

Agnieszka RODAK, Małgorzata BEBEK, Aleksandra STRUGAŁA-WILCZEK

Główny Instytut Górnictwa w Katowicach, Zakład Monitoringu Środowiska
Laboratorium Analiz Wód i Ścieków, pl. Gwarków 1, 40-166 Katowice
e-mail: arodak@gig.eu

Ocena przydatności półautomatycznej metody oznaczania azotu Kjeldahla w ciekłych próbkach środowiskowych

Ciągły rozwój metod analitycznych, zmierzający do uzyskania najbardziej miarodajnych wyników pomiarów, jest obowiązkiem każdego laboratorium badawczego, realizującego prace związane z ochroną i oceną stanu środowiska naturalnego. Celem przedstawionych badań jest praktyczna ocena przydatności specjalistycznego zestawu do oznaczania azotu metodą Kjeldahla w ciekłych próbkach środowiskowych o zróżnicowanym i nietypowym składzie fizykochemicznym. Proponowana wieloetapowa procedura oznaczania azotu metodą Kjeldahla obejmuje proces mineralizacji próbki, destylację otrzymanego mineralizatu oraz oznaczanie analitu w produkcie końcowym. W badaniach zastosowano zestaw szwajcarskiej firmy Büchi, składający się z pieca do mineralizacji Speed Digester K-436, destylarki Klej Flex K-360 oraz neutralizatora oparów (skrubera) B-414. Końcowe oznaczenie analitu prowadzono techniką wstrzykowej analizy przepływowej z dyfuzją gazową oraz detekcją spektrofotometryczną. Przeprowadzone dla roztworów wzorcowych oraz dla próbek środowiskowych pochodzących z różnych gałęzi przemysłu badania miały na celu optymalizację warunków pomiarowych i określenie wartości podstawowych cech jakościowych i ilościowych metody. Poprawność wyników otrzymanych za pomocą opracowanej procedury określono na podstawie badania odzysku azotu m.in. w ściekach socjalno-bytowych, komunalnych oraz w odciekach pochodzących z procesu podziemnego zgazowania węgla. Uzyskane wyniki badań potwierdziły przydatność zaproponowanej procedury pomiarowej do oznaczania azotu Kjeldahla zarówno w rutynowej praktyce laboratoryjnej, jak i w badaniach monitoringowych nietypowych procesów technologicznych. Automatyzacja procesu analitycznego zwiększa efektywność oznaczeń przy jednoczesnym zachowaniu dobrej powtarzalności, dokładności i wiarygodności wyników.

Słowa kluczowe: azot Kjeldahla, ścieki, podziemne zgazowanie węgla, wstrzykowa analiza przepływowa

Wstęp

Azot, jako jeden z kluczowych składników mineralnych, jest niezbędny w środowisku organizmów żywych. W wodach występuje głównie w formie rozpuszczonej nieorganicznej (azot amonowy, azotyny i azotany) i organicznej (amino-kwasy, peptydy) oraz cząstek nieorganicznych i organicznych (glony, bakterie) [1].

Azot Kjeldahla, oznaczany jako TKN (*Total Kjeldahl Nitrogen* - całkowity azot Kjeldahla), stanowi sumę azotu amonowego oraz azotu organicznego. Obecność jonów amonu w wodach powierzchniowych spowodowana jest głównie biochemicznym rozkładem organicznych związków azotowych roślinnych lub zwierzę-

cych, natomiast źródłem azotu organicznego są obumarłe szczątki roślin i zwierząt żyjących w wodzie [2]. W wodach podziemnych amoniak powstaje poprzez redukcję azotynów i azotanów przez siarkowodór czy inne związki redukujące [2].

Nadmiar azotu w zbiornikach wodnych prowadzi do dużego zużycia tlenu, co może skutkować śnięciem ryb czy zanikiem samooczyszczania wód stojących [3]. W przemyśle rafineryjnym obecność związków azotu powoduje obniżenie lub całkowite zablokowanie aktywności katalizatorów, może również być główną przyczyną powstawania nierozpuszczalnych osadów w paliwie [4]. W wodach użytkowych jony amonu przyspieszają korozję rur wodociągowych, przeszkadzają także w procesie chlorowania wody [2].

Zawartość azotu Kjeldahla w wodach środowiskowych jest określona w aktach prawnych z zakresu gospodarki wodno-ściekowej, co zobowiązuje laboratoria badawcze, zajmujące się oceną stanu środowiska naturalnego, do uzyskiwania jak najbardziej miarodajnych wyników pomiarów w tym zakresie. Oznaczanie azotu metodą Kjeldahla w wodach i ściekach jest metodą specyficzną, zakładającą wieloetapową procedurę oznaczania danego wskaźnika, stosowaną do monitorowania i oceny stanu środowiska naturalnego. Złożoność metodyki badawczej nieodłącznie jest związana ze zwiększonym ryzykiem obciążenia wyniku błędem powstałym na etapie wykonywania oznaczenia.

Celem przedstawionych badań była zarówno optymalizacja warunków pomiarowych i określenie wartości podstawowych cech jakościowych i ilościowych metody, jak również praktyczna ocena przydatności specjalistycznego zestawu do oznaczania azotu metodą Kjeldahla w ciekłych próbkach środowiskowych o zróżnicowanym i nietypowym składzie fizykochemicznym. Proponowana procedura oznaczania azotu metodą Kjeldahla obejmuje proces mineralizacji próbki, destylację otrzymanego mineralizatu oraz oznaczanie analitu w produkcie końcowym z zastosowaniem wstrzykowej analizy przepływowej (FIA) z detekcją spektrofotometryczną.

1. Materiały i metoda badań

W badaniach wykorzystano zestaw do oznaczania azotu metodą Kjeldahla, złożony z pieca do mineralizacji Speed Digester K-436, destylarki Kjel Flex K-360 oraz neutralizatora oparów (skruber) B-414 (Büchi, Szwajcaria). Zaproponowana metoda wykorzystuje schemat operacyjny zgodny z normą PN-EN 25663:2001 „Jakość wody. Oznaczanie azotu Kjeldahla. Metoda po mineralizacji z selenem” [5]. Stężenie analitu w otrzymanym destylacie oznaczano z zastosowaniem wstrzykowego analizatora przepływowego FIAmodula (Medizin und Labortechnik Engineering GmbH, Niemcy) z detekcją spektrofotometryczną i dyfuzją gazową.

W wieloetapowej procedurze oznaczania azotu metodą Kjeldahla badaną próbkę poddawano procesowi mineralizacji, w którym następowała przemiana związków azotu do siarczanu amonu za pomocą stężonego kwasu siarkowego w obecności mieszaniny katalitycznej (mieszanina siarczanu potasu i siarczanu miedzi).

Mineralizat następnie poddawano procesowi destylacji, podczas którego w środowisku silnie zasadowym z siarczanu amonu uwalniany był amoniak w końcowym etapie oznaczany spektrofotometrycznie przy długości fali 590 nm za pomocą wstrzykowego analizatora przepływowego [5].

Uzyskane wyniki, wyrażone w jednostce stężenia jonów amonu (mg/l NH_4^+), przeliczano na zawartość azotu Kjeldahla (TKN) z zastosowaniem poniższego wzoru:

$$\text{TKN} = (c_{\text{pr}} - c_0) \cdot f \cdot 0,7765$$

gdzie:

- c_{pr} - stężenie jonów amonu w badanej próbce, mg/l,
 c_0 - stężenie jonów amonu w próbce ślepej, mg/l,
 f - współczynnik przeliczeniowy wynikający ze stosunku objętości otrzymanego destylatu do objętości mineralizowanej próbki (tab. 1),
0,7765 - przelicznik mg jonu NH_4^+ na mg atomu azotu.

Tabela 1. Współczynniki przeliczeniowe dla poszczególnych objętości mineralizowanej próbki

Table 1. The conversion factors for each volumes of mineralized sample

Objętość próbki do mineralizacji, ml	f
100	1,5
50	3,0
25	6,0

Stosowane w badaniach roztwory zostały sporządzone wyłącznie z odczynników klasy cz.d.a. lub lepszej oraz wody dejonizowanej o przewodności elektrycznej właściwej poniżej $1 \mu\text{S/cm}$. Roztwory wzorcowe sporządzono z roztworu o certyfikowanej zawartości azotu Kjeldahla $1000 \pm 15,3 \text{ mg/l}$ (Sigma Aldrich, USA).

Przedmiot badań stanowiły ciekłe próbki środowiskowe pochodzące z różnych gałęzi przemysłu, w tym z procesu podziemnego zgazowania węgla szeroko opisanego w światowej literaturze [7-10], charakteryzujące się dużą zmiennością matrycy. Próbki bezpośrednio po pobraniu utrwalano stężonym kwasem siarkowym do pH poniżej 2 i przechowywano w temperaturze $2 \pm 6^\circ\text{C}$ aż do czasu przeprowadzenia analizy [5], jednak nie dłużej niż 14 dni.

2. Wyniki badań

Zakres roboczy wykonania oznaczenia określono na podstawie pomiarów przeprowadzonych dla 4 niezależnych oznaczeń analitu w roztworach wzorcowych na sześciu poziomach stężeń (0,5 mg/l, 1 mg/l, 2,5 mg/l, 20 mg/l, 50 mg/l, 100 mg/l)

azotu Kjeldahla (TKN). W przypadku metody z mineralizacją oraz końcową detekcją spektrofotometryczną przyjęto zakres roboczy stężeń od 0,5 do 100 mg/l TKN, ponieważ w tym zakresie spełnione były wymagania podstawowych parametrów ilościowych metody (precyzja, dokładność). Przy wyższych stężeniach próbkę odpowiednio rozcieńczano wodą dejonizowaną.

Granice oznaczalności metody, określoną jako dziesięciokrotną wartość odchylenia standardowego średniej, wyrażoną w jednostkach pomiaru, wyznaczono na podstawie analizy próbek ślepych, które mineralizowano w objętości 100 ml. Jako granicę oznaczalności przyjęto wartość 0,5 mg/l.

Precyzję metody w warunkach powtarzalności określono na podstawie wartości obliczonego współczynnika zmienności I (%). W tym celu przeprowadzono pomiary stężenia azotu Kjeldahla dla roztworów wzorcowych na sześciu poziomach stężeń oraz dla próbek rzeczywistych o zróżnicowanej matrycy (woda powierzchniowa, odciek ze składowiska, ścieki z procesu podziemnego zgazowania węgla, ścieki socjalno-bytowe oraz komunalne). Dla każdej próbki rzeczywistej oraz roztworu wzorcowego przeprowadzono po cztery niezależne oznaczenia analitu. Wartość współczynnika zmienności metody przy końcowej detekcji spektrofotometrycznej wynosi maksymalnie 10,8% dla roztworów wzorcowych i 9,1% dla próbek rzeczywistych (tab. 2).

Tabela 2. Wybrane parametry walidacji proponowanej metody

Table 2. Some validation parameters for the proposed method

Parametr	Wartość
Zakres roboczy mg/l TKN	0,5÷100
Granica oznaczalności mg/l TKN	0,5
Precyzja w warunkach powtarzalności %	1,0÷10,8 (roztwory wzorcowe) 9,1 (woda powierzchniowa) 0,92÷5,6 (odciek ze składowiska, ścieki komunalne i socjalno-bytowe) 1,1÷8,8 (ścieki z podziemnego zgazowania węgla)
Odzysk %	85÷109 (odciek ze składowiska, ścieki komunalnei socjalno-bytowe) 84÷115 (ścieki z podziemnego zgazowania węgla)

Poprawność metody wyznaczono, analizując po trzy niezależnie przygotowane porcje próbek rzeczywistych o zróżnicowanej matrycy wzbogacone analitem. Jako miarę poprawności przyjęto procentową wartość odzysku wzorca, która w analizowanych próbkach mieściła się w przedziale od 84 do 115% (tab. 2).

Optymalne warunki pomiarowe zestawu stosowane do oznaczania azotu metodą Kjeldahla przedstawia tabela 3.

Tabela 3. Warunki pomiarowe zestawu do oznaczania azotu Kjeldahla

Table 3. Measurement condition for Kjeldahl nitrogen set

Stężenie azotu Kjeldahla mg/l TKN	Objętość próbki do mineralizacji ml	Całkowity czas mineralizacji min
< 20	100	ok. 100
20÷50	50	ok. 70
50÷100	25	ok. 70

Dla wybranych próbek środowiskowych o skomplikowanej matrycy (ścieki z podziemnego zgazowania węgla, ścieki komunalne i socjalno-bytowe) zastosowano metodę wielokrotnego dodatku wzorca, dodając do kilku porcji próbki rzeczywistej znaną, zwiększającą się ilość analitu.

Wykorzystane w badaniach próbki ścieków po zgazowaniu węgla stanowią szczególnie nietypową matrycę (tab. 4). W składzie fizykochemicznym zawierają przede wszystkim związki aromatyczne, takie jak: benzen, toluen, etylobenzen, ksyleny, fenole oraz wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, a także inne liczne zanieczyszczenia [6].

Tabela 4. Skład fizykochemiczny przykładowej próbki ścieków po procesie podziemnego zgazowania węgla

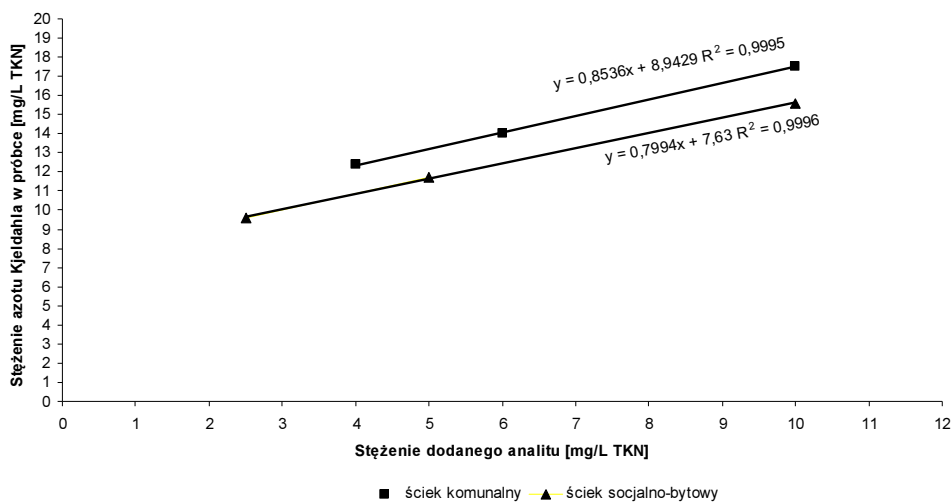
Table 4. Physicochemical composition of wastewater sample from underground coal gasification (example)

Parametr	Jednostka	Wartość
odczyn pH	-	8,1
przewodność elektryczna właściwa	μS/cm	8540
azotyny	mg/l	< 8
chlorki	mg/l	2,45
siarczany	mg/l	200
jony amonu	mg/l	1600
ChZT-Cr	mg/l	10 700
azot ogólny	mg/l	1700
fenole lotne	mg/l	2000
cyjanki całkowite	mg/l	5,7
siarczki	mg/l	0,19
RWO	mg/l	3200

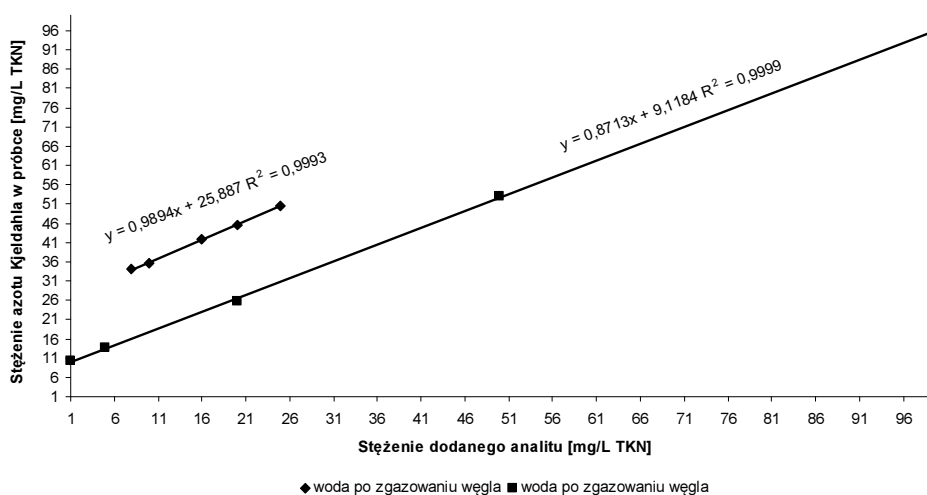
W próbkach ścieków po zgazowaniu węgla odzysk wzorca mieścił się w granicach od 84 do 115%, natomiast dla pozostałych ścieków wynosił od 85 do 109%. Dodatkowo, dla każdej analizowanej próbki zbadano liniowość zależności oznaczonego stężenia azotu Kjeldahla od stężenia dodanego wzorca oraz obliczono wartość współczynnika regresji R (rys. 1). W większości przypadków wartość współczynnika regresji wynosiła > 0,999, co pozwala wnioskować z dużą dozą

pewności, że nie występują interferencje o charakterze multiplikatywnym (nieaddytywnym), mogące zakłócać poprawność wyniku.

a)



b)



Rys. 1. Wykres zależności stężenia azotu Kjeldahla w próbce rzeczywistej od stężenia dodanego analitu: a) próbki ścieków komunalnych i socjalno-bytowych, b) próbki ścieków po podziemnym zgazowaniu węgla

Fig. 1. The graphical relationships between the concentration of Kjeldahl nitrogen in natural sample of additive concentration of the analyte: a) domestic sewage and municipal waste, b) wastewater after underground coal gasification

Poprawność metody określono również na podstawie wyników międzynarodowych porównań międzylaboratoryjnych oraz badań biegłości (tab. 5). W porówna-

niach międzylaboratoryjnych organizowanych przez RTC (liczba uczestników - 50) uzyskano wynik poprawny (wskaźnik *Z-score* wynosił $-0,90$) obarczony błędem na poziomie 10% względem wartości prawdziwej. Z kolei w badaniach biegłości organizowanych przez LGC Standards (liczba uczestników - 68) również uzyskano wynik poprawny (wskaźnik *Z-score* wynosił $-0,91$), a błąd względny wyniósł 9%.

Tabela 5. Wyniki porównań międzylaboratoryjnych/badań biegłości dla oznaczenia azotu metodą Kjeldahla

Table 5. Results of interlaboratory comparisons/proficiency testing for the determination of Kjeldahl nitrogen

Organizator porównań międzylaboratoryjnych / badań biegłości	Wartość prawdziwa mg/l	Wartość średnia uzyskana w laboratorium mg/l	<i>Z-score</i>	Błąd względny %
RTC, 2013	5,34	4,8	$-0,90$	10
LGC Standards, 2013	24,2	22,0	$-0,91$	9,1

Podsumowanie i wnioski

Przeprowadzone badania pozwoliły na dobranie optymalnych warunków pomiarowo-analitycznych oznaczania azotu Kjeldahla w wodach i ściekach za pomocą półautomatycznego zestawu oraz z zastosowaniem końcowej detekcji spektrofotometrycznej. Dobrano sposób przygotowania i postępowania z próbkami. Zoptymalizowano warunki pomiarowo-analityczne, takie jak odpowiedni czas mineralizacji, warunki destylacji, jak również roboczy zakres wykonania oznaczenia, obejmujący stężenie azotu Kjeldahla od 0,5 do 100 mg/l TKN. Ustalono maksymalną objętość próbki do mineralizacji wynoszącą 100 ml. Potwierdzono spełnienie wymagań stawianych metodzie analitycznej, wyznaczając wartości niezbędnych cech charakterystycznych proponowanej metody, takie jak granica oznaczalności, precyzja, poprawność.

Zastosowanie metody wielokrotnego dodatku wzorca w przypadku próbek ścieków o skomplikowanej matrycy wykazało liniową zależność oznaczonego stężenia azotu Kjeldahla od stężenia dodanego wzorca (współczynnik korelacji *R* lepszy niż 0,999), co praktycznie dowodzi, iż nie występują interferencje o charakterze multiplikatywnym.

Automatyzacja procesu analitycznego zwiększa efektywność oznaczeń przy jednoczesnym zachowaniu dobrej powtarzalności, dokładności i wiarygodności wyników, także badania przeprowadzone dla próbek o skomplikowanej matrycy (np. odcieków pochodzących z procesu podziemnego zgazowania węgla oraz ścieków socjalno-bytowych i komunalnych) potwierdziły przydatność zaproponowanej wieloetapowej procedury pomiarowej do oznaczania azotu Kjeldahla nie tylko w rutynowej praktyce laboratoryjnej, lecz również w przypadku monitorowania nietypowych procesów technologicznych. Wdrożenie do praktyki laboratoryjnej tej nowoczesnej metodyki z zastosowaniem półautomatycznego zestawu pozwoli

spełniać wymagania prawne zarówno w odniesieniu do metod referencyjnych, jak i podstawowych cech ilościowych metody analitycznej.

Literatura

- [1] Camping-Falco P., Meseguer-Lloret S., Climent-Santamaria T., Molins-Legua C., A microscale Kjeldahl nitrogen determination for environmental water, *Talanta* 2008, 75, 1123-1126.
- [2] Hermanowicz W., Dojlido J., Dożańska W., Koziorowski B., Zerze J., Fizyczno-chemiczne badanie wody i ścieków, Arkady, Warszawa 1999.
- [3] Klaczyński E., Oczyszczalnia ścieków - biologiczne usuwanie azotu, *Miesięcznik Wodociągi - Kanalizacja* 2012, 12(106).
- [4] Pavlova A.I., Dobrev D.S., Ivanova P.G., Determination of total nitrogen content by different approaches in petroleum matrices, *Fuel* 2009, 88, 27-30.
- [5] PN-EN 25663:2001 Jakość wody. Oznaczanie azotu Kjeldahla. Metoda po mineralizacji z selen.
- [6] Kapusta K., Stańczyk K., Uwarunkowania i ograniczenia rozwoju procesu podziemnego zgazowania węgla w Polsce, *Przemysł Chemiczny* 2009, 88/4.
- [7] Shafirovich E., Varma A., Underground coal gasification: a brief review of current status, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 2009, 48, 7865-75.
- [8] Kapusta K., Stańczyk K., Wiatowski M., Chećko J., Environmental aspects of a field-scale underground coal gasification trial in a shallow coal seam at the Experimental Mine Barbara in Poland, *Fuel* 2013, 113, 196-208.
- [9] Bhatta A.W., Bazmi A.A., Zahedi G. Underground coal gasification: From fundamentals to applications, *Progress in Energy and Combustion Science* 2013, 39, 189-214.
- [10] Liu S., Li J., Mei M., Dong D., Groundwater Pollution from Underground Coal Gasification, *Journal of China University of Mining and Technology* 2007, 17(4), 467-72.

Evaluation of Semiautomatic Method for the Determination of Kjeldahl Nitrogen in Liquid Environmental Samples

Continuous development of analytical methods, tend to obtain the most reliable measurement results, it is the responsibility of each laboratory performing research work related to the protection and assessment of the environment. The aim of this study is practical evaluation the usefulness of specialized set for determination of Kjeldahl nitrogen in liquid environmental samples of different and unusual physical and chemical composition. Kjeldahl nitrogen content in environmental waters is defined in legal acts in the field of water - waste disposal, which undertakes research laboratories involved in the assessment of the environment to obtain the most reliable measurement results in this scope. Determination of Kjeldahl nitrogen in water and wastewater is a specific method, assuming a multistep procedure for determining the indicator, used to monitoring and assess the state of the environment. The complexity of the research methodology is inseparably associated with an increased risk of load result to an error arising at the stage of the assay. In the study used a set for determination of Kjeldahl nitrogen, consisting of a mineralizer Speed Digester K-436, distiller Kjel Flex K-360 and vapor absorber Scrubber B-414 (Büchi, Switzerland). The concentration of the analyte in the obtained distillate was determined by using a flow injection analysis with spectrophotometric detection and gas diffusion. Object of the research consisted of standard solutions and environmental samples from different industries, including samples from the process of underground coal gasification, with highly variable matrix. The study aimed to optimize the measurement conditions and to determined the basic qualitative and quantitative characteristics of applied method, such as operating range, limit of quantification, precision under repeatability conditions and the correctness of the method. The correctness of the results obtained with the aid procedure determined based

on nitrogen recovery test in domestic sewage, municipal wastes and wastewater from the process of underground coal gasification. Obtained results met requirements of the method and confirmed the usefulness of the proposed multistep measurement procedure for the determination of Kjeldahl nitrogen not only in routine laboratory practice, but also for monitoring processes. The proposed automation of the analytical process provides good repeatability, accuracy and reliability of results.

Keywords: Kjeldahl nitrogen, wastewater, coal gasification, flow injection analysis