

OZNACZANIE WIELOPIERŚCIENIOWYCH WĘGLOWODORÓW AROMATYCZNYCH W GLEBACH I ODPADACH ORGANICZNYCH METODĄ HPLC - UV¹

S. Baran, P. Oleszczuk

Instytut Gleboznawstwa i Kształtowania Środowiska Przyrodniczego, Akademia Rolnicza
ul. Leszczyńskiego 7, 20-069 Lublin
e-mail: patol@consus.ar.lublin

Streszczenie: W pracy dokonano porównania różnych warunków ekstrakcyjnych na odzysk wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych z osadu ściekowego i gleby. Do ekstrakcji wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych wykorzystano zmienne warunki metody ultradźwiękowej. Porównano skuteczność ekstrakcji ciągłej (1 x 60 cm³, 1 x 100 cm³) z ekstrakcją dwoma porcjami rozpuszczalnika (2 x 30 cm³, 2 x 50 cm³). Otrzymane ekstrakty oczyszczano techniką SPE, do ilościowego i jakościowego oznaczenia WWA wykorzystano chromatograf cieczowy z detekcją UV. Opracowaną metodę zastosowano praktycznie do oznaczenia WWA w osadzie ściekowym i glebie pochodzącej z terenu podlegającego zanieczyszczeniom ropopochodnym. Oznaczone ilości 16 WWA w osadzie ściekowym wyniosły 26,32 mg/kg, natomiast w glebie wahały się 100-16 000 µg/kg.

Słowa kluczowe: WWA, osady ściekowe, zanieczyszczenia gleb, HPLC-UV, ekstrakcja ultradźwiękowa.

WSTĘP

Wykorzystanie osadów ściekowych w rolnictwie jest bez wątpienia ekologicznie i ekonomicznie uzasadnione. Liczne publikacje [1,2] wskazują na duże

¹ Praca wykonana została w ramach projektu badawczego Nr P06H 062 20, finansowanego przez Komitet Badań Naukowych

korzyści wynikające z takiego właśnie wykorzystania osadów. Osad ściekowy poprawia właściwości fizyczne, biologiczne i chemiczne gleb. Ponadto dostarcza glebie pewnych ilości materii organicznej [2].

Zastosowanie osadów ściekowych w rolnictwie stwarza jednak pewne zagrożenie. Udokumentowano niejednokrotnie [2] wysokie poziomy zanieczyszczeń, zarówno nieorganicznych (metale ciężkie) jak i organicznych. Zachodnie dane literaturowe wskazują, że osady ściekowe w zależności od pochodzenia i sposobu oczyszczania ścieków mogą być zanieczyszczone przez: PCBs, chlorofenole, PCDD/Fs, węglowodory alifatyczne i aromatyczne [3,5]. O ile stężenia metali ciężkich w osadach ściekowych z polskich oczyszczalni są znane [1,2], o tyle niewiele jest informacji na temat zanieczyszczeń organicznych.

W przypadku gdy poziomy zanieczyszczeń występujących w osadach ściekowych charakteryzują się wysokim stężeniem, istnieje poważne niebezpieczeństwo wniknięcia ich do łańcucha pokarmowego człowieka.

Wśród zanieczyszczeń, które w osadach ściekowych często przekraczają dopuszczalne normy [8], wymienia się wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne. WWA są grupą tzw. trwałych zanieczyszczeń organicznych (ang. *Persistent Organic Pollutants* – POPs) [13], obecną we wszystkich elementach środowiskach. Oznaczono je m.in. w wodach, glebach, osadach dennych, znajdują się one również w żywności, kompostach z odpadów i w popiołach lotnych. Z wielu obecnych w przyrodzie WWA, za najbardziej szkodliwe (kancerogenne i/lub mutagenne) uważa się 16 (Tab.1) [16].

Jako główne źródła WWA wymienia się: emisję z elektrowni i elektrociepłowni, transport oraz inne procesy związane ze spalaniem węgla i ropy naftowej. Niektórzy autorzy [12] wymieniają również procesy związane z biosyntezą tych związków. WWA tworzą się również w wyniku pożarów lasów i erupcji wulkanów, w krajach narażonych często na tego typu zjawiska udział WWA z tych źródeł może stanowić poważny udział.

Właściwości WWA, takie jak słaba rozpuszczalność w wodzie natomiast bardzo dobra w tłuszczach sprawiają, że wykazują one zdolność do akumulacji w organizmach żywych. Biorąc pod uwagę ich właściwości mutagenne i/lub kancerogenne [7, 16] stwarza to poważne zagrożenie dla zdrowia ludzi. Z tego względu WWA zostały wciągnięte na listę głównych zanieczyszczeń organicznych, zarówno przez Unię Europejską jak i Amerykańską Agencję Ochrony Środowiska (US EPA).

Innym zagrożeniem wynikającym z rolniczego zagospodarowania osadów ściekowych jest zdolność WWA do adsorpcji na cząstkach gleby. Zjawisko to może spowodować akumulację węglodorów w glebie. Wild i in. [17]

przewodzą badania nad efektem wielokrotnego użyźniania gleby osadem ściekowym (25 dozowań w ciągu 19 lat). W ciągu tego okresu stężenie WWA zwiększyło się z 216 $\mu\text{g}/\text{kg}$ do 5 527 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Badania wyraźnie wskazują, że wielokrotne użyźnianie gleb osadami ściekowymi powoduje podwyższenie poziomu WWA w glebach. Są to przede wszystkim węglowodory 4-6 pierścieniowe, a więc charakteryzujące się dużymi właściwościami mutagennymi i kancerogennymi.

Opisane wyżej właściwości WWA potwierdzają konieczność monitorowania poziomu ich stężeń w osadach ściekowych wykorzystywanych rolniczo. Niekontrolowane i wielokrotne wprowadzanie osadów ściekowych o nieznanym stężeniu WWA może istotnie wpłynąć na ich poziom w użyźnianych glebach, stwarzając poważne zagrożenie wniknięcia ich do łańcucha pokarmowego człowieka.

Osad ściekowy jest trudnym materiałem analitycznym. Występujące w nim bogactwo zanieczyszczeń organicznych i nieorganicznych utrudnia analizę. Metodą pozwalającą w krótkim czasie i przy niewielkim zużyciu odczynnika uzyskać wysoki odzysk są ultradźwięki. Metoda ta z powodzeniem jest stosowana do wydzielania WWA z gleby i osadów dennych [4,15]. Prace nad porównaniem skuteczności odzysku WWA z różnych próbek przy wykorzystaniu ultradźwięków i aparatu Soxhleta prowadziło wielu autorów [6,19]. Uzyskane przez nich odzyski WWA kształtują się na porównywalnym lub wyższym poziomie. Za stosowaniem ultradźwięków przemawiają krótki czas odzysku oraz mała w porównaniu do aparatu Soxhleta ilość zużytego rozpuszczalnika.

W polskiej literaturze niewiele jest informacji na temat odzysku WWA z osadów ściekowych i gleb przy zastosowaniu ultradźwięków. W pracy dokonano porównania różnych warunków prowadzenia ekstrakcji ultradźwiękowej. Opierając się na opracowanej metodyce oznaczono 16 WWA w osadach ściekowych i zanieczyszczonych produktami ropopochodnymi glebach.

MATERIAŁY I METODYKA BADAŃ

Materiały

Acetonitryl, dichlorometan (DCM), metanol, tetrahydrofuran (THF) (for HPLC grade). Próbkę osadów ściekowych pochodziły z oczyszczalni ścieków komunalnych.

Warunki ekstrakcyjne

Próbki osadu ściekowego połączone ze znaną ilością sumy 16 wzorcowych WWA.

Ekstrakcja I (EX₁) (2 x 30 cm³, 2 x 50 cm³). Próbkę osadu ściekowego (1 g) ekstrahowano przez 30 min w wannie ultradźwiękowej w 30 cm³ (50 cm³) dichlorometanu, otrzymany ekstrakt dekantowano, a osad ponownie zalano świeżą porcją (30 cm³/50 cm³) dichlorometanu i ekstrahowano przez kolejne 30 min. Otrzymane ekstrakty połączone, odwirowano i poddano oczyszczeniu.

Ekstrakcja II (EX₂) (1 x 60 cm³, 1 x 100 cm³). Próbkę osadu ściekowego (1 g) ekstrahowano w wannie ultradźwiękowej 60 cm³ (100 cm³) dichlorometanem w ciągu 60 min. Otrzymany ekstrakt odwirowano.

Ekstrakcja III (EX_{3a}, EX_{3b}) (2 x 30 cm³, 2 x 50 cm³). Próbkę osadu ściekowego (1g) ekstrahowano przez 30 min w wannie ultradźwiękowej 30 cm³ (50 cm³) dichlorometanem, otrzymany ekstrakt odwirowano i poddano oczyszczeniu (EX_{3a}). Następnie znajdujący się w kolbie osad po pierwszej ekstrakcji zalano nową porcją dichlorometanu (30 cm³, 50 cm³), ekstrahowano w czasie 30 min a następnie odwirowano i poddano oczyszczeniu (EX_{3b}).

Oczyszczanie ekstraktów

Odparowaną do sucha pozostałość z procesu ekstrakcji rozpuszczano w 4 cm³ acetonitrylu. Ekstrakt oczyszczano techniką SPE (Solid Phase Extraction) przy zastosowaniu kolumniek C₁₈ firmy J.T. Baker. Kolumnkę kondycjonowano jedną porcją metanolu (1 x 3 cm³), następnie dwoma porcjami (2 x 3 cm³) mieszaniny 2-propanol:woda (1:9). Nie dopuszczając do wysuszenia podawano na kolumnkę otrzymany ekstrakt. Po wysuszeniu kolumnkę przemywano jedną porcją (1 x 3 cm³) mieszaniny metanol:woda (1:1), suszono po czym oznaczane związki eluowano 3 cm³ acetonitrylu.

Oznaczanie jakościowe i ilościowe WWA

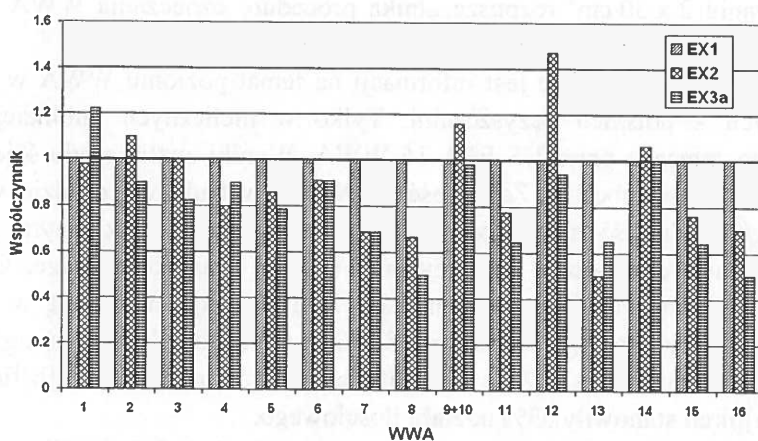
System HPLC składał się z pompy Spectra Series P100 (Thermo Separation Products) połączonej z detektorem UV Spectra Series UV100 (Thermo Separation Products). Do rozdziału 16 WWA zastosowano kolumnę Techsphere ODS-2 5μ 80A. Jako fazę ruchomą stanowiła mieszanina acetonitryl:woda (70:30, v/v). Przepływ ustalono na 1 cm³/60s. Detekcja prowadzona była przy długości fali – 254 nm.

WYNIKI I DYSKUSJA

Wiadomym jest [14], że dla uzyskania dobrego odzysku analitów z matrycy glebowej przy zastosowaniu ultradźwięków konieczne jest powtarzanie ekstrakcji nowymi porcjami rozpuszczalnika. Istotna jest również ilość zastosowanego rozpuszczalnika, aby zapewnić odpowiednią wydajność odzysku.

Biorąc pod uwagę różny zakres oznaczonych stężeń w celu obrazowego przedstawienia otrzymanych wyników przyjęto, że stężenia otrzymane podczas ekstrakcji „dzielonej” (EX₁) przyjmą wartość 1.

Na rysunku 1 wyraźnie widać, że podczas ciągłej ekstrakcji (EX₂) nie dochodzi do pełnego wydzielenia 11 węglowodorów. Odzysk tych węglowodorów jest o około 20-30% niższy od odzysku przy zastosowaniu ekstrakcji dzielonej (EX₁). Jedynie w przypadku 5 węglowodorów obserwuje się pełną ich ekstrakcję.



Rys. 1. Poziom odzysku WWA z osadów ściekowych metodą ekstrakcji ultradźwiękowej (EX₁, EX₂, EX₃ – opis – część doświadczalna): 1 – naftalen, 2 – acenaftalen, 3- acenaften, 4 - fluoren, 5 –fenantren, 6 – antracenen, 7 – fluoranten, 8 – piren, 9 + 10 – chryzen + benzo[a]antracenen, 11 – benzo[b]fluoranten, 12 – benzo[k]fluoranten, 13 – benzo[a]piren, 14 – dibenz[a,h]antracenen, 15 – benzo[ghi]perylene, 16 – indeno[1,2,3-cd]piren.

Fig. 1. Recoveries of PAHs from sewage sludge for ultrasonic extraction (EX₁, EX₂, EX₃ – materials and methods): 1 – naphthalene, 2 – acenaphthylene, 3 – acenaphthene, 4 – fluorene, 5 – phenanthrene, 6 – anthracene, 7 – fluoranthene, 8 – pyrene, 9+10 – benzo[a]anthracene + chryzene, 11 – benzo[b]fluoranthene, 12 – benzo[k]fluoranthene, 13 – benzo[a]pyrene, 14 – dibenzo[a,h]anthracene, 15 – benzo[g,h,i]perylene, 16 – Indeno[1,2,3-cd]pyrene.

Porównując stopień odzysku poszczególnych WWA podczas EX_1 i EX_{3a} widać, że w przypadku większości węglowodorów podczas pierwszej ekstrakcji wydzielana jest większa część węglowodorów ($>0,7$).

Podczas EX_{3a} obserwuje się odzysk większej części ($>80\%$) węglowodorów 2-3 pierścieniowych. W przypadku węglowodorów wysokomolekularnych (4-6 pierścieni) ekstrakcja pierwszą porcją rozpuszczalnika (EX_{3a}) zapewnia jedynie odzysk 70% węglowodorów zawartych w próbce. Ciekawie również przedstawia się zależność EX_2 od EX_{3a} . W połowie przypadków wartości są bardzo zbliżone do siebie.

Analizując wpływ ilości rozpuszczalnika na poziom odzysku WWA z osadu ściekowego i gleby ustalono, że wystarczającą ilością rozpuszczalnika jest $2 \times 30 \text{ cm}^3$. Zwiększenie ilości rozpuszczalnika do $2 \times 50 \text{ cm}^3$ nie odegrało istotnego wpływu na zwiększenie odzysku.

Najwyższą efektywność odzysku osiągnięto dla metody EX_1 . Przy zastosowaniu $2 \times 30 \text{ cm}^3$ rozpuszczalnika procedurę oznaczania WWA w próbkach osadów ściekowych oparto o te właśnie parametry.

W literaturze niewiele jest informacji na temat poziomu WWA w osadach ściekowych z polskich oczyszczalni. Tylko w nielicznych publikacjach [3] oznaczono zalecane przez US EPA 16 WWA. Wyniki analiz osadu ściekowego przedstawiono w tabeli 1. Zawartość 16 WWA w badanym osadzie wyniosła 26,32 mg/kg. Wartość ta jest stosunkowo niska w porównaniu z danymi podawanymi przez innych autorów. Dla przykładu, poziom oznaczonych przez Czekałę i in. [5] 6 WWA wahał się w granicach 30-160 $\mu\text{g}/\text{kg}$, natomiast w osadach analizowanych w pracy [18] zawartość 8 WWA wynosiła od 14 do 36 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Stwierdzono (Rys. 2), że naftalen, fluoranten, benzo[b]fluoranten i benzo[a]piren stanowiły 63% udziału ilościowego.

O ile w przypadku osadów ściekowych mało jest informacji w polskiej literaturze, to jeśli chodzi o gleby temat ten jest dokładnie badany. Znane są liczne prace Maliszewskiej-Kordybach [9,10], nad zawartością WWA w glebach użytkowanych rolniczo, niestety zagadnienie WWA w glebach podlegających antropopresji jest skąpo traktowane [11], a szczególnie mało miejsca poświęca się WWA w okolicy lotnisk. Tereny te, podobnie jak gleby wzdłuż tras komunikacyjnych i stacji benzynowych, narażone są na zanieczyszczenia WWA. Mogą one pochodzić zarówno z procesów spalania zachodzących w silnikach, jak również w wyniku przecieku paliwa z nieszczelnych zbiorników. Oznaczone ilości WWA w glebach zanieczyszczonych produktami ropopochodnymi wskazują na dość wysoki poziom tych zanieczyszczeń. W punkcie szczególnie

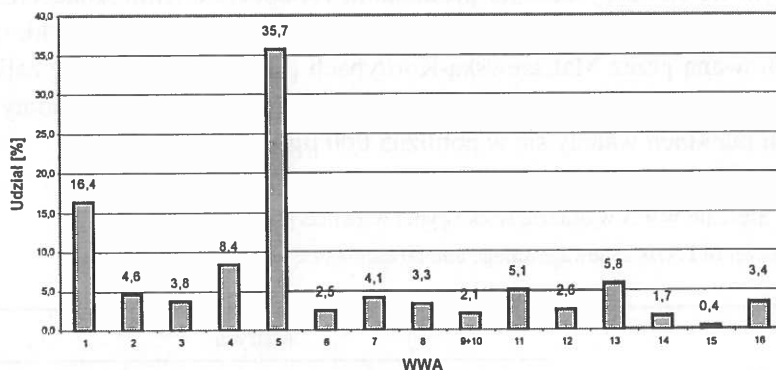
narażonym na zanieczyszczenia produktami ropopochodnymi oznaczono bardzo wysoki poziom WWA 16 889 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Tab.1). Biorąc pod uwagę klasyfikację zaproponowaną przez Maliszewską-Kordybach [10], gleby te należy zaliczyć do silnie zdegradowanych wymagających rekultywacji. Średnie poziomy WWA w innych punktach wahały się w pobliżu 5 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Tabela 1. Stężenie WWA w osadzie ściekowym i w zanieczyszczonej glebie

Table 1. Level of PAHs in sewage sludge and contaminated soil

WWA	Matryca	
	Osad ściekowy [mg/kg]	Gleba* [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
Naftalen	4,31	1512,3
Acenaftalen	1,22	352,3
Acenaften	0,99	1080,3
Fluoren	2,21	64,0
Fenantren	9,40	1349,3
Antracen	0,66	252,4
Fluoranten	1,09	2006,8
Piren	0,88	1273,7
Benzo[a]antracen+Chryzen	0,56	1851,5
Benzo[b]fluoranten	1,33	1393,8
Benzo[k]fluoranten	0,68	461,0
Benzo[a]piren	1,53	1015,7
Dibenz[ah]antracen	0,46	3001,5
Benzo[ghi]perylene	0,11	510,5
Indeno[1,2,3-cd]piren	0,89	764,6
Σ WWA	26,32	16889,3

*- gleba zanieczyszczona ropopochodnymi



Rys. 2. Udział [%] poszczególnych WVA w osadzie ściekowym (opis - rys. 1).

Fig. 2. Composition [%] individual PAHs in sewage sludge (desc. – fig. 1).

WNIOSKI

Podsumowując należy stwierdzić, że ekstrakcja pierwszą porcją rozpuszczalnika (EX_{3a}) jest istotna dla węglowodorów 2-3 pierścieniowych, podczas której wydzielane jest ponad 80% WVA znajdujących się w próbce. Natomiast ekstrakcja drugą porcją rozpuszczalnika (EX_{3b}) jest nieistotna (lub w niewielkim stopniu wpływa na końcowy wynik). Inaczej przedstawia się natomiast sytuacja w przypadku węglowodorów o 4-6 pierścieniach w cząsteczce. Pomijając trzy węglowodory, które w pełni ekstrahują się podczas pierwszej ekstrakcji, dla pozostałych równie istotna jest druga ekstrakcja.

Ilość zastosowanego rozpuszczalnika ma raczej charakter orientacyjny, gdyż w dużej mierze zależy od poziomu WVA w analizowanej matrycy. Z naszych doświadczeń wynika jednak, że nawet dla bardzo zanieczyszczonych gleb ilość 2 x 30 cm³ jest wystarczająca do całkowitego wyekstrahowania WVA.

Zaproponowana w pracy metoda przy zastosowaniu ultradźwięków zapewnia wydajną i szybką ekstrakcję WVA z materiału glebowego i organicznego, ponadto pozwala na zaoszczędzenie znacznych ilości rozpuszczalnika, czego nie można powiedzieć o najczęściej stosowanej metodzie przy użyciu aparatu Soxhleta.

Istotny jest również fakt, że przy zastosowaniu opracowanej metody następuje bardzo dobry odzysk większości węglowodorów, w tym: fluorantenu, benzo[a]pirenu i benzo[b]fluorantenu, dla których zostały ustalone normy przez Unię Europejską.

PIŚMIENNICTWO

1. **Baran S., Bielińska J.E., Wiśniewski J.:** Wpływ stosowania niekonwencjonalnych nawozów wieloskładnikowych (z osadów ściekowych i wermikompostu) na wybrane właściwości gleby. *Fol. Univ. Agricult. Stetin. Agricult.*, 72, 11-20, 1998.
2. **Baran S., Turski R.:** Wybrane zagadnienia z utylizacji i unieszkodliwiania odpadów. Wydawnictwo Akademii Rolniczej, Lublin, 1999.
3. **Bodzek D., Janoszka B., Dobosz C., Warzecha L., Bodzek M.:** Determination of polycyclic aromatic compounds and heavy metals in sludges from biological sewage treatment plants. *J. Chromatogr. A*, 774, 177-192, 1997.
4. **Chen G.S., Schramm K.W., Klimm C., Xu Y., Zhang Y.Y., Kettrup A.:** Historical record and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in core sediments from the Yangtze Estuary, China. *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 359, 280-285, 1997.
5. **Czakała J., Jakubus M.:** Metale ciężkie oraz WWA integralnymi składnikami osadów ściekowych. *Fol. Univ. Agric. Stetin., Agricultura* 77, 39-44, 1999.
6. **Garcia A.L., Gonzalez E.B., Alonso J.I.G., Medel A.S.:** Determination of some selected polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples by HPLC with fluorescence detection. *Chromatographia*, 33, 225-230, 1992.
7. **IARC.** Monographs on the Evaluation of the carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Polynuclear Aromatic Hydrocarbons, vol. 32. WHO. Lyon, France, 1983.
8. **Janoszka B., Bąkowski W., Bodzek D.,** Występowanie i oznaczanie WWA w osadach ściekowych. *Ochr. Środowiska*, 48/49, 39-40, 1993.
9. **Maliszewska-Kordybach B., Smreczak B.:** Zawartość Wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w glebach użytkowanych rolniczo na terenie woj. lubelskiego. *Roczn. Glebozn.*, T. 48, 1/2, 95-101, 1997.
10. **Maliszewska-Kordybach B.:** Zależność między właściwościami gleb i zawartością w nich WWA; na przykładzie gleb z terenu użytków rolnych w województwie lubelskim. *Archiwum Ochrony Środowiska*, 3, 79-91, 1998.
11. **Osuch E.:** Analiza zawartości WWA w glebie w okolicy elektrociepłowni. *Ochr. Powietrza i Problemy Odpadów*, 34, 50-52, 2000.
12. **Sims R.C., Overcash M.R.:** Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil-plant systems, *Residue Reviews*, 88, 1-68, 1983.
13. **Smreczak B.:** Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) w układach gleba-roślina wyższa. *Roczn. Glebozn.*, 48, 3/4, 37-47, 1997.
14. **Surygala J. (ed.), Śliwka E., Kolwzan B., Greinert H.:** Zanieczyszczenia naftowe w gruncie. Oficyna Wyd. Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 2000.

15. **Trapido M.**: Polycyclic aromatic hydrocarbons in Estonian soil: contamination and profiles. *Environ. Pollut.*, 105, 67-74, 1999.
16. **USEPA**. Evaluation and Estimation of Potential Carcinogenic Risks of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. US Environmental Protection Agency. Washington DC, 1985.
17. **Wild S.R., Waterhouse K.S., McGrath S.P., Jones K.C.**: Organic contaminants in an agricultural soil with a known history of sewage sludge amended soil polynuclear aromatic hydrocarbons, *Environ. Sci. Technol.*, 24, 1706-1711, 1990.
18. **Włodarczyk-Makula M., Janosz-Rajczyk M., Wiśniowska E., Zarębska A., Zgrzebna A.**: Badania zawartości WWA w osadach ściekowych. *Ochrona Środowiska*, 79, 15-19, 2000.
19. **Vannoort R.W., Chervet J.P., Lingeman H., Dejonge G.J., Brinkman U.A.Th.**: Coupling of supercritical fluid extraction with chromatographic techniques. *J. Chromatogr. A*, 505, 45-77, 1990.

DETERMINATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN SOILS AND ORGANIC WASTES BY HPLC-UV

S. Baran, P. Oleszczuk

Institute of Soil Science and Environmental Management, Agricultural University

Leszczyńskiego 7, 20-069 Lublin

e-mail: patol@consus.ar.lublin.pl

Summary: This paper is concerned with the comparison of the extraction conditions for PAH recovery from sewage sludge and soil. Different conditions of ultrasonic method were used for PAH extraction. The efficiency of the continuous extraction (1x60 cm³, 1x100 cm³) was compared with the extraction with two portions of the solvents (2x30 cm³, 2x50 cm³). The SPE technique was applied to clean up the obtained extraction. HPLC with UV detection was used for quantitative and qualitative determination of PAHs. The described method was employed for PAH determination in sewage sludge and oil contaminated soil. Quantitative determination of 16 PAHs was 26,32 mg/kg in sewage sludge and 100-16 000 µg/kg in soil.

Keywords: PAH, sewage sludge, HPLC-UV, ultrasonic extraction.