ml/min, objętość dozowana 550  $\mu$ l. W zakresie elucji koronenu oraz benzenu zbierano niskomolekularną frakcję zawierającą anality z grupy WWA mogące potencjalnie występować w badanym materiale.

#### **Izolacja frakcji (grupy) w zakresie polarnośći WWA techniką wysokosprawną chromatografii cieczowej w układzie faz normalnych (NP-HPLC)**

Frakcję uzyskaną w warunkach wykluczania odparowano do sucha w strumieniu azotu. Suchą pozostałość rozpuszczono w 550  $\mu$ l n-heksanu i poddano analizie z wykorzystaniem techniki wysokosprawnej, adsorpcyjnej chromatografii cieczowej w warunkach układu faz normalnych. Zastosowano preparatywną kolumnę wypełnioną żelom krzemionkowym oraz szeregowo

połączone detektory UV-DAD (długość fali  $\lambda = 254$  nm) i refraktometryczny. Granice elucji analitów z grupy WWA wyznaczono w oparciu o czas elucji koronenu i benzenu. W zakresie elucji początku piku koronenu oraz końca piku benzenu (w czasie 6,5÷8,4 od momentu dozowania) zbierano odpowiednią frakcję. Temperatura: 20°C, eluent: n-heksan. Objętościowe natężenie przepływu fazy ruchomej - 4,5 ml/min, objętość dozowana 500  $\mu$ l. Po czasie 10 min przełączono zawór przepływu zwrotnego (backflush), zapewniając w ten sposób elucję z kolumny wszystkich wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych przed przełączeniem zaworu przepływu zwrotnego i umożliwiono elucję wszystkich wysokopolarnych składników próbki silnie sorbowanych na powierzchni fazy stacjonarnej w warunkach przepływu zwrotnego, w postaci pojedynczego piku.

### **Izolacja frakcji (grupy) w zakresie polarności WWA techniką ekstrakcji do fazy stałej (SPE)**

Frakcję uzyskaną w warunkach chromatografii wykluczania odparowano do sucha w strumieniu azotu. Suchą pozostałość rozpuszczono w 550  $\mu$ l n-heksanu i poddano adsorpcji z zastosowaniem techniki SPE. Etap ten realizowano zgodnie z procedurą opisaną w aplikacji Macherey-Nagel (11). W badaniach zastosowano kolumnienki SPE wypełnione Florisilem (180  $\mu$ l frakcji adsorbowano na 1 g Florisilu). Kolumnienki uprzednio kondycjonowano 20 ml metanolu, suszono, a następnie kondycjonowano 20 ml n-heksanu i ponownie suszono. Anality ze złoża sorbentu eluowano za pomocą 25 ml n-heksanu. Uzyskaną w ten sposób frakcję - po wymianie rozpuszczalnika, z jednoczesnym zatężeniem - poddawano analizie chromatograficznej (punkt II. 2. 4).

### **Rozdzielanie, identyfikacja i oznaczanie zawartości WWA techniką wysokosprawną chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych (RP-HPLC)**

Frakcję wzbogaconą w anality z grupy WWA uzyskaną zgodnie z metodyką przygotowania próbki opisaną w punktach II. 2. 1, II. 2. 2, II. 2. 3 odparowano do sucha w strumieniu azotu. Suchą pozostałość rozpuszczono w 70  $\mu$ l acetonitrylu. W badaniach zastosowano dwa szeregowo połączone detektory: UV-DAD (w zakresie długości fali 220÷450 nm) oraz fluorescencyjny. Długość fali wzbudzenia  $\lambda_{ex}$  wynosiła 275 nm, natomiast długość fali emisji  $\lambda_{em}$  – 375 nm (dla naftalenu, acenaftenu, fluorenu i fenantrenu), a następnie 410 nm (dla pozostałych analitów z grupy WWA). Temperatura: 20°C; objętościowe natężenie przepływu fazy ruchomej: 1 ml/min; objętość dozowana: 50  $\mu$ l. Warunki rozdzielania zamieszczono w tabeli 1.

**Tabela 1.** Warunki rozdzielania zastosowane do końcowego oznaczania WWA

Kolumna chromatograficzna	Eluent / Program elucji
Spherisorb PAH, 5 $\mu$ m, 250x4.6mm i.d.	0-40min ACN:H <sub>2</sub> O=80:20 v/v 40,1-70min ACN

Identyfikacji WWA dokonano na podstawie:

- Porównania czasu retencji odpowiednich pików na chromatogramach z wartością czasu retencji substancji wzorcowych
- Porównania widm w zakresie 220 nm do 450 nm, w tym długości fali maksimum widm poszczególnych pików z widmami wzorców WWA.

Kalibrację zawartości WWA wykonano metodą krzywej kalibracyjnej (external standard method) w oparciu o sygnał detektora UV-DAD oraz fluorescencyjnego. W przypadku kalibracji na podstawie sygnału detektora UV-DAD program długości fali był następujący: 270 nm dla naftalenu, 315 nm - acenaftylen, 265 nm - acenaften i fluoren, 254 nm – fenantren, antracen i fluoranten, 270 nm - piren, 285 nm - benzo(a)antracen i chryzen, 287 nm - benzo(b)fluorantenu, 293 nm - benzo(k)fluorantenu, benzo(a)pirenu, 290 nm - dibenzo(a,h)antracen, indeno(1,2,3-cd)piren, benzo(g,h,i)perylene, benzo(e)piren, benzo(j)fluoranten. Wykonano 5-punktowe krzywe kalibracyjne o stężeniach poszczególnych związków z grupy WWA w zakresie: 50÷1000 ng/ml – dla detektora UV-DAD oraz 0,5÷32,0 ng/ml - dla detektora fluorescencyjnego. Podczas analizy próbek rzeczywistych po zakończeniu elucji analitów z grupy WWA kolumnę przełączano do trybu elucji wstecznej.

#### **Wyznaczenie stopnia odzysku analitów z grupy WWA zawartych w badanych materiałach**

Do roztworu asfaltu drogowego 50/70 o stężeniu 0,05 g/ml w dichlorometanie dodano 10 µl roztworu mieszaniny wzorców WWA o stężeniu 200 µg/ml w dichlorometanie. Następnie próbki przygotowano zgodnie z procedurą przygotowania próbki opisaną w punktach II. 2. 1, II. 2. 2, II. 2. 3. Stopień odzysku wyznaczono z zależności:

$$R = C_{i(kal.)} / C_{i(rzecz.)} \times 100\%$$

gdzie:

$C_{i(kal.)}$  - stężenie i-tego analitu wyznaczone w oparciu o krzywą kalibracyjną,  
 $C_{i(rzecz.)}$  - stężenie rzeczywiste i-tego analitu, który został wprowadzony do analizowanego roztworu.

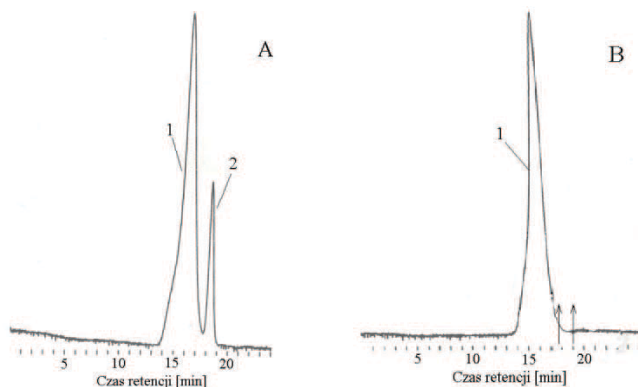
Jako granicę oznaczalności (LOQ) przyjęto stężenie odpowiadające 5-krotności poziomu szumów detektora pomniejszone o wartość stopnia odzysku.

Każdy eksperyment, którego rezultat został zamieszczony w pracy, był wykonywany co najmniej dwukrotnie. Przedstawione wyniki są wartościami średnimi.

## WYNIKI I DYSKUSJA

### Chromatografia wykluczania w skali preparatywnej (P-GPC/P-SEC) jako pierwszy etap przygotowania próbki do analizy śladowych zawartości WWA w materiałach naftowych

W pierwszym etapie przygotowania próbki wykorzystano technikę chromatografii wykluczania w celu selektywnego wydzielenia frakcji, potencjalnie zawierającej WWA i różniącej się masą molekularną od zdecydowanej większości pozostałych składników niskolotnych produktów naftowych. Etap ten umożliwił oczyszczenie próbki ze składników produktów naftowych o wyższych masach cząsteczkowych niż WWA, eluowanych wcześniej niż WWA. Zakres elucji grupy WWA wyznaczono postępując się mieszaniną koronenu oraz benzenu. Koronen posiada masę molekularną nieco wyższą ( $C_{24}H_{12}$ ,  $M = 300\text{Da}$ ) od masy molekularnej związków należących do grupy WWA (dibenzo(a,h)antracen  $C_{22}H_{14}$  posiada najwyższą masę molekularną w obrębie grupy WWA i wynosi ona 278 Da). Natomiast benzen ( $M C_6H_6 = 78\text{ Da}$ ), wyznacza dolną granicę elucji, jego masa molekularna jest niższa od naftalenu ( $M C_{10}H_{28}$ ,  $M = 128\text{ g/mol}$ ). W celu obniżenia granicy oznaczalności WWA powiększono skalę procesu przygotowania próbki poprzez zastosowanie preparatywnej kolumny do chromatografii wykluczania ( $d_c = 25\text{ mm}$ ,  $L_c = 250\text{ mm}$ ,  $d_p = 10\text{ }\mu\text{m}$ ). Zastosowanie chromatografii w skali preparatywnej umożliwiło wyizolowanie w jednym etapie rozdzielania znacznie większych ilości frakcji bogatej w anality z grupy WWA, niż by to było możliwe z zastosowaniem kolumny analitycznej. Na rysunku 1 przedstawiono przykłady chromatogramów obrazujących efekt rozdzielania w warunkach chromatografii wykluczania roztworu asfaltu drogowego 50/70 – Grupa LOTOS S.A. z (rys. 1A) i bez (rys. 2A) dodatku wzorców koronenu i benzenu).



Rysunek 1. Przykład chromatogramów otrzymanych podczas przygotowania próbki asfaltu drogowego 50/70, z dodatkiem (część A) i bez dodatku (część B) roztworu wzorca benzenu i koronenu w warunkach rozdzielania z zastosowaniem preparatywnej kolumny wykluczania. Kolumna: preparatywna PS-MIX o wymiarach 250x25 mm, 10  $\mu\text{m}$ . Eluent: dichlorometan, Objętościowe natężenie przepływu: 4,5 ml/min., Objętość dozowana: 550  $\mu\text{l}$ , Detektor: RID, Oznaczenia: 1 - komponenty asfaltu, 2 - benzen+koronen; strzałkami zaznaczono zakres zbierania frakcji zawierającej WWA



Na podstawie rys. 1 można stwierdzić, że w tym etapie przygotowania próbki wyizolowana frakcja bogata w anality z grupy WWA została pozbawiona zasadniczej części wysokomolekularnych składników asfaltu. Komponenty wyizolowane w tym etapie przygotowania próbki to WWA, inne węglowodory oraz substancje organiczne zawierające różnego rodzaju podstawniki o masach molekularnych zbliżonych do WWA.

Podczas pierwszego etapu przygotowania próbki do analizy śladowych zawartości WWA wykorzystano jako fazę stacjonarną kopolimer styren - diwinylobenzen o ściśle określonym zakresie wielkości porów – od 50 do 50000 Å.

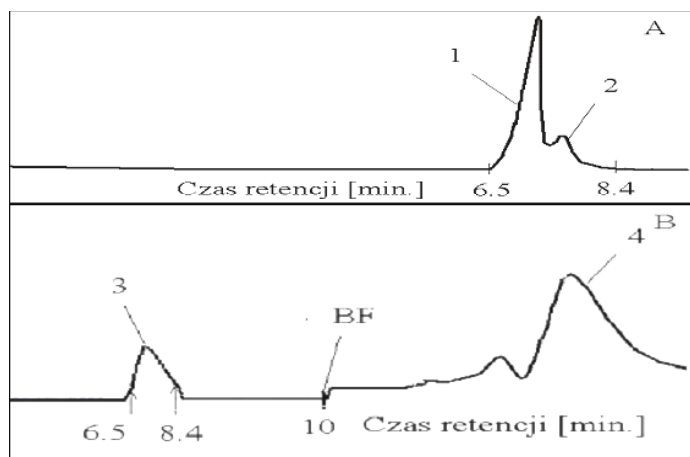
Ze względu na znaczny koszt preparatywnej kolumny chromatograficznej z wypełnieniem styren - diwinylobenzen podjęto próbę zastąpienia tej fazy stacjonarnej tradycyjnymi fazami stacjonarnymi dla układu faz normalnych, bądź odwróconych. Aby wyeliminować oddziaływania sorpcyjne i zapewnić mechanizm wykluczania, dla każdej ze stosowanych kolumn wykorzystano fazy ruchome o bardzo wysokich siłach elucyjnych. Zbadano możliwość zastosowania do przygotowania próbki faz stacjonarnych: CN, DIOL, NH<sub>2</sub> z polarnymi fazami ruchomymi, takimi jak: dichlorometan: metanol 1:1, tetrahydrofuran:metanol 7:3 oraz fazę stacjonarną typu C18 z niepolarną fazą ruchomą, taką jak *n*-heksan. Badania wykonano w skali kolumn analitycznych. Na podstawie tych badań można stwierdzić, że mimo zastosowania eluentu o wysokiej sile elucyjnej nie udało się wyeliminować oddziaływań sorpcyjnych między fazą stacjonarną stosowaną w warunkach NP a polarnymi, niskocząsteczkowymi komponentami badanych materiałów oraz analogicznie między fazą stacjonarną stosowaną w warunkach RP a niepolarnymi komponentami badanych materiałów. W obu wariantach (fazy stacjonarne typu NP oraz RP) podobną jak benzen i korony objętością elucji charakteryzowała się duża część wyżej molekularnych składników badanych materiałów. Świadczy to o mieszanym mechanizmie rozdzielania, mimo stosowania eluentów o wysokich siłach elucji. Konieczne jest więc zastosowanie kopolimeru styren – diwinylobenzen, jako fazy stacjonarnej do przygotowania próbki w warunkach wykluczania.

### **Adsorpcja w układzie faz normalnych jako kolejny etap przygotowania próbki do analizy śladowych zawartości WWA w materiałach naftowych**

Zastosowanie chromatografii wykluczania jako etapu przygotowania próbki do analizy śladowych zawartości WWA w materiałach technicznych okazało się niewystarczające. We frakcji uzyskanej w warunkach chromatografii wykluczania znajdowała się ogromna ilość substancji o masie zbliżonej do masy WWA, i o podobnej albo wyższej polarności. To uniemożliwia wykonanie oznaczenia końcowego z zastosowaniem RP-HPLC. Do dalszego oczyszczania próbki wykorzystano adsorpcję. Potencjalnie możliwe jest również zastosowanie techniki ekstrakcji do fazy stałej (SPE), albo w warunkach układu faz odwróconych, albo w warunkach układu faz normalnych (rozdzielania grupowe pod względem polarności grup funkcyjnych). W przypadku bardzo skomplikowanego składu pozostałej jeszcze we frakcji uzyskanej w warunkach wykluczania matrycy analitycznej lepszym rozwiązaniem wydaje się

zastosowanie techniki kolumnowej chromatografii cieczowej niż SPE. Jest to rozwiązanie bardziej kosztowne i trudniejsze do automatyzacji, jednak zapewnia wyższą selektywność rozdzielania i znacznie lepszą powtarzalność rezultatów. Dodatkowo, dzięki stosowaniu detektora (refraktometr, fluorescencyjny, UV) istnieje możliwość precyzyjnego wyznaczenia zakresu elucji interesującej frakcji. Zastosowanie, natomiast kolumny semipreparatywnej albo preparatywnej zapewnia możliwość obniżenia granicy oznaczalności.

Na rysunku 2 przedstawiono przykład typowego chromatogramu oczyszczania frakcji asfaltu 50/70 bogatej w WWA uzyskanej w warunkach wykluczania i rozdzielania w kolejnym etapie przygotowania próbki, z wykorzystaniem adsorpcji w warunkach układu faz normalnych.



Rysunek 2. Przykład chromatogramów otrzymanych podczas II etapu przygotowania próbki z zastosowaniem techniki NP-HPLC w skali preparatywnej dla roztworu wzorców benzenu i koronenu (część A) oraz dla frakcji asfaltu 50/70, uzyskanej w warunkach chromatografii wykluczania (część B). Kolumna: preparatywna o wymiarach 200 x 16,8 mm, 10  $\mu$ m, wypełniona żelom krzemionkowym Si60. Eluent: *n*-heksan, Objętościowe natężenie przepływu: 4,5 ml/min, Objętość dozowana: 500  $\mu$ l, Detektor: UV 254 nm, Oznaczenia: 1 - benzen, 2 - koronen, 3, 4 - komponenty produktów naftowych, odpowiednio niżej i wyżej polarne, BF - punkt przełączenia zaworu przepływu zwrotnego eluentu w kolumnie, strzałkami zaznaczono zakres zbierania frakcji

Jak widać z rys. 2B, we frakcjach uzyskanych w warunkach chromatografii wykluczania znajduje się znaczna ilość polarnych substancji o niskich masach molekularnych, które byłyby eluowane z większym albo znacznie większym czasem retencji, z powodu wyższych energii oddziaływań z powierzchnią fazy stacjonarnej, a dzięki zastosowaniu przepływu zwrotnego są eluowane w postaci pojedynczego piksu o czasie dwukrotnie wyższym od punktu backflushu. Substancje te mogą także zostać wyluowane z kolumny chromatograficznej w warunkach elucji skokowej z zastosowaniem fazy ruchomej o wyższej od *n*-heksanu sile elucyjnej. W przypadku zastosowania elucji skokowej należy liczyć się ze znaczną czasochłonnością etapu rekondycjonowania aktywności sorpcyjnej kolumny chromatograficznej w warunkach

układu NP, tj. doprowadzenia powierzchni sorpcyjnej do stanu równowagi z rozpuszczalnikiem o niskiej sile elucyjnej. W konsekwencji zastosowanie przepływu zwrotnego eluentu w kolumnie chromatograficznej okazało się postępowaniem znacznie korzystniejszym, tym bardziej że znaczną część eluentu można zawrócić. Możliwe jest też zwiększenie natężenia przepływu eluentu w okresie trwania przepływu zwrotnego, co umożliwi skrócenie czasu elucji zwrotnej. Należy dodać, że stosowanie przepływu zwrotnego jest skuteczne tylko w przypadku zastosowania bardzo dobrze wypełnionych stabilnych kolumn chromatograficznych HPLC.

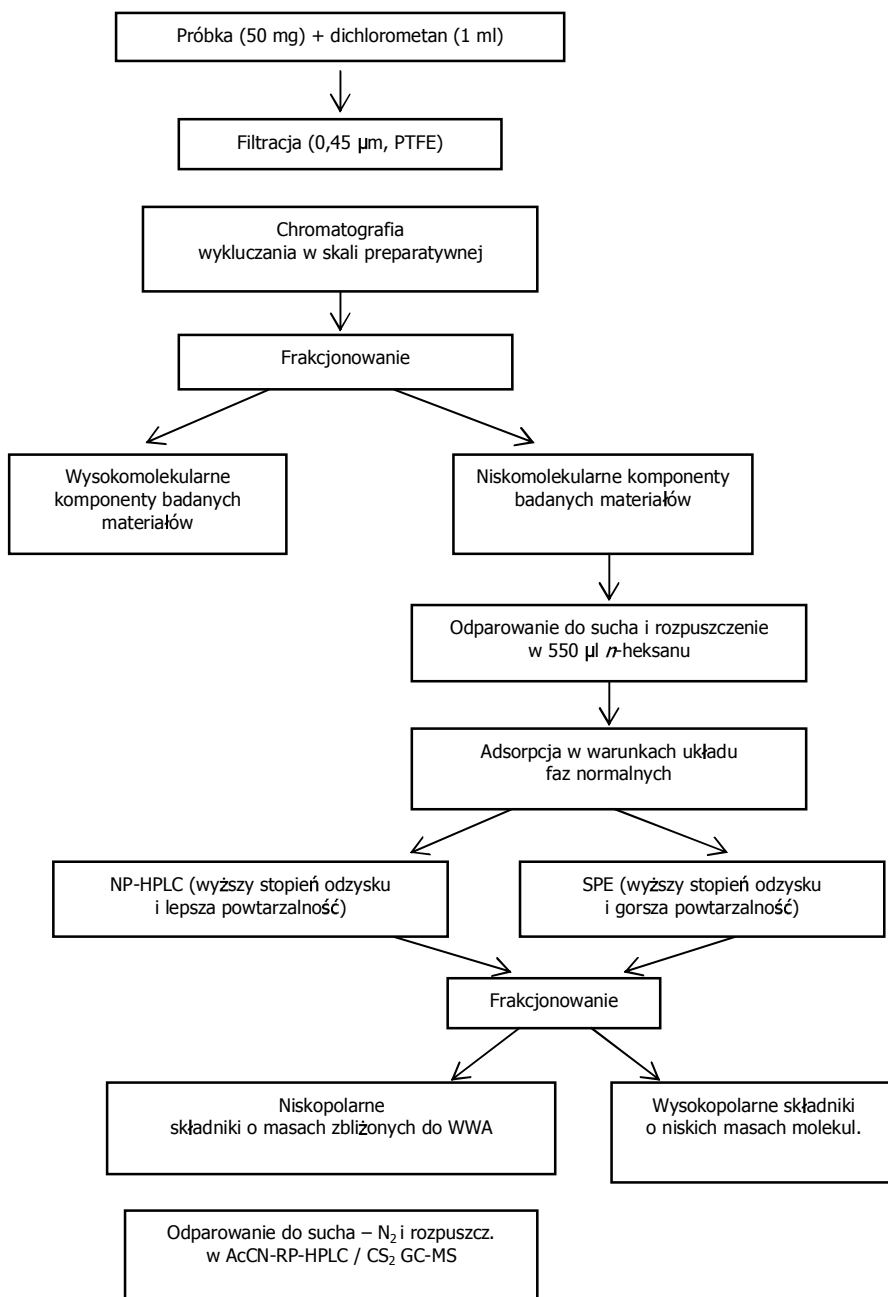
W tabeli 2 zestawiono wartości stopni odzysku analitów z grupy WWA uzyskane przy zastosowaniu opisanej w tej pracy dwuetapowej procedury przygotowania próbki, z zastosowaniem chromatografii wykluczania - w pierwszym etapie oraz kolejno adsorpcji w warunkach układu faz normalnych - w drugim etapie, realizowanego techniką NP-HPLC lub SPE.

Na podstawie danych zawartych w tabeli 2 widać, że z zastosowaniem chromatografii wykluczania - w pierwszym etapie oraz adsorpcji w warunkach układu faz normalnych - w drugim etapie, z wykorzystaniem wysokosprawnych kolumn chromatograficznych uzyskuje się zadowalające, przekraczające 80% wartości stopnia odzysku (za wyjątkiem składników lotnych, tzn. naftalenu, acenaftenu, acenaftyleny i fluoreny).

**Tabela 2.** Zestawienie wartości stopni odzysku (R) analitów z grupy WWA

Analityt	Techniki stosowane podczas przygotowania próbki			
	I etap / II etap GPC/NP-HPLC		I etap / II etap GPC/NP-SPE	
	R [%] n=3	RSD [%]	R [%] n=3	RSD [%]
naftalen	?	?	?	?
acenaften	?	?	?	?
acenaftylen	?	?	?	?
fluoren	58	2,0	11	5,0
fenantren	85	3,6	12	7,3
antracen	96	3,3	15	4,0
fluoranten	87	2,8	22	4,2
piren	94	3,1	46,6	9,6
benzo(a)antracen	100	5,0	42	7,1
chryzen	100	3,9	38	4,3
benzo(j)fluoranten	92	2,5	52	7,0
benzo(e)piren	98	2,7	37	9,4
benzo(b)fluoranten	100	3,4	56	4,1
benzo(k)fluoranten	94	2,8	57	7,1
benzo(a)piren	100	4,1	66	4,7
dibenzo(a,h)antracen	100	3,9	46	10,2
indeno(1,2,3-cd)piren	91	3,0	48	9,7
benzo(g,h,i)perylene	100	3,5	39	5,1

? – W związku ze znaczną lotnością tych WWA (sublimacja), wartości stopni odzysku tych analitów, najczęściej nieobecnych w badanych materiałach, są niskie – na poziomie od 7-25 %, zależnie od warunków zastosowanych podczas odparowywania poprzedniego eluentu; Wykonanie rzetelnego oznaczenia tych analitów wymaga zastosowania metody dodatku wzorca.



Rysunek 3. Schemat procedury przygotowania próbki do oznaczania WWA w materiałach technicznych zaproponowany w niniejszej pracy

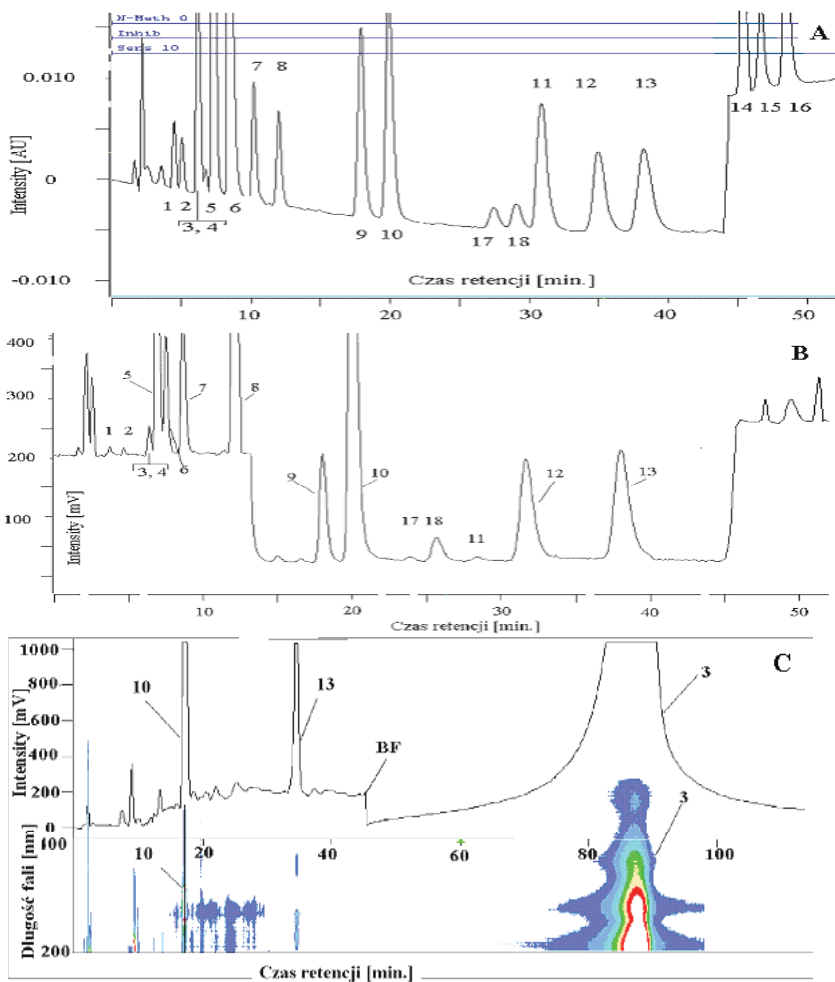
Zastosowanie NP-HPLC w drugim etapie przygotowania próbki prowadzi do znacznie wyższych wartości stopni odzysku. Niższe wartości stopni odzysku analitów z grupy WWA uzyskane podczas realizacji adsorpcji techniką SPE spowodowane są najprawdopodobniej niższą sprawnością kolumnienek SPE w stosunku do kolumn chromatograficznych i nakładaniem się frakcji analitów na frakcje składników bardziej polarnych. Ograniczeniem zaprezentowanej metodyki jest brak możliwości oznaczania lotnych węglowodorów - naftalenu, acenaftenu i acenaftyenu. Wynika to z konieczności wykonywania wymiany rozpuszczalnika po każdym etapie przygotowania próbki. Na rys. 3 zamieszczono blokowy schemat 2-etapowej procedury przygotowania próbki do oznaczania śladowych zawartości WWA w materiałach technicznych, opisanej w niniejszej pracy.

### **Wyniki końcowego oznaczenia zawartości WWA techniką RP-HPLC**

Oznaczenia końcowego WWA dokonano, posługując się zmodyfikowaną procedurą opisaną w normie PN-EN ISO 17993 [7]. Celem modyfikacji było rozszerzenie zakresu zastosowań procedury opisanej w normie o dodatkowe 2 węglowodory – benzo(j)fluoranten oraz benzo(e)piren, których dopuszczalny poziom stężeń w materiałach technicznych jest również limitowany przepisami prawnymi. Dodatkowym argumentem dla stosowania warunków elucji skokowej było dążenie do maksymalizacji powtarzalności wartości czasu retencji, który w przypadku stosowania detektora fluorescencyjnego jest parametrem identyfikacyjnym. Powtarzalność czasu retencji jest wyższa w warunkach elucji skokowej niż gradientowej, co wynika z ciągle jeszcze niedoskonałej synchronizacji cyklicznej pracy zaworów proporcjonujących pomp, w aparatach HPLC z tzw. niskociśnieniowym systemem gradientowym. Optymalizacji poddano typ fazy stacjonarnej, skład fazy ruchomej oraz program elucji. Najkorzystniejsze okazało się zastosowanie wypełnienia Spherisorb PAH oraz elucji skokowej z mieszanką acetonitrylu i wody, jako fazy ruchomej. Granice oznaczalności, uzyskane w warunkach badań tej pracy z zastosowaniem detektora fluorescencyjnego albo detektora UV-DAD, przedstawiono w tabeli 3.

**Tabela 3.** Zestawienie granic oznaczalności analitów z grupy WWA w asfalcie

<b>Analit</b>	<b>RP-HPLC-UV-DAD [ppb]</b>	<b>RP-HPLC-FLD [ppb]</b>
Fluoren	18,82	2,12
Fenantren	4,17	0,09
Antracen	2,08	0,22
Fluoranten	21,84	0,20
Piren	13,83	0,05
Benzo(a)antracen	8,00	0,23
Chryzen	6,00	0,04
Benzo(j)fluoranten	38,04	7,05
Benzo(e)piren	53,06	1,03
Benzo(b)fluoranten	34,31	7,31
Benzo(k)fluoranten	32,98	0,27
Benzo(a)piren	33,00	0,23
Dibenzo(a,h)antracen	24,75	1,32
Indeno(1,2,3-cd)piren	37,36	0,89
Benzo(g,h,i)perylene	51,96	10,02



Rysunek 4. Chromatogramy detektora UV-DAD z programowaniem długości fali (część A) i detektora fluorescencyjnego, (część B) otrzymane podczas rozdzielania 18 wzorców WWA (A) i (B) oraz podczas oznaczania frakcji zawierającej WWA otrzymanej dla asfaltu drogowego 50/70, zgodnie z procedurą przygotowania próbki opisaną w pracy (część C); Warunki rozdzielania w tabeli 1. Warunki detekcji – patrz „Metodyka”; Piki chromatograficzne: 1 - naftalen, 2 - acenaftylen, 3 - acenaften, 4 - fluoren, 5 - fenantren, 6 - antracen, 7 - fluoranten, 8 - piren, 9 - benzo(a)antracen, 10 - chryzen, 11 - benzo(b)fluoranten, 12 - benzo(k)fluoranten, 13 - benzo(a)piren, 14 - dibenzo(a,h)antracen, 15 - indeno(1,2,3-cd)piren, 16 - benzo(g,h,i)perylene, 17 - benzo(j)fluoranten, 18 - benzo(e)piren, 19 - wysokopolarne składniki asfaltu 50/70 eluowane w przepływie zwrotnym, BF - punkt przełączenia zaworu przepływu zwrotnego eluentu w kolumnie.

## WNIOSKI KOŃCOWE

Praca prezentuje metodykę przygotowania próbek niskolotnych produktów naftowych, szczególnie pochodzących z destylacji próżniowej, do oznaczania śladowych zawartości WWA.

Stosowanie techniki chromatografii wykluczania z zastosowaniem kolumny HPLC w skali preparatywnej jako I etapu przygotowania próbki do analizy śladowych zawartości WWA w produktach naftowych jest konieczne, ale niewystarczające.

Zastosowanie, dodatkowo, etapu adsorpcji w warunkach układu faz normalnych w drugim etapie przygotowania próbki zapewnia możliwość oznaczenia bardzo niskich zawartości WWA z dobrym i powtarzalnym stopniem odzysku.

Badania wykazały, że podczas pierwszego etapu przygotowania próbki nie ma możliwości zastąpienia wypełnienia w postaci kopolimeru styren – diwinylobenzen, tradycyjnymi fazami stacjonarnymi, stosowanymi w warunkach NP lub RP.

Korzyści wynikające z zastosowania techniki NP-HPLC podczas drugiego etapu przygotowania próbki to:

- wysoka sprawność i dobra powtarzalność sprawności i selektywności kolumn chromatograficznych (znacznie lepsza niż kolumniek SPE);
- możliwość monitorowania przy użyciu detektora (refraktometr, detektor UV albo fluorescencyjny) zakresu zbierania frakcji;
- możliwość zastosowania przepływu zwrotnego eluentu w kolumnie chromatograficznej do elucji składników wysoko polarnych, co zapewnia skrócenie czasu trwania analizy i zachowanie stałej aktywności sorpcyjnej kolumny;
- wyższy stopień odzysku analitów z grupy WWA i niższe wartości RSD.

W celu obniżenia granicy oznaczalności podczas obu etapów przygotowania próbki celowe jest powiększenie skali przygotowania próbki poprzez zastosowanie techniki preparatywnej chromatografii cieczowej (PLC).

Końcowe oznaczenie WWA dokonano techniką RP-HPLC z detekcją UV-DAD oraz fluorescencyjną.

## LITERATURA

1. Moret S., Conte L.S.: *J. Chromatogr. A* 2000, 882, 245-253.
2. Standard IP 346/92, Determination of polycyclic aromatics in unused lubricating base oils and asphaltene free petroleum fractions - Dimethyl sulphoxide extraction refractive index method.
3. Furusawa N., Ozaki A., Nakamura M., Morita Y., Okazaki K.: *J. Chromatogr. A* 1999, 830, 473-476.
4. Rimkus G.R., Rummler M., Nausch I.: *J. Chromatogr. A* 1996, 737, 9-14.

5. Venkatesan M.I., Northrup T., Phillip Ch.R.: *J. Chromatogr. A* 2002, 942, 223-230.
6. Nerin C., Domeno C.: *The Analyst* 1999, 124, 67-70.
7. Polish standard PN-EN ISO 17993 "Jakość wody. Oznaczanie 15 Wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) w wodzie metodą HPLC z detekcją fluorescencyjną po ekstrakcji ciecz-ciecz" (Water quality. Determination of 15 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in water using HPLC with fluorimetric detection following liquid-liquid extraction).
8. Chen Y., Zhu L., Zhou R.: *J. Hazard. Mater.* 2007, 141, 148-155.
9. Pillai I., Ritchie L., Heywood R., Wilson G., Pahlavanpour B., Setford S., Saini S.: *J. Chromatogr. A* 2005, 1064, 205-212.
10. Polish standard PN-C-82056: 2000, Produkty węglowodórne – Oznaczanie zawartości wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) w smole koksowniczej metodą cieczowej chromatografii kolumnowej (Coal derived products – Determination of the content of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in high-temperature tar by column liquid chromatography).
11. Macherey – Nagel, SPE Application Guide, Germany 2006.
12. Snyder L.R.: *Anal. Chem.* 1961, 33, 1527-1532.
13. Lancas F.M., Carniho E., Deane G.H.N., Camilo M.C.F.: *HRC* 1989, 12, 368-395.
14. Rashid H.A., Fakhn N.A., Dekran S.B., Abdulla N.I.: *Fuel Sci. Technol. Int.* 1989, 7, 281-289.
15. Aceves M., Grimalt J., Albaiges J., Broto F., Comellas L.: Gassiot M., *J. Chromatogr.* 1988, 436, 503-515.
16. Baumeister W., Zens B., Viene O., Fresenius Z.: *Anal. Chem.* 1989, 333, 710-718.
17. Karlesky L., Rollie M.E., Warner M.: *Anal. Chem.* 1989, 58, 1187- 1193.
18. Obuchi A., Aoyama H., Obuchi H.: *J. Chromatogr.* 1984, 312, 247-258.
19. Saravanabhavan G., Helferty A., Hodson P.V., Brown R.S.: *J. Chromatogr. A* 2007, 1156, 124-133.
20. Wise S.A., Chesler S.N., Hertz H.S., May W.E., Guenther F.R., Hilpert L.R.: *Analytical Techniques for Sample Preparation* (1980) 41.
21. Wise S.A., Chesler S.N., Hertz H.S., Hilpert L.R., May W.E., Parris R.M.: *Anal. Chem.*, 52 (1980) 1828.