

Politechnika Gdańska
Wydział Chemiczny
Katedra Chemii Analitycznej

Rozprawa doktorska

**OPRACOWYWANIE I PORÓWNANIE CHROMATOGRAFICZNYCH
METODYK OZNACZANIA KRÓTKOŁAŃCUCHOWYCH KWASÓW
ALKANOMONOKARBOKSYLOWYCH W PRÓBKACH
WODNYCH I STAŁYCH**

mgr inż. Anna Banel

Promotor: Prof. dr hab. inż. Bogdan Zygmunt

Gdańsk 2010

Dziękuję

PANU PROF. BOGDANOWI ZYGMUNTOWI
za interesujący temat pracy, wszelkie rady, zarówno merytoryczne, techniczne jak i życiowe,
za wszechstronną pomoc oraz za cierpliwość i zaufanie jakim mnie obdarzył,
a także za porady oraz sugestie, dzięki którym powstała niniejsza praca;

PANU PROF. JACKOWI NAMIEŚNIKOWI
za wszelką pomoc, współpracę i okazaną życzliwość,

KOLEŻANKOM I KOLEGOM Z KATEDRY CHEMII ANALITYCZNEJ,
w szczególności z pokoju 235, za duchowe wsparcie i stworzenie miłej atmosfery pracy;

MINISTERSTWU NAUKI I SZKOLNICTWA WYŻSZEGO
za wsparcie finansowe w realizacji badań;

RODZINIE I PRZYJACIŁOM
za wieloletnie wsparcie i nieustającą wiarę w moje możliwości.

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW I AKRONIMÓW	5
WSTĘP	8
I CZĘŚĆ TEORETYCZNA	10
1. Charakterystyka krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksyłowych	10
1.1. Oczyszczalnie ścieków komunalnych	13
1.2. Składowiska odpadów komunalnych	17
1.3. Farma zwierząt	20
2. Problemy analityki związków z grupy KKA w próbkach wodnych i stałych	24
2.1. Pobieranie i przechowywanie próbek	25
2.2. Przygotowania próbek wodnych do analizy	25
2.3. Derywatywacja analitów	34
2.4. Techniki analityczne wykorzystywane na etapie oznaczeń końcowych	37
2.4.1. Kolumny chromatograficzne	38
2.4.2. Detekcja związków z grupy KKA	40
3. Podsumowanie	47
II CEL PRACY	48
III CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	49
1. Odczynniki i wzorce	49
2. Roztwory i próbki wzorcowe	50
3. Aparatura i sprzęt laboratoryjny	50
4. Pobieranie, wstępna obróbka i przechowywanie próbek	52
4.1. Charakterystyka miejsc pobierania próbek	52
4.2. Pobieranie, wstępne przygotowanie i przechowywanie próbek do analizy	63
5. Metodyki oznaczania związków z grupy KKA w próbkach wodnych i stałych	65
5.1. Bezpośrednie dozowanie próbki do chromatografu gazowego	65
5.2. Destylacja	65
5.3. Ekstrakcja do fazy nadpowierzchniowej	65
5.4. Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej z fazy nadpowierzchniowej	67
5.5. Ekstrakcja ciecz- ciecz	67
6. Analiza chromatograficzna	67

7. Wyniki i ich omówienie	69
7.1. Dobór warunków chromatografowania	69
7.1.1. Wybór układu kolumn chromatograficznych	69
7.1.2. Dobór sposobu wprowadzania próbek wodnych do kolumny kapilarnej	74
7.1.3. Dobór temperatury dozownika GC i czasu desorpcji analitów z włókna urządzeniem do SPME	78
7.2. Bezpośrednie wprowadzanie próbek wodnych o dużym ładunku zanieczyszczeń do komory dozownika chromatografu-wzbogacanie destylacyjne	79
7.2.1. Optymalizacja czasu destylacji oraz objętości próbki	80
7.2.2. Wpływ dodatku soli na zawartość związków z grupy KKA	82
7.2.3. Wpływ rodzaju rozpuszczalnika (wody) na wynik analizy	84
7.3. Przygotowanie próbek wodnych do oznaczania analitów z grupy KKA z wykorzystaniem metod ekstrakcyjnych	85
7.3.1. Technika HS	85
7.3.2. Technika HS-SPME	91
7.3.3. Technika LLE	97
8. Wyznaczenie podstawowych parametrów walidacyjnych opracowanych procedur oznaczania wolnych związków z grupy KKA w próbkach wodnych	100
9. Zastosowanie opracowanych procedur do oznaczania związków z grupy KKA w próbkach rzeczywistych	106
9.1. Oczyszczalnia ścieków komunalnych	107
9.2. Składowisko odpadów komunalnych	108
9.3. Farmy zwierząt i składowisko odpadów organicznych w ogrodzie zoologicznym	115
IV WNIOSKI I PODSUMOWANIE	117
V LITERATURA	120
VI STRESZCZENIE	133
VII ABSTRACT	134
VIII DOROBEK NAUKOWY	135
ZAŁĄCZNIKI 1-5	142

WYKAZ SKRÓTÓW I AKRONIMÓW

Akronim / Skrót	Termin angielski	Termin polski
1	2	3
a	-	Współczynnik kierunkowy
b	-	Wyraz wolny
BSTFA	N,O – bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide	N,O-bis(trimetylosililo)trifluoro-acetamid
BZT	Biochemical oxygen demand	Biologiczne zapotrzebowanie na tlen
C1	Formic acid	Kwas mrówkowy
C2	Acetic acid	Kwas octowy
C3	Propionic acid	Kwas propionowy
iC4	Isobutyric acid	Kwas izomasłowy
C4	Butyric acid	Kwas masłowy
iC5	Isovaleric acid	Kwas izowalerianowy
C5	Valeric acid	Kwas walerianowy
C6	Caproic acid	Kwas kapronowy
C7	Enanthic acid	Kwas enantowy
C8	Caprylic acid	Kwas kaprylowy
CAS	Chemical Abstracts Service	Chemiczna baza danych
CAR	Carbowax	-
CE	Capillary electrophoresis	Elektroforeza kapilarna
ChZT	Chemical oxygen demand	Chemiczne zapotrzebowanie na tlen
CI-MS	Chemical Ionization-Mass Spectrometry	Spektrometria mas z jonizacją chemiczną
C/N	C/N ratio	Stosunek zawartości węgla do azotu
CV	Coefficient of variation	Współczynnik zmienności
CW - DVB	Carbowax - Divinylbenzene	Carbowax-Diwinylobenzen
cz.d.a	-	Czysty do analizy
DAI	Direct Aqueous Injection	Bezpośrednie wprowadzanie próbki wodnej do kolumny chromatograficznej
DCMS	Dimethyldichlorosilane	Dimetylochlorosilan
DDE	Diethyl Ether	Eter dietylowy
DI-SPME	Direct - SPME	Bezpośrednia mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej
DNPH	2,4-dinitrophenylhydrazine	2,4-dinitrofenylohydrazyna
DVB	Divinylbenzene	Diwinylobenzen
ECD	Electron Capture Detector	Detektor wychwytu elektronów
EDAN	N-(1-naphthyl)-ethylenediamine	N-(1-naftylo)-etylenodiamina
EDC	N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide	N-(3-dimetyloaminopropilo)-N-etylokarbodiimid
EI - MS	Electron Impact – Mass Spectrometry	Spektrometria mas z jonizacją elektronową
FID	Flame Ionisation Detector	Detektor płomieniowo - jonizacyjny
GC	Gas Chromatography	Chromatografia gazowa
GC-ECD	Gas Chromatography- Electron Capture Detector	Chromatografia gazowa z detektorem wychwytu elektronów
GC-FID	Gas Chromatography - Flame Ionisation Detector	Chromatografia gazowa z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym
GC - MS	Gas Chromatography - Mass Spectrometry	Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas
HDPE	High-density polyethylene	Wysokociśnieniowy glikol polietylenowy

Wykaz skrótów i akronimów *ciąg dalszy*

1	2	3
HPLC-UV	High-Pressure Liquid Chromatography -UV Detector	Wysokosprawna chromatografia cieczowa z detektorem spektrofotometrycznym UV
HS	Headspace	Analiza fazy nadpowierzchniowej
HS-SDME	Head Space Single – Drop Microextraction	Mikroekstrakcja do pojedynczej kropli z fazy nadpowierzchniowej
HS-SPME	Head Space Solid Phase Microextraction	Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej z fazy nadpowierzchniowej
IC	Ion chromatography	Chromatografia jonowa
IS	Internal Standard	Wzorzec wewnętrzny
j.u.	-	Jednostka umowna
K_{fs}	-	Współczynnik podziału analitu między fazę stacjonarną a próbkę
KKA	-	Krótkołańcuchowe kwasy alkanomonokarboksyłowe
LLE	Liquid – Liquid Extraction	Ekstrakcja ciecz-ciecz
LMWAs	Low molecular weight aliphatic acids	Niskocząsteczkowe kwasy alifatyczne
LOD	Limit of Detection	Granica wykrywalności
LOQ	Limit of Quantitation	Granica oznaczalności
LWCAs	Low-weight carboxylic acids	Niskocząsteczkowe kwasy karboksylowe
M	-	Masa cząsteczkowa
MeOH	Methanol	Metanol
MS	Mass Spectrometry	Spektrometria mas
MTBE	Methyl- <i>t</i> -butyl Ether	Eter metylo- <i>tert</i> -butylowy
m/z	Mass/charge ratio	Stosunek masy (m) jonu do jego ładunku (z)
n	-	Ilość niezależnych oznaczeń
N	Nitrogen	Azot
NCI	Negative Chemical Ionization	Ujemna jonizacja chemiczna
NIST	National Institute of Standards and Technology	Narodowy Instytut Standaryzacji i Technologii (USA)
n.p.m.	-	Wysokość bezwzględna oznaczona jako metry nad poziomem morza
NTE	Needle Trap Extraction	Ekstrakcja analitów przy użyciu warstwy sorbenta umieszczonego w igle
O	Olfactometry	Detekcja olfaktometryczna
OWO	Total Organic Carbon	Ogólny węgiel organiczny
P	Phosphor	Fosfor
PA	Polyacrylate	Poliakrylan
PCI	Positive Chemical Ionization	Dodatnia jonizacja chemiczna
PDAM	Pyrenyldiazomethane	Pirenylodiazometan
PDMS	Polydimethylsiloxane	Polidimetylosiloksan
PDMS-CAR	Polydimethylsiloxane- Carboxen	Carboxen-polidimetylosiloksan
PDMS-CAR-DVB	Polydimethylsiloxane- Carboxen- Divinylbenzene	Diwinylobenzen-Carboxen-Polidimetylosiloksan
PDMS-DVB	Polydimethylsiloxane- Divinylbenzene	Diwinylobenzen-Polidimetylosiloksan
PEG	Polyethylene glycol	Glikol polietylenowy
PFB	Pentafluorobenzene	α -2,3,4,5,6 –pentafluorotoluen
PFBBr	Pentafluorobenzyl bromide	Bromek pentafluorobenzylu
PFBHA	o-2,3,4,5,6-pentafluorobenzylhydroxylamine	o-2,3,4,5,6-pentafluorobenzylhydroksyloamina
PFPDE	Pentafluorophenyldiazomethane	1-pentafluorofenyldiazoetan

Wykaz skrótów i akronimów *ciąg dalszy*

1	2	3
pH	-	Wykładnik stężenia jonów wodorowych
pKa	-	Ujemny logarytm dziesiętny ze stałej dysocjacji
PKN	-	Polski Komitet Normalizacyjny
PLOT	Porous Layer Open Tubular	Kolumna kapilarna z fazą stacjonarną w postaci warstwy materiału porowatego
POCh	-	Polskie Odczynniki Chemiczne
ppmv	Parts Per Million by Volume	Część na milion (objętościowo)
PT	Purge and Trap	Wymywanie i wychwytywanie analitów w pułapce sorpcyjnej
PTFE	Polytetrafluoroethylene	Politetrafluoroetylen (teflon)
R	Regression Coefficient	Współczynnik regresji
rpm	Revolutions per minute	Liczba obrotów na minutę
QI	-	Górny poziom wodonośny
QII	-	Dolny poziom wodonośny
QI1	-	Pierwsza warstwa górnego poziomu wodonośnego (przypowierzchniowa)
QI2	-	Druga warstwa górnego poziomu wodonośnego (pośrednia)
QI3	-	Trzecia warstwa górnego poziomu wodonośnego (użytkowa)
S	Standard deviation	Odchylenie standardowe
S_{xy}	-	Szczytkowe odchylenie standardowej funkcji kalibracyjnej
SCAN	Full Spectrum Scanning	Przemiatanie całego widma
SCFAs	Short chain fatty acids	Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe
SDME	Single – Drop Microextraction	Mikroekstrakcja do pojedynczej kropli
SIM	Selected Ion Monitoring	Monitorowanie wybranych jonów
SPE	Solid Phase Extraction	Ekstrakcja do fazy stałej
	Split/splitless	Dozownik z możliwością pracy w układzie z podziałem lub bez podziału strumienia
SPME	Solid Phase Microextraction	Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej
TMS	Trimethylsilyl	Grupa trimetylosililowa
WCOT	Wall-coated open tube	Kolumna kapilarna z filmem fazy stacjonarnej
WP1	-	Górny bieg potoku
WP2	-	Dolny bieg potoku
x	-	Stężenie analitu
y	-	Pole powierzchni piku
y_i	-	Wartość wyznaczona doświadczalnie
Y_i	-	Wartość obliczona na podstawie znalezionej równania regresji
VAAs	Volatile aliphatic acids	Lotne kwasy alifatyczne
VFAs	Volatile fatty acids	Lotne kwasy tłuszczowe
VOAs	Volatile organic acids	Lotne kwasy organiczne
v/v	volume/volume	Ułamek objętościowy
ZU	-	Zakład Utylizacyjny

WSTĘP

Woda odgrywa decydującą rolę w funkcjonowaniu człowieka. Już od zarania dziejów nasi przodkowie poszukiwali terenów, które zapewnią im podstawowe warunki do przeżycia, w tym przede wszystkim z dostępem do wody. Przez wiele wieków światowa populacja ludzi była niewielka, a problem zanieczyszczenia rzek był raczej znikomy w skali obecnych czasów. Zbiorniki wodne wykorzystywały wówczas w sposób wystarczający zdolność tzw. procesu samooczyszczania, czyli naturalną możliwość do likwidacji zanieczyszczeń. Jednak ciągły wzrost liczby ludności oraz zużywanie coraz większej ilości energii i produkcji dóbr konsumpcyjnych, wiąże się z wprowadzeniem do środowiska wielu nieprzyjaznych środowisku i człowiekowi substancji. Zrzuty znacznych ilości zanieczyszczeń bezpośrednio do wód powierzchniowych, spowodowały, że naturalne procesy samooczyszczania nie spełniają w wystarczającym stopniu swej roli. Podstawowym źródłem zanieczyszczeń wód są ścieki pochodzące z miast i przemysłu, spływy powierzchniowe z terenów rolniczo-gospodarczych oraz odcieki ze składowisk odpadów komunalnych. Zanieczyszczenia te wpływają na skład i tym samym na jakość wody. Zatem oddziałują niekorzystnie na organizmy wodne i lądowe, korzystające z tych zasobów.

Poważnym zagadnieniem dotyczącym jakości wody jest dopływ zanieczyszczeń, zawierających duże ilości substancji biogennych [1]. Związki azotu (N) i fosforu (P), jako dobre pożywki dla glonów, powodują, zwłaszcza latem, gwałtowne pogorszenie się jakości wody. Gwałtowny rozwój fitoplanktonu (sinic, okrzemek, zielenic, wiciowców i in.) w zbiorniku wodnym jest znanym zjawiskiem, popularnie zwanym zakwitem wody (zakwitem planktonu) [2]. Ograniczenie dopływu światła słonecznego do głębszych warstw zbiornika wodnego, w wyniku nagromadzenia się dużej masy fitoplanktonu, powoduje zahamowanie procesu fotosyntezy. Obniżające się stężenie tlenu, zużywanego przez bakterie do rozkładu obumierających glonów jest przyczyną ginięcia ryb i innych organizmów wodnych. Woda traci przejrzystość, ma nieprzyjemny zapach siarkowodoru i nie nadaje się do spożycia. Dochodzi, więc do wtórnego zanieczyszczenia środowiska wodnego, spowodowanego dodatkowym ładunkiem związków organicznych i pierwiastków biogennych [3,4].

Proces nadmiernego napływu związków biogennych, zwany eutrofizacją, jest poważnym zagrożeniem jakości wód śródlądowych i przybrzeżnych. Temat ten jest często podejmowany w polityce wodnej Unii Europejskiej i wiele dyrektyw unijnych zawiera

wymóg oceny zjawiska eutrofizacji i wprowadzania działań ochronnych (zabezpieczających) w celu ograniczenia jego wzrostu. Niekorzystne procesy są szczególnie widoczne w rzekach i jeziorach, gdzie dopływ biogenów powoduje szybki wzrost roślin i stopniowe zarastanie zbiornika wodnego. W Rozporządzeniu Ministra Ochrony Środowiska zawarte są odpowiednie wymagania, określające dopuszczalne wartości wskaźników zanieczyszczeń ścieków komunalnych, przemysłowych i gospodarczo-bytowych lub rolnych, a także wód odciekowych ze składowisk odpadów komunalnych. Te wymagania skutkowały koniecznością modernizacji wielu istniejących i działających oczyszczalni ścieków oraz składowisk odpadów [5-8].

Obserwacja i badanie procesów samooczyszczania środowisk wodnych, doprowadziło do opracowania i wprowadzenia wysokoefektywnych rozwiązań w technologii biologicznego oczyszczania ścieków, polegającej na wykorzystaniu mikroorganizmów do usuwania azotu i fosforu. Istotnym czynnikiem w procesie biologicznego usuwania substancji biogenych jest dostępność łatwo przyswajalnego węgla organicznego. Miarą zawartości związków organicznych są dwa ogólnie przyjęte parametry – chemiczne zapotrzebowanie tlenu (ChZT) oraz biologiczne zapotrzebowanie tlenu (BZT). Okazało się, że krótkołańcuchowe kwasy alkanomonokarboksyłowe (KKA), stanowiące część frakcji związków rozpuszczonych, których miarą jest wartość liczbowa parametru ChZT, są podstawowym źródłem węgla dla procesów defosfatacji i pomocniczym dla denitryfikacji. Jednak należy zwrócić uwagę, że wskaźniki te nie rozróżniają indywidualnych zanieczyszczeń chemicznych i nie precyzują ich podatności na biologiczny rozkład [9]. W obecnie stosowanych układach technologicznych biologicznego oczyszczania ścieków, konieczna jest dokładna ocena zawartości związków z grupy KKA już na etapie projektowania oraz w praktyce eksploatacyjnej na etapie kontroli procesu fermentacji wstępnej osadów i ewentualnej analizy źródeł zakłóceń w przebiegu procesu biologicznego usuwania fosforu [9]. Określenie zawartości związków z grupy KKA w ściekach surowych i oczyszczonych, odprowadzanych do środowiska oraz w odciekach ze składowisk odpadów, a także w próbkach wód powierzchniowych i podziemnych powinno być kluczowym parametrem dla oszacowania stanu środowiska i wpływu poszczególnych jednostek tj. zakładów utylizacyjnych oraz farm zwierzęcych na ten stan. Kontrola i oznaczenie stężenia związków z grupy KKA w wielu mediach wodnych i stałych, nabiera coraz większego znaczenia, a wraz z nią rośnie zapotrzebowanie na uniwersalne, selektywne i czułe metodyki analityczne, zapewniające możliwość uzyskania miarodajnych wyników w stosunkowo krótkim czasie.

I CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. Charakterystyka krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksylowych

Krótkołańcuchowe kwasy alkanomonokarboksyłowe są niskocząsteczkowymi kwasami karboksylowymi o właściwościach hydrofilowych. Długość łańcucha związków z grupy KKA według różnych danych literaturowych wynosi od 2 do 5 [9,10], 6 [11], 7 [12-14], 8 [15] atomów węgla w cząsteczce.

Nomenklatura związków z grupy KKA oparta jest najczęściej na nazwach zwyczajowych, które świadczą o pochodzeniu roślinnym tych kwasów. Ogólnie kwasy te w literaturze określa się różnymi terminami i odpowiednio akronimami, na przykład:

- ✓ niskocząsteczkowe kwasy karboksylowe (**LWCAs**) [16],
- ✓ krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (**SCFAs**) [17],
- ✓ niskocząsteczkowe kwasy alifatyczne (**LMWAs**),
- ✓ lotne kwasy alifatyczne (**VAAAs**) [18],
- ✓ lotne kwasy organiczne (**VOAs**) [19],
- ✓ lotne kwasy tłuszczowe (**VFAs**) [10,12-15].

W **Tabeli 1** przedstawiono nomenklaturę, budowę chemiczną oraz wybrane właściwości fizykochemiczne analitów z grupy KKA. Krótkołańcuchowe kwasy alkanomonokarboksyłowe występują w różnych elementach środowiska. Pochodzą zarówno ze źródeł naturalnych jak i antropogenicznych (**Tabela 2**). Praktycznie zawsze występują w ściekach, zawierających materię organiczną. W środowisku rzadko są one obecne w stanie wolnym, najczęściej występują w postaci estrów, soli lub amidów [13]. Związki z grupy KKA powstają w procesach biodegradacji węglowodanów, białek i tłuszczów.

Tabela 2. Podstawowe źródła emisji związków z grupy KKA do środowiska.

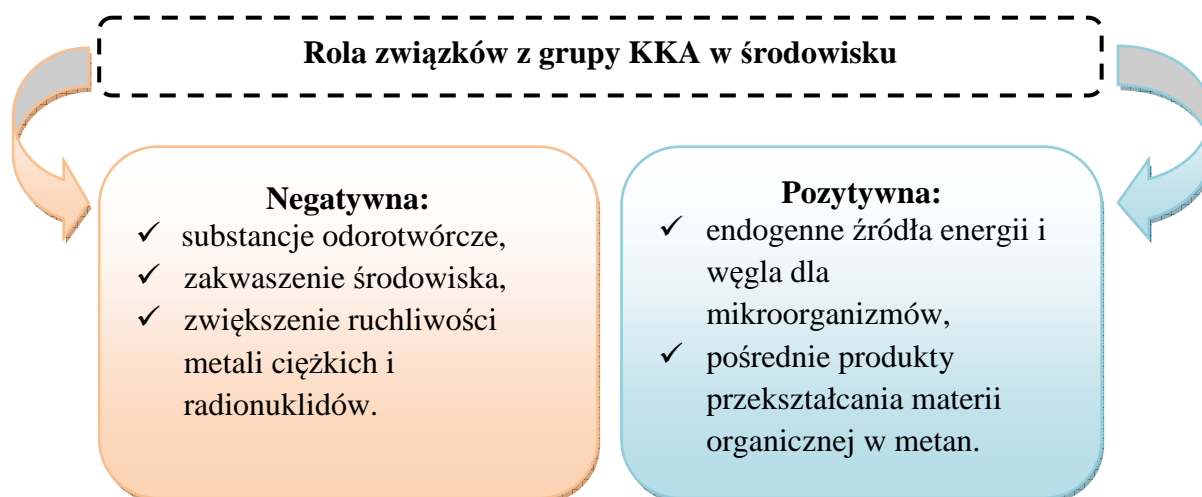
Główne źródła emisji związków z grupy KKA	
NATURALNE	ANTROPOGENICZNE
<ul style="list-style-type: none">▶ procesy biologiczne – związki emitowane przez:<ul style="list-style-type: none">▪ bakterie▪ grzyby▪ rośliny▪ zwierzęta▶ humifikacja biomasy	<ul style="list-style-type: none">▪ ścieki komunalne▪ ścieki z farm zwierząt▪ odcieki ze składowisk odpadów komunalnych▪ osady ściekowe▪ odpady organiczne▪ przetwarzana żywność

Tabela 1. Nomenklatura, budowa chemiczna oraz właściwości fizykochemiczne krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksylowych [15-19].

Związki z grupy KKA								
Nazwa systematyczna zwyczajowa	Wzór chemiczny	Nr CAS	Gęstość [g/L] w 25 ⁰ C	Temperatura wrzenia [⁰ C]	Rozpuszczalność w wodzie [g/L]	pKa w 25 ⁰ C	M [g/mol]	Zapach
Kwas etanowy <i>Kwas octowy</i>	CH ₃ COOH	64-19-7	1049	118	wysoka	4,75	60,1	ostry zapach octu
Kwas propanowy <i>Kwas propionowy</i>	C ₂ H ₅ COOH	79-09-4	993	141	wysoka	4,87	74,1	ostry, zjełczały, drażniący
Kwas 2-metylopropionowy <i>Kwas izomastowy</i>	(CH ₃) ₂ CHCOOH	79-31-2	948	154	210	4,85	88,1	stęchła woń
Kwas butanowy <i>Kwas mastowy</i>	C ₃ H ₇ COOH	107-92-6	964	162	średnia	4,81	88,1	zjełczanego masła, potu
Kwas 3-metylobutanowy <i>Kwas izowalerianowy</i>	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ COOH	503-74-2	925	177	25	4,78	102,1	zjełczanego tłuszczu, sera pleśniowego
Kwas pentanowy <i>Kwas walerianowy</i>	C ₄ H ₉ COOH	109-52-4	938	185	40	4,82	102,1	potu, waleriany
Kwas heksanowy <i>Kwas kapronowy</i>	C ₅ H ₁₁ COOH	142-62-1	927	203	10	4,88	116,2	ostry, cierpki
Kwas heptanowy <i>Kwas enantowy</i>	C ₆ H ₁₃ COOH	111-14-8	918	223	2,6	4,89	130,2	-
Kwas oktanowy <i>Kwas kaprylowy</i>	C ₇ H ₁₅ COOH	124-07-2	910	237	0,7	4,89	144,2	chlewni

Znajomość właściwości krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksylowych daje możliwość przewidywania zachowania się poszczególnych kwasów w środowisku, co dodatkowo może ułatwić opracowanie procedury ich oznaczania. Wartość liczbowa ujemnego logarytmu ze stałej dysocjacji (pK_a) pozwala określić, jaka część związku występuje w formie zdysocjowanej i niezdysocjowanej w danym medium. Gdy wartość pK_a z pH roztworu są porównywalne, to stężenie zdysocjowanej formy związku równe jest stężeniu formy niezdysocjowanej, zwiększenie pH roztworu o 2 jednostki w stosunku do wartości liczbowej pK_a powoduje wzrost udziału formy zdysocjowanej do 99% i odwrotnie zmniejszenie pH roztworu o dwie jednostki poniżej wartości liczbowej pK_a powoduje spadek zdysocjowanej formy do 1% [11, 14]. Zmniejszanie pH próbki wykorzystuje się podczas etapu ekstrakcji, np. ekstrakcji ciecz-ciecz, mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej, etc. Związki z grupy KKA w formie zdysocjowanej są w większości dobrze rozpuszczalne w wodzie, natomiast słabo w rozpuszczalnikach organicznych, niemieszających się z wodą. Poprzez zakwaszenie środowiska, dysocjacja zostaje cofnięta, co ułatwia przeniesienie niezdysocjowanych cząsteczek kwasu do fazy organicznej lub nadpowierzchniowej.

Znajomość właściwości fizykochemicznych związków z grupy KKA pozwala przewidywać rolę jaką spełniają w środowisku oraz w procesach biochemicznych (**Rysunek 1**).



Rysunek 1. *Negatywne i pozytywne aspekty występowania związków z grupy KKA w środowisku.*

Występowanie, rola i znaczenie, jakie związki z grupy KKA spełniają w próbkach ciekłych i stałych w mediach z oczyszczalni ścieków komunalnych, na składowiskach odpadów organicznych oraz ściekach z farm zwierząt zostały krótko opisane w **Podrozdziałach 1.1.; 1.2. i 1.3.**

1.1. Oczyszczalnie ścieków komunalnych

Postępujący proces eutrofizacji wód, związany głównie z obecnością związków azotu i fosforu w ściekach, przyczynił się do rozkwitu technologii biologicznego oczyszczania ścieków metodą osadu czynnego. Związki z grupy KKA stanowią istotny parametr w biologicznym oczyszczaniu ścieków.

W praktyce, oczyszczanie biologiczne prowadzi się po mechanicznym oczyszczaniu ścieków surowych, tzn. wstępnym oczyszczeniu ścieków z zawieszin, większych zanieczyszczeń stałych i tłuszczów, z wykorzystaniem krat, sit, piaskowników oraz różnego typu osadników.

Zasada biologicznego usuwania materii organicznej ze strumienia ścieków polega na naturalnych procesach samooczyszczania.

Najczęstszym sposobem realizacji etapu biologicznego oczyszczania ścieków jest stosowanie komór osadu czynnego. Osad czynny to wodna zawiesina mikroorganizmów, głównie bakterii. Jego dokładany skład zależy od wielu czynników biotycznych i abiotycznych, w tym od charakterystyki dopływających ścieków, warunków panujących w komorze osadu czynnego oraz sposobu prowadzenia procesu [7,8].

Krótkołańcuchowe kwasy alkanomonokarboksyłowe, czyli proste związki organiczne, obecne w ściekach, stanowią endogenne źródło energii i węgla dla mikroorganizmów i warunkują rozwój mikroorganizmów odpowiedzialnych za proces oczyszczania.

Mieszaninę ścieków i osadu poddaje się napowietrzaniu, następnie osad jest oddzielany od ścieków oczyszczonych i zwracany do procesu. Pewna część osadu, nazywana osadem nadmiernym, usuwana jest z procesu w osadnikach wtórnych i traktowana jako odpad [6].

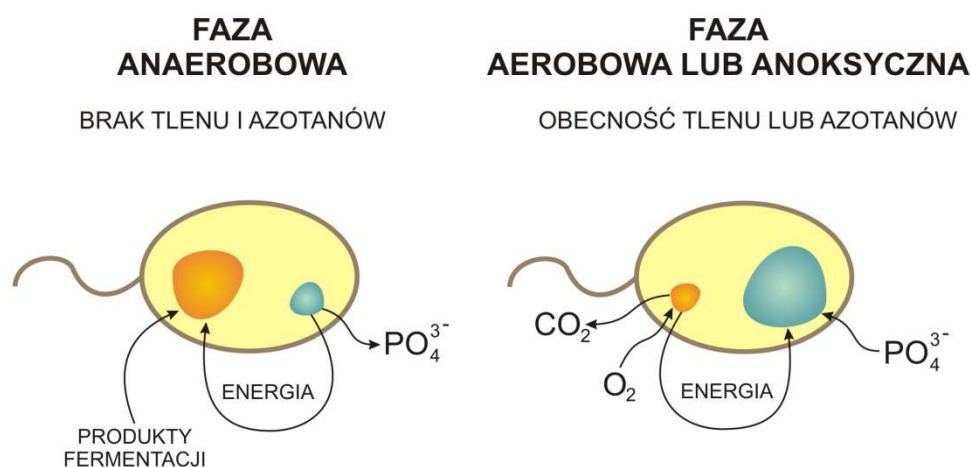
We wszystkich metodach biologicznego oczyszczania ścieków zachodzą następujące procesy:

- **Rozkład substancji organicznych do ditlenku węgla (CO_2), wody (H_2O) i amoniaku (NH_3)**
- **Biologiczne usuwanie związków fosforu ze ścieków**

Zasada biologicznego usuwania fosforu ze ścieków oparta jest na wykorzystaniu bakterii z grupy *Acinetobacter* (**Rysunek 2**), które potrafią gromadzić w organizmie nadmierne ilości fosforu [7,8]. Istotą metody jest podawanie osadu czynnego naprzemiennie warunkom beztlenowym i tlenowym. W komorze beztlenowej bakterie pobierają produkty fermentacji, głównie związki z grupy KKA i ich sole. W strefie tej bakterie uwalniają do otoczenia fosfor w postaci ortofosforanów, który nagromadziły w swoim organizmie, i pobierają związki organiczne (głównie octany). Później bakterie odgrywają istotną rolę w

przekształcaniu krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksylowych w polihydroksymaślany i magazynują je w komórce. Podczas przejścia do strefy tlenowej substancje te wykorzystywane są jako źródło związków węgla, potrzebnego do metabolizmu i rozmnażania komórki bakteryjnej. Dzięki energii uwalnianej podczas tego procesu, następuje ponowna asymilacja ortofosforanów [20].

Po zakończeniu biologicznego procesu usuwania fosforu, ścieki kierowane są do osadnika wtórnego, w którym osad ulega sedymentacji, a ścieki pozbawione fosforu odprowadzane są do odbiornika.



Rysunek 2. Schemat przebiegu procesu biologicznego usuwania fosforu przez bakterie z rodzaju *Acinetobacter* [21].

Źródła literaturowe podają, iż dla procesu defosfatacji najkorzystniejsze jest, jeśli w ściekach dopływających do komory defosfatacyjnej zachowany jest stosunek: 6 - 10 mg związków z grupy KKA (w przeliczeniu na kwas octowy) / 1 mg P_{org} [22].

- **Biologiczne usuwanie związków azotu ze ścieków**

Zasada biologicznego usuwania azotu ze ścieków oparta jest na procesach nityfikacji, denityfikacji oraz amonifikacji. Amonifikacja jest to rozkład azotu organicznego zawartego głównie w białkach, do azotu amonowego [7]. Proces nityfikacja polega na przemianie azotu amonowego w azotany (V) lub azotany (III) [6]. Proces ten prowadzony jest dwuetapowo. W pierwszym etapie następuje utlenianie azotu amonowego do azotanów (III) pod wpływem bakterii *Nitrosomonas*. Drugi etap stanowi utlenianie azotanów (III) do azotanów (V) pod wpływem bakterii *Nitrobacter*. Proces ten zachodzi ze znacznie większą szybkością, dlatego ścieki oczyszczone nie zawierają azotanów (III) [8]. Azotany (V)

zostają z kolei przekształcone w procesie denitryfikacji w azot atmosferyczny. Proces ten zachodzi w warunkach beztlenowych [7].

Udział poszczególnych kwasów w sumie zawartości wszystkich kwasów w próbkach ścieku przeważnie waha się na poziomie 50-60% kwasu octowego i ok. 40% kwasu propionowego lub 45% kwasu octowego, 35% kwasu propionowego i 15% innych kwasów [8].

Odpowiednia zawartość krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych jest kluczowym parametrem z punktu widzenia efektywnego przebiegu procesów defosfatacji i denitryfikacji zachodzących podczas biologicznego oczyszczania ścieków. Optymalne stężenia związków z grupy KKA dla tych procesów są funkcją zawartości związków fosforu i azotu i rodzaju ścieków. Surowe ścieki komunalne doprowadzane do oczyszczalni zawierają zróżnicowane i najczęściej za małe stężenie związków z grupy KKA dla efektywnego usuwania azotu i fosforu. Przykładowe wartości stężeń kwasów w ściekach surowych w przeliczeniu na kwas octowy wynosiły: 11,6 mg/L; 8,1 mg/L; 28,1 mg/L i 39,0 mg/L [4].

Fosfor jest efektywnie usuwany ze ścieków w procesie biologicznego oczyszczania, gdy zawartość kwasów w ściekach jest na poziomie powyżej 100 mg/L [4].

Gdy ścieki nie zawierają odpowiedniej ilości związków z grupy KKA to alternatywą jest przeprowadzenie wstępnej fermentacji osadu i dodanie powstałych kwasów do ścieków, doprowadzanych do reaktora lub bezpośrednio do komory beztlenowej.

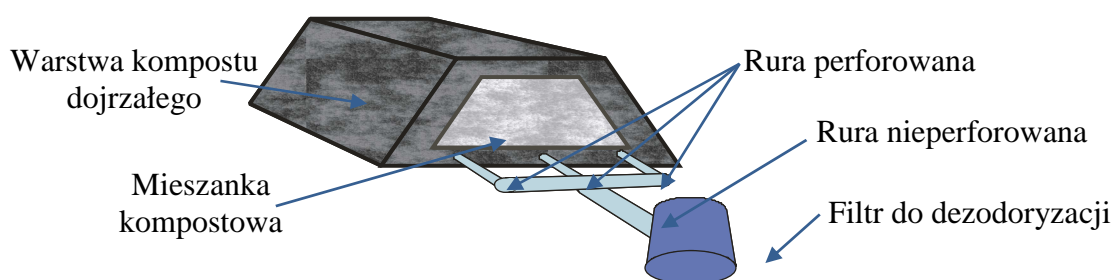
Należy dodać, że różne kwasy w różnym stopniu wpływają na procesy denitryfikacji i defosfatacji. Stwierdzono np., że na denitryfikację osadu czynnego kwas octowy miał silny wpływ, kwas masłowy umiarkowany, a kwasy propionowy, izomasłowy, walerianowy, izowalerianowy i kapronowy nawet blokowały proces denitryfikacji [7].

Dokładna znajomość stężenia związków z grupy KKA w ściekach surowych oraz w trakcie procesu oczyszczania pozwala określić szybkość i efektywność rozkładu materii organicznej w celu optymalizacji warunków i zwiększenia skuteczności procesu oczyszczania ścieków.

Może także posłużyć do analizy przyczyn zmian zachodzących podczas biologicznego usuwania pierwiastków biogennych takich jak azot czy fosfor, które występują w ściekach w nadmiernych ilościach i mogą prowadzić do eutrofizacji zbiorników wodnych, co powoduje deficyt tlenowy, wpływający na środowisko wodne w sposób szczególnie niebezpieczny.

Procesy oczyszczania ścieków wiążą się również z powstawaniem znacznej ilości osadów ściekowych [3]. Osady te charakteryzują się wysoką zawartością związków organicznych, w tym lotnych kwasów, powstających w wyniku procesów fermentacji oraz obecnością bakterii chorobotwórczych i pasożytów [23]. Osady powstające w oczyszczalni muszą być przetworzone do nieszkodliwych produktów i usunięte z terenu oczyszczalni. Surowe osady stanowią istotne zagrożenie dla środowiska i wymagają stabilizacji składu chemicznego [3]. Przeprowadzane badania mają na celu zmniejszenie ilości substancji o przykrym zapachu, w tym substancji organicznych, usprawnienie procesu odwadniania osadów oraz zmniejszenie ilości mikroorganizmów patogennych [24]. Stały skład chemiczny osadu można uzyskać poprzez zastosowanie procesów biologicznych, termicznych i chemicznych. Do najbardziej rozpowszechnionych metod należą fermentacja metanowa oraz stabilizacja tlenowa osadów. W procesach tych zachodzi przemiana substancji organicznej w mineralną. Podczas procesu degradacji część związków zostaje przekształcona również do produktów gazowych. Do biologicznych metod stabilizacji należy kompostowanie. Stosowane jest ono najczęściej do mieszaniny osadów ściekowych i odwodnionych odpadów komunalnych [24].

Kompostowanie to proces tlenowego rozkładu materii organicznej prowadzący do częściowej ich mineralizacji i humifikacji przy udziale termofilnych grzybów i bakterii [7, 23]. Cienką warstwę odwodnionego osadu rozkłada się na wydzielonym terenie i posypuje nośnikiem węgla, który jednocześnie jest komponentem strukturotwórczym. Po wymieszaniu, z materiału usypuje się pryzmy. Do wnętrza każdej z nich wprowadzane są rury perforowane, mające na celu oprowadzanie gazów powstających wewnątrz pryzmy (**Rysunek 3**) [25].



Rysunek 3. Schemat budowy prostej pryzmy kompostowej [26].

Główny etap kompostowania obejmuje szereg procesów rozkładu materii organicznej przy udziale mikroorganizmów. Efektem tego jest wydzielanie się dużej ilości ciepła, które powoduje podgrzanie przerobionych osadów. Osiągane wewnątrz pryzmy temperatury,

sięgające 70 °C, powodują zabicie bakterii chorobotwórczych, ich przetrwalników oraz jaj pasożytów jelitowych [25]. Wytwarzany w ten sposób kompost ze względu na obecność substancji próchnicznych charakteryzuje się właściwą strukturą i żyznością, co umożliwia stosowanie go jako nawozu organicznego [23]. Na jakość wytworzonego produktu ma wpływ wiele czynników [7, 23]. Należą do nich między innymi: uwodnienie osadu i komponentów, zawartość suchej masy organicznej w suchej masie osadu, zawartość związków biogenych, aktywność mikroorganizmów oraz pH i temperatura [23]. Szczególnie ważny jest też stosunek zawartości węgla do azotu (C/N) [3]. Dla dojrzałego kompostu wartość tego parametru powinna wynosić około 20 [25].

Kompostowanie osadów ściekowych pozwala nie tylko na zagospodarowanie uciążliwego odpadu, ale także wykorzystanie rolnicze wytworzonego produktu. Zastrzeżenia może budzić fakt występowania w kompoście związków szkodliwych takich jak metale ciężkie oraz organiczne związki chlorowcopochodne.

Otrzymany kompost można wykorzystywać także do rekultywacji gruntów lub jako warstwę izolacyjną na składowiskach odpadów miejskich.

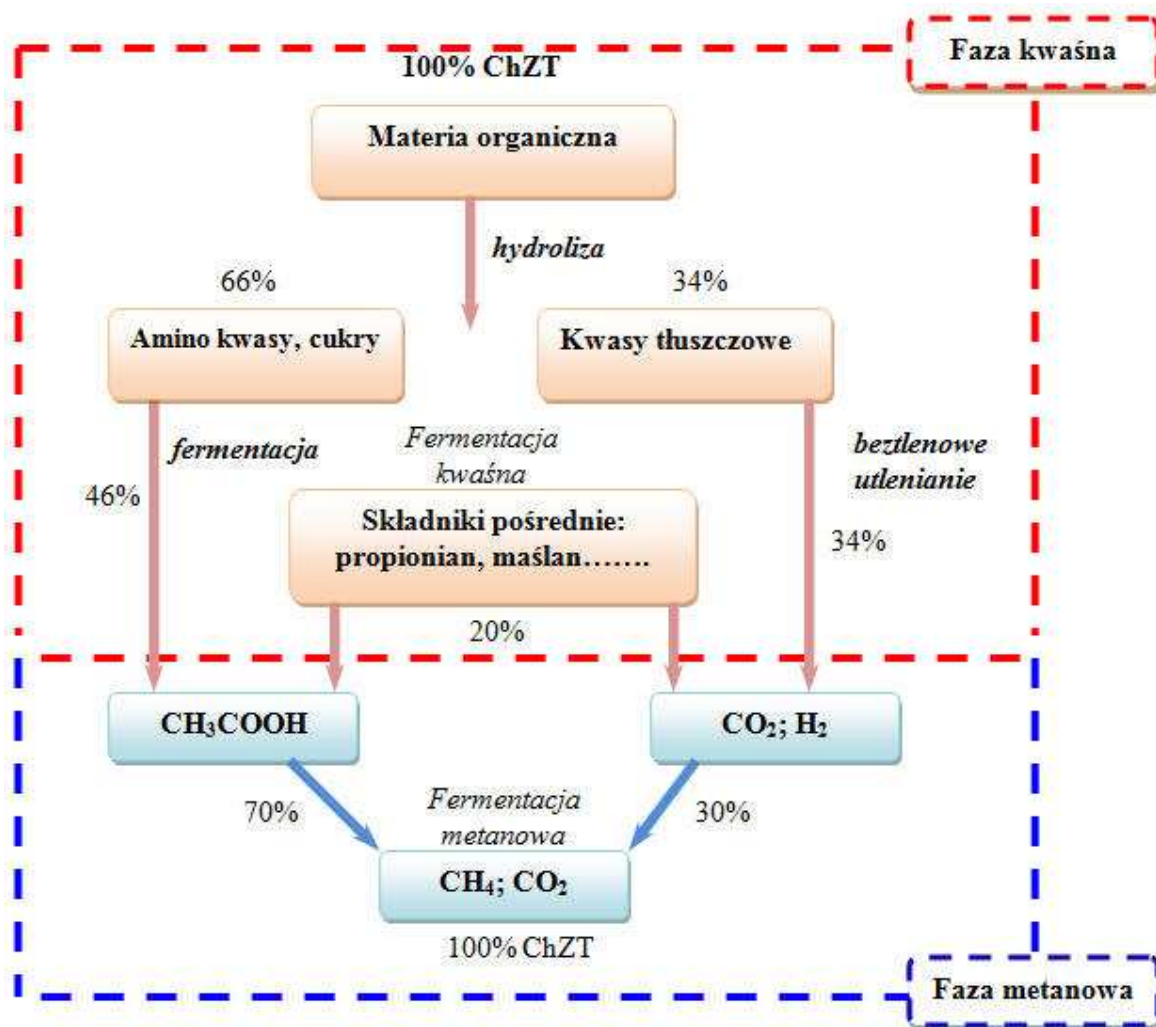
1.2. Składowisko odpadów komunalnych

Związki z grupy KKA, a w szczególności kwas octowy, propionowy i masłowy, wraz z innymi związkami chemicznymi (takimi jak lotne aminy i związki siarki) są odpowiedzialne za nieprzyjemny zapach w okolicy oczyszczalni ścieków i składowisk odpadów. W trakcie składowania, odpady stałe ulegają rozkładowi w wyniku zachodzących procesów fizyko-chemicznych i biologicznych. Powstają wówczas znaczne ilości niebezpiecznych odcieków oraz gazu wysypiskowego (biogazu).

Na skład odcieku wpływają takie czynniki jak: wiek, wielkość opadów atmosferycznych, sezonowe wahania pogody, rodzaj i skład odpadów. Wiek składowiska silnie wpływa na skład chemiczny odcieku. Na **Rysunku 4** przedstawiono schemat przebiegu procesu beztlenowego rozkładu materii organicznej, występującej na składowisku odpadów miejskich.

„Młode” składowisko odpadów zawiera duże ilości łatwo biodegradowalnej materii organicznej. Szybka fermentacja beztlenowa na takim składowisku, powoduje przetwarzanie produktów hydrolizy do prostych kwasów tłuszczowych [27]. Fermentacja kwaśna jest dodatkowo przyspieszana przez dużą wilgotność powietrza oraz dużą zawartość wody w stałych odpadach [28]. Początkowa faza procesów na składowisku

odpadów jest nazywana **fazą kwaśną (acydogenną)**, która prowadzi do uwolnienia dużych ilości kwasów z grupy KKA (do 95% zawartości substancji organicznych) [29]. W efekcie powstawania kwasów maleje pH składowiska, co powoduje uwalnianie metali [30]. W fazie tej obserwuje się intensywny wzrost bakterii octowych oraz gwałtowne zużycie substratów organicznych i związków biogenych [31]. Obserwowany jest także szybki wzrost obciążenia odcieków organicznych związkami węgla, co przyczynia się do wzrostu wartości liczbowej wskaźnika ChZT [32].



Rysunek 4. Schematycznie przedstawiony bilans parametru ChZT w organicznej frakcji odpadów komunalnych ze składowiska [33].

Podczas dojrzewania składowiska odpadów następuje **faza metanowa (metanogenna)**. W fazie tej odczyn odpadów ulega ustabilizowaniu w związku z wykorzystaniem przez bakterie związków z grupy KKA jako źródła węgla, wykorzystywanego w ich procesach życiowych [34].

Po osiągnięciu obojętnego odczynu następuje przejście do właściwej fazy rozkładu, która charakteryzuje się złożonymi interakcjami między drobnoustrojami. Bakterie octowe przekształcają dalej krótkołańcuchowe kwasy karboksylowe do octanów, wodorowęglanów i wodoru (H₂) [32]. W tej fazie produkowany jest metan przy udziale różnych bakterii metanowych. Obserwuje się gwałtowny wzrost produkcji biogazu, przy jednoczesnym spadku stężenia organicznych związków węgla. W miarę zużywania rozpuszczalnych substratów (kwasów karboksylowych), szybkość produkcji metanu (CH₄) powoli maleje. Kwasy karboksylowe są zużywane równie szybko, jak są wytwarzane [35]. Następuje też powolna humifikacja związków organicznych zawartych w odpadach [36].

Obecny stan wiedzy na temat przemian zachodzących wewnątrz składowiska, pochodzi głównie z obserwacji i badań produktów końcowych, takich jak metan, ditlenek węgla i krótkołańcuchowe kwasy alkanomonokarboksylowe. W literaturze spotyka się kilka alternatywnych podziałów faz rozkładu materii na składowisku. W **Tabeli 3** przedstawiono informacje o zmianach parametrów składowisk odpadów w trakcie jego eksploatacji [36]. W polskiej literaturze spotyka się podział stabilizacji składowisk na pięć faz: faza wstępna (tlenowa), faza przejściowa (kwaśna), faza produkcji kwasów (faza metanowa niestabilna), faza produkcji metanu (faza metanowa stabilna), faza dojrzewania (faza końcowa) [32, 37]. W odciekach „młodych” składowisk, krótkołańcuchowe kwasy alkanomonokarboksylowe stanowią prawie 80% wszystkich składników organicznych. Przykładowo, wartości stężeń krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksylowych w odciekach „świeżych” odpadów wynosiły 5688 mg/L, natomiast w „starych” odpadach zaledwie 5 mg/L [38].

Tabela 3. Informacje obrazujące zmiany podstawowych parametrów składowisk w trakcie jego eksploatacji [36].

SŁADOWISKO ODPADÓW	MŁODE	ŚREDNIE	STARE
Wiek [lata]	<5	5-10	>10
pH	6,5	6,5-7,5	>7,5
ChZT [mg/L]	>10000	4000-10000	<4000
BZT₅/ChZT	>0,3	0,1-0,3	<0,1
Organiczne związki	80% KKA	5-30% KKA +kwasy humusowe kwasy fulwowe	kwasy humusowe i kwasy fulwowe
Metale ciężkie	niskie-średnie	-	niskie
Biodegradowalność	znacząca	średnia	niska

Charakterystyka odcieków pochodzących ze składowisk odpadów jest zazwyczaj wyrażana za pomocą takich podstawowych parametrów jak: chemiczne i biologiczne zapotrzebowanie tlenu, pH, zawiesina ogólna, azot amonowy, azot ogólny Kjeldahla, metale ciężkie.

Związki z grupy KKA występują w znacznych ilościach na składowiskach odpadów w formie rozpuszczonej w wodzie. Ich powstawanie powoduje wzrost stężenia ogólnego węgla organicznego w odcieku oraz podwyższone wartości chemicznego i biologicznego zapotrzebowania na tlen.

Kwasy mogą również wpływać na stabilność pozostałości po spalaniu odpadów. Na skutek obniżenia pH, zwiększa się ruchliwość metali ciężkich oraz radionuklidów. Dlatego szczególnie ważne jest monitorowanie związków z grupy KKA, zwłaszcza kwasu octowego w glebie, gdzie składowane są odpady zawierające pierwiastki radioaktywne.

Z powyższych względów konieczne jest monitorowanie stężenia związków z grupy KKA w ściekach na różnych etapach oczyszczania biologicznego i w środowisku, w szczególności na składowiskach odpadów organicznych [33, 35].

1.3. Farma zwierząt

Problem ścieków z hodowli zwierząt wiąże się z obecnością dużych ilości substancji organicznych oraz biogennych, znacznie wyższych niż w ściekach komunalnych czy wodach odciekowych ze składowisk odpadów. Skład tych ścieków zależy od rodzaju produkujących je zwierząt, ich wieku i sposobu odżywiania, a także intensywności produkcji oraz ilości zużywanej wody do splukiwania stanowisk w miejscach bytowania zwierząt hodowlanych. Radykalne zmiany związane z negatywnym oddziaływaniem na środowisko nastąpiły wraz z pojawieniem się i upowszechnieniem dużych, przemysłowych ferm hodowlanych. Obiekty takie wprowadzają do środowiska znaczne ilości różnorodnych substancji (gazy, odpady), które mogą stanowić źródło zagrożeń dla ludzi i otaczającej przyrody.

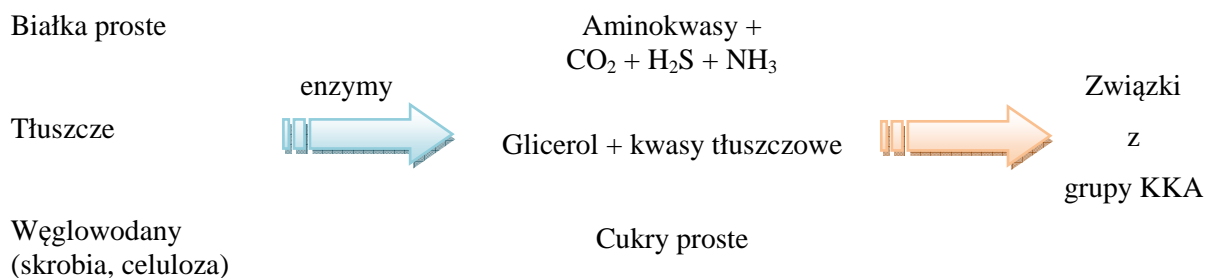
W otoczeniu ferm, gdzie składowane są odchody zwierzęce (gnojowica, obornik) powstaje wiele gazów o nieprzyjemnym zapachu, mniej lub bardziej uciążliwych dla pobliskich mieszkańców. Źródłem powstawania uciążliwych dla środowiska gazów są zarówno odchody zwierząt świeżo wydalone jak i te składowane w zbiornikach w postaci stałej lub ciekłej. Emisja związków odorotwórczych do atmosfery odbywa się głównie poprzez systemy wentylacyjne. Gazy te następnie podlegają wielu procesom, w wyniku których powstałe produkty przedostają się do gleby i wody, powodując negatywny wpływ na

zdrowie ludzi i zwierząt. Głównymi substancjami odpowiedzialnymi za wydzielanie odoru są związki siarczkowe (np. siarkowodór (H_2S)), związki azotowe (np. amoniak) i związki zawierające węgiel (np. związki z grupy KKA) [39]. Ze względu na rodzaj i ilość składowanej materii organicznej, biogaz produkowany np. z odchodów zwierząt składa się z około 60-70% (v/v) metanu, 30-40% (v/v) ditlenku węgla, 1-2% (v/v) azotu, 1000-3000 ppmv siarkowodoru, 20-30 ppmv związków z grupy KKA i 10-30 ppmv amoniaku [40, 41]. Kwasy o dłuższych łańcuchach (od kwasu masłowego do kwasu kaprylowego), a także kwasy rozgałęzione (np. kwasy izomasłowy, izowalerianowy, izokapronowy) mają bardziej intensywny zapach niż te z krótkim łańcuchem węglowym (takich jak kwasy mrówkowy, octowy i propionowy) [42]. Zatem kwasy o krótszych łańcuchach, które obecne są w przeważających ilościach w ściekach pochodzenia zwierzęcego do pozostałych kwasów, wpływają w mniejszym stopniu na intensywność powstających odorów [43].

Liczne typy bakterii obecne w żołądku zwierząt mogą wytwarzać krótkołańcuchowe kwasy alkanomonokarboksyłowe z białek, tłuszczu i węglowodanów w procesie fermentacji beztlenowej. W tym przypadku najliczniej występują takie kwasy jak octowy, propionowy i masłowy, ale obecne są także w mniejszych ilościach takie kwasy jak izomasłowy, izowalerianowy, walerianowy i kaprylowy.

Proces rozkładu związków organicznych nierozpuszczalnych w wodzie do związków prostych, rozpuszczalnych w wodzie zachodzi pod wpływem enzymów takich jak: celulazy, amylazy, proteiny i lipazy, wydzielanych przez bakterie hydrolytyczne.

Na **Rysunku 5** przedstawiono uproszczony schemat przebiegu reakcji rozkładu związków organicznych do kwasów karboksylowych.

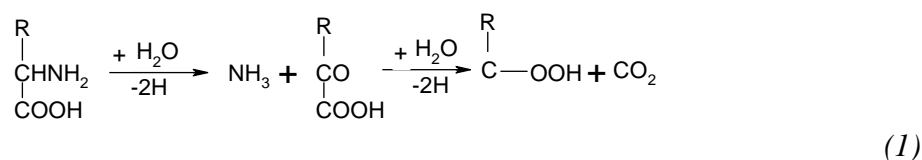


Rysunek 5. Schemat przebiegu reakcji rozkładu związków organicznych do kwasów karboksylowych.

Ze względu na budowę przewodu pokarmowego, a głównie żołądka, procesy trawienia inaczej przebiegają u zwierząt monogastrycznych – o żołądka jednokomorowym (np. koń, trzoda chlewna, pies, królik), a inaczej u zwierząt o żołądka wielokomorowym (np. bydło, owca, koza) [44].

Główne procesy rozkładu białek odbywają się w żwaczu (największej z komór żołądka przeżuwacza), dzięki obecnym tam bakteriom i pierwotniakom. Białko pochodzące z pokarmu (paszy) jest rozkładane przez enzymy tych bakterii do polipeptydów, a potem przy udziale peptydaz do aminokwasów. Aminokwasy mogą ulegać dalszym przemianom tj. dezaminacji albo dekarboksylacji, wytwarzając kwas octowy z alaniny i glicyny, kwas masłowy z waliny, kwas izowalerianowy z leucyny, kwas walerianowy z izoleucyny [43].

Proponowana reakcja (1) przebiega zgodnie ze schematem:

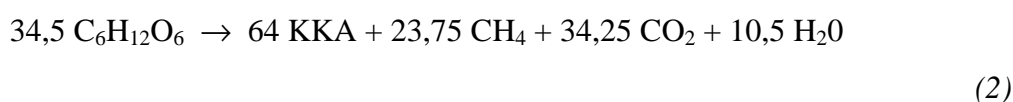


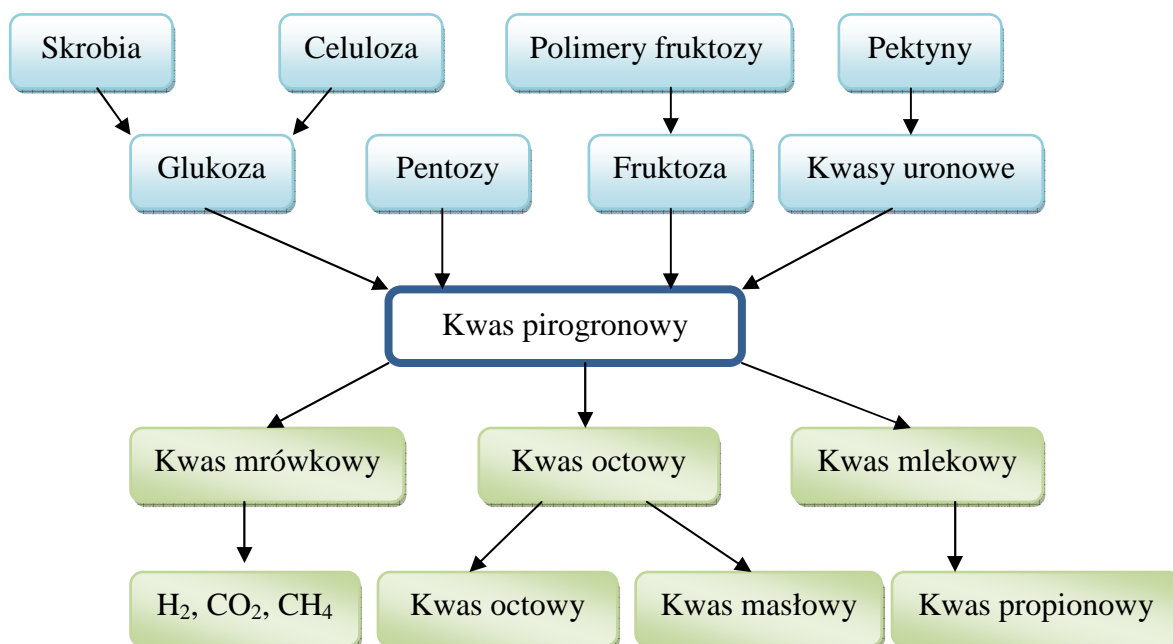
W jelicie cienkim, a ściśle w dwunastnicy, następuje główny proces trawienia tłuszczów. Przy udziale żółci, soku jelitowego oraz lipazy trzustkowej, tłuszcz rozkładany jest do glicerolu i kwasów tłuszczowych. Następnie glicerol wchodzi w cykl przemian cukrowych, w wyniku których powstają związki z grupy KKA [43, 44].

Dwucukry i wielocukry pod wpływem enzymów ulegają rozpadowi do cukrów prostych, które w toku dalszych przemian przekształcane są do związków z grupy KKA i gazów (H₂, CO₂, CH₄). Schemat przebiegu procesu rozkładu cukrów w żwaczu przedstawiono na **Rysunku 6**.

Skrobia, która jest głównym składnikiem pokarmu (pasz), ulega przekształceniu pod wpływem amylazy trzustkowej w dekstryny i maltozę, a następnie w glukozę. Glukoza ulega procesom fermentacji do kwasu propionowego. Celuloza spożywana głównie przez zwierzęta roślinożerne jest także źródłem kwasów karboksylowych, m.in. kwasu octowego, propionowego i masłowego. Celulozę rozkładają bakterie obecne w żwaczu, do których można zaliczyć: paciorkowce i laseczki kwasu mlekowego [45].

Metabolizm cukrów w warunkach beztlenowych można opisać schematycznie za pomocą następującej reakcji (2) [43]:





Rysunek 6. Schemat przebiegu procesu rozkładu cukrów w żwaczu [44].

Końcowym produktem przemian trawiennych w żwaczu są zatem krótkołańcuchowe kwasy karboksylowe, takie jak: mrówkowy, octowy, propionowy, izomasłowy, masłowy, izowalerianowy i walerianowy. Kwas octowy, propionowy i masłowy występują w przeważających ilościach, a ich wzajemny stosunek przeciętnie wynosi 6:3:1. Stosunek ten w dużej mierze zależy od składu pokarmu. W przypadku zwierząt karmionych wyłącznie sianem, produkcja kwasu octowego wynosi około 85% wszystkich kwasów, natomiast przy karmieniu paszami zbożowymi wrasta do 40-50% wytwarzanie kwasu propionowego [44].

W procesie fermentacji flora bakteryjna jelita cienkiego trzody chlewnej i bydła, bierze udział w powstawaniu kwasów organicznych, w tym związków z grupy KKA, które pełnią niezbędną funkcję energetyczną i ochronną dla układu pokarmowego tych zwierząt. Kwas octowy odgrywa zasadniczą rolę w syntezie tłuszczu mleka, dlatego istotna jest jego odpowiednio duża produkcja w żwaczu. Kwas propionowy wpływa na skład mleka, a przede wszystkim na zawartość w nim białka, natomiast kwas masłowy na zawartość tłuszczu w mleku [46].

Związki z grupy KKA powstają także podczas magazynowania (składowania) materii organicznej z okolic farm zwierzęcych lub ogrodu zoologicznego. W skład takiej materii organicznej wchodzi ciekłe i stałe odchody zwierząt oraz resztki organiczne, np. karma, siano. Przykładowo odchody pochodzenia bydłowego charakteryzują się wysoką

wartością nawozową [47]. Obok takich składników jak np. azot, fosfor, węgiel i potas, dostarczają wiele mikroelementów, np. miedź, cynk, żelazo, mangan [47]. Zatem związki z grupy KKA obecne w ściekach pochodzących z hodowli zwierząt uprzemysłowionych, mogą być bardzo cennym źródłem łatwo dostępnego węgla organicznego, przez co mogą służyć do celów nawożenia pól uprawnych. Przykładowo ścieki pochodzące z chlewni zawierają ok. 11,1 g/L kwasu octowego, 4,2 g/L kwasu propionowego i 6,4 g/L kwasu masłowego [48].

Ponadto monitoring związków z grupy KKA umożliwia również rzetelną ocenę procesu fermentacyjnego w przypadku produkcji biogazu podczas składowania stałych odpadów organicznych.

2. Problemy analityki związków z grupy KKA w próbkach wodnych i stałych

Biorąc powyższe pod uwagę staje się, oczywiste, że kompleksowe rozwiązanie problemu monitorowania związków z grupy KKA, wymaga zastosowania odpowiednich metodyk ich oznaczania.

W skali krajowej, często jeszcze laboratoria analityczne zajmujące się tą tematyką, stosują metodykę opisaną w nieaktualnej już normie (PN-75/C-04616). Polega ona na izolacji i wzbogacaniu lotnych kwasów tłuszczowych w próbkach osadu ściekowego i wodach nadosadowych, metodą destylacji z parą wodną, a następnie ich oznaczeniu metodą miareczkowania alkalimetrycznego. Istotnym ograniczeniem tej metodyki jest wysoka wartość liczbowa granicy oznaczalności (>36 mg/L) i fakt, że oznacza się w ten sposób sumę związków z grupy KKA (w przeliczeniu na kwas octowy) oraz duży błąd oznaczenia zależy od wielu parametrów [49]. Wyniki oznaczeń, przeprowadzone w czterech polskich oczyszczalniach ścieków wykazały, że średnie stężenia związków z grupy KKA w surowych ściekach, mieściły się w granicach od kilku do kilku dziesięciu mg/L w przeliczeniu na kwas octowy [6, 50]. Wskazuje to na potrzebę opracowywania lub udoskonalania stosowanych już metodyk analitycznych.

Zagadnienia dotyczące przygotowania i analizy próbek środowiskowych na zawartość krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksylowych opisano w wielu pracach przeglądowych i oryginalnych [51]. Oznaczanie poszczególnych kwasów wymaga zastosowania odpowiedniej techniki, charakteryzującej się odpowiednią zdolnością rozdzielczą. Na szczególną uwagę zasługuje chromatografia gazowa, która najczęściej musi być poprzedzona etapem izolacji i wzbogacania próbki.

2.1. Pobieranie i przechowywanie próbek

Zanim próbkę podda się procesowi przygotowania i analizie końcowej, należy je odpowiednio pobrać i najczęściej przechować przez jakiś czas, w taki sposób, aby była reprezentatywna i nie ulegała zmianom od momentu pobrania do rozpoczęcia analizy.

Kluczowe znaczenie ma zahamowanie lub raczej sugerowane spowolnienie procesów biochemicznych, chemicznych i fizycznych zachodzących w próbkach, takich jak: rozkład, fermentacja, adsorpcja na ściankach naczynia itp. [11, 50, 51].

Związki z grupy KKA mogą ulegać także procesowi nieodwracalnej adsorpcji na powierzchni szkła i dlatego zaleca się stosowanie naczyń z tworzyw sztucznych [7, 52, 53]. Próbki powinny przechowywać się w temperaturze ok. 4°C [54, 55, 56, 57-64], a w celu uniknięcia strat lotnych analitów, korzystnie jest umieścić pojemniki z próbkami w pozycji odwróconej zamknięciem ku dołowi.

Zaleca się również dodanie substancji utrwalających, np. nasyconego roztworu chlorku rtęci, chlorku benzyldimetyloalkiloamoniowego, kwasu solnego, azydki sodu lub w przypadku próbek osadów, umieszczenie ich bezpośrednio po pobraniu w rozpuszczalniku organicznym, np. w metanolu, w celu zahamowania procesu biodegradacji [50, 60, 65-67]. Analizę próbek należy przeprowadzić w najkrótszym możliwym czasie od momentu ich pobrania. Jeśli nie możliwe jest wykonanie analizy w czasie do 6 godzin od pobrania, dopuszcza się przechowywanie próbek w szczelnie zamkniętych naczyniach do kilku dni, zgodnie z proponowanymi powyżej zasadami. W przypadku, gdy próbki mają być przechowywane przez dłuższy okres czasu, należy je zamrozić [11].

2.2. Przygotowania próbek wodnych do analizy

Głównym celem przygotowania próbki jest selektywna izolacja związków, w tym przypadku lotnych kwasów karboksylowych z próbek o złożonym składzie matrycy oraz podniesienie ich stężenia do poziomu, pozwalającego je wykryć i oznaczyć.

Oznaczenie jedynie sumarycznej zawartości związków z grupy KKA, nadal stosuje się metodyki oparte na miareczkowaniu [68-72] lub spektrofotometryczne [73], które poprzedzone są zazwyczaj etapem izolacji analitów z matrycy pierwotnej za pomocą metod destylacyjnych (destylacji z parą wodną [30, 49, 73, 74] lub czasami bezpośrednim oznaczaniu [75]). Destylacja, choć nie zapewnia wysokiego stopnia wzbogacenia, umożliwia jednak skuteczne oddzielenie lotnych analitów od trudnolotnych i nielotnych składników, w tym związków nieorganicznych oraz wielkocząsteczkowych związków

organicznych, których obecność utrudniałaby lub wręcz uniemożliwiła otrzymanie miarodajnych danych [60].

Do izolacji i wzbogacania związków z grupy KKA z próbek wodnych można stosować typowe sposoby:

- Ekstrakcja do fazy ciekłej (**LLE**),
- Ekstrakcja do fazy stałej (**SPE**),
- Wyfłukiwanie za pomocą strumienia gazu z jednoczesnym wychwytywaniem (**PT**),
- Ekstrakcja z wykorzystaniem złoża stałego sorbenta umieszczonego w igle (**NTE**),
- Ekstrakcja do fazy gazowej (w układzie statycznym) (**HS**),
- Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (**SPME**),
- Mikroekstrakcja do pojedynczej kropli (**SDME**).

Oddzielenie związków z grupy KKA z próbek, charakteryzujących się złożonym składem matrycy, można osiągnąć za pomocą ekstrakcji rozpuszczalnikiem organicznym [14, 51, 76, 77]. *Ekstrakcja typu LLE* była wielokrotnie stosowana do izolacji związków z grupy KKA z próbek wodnych [15, 78]. Jest to prosta technika i nie wymaga skomplikowanej aparatury. Do ekstrakcji mogą być stosowane bardzo czyste rozpuszczalniki organiczne, zwykle dość lotne i wykazujące możliwie małą rozpuszczalność w wodzie. Często są to eter dietylowy (DEE) [14], dichlorometan [77, 79] lub eter metylowo-*tert*-butylowy (MTBE) [51, 80], ponieważ mogą być eluowane przed analitami z kolumny chromatograficznej. Obniżenie rozpuszczalności związków z grupy KKA w wodzie uzyskuje się poprzez zakwaszenie próbki wodnej np. kwasem siarkowym, oraz jej wysolenie poprzez dodanie soli nieorganicznej, np. chlorku sodu (NaCl) czy siarczanu sodu (VI) (Na₂SO₄).

Trzeba jednak pamiętać, że stopień wzbogacenia pierwszych kwasów w szeregu homologicznym jest raczej mały i technika LLE może być efektywnie stosowana w przypadku stężeń charakterystycznych dla procesu oczyszczania ścieków. Niedogodnością tej techniki jest tworzenie się emulsji i trudności związane z rozdzieleniem faz. Do wad należy czasochłonność i pracochłonność techniki. Ponadto problemem jest duże zużycie drogich i często szkodliwych rozpuszczalników oraz ich utylizacja.

Bardziej „przyjazną” środowisku techniką przygotowania próbki jest ekstrakcja do fazy stałej. W analizie środowiskowej, metoda ta jest często stosowana do wstępnego oczyszczania ciekłych próbek i ciekłych ekstraktów, ale także znajduje zastosowanie do izolacji i wzbogacania analitów organicznych z próbek wodnych.

Technika ekstrakcji do fazy stałej polega na przeniesieniu analitów z ciekłej próbki do powierzchni stałego sorbentu, a następnie ich uwolnieniu za pomocą rozpuszczalnika o dużej sile elucyjnej lub rzadziej w procesie desorpcji termicznej [81]. W przypadku oznaczania wolnych związków z grupy KKA stosowano kolumnę SPE z sorbentem, charakteryzującym się dużą powierzchnią aktywną i pojemnością, a mianowicie kopolimerem styrenu i diwinylobenzenu (LiChrolut EN-Supelclean ENVI-18 (1:1)). Anality zatrzymane na złożu sorbenta są z niego eluowane za pomocą metanolu i poddane analizie z wykorzystaniem techniki GC-FID oraz GC-MS. W przypadku próbek wodnych o stężeniu kwasów w zakresie od 0,1 do 1 µg/L uzyskano wartości odzysków na poziomie 93-102 % [66].

Bezrozpuszczalnikowe techniki przygotowania próbek do analizy są bardzo atrakcyjnymi sposobami przygotowania próbek do analizy chromatograficznej. Ich niewątpliwe zalety - ekologiczność, prostota, łatwość automatyzacji, ograniczenie czasochłonności, przy zachowaniu wysokiej czułości lub niekiedy ją podwyższające, dają prawo zaliczać je do metodyk analitycznych, które mogą znaleźć szerokie zastosowanie w praktyce analitycznej.

W przypadku **techniki wmywania i wyłapywania analitów w pułapce** wykorzystuje się zjawisko podziału analitu pomiędzy fazę ciekłą i gazową. Wypłukane anality są zatrzymywane w pułapce z sorbentem lub w naczyniu do wymrażania, a następnie w wyniku desorpcji termicznej uwalniane do kolumny GC [81]. Technika ta może być zastosowana do izolacji związków z grupy KKA po etapie derywatywacji (np. estrów metylowych) z próbek wodnych.

Na podobnej zasadzie opiera się **technika ekstrakcji analitów z fazy nadpowierzchniowej przy użyciu warstwy sorbenta umieszczonego w igle** (HS-NTE). Technikę tę zastosowano do oznaczania kwasu mrówkowego i octowego w próbce wody. Metoda ta polega na zastosowaniu igły wypełnionej stałym polidwinylobenzenem. Przepływ strumienia fazy nadpowierzchniowej przez igłę wymuszony jest przez zastosowanie pompki pracującej w układzie ssącym. Ubytek fazy nadpowierzchniowej uzupełniany jest azotem, dostarczanym do naczynka ekstrakcyjnego [82]. Precyzja proponowanej techniki została określona na podstawie wyników analizy próbek rzeczywistych i wynosiła 4,7% oraz 10,7%, odpowiednio dla kwasu mrówkowego i octowego.

Podniesienie zawartości analitów z grupy KKA oraz wymianę matrycy próbki, umożliwia **technika analizy nadpowierzchniowej**. Technikę HS-GC wyróżnia łatwość

rozdzielania oznaczanej substancji od matrycy wtórnej (gaz) oraz możliwość bezpośredniego wprowadzenia mieszaniny: gaz-pary analitu to chromatografu gazowego [83]. Jest to metoda ekonomiczna i bezpieczna dla środowiska, gdyż nie wymaga użycia rozpuszczalników organicznych. Technika ekstrakcji za pomocą gazu w układzie statycznym była szeroko stosowana do izolacji związków z grupy KKA z próbek wodnych [10]. Niestety granice oznaczalności w analizie rutynowej są stosunkowo wysokie [10, 84].

Duże znaczenie zyskała *technika mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej*, która spełnia wymagania łatwo zauważalnej tendencji do miniaturyzacji zestawów do przygotowania próbek i prawie całkowitego wyeliminowania rozpuszczalników.

W połączeniu z techniką analizy fazy nadpowierzchniowej, może być stosowana w oznaczaniu szerokiej gamy organicznych związków lotnych i średnio lotnych w próbkach środowiskowych, nawet o złożonym składzie matrycy i zawierających materię zawieszoną [85, 86]. W literaturze dostępne są informacje na temat technik pobierania próbek wodnych i stałych z wykorzystaniem urządzenia do SPME w celu izolacji i wzbogacenia wolnych związków z grupy KKA [12, 13, 15, 87-94] lub pochodnych, otrzymanych w wyniku procesu derywatywacji [95, 96, 97, 98].

Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej polega na podziale analitów znajdujących się w próbce ciekłej lub gazowej do warstwy sorbującej (ciecz lub ciało stałe) pokrywającej włókno wprowadzane wprost do próbki ciekłej lub z fazy nadpowierzchniowej pozostającej z próbką w równowadze termodynamicznej. Anality ulegają wzbogaceniu na warstwie sorbującej i następnie są uwalniane termicznie w komorze dozownika chromatografu i przenoszone do kolumny GC za pomocą gazu nośnego [86].

Niezmiernie ważnym aspektem w tej technice jest dobór właściwego włókna, ponieważ rodzaj i ilość fazy stacjonarnej wpływa na czułość i selektywność procedury opartej na mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej. Wolne krótkołańcuchowe kwasy alkanomonokarboksylowe są związkami o właściwościach hydrofilowych, i według zasady „podobne rozpuszcza się w podobnym”, najbardziej odpowiednie do ich ekstrakcji są włókna mieszane, w których stały sorbent jest rozproszony w ciekłej fazie stacjonarnej. Włókna tego typu dostępne handlowo to: PDMS-DVB, PDMS-CAR, PDMS-CAR-DVB i CW-DVB [97]. W przypadku ekstrakcji związków z grupy KKA po przeprowadzeniu w pochodne przeważnie stosowano włókno pokryte poliakrylanem (PA) [96, 99].

Przez odpowiedni dobór wartości pH próbki można w znacznym stopniu poprawić czułość procedury analitycznej, opartej na technice SPME. Obniżając wartość pH próbki (do $\text{pH} \approx 2$), dodając kwasu [12], można cofnąć dysocjację kwaśnych analitów i w ten sposób

zwiększyć ułamek analitów w fazie nadpowierzchniowej. Dodatek soli nieorganicznych, np. siarczanu litu [100], wodorosiarczanu sodu [10] czy chlorku sodu [10, 12, 99, 101, 102], wpływa na wzrost siły jonowej roztworu, co zmniejsza rozpuszczalność związków z grupy KKA w próbce wody, i tym samym zwiększa się ułamek analitów ekstrahowanych do włókna. W **Tabeli 4** przedstawiono parametry procesu ekstrakcji za pomocą włókna ekstrakcyjnego urządzeniem do SPME związków z grupy KKA z różnych próbek stałych, ciekłych i gazowych.

Technika mikroekstrakcji do pojedynczej kropli opiera się na prostej zasadzie działania i użytkowania, dlatego też przyciągnęła znaczną uwagę na przełomie ostatnich lat. Ponadto w porównaniu z tradycyjną techniką ekstrakcji ciecz-ciecz, stosunek stosowanego rozpuszczalnika do próbki wody jest bardzo mały, co czyni ją przyjazną środowisku [103-105].

W przypadku tej techniki SDME wykorzystuje się zdolność utrzymania mikrokropli organicznego rozpuszczalnika na końcu igły strzykawki, która zanurzona jest w próbce badanej (DI) bądź umieszczona w fazie nadpowierzchniowej próbki (HS). Organiczne zanieczyszczenia ulegają podziałowi między próbkę wody i fazę organiczną. Kiedy ekstrakcja zostaje zakończona, mikrokropla zostaje cofnięta do igły strzykawki i wprowadzana do chromatografu gazowego w celu dalszej analizy. Procedurę analityczną, opartą na technice HS-SDME i chromatografii gazowej (GC-FID) stosowano do oznaczania wolnych związków z grupy KKA (C2-C5), powstających podczas procesu utleniania asfaltenów obecnych w ropie naftowej.

Zbadano i zoptymalizowano takie warunki przeprowadzenia mikroekstrakcji jak: rodzaj i objętość kropli ekstrakcyjnej (3 μ L 1- butanol), czas ekstrakcji (20min), szybkość mieszania próbki (1000 rpm), efekt wysalania i pH próbki (NaCl, pH<2). Procedura ta charakteryzuje się zadawalającą liniowością i powtarzalnością (od 3,7 do 5,0%).

Wartości liczbowe takiego parametru jakim jest granica wykrywalności wahały się od 0,02 mg/L dla kwasu walerianowego do 0,3 mg/L dla kwasu octowego [105].

Brak jest jednak doniesień literaturowych na temat zastosowania techniki SDME w celu oznaczenia zawartości związków z grupy KKA w wodnych próbkach środowiskowych.

Ciągłe poszukiwanie nowych procedur przygotowania próbek prowadzi do opracowywania nowych technik ekstrakcyjnych, których główną zaletą jest krótki czas analizy związków, które występują w badanych próbkach w małych stężeniach i tylko nieznaczne zużycie rozpuszczalnika w przeliczeniu na jedną analizę.

Tabela 4. Informacje literaturowe na temat zastosowania techniki SPME do pobierania związków z grupy KKA z próbek wodnych i stałych.

Analit*	Rodzaj próbki	Derywaty-zacja	Sposób ekstrakcji	Typ włókna	Desorpcja termiczna	Objętość próbki [mL]	Wysolenie	Czas [min]	Szybkość mieszania [rpm]	Temp. [°C]	Oznaczenie końcowe	Odnosi-nik
C2 C3 C4 C5 C6 C7	Ścieki miejskie	-	HS-SPME	PDMS-CAR 75 μm	5 min (300°C)	10 lub 20	NaCl	20	1200	25	GC-FID	[12]
C2 C3 C4 C5 C6 C7	Ścieki miejskie	-	HS-SPME	PDMS-CAR 75 μm	5 min (300°C)	10	NaCl	20	1200	25	GC-NCI-MS GC-PCI-MS (CH ₄)	[13]
C2 C3 iC4 C4 iC5 C5 C6 C7	Ścieki z fermy trzodek chlewnej	-	DI-SPME	CW-DVB 65 μm	3 min	4	-	20	1000	25	GC-MS	[15]
C2 C3 iC4 C4 iC5 C5 C6 C7	Odchody bydłce	-	HS-SPME	PDMD-CAR 75 μm PDMS-CAR/DVB 50/30 μm	3 min (300°C)	10	NaCl	15	+	35	GC-MS	[87]

*C2-kwas octowy, C3-kwas propionowy, iC4-kwas izomasłowy, C4-kwas masłowy, iC5-kwas izowalerianowy, C5-kwas walerianowy, C6-kwas kapronowy, C7-kwas enantowy, C8-kwas kaprylowy

Tabela 4. ciąg dalszy.

Analit*	Rodzaj próbki	Derywaty- zacja	Sposób ekstrakcji	Typ włókna	Desorpcja termiczna	Objętość próbki [mL]	Wysolenie	Czas [min]	Szybkość mieszania [rpm]	Temp. [°C]	Oznaczenie końcowe	Oдно- nik
C2 C3 iC4 C4 iC5 C5 C6	Osad ściekowy	-	HS-SPME	PDMS/DVB/CAR 50/30 μm	10 min (260°C)	2	-	30	-	40	GC-MS	[88]
C2 C3 C4 iC5 C5	Ścieki z obszarów podmokłych	-	HS-SPME	PA 85 μm	3 min (250°C)	20	NaCl	20	+	25	GC-FID	[89]
C2 iC5	Ścieki z obszarów podmokłych	-	HS-SPME	PDMS-CAR 75 μm	5 min (300°C)	10	NaCl	20	+	25	GC-NCI- MS GC-PCI-MS (CH ₄)	[90]
C2 C3 iC4 C4 C5 C6 C7 C8	Odchody	-	HS-SPME	PDMS-CAR 75 μm	5 min (300°C)	-	-	5	+	20	GC-MS	[91]

Tabela 4. ciąg dalszy.

Analityt*	Rodzaj próbki	Derywaty- zacja	Sposób ekstrakcji	Typ włókna	Desorpcja termiczna	Objętość próbki [mL]	Wysolenie	Czas [min]	Szybkość mieszania [rpm]	Temp. [°C]	Oznaczenie końcowe	Oдно- nik
C2 C3 iC5 C6	Powietrze wydychane przez bydło	-	HS-SPME	PDMS-DVB/ CAR50/ 30 µm	7 min (250°C)	28 310	-	15	-	30	^(a) GC-MS-O	[92]
C2 C3 iC4 C4 C5 C6	Pył z chlewni	-	HS-SPME	PDMS-CAR 85 µm	40 min (260°C)	40	-	180	-	25	GC-MS-O	[93]
C2 C3 iC4 C4 iC5 C5 C6	Pył z chlewni	-	HS-SPME	PDMS- CAR 75 µm	30÷60 min (280°C)	10	-	30	-	80	GC-MS	[94]
C2 C3 C4 C5	Powietrze	In situ/SPME (PDAM)	DI-SPME	<u>Wolne kwasy:</u> PA 85 µm <u>Pochodne</u> <u>PDAM:</u> PA	5 min	40	-	180÷ 240	+	-	GC-FID GC-ECD GC-ITMS	[95]

(a) chromatograf gazowy z detektorem mas i olfaktometrycznym (GC-MS-O)

Tabela 4. ciąg dalszy.

Analit*	Rodzaj próbki	Derywaty- zacja	Sposób ekstrakcji	Typ włókna	Desorpcja termiczna	Objętość próbki [mL]	Wysolenie	Czas [min]	Szybkość mieszania [rpm]	Temp. [°C]	Oznaczenie końcowe	Odnos- nik
C2 C3 C4 C5 C6 C7	Próbki wody powietrze	In situ/SPME (PDAM)	DI-SPME HS-SPME	<u>Wolne kwasy:</u> PA 95 µm <u>Pochodne PDAM:</u> PA	Wolne kwasy: 3 min <u>Pochodne PDAM:</u> 4 min	-	-	-	-	-	GC-FID	[97]
C2	Próbki wodne	Octan benzylu	HS-SPME	PA	5 min (250°C)	3	-	30	-	25	GC-FID	[96]
C2 C3 C4 C5	Woda	In situ/SPME (PDAM)	HS-SPME	<u>Pochodne PDAM:</u> PA	5 min	-	-	60	-	-	GC-FID GC-ECD	[95]
C2 C3 iC4 C4 iC5 C5 C6	Odchody	In situ/SPME (PDAM)	HS-SPME	PA 85 µm	4 min	-	NaCl	-	-	-	GC-MS	[98]

2.3. Derywatywacja analitów

Oznaczanie wolnych kwasów z grupy KKA w przypadku typowych próbek środowiskowych jest często trudne z uwagi na niskie wartości stężeń analitów a wysokie substancji przeszkadzających [95]. Duża polarność i zdolność do odszczepiania protonu może prowadzić do silnego oddziaływania wolnych związków z grupy KKA z elementami układu chromatograficznego i w konsekwencji dawać niesymetryczne, ogonujące piki. To z kolei utrudnia oznaczanie i pogarsza jakość otrzymanych wyników. Wprowadzenie etapu chemicznej derywatywacji umożliwia rozwiązanie tego problemu. Derywatywacja czyli przeprowadzenie kwasów w pochodne (w szczególności w estry), które charakteryzują się lepszymi właściwościami chromatograficznymi. Wymiana wodoru wolnej grupy karboksylowej na odpowiednio dobrany fragment daje związki o innych właściwościach zarówno fizycznych jak i chemicznych. Wynikiem tego jest podwyższenie lotności oraz obniżenie polarności i reaktywności analitów, a co za tym idzie poprawienie jakości pików chromatograficznych [96, 100, 106, 107]. Przyczynia się to do zwiększenia czułości i selektywności, a tym samym do obniżenia wartości liczbowej granicy oznaczalności, szczególnie jeśli dobieramy odpowiedni detektor i grupę wprowadzaną do kwasu.

W przypadku oznaczania związków z grupy KKA z wykorzystaniem chromatografii gazowej, proces derywatywacji można przeprowadzić przed wprowadzeniem analitów do chromatografu lub w komorze dozownika. Istnieje także możliwość przeprowadzenia analitów z grupy KKA w pochodne bezpośrednio w próbce wodnej [95]. W przypadku stosowania techniki SPME derywatywację można przeprowadzać nasycając włókno odczynnikami derywatyżującymi [99].

W **Tabeli 5** przedstawiono klasyfikację technik przekształcania analitów w pochodne ze względu na miejsce prowadzenia procesu.

Większość odczynników derywatyżujących jest wrażliwa na obecność wody w próbce, dlatego ekstrakcja analitów z matrycy pierwotnej jest często niezbędna przed procesem przekształcania kwasów alkanomonokarboksylowych w pochodne.

Przykładem jest reakcja metylowania za pomocą np. metanolu z dodatkiem trifluorku boru (BF_3) jako katalizatora [108], w wyniku, której powstają estry metylowe kwasów, które są mało stabilne w roztworach wodnych i konieczna jest ich izolacja przed dalszą analizą.

Natomiast skutecznymi odczynnikami alkilującymi anality z grupy KKA w próbce wodnej są 1-pentafluorofenyldiazoetan (PFPE) i bromek pentafluorobenzylu (PFBBBr).

Tabela 5. Klasyfikacja technik derywatywacji ze względu na miejsce prowadzenia procesu.

Derywatywacja	Charakterystyka	Odnosićnik
Bezpośrednio w próbce „in situ”	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Dodanie do próbki pierwotnej odczynnika derywatyzyzującego, ▪ Po zajściu reakcji, pochodne izoluje się stosując odpowiednie techniki przygotowania próbek (SPME, SPE) 	[95]
Włókno urządzenia do SPME	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Powierzchnia włókna jest impregnowana odczynnikiem derywatyzyzującym (kwasy muszą być wyizolowane z próbki przed derywatyzyzacją) 	[95]
W komorze dozownika chromatografu	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Wprowadzenie do dozownika chromatografu gazowego uprzednio wyekstrahowanego analitu wraz z substancją derywatyzyzującą, ▪ Dzięki wysokiej temperaturze panującej wewnątrz dozownika reakcja zachodzi szybko, ▪ Ograniczenie strat analitu w wyniku wyeliminowania etapu ekstrakcji pochodnej. 	[78, 95]

Dzięki temu nie ma konieczności zmiany środowiska na rozpuszczalnik organiczny [95]. Wprowadzenie grupy pentafluorobenzylowej w procesie derywatyzyzacji jest szeroko stosowane w oznaczaniu związków z grupy KKA za pomocą GC sprzężonej z detektorem wychwytu elektronów (ECD) lub spektrometrem mas.

W Tabeli 6 przedstawiono krótką charakterystykę odczynników stosowanych do derywatyzyzacji związków z grupy KKA.

Wprowadzenie etapu derywatyzyzacji do opracowywanych metodyk oznaczania związków z grupy KKA w próbkach środowiskowych, wiąże się jednak ze zwiększeniem praco- i czasochłonności procesu analitycznego. Tak jak każdy dodatkowy etap, może prowadzić do powstawiania produktów ubocznych, utrudniających przebieg oznaczeń, a także może stanowić dodatkowe źródło błędów.

Ponadto obecność wody w próbce może wpłynąć na przebieg typowych reakcji derywatyzyzacji. Jest to dodatkowe utrudnienie, którego warto unikać w miarę możliwości.

Mimo iż przeprowadzenie analitów w pochodne w przypadku chromatografii gazowej pozwala na uzyskanie lepszej separacji, zminimalizowania efektu ogonowania pików oznaczania związków z grupy KKA na niższym poziomie stężeń i z lepszą precyzją, etap

derywatywacji powinien być stosowany raczej w takich przypadkach, w których nie ma innej możliwości oznaczenia analitu lub gdy istotną kwestią staje się poprawa selektywności i czułości oznaczenia.

Tabela 6. Odczynniki stosowane do derywatywacji związków z grupy KKA.

Odczynnik derywatyzujący	Kwas	Rodzaj próbki	Oznaczenie końcowe	Oдноśnik
PDAM <i>pirenylodiazometan</i>	C2-C5	woda	SPME-GC-FID	[95]
PFBBr <i>bromek pentafluorobenzylu</i>	C2-C5	woda	GC-ECD	[95]
PFPDE <i>1 - pentafluorofenylo-diazoetan</i>				
PDAM <i>pirenylodiazometan</i>	C2-C5	powietrze	GC-FID	[95]
PFPDE <i>1 - pentafluorofenylo-diazoetan</i>				
C₇H₇Br <i>Bromek benzylu</i>	C2	woda	HS-SPME GC-FID	[96]
PDAM <i>pirenylodiazometan</i>	C2-C3, iC4, C4, iC5, C5-C6	fekalia	In situ/ HS-SPME-GC-MS	[107]
BSTFA <i>N,O-bis(trimetlosililo)trifluoro-acetamid</i>	C5-C17	powietrze	GC-FID	[78]
PFBHA <i>o-2,3,4,5,6-pentafluorobenzylhydroksyloamina</i>	C2-C3	woda	HS-GC-MS	[109]
PFB <i>α-2,3,4,5,6 -pentafluorotoluen</i>	C2-C5	fekalia	GC-ECD	[110]
DNPH <i>2,4-dinitrofenylohydrazyna</i>	C2-C3	woda morska	HPLC-UV/Vis	[109]
DNPH <i>2,4-dinitrofenylohydrazyna</i>	C1-C4	powietrze	HPLC-detektor spektrofotometryczny	[111]
EDAN <i>N-(1-naftylo)-etylenodiamina</i>				
EDC <i>N-(3-dimetyloaminopropylo)-N-etylokarbodiimid</i>	C1-C5	woda	HPLC-UV	[112]
Metanol z dodatkiem H ₂ SO ₄	C1-C3, iC4, C4	kompost	HS-GC-FID	[16]

2.4. Techniki analityczne wykorzystywane na etapie oznaczeń końcowych

O wyborze odpowiedniej metodyki analitycznej stosowanej do oznaczania związków z grupy KKA decyduje głównie cel prowadzonych badań, wymagana dokładność i precyzja oznaczeń, skład matrycy, dostępna aparatura, poziom zawartości oznaczanych kwasów w próbce, czas i koszt wykonania analizy [83].

W celu określenia sumarycznej zawartości związków z grupy KKA stosuje się metody oparte na miareczkowaniu [68-72], które poprzedzone są zazwyczaj etapem izolacji analitów z matrycy pierwotnej za pomocą metod destylacyjnych [30, 49, 73, 74, 75]. Metoda miareczkowania bezpośredniego polega na zobojętnieniu kwasów powstałych w wyniku hydrolizy badanej próbki w środowisku kwaśnym ($\text{pH}=3,5$ lub $5,1$ [113]) za pomocą roztworu wodorotlenku sodu (NaOH). Choć zaletą tej metody jest prostota wykonania, obarczona jest ona znacznym błędem, wynikającym z wpływu licznych substancji przeszkadzających, obecnych w wodnych próbkach środowiskowych.

Destylacja w połączeniu z techniką miareczkowania destylatu wodorotlenkiem sodu w obecności wskaźnika, charakteryzują się jednak małą dokładnością i selektywnością oraz wysoką wartością liczbową granicy oznaczalności. Odzysk kwasów z próbki pierwotnej wynosi zaledwie ok. 70% [9, 114]. Ponadto wadą tej metody jest konieczność stosowania większych ilości próbek niż zazwyczaj są dostępne.

Oznaczanie indywidualnych kwasów przeprowadza się wykorzystując techniki separacyjne, a przede wszystkim chromatograficzne.

Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) [19, 109, 111, 115-125] i chromatografia jonowa (IC) [112, 115, 126-131] często wymagają dość skomplikowanej procedury oczyszczania próbki i użycia odczynnika derywatyzującego, aby selektywnie zwiększyć czułość i tym sposobem obniżyć wartość liczbową granicy oznaczalności [3, 10, 112, 51]. Jeśli zadanie analityczne obejmuje oznaczenie również kwasu mrówkowego i kwasów dikarboksylowych, odpowiednie wydaje się być stosowanie chromatografii jonowej (IC) lub elektroforezy kapilarnej (CE) [51, 132-136]. Jednak czułość tych technik jest generalnie znacznie mniejsza w porównaniu z techniką GC, a ponadto są to techniki mniej rozpowszechnione i trudniejsze w wykorzystaniu.

Najszerzej dostępną i najlepiej opanowaną jest jednak technika GC, która w połączeniu z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID), a szczególnie ze spektrometrem mas (MS) daje narzędzie o bardzo wysokim potencjale analitycznym i identyfikacyjnym.

Za pomocą chromatografii gazowej można oznaczać kwasy w postaci wolnej [10, 15, 51] lub po przeprowadzeniu w pochodne, co nie tylko poprawia jakość pików chromatograficznych i tym samym rozdzielczość, ale pozwala sterować selektywnością i czułością poprzez dobór grupy funkcyjnej wprowadzanej do analitu [12, 51, 100].

Chromatografia gazowa może być z powodzeniem stosowana w przypadku małych stężeń związków z grupy KKA w ściekach (<100 µg/L).

Próbka ścieków na ogół nie nadaje się do bezpośredniego wprowadzenia do kolumny chromatograficznej. Obok związków z grupy KKA wodne próbki środowiskowe zawierają wiele substancji organicznych, które mogą wpływać na wynik oznaczeń. Bezpośrednie wprowadzenie próbki wodnej, charakteryzującej się złożonym składem matrycy do chromatografu gazowego, mogłoby powodować wiele niekorzystnych efektów, np. podwyższenie poziomu szumu urządzenia, niszczenie kolumny bądź zanieczyszczenie całego układu. Skutkiem tego byłoby pogorszenie stopnia rozdzielania pików, a tym samym wzrost wartości liczbowej granic wykrywalności i oznaczalności. Ponadto woda wprowadzana do układu chromatograficznego w istotny sposób wpływa na żywotność faz stacjonarnych, szczególnie faz typu glikolu polietylenowego, które są szczególnie polecane do rozdzielania lotnych kwasów [51].

Chromatografia gazowa z detekcją płomieniowo-jonizacyjną, która jest najczęściej stosowaną techniką do oznaczania związków z grupy KKA [51, 54-56, 137, 138-145]. Ogromną zaletą tej techniki jest brak skomplikowanego etapu przygotowania próbki, które w zasadzie ogranicza się do odwirowania lub odfiltrowania. Dzięki temu technika ta pozwala zaoszczędzić czas oraz zmniejszyć koszty na etapie przygotowania próbki do analizy. Istotnym aspektem tej metodyki jest konieczność doboru odpowiedniej kolumny chromatograficznej, odpornej na wodę, a jednocześnie zapewniającej uzyskanie chromatogramów dobrej jakości, a więc symetrycznych, dobrze rozdzielonych pików chromatograficznych, co w tym przypadku jest trudne (kłopotliwe).

W takim przypadku koniecznym etapem analizy staje się wstępne przygotowanie próbek, polegające przede wszystkim na selektywnym wyizolowaniu analitów z próbki pierwotnej i przeniesieniu ich do matrycy zgodnej z wybranym układem GC [51].

2.4.1. Kolumny chromatograficzne

Dobór odpowiedniej kolumny chromatograficznej jest niezwykle istotny dla rozdzielania złożonych mieszanin na poszczególne składniki oraz ich jakościowego i ilościowego oznaczania. Generalnie cały szereg przykładowych separacji znajduje się w

materiałach firm oferujących kolumny chromatograficzne i w publikacjach naukowych. Ogólnie wiadomo, że fazy bardzo polarne są mniej stabilne i służą do analizy związków o węższym zakresie temperatur wrzenia oraz mają na ogół gorszą sprawność. Natomiast kolumny z fazą niepolarną są bardziej odporne na utlenianie, łatwiej znoszą niewłaściwe przechowywanie i nieuszczelnienia układu chromatograficznego [83].

Kolumna chromatograficzna powinna charakteryzować się wysoką sprawnością oraz stabilnością termiczną filmu fazy stacjonarnej. Cechą fazy stacjonarnej powinno być różnicowanie retencji poszczególnych składników analizowanej mieszaniny próbki (selektywność) [83].

Wolne krótkołańcuchowe kwasy alkanomonokarboksylowe charakteryzują się wysoką polarnością i mają tendencję do tworzenia wiązań wodorowych, a te z kolei mogą prowadzić do tzw. „ogonowania” lub niecałkowitego rozdzielania pików w wyniku adsorpcji w kolumnie chromatograficznej.

Do oznaczania krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksylowych stosuje się głównie kolumny kapilarne, ze względu na ich dużą sprawność, małe zużycie gazu nośnego, a także znaczne skrócenie czasu analizy. Najczęściej stosuje się kolumny z polarną fazą stacjonarną, ale mogą być również zastosowane kolumny z wypełnieniem niepolarnym, czy raczej średnio polarnym, w przypadku oznaczania estrów związków z grupy KKA [50]. Polecaną fazą stacjonarną stosowaną do rozdzielania wolnych krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksylowych jest glikol polietylenowy (PEG), w formie cienkiego filmu na ściankach kolumny [54, 62, 66, 82, 132, 144-153].

Poważnym problemem w oznaczaniu wolnych krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksylowych jest możliwość ich adsorbowania się w dozowniku bądź w kolumnie, co może w znacznym stopniu pogorszyć jakość wyników.

Najbardziej polecaną fazą stacjonarną do rozdzielania lotnych kwasów jest przede wszystkim glikol polietylenowy modyfikowany np. przez działanie kwasem nitrotereftalowym, co prowadzi do dezaktywacji miejsc o charakterze zasadowym [10, 15, 61, 63, 76, 82, 89, 141-143, 154-173]. W takim przypadku kwasy nie ulegają adsorpcji w kolumnie. Glikol polietylenowy to powszechnie stosowana faza stacjonarna zarówno w kolumnach kapilarnych jak i pakowanych. W przypadku kolumn pakowanych, glikol polietylenowy (np. Carbowax 4000 [174]) znajduje się na stałym nośniku, głównie typu diatomitowego, Chromosorb W [14, 174] lub Chromosorb 101 [175].

Wymienione nośniki są polecane, gdyż można rozdzielać związki o charakterze polarnym, ze względu na małą zdolność adsorpcyjną powierzchni. Dzięki modyfikacji, polegającej na

przemyciu nośnika za pomocą kwasu np. 1% kwasem ortofosforowym [14] lub kwasem tereftalowym [174], następuje zmniejszenie oddziaływania nośnika z ciekłą fazą stacjonarną i zmniejszenie niekorzystnego wpływu powierzchni nośnika na przebieg procesu chromatograficznego, co przejawia się rozmyciem i asymetrią pików, szczególnie w przypadku związków polarnych [50, 60].

W celu lepszego unieruchomienia absorbenta (fazy ciekłej np. 50% metylo– 50% fenylosiloksanu) oraz zminimalizowania oddziaływań nośnika (Chromosorbu W) z rozdzielanymi związkami z grupy KKA przeprowadzonymi w estry pentafluorobenzylowe, powierzchnię nośnika poddawano procesowi silanizacji poprzez traktowanie dimetylochlorosilanem (DCMS) [110]. Natomiast w przypadku rozdzielania estrów trimetylosililowych lotnych kwasów monokarboksylowych zastosowano kolumnę kapilarną o średnio polarnej fazie ciekłej (14% policyjanopropylo – 86% metylosiloksan) [16, 78].

Polimery typu polisiloksanów są powszechnie stosowane jako fazy stacjonarne w kolumnach kapilarnych. W przypadku rozdzielania analitów z grupy KKA w postaci wolnej lub po przeprowadzeniu w pochodne stosuje się raczej polidimetylosiloksany, w których część grup niepolarnych zastąpione jest grupami polarnymi takimi jak cyjanopropylo [176], fenylo [77, 79, 87, 88, 96, 97, 177-179] oraz trifluoropropylo [83] lub dwiema różnymi.

W **Tabeli 7** przedstawiono krótką charakterystyką kolumn kapilarnych stosowanych do oznaczania krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksylowych.

2.4.2. Detekcja związków z grupy KKA

Jedną z głównych tendencji związanych z analityką śladów jest dążność do zredukowania liczby etapów poprzedzających oznaczenie, a tym samym opracowanie techniki chromatograficznej, która przeprowadzana jest z wykorzystaniem czułych i selektywnych detektorów.

Chromatografia gazowa, która odgrywa ważną rolę w analityce krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksylowych, sprzężona jest najczęściej z takimi systemami detekcji jak:

- Detektor płomieniowo- jonizacyjny,
- Spektrometr mas,
- Detektor wychwyty elektronów [51].

Tabela 7. Ogólna charakterystyka kolumn kapilarnych (faz stacjonarnych) najczęściej stosowanych do rozdzielania związków z grupy KKA.

Faza stacjonarna	Charakterystyka	Postać rozdzielanych związków z grupy KKA	Nazwa handlowa kolumny	Odnosićnik
Glikol polietylenowy	stacjonarna faza polarna	wolna	Stabilwax,	[82]
			DBWAX	[54,144]
			ZBWAX	[62]
			HP-INNOwax	[66,146,147]
			CP-Wax 52 CB	[132,145,148-153]
Glikol polietylenowy modyfikowany kwasem nitrotereftalowym	stacjonarna faza polarna	wolna	TR-FFAP	[154]
			PE-FFAP	[155]
			Stabilwax-DA	[82,88,89,156]
			EC 1000	[157]
			HP-FFAP	[158-163]
			DB-FFAP	[141-143, 164-167]
			Nukol	[61, 63, 76, 168, 169, 171]
			FFAP	[10, 170, 172]
Biscyjanopropylo polisiloksanowa	stacjonarna faza polarna	po derywatywacji	BP-21	[173]
			CP-SIL 88	[176]
5 %-difenyl - 95 % dimetylopolisiloksanowa	Stacjonarna faza niepolarna	wolna/po derywatywacji	CP-Sil 8CB	[178, 179]
			HP-5MS	[79, 87, 177]
			DB-5MS	[77, 96]
			SPB-5	[97]
			ZB-5 MS	[88]
14%cyjanopropylo-86%metylosiloksanowa	ciekła faza średnio-polarna	po derywatywacji	RTX-1701,	[16]
			HP-1701	[78]
6%cyjanopropylo-94%dimetylopolisiloksanowa	ciekła faza średnio-polarna	wolna/po derywatywacji	Rtx-624	[80, 180]
100% dimetylopolisiloksan	stacjonarna faza niepolarna	wolna/po derywatywacji	Rtx-1	[181]
			DB-1	[96, 182]
Trifluoropropylo-metylopolisiloksanowa	średnio-polarna	wolna	Rtx-200	[138]

Detektor płomieniowo-jonizacyjny jest jednym z najczęściej stosowanych detektorów w chromatografii gazowej do oznaczania związków z grupy KKA w próbkach ciekłych. Detektor ten wykrywa wszystkie związki organiczne, z wyjątkiem kwasu mrówkowego i disiarczku węgla [1].

Charakteryzuje się on bardzo wysoką czułością (0,1–10 ng) i szerokim zakresem liniowości (10^6 - 10^7). Detektor FID jest czuły na substancje, które ulegają jonizacji w płomieniu powietrzno – wodorowym. Selektywność ta daje wiele korzyści, np. wówczas, gdy za pomocą detektora FID analizowane są ciekłe próbki, a piki chromatograficzne oznaczanych analitów i wody nakładają się na siebie.

Czułość detektora FID jest największa dla węglowodorów i jest proporcjonalna do liczby atomów węgla w cząsteczce [83].

W analityce badań rutynowych związków z grupy KKA, preferowane są bezpośrednie metody analizy, w których ciekła próbka możliwie natychmiast po jej pobraniu zostaje wprowadzona do kolumny chromatograficznej. Bezpośrednią metodę analizy, przede wszystkich śladowych ilości analitów z grupy KKA, stosuje się zazwyczaj, gdy stężenia oznaczanych kwasów nie są wysokie oraz gdy matryca próbki umożliwia bezpośrednie wprowadzenie jej na kolumnę chromatograficzną.

W takim przypadku najczęściej proponowanym układem jest chromatograf gazowy z detekcją płomieniowo-jonizacyjną [83]. Przy użyciu detektora FID można oznaczać związki z grupy KKA w postaci wolnej [10, 12-14, 56, 66, 82, 88, 97, 138, 145] oraz po przeprowadzeniu w estry trimetylosililowe zawierające powyżej czterech atomów węgla w cząsteczce [100] oraz kwas octowy po przeprowadzeniu go w octan benzylu [96].

W **Tabeli 8** zestawiono informacje o wartościach liczbowych granic wykrywalności analitów z grupy KKA w przypadku stosowania techniki GC-FID.

W przypadku detektora FID, uzyskano niższe wartości liczbowe parametru LOD po derywatywacji kwasu propionowego i masłowego pirenolodiazometanem [95] niż dla kwasów oznaczanych w postaci wolnej [95, 97].

Na szczególną uwagę zasługuje detektor mas, który może pracować jako uniwersalny (identyfikacja nieznanymi substancjami) albo selektywny (detekcja jonów charakterystycznych dla oznaczanego związku).

Tabela 8. Wartości liczbowe granic oznaczalności dla znanych metodyk oznaczanych związków z grupy KKA w przypadku stosowania techniki GC-FID na etapie oznaczeń końcowych.

Metodyka analityczna	Derywatyżacja	Nazwa handlowa kolumny	Jednostka	LOD							Oдноśnik	
				C2	C3	iC4	C4	iC5	C5	C6		C7
SPE-GC-FID	-	HP-INNOWax	mg/L	0,0006	0,0021	-	0,0004	0,0005	0,0003	0,0006	-	[66]
HS-SPME-GC-FID (PA)	-	SPB-5	mg/L	0,760	0,280	-	0,122	-	0,0031	0,0005	0,0001	[95, 97]
HS-SPME-GC-FID (PA)	PDAM	SPB-5	mg/L	-	0,0025	-	0,0014	-	-	-	-	[95]
HS-GC-FID	metanol+H ₂ SO ₄	Rtx-1701	mg/kg	5	1	10	1	-	5	-	-	[16]
HS-GC-FID	-	FFAP	mg/L	3,7	3,3	0,9	0,3	0,7	0,3	-	-	[10]
DAI-GC-FID	-	Rtx-200	mg/L	8	5	-	5	-	5	5	-	[138]
DAI-GC-FID	-	Nukol	mg/L	5	5	5	5	5	5	5	5	[61]
DAI-GC-FID	-	DB-FFAP	mg/L	1	-	-	-	-	-	-	-	[56]
HS-SPME-GC-FID (PDMS/CAR)	-	TR-FFAP	mg/L	0,675	0,054	-	0,006	-	0,046	0,019	0,038	[12, 13]
HS-SPME-GC-FID (PA)	-	Stabilwax-DA	mg/L	0,467	0,062	-	0,019	0,003	0,012	0,019	0,003	[88]
LLE-GC-FID	-	Chromosorb WAW	mg/L	3,61	0,331	0,415	0,405	0,495	0,494	0,616	0,692	[14]
HS-NTE-GC-FID	-	Stabilwax-DA	mg/L	0,0872	-	-	-	-	-	-	-	[82]
HS-SPME-GC-FID (PA)	C ₇ H ₇ Br	DB5	mg/L	0,0156	-	-	-	-	-	-	-	[96]

Dla związków o wysokiej i średniej lotności, właściwą techniką jest chromatografia gazowa połączona ze spektrometrią mas z jonizacją elektronową (EI) [63, 77, 172, 179, 180, 183, 184] łączy bowiem w sobie wysoką sprawność rozdzielania chromatograficznego z dużym potencjałem identyfikacyjnym spektrometrii mas. Energię elektronów jonizujących można zmieniać w zakresie od 5 do 100 eV.

W przypadku identyfikacji lotnych kwasów przeważnie stosowano energię 70 eV. Zaletą jonizacji elektronowej jest możliwość precyzyjnego kontrolowania i łatwego odtwarzania energii elektronów [83]. W analityce związków z grupy KKA stosowano także technikę jonizacji chemicznej (CI). Technika jonizacji chemicznej w porównaniu do EI, umożliwia uzyskanie jonu cząsteczkowego o większej intensywności w porównaniu do jonów fragmentacyjnych w technice EI. Jonizacja substancji następuje na skutek zderzeń z tzw. jonami pierwotnymi występującymi w źródle jonów (najczęściej są to jony gazów obojętnych, metanu [50], amoniaku [12, 13]).

W przypadku zastosowania odpowiednich warunków jonizacji chemicznej, aparat może rejestrować zarówno widma jonów dodatnich (PCI), jak i ujemnych (NCI). Widma te mają charakter komplementarny i są szczególnie przydatne w przypadku oznaczania lotnych kwasów w próbkach środowiskowych [83].

Detekcja typu MS stwarza możliwości osiągnięcia wysokiej czułości (1 –10 ng dla trybu przemiatacia całego widma-SCAN); 1 – 10 pg dla trybu monitorowania wybranych jonów-SIM) i selektywności, co zmniejsza możliwość popełnienia błędów jakościowych i ilościowych analizy. Cechują się także szerokim zakresem liniowości (10^5 - 10^6) [83]. Dodatkowo widma mas, zawierające jony fragmentacyjne charakterystyczne dla danych związków, stanowią istotne źródło wiedzy o naturze analitu i podwyższają znacząco wiarygodność identyfikacji.

W **Tabeli 9** zestawiono informacje o wartościach liczbowych granic wykrywalności analitów z grupy KKA w przypadku stosowania techniki chromatografii gazowej ze spektrometrią mas oraz z detekcją wychwytu elektronów na etapie oznaczeń końcowych.

Analizując dane zawarte w **Tabeli 9** można stwierdzić, że zwiększoną selektywność i obniżoną wartość liczbową granicy oznaczalności można było uzyskać, stosując spektrometr mas ze źródłem ujemnej jonizacji chemicznej, w przypadku kwasów w postaci wolnej.

Tabela 9. Wartości liczbowe granic oznaczalności dla znanych metodyk oznaczanych związków z grupy KKA w przypadku stosowania techniki GC-MS i GC-ECD na etapie oznaczeń końcowych.

Metodyka analityczna	Derywatywacja	Nazwa handlowa kolumny	Jednostka	LOD							Oдноśnik	
				C2	C3	iC4	C4	iC5	C5	C6		C7
HS-SPME-GC-NCI-MS (PDMS/CAR)	-	TR-FFAP	µg/L	150	5	-	2	-	2	6	5	[13]
HS-SPME GC-PCI-MS (PDMS/CAR)	-	TR-FFAP	µg/L	115	25	-	26	-	11	13	10	[13]
SPE- GC-PCI-MS	-	HP-INNOW _{ax}	µg/L	0,04	0,34	-	0,03	0,40	0,24	0,23	-	[122]
HS-SPME- GC-EI-MS (DVB/CAR/PDMS)	-	HP5MS	µg/L	1358	1441	0,11	0,97	1,8	0,056	4,5	0,017	[87]
DI-SPME- GC-EI-MS (DVB/CAR/PDMS)	-	Stabilwax-DA	mg/L	660	741	220	141	33,7	52,1	10,5	3,91	[15]
SPE- GC-EI-MS	-	HP-INNOW _{ax}	µg/L	0,009	0,040	-	0,025	0,010	0,002	0,005	-	[122]
HS-SPME-GC-ECD (PA)	PFB- Br	SPB-5	µg/L	-	-	-	0,5	-	0,1	-	-	[95]
HS-SPME-GC-ECD (PA)	PFPDE	SPB-5	µg/L	0,8	0,6	-	0,5	-	0,4	-	-	[95]

Detektory selektywne i specyficzne (reagujące na określoną grupę związków) są powszechnie wykorzystywane do oznaczania bardzo małych stężeń różnych związków w próbkach charakteryzujących się złożonym składem matrycy. Ma to duże znaczenie zwłaszcza dla próbek środowiskowych, gdzie oznaczenie wszystkich składników jest najczęściej niemożliwe przy użyciu standardowych kolumn chromatograficznych i uniwersalnych detektorów takich jak FID.

Modyfikowanie właściwości analitów z grupy KKA za pomocą szerokiej gamy odczynników do derywatywacji, umożliwia zwiększenie czułości i selektywności oznaczenia. W tym celu wykorzystuje się przede wszystkim detektory selektywne, czułe na określony, nowy fragment struktury analizowanego związku [184]. Przykładem może być wprowadzenie grupy pentafluorobenzylowej do krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksylowych i zastosowanie detektora wychwytu elektronów, który jest bardzo czuły na związki, zawierające atomy o dużym powinowactwie elektronowym, a w szczególności na związki halogenoorganiczne. Czułość i selektywność detektora ECD zależą od powinowactwa elektronowego związków, a przede wszystkim od dominujących grup funkcyjnych (atomów chlorowców i innych heteroatomów, grup estrowych, hydroksylowych i innych).

Przykładowo parametr ten w zależności od grupy funkcyjnej wynosi odpowiednio 0,1-10 pg (związki chlorowcowane), 1-100 pg (azotany); 0,1-2 ng (związki karbonylowe). Odpowiedź detektora ECD może się zmieniać w granicach od 1 do 10^7 w zależności od charakteru cząsteczki [83].

W literaturze opisanych jest kilka przykładów zastosowania chromatografii gazowej z detekcją wychwytu elektronów, które umożliwiają oznaczanie związków z grupy KKA po przeprowadzeniu w pochodne w reakcji z np. bromkiem pentafluorobenzylu [95] i 1-pentafluorofenyldiazoetanem [95].

Z danych zawartych w **Tabeli 9** wynika, że zwiększoną selektywność i obniżoną wartość liczbową granicy oznaczalności można uzyskać np. poprzez wprowadzanie fluorowanych grup funkcyjnych i zastosowanie detektora ECD. W ten sposób można zwiększyć czułość oznaczenia nawet o kilka rzędów wielkości.

Zastosowanie detektora FID, MS i ECD do oznaczania związków z grupy KKA, pozwala uzyskać selektywną detekcję i identyfikację poszczególnych kwasów na niskim poziomie stężeń. W wielu wypadkach niezbędne staje się jednak, przygotowanie próbki przed wprowadzeniem do chromatografu gazowego, co w znaczący sposób wpływa na obniżenie wartości parametru LOD, ale jednocześnie pogorszenie powtarzalności.

Z danych literaturowych przedstawionych w **Tabeli 8 i 9** wynika, że najniższą wartość liczbową granicy oznaczalności związków z grupy KKA rzędu tysięcznych i setnych $\mu\text{g/L}$ uzyskano przy zastosowaniu ekstrakcji do fazy stacjonarnej na etapie przygotowania próbki i chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas z jonizacją elektronową na etapie oznaczeń końcowych.

3. Podsumowanie

Przedstawione powyżej wiadomości na temat obecności krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksylowych w próbkach wodnych i stałych wskazują, że monitoring tych kwasów jest niezbędny w wielu sytuacjach. Można także stwierdzić, iż zróżnicowane poziomy stężeń (w tym również śladowe) i złożony skład matrycy próbek wodnych, najwłaściwszą techniką do zastosowania wydaje się być chromatografia gazowa, co potwierdza fakt, że większość opisanych dotychczas metodyk opiera się na jej wykorzystaniu na etapie oznaczeń końcowych.

Analizując zebrane dane literaturowe można stwierdzić, że najczęstszą metodą oznaczania związków z grupy KKA w próbkach wodnych i stałych jest chromatografia gazowa w połączeniu z detekcją płomieniowo- jonizacyjną.

Oznaczanie związków z grupy KKA w postaci wolnej ma tę niewątpliwą zaletę, że wyeliminowany jest dość kłopotliwy etap derywatyzacji. W przypadku oznaczania wolnych kwasów z wykorzystaniem techniki GC, stosowano dotychczas głównie kolumny pakowane i kapilarne z polarnymi fazami stacjonarnymi modyfikowanymi kwasami, aby zmniejszyć „ogonowanie” pików, a tym samym poprawić rozdzielczość i jakość wyników oraz obniżyć granicę oznaczalności.

W przypadku próbek mało obciążonych zanieczyszczeniami, ale zawierających możliwie wysokie stężenie analizowanych kwasów można stosować bezpośrednio dozowanie próbki wodnej. Najczęściej jednak wymagane jest dość kłopotliwe przygotowanie próbki do analizy. Posiadają one jednak pewne ograniczenia, uniemożliwiające ich zastosowanie w każdym przypadku.

Istnieje zatem ciągła potrzeba opracowywania nowych lub uaktualnienia stosowanych już metodyk do wykrywania i oznaczania krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksylowych.

II CEL PRACY

Zasadniczym celem niniejszej rozprawy jest opracowanie podstaw metodycznych, a następnie odpowiednich procedur oznaczania wolnych krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksylowych w próbkach wodnych i stałych za pomocą chromatografii gazowej. Istotnym etapem tych badań jest opracowanie sposobu izolacji i wzbogacania tych kwasów z próbek wodnych, z wykorzystaniem takich technik jak:

- destylacja,
- analiza fazy nadpowierzchniowej (**HS**),
- ekstrakcja ciecz-ciecz (**LLE**),
- mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej z fazy nadpowierzchniowej (**HS-SPME**).

Ponadto w ramach pracy podjęto próbę zastosowania metody bezpośredniego dozowania próbki wodnej do kolumny kapilarnej.

Program badawczy będący przedmiotem niniejszej rozprawy związany jest z realizacją następujących zadań:

• **Oceną możliwości oznaczania wolnych związków z grupy KKA, z wykorzystaniem takich procedur analitycznych jak:**

- bezpośrednie wprowadzanie próbki do chromatografu gazowego z detekcją płomieniowo-jonizacyjną (**GC-FID**)
- destylacyjne oczyszczanie i wzbogacanie połączone z chromatografią gazową z detekcją płomieniowo-jonizacyjną (**Destylacja- GC-FID**)
- ekstrakcja do fazy nadpowierzchniowej-chromatografia gazowa z detekcją płomieniowo-jonizacyjną (**HS-GC-FID**)
- mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej z fazy nadpowierzchniowej-chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (**HS-SPME-GC-MS**)
- ekstrakcja ciecz-ciecz-chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (**LLE-GC-MS**)

• **Opracowaniem tych nowych procedur analitycznych, które wiążą się z koniecznością realizacji takich zadań jak:**

- Dobranie optymalnych warunków analizy chromatograficznej (kolumna chromatograficzna, program temperaturowy, inne parametry pracy układu chromatograficznego)

- Zbadanie wpływu czynników na wydajność ekstrakcji związków z grupy KKA z wodnych próbek i wybór optymalnych warunków prowadzenia tego procesu (wysolenie próbki, czas ekstrakcji, itd.)
- Wyznaczenie parametrów walidacyjnych opracowanych procedur (granice wykrywalności i oznaczalności, zakresy liniowości, powtarzalność)
- Zastosowanie opracowanych procedur analitycznych do analizy próbek rzeczywistych, charakteryzujących się zróżnicowaną zawartością analitów z grupy KKA.

To zadanie badawcze zostało zrealizowane w trakcie badań metodycznych, z wykorzystaniem odpowiednich roztworów wzorcowych, których skład dostosowywano do wymogu każdej z opracowanych metodyk analitycznych.

III CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

2. 1. Odczynniki i wzorce

W **Tabeli 10** przedstawiono charakterystykę odczynników chemicznych, gazów i wzorców stosowanych do etapu przygotowania próbek.

Tabela 10. *Stosowane odczynniki i wzorce.*

WZORCE	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Kwas octowy $\geq 99,0$ % (Fluka, Szwajcaria) ▪ Kwas propionowy $\geq 99,5$ % (Fluka, Szwajcaria) ▪ Kwas masłowy $\geq 99,5$ % (Fluka, Szwajcaria) ▪ Kwas izomasłowy $\geq 99,5$ % (Fluka, Szwajcaria) ▪ Kwas 2-etylomasłowy $\geq 99,0$ % (Fluka, Szwajcaria) ▪ Kwas walerianowy $\geq 99,0$ % (Fluka, Szwajcaria), ▪ Kwas izowalerianowy $\geq 98,0$ % (Fluka, Szwajcaria) ▪ Kwas kapronowy $\geq 98,0$ % (Fluka, Szwajcaria) ▪ Kwas enantowy $\geq 99,0$ % (Fluka, Szwajcaria) ▪ Kwas kaprylowy $\geq 99,0$ % (Fluka, Szwajcaria) ▪ Wzorcowy roztwór kwasów alkanomonokarboksylowych (C1-C7) w wodzie, (Supelco, USA)
ODCZYNNIKI I GAZY	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Eter metylo – tert – butylowy cz.d.a. (Merck, Niemcy) ▪ Metanol cz.d.a. (Merck, Niemcy) ▪ Chlorek sodu cz.d.a. (P.P.H. „STANDARD” Sp. z o.o. Polska) ▪ Woda wysokiej czystości (uzyskana z aparatu Milipore QPLUS 185) ▪ Kwas siarkowy(VI) 95,0% cz.d.a. (Polskie Odczynniki Chemiczne POCh Gliwice) ▪ Gazy: hel (5.0), wodór, powietrze (Linde, Polska)

2. Roztwory i próbki wzorcowe

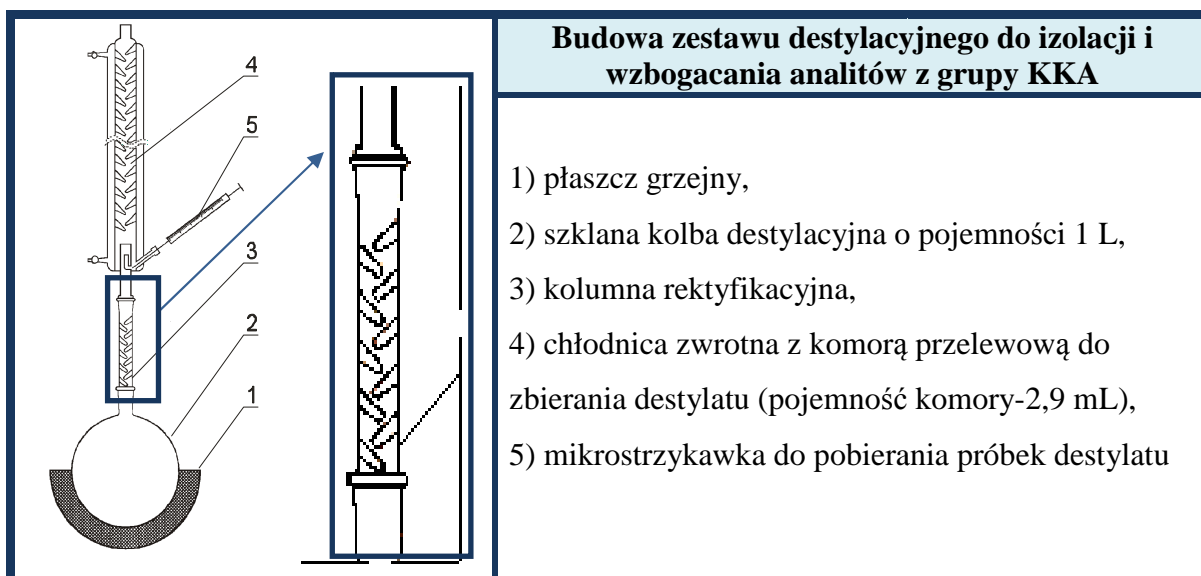
Roztwór podstawowy krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksylowych, otrzymano przez zmieszanie roztworów wyjściowych każdego kwasu w metanolu (MeOH), eterze metylo-*tert*-butylowym (MTBE) lub eterze dietylowym (DEE) o stężeniu 50 g/L. Stężenie każdego kwasu w roztworze podstawowym wynosiło 5000 mg/L. W zależności od metodyki, rozpuszczalnikiem był MeOH, MTBE lub DEE. Stosowano również wodny roztwór podstawowy mieszaniny kwasów C1-C7 w wodzie dejonizowanej o stężeniu 10 mM każdego kwasu (Supelco).

Roztwory wzorcowe sporządzano w sposób objętościowy, metodą kolejnych rozcieńczeń przez dodanie odpowiedniej ilości roztworu podstawowego do próbki wody dejonizowanej. Do próbek wzorcowych dodawano także znaną ilość kwasu 2-etylomasłowego w metanolu lub w MTBE, w celu korygowania wahań niektórych parametrów. Tak przygotowane próbki poddano etapowi przygotowania z wykorzystaniem odpowiedniej techniki, a następnie analizie za pomocą chromatografii gazowej z detekcją MS lub FID.

Wodne próbki wzorcowe stosowano do przeprowadzenia optymalizacji poszczególnych parametrów proponowanych procedur analitycznych i ich walidacji (wykreślanie krzywych kalibracyjnych, wyznaczenie wartości liczbowych granic wykrywalności i oznaczalności oraz zakresów stosowalności metodyk analitycznych, itp.). W celu wyznaczenia wartości liczbowych granic wykrywalności i oznaczalności sporządzono próbki wzorcowe o stężeniach w zakresie od 0,05 mg/L do 5 mg/L, w zależności od charakteryzowanej procedury.

3. Aparatura i sprzęt laboratoryjny

Zestaw do destylacyjnego przygotowania próbek do analizy (**Rysunek 7**) wykonano we własnym zakresie, na podstawie schematu zestawu zbudowanego i stosowanego wcześniej i wzorowanego na aparacie zaproponowanym przez Petersa [185]. Aparat ten składa się z szklanej kolby okrągłodennej z szyjką ze znormalizowanym szlifem, krótkiej kolumny rektyfikacyjnej (deflegmatora), chłodnicy zwrotnej i odbieralnika, który stanowi komora przelewowa o objętości 2,9 mL. Kolumnę rektyfikacyjną stanowi rura szklana z wgłębieniami wykonanymi w ten sposób, że co drugie wgłębienie na tym samym poziomie skierowane są w dół pod kątem 45°. Ma to zapewnić możliwość przeniesienia cieczy ze ścian do środka kolumny.



Rysunek 7. Zestaw destylacyjny do izolacji i wzbogacania analitów z grupy KKA.

W **Tabeli 11** zestawiono typy kolumny chromatograficznych oraz sprzęt laboratoryjny stosowany w trakcie badań.

Tabela 11. Sprzęt laboratoryjny i kolumny chromatograficzne.

SPRZĘT LABORATORYJNY	<ul style="list-style-type: none"> ▪ zestaw do mikroekstrakcji (Supelco, Bellefonte, PA) ▪ włókna ekstrakcyjne: glikol polietylenowy (PEG) o grubości 60 μm (długość 1cm), Carboxen/polidimetylosiloksan (PDMS/CAR) o grubości 85 μm (długość 1cm) (Supelco, Bellefonte, PA) ▪ mieszadło magnetyczne MR3000D o regulowanej szybkości obrotów (Heidolph) oraz mieszadła (Aldrich) ▪ termostat z możliwością regulacji temperatury w zakresie 25-70 °C ▪ fiołki o objętości 15 mL, nakrętki, membrany PTFE/silikonowe (Supelco, Bellefonte, PA) ▪ waga analityczna (RADWAG WAX 110, Polska) ▪ fiołki, pojemność 11 mL (MERCK, Niemcy) ▪ stoper ▪ urządzenie do otrzymania wody o wysokim stopniu czystości (Milipore QPLUS 185, Francja) ▪ papierki wskaźnikowe do pomiaru pH ▪ wirówka obrotowa (Centrifuge 5702, Eppendorf, Niemcy) ▪ pipety automatyczne, pojemność: 0,5-10μl ,10–100 μl, 100–1000 μl, 500–5000 μl (BRAND, Niemcy) ▪ mikrostrzykawkę do ręcznego dozowania próbek, pojemność 10 μl (ILS, Niemcy) ▪ mikrostrzykawkę do sporządzania roztworów wzorcowych, pojemność 10 μl, 100 μl, 250 μl, 500 μl (HAMILTON Bonaduz AG, Szwajcaria) ▪ zestaw do destylacji frakcyjnej ▪ pojemniki z tworzywa sztucznego HDPE, pojemność 0,5 L (Cezal S.A., Polska)
-----------------------------	--

Tabela 11 *ciąg dalszy.*

KAPILARNE KOLUMNY CHROMATOGRAFICZNE	<ul style="list-style-type: none">▪ Stabilwax-DA (glikol polietylenowy modyfikowany kwasem nitrotereftalowym), długość 30 m, średnica wewnętrzna 0,32 mm, grubość filmu warstwy fazy stacjonarnej 0,50 μm (Restek)▪ Stabilwax-DA (glikol polietylenowy modyfikowany kwasem nitrotereftalowym), długość 30 m, średnica wewnętrzna 0,25 mm, grubość filmu warstwy fazy stacjonarnej 0,25 μm (Restek)▪ Rtx-1 (dimetylo- polisiloksan), długość 30 m, średnica wewnętrzna 0,53 mm, grubość filmu warstwy fazy stacjonarnej 5,0 μm (Restek)▪ SUPEROX II FA (glikol polietylenowy), długość 10m, średnica wewnętrzna 0,53 mm, grubość filmu warstwy fazy stacjonarnej 1,20 μm (Bio-Rad)▪ kolumna dezaktywowana, długość 5 m, średnica wewnętrzna 0,53 mm (Restek)
--	---

Oznaczenia końcowe prowadzono za pomocą chromatografii gazowej stosując:

- ☑ Chromatograf gazowy firmy Thermo Finnigan model Trace GC 2000 wyposażony w dozownik z możliwością pracy w układzie z podziałem lub bez podziału strumienia (split/splitless) połączony z kwadrupolowym spektrometrem mas firmy Thermo Finnigan Trace DSQ,
- ☑ Chromatograf gazowy model Autosystem XL (Perkin Elmer) wyposażony w dozownik z możliwością pracy w układzie z podziałem lub bez podziału strumienia (split/splitless) i detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID),
- ☑ Chromatograf gazowy firmy Carlo Erba GC 8000 Instruments wyposażony w dozownik z możliwością pracy w układzie z podziałem lub bez podziału strumienia (split/splitless) i detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID).

4. Pobieranie, wstępna obróbka i przechowywanie próbek

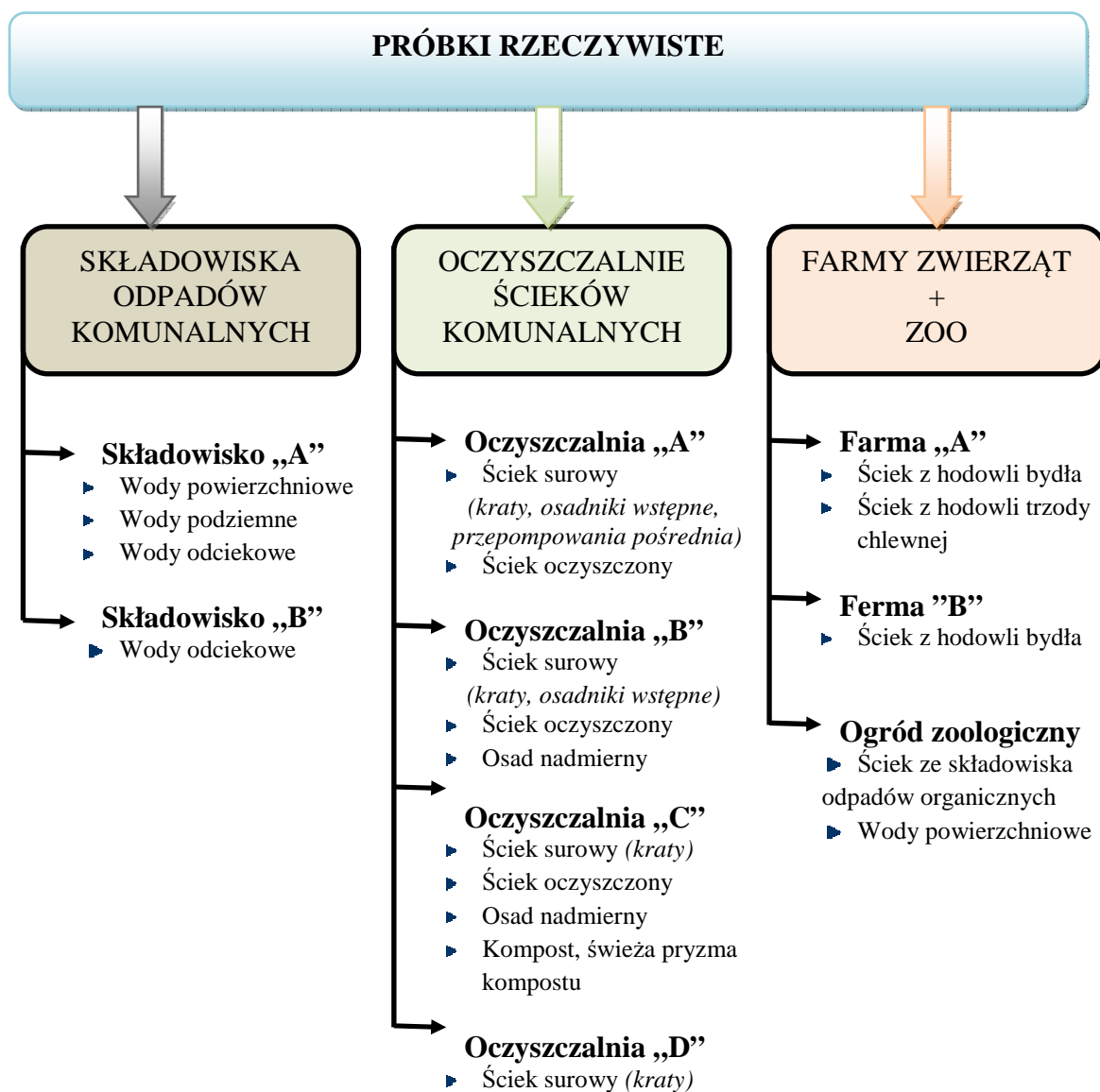
4.1. Charakterystyka miejsc pobierania próbek

Badano możliwość oznaczania wolnych krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksyłowych w próbkach następujących mediów:

- Ścieki na różnych etapach oczyszczania w biologicznych oczyszczalniach ścieków,
- Odcieki z przyzmy kompostowej zlokalizowanej w oczyszczalni ścieków,
- Odcieki ze składowiska odpadów komunalnych oraz wody powierzchniowe i podziemne w obszarze składowiska,
- Odcieki ze składowiska odpadów organicznych należące do ogrodu zoologicznego,
- Ścieki z farm bydła i trzody chlewnej,
- Próbkę stałą z oczyszczalni ścieków:

- Osad nadmierny,
- Kompost,
- Świeża przyzma kompostu.

Na **Rysunku 8** przedstawiono schemat z zestawem podstawowych informacji o miejscach pobierania próbek rzeczywistych, w których będą oznaczane krótkołańcuchowe kwasy alkanomonokarboksylowe.



Rysunek 8. Informacje o miejscach pobierania próbek rzeczywistych badanych na zawartość związków z grupy KKA.

Krótki opis obiektów pobierania próbek rzeczywistych w celu oznaczenia wolnych krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksylowych przedstawiono na dalszych stronach.

Składowisko odpadów komunalnych „A”

Składowisko odpadów „A” zostało zbudowane w miejscu dawnej żwirowni w odległości 1,5 km od dużego miasta i ma powierzchnię 72 ha. Obszar ten znajduje się na terenie Pojezierza, do którego uchodzi płynący przez teren składowiska potok. Zaczyna się on przy wschodniej granicy składowiska. Zbierane są tam wody opadowe i przypowierzchniowe [187]. Od zachodu teren składowiska sąsiaduje z bezodpływową powierzchniowo zlewnią jeziora. Lokalne warunki hydrograficzne zobrazowane są na **Rysunku 9**.



Rysunek 9. Warunki hydrograficzne w rejonie Zakładu Utylizacyjnego (ZU) „A” (1:25 000) [186].

Niecka wysypiska nie została wyposażona ani w drenaż wód podziemnych i odciekowych ani nie posiada sztucznego, uszczelnionego podłoża. Wody powierzchniowe mają możliwość bezpośredniej infiltracji w przepuszczalne podłoże.

Warunki geologiczne i hydrogeologiczne są w rejonie lokalizacji składowiska i Zakładu bardzo zróżnicowane. Przy powierzchni terenu występują głównie gliny zwałowe, a na terenie składowiska piaski drobno i średnio-ziarniste.

Na składowisko dostarczane są odpady bytowo – gospodarcze. Codziennie przyjmuje się ok. 700 Mg odpadów od ok. 500 000 mieszkańców. W ciągu roku, do zakładu trafia łącznie ponad 200.000 Mg odpadów komunalnych, budowlanych i przemysłowych (w tym odpady niebezpieczne) [188]. Znacząca większość to odpady komunalne niesegregowane, unieszkodliwiane poprzez składowanie. Polegające na warstwowym układaniu odpadów w wyznaczonych kwaterach składowych, posiadających osłony ochronne przeciw wywiewaniu odpadów lekkich przez wiatr. Następnie, przy zastosowaniu ciężkich specjalistycznych urządzeń typu kompaktor, odpady są zagęszczane i ostatecznie pokryte obojętną warstwą izolacyjną, np. ziemią, gruzem lub piaskiem. Skarpa kwatery składowej kształtowana jest w taki sposób, aby jej nachylenie nie przekraczało 33 stopni [189]. Dodatkowa warstwa gleby, obsadzona roślinnością, zabezpiecza skarpe przed erozją wodną oraz wspomaga rekultywację biologiczną.

Głównym zadaniem monitoringu składowiska odpadów jest rozpoznanie i śledzenie wpływu zanieczyszczeń na jakość wód podziemnych i powierzchniowych. Punkty monitoringowe wokół składowiska rozmieszczone są w trzech strefach:

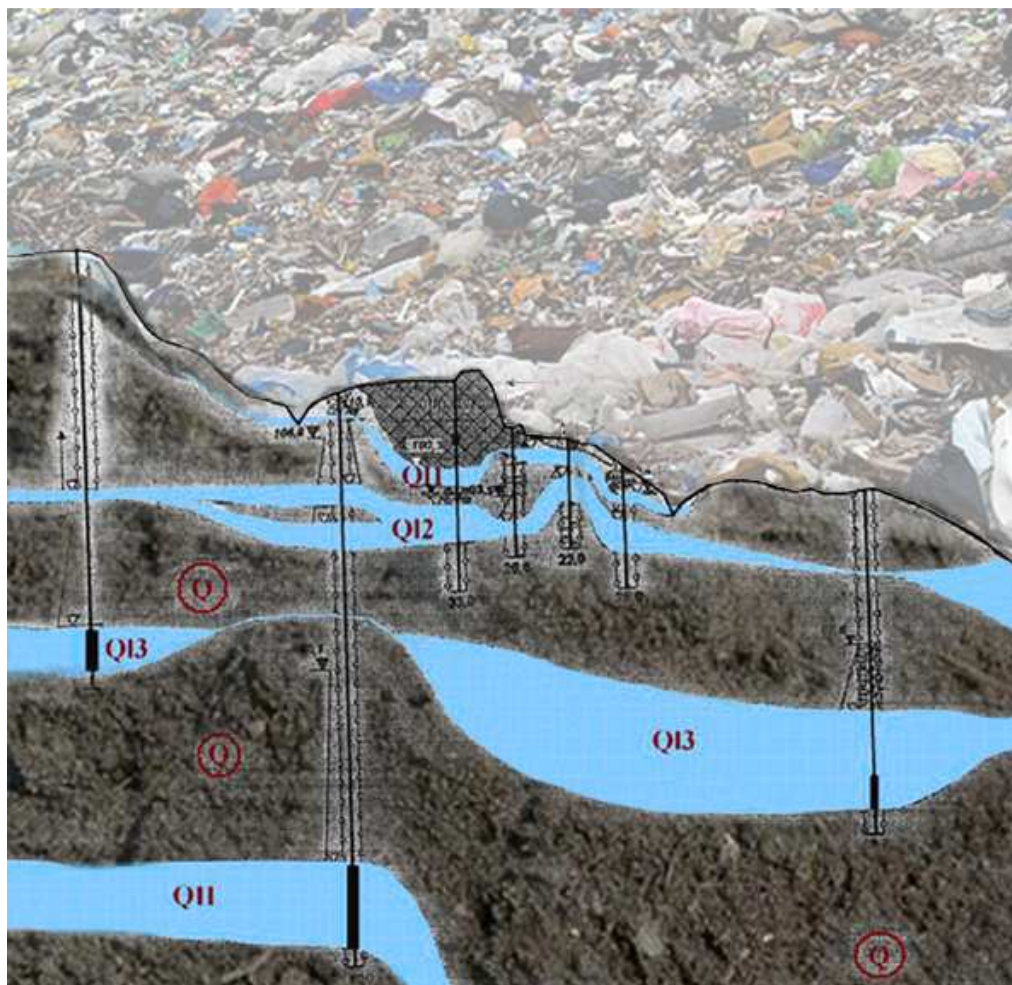
- od strony napływu wód w rejon składowiska, które służą do określenia aktualnego tła hydrogeochemicznego;
- w obrębie składowiska, które pozwalają na określenie maksymalnych stężeń zanieczyszczeń przenikających ze składowiska do podłoża;
- od strony odpływu wód podziemnych, poniżej składowiska, w strefie wód zanieczyszczonych.

Monitoring obejmuje ponadto trzy warstwy wodonośne, opisane jako:

QI1 [ok. 90-110 m n.p.m.], **QI2** [ok. 95-110 m n.p.m] oraz **QI3** [50-70 m n.p.m.].

Dokładny przekrój hydrogeologiczny, obrazujący rozmieszczenie wód podziemnych we wschodnio-zachodnim (B-B') przekroju poprzecznym składowiska, został przedstawiony na **Rysunku 10**.

System sieci monitoringowej wód podziemnych na składowisku „A” obejmuje 27 piezometrów oraz studni ujęcia wody, które ujmują wody wszystkich trzech warstw górnego poziomu wodonośnego. W **Tabeli 12** przedstawiono usytuowanie piezometrów oraz ich zasięg ze względu na przynależność do danej warstwy wodonośnej. Kolorem czerwonym zaznaczono badane próbki wody z poszczególnych piezometrów.



Rysunek 10. Przekrój hydrogeologiczny w miejscu lokalizacji Zakładu Utylizacyjnego „A” [190].

Tabela 12. Usytuowanie piezometrów oraz ich zasięg ze względu na przynależność do danej warstwy wodonośnej [191-194].

Usytuowanie	WARSTWA GÓRNEGO POZIOMU WODONOŚNEGO		
	Pierwsza (Q11)	Druga (Q12)	Trzecia (Q13)
Na dopływie wód do składowiska	P-9		
	P-10	P-8	P-19C
	P-10A	P-11B	P-21C
	P-11A	P-19B	
	P-19A		
Na odpływie wód ze składowiska	P-7	P-12A	
	P-13A	P-13	
	P-14A	P-14	P-12
	P-15A	P-15	P-14C
	P-16A	P-16	P-20C
	P-17A	P-17	
	P-18A	P-18B	

Natomiast na **Rysunku 11** zaznaczono rozmieszczenie punktów kontrolnych, z których można pobierać próbki wód podziemnych, powierzchniowych i odciekowych.

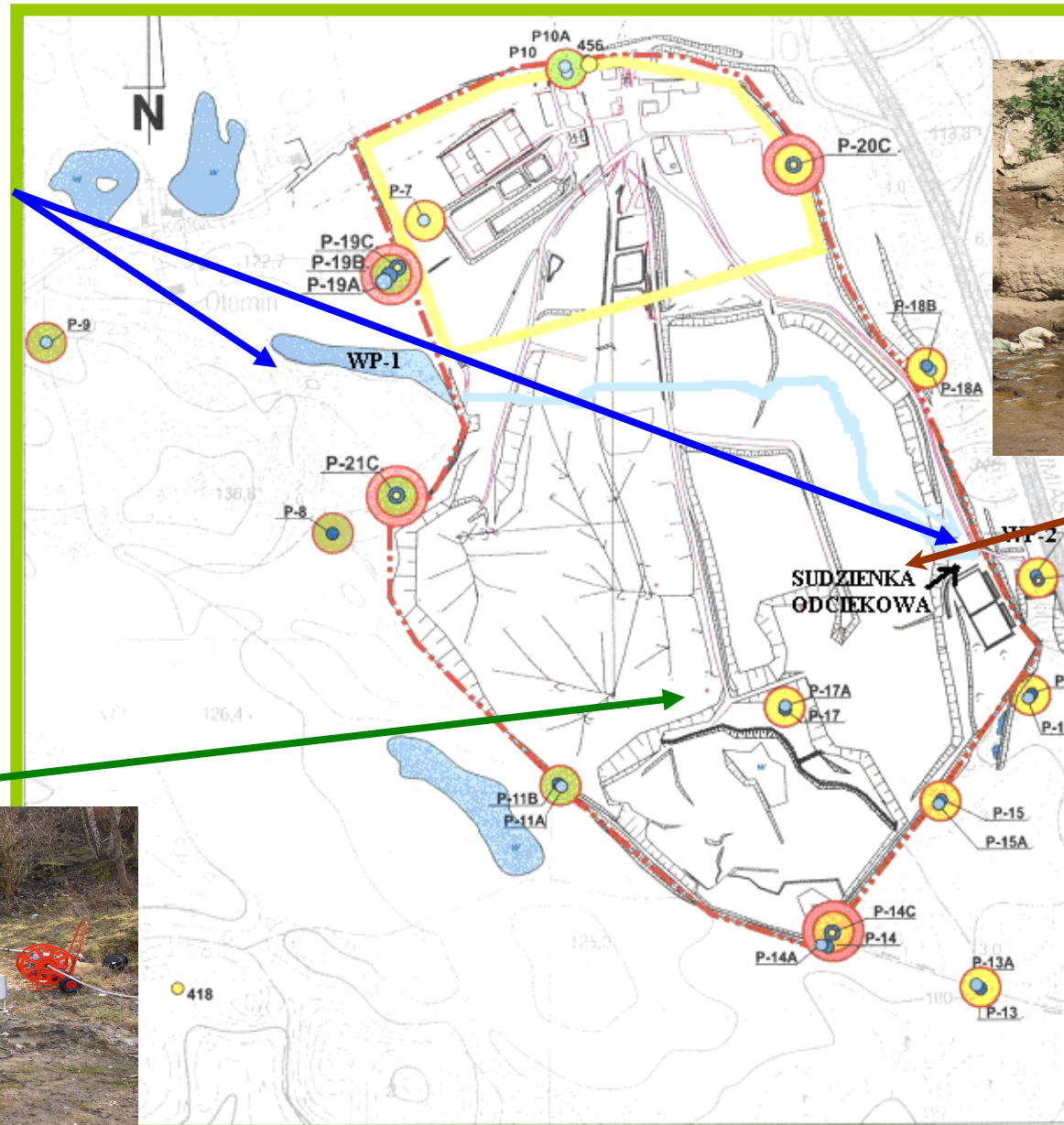
WODY POWIERZCHNIOWE



WODY PODZIEMNE



WODY ODCIEKOWE



WARSTWA Q11

- na dopływie wód ze składowiska P11A,
- na odpływie wód ze składowiska P7, P17A,

WARSTWA Q12

- na dopływie wód ze składowiska P8,
- na odpływie wód ze składowiska P17.

Rysunek 11. Rozmieszczenie punktów monitoringowych dla wód podziemnych, powierzchniowych i odciekowych z zaznaczonym prawdopodobnym przepływem potoku przez składowisko.

Sieć monitorowana wód powierzchniowych składa się z dwóch punktów zlokalizowanych na potoku: przed (górny bieg potoku-WP1) i za składowiskiem (dolny bieg potoku-WP2).

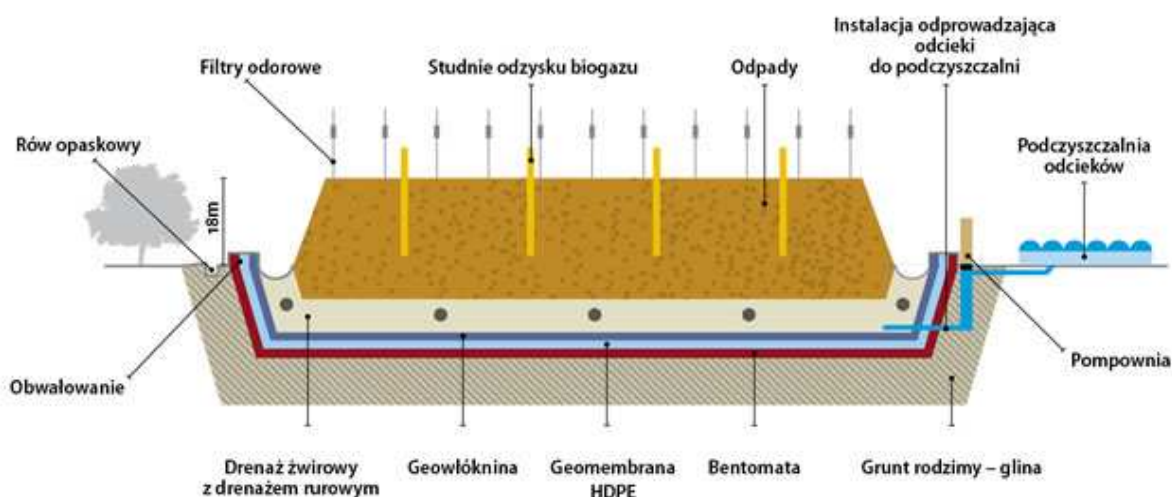
W trakcie pobierania w terenie badano podstawowe parametry wody (tj.: odczyn, przewodność elektrolityczną właściwą, temperaturę, mętność, barwę oraz organoleptycznie zapach).

Sieć monitoringowa wód odciekowych składa się z jednego punktu pobierania, czyli zbiornika odcieków. Wody odciekowe gromadzące się w tym zbiorniku są zawracane (recykulowane) na składowisko.

Badania takich wskaźników jak: ogólny węgiel organiczny (OWO), chemiczne zapotrzebowania na tlen, biologiczne zapotrzebowania na tlen i odczyn pH, były przeprowadzane przez akredytowane laboratorium, które w trakcie badań wykorzystywało standardowe metody analityczne.

Składowiska odpadów komunalnych „B”

Składowisko odpadów komunalnych „B” ma powierzchnię ok. 60 ha i jest wykorzystywane od 2003 r. Na składowisko dostarczane są odpady bytowo - gospodarcze. Codziennie przyjmuje się odpady od ok. 400 000 mieszkańców. Na **Rysunku 12** przedstawiony jest schemat budowy składowiska odpadów.



Rysunek 12. Schemat budowy składowiska odpadów „B” [195].

Kwaterny składowania odpadów komunalnych uszczelniane są za pomocą geomembran (folii o grubości 2-3 mm), bentomaty, geowłókniny, gliny oraz drenażu

żwirowego, aby zapobiec przedostawaniu się ewentualnych substancji szkodliwych do warstw wodonośnych. Odpady układane są na kwaterze metodą „tortową” z zachowaniem powtarzającego się układu warstw: 2-metrowa warstwa zagęszczonych odpadów, 15 cm warstwy przesypki (żwir, piasek, drobny gruz). Warstwa przesypkowa zmniejsza oddziaływanie odpadów i ich rozwiewanie. Kwatera składowa w czasie eksploatacji i po niej podlega stałej kontroli szczelności. Niebezpieczne odcieki wyłapywane są przez system drenażu wbudowany powyżej geomembrany. Zanieczyszczone odcieki kierowane są do oczyszczalni i uzdatniane. Woda uzyskana po oczyszczeniu ścieków w części używana jest do nawilżania kwater składowych. Reszta kierowana jest do kanalizacji sanitarnej.

Oczyszczalnia ścieków komunalnych „A”

Oczyszczalnia ścieków „A” zajmuje powierzchnię 73,6 ha. Całkowita wydajność oczyszczalni „A” wynosi 100000 m³ / dobę. Technologia oczyszczania ścieków opiera się na trójstopniowym układzie technologicznym, obejmującym oczyszczanie mechaniczne, biologiczne i przeróbkę osadów. Układ mechaniczny składa się z krat – do usuwania ciał pływających i grubych zawiesin, piaskowników – do usuwania piasku o frakcji 0,1 - 0,2 mm i większej. W skład układu biologicznego wchodzi: wielofazowy reaktor biologiczny, dwa osadniki wtórne i jedna pompownia recyrkulatu i osadu nadmiernego. W reaktorach biologicznych przebiegają zintegrowane procesy biologicznego usuwania organicznych związków węgla, oraz azotu i fosforu. Prowadzona przez oczyszczalnię gospodarka osadami obejmuje: odwodnienie osadów (wstępnego – na lejach osadników, wtórnego – na prasie filtracyjnej), fermentację, ponowne odwodnienie, i depozycję osadów na poletkach ociekowych. Oczyszczone ścieki odprowadzane są kolektorem do wód zatoki w odległości 2,4 km od linii brzegowej [196].

Oczyszczalnia ścieków komunalnych „B”

Każdego dnia oczyszczalnia „B”, zgodnie z obowiązującymi przepisami dotyczącymi jakości ścieków odprowadzanych do wód morskich, oczyszcza około 60.000m³ ścieków komunalnych. Proces oczyszczania ścieków obejmuje mechaniczne oczyszczanie ścieków z napowietrzaniem wstępnym oraz proces biologicznego oczyszczania metodą osadu czynnego. Oczyszczalnia posiada reagentową osłonę biologicznego usuwania związków fosforu wraz z zagospodarowaniem powstałych w tym

procesie osadów. Oczyszczone ścieki odprowadzane są kolektorem o długości 9 km do wód zatoki.

W wyniku procesu oczyszczania ścieków w ciągu doby powstaje około 3000 m³ osadu. W ramach jego zagospodarowania przeprowadza się procesy zagęszczania, fermentacji, odwadniania oraz spalania [197].

Oczyszczalnia ścieków komunalnych „C”

Oczyszczalnia ścieków „C” jest odbiornikiem ścieków miejskich. W okresie letnim ilość ścieków doprowadzanych do oczyszczalni wynosi ok. 1000 m³/dobę, natomiast w okresie zimowym, na skutek zmniejszenia się liczby turystów, obciążenie hydrauliczne oczyszczalni jest o połowę mniejsze.

Oczyszczanie ścieków obejmuje procesy mechaniczne, chemiczne i biologiczne. Biologiczna degradacja zanieczyszczeń zawartych w ściekach, zachodzi w sekwencyjnych reaktorach biologicznych. W oczyszczalniach wykorzystuje się usuwanie fosforu na drodze chemicznej, stosując do koagulacji fosforanów siarczan żelaza II.

Gospodarka osadowa oparta jest na procesie kompostowania osadu nadmiernego z materiałem strukturotwórczym (słomą). Część osadu, po odwodnieniu i higienizacji, składowana jest na poletkach osadowych. Odcieki spod poletek zawracane są do oczyszczalni.

Obiekt jest jedną z najdalej wysuniętych na północ oczyszczalni, przez co ma istotny wpływ na ochronę wód przybrzeżnych Morza Bałtyckiego [198].

Oczyszczalnia ścieków komunalnych „D”

Oczyszczalnia ścieków „D” jest odbieralnikiem ścieków bytowo-gospodarczych. Całkowita przepuszczalność oczyszczalni „D” wynosi 315 m³/dobę. Oczyszczanie ścieków obejmuje procesy mechaniczne i biologiczne. Część mechaniczna oczyszczalni składa się z: pompowni ścieków surowych, stanowiska zlewnego ścieków dowożonych, piaskownika pionowego, zbiornika retencyjnego ścieków dowożonych. Oczyszczalnia ta działa w oparciu o metodę osadu czynnego, w której zastosowano reaktor biologiczny. W reaktorze biologicznym wydzielone zostały następujące komory: predenitryfikacji, defosfatacji, denitryfikacji, nitryfikacji, odgazowania ścieków oraz osadników wtórnych i komory stabilizacji tlenowej osadu. Następnie oczyszczone ścieki odprowadzane są do pobliskiej rzeki za pośrednictwem rowu melioracyjnego [199].

Gospodarstwo „A” specjalizującego się w hodowli trzody chlewnej i bydła

Gospodarstwo „A” zajmuje się hodowlą bydła (27 sztuk) i trzody chlewnej (7 sztuk). Powierzchnia gospodarstwa „A” wynosi 20 ha.

Ścieki wytwarzane przez bydło spływają kanałem ściekowym do zbiornika, znajdującego się pod płytą gnojową, w odległości 5 m od obory. Po napełnieniu zbiornika, gnojowica wywożona jest na pola, gdzie stanowi uzupełnienie nawozu naturalnego. Podobna sytuacja przedstawia się w przypadku gnojowicy wytwarzanej przez trzodę chlewną, znajdująca się w oddzielnym pomieszczeniu. Ścieki te spływają do osobnego zbiornika pod płytą gnojową (**Rysunek 13**).



Rysunek 13. Widok płyty pokrywającej zbiornik ścieków pochodzących z hodowli trzody chlewnej.

Gospodarstwo „B” specjalizujące się w hodowli bydła

Gospodarstwo „B” posiada 300 sztuk bydła, w tym 150 sztuk krów dojnych, pozostałe to jałówki. Zwierzęta przebywają w 3 zmodernizowanych obiektach wolnostanowiskowych w zależności od wieku: cielęta w cielętniku, jałówki w jałowniku, krowy dojne w oborze. Każdy obiekt posiada stół paszowy i wybiegi dla zwierząt. Zwierzęta hodowane są w celach mleczarskich.

Odpady wytwarzane przez bydło w postaci obornika zbierane są raz dziennie poprzez wypychanie ich na płytę obornikową. Ponadto ścieki typowo płynne – gnojowica – odpływają z obory, cielętnika oraz jałownika na bieżąco do naziemnego zbiornika, o pojemności 600 000 litrów, znajdującego się obok płyty obornikowej.

Widok płyty obornikowej przedstawiono na **Rysunku 14**.



Rysunek 14. *Ogólny wygląd płyty obornika przeznaczona do składowania odchodów zwierzęcych.*

Składowisko odpadów organicznych pochodzących z ogrodu zoologicznego

Na składowisko odpadów organicznych, należące do ogrodu zoologicznego dostarczane są odchody zwierząt oraz resztki organiczne (np. karma, siano).

Składowanie polega na warstwowym układaniu odpadów organicznych w wyznaczonych kwaterach składowych. Składowisko to nie posiada osłon ochronnych przeciw wywiewaniu odpadów lekkich przez wiatr. Niecka wysypiska nie została wyposażona w drenaż wód podziemnych i odciekowych ani sztuczne uszczelnienie podłoża. Wody powierzchniowe mają możliwość bezpośredniej infiltracji w przepuszczalne podłoże. Na **Rysunkach 15 i 16** przedstawiono miejsca, z których pobrano ciekłe próbki z terenu składowiska odpadów organicznych.

Pierwszy punkt pomiarowy był usytuowany ok. 5m od składowiska odpadów organicznych w kałuży powstającej czasie opadów atmosferycznych, a drugi na powierzchni składowiska.



Rysunek 15. *Widok odcieku powstałego w wyniku opadów deszczu, znajdujący się 5m od składowiska odpadów organicznych.*



Rysunek 16. *Widok odcieku znajdującego się na powierzchni składowiska odpadów organicznych.*

4.2. Pobieranie, wstępne przygotowanie i przechowywanie próbek do analizy

Wszystkie próbki pobierano do 0,5 L pojemników z tworzywa sztucznego, wykonanego z polietylenu o nierozgałęzionych łańcuchach, zapewniających wysoką gęstość i duże siły oddziaływania międzycząsteczkowego (HDPE). Przed każdym napełnieniem butelki (oczyszczone i przepłukane wodą nie zawierającą materii organicznej) bezpośrednio przed pobraniem, dwukrotnie przepłukiwano badanym medium wodnym. W celu zapobieżenia uwalniania się lotnych składników do fazy gazowej badane ścieki pobierano „pod korek” (**Rysunek 17**).



Rysunek 17. Fotograficzna dokumentacja etapu przepłukiwania medium wodnym pojemników z tworzywa sztucznego (rys. lewy) oraz pobrane próbki ścieków „pod korek” (rys. prawy).

W trakcie pobierania próbek ze składowiska odpadów, uwzględniono pionową stratyfikację składu odcieku. Zwracano szczególną uwagę, aby w czasie pobierania próbek za pomocą czerpaka nie doszło do jej zanieczyszczenia zawiesiną, która na skutek ciągłej sedimentacji wykazuje dużą miąższość w zbiorniku.

Próbki wód podziemnych z poszczególnych piezometrów, pobierano zgodnie z wytycznymi PN-ISO 5667-11:2004 [187] przy zastosowaniu pompy zanurzeniowej „GIGANT” wraz z pompą wspomagającą „WHALE” (**Rysunek 18**). Podczas pobierania próbek wód, monitorowano dodatkowo takie parametry jak: pH, przewodność elektrolityczną, temperaturę i poziom zwierciadła wód.

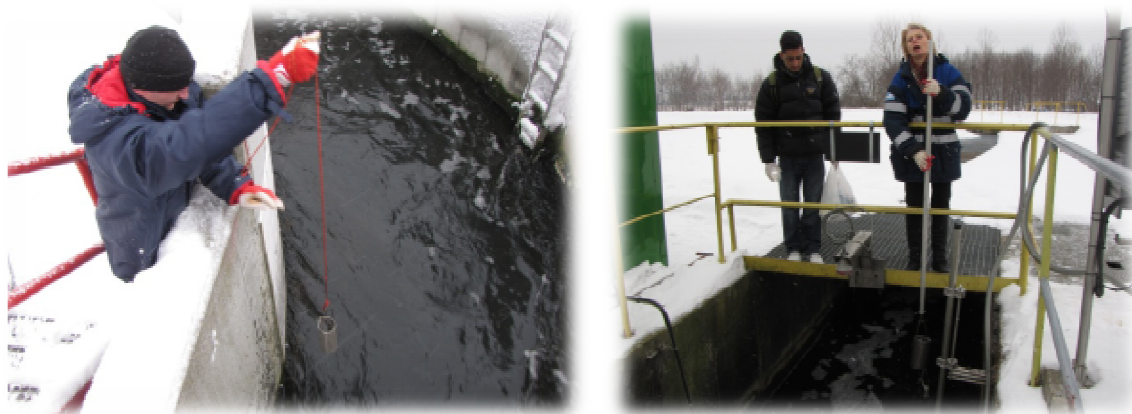
Próbki wody powierzchniowej, odciekowej, ścieki z oczyszczalni ścieków i z hodowli trzody chlewnej oraz bydła, pobrano przy użyciu czerpaka (**Rysunki 19 i 20**).

Próbki po pobraniu transportowano do laboratorium (czas transportu nie przekraczał 4 godzin). Pojemniki ze ściekami obkładano lodem w celu utrzymania niskiej temperatury ścieków (≤ 4 °C). W laboratorium ścieki zakwaszono stężonym H_2SO_4 do

pH \approx 2 w celu ich konserwacji (zgodnie z wytycznymi PN-75/C-04616) [49] oraz polepszenia efektywności ekstrakcji.



Rysunek 18. Wygląd sprzętu (rys. lewy) używanego do pobierania próbek wód podziemnych (rys. prawy).



Rysunek 19. Dokumentacja fotograficzna etapu pobierania próbek ścieków na terenie oczyszczalni komunalnych.



Rysunek 20. Dokumentacja fotograficzna etapu pobierania próbek wód powierzchniowych z okolic składowiska odpadów komunalnych (rys. lewy) oraz próbek ścieków pochodzących z hodowli bydła (rys. prawy).

5. Metodyki oznaczania związków z grupy KKA w próbkach wodnych i stałych

Opracowano sześć procedur oznaczania wolnych krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksylowych w próbkach wodnych.

Na **Rysunku 21** przedstawiono ogólny schemat postępowania analitycznego. Jak widać pewne etapy niektórych procedur są praktycznie identyczne, szczególnie jeśli chodzi o wstępne przygotowanie próbek i oznaczanie końcowe. Szczegółowe schematy wszystkich procedur przedstawiono w postaci załączników.

5.1. Bezpośrednie dozowanie próbki do chromatografu gazowego

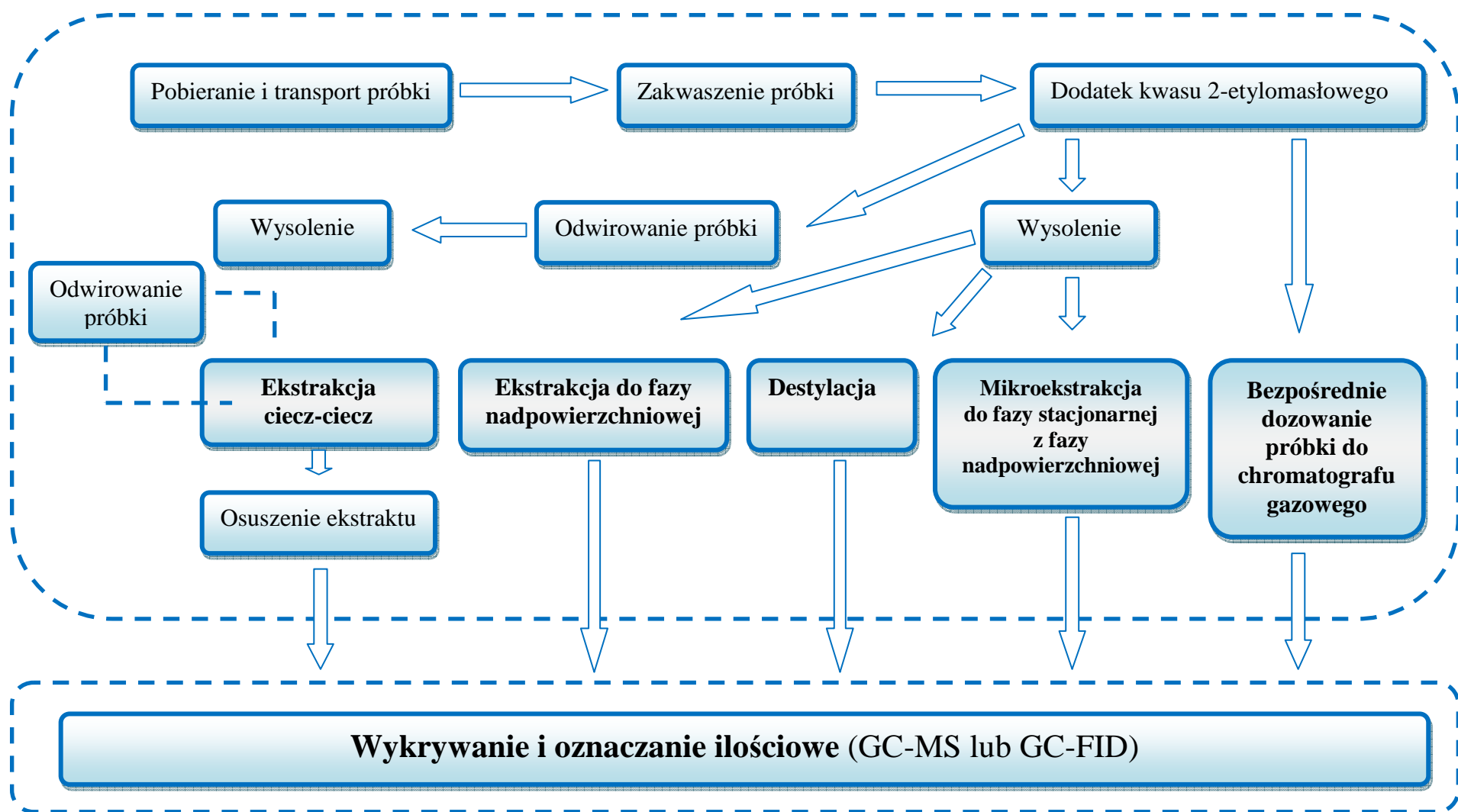
Próbkę wodną, po uprzednim zakwaszeniu kwasem siarkowym (VI), odwirowaniu i dodaniu kwasu 2-etylomasłowego, bezpośrednio wprowadzano do komory dozownika chromatografu gazowego z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (**ZAŁĄCZNIK 1**).

5.2. Destylacja

Próbkę o objętości 250 mL, zakwaszono H_2SO_4 do $pH \approx 2$ i dodano 95 g chlorku sodu, i umieszczano w kolbie destylacyjnej z zestawu do destylacyjnego wzbogacania (**Rysunek 7**). Próbkę doprowadzono do wrzenia w elektrycznym płaszczu grzejnym i utrzymywano w tym stanie przez okres 65 min. Kondensat, zbierający się w komorze przelewowej pobierano w trakcie procesu lub po jego zakończeniu za pomocą mikrostrzykawki. Próbkę kondensatu o objętości 2 μ L wprowadzono bezpośrednio do dozownika chromatografu gazowego z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (**ZAŁĄCZNIK 2**).

5.3. Ekstrakcja do fazy nadpowierzchniowej

Do zakwaszonej próbki wodnej o objętości 2 mL dodano się 0,75 g chlorku sodu i umieszczono w 15mL fiolce, szczelnie zamkniętej silikonową membraną i aluminiowym kapslem. Fiolki umieszczone w automatycznym podajniku próbek kolejno wprowadzono do sprzężonego układu HS-GC. Fiolkę z próbką utrzymywano w temperaturze 95°C przez okres 30 min i następnie 0,5 mL fazy nadpowierzchniowej wprowadzono do chromatografu gazowego (**ZAŁĄCZNIK 3**).



Rysunek 21. Schemat blokowy opracowanych procedur przygotowania próbek wodnych do analizy za pomocą chromatografii gazowej na zawartość krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksylowych.

5.4. Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej z fazy nadpowierzchniowej

Próbkę wodną o objętości 2 mL odmierzano do fiolki ekstrakcyjnej o objętości 15 mL, zakwaszono H_2SO_4 do $pH \approx 2$ i dodano 0,75 g chlorku sodu. W fazie nadpowierzchniowej umieszczano włókno ekstrakcyjne (typu PEG, PDMS/CAR). Ekstrakcję prowadzono przez okres 40 min w temperaturze $25^\circ C$, intensywnie mieszając próbkę z szybkością 1200 rpm za pomocą mieszadła magnetycznego. Następnie włókno wprowadzono do dozownika ustawionego na tryb pracy bez podziału strumienia, w celu termicznego uwolnienia i wprowadzenia analitów do kolumny GC (**ZAŁĄCZNIK 4**).

5.5. Ekstrakcja ciecz- ciecz

Zakwaszoną H_2SO_4 do $pH \approx 2$ próbkę wodną o objętości 4 mL odmierzano do fiolki (11 mL) i dodawano 1 g chlorku sodu, a następnie ekstrahenta (eter metylo-*tert*-butylowy) i wytrząsano przez okres 3 min. Następnie fiolkę z próbką i ekstrahentem wirowano, celem przyspieszenia rozdzielania się warstw. Warstwę organiczną pobierano za pomocą strzykawki i przenoszono do innej fiolki. Do fiolki z próbką dodawano świeżą porcję (2mL) ekstrahenta i powtarzano proces. Ekstrakty z drugiej i pierwszej ekstrakcji łączono, dodawano 0,5 g bezwodnego siarczku sodu w celu suszenia ekstraktu i po dekantacji ekstrakt eterowy dozowano do GC (**ZAŁĄCZNIK 5**).

6. Analiza chromatograficzna

W przypadku wszystkich procedur oznaczania kwasów z grupy KKA na etapie oznaczeń końcowych stosowano chromatografię gazową. Rozdzielanie prowadzono w kolumnach kapilarnych typu WCOT z glikolem polietylenowym jako fazą stacjonarną oraz specjalnym zestawem szeregowo łączonych różnych kolumn, w przypadku dozowania próbek wodnych. Warunki prowadzenia analiz chromatograficznych przedstawiono w **Tabeli 13**.

Stosowano spektrometr mas pracujący w trybie przemiatacia całego widma (SCAN) i/ lub w monitorowania wybranego lub wybranych jonów (SIM). Widma mas rejestrowano w zakresie wartości liczbowej parametru m/z od 40 do 200. W przypadku trybu SIM wybrane (na podstawie widm mas poszczególnych kwasów) i monitorowane jony są zestawione w **Tabeli 14**.

Tabela 13. Warunki prowadzenia analiz z wykorzystaniem techniki GC.

Sposób przygotowania próbki do analizy chromatograficznej	LLE	HS-SPME		HS	Bezpośrednie dozowanie próbek wodnych	Destylacja
Element układu pomiarowego	GC-MS			GC-FID	GC-FID	
Chromatograf gazowy	Thermo Finnigan Trace GC, USA			Autosystem XL, Perkin Elmer	GC 6000 Vega Series wyprodukowany przez Carlo Erba Instruments	
Detektor	Spektrometr mas ,Thermo Finnigan Trace DSQ MS			Płomieniowo-jonizacyjny (FID)	Płomieniowo-jonizacyjny (FID)	
Temperatura detektora	240°C, energia strumienia elektronów: 70 eV, zakres mas jonów: 40-200			250°C	250°C	
Kolumna (długość x średnica wewnętrzna x grubość warstwy fazy stacjonarnej)	Stabilwax DA (30m x 0,32mm x 0,5µm)			Stabilwax DA (30m x 0,25mm x 0,25µm)	SUPEROX II FA (10m x 0,53mm x 1,20 µm) ⇒dezaktywowana kolumna (2m x 0,53mm) ⇒Rtx-1 (30m x 0,53mm x 5,0µm) ⇒kolumna zabezpieczająca (0,5m x 0,32mm)	
Program temperaturowy	60°C/min, (2min) ⇒10°C/min⇒ 220°C/min (1min)	40°C(3min),40°C/min⇒180°C (1min), 10°C/min ⇒ 230°C (1min)		70°C(1min),25°C/min⇒160°C(1min) 10°C/min ⇒ 230°C (5min)	85°C (30s); 7°C/min ⇒220°C (1min)	
Temperatura dozownika	250°C	230°C (włókno PEG)	300°C (włókno PDMS/CAR)	200°C	250°C	
Tryb pracy dozownika	z podziałem/bez podziału strumienia gazu nośnego (split/splitless)			z podziałem strumienia gazu nośnego (split) (1:6)	bez podziału strumienia gazu nośnego przez 40 s, następnie z podziałem strumienia (20:1)	
Gaz nośny	hel, 1,5 mL/min			hel, 1,0 mL/min	wodór, 22 mL/min	
Objętość dozowanej próbki	1 µL			0,5 mL	2 µL	

Tabela 14. Masy monitorowanych jonów wybranych do detekcji poszczególnych krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksylowych.

Analit	Masy jonów monitorowanych (m/z)
Kwas octowy	43, 45, 60
Kwas propionowy	45, 57, 74
Kwas izomasłowy	43, 73, 88
Kwas masłowy	60, 73
Kwas izowalerianowy	41, 60, 87
Kwas walerianowy	60, 73, 87
Kwas kapronowy	60, 73, 87
Kwas enantowy	60, 73, 87
Kwas kaprylowy	43, 73, 101

7. Wyniki i ich omówienie

7.1. Dobór warunków chromatografowania

Analiza chromatograficzna jest końcowym etapem procesu analitycznego i powinna zapewnić prawidłowe rozdzielanie mieszaniny. Na podstawie uzyskanego chromatogramu można uzyskać wiarygodne informacje (o charakterze jakościowym i ilościowym) na temat składu próbki, czy też zawartości wybranych związków.

W pierwszym etapie prowadzonych badań, ustalono optymalne warunki pracy układu chromatograficznego-wybrano kolumnę chromatograficzną, dobrano natężenie przepływu strumienia gazu nośnego, temperaturę dozownika GC, program temperaturowy, objętość i sposób dozowania próbki do kolumny oraz warunki pracy spektrometru mas i detektora płomieniowo-jonizacyjnego, umożliwiające rozdzielanie i wykrywanie wybranych kwasów.

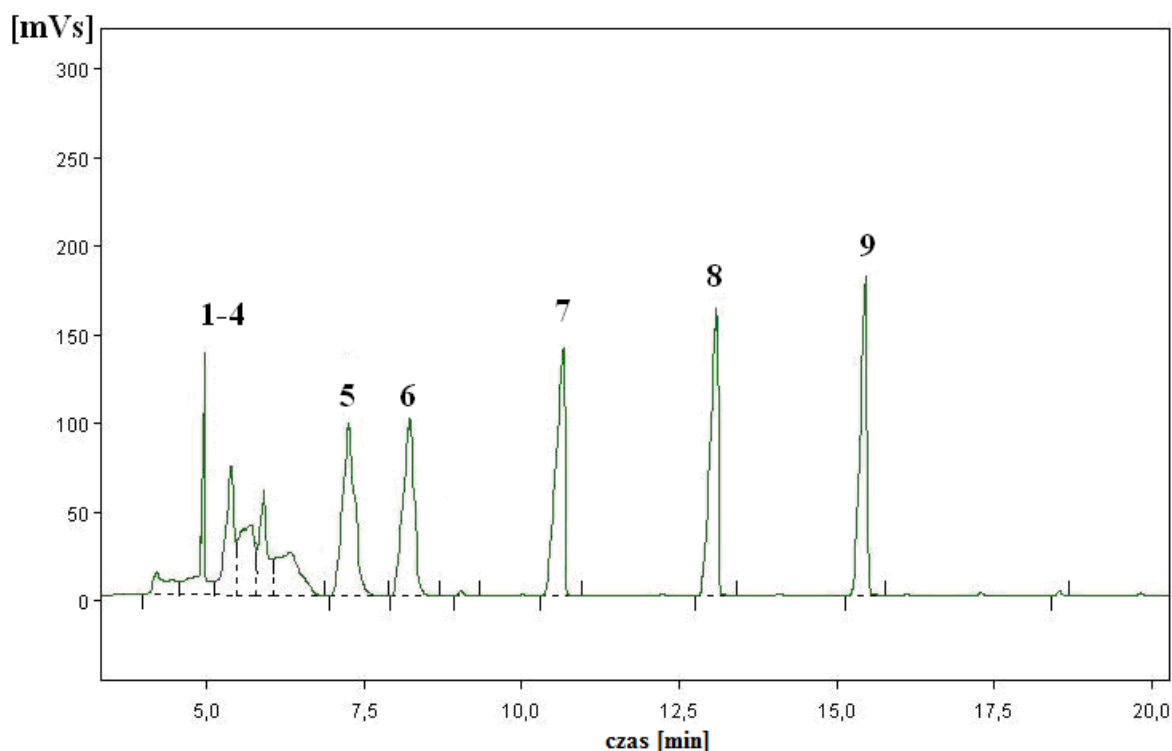
7.1.1. Wybór układu kolumn chromatograficznych

Wolne krótkołańcuchowe kwasy alkanomonokarboksylowe są to substancje polarne, ulegające w wodzie przynajmniej słabej dysocjacji i dlatego wskazane jest stosowanie kolumny zawierającej polarną lub wręcz bardzo polarną fazę stacjonarną do ich rozdzielania.

Gdy matrycą próbki jest woda najbardziej odpowiednią wydaje się być kolumna z grubym filmem niepolarniej fazy stacjonarnej. Często jest to polidimetylosiloksan, który praktycznie nie oddziałuje z wodą i dzięki temu woda, która nie jest zatrzymywana w

kolumnie, wymywana jest w czasie niewiele większym niż czas retencji substancji niezatrzymywanej.

W przypadku opracowywania procedury bezpośredniego wprowadzania próbki do chromatografu gazowego z detekcją płomieniowo-jonizacyjną, podjęto próbę doboru kolumny. Najpierw zastosowano niepolarną kolumnę kapilarną Rtx-1 (polidimetylosiloksan) o parametrach: 30m x 0,53mm x 5,0 μ m. Na **Rysunku 22** przedstawiono chromatogram uzyskany w trakcie analizy próbki wzorcowej zawierającej anality z grupy KKA w wodzie na poziomie stężenia każdego z kwasów 25 mg/L. Układ rozdzielczy składał się z: dezaktywowanej kolumny kapilarnej z topionej krzemionki nie zawierającej fazy stacjonarnej (2m x 0,53mm), kolumny właściwej Rtx-1 (30m x 0,53mm x 5,0 μ m) i kolumny zabezpieczającej (0,5m x 0,32mm) – **układ A**.



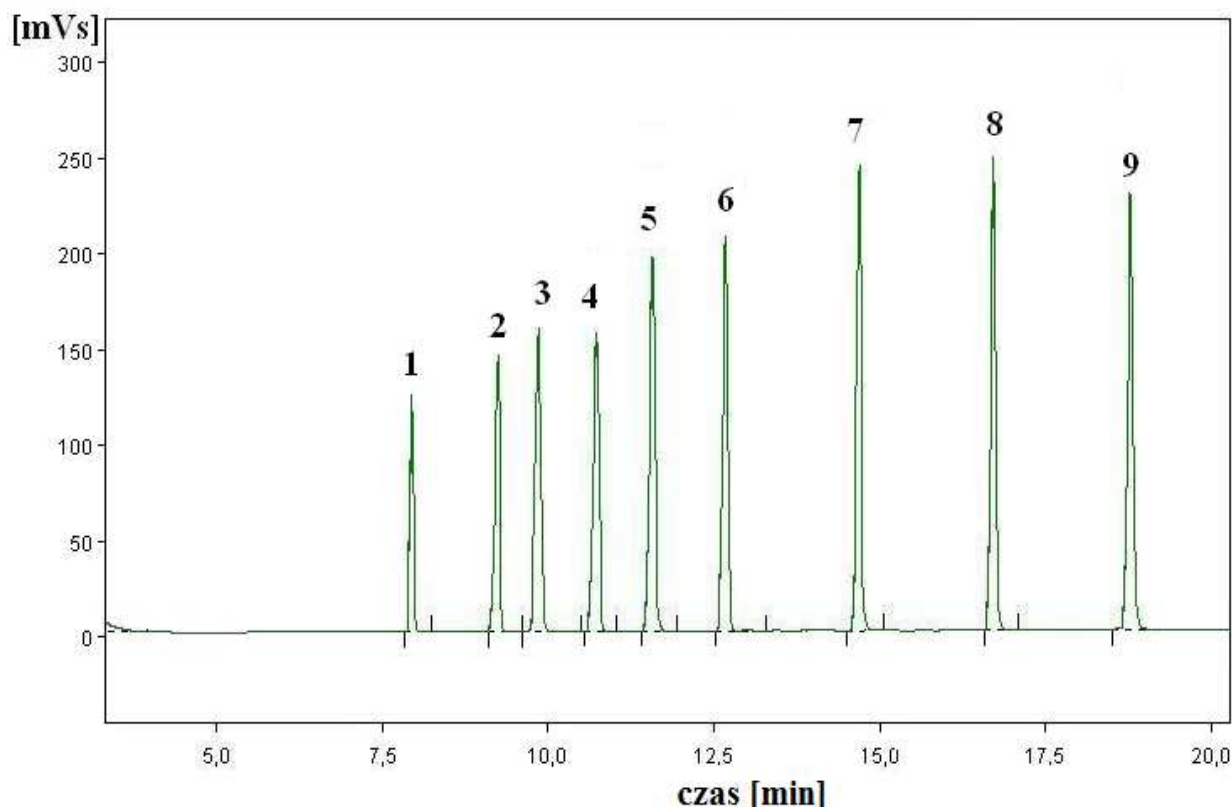
Rysunek 22. Chromatogram uzyskany w trakcie analizy wodnej próbki wzorcowej zawierającej anality z grupy KKA na poziomie stężenia każdego z kwasów 25 mg/L, z zastosowaniem układu kolumn A. Program temperaturowy: 80 °C (2min) 7 °C/min do temperatury 220 °C (2min); dozownik: bez podziału strumienia, objętość dozowanej próbki: 2 μ L.

[1-kwas octowy; 2-kwas propionowy; 3-kwas izomasłowy, 4-kwas masłowy, 5-kwas izowalerianowy, 6-kwas walerianowy; 7-kwas kapronowy, 8-kwas enantowy; 9-kwas kaprylowy]

Stosując taki układ kolumn (**Rysunek 22**), nie osiągnięto rozdzielania wszystkich analitów z grupy KKA. Piki oznaczanych związków na chromatogramie są poszerzone w

stosunku do pików uzyskanych z wykorzystaniem kolumny z glikolem polietylenowym jako fazą stacjonarną. Ponadto obserwowano występowanie efektu „ogonowania pików”, co utrudnia interpretację jakościową, a w szczególności ilościową chromatogramów.

Kolejny zaproponowany układ rozdzielczy to: polarna kolumna kapilarna SUPEROX II FA (10m x 0,53mm x 1,20 μ m), dezaktywowana kolumna kapilarna (2m x 0,53mm), kolumna Rtx-1, kolumna zabezpieczająca (0,5m x 0,32mm)- **układ B (Rysunek 23)**. Taki układ kolumn chromatograficznych spowodował bardzo silne zawężenie („zogniskowanie”) pasma, a tym samym korzystnie wpłynął na rozdzielczość postępowania analitycznego. Woda wykazuje dużą retencję ze względu na silne oddziaływanie z polarną fazą stacjonarną. Zastosowanie niepolarniej fazy umożliwia zróżnicowanie oddziaływania i retencję analitów z grupy KKA, natomiast woda nie wykazuje żadnej retencji.



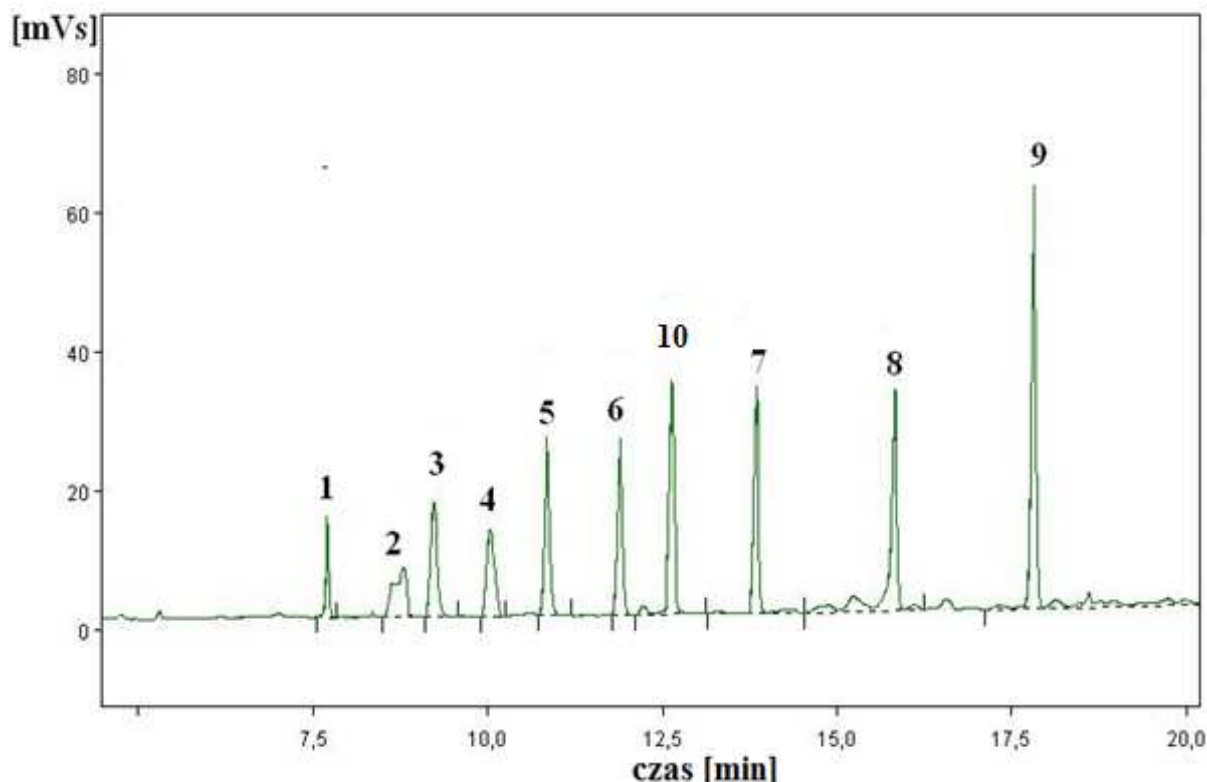
Rysunek 23. Chromatogram uzyskany w trakcie analizy wodnej próbki wzorcowej zawierającej anality z grupy KKA na poziomie stężenia każdego z kwasów 25 mg/L, z zastosowaniem układu kolumn B (parametry jak na Rysunku 23).

Sprawdzono także układ: dezaktywowana kolumna kapilarna (1,5m x 0,53mm), polarna kolumna kapilarna SUPEROX II FA (10m x 0,53mm x 1,20 μ m), dezaktywowana

kolumna kapilarna (2m x 0,53mm), kolumna Rtx-1, kolumna zabezpieczająca (0,5m x 0,32mm) – **układ C** (**Rysunek 24**).

W tym przypadku uzyskano chromatogram trudniejszy do interpretacji.

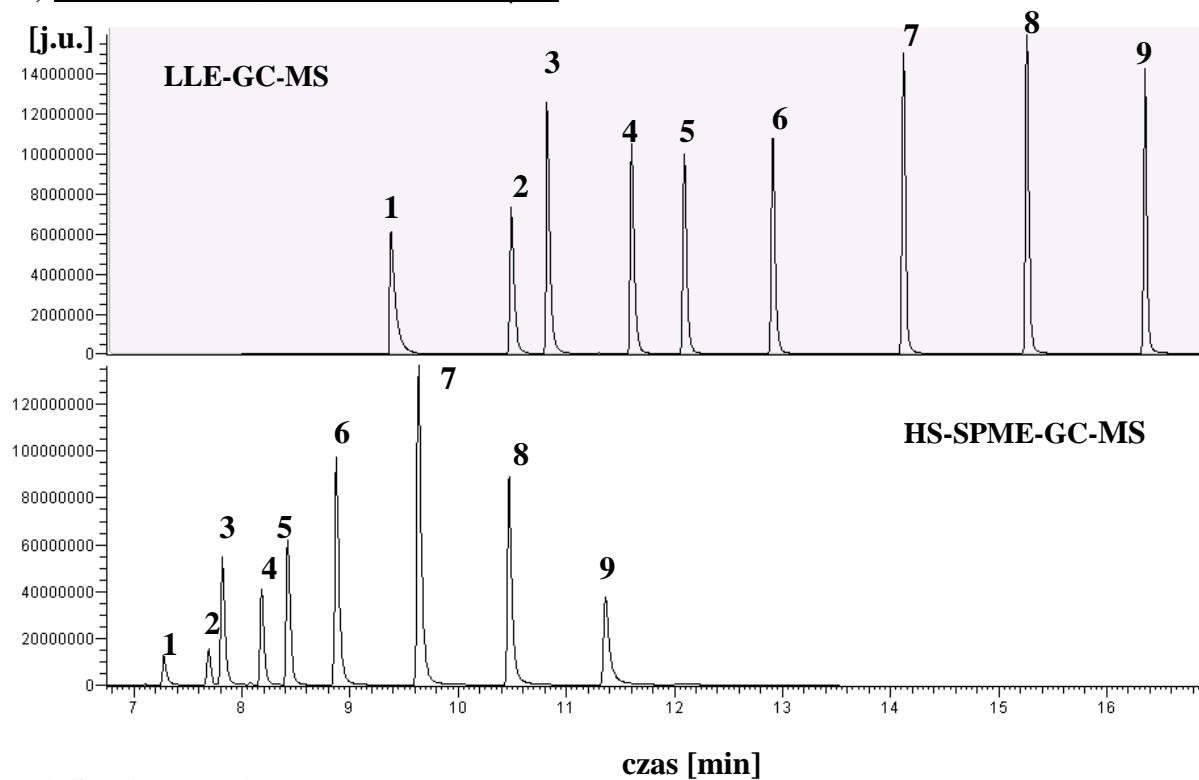
Wybrano więc następujący układ kolumn chromatograficznych: polarna kolumna kapilarna SUPEROX II FA (10m x 0,53mm x 1,20 μ m), dezaktywowana kolumna kapilarna (2m x 0,53mm), kolumna Rtx-1, kolumna zabezpieczająca (0,5m x 0,32mm) jako parametr opracowanej metodyki analitycznej.



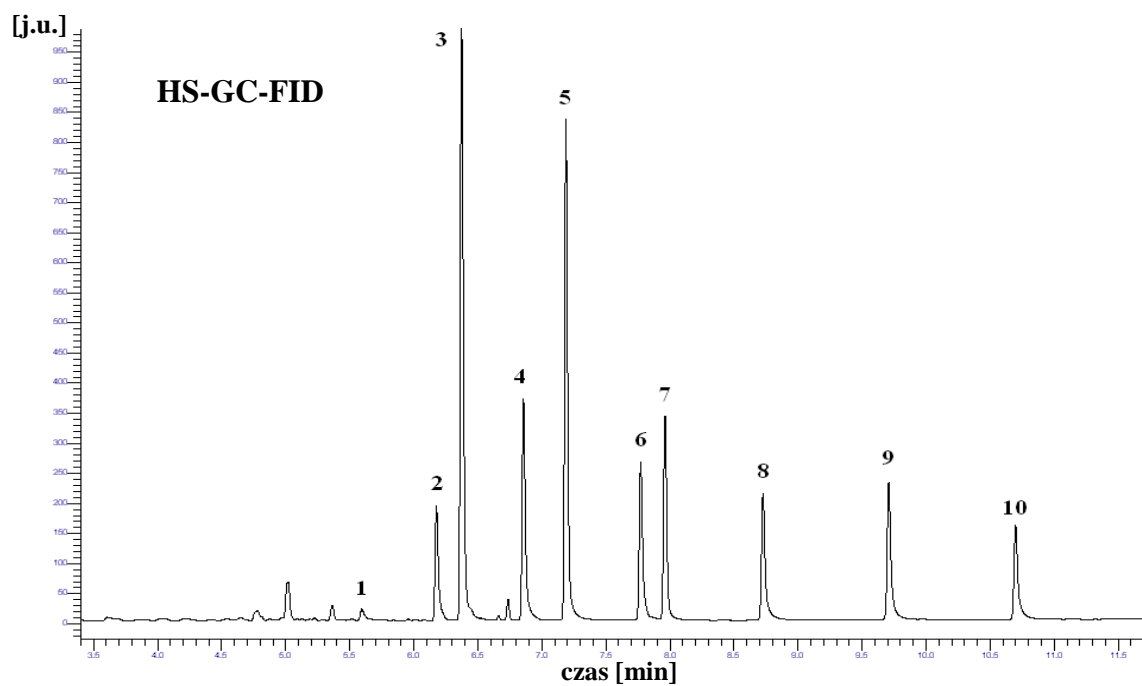
Rysunek 24. Chromatogram uzyskany w trakcie analizy wodnej próbki wzorcowej zawierającej anality z grupy KKA na poziomie stężenia każdego z kwasów 25 mg/L, z zastosowaniem układu kolumn C (parametry jak na Rysunku 23).
[10 – kwas 2-etylomastłowy]

Na **Rysunku 25** przedstawiono chromatogramy uzyskane w trakcie analizy badanych próbek wzorcowych z wykorzystaniem różnych metodyk analitycznych, opisanych w rozprawie doktorskiej, przy użyciu wspomnianych wyżej kolumn kapilarnych z glikolem polietylenowym jako fazę stacjonarną.

a) Stabilwax-DA (30m x 0,32mm x 0,5 μ m)



(b) Stabilwax-DA (30m x 0,25mm x 0,25 μ m)



*[1- kwas octowy; 2- kwas propionowy; 3- kwas izomasłowy; 4- kwas masłowy; 5- kwas izowalerianowy; 6- kwas walerianowy; 7- kwas 2-etylomasłowy; 8- kwas kapronowy; 9- kwas enantowy; 10- kwas kaprylowy].

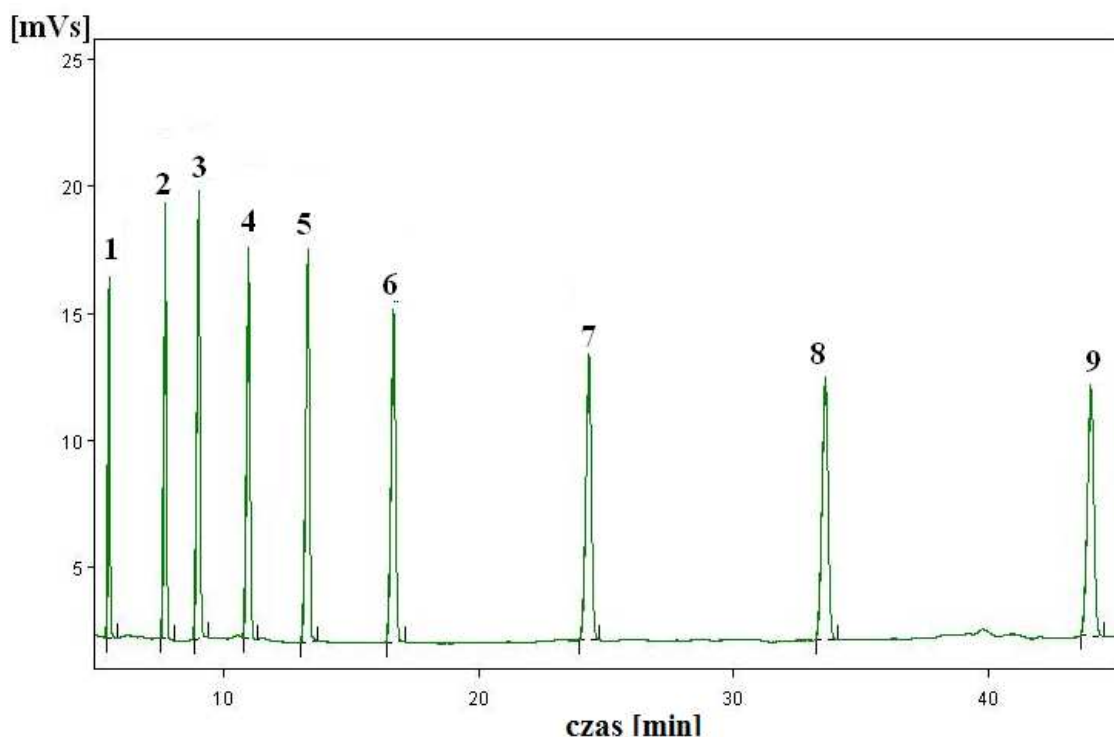
Rysunek 25. Przykładowe chromatogramy uzyskane w trakcie analizy próbek wzorcowych analitów z grupy KKA w wodzie o stężeniu 25, 50 i 500 mg/L, stosując różne sposoby przygotowania próbek.

7.1.2. Dobór sposobu wprowadzania próbek wodnych do kolumny kapilarnej

W przypadku ręcznego wprowadzania próbki do kolumny chromatograficznej zastosowano technikę pustej zimnej igły, by zapobiec procesowi dyskryminacji analitów w wyniku odparowania próbki w czasie wprowadzania igły strzykawki do komory dozownika chromatograficznego.

Podczas stosowania procedury GC-FID, porównano chromatogramy uzyskane przy wprowadzaniu próbek do układu chromatograficznego, poprzez dozownik pracujący w trybie z podziałem strumienia i bez podziału strumienia.

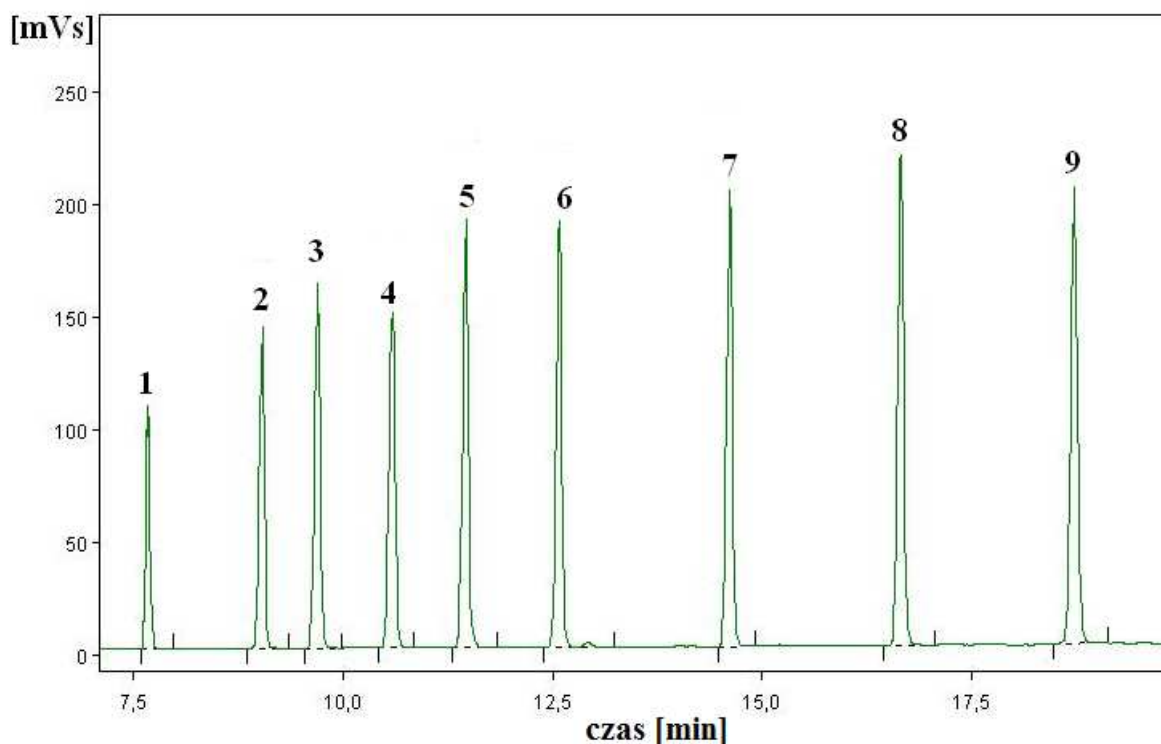
Na kolejnych rysunkach przedstawiono chromatogramy uzyskane w wyniku analizy próbek wzorcowych analitów z grupy KKA w wodzie o stężeniu 25 mg/L, wprowadzanych do chromatografu gazowego z wykorzystaniem systemu z podziałem (**Rysunek 26**) i bez podziału strumienia (**Rysunek 27**). Podczas pracy w systemie z podziałem strumienia, ze względu na krótki czas przebywania próbki w dozowniku oraz konieczność odparowania rozpuszczalnika (wody), stosowano wyższą początkową temperaturę kolumny. W przypadku stosowania wody jako rozpuszczalnika, temperatura początkowa kolumny wynosiła powyżej 100°C.



Rysunek 26. Chromatogram uzyskany w trakcie analizy wodnej próbki wzorcowej zawierającej anality z grupy KKA na poziomie stężenia każdego z kwasów 25 mg/L, z zastosowaniem dozownika w wersji z podziałem strumienia (Program temperaturowy: 105 °C (1 min); 1 °C/min do temperatury 170 °C (15min), temp. dozownika: 250 °C, objętość próbki 1 µL).

Dobór odpowiedniego sposobu wprowadzania próbek wodnych do kolumny chromatograficznej, uwzględniający w szczególności zróżnicowaną lotność i stabilność termiczną krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksylowych w próbce wodnej, jest zadaniem bardzo istotnym i ma znaczący wpływ na dokładność uzyskiwanych wyników.

Do oznaczania związków z grupy KKA, występujących w badanych próbkach wodnych na poziomie śladów, szczególnie użytecznym jest stosowanie dozowania bez podziału strumienia, ponieważ w tej sytuacji cała objętość próbki wprowadza się bezpośrednio do kolumny. Dzięki temu uzyskuje się dobrą powtarzalność dozowania i niższą granicę oznaczalności. W dalszych badaniach wykorzystywano technikę dozowania bez podziału strumienia.



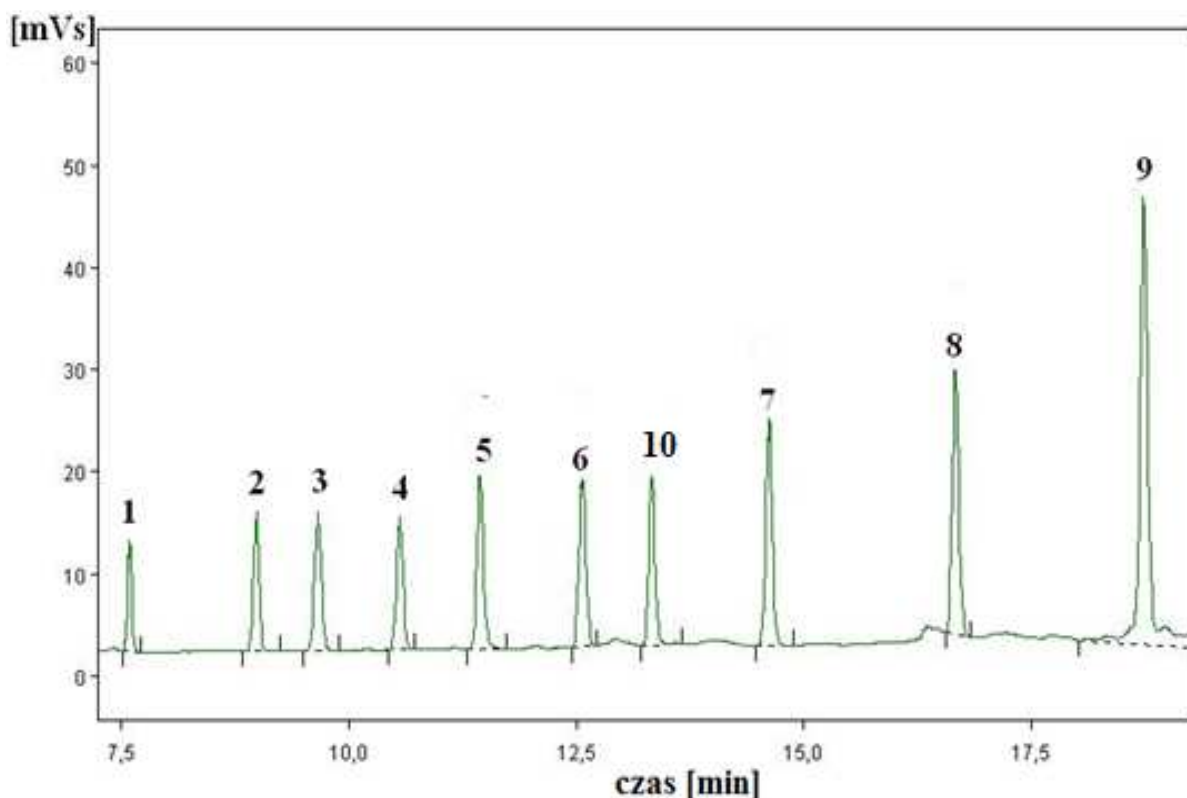
Rysunek 27. Chromatogram uzyskany w trakcie analizy wodnej próbki wzorcowej zawierającej anality z grupy KKA na poziomie stężenia każdego z kwasów 25 mg/L z zastosowaniem dozownika w wersji bez podziału strumienia (Program temperaturowy: 80 °C (30s); 7 °C/min do temperatury 200 °C (2min), temp. dozownika: 250 °C, objętość próbki 1 μL)

Wartość liczbowa granicy oznaczalności zależy między innymi od wielkości próbki wprowadzanej do dozownika, ponieważ nadmierne zwiększenie objętości próbki może pogarszać kształt pików, a tym samym stopień rozdzielania i jakość uzyskiwanych wyników oznaczeń. Dobierano również wielkość dozowanej próbki.

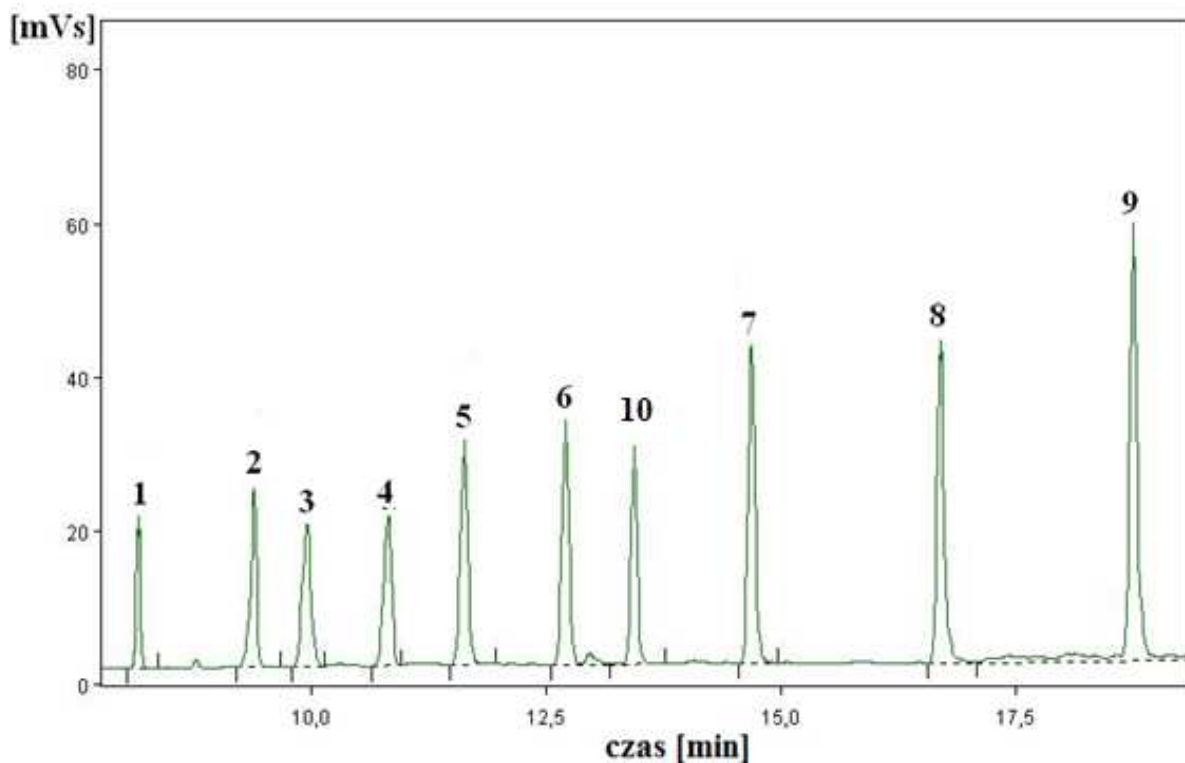
Na **Rysunkach 28-30** przedstawiono chromatogramy uzyskane w wyniku analizy wodnej próbki wzorcowej, wprowadzając kolejno objętości 1, 2 oraz 3 μL o stężeniu 25 mg/L każdego kwasu do układu GC-FID (warunki chromatograficzne-**Tabela 13**).

Objętość 2 μL próbki dozowanej do układu chromatograficznego, umożliwia uzyskanie zadawalająco wąskich pasm chromatograficznych poszczególnych analitów, przy jednoczesnym obniżeniu, czyli polepszeniu wartości liczbowej granicy oznaczalności.

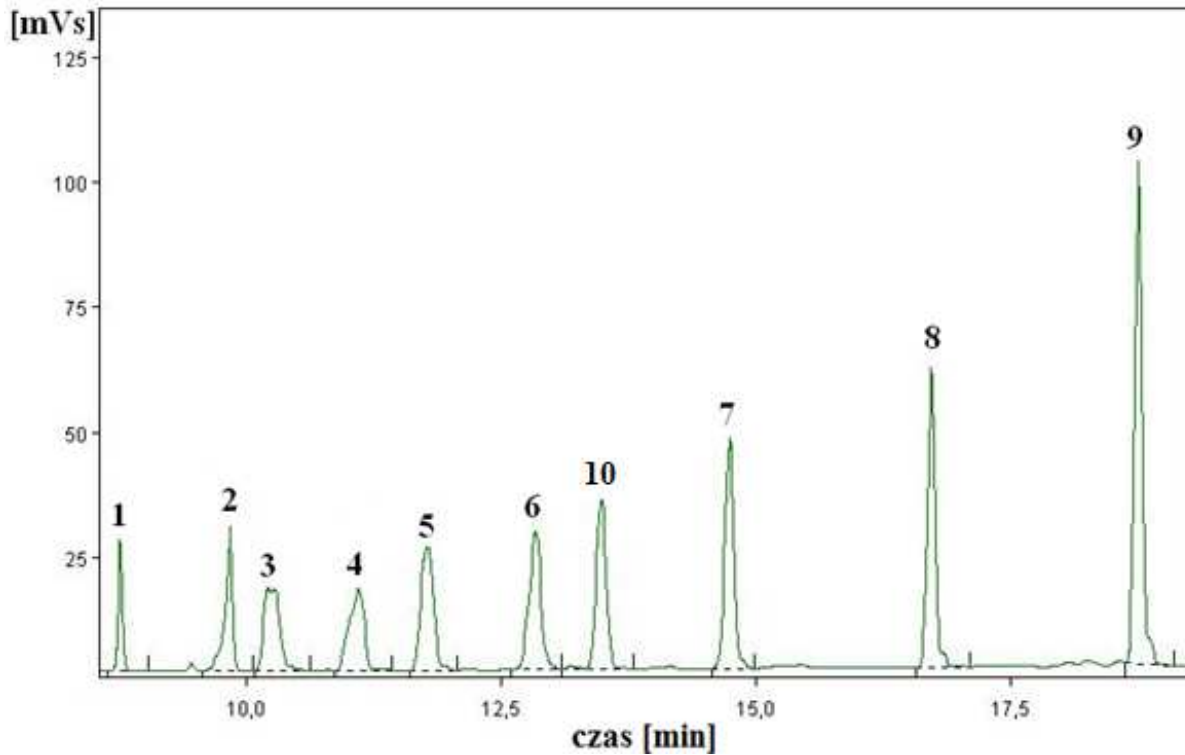
Program temperaturowy pieca dobierano na podstawie danych, zawartych w dostępnej literaturze oraz doświadczeń i badań własnych. W rezultacie program temperaturowy był następujący: temperatura początkowa 85°C (30s), następnie narost temperatury z szybkością 7°C/min do temperatury 220°C (1min). Czas analizy wynosił ok. 22 min.



Rysunek 28. Chromatogram uzyskany w trakcie analizy wodnej próbki wzorcowej o stężeniu każdego kwasu 25 mg/L (objętość dozowanej próbki: 1 μL).



Rysunek 29. Chromatogram uzyskany w trakcie analizy wodnej próbki wzorcowej o stężeniu każdego kwasu 25 mg/L (objętość dozowanej próbki: 2 μ L).



Rysunek 30. Chromatogram uzyskany w trakcie analizy wodnej próbki wzorcowej o stężeniu każdego kwasu 25 mg/L (objętość dozowanej próbki: 3 μ L).

7.1.3. Dobór temperatury dozownika GC i czasu desorpcji analitów z włókna urządzeniem do SPME

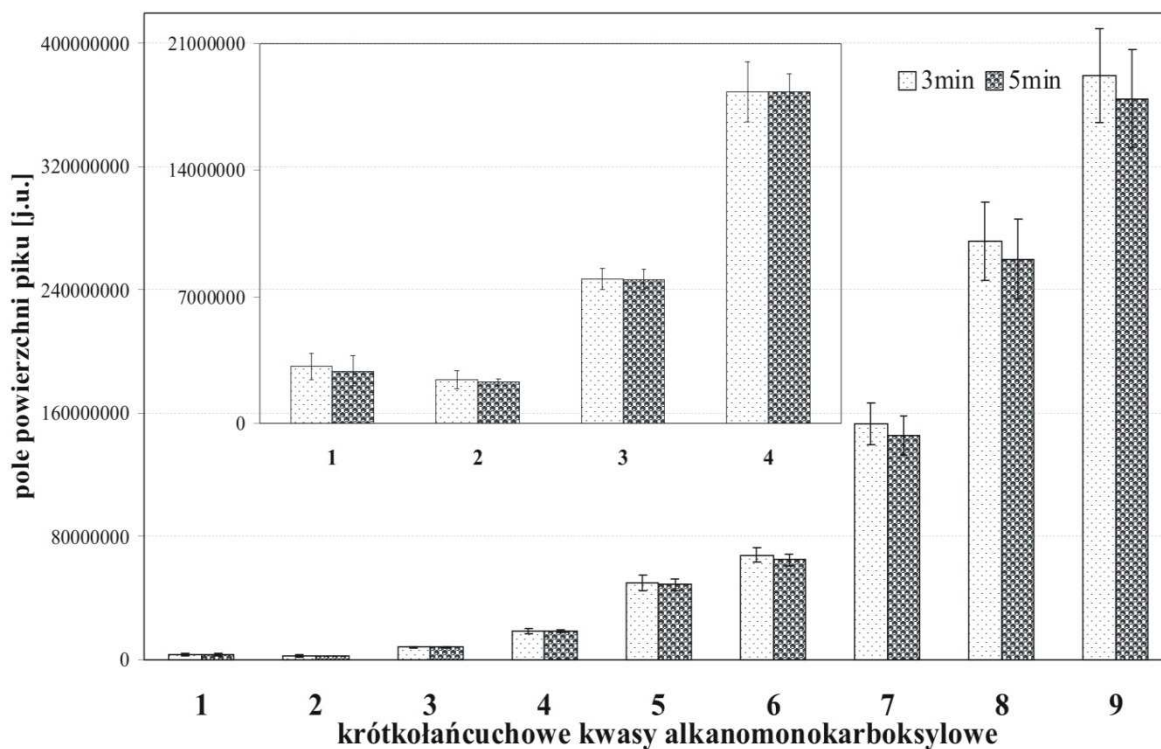
Głównymi czynnikami wpływającymi na termiczną desorpcję krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksylowych z włókna urządzenia do SPME są: temperatura, czas desorpcji i położenie igły w dozowniku GC. Im wolniej będą desorbowane anality, tym ich pasma będą szersze w kolumnie chromatograficznej. Wzrost temperatury powoduje zmniejszenie powinowactwa analitów do włókna, a tym samym zwiększa efektywność ich uwolnienia, zaś natężenie przepływu gazu nośnego określa czas przeniesienia desorbatów z dozownika do kolumny GC. Efektywność termiczna desorpcji analitów jest również zależna od lotności analitów i grubości pokrycia włókna. W badaniach stosowano włókno ekstrakcyjne o długości 1 cm, pokryte fazą stacjonarną PEG o grubości filmu 60 μm .

Większość dozowników w chromatografach gazowych jest przystosowana do bezpośredniego wprowadzenia włókna. Objętość wkładki wpływa na kształt pików chromatograficznych; zbyt duża objętość jest powodem poszerzania pasma analizowanych substancji, dlatego też do analizy stosowano wkładkę o średnicy 1 mm. W przypadku desorpcji analitów z włókna, można stosować wkładkę o bardzo małej objętości, bo nie ma w tym przypadku rozpuszczalnika, który zajmuje nieproporcjonalnie większą objętość niż anality. Dozownik chromatograficzny był ustawiony na pracę w układzie bez dzielenia strumienia.

Desorpcję badano w zakresie temperatur od 210°C do 250°C (podwyższając temperaturę co 10°C) przez okres 3 i 5 min. Dla kwasów od 2 do 5 atomów węgla w cząsteczce, największe pola powierzchni pików na chromatogramie uzyskano dla temperatury 220 i 230°C. Dalsze podwyższanie temperatury prowadziło do obniżenia powierzchni pików tych analitów, za wyjątkiem wyższych kwasów (C7-C8). Następnie porównano powierzchnie pików, uzyskane w temperaturze 230°C, prowadząc desorpcję przez okres 3 i 5 min (**Rysunek 31**). Różnice nie były statystycznie istotne, dlatego wydłużanie czasu desorpcji powyżej 3 min nie było potrzebne. Z danych literaturowych wynika [12,13], że desorpcja analitów z grupy KKA jest skuteczna jeśli jest prowadzona przez okres 3 min w temperaturze 300°C, w przypadku stosowania włókna typu polidimetylosiloksan/carboxen.

W celu sprawdzenia czy pozostające na włóknie anality będą wpływały na wyniki kolejnych oznaczeń, włókno po pierwszej desorpcji ponownie umieszczano w komorze dozownika GC i uwolnione substancje poddawano oznaczeniu. Prowadząc analizę próbek

wzorcowych o stężeniu każdego z kwasów 1, 25 i 250 mg/L, stwierdzono, że pola powierzchni pików po drugiej desorpcji nie były większe niż 0,5% pól powierzchni tych samych pików po pierwszej desorpcji. Oznacza to, że jeśli na włóknie pozostają pewne ilości analitów to są to jedynie ilości śladowe i mogą być pominięte, gdyż są mniejsze niż błędy eksperymentalne, jakimi są obarczone wyniki oznaczeń.



Rysunek 31. Wpływ czasu desorpcji na odzysk analitów z włókna PEG (temperatura desorpcji 230 °C)

7.2. Bezpośrednie wprowadzanie próbek wodnych o dużym ładunku zanieczyszczeń do komory dozownika chromatograficznego-wzbogacanie destylacyjne

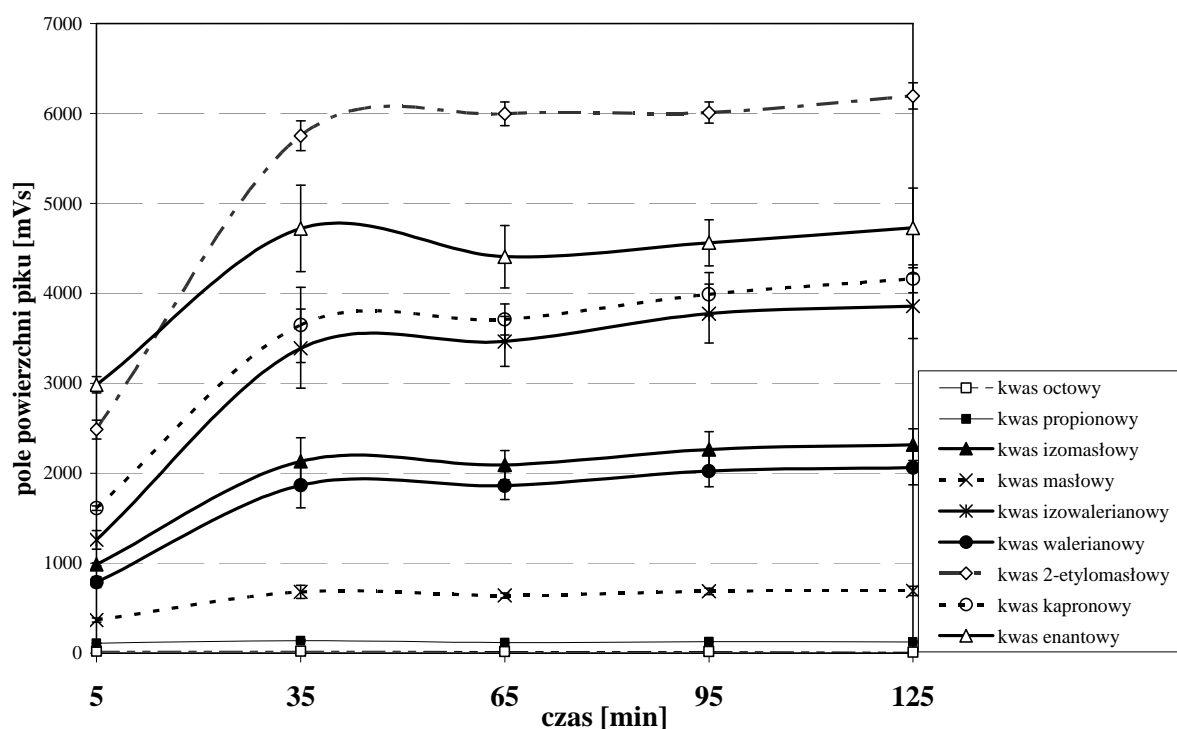
Wydawać by się mogło, że bezpośrednie dozowanie próbki wodnej, zawierającej anality z grupy KKA, do kolumny chromatograficznej to idealne rozwiązanie, gdyż przygotowanie próbki jest ograniczone do minimum, a rozpuszczalnik próbki przyjazny środowisku. Okazuje się jednak, że ten sposób może być stosowany jedynie w przypadku próbek o dość prostej matrycy oraz o stosunkowo dużym stężeniu analitów. W przypadku wielu wodnych próbek związanych z ochroną i zanieczyszczeniem środowiska, oznaczanie wymaga wprowadzenia etapu izolacji i wzbogacenia. Techniki destylacyjne, choć nie zapewniają uzyskanie dużej wartości liczbowej stopnia wzbogacenia wszystkich

rozpatrywanych kwasów, umożliwiając jednak skuteczne oddzielenie lotnych analitów od trudnolotnych i nielotnych składników, oraz zawiesin w tym związków nieorganicznych oraz wielkocząsteczkowych związków organicznych.

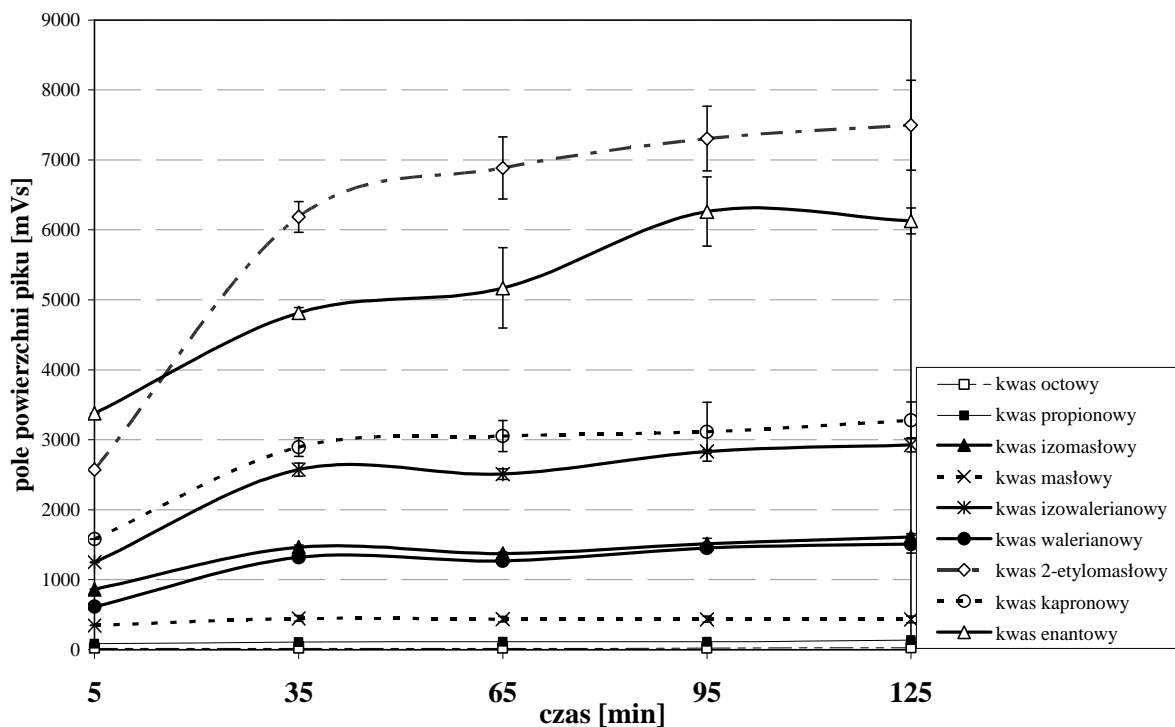
Zaplanowano efekt ten uzyskać, stosując minirektyfikację z całkowitym zawracaniem kondensatu poprzez komory przelewowe, zamknięte membraną z gumy silikonowej, poprzez którą można było pobierać kondensat wodny do analizy chromatograficznej, nawet w trakcie procesu i tym samym śledzić zmiany stężenia analitów w kondensacie i optymalizować proces. Poniżej opisano optymalizację poszczególnych parametrów.

7.2.1. Optymalizacja czasu destylacji oraz objętości próbki

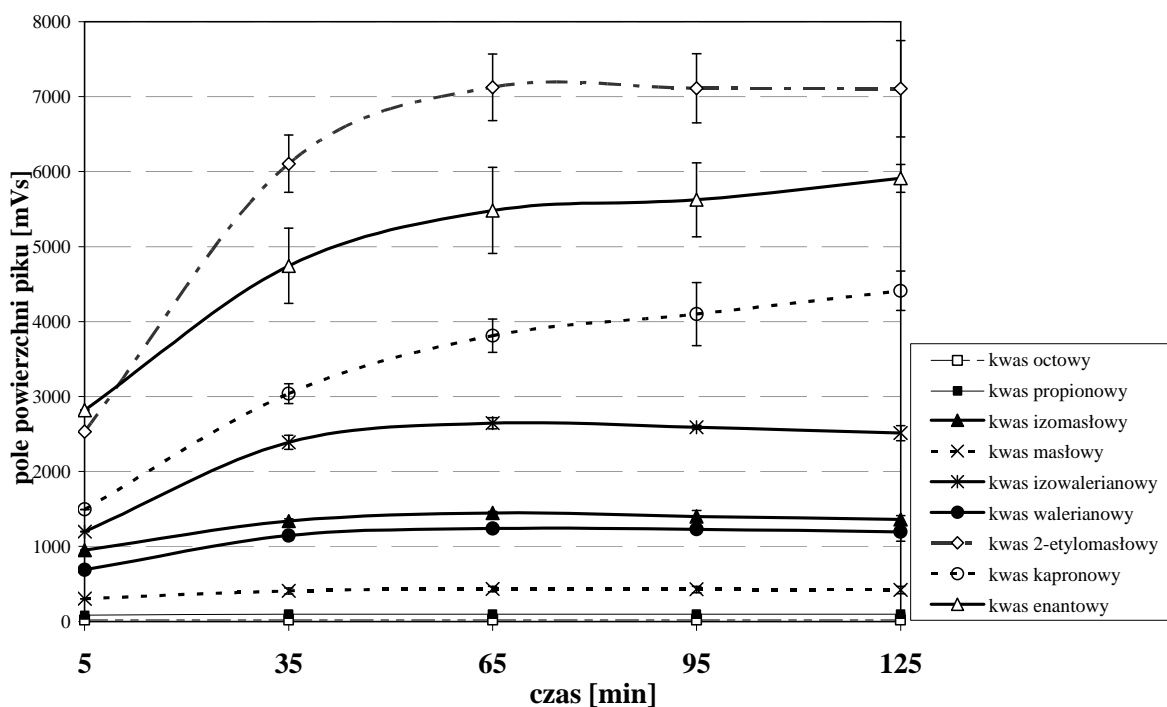
W pierwszej kolejności określono czas procesu, czyli czas, po którym stężenia wszystkich badanych kwasów w destylacie nie ulegają już zauważalnej zmianie. Zmiany te dla poszczególnych kwasów są w przypadku próbek o różnej objętości pokazano na **Rysunkach 32-34**. Dla objętości próbki 250 mL największą zawartość analitów w kondensacie stwierdzono, gdy proces trwał 95 min.



Rysunek 32. Wpływ czasu destylacji na stężenie związków z grupy KKA w kondensacie (objętość próbki 250 mL).



Rysunek 33. Wpływ czasu destylacji na stężenie związków z grupy KKA w kondensacie (objętość próbki 500 mL).



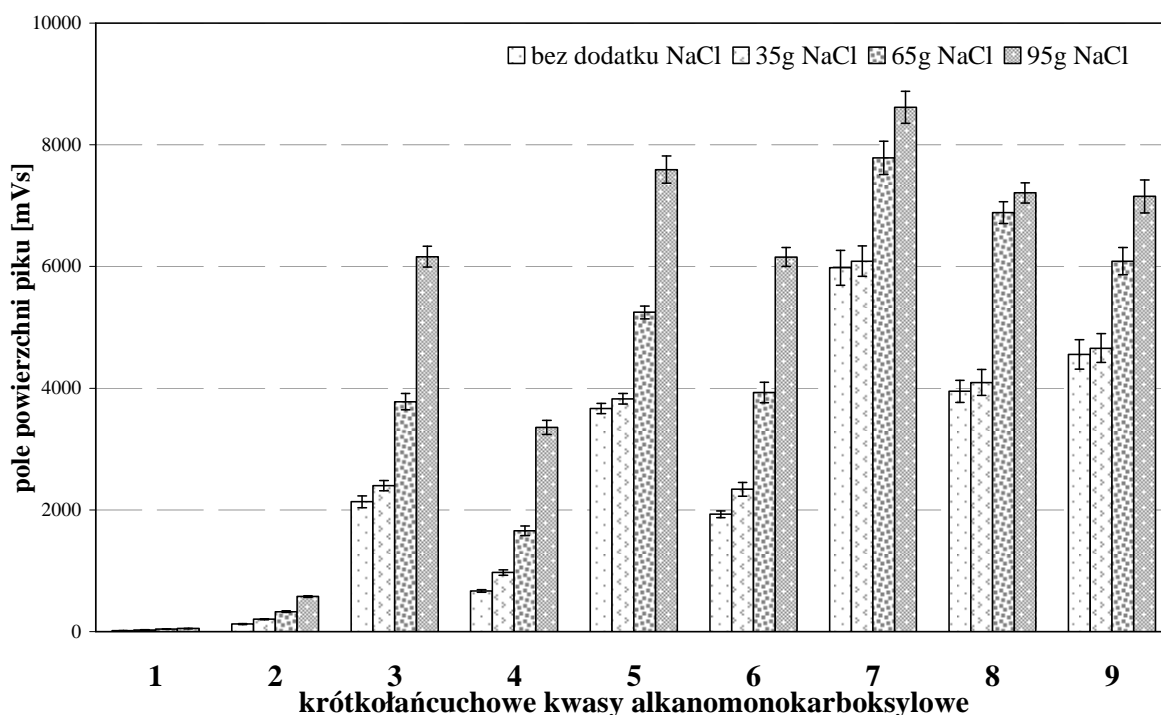
Rysunek 34. Wpływ czasu destylacji na stężenie związków z grupy KKA w kondensacie (objętość próbki 750 mL).

7.2.2. Wpływ dodatku soli na zawartość związków z grupy KKA

Zbadano także wpływ dodatku chlorku sodu w zakresie od 0 do 95 g do 250 mL próbki na zawartość analitów w kondensacie. Wyniki badań wskazują, że dodatek soli powoduje zwiększenie współczynnika wzbogacenia analitów (**Rysunek 35**).

W przypadku dodatku 95 g NaCl na 250 mL próbki, wartość liczbową współczynnika wzbogacenia mieściła się w zakresie od 1,57 (dla kwasu kapronowego) do 5,04 (dla kwasu masłowego).

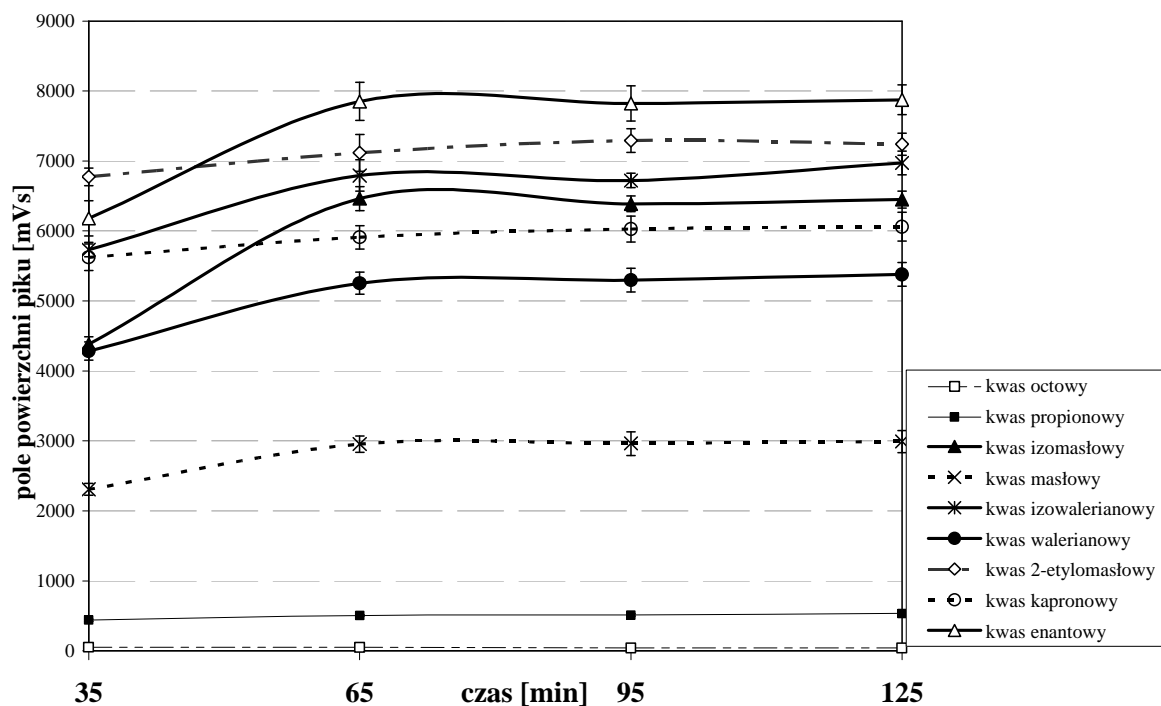
Stwierdzono również, że dodatek soli wpływa na skrócenie czasu niezbędnego do osiągnięcia stanu równowagi (**Rysunek 36**).



Rysunek 35. Wpływ dodatku soli na stężenie związków z grupy KKA w kondensacie (objętość próbki 250 mL).

Dla ustalonych ostatecznych warunków procesu oczyszczania i wzbogacania analitów wyznaczono przybliżoną wartość liczbową współczynnika wzbogacania w przypadku dodatku i bez dodatku NaCl (**Tabeli 15**).

Warto zauważyć, że wartość liczbową współczynnika wzbogacenia kwasu octowego, w przypadku destylacji bez dodatku soli, jest mniejsza od jedności. Wynika z tego, że kwas octowy ulega w tym przypadku rozcieńczeniu, ale ważne jest, że następuje znaczne oczyszczenie próbki, pozwalające wprowadzać wodny kondensat bezpośrednio do chromatografu gazowego.



Rysunek 36. Wpływ dodatku soli na czas destylacji związków z grupy KKA.

Tabela 15. Wartość liczbowa współczynnika wzbogacania związków z grupy KKA.

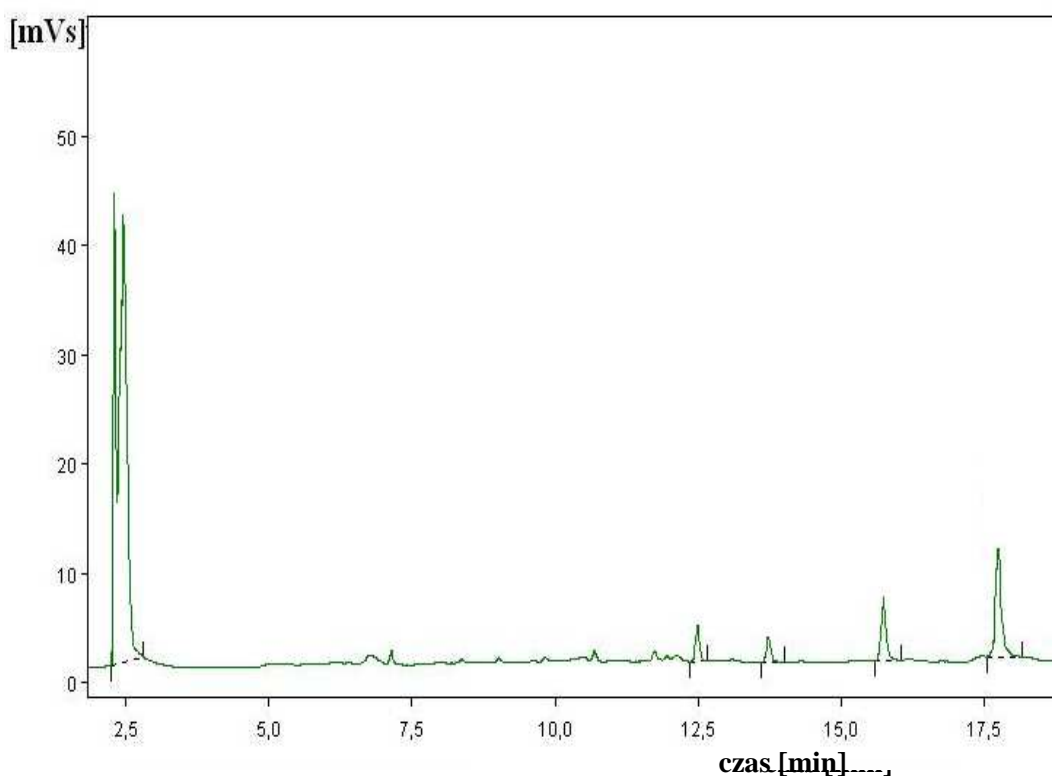
Analit	Bez dodatku NaCl		Z dodatkiem 95 g NaCl	
	średnie wzbogacenie ± odchylenie standardowe	CV [%]	średnie wzbogacenie ± odchylenie standardowe	CV [%]
Kwas octowy	0,32 ± 0,029	7,87	5,6 ± 0,22	3,44
Kwas propionowy	1,4 ± 0,035	2,18	8,9 ± 0,81	7,88
Kwas izomasłowy	18 ± 1,6	7,71	27 ± 2,0	6,41
Kwas masłowy	5,8 ± 0,29	4,30	17 ± 0,80	4,10
Kwas izowalerianowy	21 ± 2,0	7,98	17 ± 1,4	7,43
Kwas walerianowy	13 ± 1,3	8,31	18 ± 0,21	1,01
Kwas 2-etylomasłowy	25 ± 0,66	2,33	19 ± 0,031	0,01
Kwas kapronowy	20 ± 1,1	4,64	15 ± 0,73	4,24
Kwas enantowy	21 ± 1,9	7,86	13 ± 0,98	6,65
Kwas kaprylowy	20 ± 4,3	18,34	8,8 ± 0,66	6,48

Pozostałe omawiane kwasy organiczne ulegają wzbogaceniu zarówno warunkach dodatku, jak i braku NaCl. Zaobserwowano również, że wysolenie próbki stabilizuje proces destylacji, zwiększając jego powtarzalność (mniejsze wartości liczbowe współczynnika zmienności).

7.2.3. Wpływ rodzaju rozpuszczalnika (wody) na wynik analizy

Woda do przygotowania próbek wzorcowych może zawierać pewne ilości zanieczyszczeń, które mogą koeluować z analitami. Trzeba także pamiętać, że w czasie procesu substancje przeszkadzające mogą także ulegać wzbogaceniu i w ten sposób wpływać na wyniki oznaczeń także na etapie analizy próbek wzorcowych. Dlatego też poddawano analizie próbkę wody wysokiej czystości (uzyskanej z aparatu Milipore Q_{PLUS} 185) z dodatkiem H₂SO₄ i 95 g NaCl.

Na **Rysunku 37** przedstawiono chromatogram uzyskany w wyniku bezpośredniej analizy próbki wody wysokiej czystości z dodatkiem H₂SO₄ i NaCl.



Rysunek 37. Chromatogram uzyskany w wyniku analizy próbki wody wysokiej czystości (uzyskanej z aparatu Milipore Q_{PLUS} 185) z dodatkiem H₂SO₄ i 95 g NaCl.

W ten sposób można uwzględnić ewentualne substancje przeszkadzające we wszystkich odczynnikach. Uzyskany chromatogram kondensatu traktowano jako ślełą próbkę. Obecne w próbce ślepej indywidualia chemiczne, które w sposób istotny wpływają na analizę śladową kwasów, po etapie destylacji powodowały prawie dwukrotne wzbogacenie tych zanieczyszczeń w destylacie. Na tym etapie badań kwasów kapronowego, enantowego i kaprylowego nie poddano oznaczaniu w próbkach rzeczywistych.

7.3. Przygotowanie próbek wodnych do oznaczania analitów z grupy KKA z wykorzystaniem metod ekstrakcyjnych

Dobierając parametry ekstrakcji kierowano się uzyskaniem możliwie dużej wydajności ekstrakcji, a tym samym czułości akceptowalnej dla danych zadań analitycznych, zachowując jednocześnie rozsądny czas analizy i pracochłonność.

W **Tabeli 16** zestawiono przeprowadzone badania optymalizacyjne parametrów trzech szeroko stosowanych technik przygotowania próbki do analizy chromatograficznej.

Tabela 16. Zakres badań optymalizowanych, związanych z opracowaniem techniki przygotowania próbki do analizy.

Optymalizowany parametr	Technika przygotowania próbki		
	HS	HS-SPME	LLE
Temperatura	✓	✓	
Czas	✓	✓	✓
Objętość próbki	✓	✓	✓
Dodatek soli	✓	✓	✓
Rodzaj rozpuszczalnika			✓
Typ pokrycia włókna ekstrakcyjnego		✓	

7.3.1. Technika HS

Technika HS polega na przeprowadzeniu analitów z gazowej fazy nadpowierzchniowej, pozostającej w równowadze z badaną próbką wodną. Im większe jest stężenie w fazie nadpowierzchniowej tym wyższa będzie czułość i prawdopodobnie wartość liczbowa granicy oznaczalności. W niniejszej pracy wykorzystano sprzężony układ HS-GC do prowadzenia analizy.

Objętość próbki

Dobór objętości próbki w stosunku do objętości fazy nadpowierzchniowej w metodzie równowagowej, do której zalicza się technika HS jest niezmiernie istotny. Stosunek faz, całkowita objętość układu i jego geometria wpływają na szybkość ustalania się stanu równowagi.

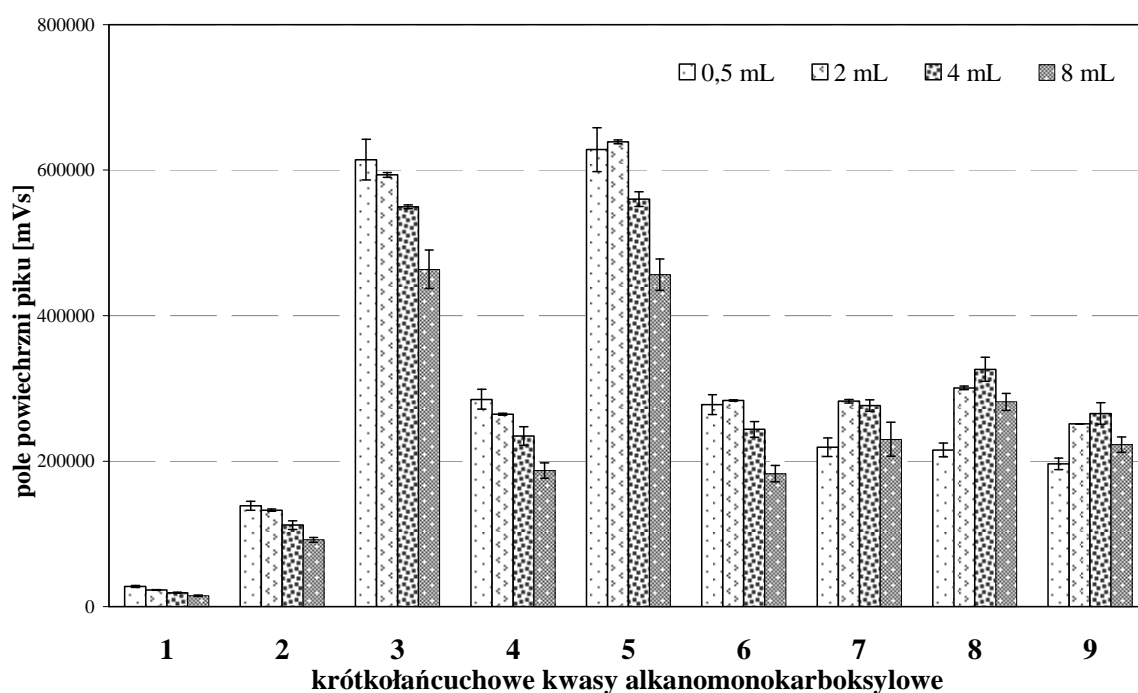
Badaniom poddano próbki wzorcowe o objętości 0,5, 2, 4 i 8 mL umieszczone w fiołce o pojemności 15 mL (**Rysunek 38**). Wpływ objętości próbki na wydajność procesu ekstrakcji, obserwowano na podstawie pól powierzchni pików, odpowiadających

poszczególnym kwasom. W przypadku, gdy objętość fazy ciekłej wynosiła zaledwie 0,5 mL obserwowano bardzo małą powtarzalność wyników.

W rozważaniach uwzględniono, zatem jedynie sytuacje, gdy dodawano 2, 4 i 8 mL wodnej próbki wzorcowej krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksyłowych.

Nieco zaskakującym wydaje się być, że wraz ze wzrostem objętości próbki malała powierzchnia pików, chociaż na podstawie rozważań termodynamicznych, można oczekiwać odwrotnego rezultatu. Wprawdzie wartości liczbowe współczynnika podziału związków z grupy KKA są stosunkowo małe, gdyż krótkołańcuchowe kwasy dobrze lub dość dobrze rozpuszczają się w wodzie, a wyżej cząsteczkowe mają względnie wysokie temperatury wrzenia. Zwiększenie objętości może, zatem powodować jedynie nieznaczny wzrost ułamka analitu w fazie nadpowierzchniowej.

Obserwowany statystycznie istotny spadek można jedynie wyjaśnić faktem, że stan równowagi nie zostaje osiągnięty, w przypadku próbek o objętości 4 i 8 mL i wskazane jest stosowanie próbek o objętości 2 mL.

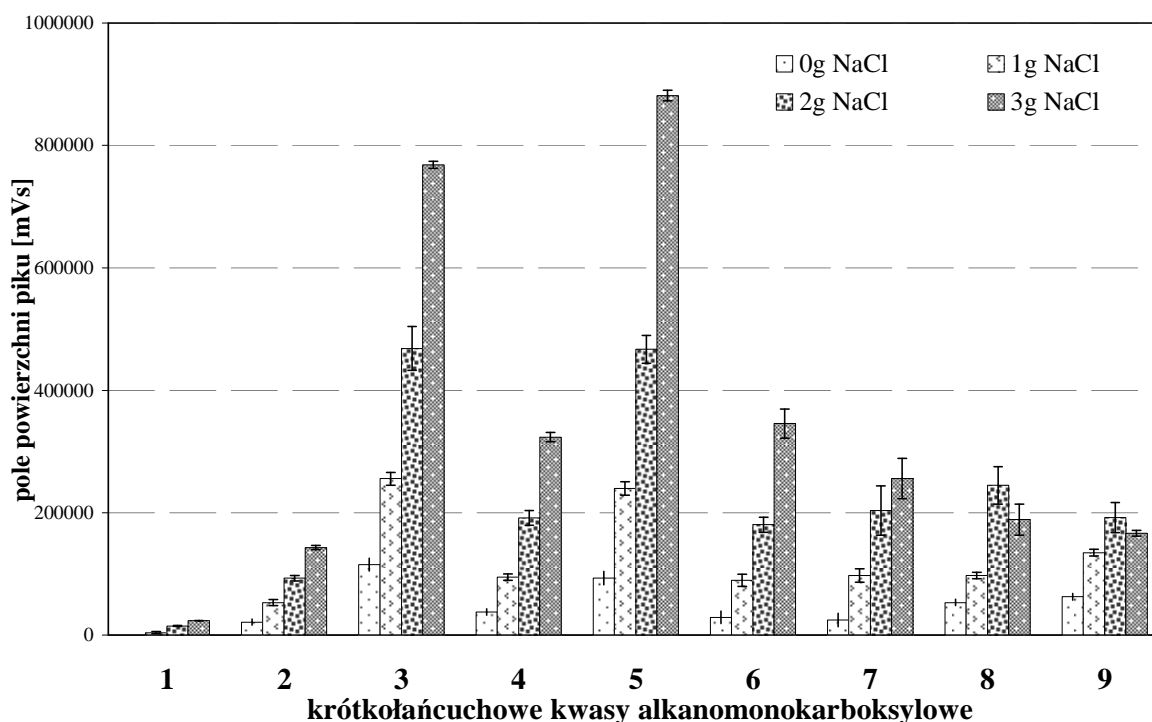


Rysunek 38. Wpływ objętości próbki na wydajność ekstrakcji analitów

(próbka roztworu wzorcowego analitów z grupy KKA w wodzie o stężeniu każdego z kwasów 500 mg/L w 15 mL fiołce, temperatura ekstrakcji 85 °C, czas 30 min, objętość fazy nadpowierzchniowej wprowadzanej do kolumny 0,2 mL, czas wyrównywania ciśnień 3 min).

Dodatek soli

Badając wpływ dodatku soli na ekstrakcję do fazy nadpowierzchniowej arbitralnie przyjęto objętość próbki 8 mL. Na **Rysunku 39** przedstawiono wyniki obrazujące wpływ dodatku chlorku sodu na stężenie związków z grupy KKA. Stwierdzono, że zauważalny wpływ dodatku soli występuje, gdy osiągnięto stężenie 0,75 g na 2 mL czyli 3 g na 8 mL próbki. Dla takiego stężenia obserwowano wzrost sygnału detektora, a więc wyekstrahowanej ilości analitów aż o 80% w przypadku kwasu octowego i 70% dla propionowego. W przypadku wyższych kwasów obserwowano zmniejszający się wpływ dodatku soli na wydajność ekstrakcji.

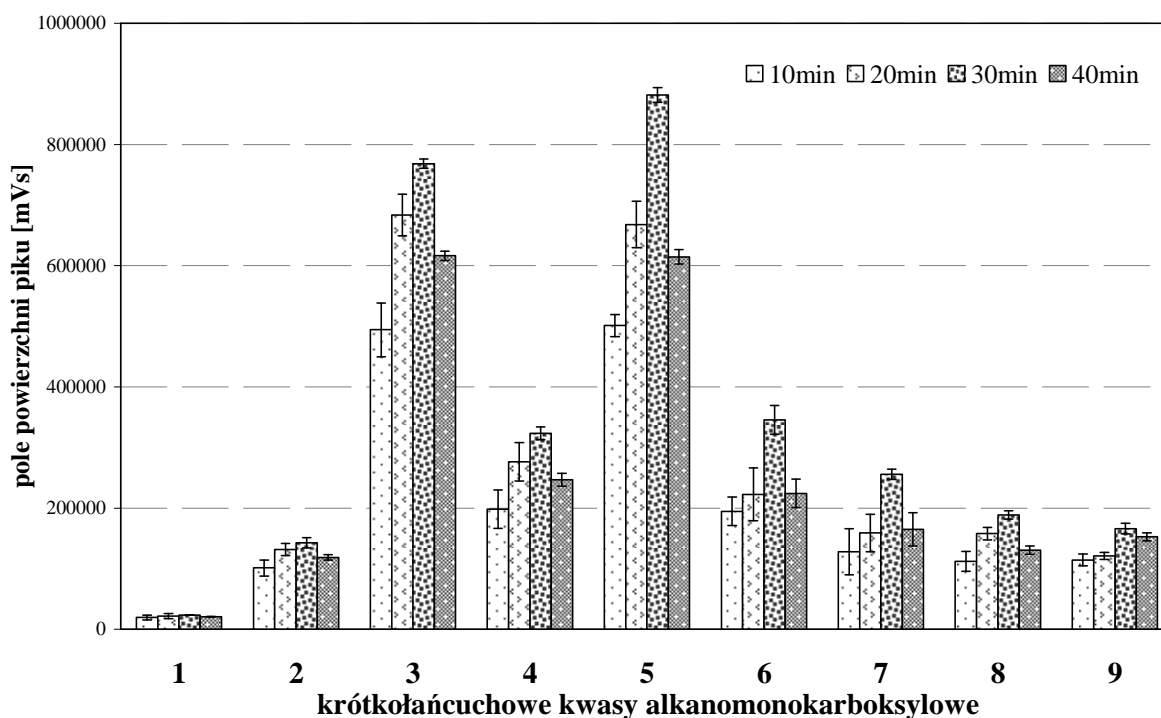


Rysunek 39. Wpływ dodatku soli na wydajność ekstrakcji analitów z grupy KKA (parametry jak na Rysunku 39).

Czas ekstrakcji analitów z próbki

Przed wprowadzeniem fazy nadpowierzchniowej do chromatografu gazowego, fiołki zawierające próbkę wodną były termostatowane przez określony okres czasu. Dobieranie czasu ekstrakcji polegało na obserwowaniu zmian stężenia analitów w fazie nadpowierzchniowej w funkcji czasu utrzymywania fiołki zawierającej próbkę w wybranej temperaturze ekstrakcji. Badanie polegało na pomiarze powierzchni pików uzyskanych w trakcie analizy identycznych próbek fazy nadpowierzchniowej, stosując następujące czasy ekstrakcji: 10, 20, 30 i 40 min.

Stwierdzono, że wydłużanie czasu ekstrakcji powyżej 30 min, nie powodowało dalszego wzrostu powierzchni pików chromatograficznych żadnego z kwasów, co wskazuje, że albo już w tym czasie 30 min osiąga się stan równowagi dla wszystkich rozpatrywanych kwasów lub zmiany są mniejsze niż błędy oznaczeń (**Rysunek 40**). Wydłużanie czasu ekstrakcji powyżej 30 min powodowało w wielu wypadkach spadek sygnału, prawdopodobnie wywołane niekontrolowanym stratom nietlotnych analitów.

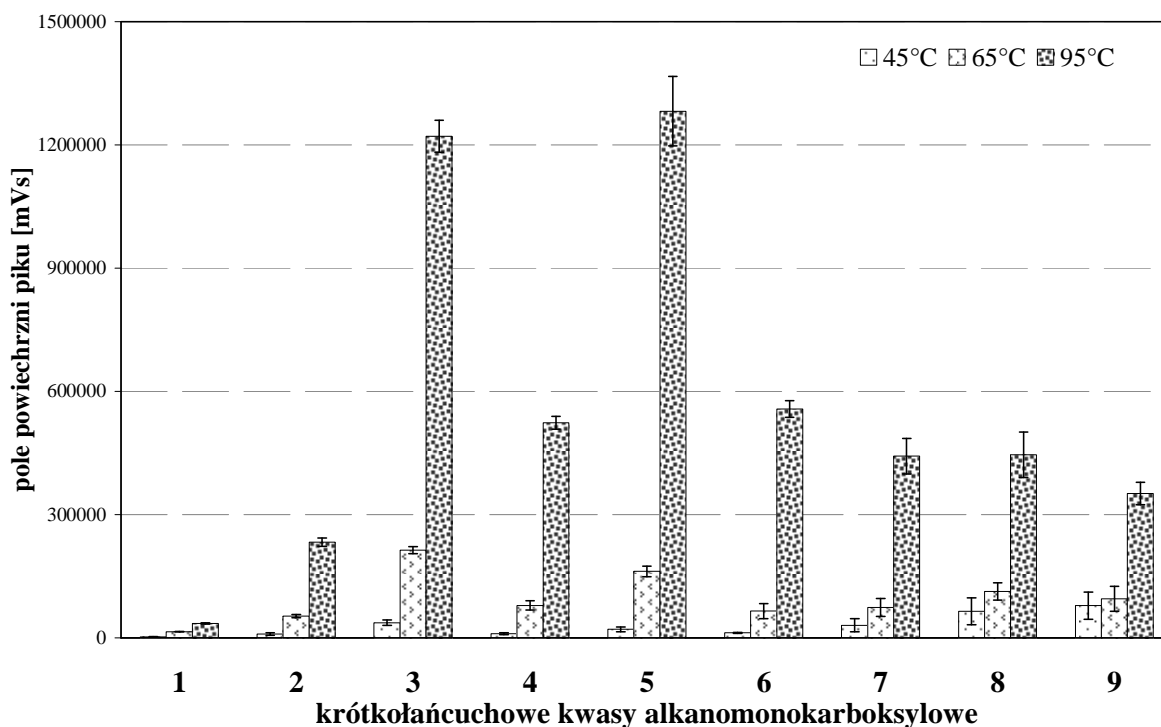


Rysunek 40. Wpływ czasu ekstrakcji na stężenie analitów w fazie nadpowierzchniowej (8 mL próbki wzorcowej analitów z grupy KKA w wodzie o stężeniu 500 mg/L z dodatkiem 3g NaCl w 15 mL fiołce, temperatura termostatowania 85 °C, objętość fazy nadpowierzchniowej wprowadzanej do kolumny 0,2 mL, czas wyrównywania ciśnienia 3 min).

Temperatura ekstrakcji

Wraz ze wzrostem temperatury ułamek analitów, które zostały przeniesione do fazy nadpowierzchniowej rośnie. Analizę próbek wzorcowych przeprowadzono stosując temperaturę ekstrakcji, wynoszącą odpowiednio 45, 65 i 95°C.

Na **Rysunku 41** przedstawiono wpływ temperatury na wydajność ekstrakcji analitów z grupy KKA. Jak wynika z diagramu słupkowego, w przypadku ekstrakcji typu HS maksymalny odzysk uzyskuje się dla temperatury 95°C.



Rysunek 41. Wpływ temperatury na wydajność ekstrakcji analitów (2 mL próbki wzorcowej związków z grupy KKA w wodzie każdy, o stężeniu 500 mg/L; dodatek 0,75 g NaCl, objętość fazy nadpowierzchniowej wprowadzanej do kolumny chromatograficznej 0,2 mL, czas wyrównywania ciśnienia 3 min).

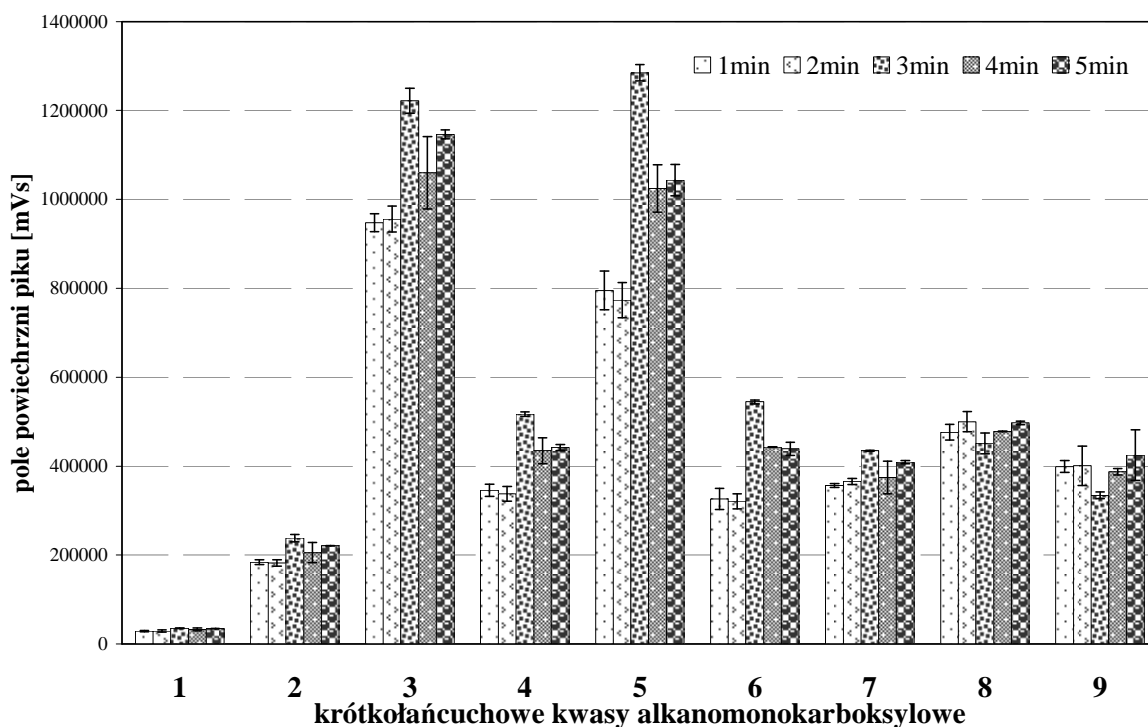
Czas wyrównywania ciśnienia

Przed wprowadzeniem fazy nadpowierzchniowej do kolumny, ciśnienie w fiolce powinno być takie same jak ma gaz nośny na wlocie do kolumny chromatograficznej.

Czas wyrównywania ciśnienia jest zatem okresem, w którym do fiolki doprowadzany jest gaz nośny za pomocą igły, którą przebija się membranę.

Analizę próbek wzorcowych przeprowadzono stosując czas wyrównywania ciśnienia wynoszący odpowiednio 1, 2, 3, 4 i 5 min. Czas powinien być dostatecznie długi, by zapewnić homogeniczność fazy gazowej w fiolce. W przypadku krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksyłowych największe piki, a tym samym czułość, uzyskiwano dla czasu 3 min (**Rysunek 42**).

Jest to wartość liczbowa, która jest charakterystyczna dla danego urządzenia, analitów i wielu innych parametrów, dlatego powinna być sprawdzana przed rozpoczęciem badań z nowymi zadaniami analitycznymi i charakterem badanych próbek.



Rysunek 42. Wpływ czasu wyrównywania ciśnienia na wydajność ekstrakcji analitów (parametry jak na Rysunku 41).

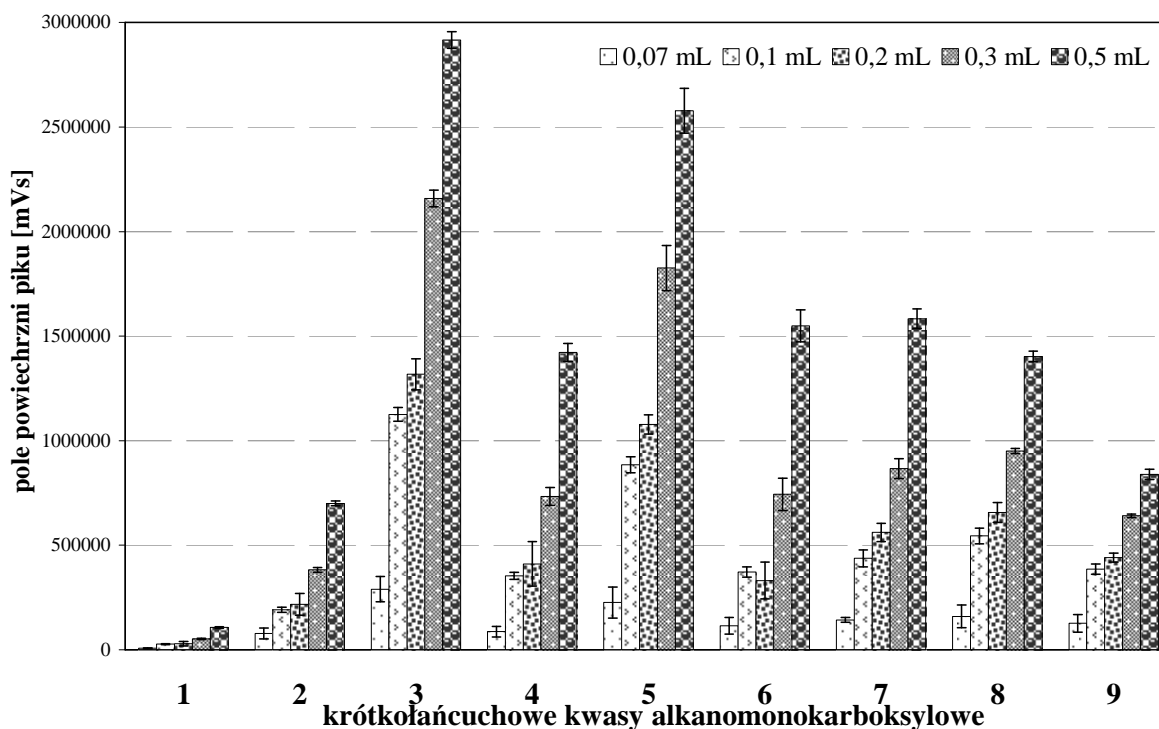
Objętość próbki fazy gazowej wprowadzanej do kolumny GC

Kolejnym parametrem jest objętość dozowanej próbki fazy gazowej do kolumny, która dla stosowanego urządzenia może być zmieniana w zakresie od 0,07 do 0,5 mL.

Na **Rysunku 43** przedstawiono wyniki obrazujące wpływ objętości próbki nadpowierzchniowej wprowadzanej do kolumny GC na ilość i powtarzalność oznaczania analitów z grupy KKA.

Nawet w przypadku próbek o objętości 0,5 mL, jakość chromatogramów jest dobra, a rozrzut wyników nie był znacząco większy niż przy mniejszych objętościach.

Przyjęto zatem 0,5 mL jako parametr procedury, ponieważ wówczas powierzchnia pików, a tym samym czułość były największe.



Rysunek 43. Wpływ objętości fazy nadpowierzchniowej wprowadzanej do kolumny GC na czułość (pole powierzchni) i powtarzalność pomiarów analitów z grupy KKA (2 mL próbki wzorcowej analitów z grupy KKA w wodzie każdy, o stężeniu 500 mg/L, dodatek 0,75 g NaCl, temperatura termostatowania 95 °C, objętość fazy nadpowierzchniowej wprowadzanej do kolumny chromatograficznej 0,2 mL, czas wyrównywania ciśnienia 3 min).

7.3.2. Technika HS-SPME

Ten sposób izolacji i wzbogacenia polega na ekspozycji włókna urządzenia do SPME w fazie nadpowierzchniowej próbki i umieszczeniu włókna ekstrakcyjnego w gorącym dozowniku chromatograficznym w celu desorpcji zatrzymanych analitów i wprowadzeniu ich (w postaci wąskiego pasma) do kolumny chromatograficznej.

Rodzaj pokrycia włókna ekstrakcyjnego

W celu osiągnięcia dobrej selektywności i wydajności ekstrakcji analitów włókno powinno charakteryzować się odpowiednimi właściwościami chemicznymi i fizycznymi. W pierwszym etapie wybór fazy stacjonarnej opiera się na zasadzie „podobne rozpuszcza się w podobnym”, czyli niepolarne anality są skuteczniej ekstrahowane do niepolarniej fazy stacjonarnej włókna, a polarne lepiej do fazy polarnej.

Wolne krótkołańcuchowe kwasy alkanomonokarboksyłowe, szczególnie te o najkrótszych łańcuchach, są związkami o silnych właściwościach hydrofilowych i, według wspomnianej

wyżej zasady, wybrano włókno z polarnym pokryciem, a mianowicie włókno pokryte fazą stacjonarną typu glikolu polietylenowego o grubości filmu 60µm i o długości 1cm (PEG, Supelco). Do badań wykorzystano także włókno z pokryciem polidimetylosiloksan/carboxen (grubość filmu 85µm i długości 1cm), którego wykorzystanie do ekstrakcji kwasów o mniejszej liczbie atomów węgla w cząsteczce zostało opisane w literaturze. W **Tabeli 17** przedstawiono charakterystykę stosowanych włókien ekstrakcyjnych.

Tabela 17. Charakterystyka pokryć włókna ekstrakcyjnego urządzenia do SPME, które były wykorzystane w trakcie badań [201].

Pokrycie włókna	Grubość filmu	pH	Max temperatura desorpcji	Temperatura kondycjonowania	Czas kondycjonowania
glikol polietylenowy (PEG)	60 µm	2-9	250°C	240°C	0,5 h
polidimetylosiloksan / carboxen (PDMS/CAR)	85 µm	2-11	320°C	300°C	1,0 h

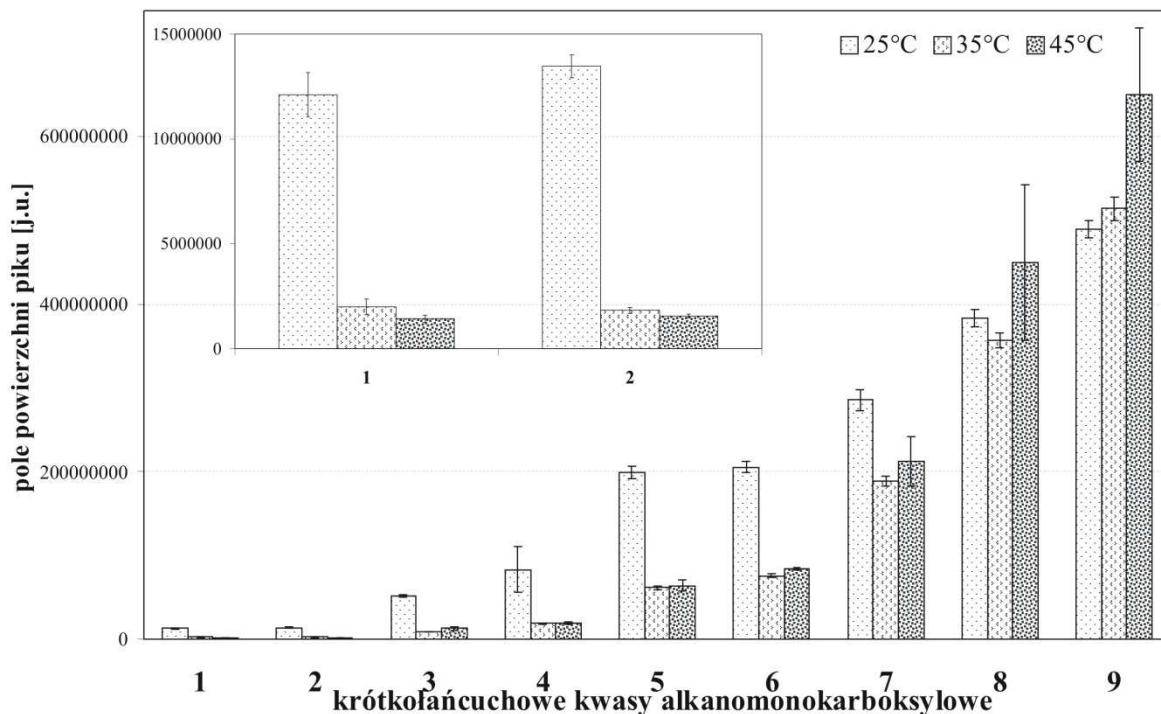
Temperatura ekstrakcji

Temperatura ekstrakcji w sposób istotny wpływa na proces ekstrakcji za pomocą techniki HS-SPME. Zmiana temperatury powoduje zmianę współczynnika podziału oznaczanych analitów pomiędzy poszczególne fazy. Wzrost temperatury ekstrakcji powoduje wzrost współczynnika podziału analitów: faza nadpowierzchniowa - próbka wodna. Natomiast w przypadku tych samych analitów, współczynnik podziału między fazą stacjonarną na włóknie i gazową maleje ze wzrostem temperatury. Zmiany te są zatem przeciwne, dlatego musi być jakaś optymalna temperatura, przy której wydajność ekstrakcji danego analitu jest największa. Dobierając temperaturę ekstrakcji trzeba niewątpliwie wziąć pod uwagę także wiele innych czynników.

Zakres temperatury, w którym badano ekstrakcję analitów z grupy KKA został ustalony w wąskich granicach od 25 do 45°C, z uwagi na ewentualną nadmierną permeację analitów przez membranę przy wyższych temperaturach i zbyt dużą zawartość wody w fazie nadpowierzchniowej.

Przeprowadzone badania wskazały, że wzrost temperatury w powyższym zakresie, powoduje zmniejszenie wydajności ekstrakcji prawie dla wszystkich kwasów (**Rysunek 43**). Jedynie dla kwasu enantowego i kaprylowego uzyskano wyższą wydajność w

temperaturze 45°C. Wypadkowe stopnie ekstrakcji w układzie próbka wodna-faza nadpowierzchniowa-faza stacjonarna na włóknie są najbardziej niekorzystne z punktu widzenia oznaczania analitów z grupy KKA, dla pierwszych z szeregu homologicznym i wskazane jest stosować raczej niższą z rozpatrywanych temperatur.

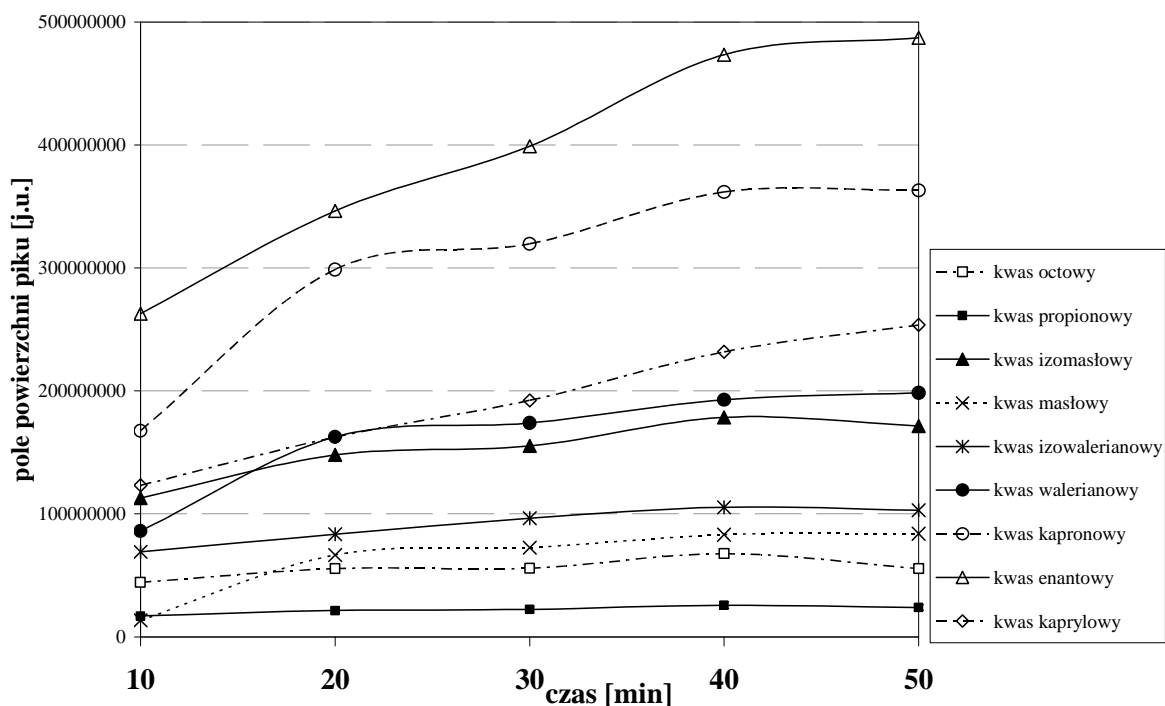


Rysunek 43. Wpływ temperatury na wydajność ekstrakcji związków z grupy KKA przy użyciu włókna PEG (HS-SPME-GC-MS).

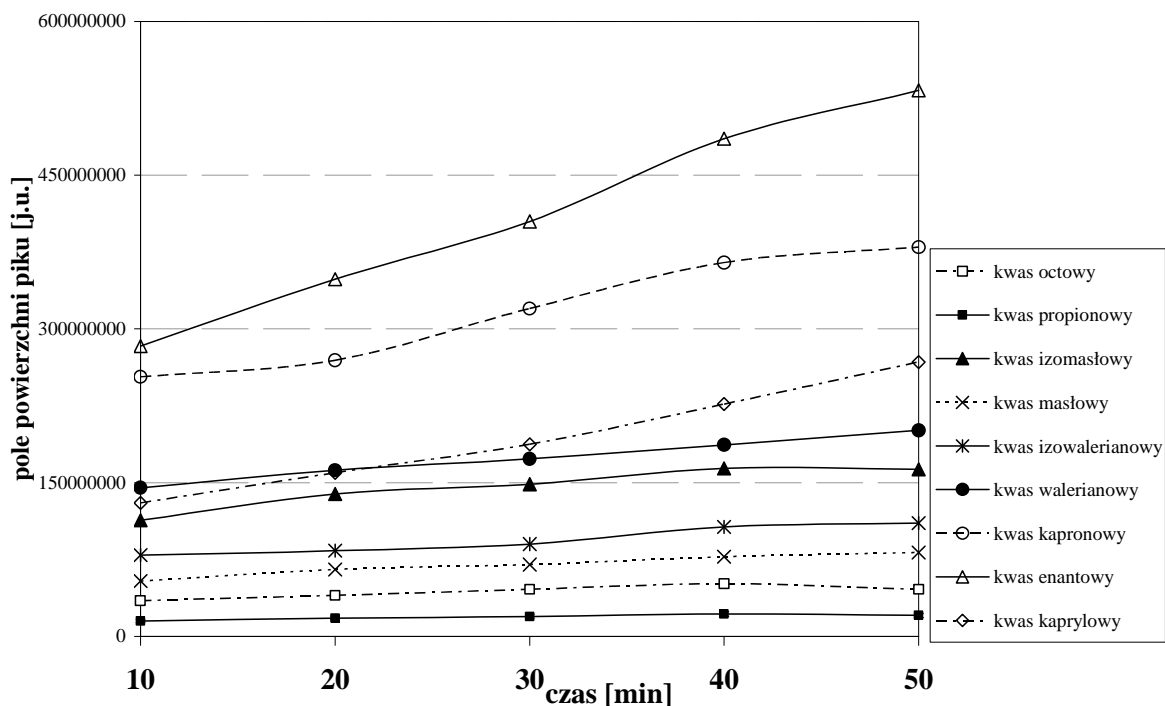
Czas ekstrakcji

Na całkowity czas analizy istotny wpływ ma czas ekstrakcji. Aby wybrać możliwie najkorzystniejsze rozwiązanie wyznaczono profile ekstrakcji w zakresie od 10 do 50 min (**Rysunki 44-46**). Temperatura ekstrakcji wynosiła 25°C. Podczas ekstrakcji stosowano mieszanie za pomocą mieszadła magnetycznego z szybkością 1200 obrotów na minutę. Zaobserwowano, że nawet najdłuższy czas ekstrakcji (50 min) nie zapewnia osiągnięcia stanu równowagi dla badanych kwasów o najdłuższych łańcuchach.

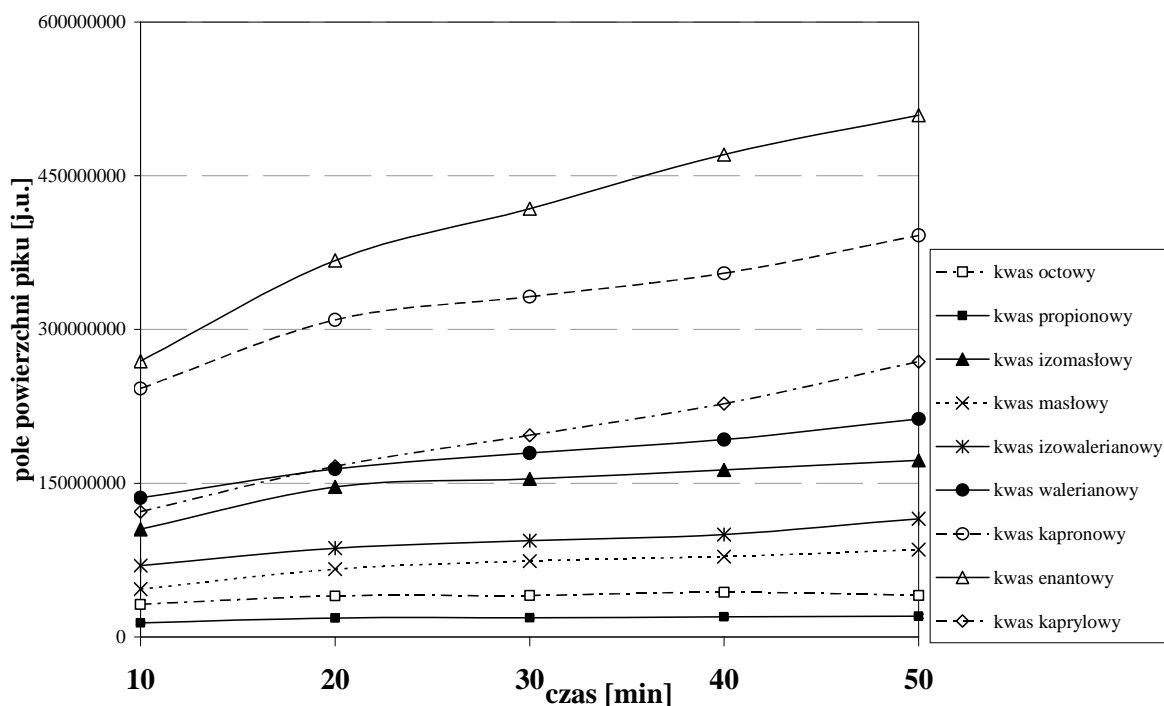
Wydłużenie czasu ekstrakcji powyżej 30 min, w przypadku kwasu octowego i propionowego, nie wpływa już w sposób statystycznie istotny na powierzchnie ich pików. Biorąc pod uwagę wydajność i całkowity czas analizy, najkorzystniejszym wydaje się czas ekstrakcji rzędu 40 min.



Rysunek 44. Wpływ czasu na wydajność ekstrakcji poszczególnych analitów z grupy KKA przy użyciu włókna PEG (HS-SPME-GC-MS) (2 mL próbki, 13 mL fazy nadpowierzchniowej, temperatura ekstrakcji 25 °C).



Rysunek 45. Wpływ czasu na wydajność ekstrakcji poszczególnych analitów z grupy KKA przy użyciu włókna PEG (HS-SPME-GC-MS) (5 mL próbki, 10 mL fazy nadpowierzchniowej, temperatura ekstrakcji 25 °C).



Rysunek 46. Wpływ czasu na wydajność ekstrakcji poszczególnych analitów z grupy KKA przy użyciu włókna PEG (HS-SPME-GC-MS) (8 mL próbki, 7 mL fazy nadpowierzchniowej, temperatura ekstrakcji 25 °C).

Dodatek soli

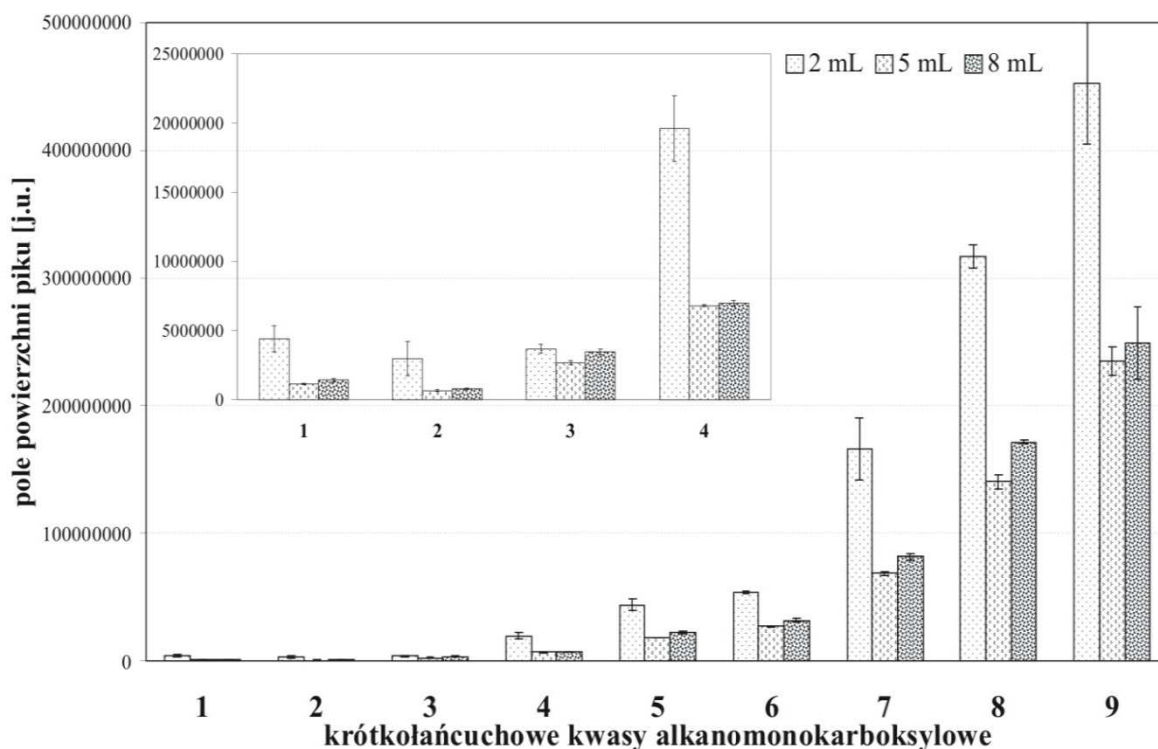
Dodatek soli dobrze dysocjującej w wodzie, zwiększa siłę jonową roztworu, a tym samym zmniejsza rozpuszczalność wielu substancji organicznych, w tym krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksyłowych. Powinno to skutkować wzrostem ilości analitów ekstrahowanych do fazy HS i tym samym do włókna.

Wielkość efektu wysolenia próbki zależy przede wszystkim od polarności analitu, stężenia soli oraz od matrycy próbki. Stwierdzono, że zwiększanie dodatku soli powyżej stężenia rzędu 0,75 g na 2 mL próbki wody nie ma już znaczącego wpływu na odzysk analitów do włókna.

Objętość próbki

Kolejnym parametrem w procesie optymalizacji warunków ekstrakcji związków z grupy KKA w przypadku stosowania techniki HS-SPME jest objętość próbki. Czułość metodyki zależy od ilości analitu wyekstrahowanego do włókna, która powinna wzrastać wraz ze wzrostem stosunku objętości próbki do objętości fazy nadpowierzchniowej. Jeśli opisujący ten złożony układ współczynnik podziału analitu między próbkę i włókno jest

duży wówczas zwiększenie objętości próbki w stosunku do objętości fazy nadpowierzchniowej, nieznacznie wpływa na odzysk analitu do włókna. Dobierając parametry ekstrakcji należy uwzględnić kinetykę ustalania się równowagi w tym złożonym układzie. Stosując naczynko ekstrakcyjne o objętości 15 mL, prowadzono ekstrakcję analitów z fazy nadpowierzchniowej próbek wzorcowych o objętości 2, 5 i 8 mL (**Rysunek 47**). We wszystkich badanych przypadkach stężenie analitów było jednakowe i wynosiło 25 mg/L.



Rysunek 47. Wpływ objętości próbki na odzysk analitów za pomocą włókna urządzenia do SPME.

Stwierdzono, że w przypadku próbki o objętości 2 mL, otrzymano największe powierzchnie pików dla wszystkich analizowanych związków z grupy KKA. Jest to wynik dość zaskakujący. Należy jednak pamiętać, że niższe kwasy są dość dobrze rozpuszczalne w wodzie, a wyższe słabiej, ale są raczej trudno lotne. Zatem wszystkie powinny mieć stosunkowo wysokie wartości liczbowe współczynnika podziału próbka wodna-faza nadpowierzchniowa i tym samym duże całkowite współczynniki podziału próbka wodna-faza stacjonarna na włóknie. Wzrost objętości próbki powinien, zatem powodować wzrost, aczkolwiek raczej mały, ilości poszczególnych analitów, które zostały pobrane z próbki za pomocą włókna urządzeniem do SPME, a tym samym zwiększać czułość procedury.

Jednak obserwowano największą czułość dla objętości 2 mL. Można to jedynie tłumaczyć, ustaleniem się stanu równowagi w układzie: analit w próbce ciekłej, gazowej i stacjonarnej na włóknie oraz że przynajmniej dla próbek o objętościach 4 i 8 mL, stan równowagi nie zostaje osiągnięty.

7.3.3. Technika LLE

Rodzaj ekstrahenta

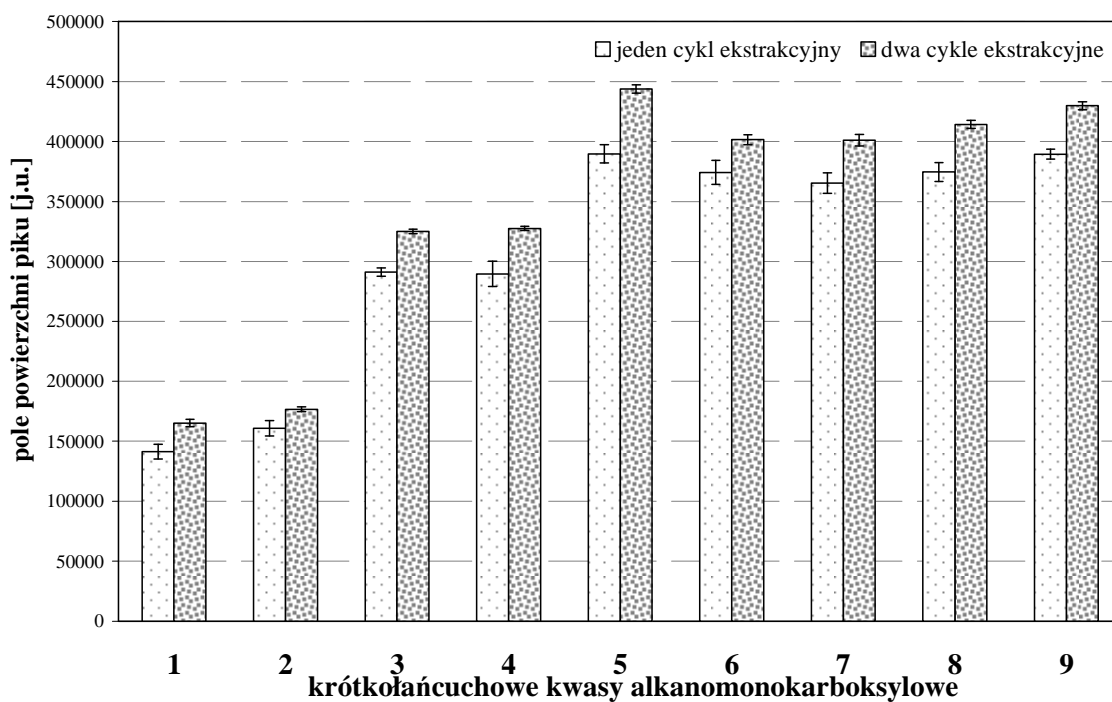
Istotnym zagadnieniem przy wykonywaniu ekstrakcji ciecz - ciecz jest wybór odpowiedniego ekstrahenta. W przypadku oznaczania związków z grupy KKA za pomocą chromatografii gazowej istotne było dobranie takiego ekstrahenta, który zapewni wysokie wartości odzysku i jednocześnie nie będzie koelugować z oznaczanymi analitami.

Sprawdzono dwa rozpuszczalniki tzn. eter dietylowy (DEE) oraz metylo-*tert*-butylowy (MTBE). Oba etery mogą być stosowane jako rozpuszczalniki w oznaczaniu chromatograficznym związków z grupy KKA, ponieważ w obu przypadkach ani piki rozpuszczalników ani piki zanieczyszczeń obecne w tych odczynnikach nie pokrywają się z pikami badanych analitów. Stosowanie MTBE wydaje się być bezpieczniejsze.

Ilość cykli ekstrakcyjnych

Najwygodniej jest prowadzić ekstrakcję jednokrotnie. Jeżeli jednak przeprowadzi się ekstrakcję taką samą sumaryczną ilością rozpuszczalnika, ale w kilku etapach, czyli ekstrakcja wielokrotna wówczas odzysk będzie większy. W ramach pracy porównywano wielkość odzysków w procesie ekstrakcji jedno i dwustopniowej. Na **Rysunku 48** przedstawiono zależność pola powierzchni pików oznaczanych kwasów od ilości cykli ekstrakcyjnych.

Uzyskane wyniki wskazują, że ekstrakcja dwustopniowa pozwoliła na otrzymanie zadowalającego stopnia odzysku analitów, dlatego nie badano większej ilości cykli ekstrakcyjnych, gdyż wydłużyłoby to czas trwania ekstrakcji i zwiększyło rozrzut wyników. Dodatkowo ekstrakcja dwustopniowa charakteryzuje się lepszą powtarzalnością, w porównaniu z jednostopniową, na co wskazują mniejsze wartości rozszerzonej niepewności.



Rysunek 48. Wpływ ilości cykli ekstrakcyjnych na odzysk związków z grupy KKA z próbki wzorcowej.

Objętość ekstrahenta

Wydajność ekstrakcji danego analitu z próbki wodnej do rozpuszczalnika organicznego zależy również od stosunku objętości ekstrahent-próbka. Dla przyjętej objętości próbki wodnej wynoszącej 4 mL, określano wartość odzysku analitów z grupy KKA, stosując kolejno 1, 2, 3 i 4 mL ekstrahenta w pojedynczym etapie dwukrotnej ekstrakcji.

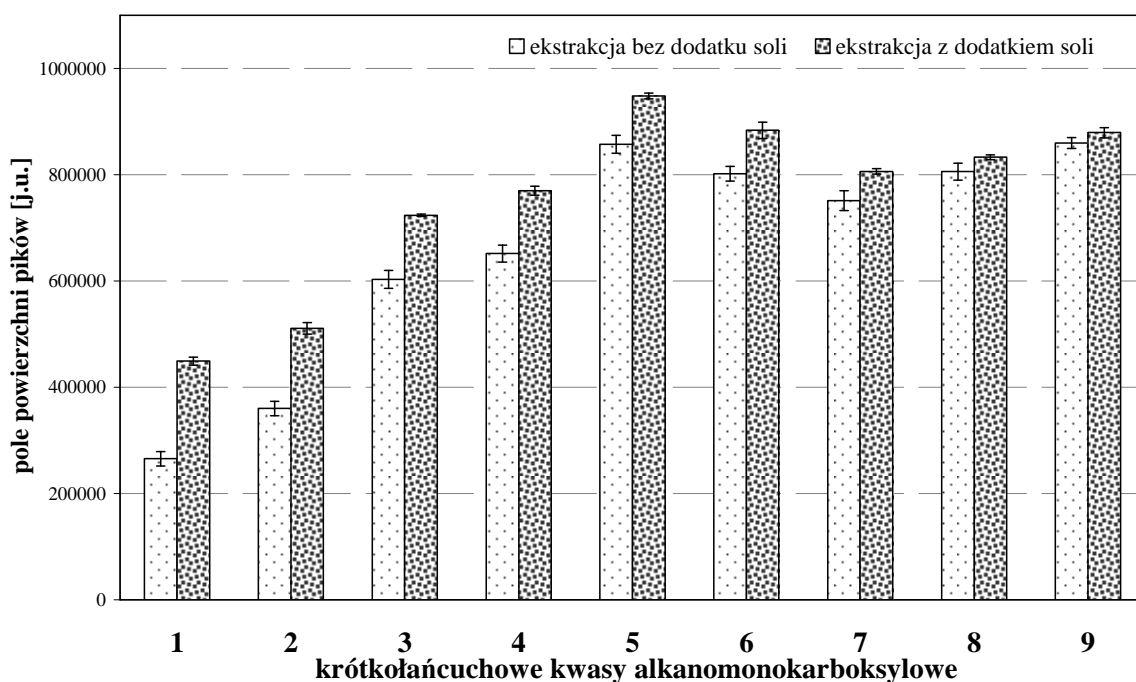
Zaobserwowano, że zwiększenie powyżej 2 mL ilości rozpuszczalnika w jednym cyklu ekstrakcyjnym w dwukrotnej ekstrakcji, nie powoduje już wzrostu wartości odzysku, a wręcz zmniejszenie wywołane prawdopodobnie niekontrolowanymi stratami.

Czas trwania ekstrakcji

Ekstrakcji ciecz-ciecz jak każdy inny proces wymiany masy jest procesem kinetycznym, a zatem szybkość ustalania równowagi zależy również od intensywności mieszania. Stwierdzono, że kilkuminutowe wytrząsanie próbki z rozpuszczalnikiem jest w pełni wystarczające, by uzyskać zadawalający odzysk analitów.

Dodatek soli

Podobnie jak w przypadku innych technik ekstrakcyjnej izolacji analitów z grupy KKA z próbek wodnych, dodatek elektrolitu zmniejsza ich rozpuszczalność i poprawia wartość odzysku. Stwierdzono, że dodatek chlorku sodu ma największy wpływ na wydajność ekstrakcji kwasów, charakteryzujących się największą rozpuszczalnością w wodzie. Uzyskane dane (**Rysunek 49**) wskazują, że dodatek 0,25 g NaCl na mL próbki wodnej zwiększa odzysk kwasu octowego i propionowego o ok. 40% oraz od 5% do 20% w przypadku pozostałych związków z grupy KKA.



Rysunek 49. Wpływ dodatku soli na odzysk związków z grupy KKA z wody do rozpuszczalnika organicznego.

Otrzymane wyniki potwierdziły, że dodatek soli ma większy wpływ na izolację analitów, które charakteryzują się większą lotnością (kwasy: octowy, propionowy, izomasłowy, masłowy, izowalerianowy) i dla tych związków różnice w odzyskach są większe. Dlatego też w dalszych badaniach do każdej próbki wodnej o objętości 4 mL dodawano 1 g NaCl.

8. Wyznaczenie podstawowych parametrów walidacyjnych opracowanych procedur oznaczania wolnych związków z grupy KKA w próbkach wodnych

Proces walidacji jest określeniem charakterystyki procedury analitycznej i tym samym sprawdzeniem czy może ona być zastosowana do rozwiązania konkretnego zadania analitycznego. Zaproponowane procedury oznaczania wolnych krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksyłowych poddano procesowi walidacji, określając takie parametry jak:

- **zakres liniowości,**
- **powtarzalność (precyzja),**
- **zakres pomiarowy,**
- **granice wykrywalności i oznaczalności,**
- **niepewność.**

W procesie walidacji stosowano próbki ślepe, próbki wzorcowe i próbki rzeczywiste. Pomiarów wykonywano wielokrotnie i określano poszczególne parametry z wykorzystaniem ogólnie przyjętych zasad obróbki statystycznej wyników.

Zakres pomiarowy, liniowość i powtarzalność

Zakres pomiarowy to przedział między najniższym i najwyższym stężeniem, w jakim mogą być analizy oznaczane z założoną miarodajnością [202].

Terminem ***liniowości*** określa się przedział zakresu pomiarowego procedury analitycznej, w którym sygnał wyjściowy jest proporcjonalny do stężenia oznaczanego analitu [202].

Powtarzalność (precyzja) charakteryzuje rozrzut wyników uzyskanych w tych samych warunkach pomiarowych (dane laboratorium, analityk, instrument pomiarowy, odczynniki) [202]. Miarą powtarzalności jest współczynnik zmienności (CV), który wyznaczono korzystając z równania (1):

$$CV = \frac{S \times 100\%}{\bar{x}} \quad (1)$$

gdzie:

\bar{x} – średnia arytmetyczna

S - odchylenie standardowe

Zakresy pomiarowe, liniowość oraz powtarzalność poszczególnych procedur oznaczano na podstawie analizy próbek wzorcowych poddawanych całkowitemu

procesowi analitycznemu. W przypadku detektora MS, ocena procedur opierała się na danych, które uzyskano w trakcie pracy spektrometru mas w trybie SIM. Zakresy stężeń uwzględnione w procesie kalibracji, były dobierane w zależności od wartości stężeń, na jakich poszczególne kwasy najczęściej występowały w próbkach rzeczywistych.

Funkcje kalibracyjne dla wszystkich oznaczanych związków z grupy krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksylowych wyznaczono w oparciu o przygotowane próbki wzorcowe. Dla każdego badanego stężenia mieszaniny wzorcowej kwasów przeprowadzono cztery powtórzenia. Wykreślone krzywe kalibracyjne opisano równaniami regresji liniowej (2):

$$y = ax + b, \tag{2}$$

gdzie:

y–pole powierzchni pików,

x–stężenie analitu,

a–współczynnik kierunkowy,

b–wyraz wolny.

Proste regresji odzwierciedlały zależność powierzchni pików chromatograficznych badanych analitów od stężenia.

Zgodność punktów pomiarowych z wyliczoną funkcją regresji liniowej wyraża wartość współczynnika regresji (R).

W przypadku wszystkich opracowanych metodyk, wartość współczynnika oscylowała w pobliżu wartości **0,9990**, co oznacza liniową zależność sygnału od stężenia, w przyjętych zakresach stężeń. W niektórych przypadkach, pomimo uzyskania wartości liczbowej współczynnika regresji 0,9990 dla badanego zakresu, dzielono go na dwa lub wyjątkowo trzy fragmenty, które opisano odrębnymi równaniami regresji liniowej, które dokładniej opisywały zależność sygnału do stężenia. Szczególnie ważne było wyodrębnienie zakresu stężeń bliskich wartości liczbowej granicy oznaczalności. Zależności są najczęściej znacząco różne od tych dla stężeń wyższych [202].

W **Tabeli 18** zestawiono wartości liczbowe współczynników regresji krzywych kalibracyjnych oraz współczynników zmienności, charakteryzujące poszczególne zakresy stężeń analitów z grupy KKA w przypadku stosowania opracowanych metodyk (GC-FID, Destylacja-GC-FID, HS-GC-FID, HS-SPME-GC-MS (PEG), HS-SPME-GC-MS (PDMS/CAR), LLE-GC-MS).

Tabela 18. Charakterystyka metrologiczna opracowanych procedur oznaczania wolnych związków z grupy KKA w próbkach wzorcowych.

Analit	GC-FID			Destylacja-GC-FID			LLE-GC-MS		
	Zakres [mg/L]	R	CV [%]	Zakres [mg/L]	R	CV [%]	Zakres [mg/L]	R	CV [%]
C2	0,100-5,00	0,9940	1,06-5,47	0,100-5,00	0,9995	0,150-8,22	0,100-5,00	0,9992	1,91-7,80
	5,00-50,0	0,9980	1,11-5,47	5,00-50,0	0,9965	0,154-2,45	5,00-100	0,9999	0,890-3,20
	50,0-500	0,9920	0,761-5,52						
C3	0,100-5,00	0,9990	1,28-5,36	0,100-5,00	0,9978	0,200-7,76	0,100-5,00	0,9996	0,453-6,50
	5,00-50,0	0,9990	0,141-3,63	5,00-50,0	0,9985	0,082-2,53	5,00-100	0,9986	1,10-2,91
	50,0-500	0,9910	0,542-4,86						
iC4	0,100-5,00	0,9990	1,76-6,67	0,100-5,00	0,9899	1,27-3,93	0,100-5,00	0,9995	0,572-6,23
	5,00-50,0	0,9990	2,47-6,48	5,00-50,0	0,9956	0,700-1,65	5,00-100	0,9996	1,02-5,10
	50,0-500	0,9910	0,613-3,15						
C4	0,100-5,00	0,9870	0,75-4,00	0,100-5,00	0,9922	0,110-2,98	0,100-5,00	0,9991	0,842-5,80
	5,00-50,0	0,9970	2,14-4,23	5,00-50,0	0,9964	0,391-2,21	5,00-100	0,9993	0,273-3,13
	50,0-500	0,9900	4,11-0,51						
iC5	0,100-5,00	0,9980	1,26-3,00	0,100-5,00	0,9843	0,129-4,10	0,100-5,00	0,9994	0,350-6,40
	5,00-50,0	0,9990	4,24-4,89	5,00-50,0	0,9965	0,888-3,32	5,00-100	0,9989	0,980-3,70
	50,0-500	0,9990	1,24-4,24						
C5	0,100-5,00	0,9990	1,67-3,44	0,100-5,00	0,9903	1,84-7,92	0,100-5,00	0,9995	0,271-5,42
	5,00-50,0	0,9990	0,101-3,86	5,00-50,0	0,9979	1,47-2,78	5,00-100	0,9990	0,701-3,11
	50,0-500	0,9910	1,36-4,06						
C6	0,100-5,00	0,9980	1,62-4,24	-	-	-	0,100-5,00	0,9998	0,604-7,11
	5,00-50,0	0,9990	2,11-6,32				5,00-100	0,9989	0,961-3,30
	50,0-500	0,9920	2,43-6,84						
C7	0,100-5,00	0,9990	2,04-7,10	-	-	-	0,100-5,00	0,9991	0,560-4,81
	5,00-50,0	0,9980	3,72-8,66				5,00-100	0,9988	0,532-4,31
	50,0-500	0,9970	0,881-8,66						
C8	0,100-5,00	0,9820	0,322-8,16	-	-	-	0,100-5,00	0,9994	0,441-5,62
	5,00-50,0	0,9980	0,251-5,08				5,00-100	0,9987	0,290-4,71
	50,0-500	0,9980	1,62-7,74						

Tabela 18. ciąg dalszy.

Analit	HS-GC-FID			HS-SPME-GC-MS					
				PEG			PDMS/CAR		
	Zakres [mg/L]	R	CV [%]	Zakres [mg/L]	R	CV [%]	Zakres [mg/L]	R	CV [%]
C2	0,500-25,0	0,9869	0,510-16,0	0,100-10,0	0,9945	0,901-3,20	0,500-10,0	0,9994	0,911-5,50
	25,0-100	0,9933	0,471-15,0	10,0-200	0,9957	0,0510-1,60	10,0-200	0,9996	0,702-4,42
	100-1000	0,9980	0,471-17,1						
C3	0,500-5,00	0,9990	2,82-17,0	0,120-3,70	0,9925	1,53-4,71	0,620-12,0	0,9932	1,42-5,01
	5,00-300	0,9998	1,66-16,3	3,70-216	0,9936	0,462-2,50	12,0-154	0,9930	1,07-3,40
iC4	0,100-5,00	0,9995	0,125-5,20	0,140-4,40	0,9961	0,351-3,11	0,140-7,30	0,9958	0,370-2,41
	5,00-100	0,9996	0,125-5,30	4,40-256	0,9962	1,01-3,73	7,30-37,0	0,9912	0,584-3,35
C4	0,100-25,0	0,9979	3,40-14,1	0,140-4,40	0,9925	1,64-4,30	0,730-7,30	0,9876	0,703-4,40
	25,0-200	0,9992	3,04-11,1	4,40-256	0,9963	0,155-3,43	7,30-183	0,9888	2,21-4,33
iC5	0,100-5,00	0,9995	0,112-4,70	0,160-5,10	0,9917	0,152-3,73	0,160-17,0	0,9981	0,821-3,94
	5,00-100	0,9943	1,05-3,20	5,10-212	0,9962	0,731-2,40	17,0-212	0,9924	1,10-4,93
C5	0,100-5,00	0,9918	1,44-4,50	0,160-5,10	0,9829	0,372-4,34	0,160-17,0	0,9937	1,70-5,40
	5,00-100	0,9996	2,90-7,90	5,10-170	0,9993	0,512-2,81	17,0-255	0,9960	0,305-4,03
C6	1,00-10,0	0,9996	3,32-18,0	0,0900-5,80	0,9947	0,490-2,51	0,0900-1,90	0,9945	0,844-4,35
	10,0-100	0,9895	3,08-18,0	5,80-193	0,9948	0,176-1,67	1,90-14,5	0,9981	0,674-5,01
C7	-	-	-	0,100-6,50	0,9973	0,636-4,53	0,100-2,16	0,9963	4,61-5,42
	-	-	-	6,50-217	0,9983	2,05-5,91	2,16-16,2	0,9994	3,40-6,51

Granice wykrywalności i oznaczalności opracowywanych procedur

Wartości liczbowe parametrów granic oznaczalności i wykrywalności są istotnymi parametrami walidacyjnymi metodyk analitycznych. Na ogół przyjmuje się, że **granica wykrywalności (LOD)** jest to najmniejsza ilość lub najmniejsze stężenie substancji możliwe do wykrycia za pomocą danej techniki analitycznej z określonym prawdopodobieństwem. Natomiast **granica oznaczalności (LOQ)** to najmniejsza ilość lub najmniejsze stężenie substancji, możliwe do ilościowego oznaczenia daną techniką analityczną z założoną dokładnością, precyzją i niepewnością [202]. W celu wyznaczenia granicy wykrywalności i oznaczalności sporządzono wzorcowe próbki wodne badanych kwasów w zakresie niskich stężeń (0,05 mg/L do 5 mg/L) i poddano je analizie.

Wartości liczbowe granicy wykrywalności (LOD) oszacowano stosując metodę opartą na wartościach odchylenia standardowego zbioru sygnałów i kąta nachylenia krzywej kalibracyjnej [205]. Wartości liczbowe granicy wykrywalności obliczono z wykreślonej regresji liniowej zgodnie z równaniem (3):

$$LOD = 3,3 \times \frac{S}{a} \quad (3)$$

gdzie:

a-współczynnik kierunkowy funkcji kalibracyjnej.

Odchylenie standardowe S obliczono jako szcążkowe odchylenie standardowej funkcji kalibracyjnej S_{xy} (równanie (4)):

$$S_{xy} = \sqrt{\frac{1}{n-2} \sum (y_i - Y_i)^2} \quad (4)$$

gdzie:

n - ilość niezależnych oznaczeń dla roztworów wzorcowych na podstawie, których wyznaczono funkcje kalibracyjną;

y_i - wartość wyznaczona doświadczalnie;

Y_i - wartość obliczona na podstawie znalezionej równania regresji [202].

Wartości liczbowe granicy oznaczalności (LOQ) szacowano jako trzykrotność granicy wykrywalności (równanie (5)):

$$LOQ = 3 \times LOD \quad (5)$$

Wyznaczone wartości liczbowe granicy wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ) opracowanych procedur oznaczania poszczególnych krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksylowych przedstawiono w **Tabeli 19**.

Tabela 19. Wyznaczone wartości liczbowe granicy wykrywalności i oznaczalności poszczególnych krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksylowych, charakteryzujące opracowane metodyki analityczne.

Procedura	GC-FID		HS-GC-FID		HS-SPME-GC-MS				LLE-GC-MS	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ	PEG		PDMS/CAR		LOD	LOQ
					LOD	LOQ	LOD	LOQ		
Analit	[mg/L]									
C2	0,019	0,059	0,14	0,43	0,051	0,15	0,20	0,60	0,20	0,60
C3	0,017	0,051	0,38	1,2	0,040	0,12	0,030	0,090	0,24	0,72
iC4	0,016	0,047	0,30	0,90	0,017	0,051	0,050	0,15	0,44	1,3
C4	0,026	0,079	0,14	0,41	0,064	0,19	0,28	0,84	0,28	0,84
iC5	0,061	0,18	0,053	0,16	0,047	0,14	0,040	0,12	0,070	0,21
C5	0,070	0,21	0,37	1,1	0,017	0,051	0,060	0,18	0,10	0,30
C6	0,073	0,22	0,36	1,1	0,026	0,078	0,040	0,12	0,15	0,45
C7	0,057	0,17	-	-	0,035	0,10	0,080	0,24	0,18	0,54
C8	0,085	0,25	-	-	-	-	-	-	0,070	0,21

Niepewność

Rozszerzona niepewność jest to wielkość określająca przedział wokół uzyskanego wyniku analizy, w którym można, na określonym poziomie istotności (prawdopodobieństwa) oczekiwać wystąpienia wartości oczekiwanej [202].

Wartość niepewności może być także szacowana jako przedział nieufności. W przypadku prowadzonych badań ograniczono się do szacowania wartości niepewności dobieranych (optymalizowanych) parametrów ekstrakcyjnych, które przedstawiono na **Rysunkach 31-36, 38-43, 47-49**. Dominującym parametrem w trakcie opracowywania procedur analitycznych była przede wszystkim powtarzalność pomiarów.

Wielkość rozszerzonej niepewności pomiaru obliczono korzystając z zależności:

$$U = k \frac{S}{\sqrt{n}} \quad (6)$$

gdzie:

S - odchylenie standardowe;

n - liczba pomiarów;

k – współczynnik rozszerzenia (dla poziomu prawdopodobieństwa 95%, k=2).

Z drugiej strony obliczoną wartość przedziału ufności dla serii wyników opisuje zależność:

$$\Delta x = t(\alpha, f) \frac{S}{\sqrt{n}} \quad (7)$$

Dla poziomu istotności $\alpha=0,05$ i liczby stopni swobody $f \rightarrow \infty$, parametr krytyczny testu t-Studenta wynosi ok. 2.

9. Zastosowanie opracowanych procedur do oznaczania związków z grupy KKA w próbkach rzeczywistych

Opracowane metodyki oznaczania wolnych krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksylowych mogą być podstawą sformułowania projektu badawczego, ukierunkowanego na badanie procesów oczyszczania ścieków oraz procesów zachodzących na i w pobliżu składowisk odpadów, a także oszacowaniem wpływu kompostowania odchodów z farm zwierzęcych.

W **Tabeli 20** przedstawiono informacje o doborze praktycznego wykorzystania opracowanych metodyk analitycznych, które zastosowano do oznaczania analitów z grupy KKA w próbkach rzeczywistych.

Tabela 20. Zastosowanie opracowanych procedur analitycznych do analizy związków z grupy KKA w próbkach rzeczywistych.

Pochodzenie próbki	Procedura				
	LLE-GC-MS	HS-GC-FID	GC-FID	Destylacja-GC-FID	HS-SPME-GC-MS
▪ Oczyszczalnia ścieków komunalnych	✓		✓	✓	✓
▪ Składowisko odpadów komunalnych	✓		✓		✓
▪ Składowisko odpadów organicznych na terenie zoo		✓			
▪ Farmy zwierząt	✓	✓			✓

9.1. Oczyszczalnia ścieków komunalnych

Wybrane metodyki zastosowano do oznaczania związków z grupy KKA w próbkach wodnych i stałych pobranych z czterech oczyszczalni ścieków („A”- „D”).

Są to próbki:

- ▶ **Ścieków**
 - oczyszczonych
 - surowych (wpływających do oczyszczalni)
 - z osadników wstępnych
 - z przepompowni
- ▶ **Odcieku z przyzmy kompostu**

które poddano analizie, zgodnie z następującymi procedurami:

- HS-SPME-GC-MS (PEG i PDMS/CAR),
- Destylacja-GC-FID,
- GC-FID,
- LLE-GC-MS.

W **Tabelach 21-22** przedstawiono uzyskane wyniki oznaczeń zawartości poszczególnych analitów z grupy KKA w próbkach wodnych i stałych pobranych z oczyszczalni ścieków „A” – „D”. Zależnie od typu próbki zastosowano następujące formatowanie:

- ▶ Kolor:
 - **niebieski**- próbka ścieku oczyszczonego
 - **czerwony**- próbka ścieku surowego
 - **pomarańczowy**- próbka odcieku z kompostu przyzmy

- **zielony**- próbka z osadników wstępnych
- **fioletowy**- próbka ścieków z przepompowni
- **czarny**- próbka osadu nadmiernego
- **szary**- próbka z kompostu ze świeżej przyzmy
- **różowy**- próbka kompostu
- ▶ „A”, „B”, „C”, „D”- oczyszczalnie ścieków.

Można zauważyć, że zawartość wolnych krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksylowych w analizowanych próbkach ścieków surowych z oczyszczalni „A-D” mieściła się w dość szerokich granicach od 0,16 do 96 mg/L. W przypadku próbek ścieków oczyszczonych wartości stężeń były poniżej lub w pobliżu wartości liczbowej granicy oznaczalności stosowanej procedury.

Próbki odcieku z przyzmy kompostu zawierały anality z grupy KKA na poziomie od 1,26 do 668 mg/L.

Próbki kompostu z przyzmy oraz gotowego produktu kompostu pobierano z głębiej położonych warstw, gdyż anality z grupy KKA ze względu na dużą lotność, mogły ulec odparowaniu. W trakcie przygotowania próbki świeżego kompostu z przyzmy, kompostu oraz próbki osadu nadmiernego do analizy, do naczynia z próbką rzeczywistą dodawano wody dejonizowanej w stosunku 1:2 lub 1:20, w zależności od stosowanej metodyki oznaczeń kwasów. W przypadku próbek stałych, największe zawartości analitów stwierdzono kolejno dla kwasu octowego, propionowego, masłowego i izowalerianowego. Względnie duża zawartość tych ostatnich kwasów może sugerować, iż proces fermentacji materii organicznej znajduje się w początkowej fazie. Wraz z postępem fermentacji kwas masłowy i izowalerianowy rozkłada się bowiem na kwasy o krótszych łańcuchach węglowych.

9.2. Składowisko odpadów komunalnych

W celu określenia wpływu składowisk odpadów komunalnych „A” i „B” na stan środowiska, oznaczono związki z grupy KKA w próbkach **wód powierzchniowych, podziemnych i odciekowych** z wykorzystaniem metodyki LLE-GC-MS, GC-FID oraz HS-SPME-GC-MS. Na **Rysunku 50** przedstawiono oznaczone zawartości kwasu octowego z wykorzystaniem procedury LLE-GC-MS oraz miejsca punktów kontrolnych, w których można pobierać próbki wód podziemnych, powierzchniowych, na dopływie (WP-1) i odpływie wód (WP-2) ze składowiska oraz wód odciekowych.

Tabela 20. Wyniki oznaczeń zawartości analitów z grupy KKA w próbkach ścieków z różnych oczyszczalni komunalnych.

Anality	Stężenie [mg/L] [średnia ± U(k=2)]									
	GC-FID	Destylacja-GC-FID			LLE-GC-MS					
	„C”	„C”			„A”				„D”	
	0	0	1	4	0	1	2	3	0	1
C2	<LOD	<LOD	96,1 ± 8,1	668 ± 15	<LOD	29,50 ± 1,51	53,3 ± 2,0	49,3 ± 1,1	2,53 ± 0,15	90,0 ± 3,2
C3	<LOD	<LOD	17,3 ± 1,2	52,1 ± 4,7	<LOD	3,31 ± 0,45	14,92 ± 0,72	13,20 ± 0,65	<LOD	28,3 ± 1,1
iC4	<LOD	<LOD	11,1 ± 1,1	3,22 ± 0,56	<LOD	0,510 ± 0,014	1,304 ± 0,046	1,204 ± 0,065	<LOD	1,94 ± 0,13
C4	<LOD	<LOD	30,4 ± 1,5	15,40 ± 0,65	<LOD	0,461 ± 0,021	1,402 ± 0,065	1,200 ± 0,027	<LOD	4,58 ± 0,31
iC5	<LOD	<LOD	5,03 ± 0,36	1,26 ± 0,44	<LOD	0,410 ± 0,012	1,072 ± 0,046	0,961 ± 0,034	<LOD	2,91 ± 0,55
C5	<LOD	<LOD	4,01 ± 0,33	2,83 ± 0,62	<LOD	0,224 ± 0,089	0,844 ± 0,032	0,765 ± 0,022	<LOD	2,80 ± 0,46
C6	<LOD	n.b.	n.b.	n.b.	<LOD	0,160 ± 0,016	0,194 ± 0,014	0,164 ± 0,014	<LOD	1,44 ± 0,22
C7	<LOD	n.b.	n.b.	n.b.	<LOD	0,240 ± 0,018	0,240 ± 0,011	0,221 ± 0,012	<LOD	1,80 ± 0,16
C8	<LOD	n.b.	n.b.	n.b.	<LOD	0,180 ± 0,015	0,200 ± 0,017	0,180 ± 0,015	<LOD	2,71 ± 0,18

*n.b.- nie badano

Tabela 20. ciąg dalszy.

Analizy	Stężenie [mg/L] [średnia ± U(k=2)]								
	HS-SPME-GC-MS (PEG)			HS-SPME-GC-MS (PDMS/CAR)					
	„A”			„A”			„B”		
	0	1	2	0	1	2	0	1	2
C2	3,07 ± 0,11	43,4 ± 1,1	102,4 ± 1,6	<LOD	56,7 ± 2,7	72,9 ± 3,1	<LOD	45,8 ± 2,1	66,7 ± 2,6
C3	0,360 ± 0,073	3,200 ± 0,034	19,60 ± 0,73	<LOD	3,16 ± 0,11	7,24 ± 0,35	<LOD	1,671 ± 0,067	5,48 ± 0,47
iC4	0,0650 ± 0,0087	0,250 ± 0,014	0,560 ± 0,013	<LOD	2,56 ± 0,14	2,67 ± 0,22	<LOD	1,62 ± 0,13	1,89 ± 0,71
C4	0,563 ± 0,012	2,962 ± 0,052	3,141 ± 0,052	<LOD	0,920 ± 0,061	1,68 ± 0,91	<LOD	0,870 ± 0,034	1,55 ± 0,65
iC5	0,792 ± 0,087	0,480 ± 0,018	2,761 ± 0,047	<LOD	0,194 ± 0,014	2,49 ± 0,16	<LOD	0,224 ± 0,013	0,481 ± 0,088
C5	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1,093 ± 0,037	<LOD	<LOD	2,06 ± 0,64
C6	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
C7	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
C8	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

*n.b.- nie badano

Tabela 21. Wyniki oznaczeń zawartości analitów z grupy KKA w próbkach stałych z różnych oczyszczalni komunalnych.

Anality	Stężenie [mg/L] [średnia ± U(k=2)]				
	Destylacja-GC-FID			HS-SPME- GC-MS (PDMS/CAR)	
	„C”			„B”	
	5	6	7	5	
C2	28,5 ± 1,3	847 ± 18	105,2 ± 8,3	304 ± 12	
C3	27,01 ± 0,87	236,4 ± 8,8	20,2 ± 1,4	244,1 ± 9,9	
iC4	2,43 ± 0,65	26,51 ± 0,82	3,04 ± 0,32	9,94 ± 0,72	
C4	10,61 ± 0,31	227,0 ± 9,2	18,73 ± 0,56	10,35 ± 0,62	
iC5	1,37 ± 0,26	15,43 ± 0,43	1,62 ± 0,14	110,3 ± 8,7	
C5	4,21 ± 0,62	5,27 ± 0,77	4,20 ± 0,55	17,5 ± 2,1	
C6	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	3,71 ± 0,32	
C7	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	0,360 ± 0,058	
C8	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	

*n.b.- nie badano

Próbki wód podziemnych, które pobierane były z piezometrów, zasilanych z dwóch poziomów górnej warstwy wodonośnej, zarówno w strefie dopływu jak i odpływu wód podziemnych w rejon składowiska „A”, wykazywały minimalną obecność kwasu octowego. Wzrost zawartości kwasu octowego obserwowano także w próbce wód powierzchniowych (WP-2).

Porównując wyniki oznaczeń analitów z grupy KKA w próbkach wód odciekowych, z dwóch składowisk odpadów „A” i „B”, stosując różne procedury analityczne, można zauważyć, że rząd wielkości stężeń związków z grupy KKA był zbliżony w przypadku obydwu składowisk (**Tabela 22**). W obu przypadkach były to składowiska odpadów komunalnych o zbliżonym składzie, a dominującym kwasem we wszystkich próbkach był kwas octowy. W celu porównania zawartości związków z grupy KKA w stosunku do innych związków organicznych w **Tabeli 23** przedstawiono również oznaczone wartości liczbowe takich parametrów jak: OWO, ChZT_{Cr}, BZT₅ i odczyn pH.

Tabela 23. Zestawienie wyników analizy wód odciekowych ze składowiska odpadów „A”.

WODY ODCIEKOWE			
Oznaczenie	Jednostka	Zbiornik odcieków	Wartości dopuszczalne z Rozporządzeniem Ministra Środowiska (Dz.U. Nr 137, poz. 984)
ChZT _{Cr}		1911	125
BZT ₅	mg/ L	332	25
OWO		704	30
Odczyn pH	-	7,3	6,5-9,0

W stosunku do norm zawartych w Rozporządzeniu Ministra Środowiska (Dz.U. Nr 137, poz. 984) obserwuje się znaczne przekroczenie dopuszczalnych wartości wskaźników wyrażających zawartość związków organicznych, jakie powinny spełniać ścieki wprowadzane do wód lub ziemi.

NA DOPIŁYWIE WÓD
DO SKŁADOWISKA

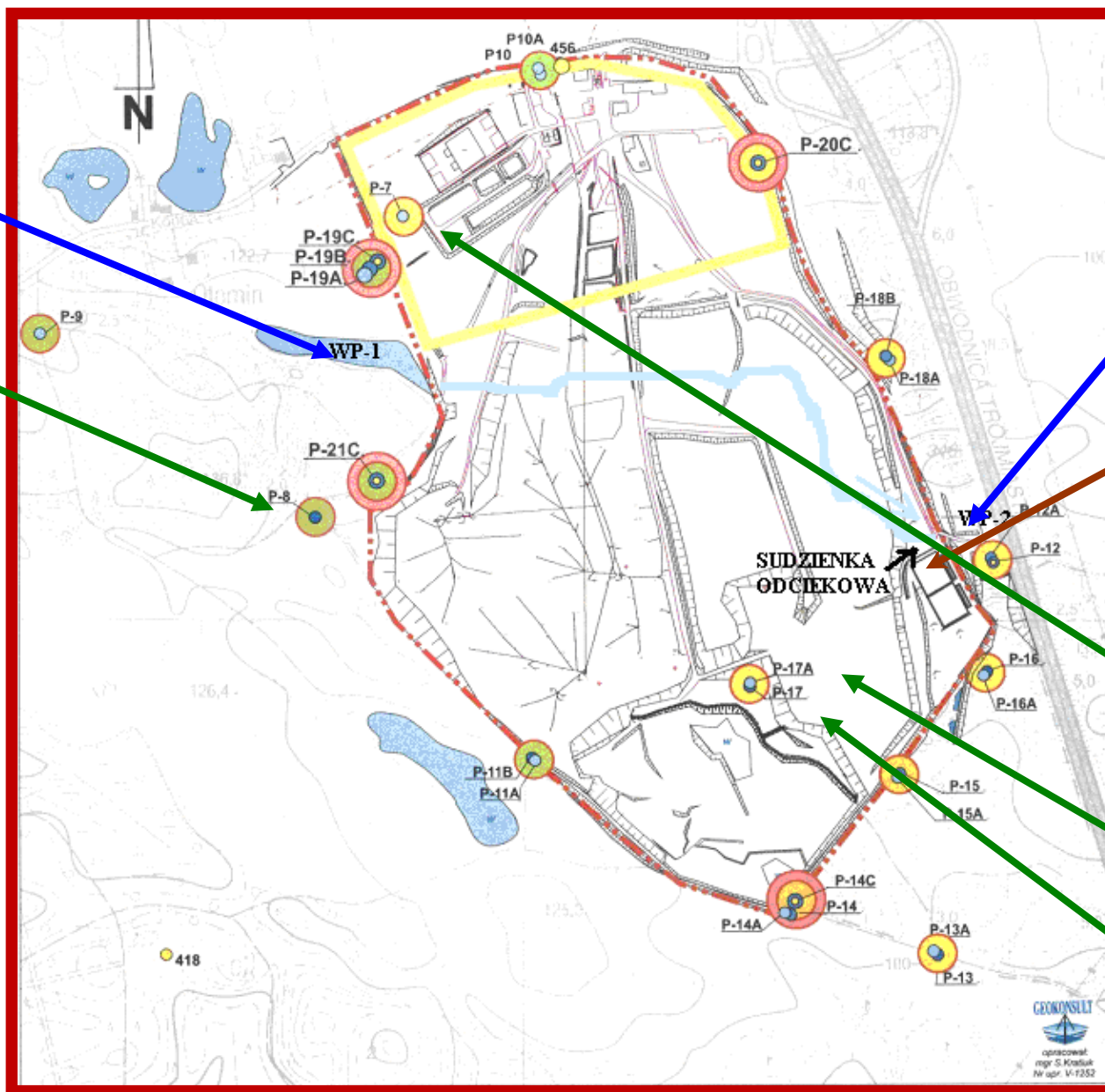
WODY
POWIERZCHNIOWE

kwaz octowy
<LOD [mg/L]

WODY PODZIEMNE
związki z grupy KKA
<LOD [mg/L]

WARSTWA Q11
- na dopływie wód ze
składowiska
P11A,
- na odpływie wód ze
składowiska
P7, P17A,

WARSTWA Q12
- na dopływie wód ze
składowiska
P8,
- na odpływie wód ze
składowiska
P17.



NA ODPIŁYWIE WÓD
ZE SKŁADOWISKA

WODY
POWIERZCHNIOWE

kwaz octowy
0,200-0,540
[mg/L]

WODY ODCIEKOWE
kwaz octowy
18,0 [mg/L]

WODY PODZIEMNE
związki z grupy KKA
<LOD [mg/L]

kwaz octowy
0,200-0,630 [mg/L]

kwaz octowy
0,530-0,830 [mg/L]

Rysunek 50. Miejsca pobierania próbek i odpowiadające im stężenia kwasu octowego w próbkach pobranych z punktów kontrolnych wód podziemnych, powierzchniowych i odciekowych, na dopływie i odpływie wód ze składowiska

Tabela 22. Wyniki oznaczeń zawartości analitów z grupy KKA w próbkach wód odciekowych ze składowiska odpadów komunalnych „A” i „B”.

Analit	Stężenie [mg/L] [średnia ± U(k=2)]			
	GC-FID	LLE-GC-MS		HS-SPME-GC-MS
	„A”	„A”	„B”	„B”
C2	15,21 ± 0,73	18,04 ± 0,90	19,60 ± 0,64	4,51 ± 0,90
C3	4,52 ± 0,19	3,40 ± 0,16	6,81 ± 0,24	1,203 ± 0,053
iC4	1,211 ± 0,061	0,500 ± 0,045	1,004 ± 0,054	1,404 ± 0,066
C4	2,103 ± 0,074	1,401 ± 0,061	0,671 ± 0,063	2,401 ± 0,055
iC5	0,480 ± 0,077	0,344 ± 0,081	0,440 ± 0,028	1,310 ± 0,043
C5	0,450 ± 0,059	0,280 ± 0,013	0,391 ± 0,023	1,110 ± 0,015
C6	n.b.	<LOD	<LOD	0,580 ± 0,013
C7	n.b.	<LOD	<LOD	0,50 ± 0,012
C8	n.b.	<LOD	<LOD	n.b.

*n.b.- nie badano

9.3. Farmy zwierząt i składowisko odpadów organicznych w ogrodzie zoologicznym

Wybrane metodyki zastosowano do oznaczania związków z grupy KKA w próbkach ścieków pobranych z farm zwierząt („A” i „B”) oraz ze składowiska odpadów organicznych ogrodu zoologicznego. Próbki ścieków zawierały wysokie stężenia kwasów, dlatego rozcieńczano je wodą dejonizowaną 1:4 (v/v) przed rozpoczęciem procesu ekstrakcji. W **Tabeli 24** zestawiono otrzymane wyniki oznaczeń poszczególnych analitów z grupy KKA w próbkach ścieków z hodowli bydła i trzody chlewnej.

Tabela 24. Wyniki oznaczeń zawartości analitów z grupy KKA w próbkach ścieków pochodzących z hodowli trzody chlewnej i bydła.

Analit	Stężenie [mg/L] [średnia ± U(k=2)]					
	ŚCIEKI Z HODOWLI TRZODY CHLEWNEJ	ŚCIEKI Z HODOWLI BYDŁA				
		LLE-GC-MS	LLE-GC-MS	HS-GC-FID	HS-SPME-GC-MS (PEG)	
					Bez zawiesin	Z zawiesinami
„A”	„A”	„B”	„B”	„B”		
C2	726 ± 22	984 ± 26	79,6·10 ² ± 2,8·10 ²	60,3·10 ² ± 2,6·10 ²	89,5·10 ² ± 2,3·10 ²	
C3	58 ± 14	111 ± 10	672 ± 21	21,7·10 ² ± 1,6·10 ²	30,2·10 ² ± 2,1·10 ²	
iC4	10,4 ± 3,1	17,0 ± 1,5	112 ± 11	299 ± 33	484 ± 36	
C4	12,7 ± 3,2	39,4 ± 2,2	260 ± 25	873 ± 54	1129 ± 46	
iC5	22,0 ± 5,0	35,3 ± 1,1	104 ± 26	206 ± 18	276 ± 21	
C5	5,31 ± 0,89	4,11 ± 0,43	66 ± 15	184 ± 13	266 ± 16	
C6	1,13 ± 0,37	2,61 ± 0,17	n.b.	37,2 ± 4,9	38,6 ± 3,8	
C7	0,530 ± 0,067	0,481 ± 0,043	n.b.	1,56 ± 0,15	0,644 ± 0,011	
C8	0,560 ± 0,069	0,930 ± 0,070	n.b.	n.b.	n.b.	

A- Farma „A”- hodowla trzody chlewnej i bydła

B- Farma „B”- hodowla bydła

n.b. -nie badano

Zbadano także wpływ zawiesin obecnych w próbce rzeczywistej na wyniki oznaczenia związków z grupy KKA, w przypadku metodyki HS-SPME-GC-MS. W tym

celu z części próbek usunięto zawiesinę metodą odwirowania i dopiero wówczas rozcieńczano je wodą i podano analizie. Otrzymane wyniki oznaczeń były mniejsze, czego można było oczekiwać, ze względu na adsorpcję kwasów na materii zawieszanej.

Zawartość analitów z grupy KKA w próbkach ścieków z hodowli była nieznacznie wyższa, co może być wynikiem dłuższego okresu przechowywania ścieków w zbiorniku, a co za tym idzie dłuższego okresu procesu fermentacji beztlenowej.

W **Tabeli 25** zestawiono uzyskane wyniki oznaczeń analitów z grupy KKA w próbkach wodnych, powstałych na i w pobliżu składowiska odpadów organicznych ogrodu zoologicznego.

Tabela 25. Zawartość analitów z grupy KKA w próbkach ścieków i odcieków pobranych ze składowiska odpadów organicznych ogrodu zoologicznego oznaczone w wyniku zastosowania procedury HS-GC-FID.

Analit	Stężenie [mg/L] [średnia ± U(k=2)]	
	(a)	(b)
C2	8,89 ± 0,25	885 ± 43
C3	10,14 ± 0,87	240 ± 27
iC4	2,380 ± 0,052	37,9 ± 3,6
C4	6,45 ± 0,19	166,6 ± 8,6
iC5	1,18 ± 0,11	72,5 ± 5,8
C5	1,16 ± 0,18	23,9 ± 1,5
C6	< LOD	5,54 ± 0,39

(a) odciek powstały w wyniku opadów deszczu, znajdujący się 5m od składowiska odpadów organicznych

(b) ściek znajdujący się na powierzchni składowiska odpadów organicznych

Zawartość związków z grupy KKA w analizowanych próbkach ze składowiska odpadów organicznych ogrodu zoologicznego mieściła się w granicach od 5,54 do 885 mg/L, natomiast w próbkach odcieków od 1,16 do 10,14 mg/L. W przypadku próbek wód powierzchniowych, pobranych z terenu składowiska ogrodu zoologicznego, zawartości analitów z grupy KKA znajdowały się poniżej wartości liczbowej granicy wykrywalności.

IV PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Przeprowadzone studium literaturowe oraz badania własne dotyczą w głównej mierze szerokiego spektrum metod izolacji i wzbogacania krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksyłowych (KKA), które wydają się niezbędne do pełnego zrozumienia problemów przygotowania wodnej próbki środowiskowej do analizy chromatograficznej i optymalnego wyboru procedury przygotowania próbki dla danego zadania analitycznego.

Przeprowadzone studium literaturowe wskazuje:

- na konieczność oznaczania krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksyłowych w próbkach stałych i ciekłych, w tym szczególnie w próbkach wodnych zanieczyszczonych przez materię organiczną i w których występują mikroorganizmy odpowiedzialne za procesy fermentacyjne.
- na potrzebę opracowywania metodyk oznaczania powyższych analitów.
- że szczególnie przydatną techniką jest chromatografia gazowa i dobrze jest zaplanować metodyki wykorzystujące tę technikę.
- że w badaniach nad opracowaniem metodyk, główny nacisk należy położyć na etap przygotowania próbki do analizy.

Celem prezentowanego projektu badawczego było opracowanie metodyk oznaczania związków z grupy KKA, opartych na chromatografii gazowej jako technice oznaczeń końcowych i różnych sposobach przygotowania próbek do analizy. Aby zrealizować ten cel przeprowadzono szereg badań, których wyniki mogą być podstawą do następujących spostrzeżeń i wniosków dotyczących:

1. Opracowania odpowiednich metodyk analitycznych, które w porównaniu z istniejącymi procedurami oznaczania wolnych krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksyłowych, stanowią nowość naukową ze względu na:

- Zastosowanie bezrozpuszczalnikowych technik wzbogacania analitów z próbek wodnych.
- Umożliwienie bezpośredniego oznaczania kwasów w próbkach wodnych, charakteryzujących się stosunkowo małym ładunkiem zanieczyszczeń w wyniku wprowadzenia układu rozdzielczego, w którym szeregowo połączono kolumny z polarną i niepolarną fazą stacjonarną.
- Wprowadzenie metodyki oczyszczania próbki o złożonym składzie matrycy przed bezpośrednim dozowaniem wodnej próbki do chromatografu gazowego, opartej na

technice destylacji, stosując zaprojektowany wcześniej aparat do wzbogacania lotnych związków polarnych z próbek ścieków farmaceutycznych.

- Zastosowanie eteru metylo-*tert*-butylowego jako rozpuszczalnika do ekstrakcji typu LLE, który w porównaniu z eterem dietylowym wydaje się być bezpieczniejszy w stosowaniu.
- Użycie włókna urządzenia do SPME pokrytego polarną fazą stacjonarną typu glikolu polietylenowego (PEG) do izolacji analitów z grupy KKA za pomocą techniki HS-SPME na etapie przygotowania próbki do analizy.

2. Optymalizacji niezbędnych parametrów zaproponowanych metodyk analitycznych. Wyniki prac optymalizacyjnych zestawiono w **Tabelach 13 i 26**.

Tabela 26. Parametry, metodologia opracowanych procedur analitycznych.

Procedura	GC-FID	Destylacja- GC-FID	HS- GC-FID	HS-SPME-GC-MS		LLE- GC-MS
				PEG	PDMS/CAR	
Dobre warunki technik przygotowania próbki do analizy						
Oznaczone kwasy	C2-C8	C2-C5	C2-C6	C2-C7	C2-C7	C2-C8
Objętość próbki	2 µL	250 mL	2 mL	2 mL	2 mL	4 mL
Dodatek NaCl [g]	-	95	0,75	0,75	0,75	1
Czas ekstrakcji [min]	-	65	30	40	40	2x3
Temperatura [°C]	-	-	95	25	25	-
Rodzaj rozpuszczalnika	-	-	-	-	-	MTBE
Całkowity czas analizy [min]	ok 22	ok 105	ok 40	ok 60	ok 60	ok 30
Zakres [mg/L]	0,1-500	0,1-50	0,1-1000	0,1-256	0,09-255	0,1-100
R	>0,9820	>0,9849	>0,9869	>0,9829	>0,9876	>0,9986
CV [%]	<8,66	<8,22	<18	<5,91	<6,51	<7,80
Zakres LOD [mg/L]	0,016-0,085	-	0,053-0,38	0,064-0,17	0,03-0,28	0,070-0,44
LOD C2 [mg/L]	0,019	-	0,14	0,051	0,20	0,20

3. Wyznaczenia podstawowych parametrów walidacyjnych metodyk oznaczania wolnych krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksylowych na bazie próbek wzorcowych,

zapewniający pewien poziom kontroli i zapewnienia jakości uzyskanych wyników analitycznych. Parametry walidacyjne zostały przedstawione w **Tabeli 26**, które można podsumować w następujący sposób:

- Powtarzalność opracowanych metodyk wyrażona, jako wartość współczynnika zmienności wahała się na poziomie 6-9%, za wyjątkiem procedury HS-GC-FID, w przypadku której współczynnik ten wynosił 18%.
- W przypadku wszystkich opracowanych procedur zależności sygnału (pola powierzchni) od stężenia dla wybranych zakresów stężeń są opisane równaniami regresji liniowej-wartości współczynnika zmienności ($R > 0,9820$). Dokładność oznaczeń można poprawić dzieląc zakresy stężeń na dwa, wyjątkowo trzy segmenty.
- Wartości liczbowe granic oznaczalności są funkcją kwasu i procedury, jednak nie przekraczają wartości mg/L.

4. Zastosowania opracowanych procedur do określenia stężeń związków z grupy KKA w próbkach ciekłych i stałych z procesów oczyszczania ścieków oraz z procesów zachodzących na i w pobliżu składowisk odpadów, a także z farm zwierząt. Uzyskane dane mogą stanowić cenne przesłanki w zakresie:

- badania procesów oczyszczania ścieków oraz procesów zachodzących na i w pobliżu składowisk odpadów, a także oszacowania wpływu kompostowania odchodów z farm zwierzęcych.
- działań modernizacyjnych technologii oczyszczania ścieków-skutkiem czego byłoby zmniejszenie zrzutu substancji zanieczyszczających środowisko wodne i obniżenie kosztów ponoszonych przez oczyszczalnie ścieków za korzystanie ze środowiska,
- kontroli procesów zachodzących na składowiskach odpadów komunalnych oraz farm zwierząt w kierunku obniżenia emisji odorów do środowiska, może poprawić komfort życia mieszkańców pobliskich osiedli, a tym samym przyczynić się do uatrakcyjnienia walorów turystycznych tego obszaru.

5. Możliwości wykorzystania opracowanych metodyk w laboratoriach pracujących z dla oczyszczalni ścieków oraz dla zespołów badania procesów biologicznego oczyszczania ścieków i w laboratoriach analityki środowiskowej.

Sugeruje się przeprowadzenie dalszych prac, ukierunkowanych na wdrożenie wybranej procedury jako normy zalecanej przez PKN.

V LITERATURA

- [1] Dojlido J.R., *Chemia wód powierzchniowych*, Wydawnictwo Ekonomia i Środowisko, Białystok (1995)
- [2] <http://pl.wikipedia.org/wiki/Zakwit>
- [3] Dymczewski Z., Oleszkiewicz J., Sozański M., *Poradnik eksploratora oczyszczalni ścieków*, Polskie Zrzeszenie Inżynierii i Technologii Sanitarnych, Poznań (1997)
- [4] Klimiuk E., Łebkowska M., *Biotechnologia w ochronie środowiska*, PWN, Warszawa (2003)
- [5] Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 24 lipca 2006 r. w sprawie warunków, jakie należy spełnić przy wprowadzaniu ścieków do wód lub ziemi, oraz w sprawie substancji szczególnie szkodliwych dla środowiska wodnego, Dz.U. 2006 nr 137 poz. 984.
- [6] Bernacka J., Pawłowska L., Krobski A., *Wysokoefektywne oczyszczanie ścieków w Polsce*, Instytut Ochrony Środowiska, Warszawa (2001)
- [7] Łomotowski J., Szpinder A., *Nowoczesne systemy oczyszczania ścieków*, Arkady, Warszawa (2002)
- [8] Latkowska B., Fitko H., Sobolewski A., *Gaz, Woda i Technika Sanitarna*, **4**, 146 (2003)
- [9] Żeglin K., mater. Seminarium P.K. "Metody oznaczania wskaźników zanieczyszczeń organicznych" Kraków (1998)
- [10] Cruwys J.A., Dinsdale R.M., Hawkes F.R., Hawkes D.L., Development of a static headspace gas chromatographic procedure for the routine analysis of volatile fatty acids in wastewaters, *J. Chromatogr. A*, **945**, 195–209 (2002)
- [11] Kryłow M., Lach A., Mater. Seminarium P.K. "Metody oznaczania wskaźników zanieczyszczeń organicznych", Kraków (1998)
- [12] Abalosa M., Bayona J.M., Pawliszyn J., Development of a headspace solid-phase microextraction procedure for the determination of free volatile fatty acids in waste waters, *J. Chromatogr. A*, **873**, 107–115 (2000)
- [13] Abalosa M., Bayona J.M., Application of gas chromatography coupled to chemical ionization mass spectrometry following headspace solid-phase microextraction for the determination of free volatile fatty acids in aqueous samples, *J. Chromatogr. A*, **891**, 287–294 (2000)
- [14] Manni G., Caron F., Calibration and determination of volatile fatty acids in waste leachate by gas chromatography, *J. Chromatogr. A*, **690**, 237-242 (1995)
- [15] Shao-Pin Y., Analysis of volatile fatty acids in wastewater collected from a pig farm by a solid phase microextraction method, *Chemosphere*, **38**, 823-834 (1999)
- [16] Himanen M., Latva-Kala K., Itavaara M., Hanninen K., A Method for Measuring Low-Weight Carboxylic Acids from Biosolid Compost, *J. Environ. Qual.*, **35**, 516-521(2006)
- [17] Cherrington C.A., Hinton M., Mead G.C., Chopra I., Organic acids: chemistry, antibacterial activity and practical applications, *Adv. Microbiol. Physiol.*, **32**, 87-108 (1991)

- [18] Baziramakenga R., Simard R.R., Low molecular weight aliphatic acid contents of composted manures, *J. Environ. Qual.*, **27**, 557–562 (1998)
- [19] Brondz I., Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques, *Anal. Chim. Acta*, **465**, 1–37 (2002)
- [20] Malej J., *Rocznik Ochrony Środowiska*, **3**, 103 (2001)
- [21] Henze M., Harremoes P., Jansen J., Arvin E., *Oczyszczanie ścieków procesy biologiczne i chemiczne*, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Kielce (2000)
- [22] Choi H. J., Lee S.M., Choi C.H., Kwon M.C., Lee H.Y., Influence of the wastewater composition on denitrification and biological p-removal in the S-DN-P-process. (b) Effect of acetate, *J. Hazard. Mater.*, **158**, 151-156 (2008)
- [23] Podedworna J., Umiejewska K., *Technologia osadów ściekowych*. Oficyna Wydawnicza PW, Warszawa (2008)
- [24] Bień J.B., *Osady ściekowe- teoria i praktyka*. Wydawnictwo Politechniki Częstochowskiej, Częstochowa (2007)
- [25] Hupka J., *Charakterystyka i zagospodarowanie osadów ściekowych t.II*, Bydgoskie Towarzystwo Naukowe Prace Wydziału Nauk Technicznych Seria A, zeszyt nr 30 (2000)
- [26] *GEO Year Book, An overview of Our Changing Environment*. UNEP (2007)
- [27] Welander U., Henryson T., Welander T., Nitrification of landfill leachate using suspended-carrier biofilm technology, *Water Res.*, **31**, 2351-2355 (1997)
- [28] Wang F., Smith D.W., El-Din M.G., Application of advanced oxidation methods for landfill leachate treatment- A review, *J. Environ. Eng. Sci.*, **2**, 413-427 (2003)
- [29] Harsem J., Identification of organic compounds in leachate from a waste tip, *Water Res.*, **17**, 699-705 (1983)
- [30] Bozkurt S., Moreno L., Neretnieks I., Long-term processes in waste deposits, *Sci. Total. Environ.*, **250**, 101-121 (2000)
- [31] Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 grudnia 2002 r. w sprawie zakresu, czasu, sposobu oraz warunków prowadzenia monitoringu składowisk odpadów. (Dz. U. Nr 220, poz.1858)
- [32] Kozłowska B., *Ochrona Środowiska-wybrane zagadnienia*, Wydawnictwo Politechniki Łódzkiej, Łódź (2001)
- [33] Renou S., Givaudan J.G., Poulain S., Dirassouyan F., Moulin P., Landfill leachate treatment: Review and opportunity, *J. Hazard. Mater.*, **150**, 468-493 (2008)
- [34] Barlaz M.A., Schaefer D.M., Ham R.K., Bacterial population development and chemical characteristics of refuse decomposition in a simulated sanitary landfill, *Appl. Environ. Microb.*, **55**, 55-65(1989)
- [35] Kjeldsen P., Barlaz M.A., Rooker A.P., Baun A., Christensen T.H., Present and long term composition of MSW landfill leachate: a review, *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.*, **32**, 297-336 (2002)
- [36] Chian E.S.K., DeWalle F.B., Sanitary landfill leachates and their treatment, *J. Environ. Eng. Div.*, 411-431 (1976)

- [37] Żygadło M., Gospodarka odpadami komunalnymi, Wydawnictwo Politechniki Świętokrzyskiej, Kielce (1998)
- [38] Bogacki A., Badanie wpływu wysypiska odpadów na środowisko, *Eko-problemy*, **23**, 14-16 (1993)
- [39] <http://www.wodr.konskowola.pl>
- [40] Angelidaki I., Ellegaard L., Ahring B.K., Applications of the anaerobic digestion process, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **82**, 1–33 (2003)
- [41] Ramirez-Saenz D., Zarate-Segura P.B., Guerrero-Barajas C., Garcia-Pena E.I., H₂S and volatile fatty acids elimination by biofiltration: Clean-up process for biogas potential use, *J. Hazard. Mater.*, **163**, 1272–1281 (2009)
- [42] Rappert S., Muller R., Odor compounds in waste gas emissions from agricultural operations and food industries, *Waste Manage.*, **25**, 887–907 (2005)
- [43] Zhu J., A review of microbiology in swine manure odour control, *Agr. Ecosyst. Environ.*, **78**, 93–106 (2000)
- [44] Krzymowski T., Fizjologia zwierząt, PWRiL, Warszawa (1983)
- [45] Zygmunt E., Zarys fizjologii zwierząt, PWN, Warszawa (1989)
- [46] <http://www.delaval.pl>
- [47] Zvomuya F., Helgason B.L., Larney F.J., Predicting phosphorus availability from soil-applied composted and non-composted cattle feedlot manure, *J. Environ. Qual.*, **35**, 928-937 (2006)
- [48] Ahn J-H, Do T.H., Kim S.D., Hwang S., The effect of calcium on the anaerobic digestion treating swine wastewater, *Biochem. Eng. J.*, **30**, 33-38 (2006)
- [49] PN-75/C-04616 Woda i ścieki: Badania specjalne osadów, Oznaczanie kwasów tłuszczowych lotnych w osadach ściekowych i wodach nadosadowych metodą destylacji z parą wodną, Wydawnictwo Normalizacyjne (1975)
- [50] Giecwicz J., Zygmunt B., Oznaczanie lotnych kwasów tłuszczowych w ściekach metodą chromatografii gazowej, *Chem. Inż. Ekol.*, **10**, 1125-1138 (2003)
- [51] Peldszus S. Organic acids, w: Chromatographic analysis of the environment, Red. Nollet N., CRC Press, Chromatographic Sci. Series, **93** (2006)
- [52] PN-EN ISO 5667-13 Jakość wody-Pobieranie próbek-Część 13: Wytyczne dotyczące pobierania próbek osadów z oczyszczalni ścieków i stacji uzdatniania wody, Wydawnictwo Normalizacyjne (2002)
- [53] Dick E.M., Water and Wastewater Sampling for Environmental Analysis, w: Environmental Sampling for Trace Analysis, Red. Market B., VCH, New York, 255-278 (1994)
- [54] Zhang P., Chen Y., Huang T., Zhou Q., Waste activated sludge hydrolysis and short-chain fatty acids accumulation in the presence of SDBS in semi-continuous flow reactors: Effect of solids retention time and temperature, *Chem. Eng. J.*, **148**, 348–353 (2009)

- [55] Ponsa S., Ferrer I., Vazquez F., Fonta X., Optimization of the hydrolytic–acidogenic anaerobic digestion stage (55°C) of sewage sludge: Influence of pH and solid content, *Water Res.*, **42**, 3972–3980 (2008)
- [56] Yasuhara A., Shiraishi H., Nishikawa M., Yamamoto T., Uehiro T., Nakasugi O., Okumura T., Kenmotsu K., Fukui H., Nagase M., Ono Y., Kawagoshi Y., Baba K., Noma Y., Determination of organic components in leachates from hazardous waste disposal sites in Japan by gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **774**, 321–332 (1997)
- [57] Namieśnik J., Łukasiak J., Jamrógiewicz Z., Pobieranie próbek środowiskowych do analizy, PWN, Warszawa (1995)
- [58] Hermanowicz W., Dojlido J., Dożańska W., Koziorowski B., Zerbe J., Fizyczno-chemiczne badania wody i ścieków, Arkady, Warszawa (1999)
- [59] Dojlido J., Zebre J., Instrumentalne metody badania wody i ścieków, Arkady, Warszawa (1997)
- [60] Kuran P., Sojak L., Environmental analysis of volatile organic compounds in water and sediment by gas chromatography, *J. Chromatogr. A*, **733**, 119–141 (1996)
- [61] Cuetos M.J., Gomez X., Otero M., Moran A., Anaerobic digestion of solid slaughterhouse waste (SHW) at laboratory scale: Influence of co-digestion with the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW), *Biochem. Eng. J.*, **40**, 99–106 (2008)
- [62] Senturk E., Ince M., Engin O. G., Treatment efficiency and VFA composition of a thermophilic anaerobic contact reactor treating food industry wastewater, *J. Hazard. Mater.*, **176**, 843–848 (2010)
- [63] Yang W.Z., Laarman A., He M.L., Liu Q., Effect of rare earth elements on in vitro rumen microbial fermentation and feed digestion, *Anim. Feed Sci. Technol.*, **148**, 227–240 (2009)
- [64] Speight S.M., Harmon D.L., Batch culture evaluation of carbohydrase inhibitors to moderate rumen fermentation, *Anim. Feed Sci. Technol.*, **155**, 156–162 (2010)
- [65] Gajkowska- Steffańska L., Guberski S., Gutawski W., Momak Z., Szperliński Z., Laboratoryjne badania wody, ścieków i osadów ściekowych, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa (2001)
- [66] Jurado-Sanchez B., Ballesteros E., Gallego M., Determination of carboxylic acids in water by gas chromatography using several detectors after flow preconcentration, *J. Chromatogr. A*, **1217**, 7440–7447 (2010)
- [67] Skarżyńska K., Polkowska Ż., Przyjazny A., Namieśnik J., Application of Different Sampling Procedures In Studies of Composition of Various Types of Runoff Waters- A Review, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **37**, 91–105 (2007)
- [68] Imen S., Ismail T., Sami S., Fathi A., Khaled M., Ahmed G., Latifa B., Characterization and anaerobic batch reactor treatment of Jebel Chakir Landfill leachate, *Desalination*, **246**, 417–424 (2009)
- [69] Bhattacharyya J.K., Kumar S., Devotta S., Studies on acidification in two-phase biomethanation process of municipal solid waste, *Waste Manage.*, **28**, 164–169 (2008)

- [70] Feitkenhauer H., von Sachs J., Meyer U., On-line titration of volatile fatty acids for the process control of anaerobic digestion plants, *Wat. Res.*, **36**, 212-218 (2002)
- [71] Buchauer K., A comparison of two titration procedures to determine volatile fatty acids to wastewater and sludge treatment processes, *Water SA*, **24**, 49-56 (1998)
- [72] Sponza D.T., Agdag O.N., Impact of leachate recirculation and recirculation volume on stabilization of municipal solid waste in simulated anaerobic bioreactors, *Process Biochem.*, **39**, 2157-2165 (2004)
- [73] Siedlecka E.M., Kumirska J., Ossowski T., Glamowski P., Gołębiowski M., Gajdus J., Kaczyński Z., Stepnowski P., Determination of Volatile Fatty Acids in Environmental Aqueous Samples, *Pol. J. Environ. Stud.*, **17**, 351-356 (2008)
- [74] Sosnowski P., Klepacz-Smolka A., Kaczorek K., Ledakowicz S., Kinetic investigations of methane co-fermentation of sewage sludge and organic fraction of municipal solid waste, *Bioresour. Technol.*, **99**, 5731-5737 (2008)
- [75] Olmsted W.H., Duden C.W., Whitaker W.M., Parker R.F., A method for the rapid distillation of the lower volatile fatty acids from stools, *J. Biol. Chem.*, **85**, 111-115 (1929)
- [76] Alkaya E., Kaptan S., Ozkan L., Uludag-Demirer S., Demirer G.N., Recovery of acids from anaerobic acidification broth by liquid-liquid extraction, *Chemosphere*, **77**, 1137-1142 (2009)
- [77] Zhou W., Wu B., She Q., Chi L., Zhang Z., Investigation of soluble microbial products in a full-scale UASB reactor running at low organic loading rate, *Bioresour. Technol.*, **100**, 3471-3476 (2009)
- [78] Docherty K.S., Ziemann P.J., On-line, inlet-based trimethylsilyl derivatization for gas chromatography of mono- and dicarboxylic acids, *J. Chromatogr. A*, **921**, 265-275 (2001)
- [79] Ormad P., Cort S., Sarasa J., Martin A., Puig A., Ovelleiro J.L., Characterization of organic micropollutants in the River Cinca (Spain) by using granular activated carbon and liquid-liquid extraction, *J. Chromatogr. A*, **733**, 159-169 (1996)
- [80] Zygmunt B., Banel A., GC-FID Determination of C2-C4 Aliphatic Monocarboxylic Acids in Aqueous Samples Preceded by Solvent Extraction, *Chem. Anal. (Warsaw)*, **54**, 339-348 (2009)
- [81] Zygmunt B., Zesz. Nauk. Politechniki Gdańskiej, *Chemia XXXVII*, nr 556, Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej, Gdańsk (1997)
- [82] Lou D.W., Lee X., Pawliszyn J., Extraction of formic and acetic acids from aqueous solution by dynamic headspace-needle trap extraction Temperature and pH optimization, *J. Chromatogr. A*, **1201**, 228-234 (2008)
- [83] Namieśnik J., Jamrógiewicz Z., *Fizykochemiczne metody kontroli zanieczyszczeń środowiska*, Wydawnictwo Naukowo Techniczne, Warszawa (1998)
- [84] Gonzalez-Fernandez C., Garcia-Encina P.A., Impact of substrate to inoculum ratio in anaerobic digestion of swine slurry, *Biomass Bioenergy*, **33**, 1065-1069 (2009)
- [85] Psillakis E., Kalogerakis N., Application of solvent microextraction to the analysis of nitroaromatic explosives in water samples, *J. Chromatogr. A*, **907**, 211-219 (2001)

- [86] Psillakis E., Kalogerakis N., Solid-Phase Microextraction versus single drop microextraction for the analysis of nitroaromatic explosives in water samples, *J. Chromatogr. A*, **938**, 113-120 (2001)
- [87] Larreta J., Vallejo A., Bilbao U., Alonso A., Arana G., Zuloaga O., Experimental design to optimise the analysis of organic volatile compounds in cow slurry by headspace solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **1136**, 1–9 (2006)
- [88] Francioso O., Rodriguez-Estrada M.T., Montecchio D., Salomoni C., Caputo A., Palenzon D., Chemical characterization of municipal wastewater sludges produced by two-phase anaerobic digestion for biogas production, *J. Hazard. Mater.*, **175**, 740–746 (2010)
- [89] Feng L., Huang Y., Wang H., Solid-Phase Microextraction in Combination with GC–FID for Quantification of the Volatile Free Fatty Acids in Wastewater from Constructed Wetlands, *J. Chromatogr. Sci.*, **46**, 577-584 (2008)
- [90] Huang Y., Ortiz L., Aguirre P., Garcia J., Mujeriego R., Bayona J.M., Effect of design parameters in horizontal flow constructed wetland on the behaviour of volatile fatty acids and volatile alkylsulfides, *Chemosphere*, **59**, 769-777 (2005)
- [91] Miller D.N., Woodbury B.L., A solid-phase microextraction chamber method for analysis of feces and manures volatiles, *J. Environ. Qual.*, **35**, 2383-2394 (2006)
- [92] Spinhirne J.P., Koziel J.A., Chirase N.K., Sampling and analysis of volatile organic compounds in bovine breath by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **1025**, 63–69 (2004)
- [93] Cai L., Koziel J.A., Lo Y.C., Hoff S.J., Characterization of volatile organic compounds and odorants associated with swine barn particulate matter using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry-olfactometry, *J. Chromatogr. A*, **1102**, 60-72 (2006)
- [94] Razote E.B., Maghirang R.G., Seitz L.M. i Jeon I.J., Characterization of volatile organic compounds on airborne dust in a swine finishing barn, *Am. Soc. Agric. Eng.*, **47**, 1231-1238 (2004)
- [95] Pan L., Pawliszyn J., Derivatization/Solid-Phase Microextraction: New Approach to Polar Analytes, *Anal. Chem.*, **69**, 169-205 (1997)
- [96] Wittmann G., Van Langenhoveb H., Dewulf J., Determination of acetic acid in aqueous samples, by water-phase derivatisation, solid-phase microextraction and gas chromatography, *J. Chromatogr. A*, **874**, 225–234 (2000)
- [97] Pan L., Adams M., Pawliszyn J., Determination of Fatty Acids Using Solid-Phase Microextraction, *Anal. Chem.*, **67**, 4396-4403 (1995)
- [98] Mills G.A., Walker V., Mughal H., Headspace solid-phase microextraction with 1-pyrenyldiazomethane in-fibre derivatisation for analysis of faecal short-chain fatty acids, *J. Chromatogr. B*, **730**, 113-122 (1999)
- [99] Prosen H., Zupancic-Kralj L., Solid Phase Microextraction, *Trends Anal. Chem.*, **18**, 272-282 (1999)
- [100] Mills G.A., Walker V., Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials, *J. Chromatogr. A*, **902**, 267–287 (2000)

- [101] Penalver A., Pocurull E., Borrull F., Marce R.M., Trends in Solid-Phase Microextraction for Determining Organic Pollutants in Environmental Samples, *Trends Anal. Chem.*, **18**, 557-568 (1999)
- [102] Grebel J.E., Young C.C., (Mel) Suffet I.H., Solid Phase Microextraction of N-Nitrosamines, *J. Chromatogr. A*, **1117**, 11-18 (2006)
- [103] Xu L., Basheer C., Lee H.K., Developments in single-drop microextraction, *J. Chromatogr. A*, **1152**, 184-192 (2007)
- [104] Wardencki W., Curyło J, Namieśnik J., Trends in solventless sample preparation techniques for environmental analysis, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **70**, 257-288 (2007)
- [105] Li Y., Xionga Y., Lianga Q., Fanga C., Wangb C., Application of headspace single-drop microextraction coupled with gas chromatography for the determination of short-chain fatty acids in RuO₄ oxidation products of asphaltenes, *J. Chromatogr. A*, **1217**, 3561–3566 (2010)
- [106] Field J.A., Coupling chemical derivatization reactions with supercritical fluid extraction, *J. Chromatogr. A*, **785**, 239-249 (1997)
- [107] Zygmunt B., Jastrzębska A., Namieśnik J., Application of solid-phase microextraction for determination of organic vapours in gaseous matrices, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **31**, 1-18 (2001)
- [108] Clark J.T, Bunch J.E., Determination of Volatile Acids in Tobacco, Tea, and Coffee Using Derivatization–Purge and Trap Gas Chromatography–Selected Ion Monitoring Mass Spectrometry, *J. Chromatogr. Sci.*, **35**, 206-280 (1997)
- [109] Takeda K., Katoh S., Nakatani N., Sakugawa H., Rapid and Highly Sensitive Determination of Low- Molecular- Weight Carbonyl Compounds in Drinking Water and Natural Water by Preconcentration HPLC with 2,4-Dinitrophenylhydrazine, *Anal. Sci.*, **22**, 1509-1514 (2006)
- [110] McGrath L.T., Weir C.D., Maynard S., Rowlands B.J., Gas-liquid chromatographic analysis of volatile short chain fatty acids in fecal samples as pentafluorobenzyl esters, *Anal. Biochem.*, **207**, 227-230 (1992)
- [111] Uchiyama S., Matsushima E., Aoyagi S., Ando M., Simultaneous Determination of C1-C4 Carboxylic Acids and Aldehydes Using 2,4-dinitrophenylhydrazine-Impregnated Silica Gel and High- Performance Liquid Chromatography, *Anal. Chem.*, **76**, 5849-5854 (2004)
- [112] Peillard F.R., Barco E.P., Dudal Y., Coulomb B., Boudenne J.L., Alternative Spectrofluorimetric Determination of Short-Chain Volatile Fatty Acids in Aqueous Samples, *Anal. Chem.*, **81**, 3063–3070 (2009)
- [113] Anderson G., Yang G., Determination of bicarbonate and total volatile acid concentration in anaerobic digestion using a simple titration, *Water Environ. Res.*, **64**, 53–59 (1992)
- [114] Delgnes J.P., Rustrian E., Bernet N., Moletta R., Combined biodegradation of carbon, nitrogen and phosphorus from wastewaters, *J. Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **5**, 429-433 (1998)

- [115] Fischer K., Chodura A., Kotalik J., Blemek D, Kettrup A., Analysis of aliphatic carboxylic acids and amino acids in effluents of landfills, composting plants and fermentation plants by ionexclusion and ion-exchange chromatography, *J. Chromatogr. A*, **770**, 229-241 (1997)
- [116] Soares A., Kampas P., Maillard S., Wood E., Brigg J., Tillotson M., Parsons S.A., Cartmell E., Comparison between disintegrated and fermented sewage sludge for production of a carbon source suitable for biological nutrient removal, *J. Hazard. Mater.*, **175**, 733–739 (2010)
- [117] Mohan S.V., Bhaskar Y.V., P. Murali Krishna P.M., Roa N.C., Babu V.L., Sarma P.N., Biohydrogen production from chemical wastewater as substrate by selectively enriched anaerobic mixed consortia: Influence of fermentation pH and substrate composition, *Int. J. Hydrogen Energy*, **32**, 2286–2295 (2007)
- [118] Ghaniyari-Benis S., Borja R., Ali Monemian S., Goodarzi V., Anaerobic treatment of synthetic medium-strength wastewater using a multistage biofilm reactor, *Bioresour. Technol.*, **100**, 1740–1745 (2009)
- [119] Chauhan A., Ogram A., Evaluation of support matrices for immobilization of anaerobic consortia for efficient carbon cycling in waste regeneration, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **327**, 884–893 (2005)
- [120] Argun H., Kargi F., Bio-hydrogen production from ground wheat starch by continuous combined fermentation using annular-hybrid bioreactor, *Int. J. Hydrogen Energy*, **35**, 6170 -6178 (2010)
- [121] Eilersen, A.M., Henze, M., and Kloft, L., Effect of volatile fatty acids and trimethylamine on denitrification in activated sludge, *Water Res.*, **29**, 1259-1266 (1995)
- [122] Jen, J.F., Lin C.W., Lin C.J., Yan. C.T., Determination of volatile fatty acids in landfill leachates by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **629**, 394-397 (1993)
- [123] Viggì C.C., Dionisi D., Miccheli A., Valerio M., Majone M., Metabolic analysis of the removal of formic acid by unacclimated activated sludge, *Water Res.*, **44**, 3393-3400 (2010)
- [124] Majone M., Aulenta F., Dionisi D., D'Addario E.N., Sbardellati R., Bolzonella D., Beccari M., High-rate anaerobic treatment of Fischer–Tropsch wastewater in a packed-bed biofilm reactor, *Wat. Res.*, **44**, 2745-2752 (2010)
- [125] Wagner A.O., Gstrauntaler G., Illmer P., Utilisation of single added fatty acids by consortia of digester sludge in batch culture, *Waste Manage.*, **30**, 1822–1827 (2010)
- [126] Niven S.J., Beal J.D., Brooks P.H., The simultaneous determination of short chain fatty acid, monosaccharides and ethanol in fermented liquid pig diets, *Anim. Feed Sci. Technol.*, **117**, 339-345 (2004)
- [127] Barcelona M.J., Liljestränd H.M., Morgan J.J., Determination of Low Molecular Weight Volatile Fatty Acids in Aqueous Samples, *Anal. Chem.*, **52**, 321-325 (1980)
- [128] Fischer K., Environmental analysis of aliphatic carboxylic acids by ion-exclusion chromatography, *Anal. Chim. Acta*, **465**, 157–173 (2002)

- [129] Palacio-Barco E., Robert-Peillard F., Boudenne J.L., Coulomb B., On-line analysis of volatile fatty acids in anaerobic treatment processes, *Anal. Chim. Acta*, **668**, 74–79 (2010)
- [130] Ohta K., Tanaka K., Haddad P.R., Ion-exclusion chromatography of aliphatic carboxylic acids on an unmodified silica gel column, *J. Chromatogr. A*, **739**, 359–365 (1996)
- [131] Tanaka K., Chikara H., Hu W., Hasebe K., Separation of carboxylic acids on a weakly acidic cation-exchange resin by ion-exclusion chromatography, *J. Chromatogr. A*, **850**, 187–196 (1999)
- [132] Zhang D., Chen Y., Zhao Y., Zhu A., New Sludge Pretreatment Method to Improve Methane Production in Waste Activated Sludge Digestion, *Environ. Sci. Technol.*, **44**, 4802–4808 (2010)
- [133] Kibler M., Bachmann K., New derivatization method for carboxylic acids in aqueous solution for analysis by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection, *J. Chromatogr. A*, **836**, 325–331 (1999)
- [134] Buchberger W., Klampfl C.W., Eibensteiner F., Buchgraber K., Determination of fermenting acids in silage by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, **766**, 197–203 (1997)
- [135] Pantsar-Kallio M., Kmtunen M., Manmnen P. K.G., Application of capillary electrophoresis for determination of organic acids in waste waters, *Chemosphere*, **35**, 1509–1518 (1997)
- [136] Chi F.H., Lin H.P., Le M.H., Quick determination of malodor-causing fatty acids in manure by capillary electrophoresis, *Chemosphere*, **60**, 1262–1269 (2005)
- [137] Patni N. K., Jui P. Y., Volatile Fatty Acids in Stored Dairy-Cattle Slurry, *Agr. Wastes*, **13**, 159–178 (1985)
- [138] Morin-Couallier E., Bleton J., Lameloise M.L., Tchaplal A., Quantification of deformed peaks in capillary gas chromatography (CGC): Application to simultaneous analysis of free fatty acids and less polar compounds in aqueous distillery effluent, *Anal. Chim. Acta*, **583**, 259–265 (2007)
- [139] Garcia Encina P.A., Hidalgo M.D., Influence of substrate feed patterns on biofilm development in anaerobic fluidized bed reactors (AFBR), *Process Biochem.*, **40**, 2509–2516 (2005)
- [140] Ramírez-Perez A.H., Sauvant D., Meschy F., Effect of phosphate solubility on phosphorus kinetics and ruminal fermentation activity in dairy goats, *Anim. Feed Sci. Technol.*, **149**, 209–227 (2009)
- [141] Wang Y., Zhang Y., Wang J., Meng L., Effects of volatile fatty acid concentrations on methane yield and methanogenic bacteria, *Biomass Bioenergy*, **33**, 848–853 (2009)
- [142] Dong F., Zhao Q.B., Zhao J.B., Sheng G.P., Tang Y., Tong Z.H., Yu H.Q., Li Y.Y., Harada H., Monitoring the restart-up of an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor for the treatment of a soybean processing wastewater, *Bioresour. Technol.*, **101**, 1722–1726 (2010)

- [143] Zhang M. L., Sheng G.P., Yu H.Q., Near-infrared spectroscopy-based quantification of substrate and aqueous products in wastewater anaerobic fermentation processes, *Chinese Sci. Bull.*, **54**, 1918-1922 (2009)
- [144] Yan Y., Feng L., Zhang C., Wisniewski C., Zhou Q., Ultrasonic enhancement of waste activated sludge hydrolysis and volatile fatty acids accumulation at pH 10.0, *Water Res.*, **44**, 3329-3336 (2010)
- [145] Chen Y., Jiang S., Yuan H., Zhou Q., Gu G., Hydrolysis and acidification of waste activated sludge at different pHs, *Water Res.*, **41**, 683-689 (2007)
- [146] Hwang K., Song M., Kim W., Kim N., Hwang S., Effects of prolonged starvation on methanogenic population dynamics in anaerobic digestion of swine wastewater, *Bioresour. Technol.*, **101**, S2-S6 (2010)
- [147] Zhang L., Jahng D., Enhanced anaerobic digestion of piggery wastewater by ammonia stripping: Effects of alkali types, *J. Hazard. Mater.*, **182**, 536-543 (2010)
- [148] Jiang S., Chen Y., Zhou Q., Effect of sodium dodecyl sulfate on waste activated sludge hydrolysis and acidification, *Chem. Eng. J.*, **132**, 311-317 (2007)
- [149] Zhang Q.H., Luc X., Tang L., Mao Z.G., Zhang J.H., Zhang H.J., Sun F.B., A novel full recycling process through two-stage anaerobic treatment of distillery wastewater for bioethanol production from cassava, *J. Hazard. Mater.*, **179**, 635-641 (2010)
- [150] Yuan H. , Chen Y., Zhang H., Jiang S, Zhou Q., Gu G., Improved Bioproduction of Short-Chain Fatty Acids (SCFAs) from Excess Sludge under Alkaline Conditions, *Environ. Sci. Technol.*, **40**, 2025-2029 (2006)
- [151] Tong J., Chen Y., Enhanced Biological Phosphorus Removal Driven by Short-Chain Fatty Acids Produced from Waste Activated Sludge Alkaline Fermentation, *Environ. Sci. Technol.*, **41**, 7126-7130 (2007)
- [152] Feng L., Gu Y., Zheng X., Enhancement of Waste Activated Sludge Protein Conversion and Volatile Fatty Acids Accumulation during Waste Activated Sludge Anaerobic Fermentation by Carbohydrate Substrate Addition: The Effect of pH, *Environ. Sci. Technol.*, **43**, 4373-4380 (2009)
- [153] Zhao Y., Chen Y., Zhang D., Zhu A., Waste Activated Sludge Fermentation for Hydrogen Production Enhanced by Anaerobic Process Improvement and Acetobacteria Inhibition: The Role of Fermentation pH, *Environ. Sci. Technol.*, **44**, 3317-3323 (2010)
- [154] Goiri I., Oregui L.M., Garcia-Rodriguez A., Dose-response effects of chitosans on in vitro rumen digestion and fermentation of mixtures differing in forage-to-concentrate ratios, *Anim. Feed Sci. Technol.*, **151**, 215-227 (2009)
- [155] Jagadabhi P.S., Kaparaju P, Rintala J., Effect of micro-aeration and leachate replacement on COD solubilization and VFA production during mono-digestion of grass-silage in one-stage leach-bed reactors, *Bioresour. Technol.*, **101**, 2818-2824 (2010)
- [156] Alanis P., Sorenson M., Beene M., Krauter C., Shamp B., Hasson A.S., Measurement of non-enteric emission fluxes of volatile fatty acids from a California dairy by solid phase micro-extraction with gas chromatography/mass spectrometry, *Atmos. Environ.*, **42**, 6417-6424 (2008)

- [157] Elefsiniotis P., Li D., The effect of temperature and carbon source on denitrification using volatile fatty acids, *Biochem. Eng. J.*, **28**, 148–155 (2006)
- [158] Tsang Y.F., Chua H., Sin S.N., Chan S.Y., Treatment of odorous volatile fatty acids using a biotrickling filter, *Bioresour. Technol.*, **99**, 589–595 (2008)
- [159] Cokgor U., Oktay S., Tas D.O., Zengin G.E., Orhon D., Influence of pH and temperature on soluble substrate generation with primary sludge fermentation, *Bioresour. Technol.*, **100**, 380–386 (2009)
- [160] Yuan Q., Sparling R., Oleszkiewicz J.A., Waste activated sludge fermentation: Effect of solids retention time and biomass concentration, *Water Res.*, **43**, 5180–5186 (2009)
- [161] Mulkerrins D., Dobson A.D.W., Colleran E., Parameters affecting biological phosphate removal from wastewaters, *Environ. Int.*, **30**, 249–259 (2004)
- [162] Yuan Q., Oleszkiewicz J.A., Biomass fermentation to augment biological phosphorus removal, *Chemosphere*, **78**, 29–34 (2010)
- [163] Yuan Q., Baranowski M., Oleszkiewicz J.A., Effect of sludge type on the fermentation products, *Chemosphere*, **80**, 445–449 (2010)
- [164] Shi X.Y., Yu H.Q., Conversion of individual and mixed volatile fatty acids to hydrogen by *Rhodospseudomonas capsulate*, *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **58**, 82–88 (2006)
- [165] Oguz M.T., Robinson K.G., Layton A.C., Sayler G.S., Volatile fatty acid impacts on nitrite oxidation and carbon dioxide fixation in activated sludge, *Wat. Res.*, **40**, 665–674 (2006)
- [166] Zhao G., Liu J., Nyman M., Jonsson J.A., Determination of short-chain fatty acids in serum by hollow fiber supported liquid membrane extraction coupled with gas chromatography, *J. Chromatogr. B*, **846**, 202–208 (2007)
- [167] Wang Y., Zhang Y., Meng L., Wang J., Zhang W., Hydrogen–methane production from swine manure: Effect of pretreatment and VFAs accumulation on gas yield, *Biomass Bioenerg.*, **33**, 1131–1138 (2009)
- [168] Yu J., Production of PHA from starchy wastewater via organic acids, *J. Biotechnol.*, **86**, 105–112 (2001)
- [169] Buyukkamaci N., Filibeli A., Volatile fatty acid formation in an anaerobic hybrid reactor, *Process Biochem.*, **39**, 1491–1494 (2004)
- [170] Bouzas A., Ribes J., Ferrer J., Seco A., Fermentation and elutriation of primary sludge: Effect of SRT on process performance, *Wat. Res.*, **41**, 747–756 (2007)
- [171] Gungor K., Muftugil M.B., Ogejo J.A., Knowlton K.F., Love N.G., Prefermentation of liquid dairy manure to support biological nutrient removal, *Bioresour. Technol.*, **100**, 2124–2129 (2009)
- [172] Markantonatos X., Aharoni Y., Richardson L.F., Varga G.A., Effects of monensin on volatile fatty acid metabolism in periparturient dairy cows using compartmental analysis, *Anim. Feed Sci. Technol.*, **153**, 11–27 (2009)
- [173] Jonsson S., Boren H., Analysis of mono- and diesters of *o*-phthalic acid by solid-phase extractions with polystyrene divinylbenzene-based polymers, *J. Chromatogr. A*, **963**, 393–400 (2002)

- [174] Kroman R.P, Meyer J.H., Stielau W.J., Steam distillation of volatile fatty acids in rumen ingesta, *J. Dairy Sci.*, **29**,73-76 (1967)
- [175] Xiao B., Liu J., Biological hydrogen production from sterilized sewage sludge by anaerobic self-fermentation, *J. Hazard. Mater.*, **168**, 163–167(2009)
- [176] Gomez-Brandon M., Lores M., Dominguez J., Comparison of extraction and derivatization methods for fatty acid analysis in solid environmental matrixes, *Anal. Bioanal. Chem.*, **392**,505-514 (2008)
- [177] Larreta J., Usobiaga A., Etxebarria N., Arana G., Optymalisation of the on-fibre derivatisation of volatile fatty acids in the simultaneous determination together with phenols and indoles in cow slurries, *Anal. Bioanal. Chem.*, **389**, 1603-1609 (2007)
- [178] Lu M., Lamichhane P., Liang F., Imerman E., Chai M., Identification of Odor Causing Compounds in a Commercial Dairy Farm, *Water Air Soil Pollut.*, **8**, 359–367 (2008)
- [179] Sasaki G.L., Souza L.M., Serrato R.V., Cipriani T.R.,Gorin P.A.J., Iacomini M., Application of acetate derivatives for gas chromatography–mass spectrometry: Novel approaches on carbohydrates, lipids and amino acids analysis, *J. Chromatogr. A*, **1208**, 215–222 (2008)
- [180] Swati M., Rema T., Joseph K., Hazardous organic compounds in urban municipal solid waste from a developing country, *J. Hazard. Mater.*, **160**, 213–219 (2008)
- [181] Govere E.M., Tonegawa M., Bruns M.A., Wheeler E.F., Kephart K.B., Voigt J.W., Dec J., Using minced horseradish roots and peroxides for the deodorization of swine manure: A pilot scale study, *Bioresour. Technol.*, **98**, 1191-1198 (2007)
- [182] Castillo-Gonzales H.A., Bruns M.A., Dissimilatory Iron Reduction and Odor Indicator Abatement by Biofilm Communities in Swine Manure Microcosms, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 4972-4978 (2005)
- [183] Dincer F., Odabasi M., Muezzinoglu A., Chemical characterization of odorous gases at a landfill site by gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **1122**, 222–229 (2006)
- [184] Huang W.J., Fang G.C., Wang C.C., The determination and fate of disinfection by-products from ozonation of polluted raw water, *Sci. Total Environ.*, **345**, 261– 272 (2005)
- [185] Peters T.L., Steam distillation apparatus for concentration of trace water soluble organics, *Anal. Chem.*, **52**, 211–213 (1980)
- [186] Andrzejewska D., Andrzejewski T., Behnke M, Godlewski J., Kiejzik-Głowińska M., Sadurski A., Szymański J., Toszecki A., Walc K., Wniosek o Wydanie Pozwolenia Zintegrowanego ZUT Sp. z o.o. w Gdańsku, Ekokonsult, Gdańsk (2006)
- [187] Ebelt M., Kiejzik-Głowińska M., Tyszecki A., Raport o oddziaływaniu na środowisko budowy zakładu unieszkodliwiania odpadów w Gdańsku Szadółkach. Eko-Konsult, Gdańsk (2005)
- [188] Tyszecki A., Wniosek o wydanie pozwolenia zintegrowanego Zakład Utylizacyjny Sp. z o.o. w Gdańsku, Eko-Konsult, Gdańsk (2006)

- [189] Bystrzanowski W., Ocena Oddziaływania na Środowisko Przedsięwzięcia Inwestycyjnego, Dot. Budowy Zakładu Utylizacji Odpadów Komunalnych w Gdańsku-Szdółkach, INFRATECH, Gdańsk (2001)
- [190] Małaczyński M., Majorkowski A., Wieszczyński T., Pomowski K., Tichbar A., Łabieniec K., Przegląd Ekologiczny dla Składowiska Odpadów Gdańsk Szadółki (2002)
- [191] Stangret, Walczyk J., Badania ilości i składu wód podziemnych, powierzchniowych oraz odcieków dla Zakładu Utylizacyjnego Sp. z o.o. w Gdańsku (SNG/TLC/Raport nr 1-4), Saur Neptun Gdańsk, Gdańsk (2004)
- [192] Wiczyński M., Przybyłko – Rydzik K., Moczulski G., Monitoring składowiska odpadów komunalnych w Gdańsku-Szadółkach, Badania Składu Wód Podziemnych, Powierzchniowych i Odciekowych, Raport za 2005 rok, „Eko-Projekt”, Pszczyna (2006)
- [193] Ciechanowska-Żurek K., Monitoring składowiska odpadów komunalnych w Gdańsku-Szadółkach, Badania Składu Wód Podziemnych, Powierzchniowych i Odciekowych, Raport za 2006 rok, „Eko-Projekt”, Pszczyna (2007)
- [194] Nowak A., Monitoring składowiska odpadów komunalnych w Gdańsku-Szadółkach, Badania Składu Wód Podziemnych, Powierzchniowych i Odciekowych, Raport za 2007 rok, „Eko-Projekt”, Pszczyna (2007)
- [195] www.ekodolina.pl
- [196] www.sng.com.pl
- [197] www.pewik.gdynia.pl
- [198] www.sws-swarzewo.pl
- [199] www.dzialdowo.com.pl
- [200] PN-EN ISO 5667-11 Jakość wody-Pobieranie próbek-Część 11: Wytyczne dotyczące pobierania próbek wód podziemnych, Wydawnictwo Normalizacyjne (2004)
- [201] www.sigmaldrich.com
- [202] Konieczka P., Namieśnik J., Ocena i kontrola jakości wyników pomiarów analitycznych, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa (2007)

VI STRESZCZENIE

Nadrzędnym celem jaki postawiono przy planowaniu programu badawczego będącego podstawą tej rozprawy doktorskiej było opracowanie metodyk oznaczania wolnych krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksylowych (KKA) opartych na chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas lub z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym oraz sprawdzenie ich przydatności w analizie wodnych próbek rzeczywistych. Na podstawie przeprowadzonych badań określono warunki, w jakich przebiegać powinna izolacja związków z grupy KKA, a także określono najlepsze warunki rozdzielania chromatograficznego. Na podstawie uzyskanych wyników sformułowano sześć metodyk analitycznych i wyznaczono takie parametry walidacji jak: zakresy liniowości, wartości liczbowe granicy wykrywalności i oznaczalności oraz powtarzalność metodyk. Metodyki opierają się na podstawowych technikach izolacji i wzbogacania analitów z próbki wodnej tzn. tradycyjną ekstrakcją eterem metylo-*tert*-butylowym (LLE), różne warianty ekstrakcji gazem, a więc analizę fazy nadpowierzchniowej w wersji statycznej (HS), oraz mikroekstrakcję do włókna pokrytego glikolem polietylenowym (SPME), w połączeniu z techniką HS. W ramach badań dobrano również warunki analizy chromatograficznej przy zastosowaniu techniki bezpośredniego wprowadzania próbek wodnych do kolumny kapilarnej. W celu możliwości analizy próbek o dużym ładunku zanieczyszczeń, opracowano metodykę oczyszczania próbki przed wprowadzeniem jej do chromatografu gazowego, opierającą się na destylacyjnym wzbogacaniu we wcześniej zaprojektowanym aparacie. Technika ta, choć nie zapewnia wysokiego stopnia wzbogacania, umożliwia jednak skuteczne oddzielenie substancji przeszkadzających, tj. zawiesin, związków nieorganicznych oraz wielocząsteczkowych organicznych.

Zaproponowane metodyki okazały się skutecznym narzędziem do oznaczania wolnych krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksylowych w próbkach:

- ścieków pochodzących z różnych etapów oczyszczania ścieków miejskich,
- odcieku ze składowiska odpadów organicznych z ogrodu zoologicznego,
- wód powierzchniowych znajdujących się w pobliżu składowiska odpadów organicznych ogrodu zoologicznego,
- odcieku ze składowiska odpadów komunalnych,
- wodach powierzchniowych i podziemnych z okolic składowisk odpadów komunalnych,
- stałych pochodzących z oczyszczalni ścieków (osad nadmierny, kompost).

VII ABSTRACT

The main aim of research planning (being the very core of the PhD thesis) was to develop methodologies of volatile fatty acids (VFAs)' determination based on gas chromatography combined with mass spectrometry or flame ionization detection and to test their usefulness in the analysis of real aqueous samples.

Based on studies conducted the conditions of VFAs isolation have been determined as well as the best parameters of the chromatographic separation. The validation parameters were also assessed, namely: linearity range, numerical values of detection and quantification limits and methodologies' repeatability. Basic techniques of analytes' isolation and preconcentration from the aqueous samples – traditional liquid-liquid extraction with methyl-*tert*-butyl ether (LLE), different variations of gas extraction like static headspace analysis (HS) and solid phase microextraction to the fiber coated with polyethylene glycol (SPME) from sample. Also conditions of conducting chromatographic analysis when are aqueous sample, directly injected to the capillary column. In order to analyse samples with high load of other pollutants the methodology of sample clean-up - prior to introduction to the chromatographic column – has been elaborated based on distillation using special apparatus devoted for rectifying preconcentration. This technique, although doesn't assures a high preconcentration factor, enables efficient separation of interfering substances, suspended matter, inorganics and high molecular organics.

The methodologies elaborated have proved to be efficient tools enabling assessment of VFA in the samples of:

- sewage collected at different stages of municipal wastewaters treatment,
- leachates from organic wastes landfill located at zoological garden,
- surface water collecting in the vicinity of organic wastes landfill located at zoological garden,
- leachates from the municipal landfill,
- surface and underground waters located in the vicinity of municipal landfill,
- solids collected from wastewaters treatment plants (compost, sewage sludge).

VIII DOROBEK NAUKOWY

Publikacje

1. **Banel A.**, Zygmunt B., Zastosowanie połączenia mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej i chromatografii gazowej do oznaczania lotnych kwasów tłuszczowych w próbkach środowiskowych i pokrewnych, *Chem. Inż. Ekol. S*, **15**, 7-28 (2008)
2. Zygmunt B., **Banel A.**, GC-FID determination of selected volatile fatty acids in wastewater with the use of liquid-liquid extraction, *Chem. Anal.*, **54**, 339-348 (2009)
3. **Banel A.**, Zygmunt B., Lotne kwasy tłuszczowe na składowisku odpadów-występowanie i oznaczanie, *Chem. Inż. Ekol. S*, **16**, 193-206 (2009)
4. Wasielewska M., **Banel A.**, Zygmunt B., Derywatyzacja w oznaczaniu lotnych alifatycznych kwasów monokarboksylowych (LAKM), *Analityka- Nauka i Praktyka*, 21-26 (2010)

Prace objęte procesem redakcyjnym

1. **Banel A.**, Zygmunt B., Application of Gas Chromatography-Mass Spectrometry Preceded by Solvent Extraction to Determine Volatile fatty Acids in Wastewater of Municipal, Animal Farm and Landfill Origin, *Water Sci. Technol.*, (przyjęto do druku)
2. **Banel A.**, Wasielewska M., Zygmunt B., Application of headspace-solid phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry to determine short-chain alkane monocarboxylic acids in aqueous samples, *Anal. Bioanal. Chem.*, (przyjęto do druku)
3. **Banel A.**, Wasielewska M., Felchner-Żwirełło M., Zygmunt B., Determination of volatile fatty acids in leachates from ZOO organic waste piles by headspace – gas chromatography – flame ionization detection, *Water Sci. Technol.* (przyjęto do druku)
4. **Banel A.**, Jakimska A., Wasielewska M., Wolska L., Zygmunt B., Determination of SCFAs in water using GC-FID. Selection of the separation system., *Anal Chim Acta* (po recenzjach)

Publikacje w przygotowaniu

1. **Banel A.**, Jakimska A., Wasielewska M., Zygmunt B., Application of distillation followed by gas chromatography to determine volatile fatty acids in highly polluted wastewater and sewage sludge;
2. **Banel A.**, Zygmunt B., Chromatografia gazowa z oznaczaniem krótkołańcuchowych kwasów alkanomonokarboksylowych w próbkach stałych i ciekłych.

Rozdział w opracowaniu książkowym

1. Zygmunt B., **Banel A.**, Chapter 1: Strategy of collecting samples from aquatic environment, Analytical measurements in aquatic environments, red.: Namieśnik J., Szefer P., CRC Press Edition Office, 1-18 (2010)

Artykuły opublikowane w całości w materiałach konferencyjnych

1. Zygmunt B., **Banel A.**, Occurrence and gas chromatographic determination of volatile fatty acids in landfill leachate. The case of two landfills in Gdansk Pomerania, Poland, WSEAS, Conference Environmental And Geological Science And Engineering, 11-13.09.2008, Malta, (WSEAS Press), 167-170

2. Zygmunt B., **Banel A.**, Formation, occurrence and determination of volatile fatty acids in environmental and related samples, Proceedings of the 3rd WSAS International conference on Renewable Energy Sources (RES 09): Proceedings of the 3rd WSEAS International Conference on WASTE Mangement Water Pollution, Air Pollution, Indoor Climate (WWAI 09), 01-03.07.2009, Teneryfa, Hiszpania, (WSEAS Press), 476-481

3. Zygmunt B., **Banel A.**, Occurrence and Determination of Volatile Fatty Acids in Wastewater of Different Origin, Progress in Environmental Science and Technology: Proceedings of the 2009 International Symposium on Environmental Science and Technology, 02-05.06.2009, Shanghai, Chiny, (Science Press – II), 1142-1149

4. **Banel A.**, Wasielewska M., Zygmunt B., Application of headspace-solid phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry to determine short-chain monocarboxylic acids in cattle farm wastewater and waste landfill leachates, Proceedings of the 2010 International Conference on Environmental Science and Technology, 23-25.04.2010, Bangkok, Tajlandia, (ICEST - Singapore: Research Publishing Services), 80-84

5. Zygmunt B., **Banel A.**, Determination of volatile fatty acids in municipal wastewater and leachates from sewage sludge allotments and compost piles using direct aqueous injection gas chromatography preceded by distillation based sample cleanup, Proceedings of the 2010 International Conference on Environmental Science and Technology, 23-25.04.2010, Bangkok, Tajlandia, (ICEST - Singapore: Research Publishing Services), 85-89

6. Wasielewska M., **Banel A.**, Zygmunt B., Application of static headspace gas chromatography for routine analysis of VFAs in cattle farm wastewater, 13th International

Symposium of Students and Young Mechanical Engineers : "Advances in Chemical and Mechanical Engineering", 20-22.05.2010, Gdańsk, (GUT) 369-374

7. Godlewska S., Faniband M., Wasielewska M., **Banel A.**, Zygmunt B., SPME as a method of sample preparation for GC analysis of VFAs, 13th International Symposium of Students and Young Mechanical Engineers : "Advances in Chemical and Mechanical Engineering", 20-22.05.2010, Gdańsk, (GUT) 122-128

8. Zygmunt B., **Banel A.**, Wasielewska M., Felchner-Żwirełło M., Studies on development of headspace - gas chromatographic determination of volatile fatty acids in troublesome environmental samples, 2010 International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (ICCCE 2010), 01-03.08.2010, Kyoto, Japonia, (IEEE), 281-284

Doniesienia konferencyjne

a). postery

1. **Banel A.**, Hrecka-Procińska K., Zygmunt B., Studies on development of solvent extraction based GC-MS determination volatile fatty acids (C₂-C₈) in some wines, Materiały: 13th International Symposium on Separation Sciences, 27-29.06.2007, Štrbské Pleso, Słowacja, (CD-ROM) M10

2. **Banel A.**, Zygmunt B., Występowanie i oznaczanie monokarboksyłowych kwasów tłuszczowych w wodnych próbkach środowiskowych za pomocą GC, 50 Jubileuszowy Zjazd PTChem oraz SITPChem „Chemistry, Environment & Human Activity in Civilization Development”, 09-12.09.2007, Toruń, s. 231

3. **Banel A.**, Zygmunt B., Gas chromatographic- mass spectrometric determination of volatile fatty acids in municipal and animal farm wastewater, Materiały: 35th International Symposium on Environmental Analytical Chemistry, 22-26.06.2008, Gdańsk, s. 142

4. **Banel A.**, Zygmunt B., Development of a gas chromatographic procedure for determination of volatile fatty acids in environmental samples, Materiały: 14th International Symposium on Separation Sciences, 30.09-3.10.2008, Primošten, Chorwacja, s. 45

5. **Banel A.**, Opracowanie i porównanie chromatograficznych metodyk oznaczania krótkołańcuchowych alifatycznych kwasów monokarboksyłowych w wodnych próbkach środowiskowych, Materiały: Seminarium Politechnika Gdańska- uniwersytet przedsiębiorczy XXI wieku, 24-25.05.2010, Gdańsk, s. 7

6. **Banel A.**, Wasielewska M., Zygmunt B., Oznaczanie KAKM z wykorzystaniem bezpośredniego dozowania do chromatografu gazowego rzeczywistej próbki wodnej lub

po jej rektyfikacji, Materiały: VIII Polska Konferencja Chemii Analitycznej: Analityka dla Społeczeństwa XXI wieku, 04-09.07.2010, Kraków, s. 298

7. Wasielewska M., **Banel A.**, Zygmunt B., Oznaczanie krótkołańcuchowych alifatycznych kwasów monokarboksylowych w ściekach z hodowli bydła za pomocą połączenia analizy fazy nadpowierzchniowej i chromatografii gazowej, Materiały: VIII Polska Konferencja Chemii Analitycznej: Analityka dla Społeczeństwa XXI wieku, 04-09.07. 2010, Kraków, s. 392

8. **Banel A.**, Wasielewska M., Zygmunt B., Comparison of gas chromatographic procedures of determination of short- chain alkanomonocarboxylic acids in the aqueous samples based on different sample preparation techniques, Materiały: ExTech 2010 : 12th International Symposium on Advances in Extraction Technologies, 20-22.09.2010, Poznań, s. 83-84

b). wystąpienia ustne

1. **Banel A.**, Opracowanie metodyk oznaczania monokarboksylowych kwasów tłuszczowych w próbkach środowiskowych, Materiały: Sesji Sprawozdawczej Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej, 24-25.09.2007, Gdańsk, s. 40

2. Zygmunt B., **Banel A.**, Gas chromatography in the determination of volatile fatty acids in environmental samples. Problems and challenges, Materiały: 5th International Conference on Instrumental Methods of Analysis – Modern Trends and Applications (IMA 007), 30.09-04.10.2007, Patras, Grecja, s.179

3. **Banel A.**, Zygmunt B., Oznaczanie lotnych kwasów tłuszczowych w próbkach środowiskowych za pomocą GC-MS, Materiały: LI Zjazd PTChem i SITPChem, 07-11.09.2008, Opole, s. 96

4. **Banel A.**, Zastosowanie techniki ekstrakcji ciecz-ciecz do oznaczania lotnych kwasów tłuszczowych w różnych próbkach środowiskowych, Materiały: Sesja Sprawozdawcza Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej, 22-23.09.2008, Gdańsk, s. 38

5. Zygmunt B., **Banel A.**, Occurrence and gas chromatographic determination of volatile fatty acids in landfill leachate. The case of two landfills in Gdansk Pomerania, Poland, Materiały: WSEAS, Conference Environmental and Geological Science and Engineering, 11-13.09.2008, Malta, s. 167-170

5. Zygmunt B., **Banel A.**, Występowanie i oznaczanie krótkołańcuchowych kwasów monokarboksylowych w ściekach różnego pochodzenia, Materiały: **ECOpole'08, Substancje Chemiczne w Środowisku Przyrodniczym, 23 – 25.10.2008, Szklarska Poręba, s. 44**
6. Zygmunt B., **Banel A.**, Zaborowska A., Occurrence and Determination of Volatile Fatty Acids in Wastewater of Different Origin, Materiały: Progress in Environmental Science and Technology: Proceedings of the 2009 International Symposium on Environmental Science and Technology, 02-05.06.2009, Shanghai, Chiny, s. 1142-1149
7. Zygmunt B., **Banel A.**, Formation, occurrence and determination of volatile fatty acids in environmental and related samples, Proceedings of the 3rd WSAS International conference on Renewable Energy Sources (RES 09): Proceedings of the 3rd WSEAS International Conference on WASTE Mangement Water Pollution, Air Pollution, Indoor Climate (WWAI 09), 01-03.07.2009, Teneryfa, Hiszpania, (WSEAS Press), s. 476-481
8. **Banel A.**, Zygmunt B., Oznaczanie niskocząsteczkowych kwasów monokarboksylowych w próbkach wodnych z wykorzystaniem techniki HS-SPME-GC-MS, Materiały: 52 Zjazd PTChem i SITPChem, 12-16.09.2009, Łódź, s. 174
9. **Banel A.**, Opracowanie metodyk oznaczeń niskocząsteczkowych alkilowych kwasów monokarboksylowych w próbkach wodnych z wykorzystaniem technik: HS-GC-FID, HS-SPME-GC-FID, DAI-GC-FID, DESTYLACJA-GC-FID, Materiały: Sesja Sprawozdawcza Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej, 21-22.09.2009, Gdańsk, s. 48
10. **Banel A.**, Wasielewska M., Zygmunt B., Application of headspace-solid phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry to determine short-chain monocarboxylic acids in cattle farm wastewater and waste landfill leachates, Materiały: Proceedings of the 2010 International Conference on Environmental Science and Technology, 23-25.04.2010, Bangkok, Tajlandia, (ICEST - Singapore: Research Publishing Services), s. 80-84
11. Zygmunt B., **Banel A.**, Determination of volatile fatty acids in municipal wastewater and leachates from sewage sludge allotments and compost piles using direct aqueous injection gas chromatography preceded by distillation based sample cleanup, Materiały: Proceedings of the 2010 International Conference on Environmental Science and Technology, 23-25.04.2010, Bangkok, Tajlandia, (ICEST - Singapore: Research Publishing Services), s. 85-89

12. Wasielewska M., **Banel A.**, Zygmunt B., Application of static headspace gas chromatography for routine analysis of VFAs in cattle farm wastewater, *Materiały:13th International Symposium of Students and Young Mechanical Engineers: "Advances in Chemical and Mechanical Engineering"*, 20-22.05.2010, Gdańsk, (GUT) s. 369-374
13. Godlewska S., Faniband M., Wasielewska M., **Banel A.**, Zygmunt B., SPME as a method of sample preparation for GC analysis of VFAs, *Materiały: 13th International Symposium of Students and Young Mechanical Engineers : "Advances in Chemical and Mechanical Engineering"*, 20-22.05.2010, Gdańsk, (GUT) s. 122-128
14. Zygmunt B., **Banel A.**, Wasielewska M., Połączenie mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej i chromatografii gazowej: Wygodny sposób oznaczenia alifatycznych kwasów monokarboksylowych w silnie obciążonych mediach wodnych, *Materiały: VIII Polska Konferencja Chemii Analitycznej: Analityka dla Społeczeństwa XXI wieku*, 04-09.07.2010, Kraków, s. 274
15. Zygmunt B., **Banel A.**, Wasielewska M., Felchner-Żwirełło M., Studies on development of headspace - gas chromatographic determination of volatile fatty acids in troublesome environmental samples, *Materiały: 2010 International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (ICCCE 2010)*, 01-03.08.2010, Kyoto, Japonia, (IEEE), s. 281-284

Przyznane granty i stypendia

1. Projekt badawczy własny nr N N523 230535 na realizację projektu badawczego pt.: „Problemy występowania lotnych kwasów tłuszczowych- opracowanie metodyk chromatograficznego oznaczania na różnych etapach procesu oczyszczania” przyznany w ramach 35 konkursu na projekty badawcze na podstawie decyzji Ministra Nauki i Informatyzacji nr 2305/B/T02/2008/35(kierowanym przez prof. Bogdana Zygmunta, w którym jestem głównym wykonawcą)
2. Stypendium za wyniki w nauce przyznane ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego, Budżetu Państwa i Budżetu Województwa Pomorskiego w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki Priorytetu VIII, działanie 8.2, poddziałanie 8.2.2 Regionalne Strategie Innowacyjności", projektu systemowego Województwa Pomorskiego "**InnoDoktorant - stypendia dla doktorantów, II edycja**", 1.12.2009-30.07.2010
3. Stypendium za wyróżniający się dorobek naukowy z Własnego Funduszu Stypendialnego Rektora PG za okres: III-VII. 2008r., X. 2008 - VII. 2009r., XII. 2009 - VII. 2010r.

Inne osiągnięcia

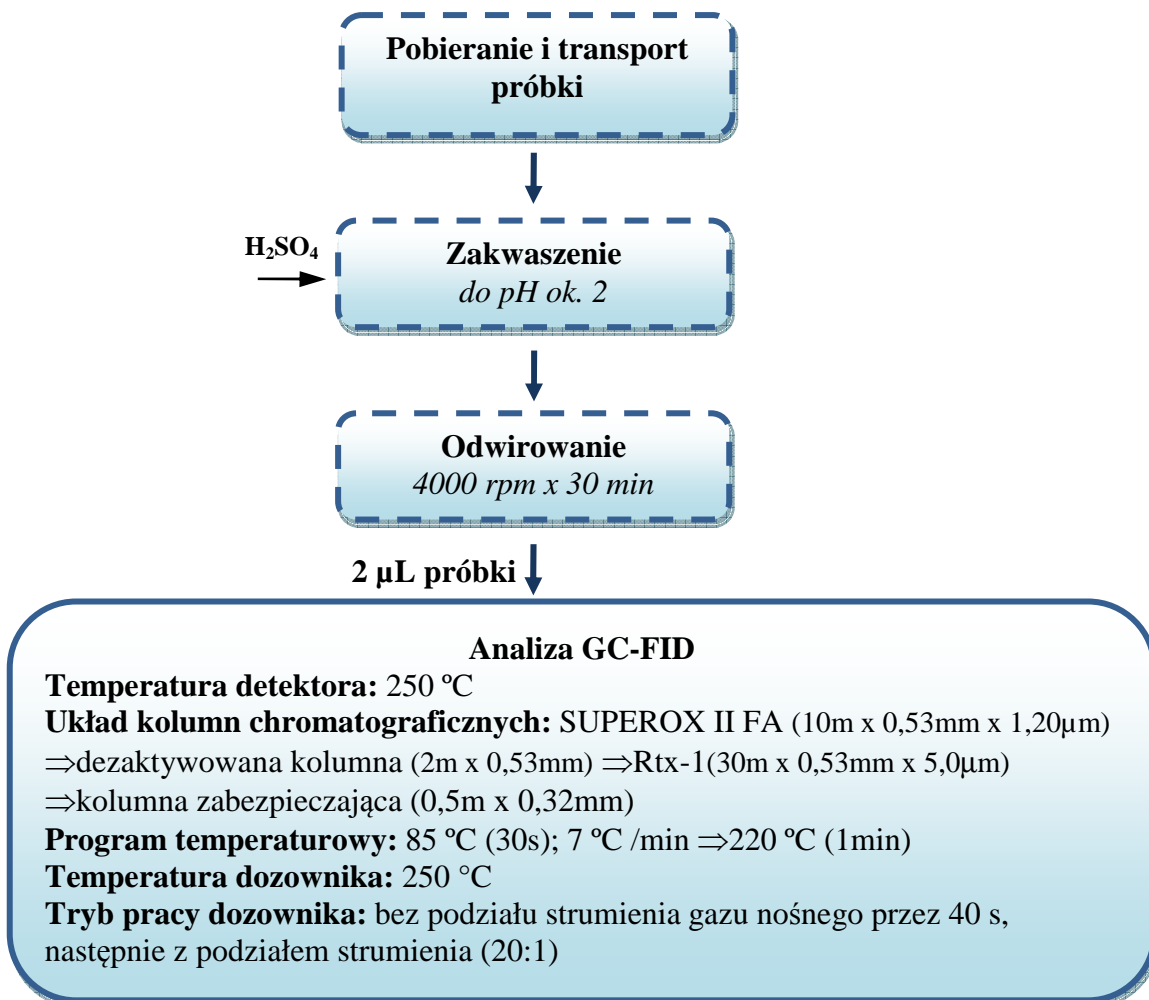
Prowadzenie kursu „Aspekty praktyczne wykorzystania Chromatografii Gazowej” przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej, ćwiczenie: Problemy identyfikacji związków przy zastosowaniu układu GC-MS (SCAN, SIM, indeksy retencji), 05-09.02. i 02.06.07.2007, 07-11.07.2008, 06-10.07.2009, 20-24.09.2010, Gdańsk.

Prowadzenie kursu „Przygotowania próbek do analizy” przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej, ćwiczenie: Oznaczanie LKT w próbkach środowiskowych z wykorzystaniem LLE na etapie przygotowania próbek oraz GC na etapie oznaczeń końcowych, 26-27.09.2008, Gdańsk.

Funkcja sekretarza programu Erasmus-Mundus w roku akademickim 2009/2010

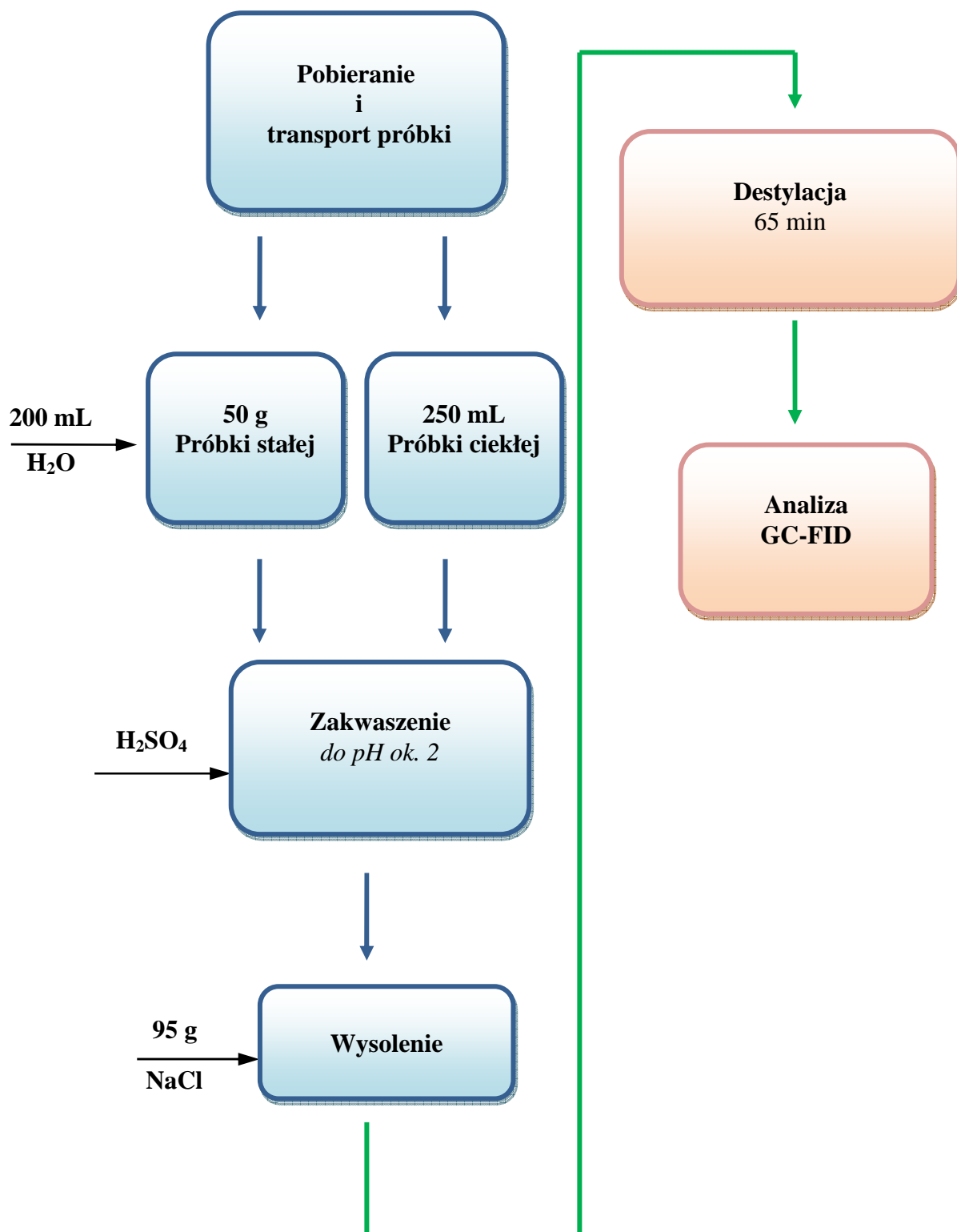
ZAŁĄCZNIK 1

Schemat blokowy metodyki oznaczania związków z grupy KKA w wodnych próbkach z wykorzystaniem techniki GC-FID.



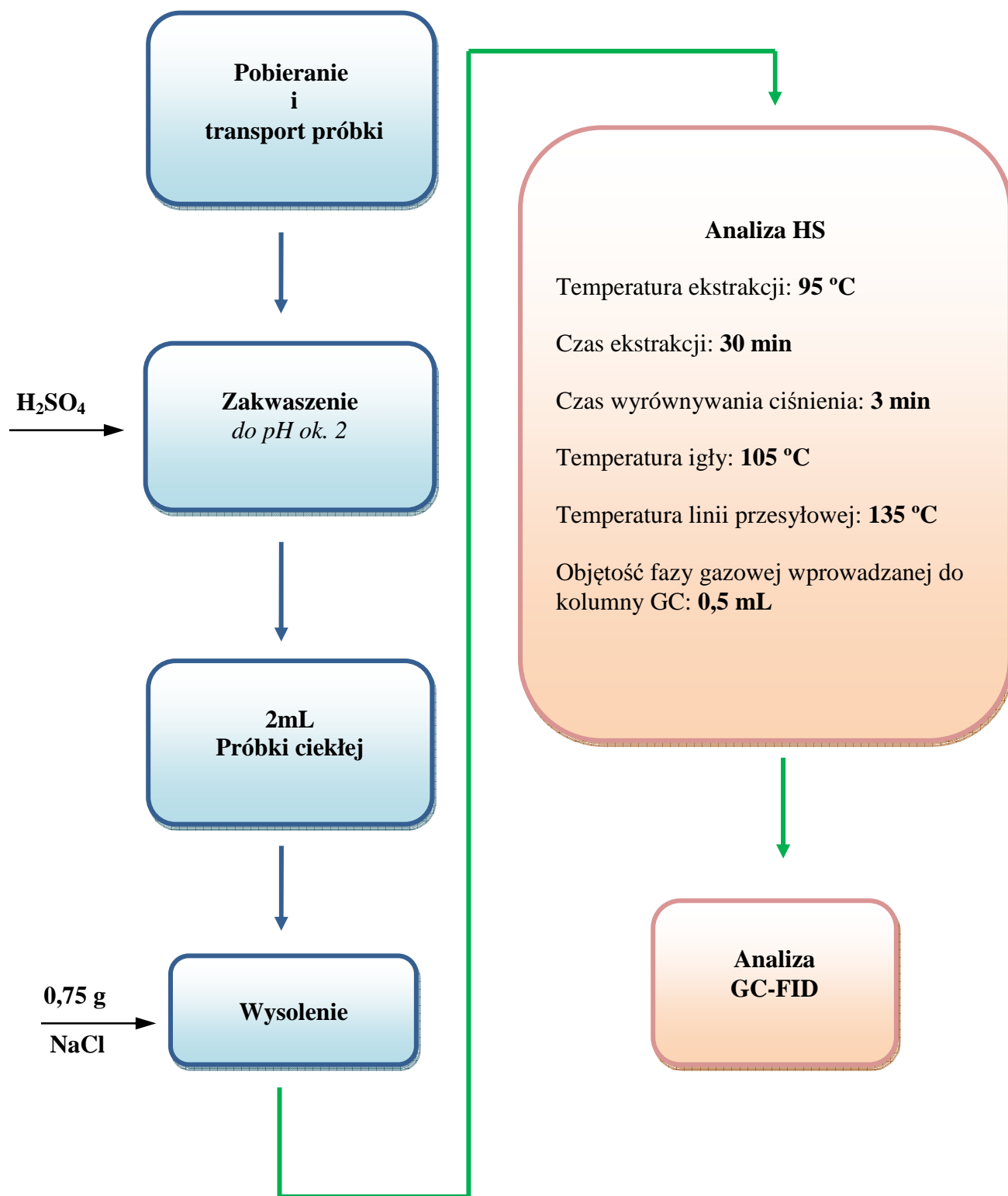
ZAŁĄCZNIK 2

Schemat blokowy metodyki oznaczania związków z grupy KKA w wodnych próbkach z wykorzystaniem techniki Destylacji-GC-FID.



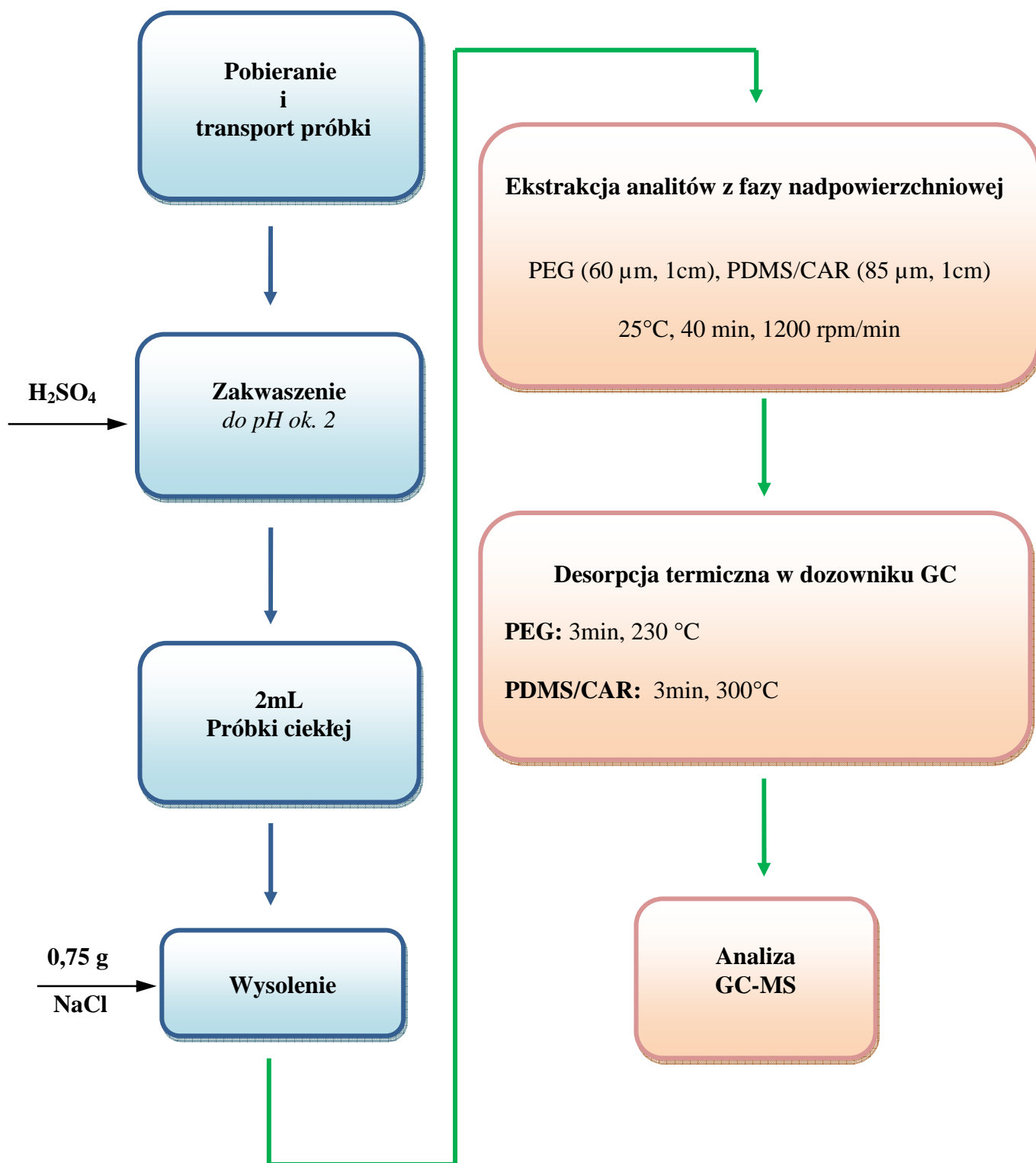
ZAŁĄCZNIK 3

Schemat blokowy metodyki oznaczania analitów z grupy KKA w próbkach wodnych z wykorzystaniem techniki HS-GC-FID.



ZAŁĄCZNIK 4

Schemat blokowy metodyki oznaczania związków z grupy KKA w wodnych próbkach z wykorzystaniem techniki HS-SPME-GC-MS.



ZAŁĄCZNIK 5

Schemat blokowy metodyki oznaczania związków z grupy KKA w wodnych próbkach z wykorzystaniem techniki LLE-GC-MS.

