



Project funded by
EUROPEAN UNION



Common borders. Common solutions.

Methodological guide on high-performance analytical techniques for the monitoring of toxic chemicals in environment

Μεθοδολογικός οδηγός αναλυτικών τεχνικών υψηλής απόδοσης για την παρακολούθηση τοξικών χημικών ουσιών στο περιβάλλον

BSB27-MONITOX

Editors

Thomas Spanos
Christina Chatzichristou
Antoaneta Ene





Project funded by
EUROPEAN UNION



Methodological guide on high-performance analytical techniques for the monitoring of toxic chemicals in environment

Μεθοδολογικός οδηγός αναλυτικών τεχνικών υψηλής απόδοσης για την παρακολούθηση τοξικών χημικών ουσιών στο περιβάλλον

Editors
Thomas Spanos
Christina Chatzichristou
Antoaneta Ene

Editing Press Organotiki OE
Kavala - 2021

Address of the Editors
International Hellenic University, Kavala
Department of Chemistry,
Agios Lucas 65404 Kavala, Greece
Phone: +30 2510 462169
Email: tspanos@chem.ihu.gr
Website: <https://www.ihu.gr>

List of contributor authors
Thomas Spanos - Ch.1
Christina Chatzichristou - Ch.2
Sofia Mitkidou & Nikolaos Kokkinos - Ch.3

Methodological Guide was financially supported by:

Project BSB 27 - Joint Operational Programme Black Sea Basin 2014-2020

Εκτύπωση: Οργανωτική ΟΕ Κ. Γούναρης & ΣΙΑ ΟΕ
Βενιζέλου & Δαγκή 10, 65403, Καβάλα
tel.: +30 2510 227922
Fax: +30 2513 006464
email: info@organwtiki.gr
ISBN 978-618-85036-1-8

CONTENTS

FOREWORD	3
CHAPTER 1. INDUCTIVELY COUPLED PLASMA - MASS SPECTROMETRY (ICP-MS)	4
Thomas Spanos (IHU)	
1.1. ICP-MS technique	4
1.1.1. Mass spectrometers measurements	5
1.1.2. Schematic diagram of ICP-MS	7
1.2. Inductively coupled plasma	7
1.2.1. Schematic representation of inductively coupled plasma formation	9
1.2.2. Advantages of using argon	9
1.3. Sample input system - nebulizer	10
1.3.1. ICP interface system with mass spectrometry	10
1.3.2. Optical system	11
1.3.3. Ion focusing system - ion focusing lenses	11
1.3.4. Cell Collision/Reaction (CRC)	12
1.3.5. Ion Optics	14
1.3.6. Mass analyzer - Quadrupole	14
1.3.7. Ion Detector	15
1.4. Calibration and quantification	16
1.4.1. Quantitative analysis	16
1.4.2. Semi-quantitative analysis	17
1.4.3. Isotopic ratio, for isotopic analysis and isotopic dilution	17
1.5. ICP-MS mass spectrum	18
1.5.1. Comparison of ICP-MS technique with other elemental analysis	19
1.6. LA-ICP-MS Laser Ablation- Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry	19
References	20
CHAPTER 2. SPECTROSCOPIC METHODS ULTRAVIOLET - VISIBLE (UV-VIS) FOR ENVIRONMENTAL ANALYSIS	21
Christina Chatzichristou (IHU)	
2.1. Introduction	21
2.1.1. Properties of Light	21
2.2. The Electromagnetic Spectrum	22
2.3. Bouguer-Lambert-Beer law	23

Methodological guide on high-performance analytical techniques for the monitoring of toxic chemicals in environment

2.3.1. Deviations of the Beer-Lambert law	24
2.4. UV-Vis Instrumentation.....	26
2.4.1. Types of instruments.....	27
2.5. Developing a Quantitative Method for a Single Component using calibration curve	29
2.6. Applications of UV-Vis spectrophotometry in environmental analysis	30
References.....	32
CHAPTER 3. GC-MS FINGERPRINTING OF PETROLEUM HYDROCARBONS IN FORENSIC ENVIRONMENTAL GEOCHEMISTRY	34
Sofia Mitkidou & Nikolaos Kokkinos (IHU)	
3.1. Introduction to chromatography.....	35
3.1.1. Gas Chromatography (GC).....	36
3.1.2. Biomarker Diagnostic Parameters	40
3.1.3. Weathering of biomarkers.....	41
3.1.4. GC-MS	43
3.2. Petroleum Forensic Fingerprinting	44
3.2.1. Petroleum Biomarkers Analysis.....	46
3.2.2. Biomarker Diagnostic Parameters	50
3.2.3. Weathering of biomarkers.....	51
3.3. PAHs and PASHs analysis	52
3.3.1. Weathering of PAHs	53
3.4. Methodology for determination of hydrocarbons in environmental samples.....	54
3.4.1. Sampling	54
3.4.2. Organic extract from water samples	55
3.4.3. Separation by column chromatography	55
3.4.4. Recovery control and standard compounds.....	55
3.4.5. Acquisition of organic extract from sediment samples	56
3.4.6. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS).....	56
3.5. Results and discussion.....	57
3.5.1 Study area	57
3.5.2. Use of biomarkers in the correlation of petroleum pollutants	58
3.5.3. Analysis of water and sediment samples.....	63
Conclusions	65
References.....	65

FOREWORD

Modern environmental problems require appropriate theoretical and applied scientific knowledge to approach and solve them. During the execution of the project, these problems were approached and solved by applying specific techniques.

The differentiation of environmental problems and the need for effective monitoring of a large group of toxic substances (TOX) at trace and super-trace levels have necessitated the development of different analysis methods characterized by high sensitivity, selectivity, reproducibility and accuracy.

The methodological guide is published in the framework of the project under code BSB27, "Black Sea Basin interdisciplinary cooperation network for sustainable joint monitoring of environmental toxicants migration, improved evaluation of ecological state and human health impact of harmful substances, and public exposure prevention." (acronym "MONITOX"), was funded by the EU CBC Joint Operational Program "Black Sea Basin 2014-2020", implemented during the years 2018-2021 by the "Dunarea de Jos" University of Galatia, Romania (Project Leader Partner) in collaboration with the Institute of Zoology, Chisinau, Republic of Moldova, the International Hellenic University, Kavala, Greece the Institute of Geology and Seismology, Chisinau, Republic of Moldova and the Danube Delta National Institute for Research and Development, Tulcea, Romania.

The guide presents the main techniques applied for the analysis of inorganic and organic substances at the level of the MONITOX network, forming part of a series of methodological guides to be published in the framework of the aforementioned project. It is based on an extensive personal experience of the authors and good international practices in the study of the parameters of various environmental factors.

This Methodological Guide is divided into three chapters and describes the theoretical principles of techniques, special instruments and environmental applications of the most important analytical tools used to determine heavy metals, trace elements, persistent organic pollutants, petroleum and physicochemical parameters in environmental samples.

The authors especially thank Professor Dr. Elena Zubcov, Project Coordinator of Partner Institute 2 (Institute of Zoology), for the review of the methodological guide.

Kavala September 2021

Chapter 1.

INDUCTIVELY COUPLED PLASMA - MASS SPECTROMETRY (ICP-MS)

Thomas Spanos

Instrumental Analysis Techniques, International Hellenic University (IHU), Faculty of Natural Sciences, Department of Chemistry, St. Loukas, 65404 Kavala, Greece, tspanos@chem.ihu.gr

1.1. ICP-MS technique

ICP-MS technique is the most widely used atomic mass spectrometry technique, where the ionization of the sample elements is done with argon plasma (Ar) similar to the inductively coupled plasma atomic emission spectrometry technique (ICP-AES or ICP-OES). The difference is that the separation and detection of ions formed by the sample is done with a mass spectrometer, based on the ratio m to their charge z (m/z). The ICP-MS technique is a hyphenated technique, it successfully analyzes almost all the elements of the periodic table from Li to U, performing simultaneous determination of a large number of elements (multi-elemental inorganic analysis), with a detection limit of 0.01-1ppb. [1]. The elements that the ICP-MS detects include: alkali, alkaline earths, metals, minerals and rare earths in very low concentrations, applied in areas such as geochemical and environmental research, nuclear chemistry, biological sample analyzes, pharmaceuticals, food chemistry, specialty isotopic analysis and others.

The ICP-MS technique is a relatively new technique of Instrumental Chemical Analysis. It was developed in the late 1970s in England by GRAY and DATE in America and in Canada by HOUK and DOUGLAS.

The development of ICP-MS arose from the need to find an improved technique for the determination of trace amounts of heavy metals, especially when it is necessary to find the ratio of their isotopes, which form carbides with many spectral lines, that make it difficult to evaluate their emission spectra. It is generally true that mass spectra are simpler than emission spectra, (Fig. 1.1.) compares the spectrum of the cerium element (Ce) obtained with the ICP-AES technique and the ICP-MS technique. It appears that with ICP-MS a simpler spectrum with fewer peaks is obtained [15].

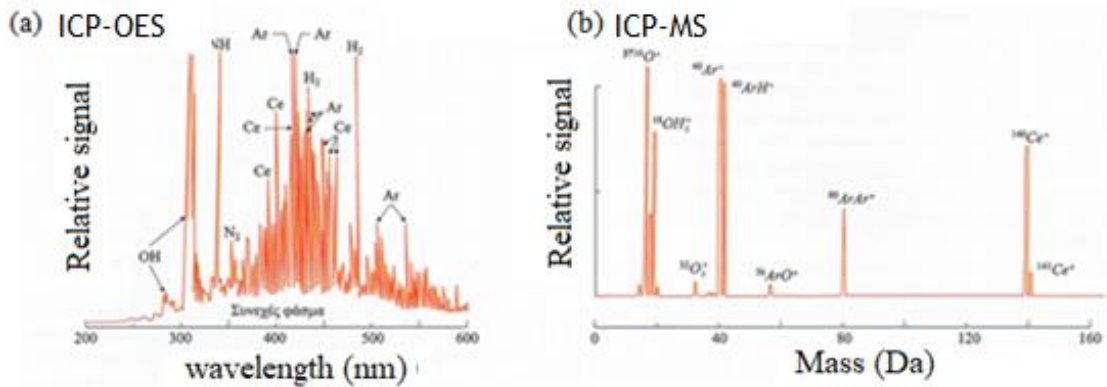


Fig. 1.1. Comparison of a spectrum of Cerium (Ce) a) with the ICP-OES technique b) with the ICP-MS technique [15]

Compared to atomic absorption techniques (AAS), ICP-MS has higher speed, accuracy, sensitivity and lower limits. It is also more sensitive to the detection of trace contaminants coming from glassware and reagents and to the detection of ions that can inhibit the detection of other ions.

When compared, the variety of ICP-MS applications exceeds the ICP-OES technique because it measures at even lower levels with unsurpassed reproducibility compared to any other technique and with zero chemical interference.

1.1.1. Mass spectrometers measurements

Mass spectrometers distinguish isotope masses. Atomic and molecular weights in atomic and molecular mass spectrometry are expressed in atomic mass units (amu, atomic mass units) or Dalton (Da). An amu or Da is defined as 1/12 of the mass of a neutral atom $^{12}_6\text{C}$. Therefore, the isotope $^{12}_6\text{C}$ corresponds to exactly 12 amu (Da). The average atomic weight (A) of an element, which occurs in nature, is equal to the sum of the atomic masses A_n of the n isotopes of the element, multiplied by the relative abundances of these isotopes in nature (1-1). Isotopes are elements that have the same number of protons meaning they have the same atomic number (Z), but different number of neutrons (N), therefore they have different atomic weight ($AB = Z + N$).

$$A = \sum_{n=1}^n A_n \cdot \rho_n \quad (1-1)$$

Example: (Fig.1.2.) The two major isotopes of chlorine, seen in (Fig.1.2. (a)), have atomic weights of 35 and 37 and relative abundance of 75% and 25%, respectively. They

both have 17 protons each, but the neutrons are 18 and 20, respectively. Applying to the equation (1-1) the atomic weight of chlorine is $A_{Cl} = 35.5$

The ratio $\frac{^{35}\text{Cl} (75\%)}{^{37}\text{Cl} (25\%)} = \frac{3}{1}$ expresses the relative abundance of the two isotopes as shown in the corresponding mass spectrum figure 2b.

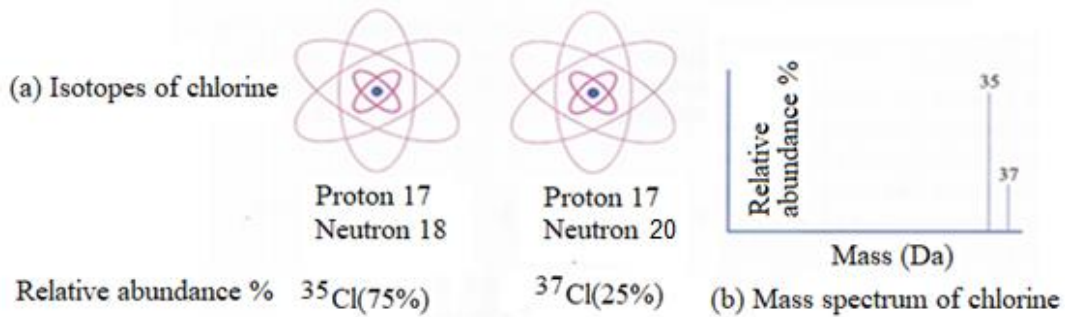


Fig. 1.2. Main isotopes of chlorine with their respective mass spectra [15]

The samples that can be analyzed by the ICP-MS technique are liquid but can also be solid (depending on the method of insertion), then the sample is ionized with inductively coupled plasma. Finally, a mass spectrometer (MS) separates and quantifies the ions, (Fig.1.3.).

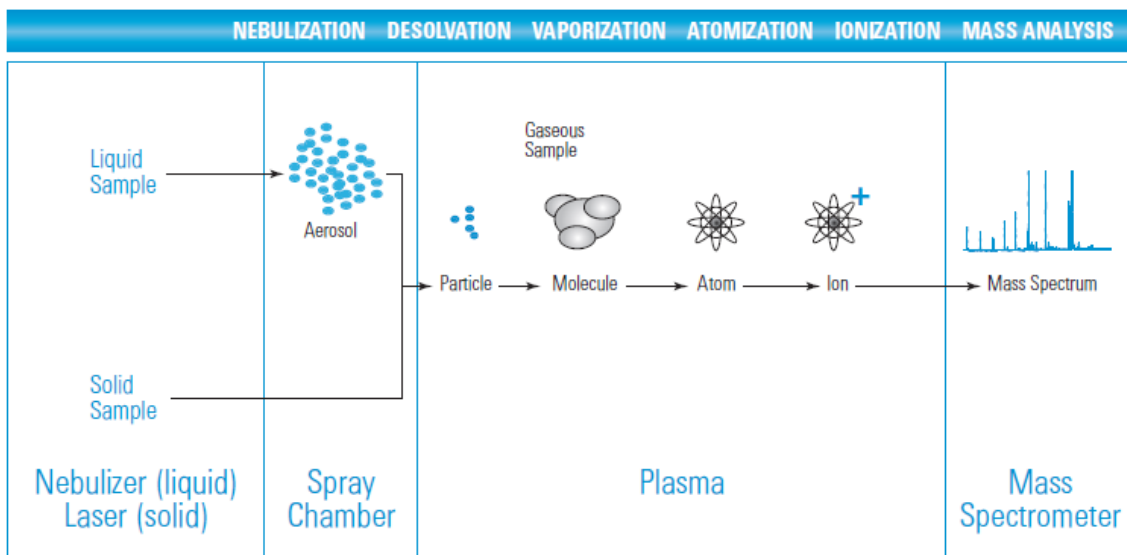


Fig. 1.3. ICP-MS schematic layout from sample entry to mass spectrum [2, 3, 16]

1.1.2. Schematic diagram of ICP-MS

The ICP-MS spectrometer consists of the following parts, (Fig. 1.4.)

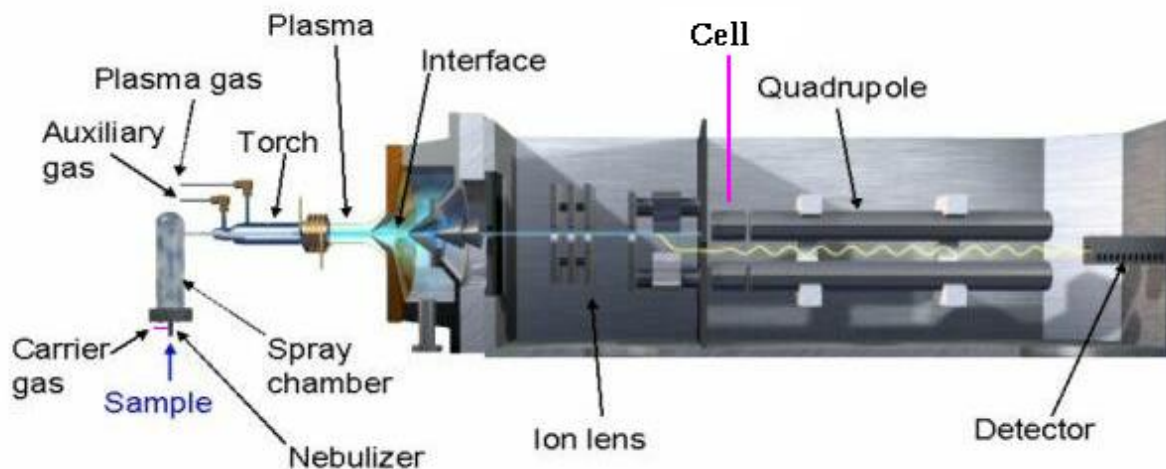


Fig. 1.4. Spectrophotometer ICP-MS [4]

1. inductively coupled plasma (torch ICP and RF coil)
2. sample input system - nebulizer Figure 4. ICP-MS Spectrometer
3. interface system: connects the ICP ion source (atmospheric pressure) to the mass spectrometer (high vacuum)
4. optical system
5. mass analyzer, classifies ions in relation to m/z ratio
6. ion detector measures the particular ions coming out of the quadrupole
7. computer for data management and evaluation

1.2 Inductively coupled plasma

Inductively coupled plasma argon is a very hot gas that is activated by induction heating from an electric coil, containing a sufficient concentration of argon ions and electrons to make the gas electrically conductive. In plasma the positive ions are almost all simply charged and there are few negative ions, they are essentially electrically neutral, because every positive ion charge corresponds to a free electron.

An inductively coupled plasma (ICP) for spectrometry is generated in a torch consisting of three concentric tubes, usually made of quartz, (Fig. 1.5.) If the inner torch tube consists of sapphire it can be used to digest the samples, including hydrofluoric acid.

The tip of the torch is placed inside an induction coil that is powered by a radio frequency (RF) electric current and thus at the top of the torch the argon is converted into plasma.

A stream of argon gas (usually 14 to 18 L/min) is introduced into the outer tube of the torch and an electric spark (Tesla) is applied for a few seconds to introduce free electrons into the stream of argon. These electrons interact with the radio frequency of the magnetic field generated by the inductor and accelerate first in one direction and then in the other, as the field changes at a high frequency, usually 27.12 or 40.68 MHz [16]. They then collide with argon atoms, figure 1.6 and sometimes the collision causes an argon atom to lose one of its electrons ($\text{Ar} \rightarrow \text{Ar}^+ + \text{e}^-$). The released electron in turn is accelerated by the rapidly changing magnetic field and the process continues automatically until the rate of release of the new electrons from collisions is balanced by the rate of recombination of the electrons with argon ions. This creates the plasma, a "fireball" flame consisting mainly of argon atoms and a small fraction of free electrons and argon ions, which due to the high electron density in this space, develop with friction high temperatures up to 10,000 K. This condition is called induction of induced conjugated plasma and produces ultraviolet light (one should not look at it directly). The plasma temperature is very high, at the top of the torch it reaches 10,000 K and about 8,000 K in the center of the plasma (channel), (Fig. 1.5.).

A second stream of argon (about 1 L/min) is introduced into the middle tube to keep the plasma at a constant temperature and away from the top of the torch.

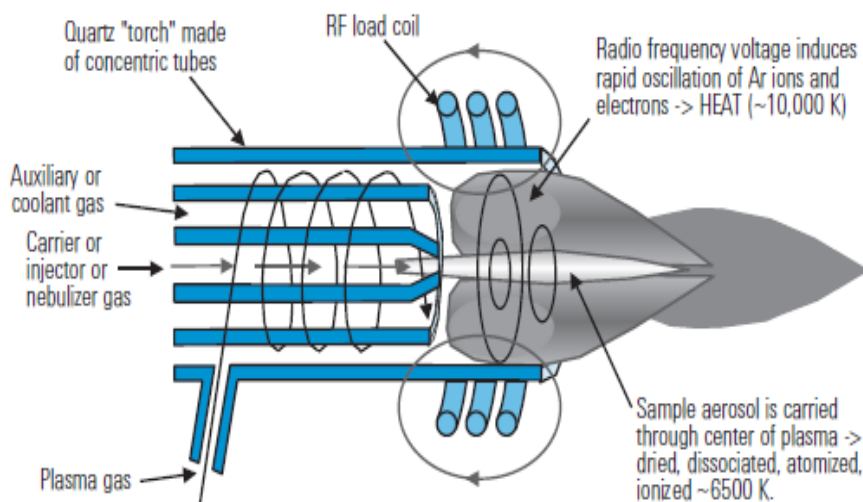


Fig. 1.5. Inductively coupled plasma torch [3]

A third stream of argon gas (again usually about 1 L/min) is introduced into the center tube to keep the plasma away from the end of the center tube, this gas flow as it passes through the center of the plasma forms a central channel which is colder than the surrounding plasma, but still much hotter than a chemical flame.

1.2.1. Schematic representation of inductively coupled plasma formation

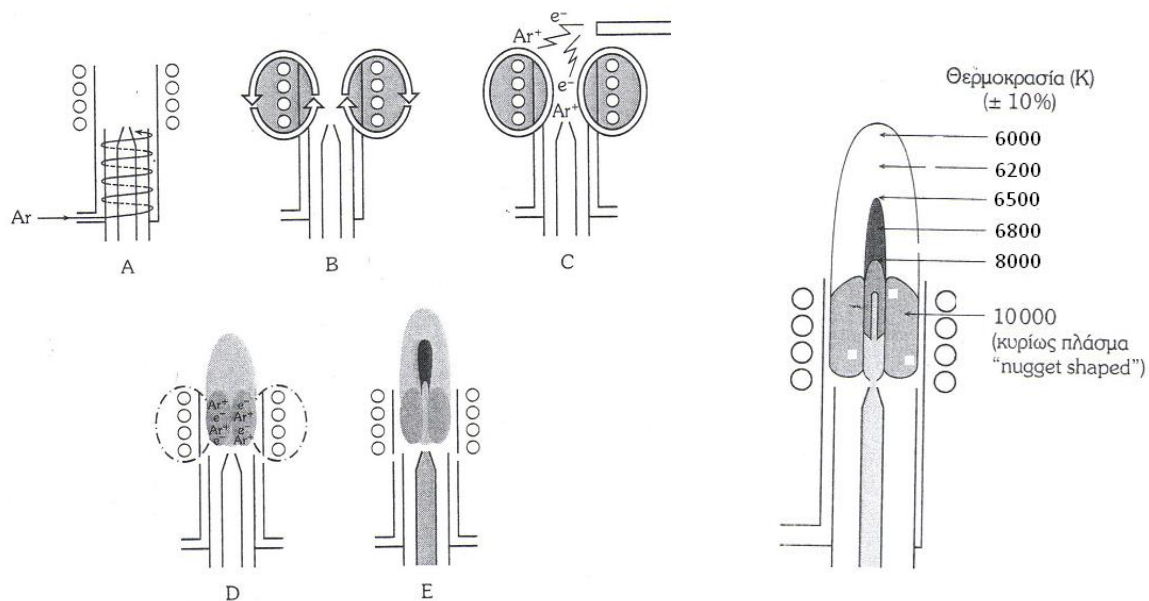


Fig. 1.6. Representation of the formation steps of inductively coupled plasma

A. the gas Ar swirls in the torch, at the top of which is the inductor coil, **B.** radio frequency (RF) is applied to the inductor, **C.** Spark (Tesla) partially ionizes the argon, **D.** free electrons of argon are accelerated by the radio frequency field causing further ionization of the argon and thus the plasma is created, **E.** the aerosol of the sample passes through the inside of the torch and creates a hole in the plasma, (Fig. 1.6.).

The Argon plasma is powered by the interaction of an electromagnetic field generated by a radio frequency generator. There are fixed frequency generators (RF generators) that produce fixed radio frequency and free running generators which the frequency changes as the plasma conditions change to achieve better radio frequency compatibility with the plasma. Today free-flow generators are used. The coil is cooled homogeneously with water or argon gas.

1.2.2. Advantages of using argon

Argon is mainly used to create plasma. With argon plasma there are the following advantages over other gases: argon is abundant (found in the atmosphere 9340 ppm as a result of radioactive decomposition of potassium), it is cheaper than other noble gases, it is commercially available, it is bought in bottles with guaranteed purity of 99.99 %, is chemically inert and therefore does not form bonds with the various identifiable elements. It also has a higher initial ionization potential of 15.6 eV and thus can ionize most elements of the periodic table. The reaction $(Ar^+ + e^- \rightarrow Ar)$ is more energetically favorable than the reaction $(M^+ + e^- \rightarrow M)$, this ensures that the sample remains ionized (as M^+) so that the mass spectrometer can detect it.

1.3. Sample input system - nebulizer

The sample to be analyzed is introduced into the nebulizer by means of a peristaltic pump in the form of a solution. The nebulizer then converts it into microdroplets (aerosol) that enter the spray chamber and from there pass into the internal channel of the torch with the help of argon current, (Fig. 1.7.). Inside the horizontal torch a droplet of the nebulized sample evaporates and any solids dissolved in the liquid evaporate and decompose into atoms [5].

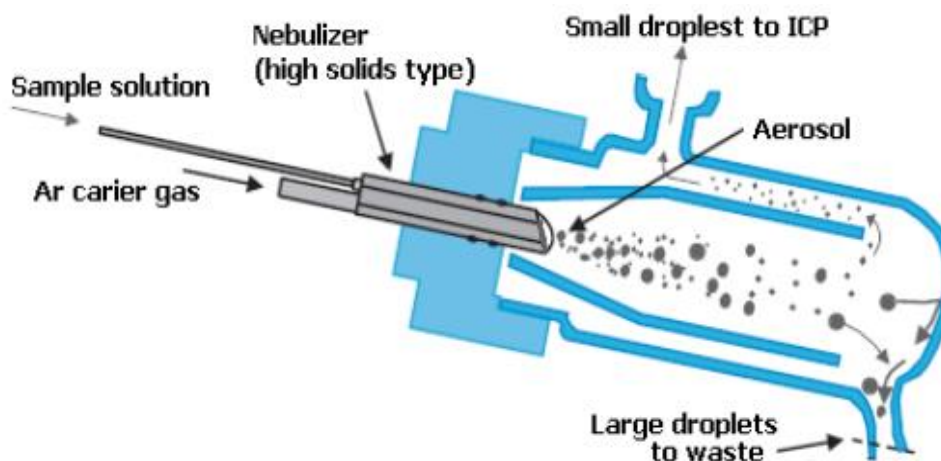


Fig. 1.7. Nebulizer [4]

At plasma temperatures, a significant percentage of atoms are ionized by many chemical elements (each atom loses its least bound electron and forms a single charged ion). So microdroplets are decomposed, gasified and atomized, then ionized losing an electron.

Under these conditions, almost all the elements ionize and ions are formed, mainly of simple charge (+). The procedure lasts 10 ms from the moment the micro drop reaches the plasma.

1.3.1. ICP interface system with mass spectrometry

The ICP interconnection system with mass spectrometry forces a portion of the ions generated in the plasma to pass through a series, usually 2 inverted cones, (Fig. 1.8.). The cones are metal disks made of Cu, Ni or Pt and are neutrally charged. They have a central small hole of 1mm or less to maintain the high vacuum in the spectrometer area through which the ions pass.

A fraction of the ions formed pass through the first hole cone ~ 1mm (sample cone) and then a fraction of this gas passes through the second hole cone ~ 0.4mm (skimmer

cone). Between the first and second cone a vacuum is created and maintained by a mechanical rotary pump (10^{-1} Atm). At the same time this space is cooled with water and under these conditions no other ions are created [16].

After the second cone, up until the detector, a high vacuum (10^{-5} Atm) is created and maintained by two powerful turbocharged pumps (necessary for the operation of mass spectrometry). This area is cooled by helium gas so that atoms that are not ionized in plasma are cooled quickly to 4 K, liquefied and removed. The charged ions are not liquefied and are led to the quadrupole mass filter, where they are separated based on the mass to charge ratio.

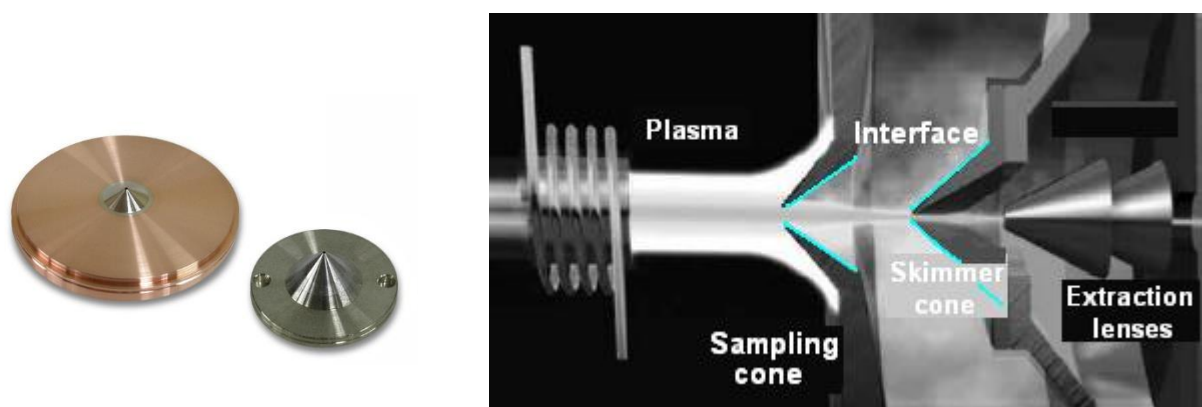


Fig. 1.8. The two ICP-MS cones [3]

1.3.2. Optical system

The optical system consists of:

- ion focus system (ion lenses and ion focus)
- the collision/reaction cell, and
- ion optics

1.3.3. Ion focusing system - ion focusing lenses

The ion focusing system focuses the ions in a solid beam as they exit the skimmer cone until they reach the mass analyzer (quadrupole), (Fig. 1.9.). By applying a positive potential to the ion lenses, the ions are accelerated in the center of the lenses. Low-voltage ions focus on low-mass ions, while higher voltages focus on high-mass ions [6, 7, 16]. At the same time ion lenses perform another great function, deflecting the compact beam resulting in the separation of positive ions from:

- Unwanted neutral particles generated or transported by ICP, such as argon atoms (Ar) and oxygen molecules (O₂)
- negatively charged atoms and molecular ions

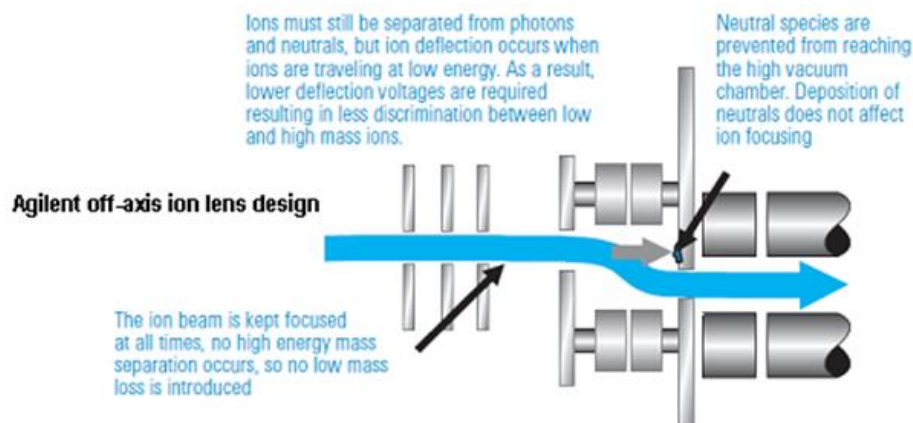


Fig. 1.9. Ion lenses [4]

- reactive unstable atoms and ions (metastable)
- the photons deflection results in the elimination of background noise.

1.3.4. Cell Collision/Reaction (CRC)

The ability to detect traditional quadrupole mass analyzers for certain critical elements is severely hampered by the formation of multi-atomic spectral disturbances created by the reaction of argon (Ar) with solvents, or the sample with basic ionized species, or a combination of both to create polyatomic ions with the same m/z ratio with the analyte of interest.

ICP-MS allows the identification of elements with atomic mass scales (amu) 7 to 240 (Li to U). However, some masses cannot be determined due to the same mass with the ionic interferences formed.

For example, mass 40, due to the abundance of argon (^{40}Ar) in the sample, mass 80, due to dimeric argon ($^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$ and mass 56 (due to the formed $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$), the latter of which significantly inhibits Fe analysis. The above problems are eliminated if the instrument is equipped with a collision-reaction cell, a new technology that essentially removes the formation of many harmful ionic species, which prevent them from entering the mass analyzer.

How the collision/reaction cell works

The cell is a closed chamber, it has an inlet and outlet hole, where collisions/reactions take place [8, 16].

- a gas always enters the cell so the pressure inside the cell increases.
- the ion path in the cell is controlled by the cell potential and the inlet and outlet holes
- ions enter the cell and react with the gas present in it
- the main use of the cell is to reduce or eliminate multi-atom interference

- whether a cell will be in collision or reaction depends on the multi-pole (quadrupole, hexapole or octopole) and the gas introduced into it
- The collision/reaction cell is placed in front of the mass analyzer (quadrupole), figure 10 and removes the multiatomic spectra of the interfering ions.

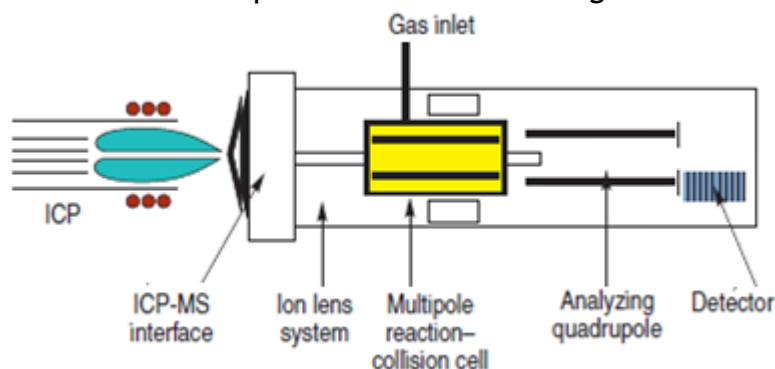


Fig. 1.10. Collision/reaction cell [9]

Table 1.1 shows some interferences in the corresponding elements of the analyte. Finally, it should be noted that by supplying the hole of the sampler or skimmer cone with collision or reaction gas, there are additional collisions and reactions that destroy the interfering polyamine ions.

In the case that the cell can work for both processes at the same time it is called universal and allows more applications.

Table 1.1

Interference	Analyte
$^{12}\text{C}^{15}\text{N}$, $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^1\text{H}$	^{27}Al
$^{38}\text{Ar}^1\text{H}$	^{39}K
^{40}Ar	^{40}Ca
$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}$	^{51}V
$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^1\text{H}$	^{52}Cr
$^{36}\text{Ar}^{16}\text{O}$	^{52}Cr
$^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$	^{52}Cr
$^{23}\text{Na}^{40}\text{Ar}$	^{63}Cu
$^{38}\text{Ar}^{16}\text{O}^1\text{H}$	^{55}Mn
$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$	^{56}Fe
$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^1\text{H}$	^{57}Fe
$^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$	^{75}As
ArAr	^{80}Se

(Fig. 1.11.) shows the possibility of removing interferences from each function. The standard mode is suitable for elements that have no interferences, the collision mode for removing few interferences and the reaction mode for removing many interferences.

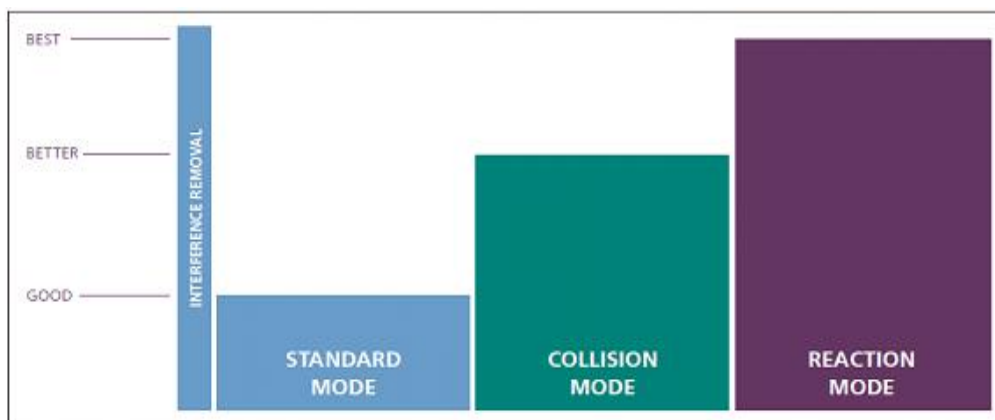


Fig. 1.11. Ability to remove interferences [3]

1.3.5. Ion Optics

The ions leaving the collision/reaction cell due to the abrupt change of pressure and temperature and with the effect of an electric field at the input of the mass analyzer, accelerate in a controlled way and create an ionic beam directed to the mass analyzer.

1.3.6. Mass analyzer - Quadrupole

The main type of mass analyzer is the quadrupole which gives a range that is easily interpreted. It consists of 4 electrically conductive cylinders (diameter about 1 cm and length 15-20 cm) supplied with DC voltage, the 2 cylinders (1st pair) of the 4 cylinders with + DC, while the other 2 cylinders (2nd pair) with - DC. An alternating frequency (RF) voltage is applied to the 1st pair and another to the 2nd with a phase difference of 180°.

The electric field created between the 4 cylinders orients the ions, while the radio frequency field accelerates them alternately towards the cylinders and forces them to follow a rotating path, (Fig. 1.12.).

The computer-controlled DC/RF ratio allows only a certain m/z ratio to pass through the quadrupole at a given time and reach the detector, so the ion-constant fractions are separated based on the ratio of mass to charge (m/z) to the nearest $\pm 0,05$ amu. The remaining fragments that are unstable at this voltage collide with the cylinders and

thus never reach the detector. If, for example, it is set to pass $m/z = 23/1$ only sodium ions will pass. Similarly, if it is set to $m/z = 63/1$ only Cu ions will pass [10].

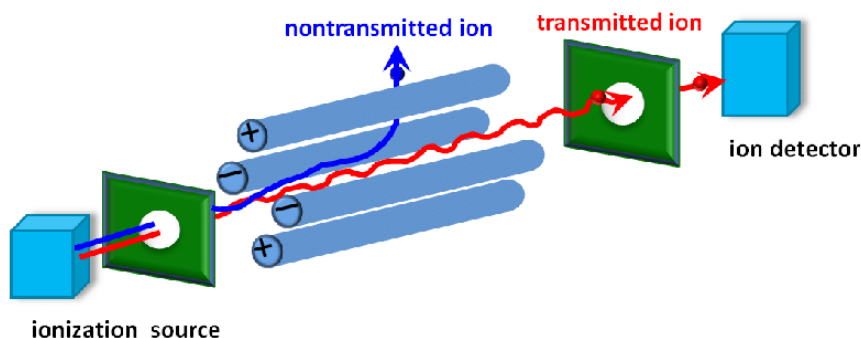


Fig. 1.12. Quadrupole [10]

In quadrupole the m/z options can be changed at any time. The potential in the quadrupole cylinders can change instantaneously this means that the quadrupole can split over 5,000 units of atomic mass (amu) per second and the scan of potential values takes place almost instantaneously over the range of 2-280 amu, lasting approximately 100 ms and the resolution is 1 amu across the mass range.

This feature allows the quadrupole to perform simultaneous multi-element analysis, in fact it takes 3-4 min to scan 25 items with good accuracy. In this way the different isotopes of an element are found. Good operation of the quadrupole requires the careful cleaning of the film created in the cylinders from the accumulation of ions that are discarded in the analysis process.

There are other types of analyzers besides quadrupole such as: magnetic focus analyzers, flight time analyzers and ion trap analyzers.

1.3.7. Ion Detector

It detects ions leaving the mass analyzer (quadrupole) and separated by the m/z ratio. The ion current is generally low so a multiplier is needed. The detector translates the number of ions struck into an electrical signal related to the number of the element of interest using calibration standards. The continuous dynode electron multiplier consisting of a number of dynodes is most commonly used, (Fig. 1.13.). Incoming positively charged ions fall on the first dynode and produce one or more secondary electrons. These electrons then strike the second dynode and release more electrons, then the third dynode and so on. With each new stroke more electrons are produced and the signal is amplified 10^4 to 10^7 times. The detector measures counts per sec (cps), stores the total signal from each mass (m/z) and gives the sample quality range,

generally measuring a few tens of ions per second. The size of each peak is proportional to the concentration of an element in the sample [1, 11].

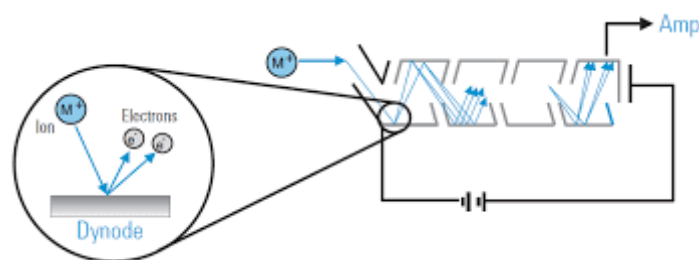


Fig. 1.13. Ion Detector [11]

1.4. Calibration and quantification

A typical ICP-MS is able to detect in the range of 1ng/L up to 100 mg/L depending on the element. Quantitative methods with ICP-MS include:

- External calibration (with or without internal standard)
- Constant addition method
- Semi-quantitative analysis
- Measurement of isotopic ratio
- Isotopic dilution (IDMS)

1.4.1. Quantitative analysis

It is obtained by external calibration (with or without internal standard) and is the most widely used method for liquid samples. It measures the signal strength of each element-selected isotope (counts on the detector) of interest and compares it with the signal strength of the calibration curve to find its concentration. Calibration curves are usually made using 3-5 standard solutions in the area of interest and additionally of the blank solution. Make sure that the reference-calibration solutions are as close as possible to the unknown solution. There is a possibility of simultaneous quantitative analysis of up to 36 data with an accuracy of $\pm 1-2\%$.

By performing quantitative analysis it is possible to record the full range of all the masses contained in the sample (regardless of whether or not they are of interest). Usually, the recording of the full spectrum takes 3-4 min with consumption of 2-3 mL sample.

1.4.2. Semi-quantitative analysis

It is used to quickly identify all the elements of a completely unknown sample, at any concentration scale (with deviations of 30% from the actual concentration values) [12]. Semi-quantitative analysis requires only the use of a calibration curve of a standard or a high-quality standard for semi-quantitative analysis, containing a minimum of three elements. Special software calculates up to 80 items in the totally unknown sample with a small deviation from the actual concentration values, so it is not necessary to calibrate the ICP-MS for each item in the sample.

1.4.3. Isotopic ratio, for isotopic analysis and isotopic dilution

Usually in each element analysis the principle isotope is measured rather than the isotope ratio or the natural abundance that is a constant in nature. For elements that have more than one stable isotope (approximately 80% of the elements of the periodic table) the isotopic dilution technique is applied. For example, the sample is “enriched” with a solution of a known amount of isotope and the change in the ratio of the peaks of the two isotopes is measured before and after dilution, (Fig. 1.14.). This is a better quantification because the enriched isotope has the same physicochemical properties as the analyte, while at the same time being the best possible internal standard that does not require a reference solution.

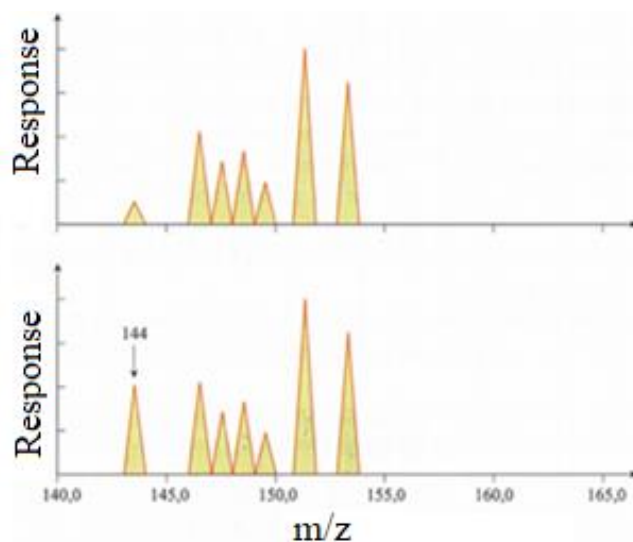


Fig. 1.14. Isotopic dilution method for the determination of the samarium element (Sn)
A. Samarium isotopes with their natural relative abundance B. Samarium enriched with the isotope ^{144}Sn [15].

An example of measuring the isotope ratio is Pb, where one isotope comes from its formation on earth, while the other is the result of the decay of radioactive substances,

so the isotope ratios differ depending on the source of the lead and in this case must be measured [17]. Isotope ratio determinations are used in a variety of geological, nuclear applications, in the identification of sources of pollution, sources of trace elements and impurities, and as tracers in biological studies.

(Fig. 1.15.) shows in color the elements analyzed by ICP-MS, while the white ones are not analyzed or have no natural isotopes. The bars, represent the number and natural abundance of isotopes of each element, also referred to as the isotopic fingerprint of the element.

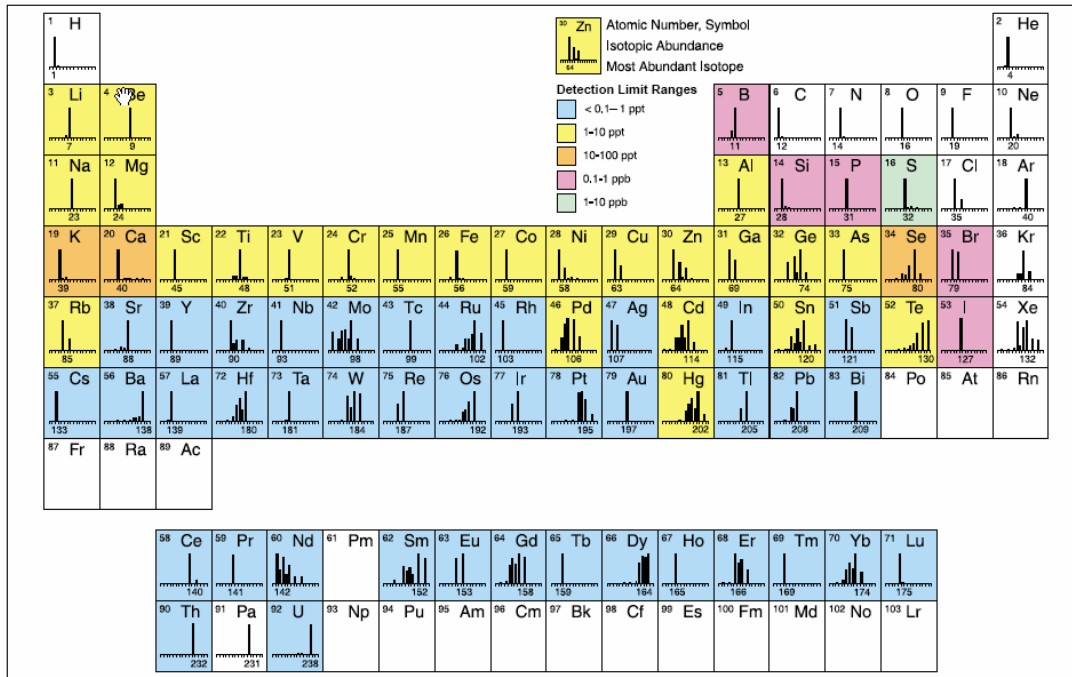


Fig. 1.15. Elements analyzed by ICP-MS [13]

1.5. ICP-MS mass spectrum

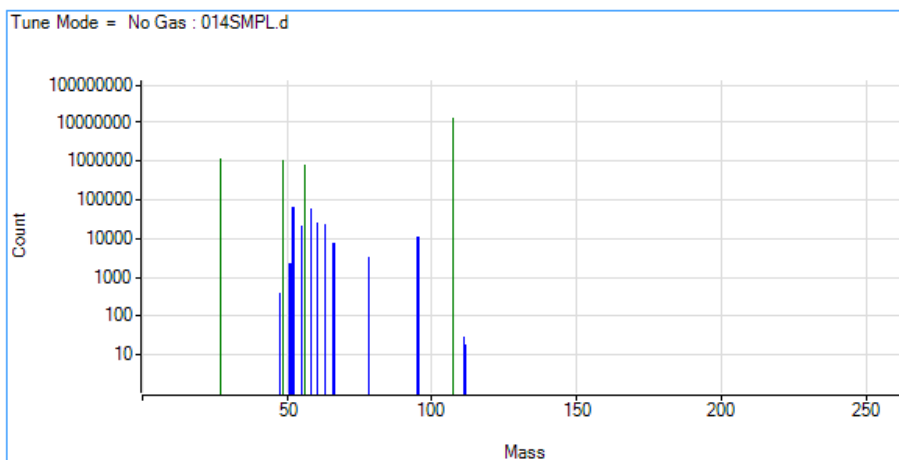


Fig. 1.16. ICP-MS mass spectrum [16]

1.5.1. Comparison of ICP-MS technique with other elemental analysis

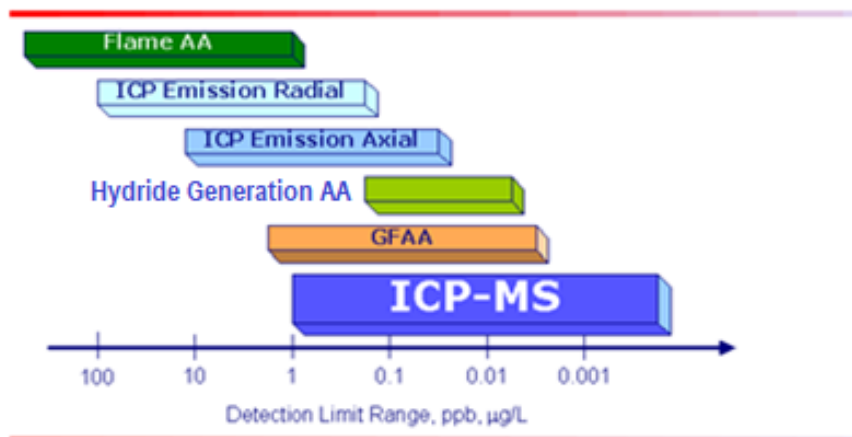


Fig. 1.17. Comparison of ICP-MS technique with other elemental analysis [12]

1.6. Laser Ablation- Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry, LA-ICP-MS

This technique uses the laser as a means of dissolving the samples and finds application in the direct analysis of solid samples (without prior solubilization) and without loss of material (non-destructive technique). In laser splitting, a strong laser beam strikes the surface of the sample, which is in the form of a lozenge in a chamber leaking argon, on a surface of a few square micrometers, resulting in the extraction and ejection of various small pieces of the sample. The atomized sample is swept by means of a stream of argon gas and inserted directly to the plasma atomizer (ICP), where atomization and ionization take place. The generated plasma enters the mass spectrometer for analysis (Fig. 1.18.) LSX-213 G2 Teledyne.



Fig. 1.18. LA-ICP-MS, ICP-MS Agilent 7700X coupled with LA LSX-213 G2 Teledyne [16]

References

- [1] ISO 17294-1 (2005), Water Quality of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-) - Part 1: General guidelines.
- [2] Agilent Atomic Spectroscopy-ICP-MS.
- [3] <http://www.analytical.gr/wp-content/uploads/2016/12/Agilent%20Atomic%20Spectroscopy-ICP-MS.pdf>
- [4] ICP-MS Principles and Hardware manual, Agilent Technologies, 2005
- [5] Aceto, M., (2016), The use of ICP-MS in food Traceability. In K. Miller (Ed.), Advances in Food Traceability Techniques and Technologies (pp. 137-164), UK: Woodhead Publishing.
- [6] Thomas, R. (2008), Practical guide to ICP-MS: a tutorial for beginners.
- [7] Thomas, R. (2004), Practical guide to ICP-MS, New York, N.Y.: Marcel Dekker.
- [9] Tyler, G. (2018), ICP-OES, ICP-MS and AAS Techniques Compared.” Horiba.
<https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcS03tC-yfKNFqMBnpowArasLbUCLYeZcuGbKA&usqp=CAU>
- [10] <https://www.researchgate.net/profile/Eliana-Alves-2/publication/329040300/figure/fig4/AS:694663832948740@1542632172204/Scheme-of-quadrupole-mass-analyzer-Q.png>
- [11] https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcSJ6MUCszTT3ix2Ah-L_HUBwVq1kr4sc8AlkrGnNY5K4raZIL3U-YdESnT5isEF2b3mA1c&usqp=CAU
- [12] The 30-Minute Guide to ICP-MS, https://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-74849tch_icpmsthirtyminuteguide.pdf
- [13] https://cdn.dal.ca/content/dam/dalhousie/images/sites/laser-ablation/periodic_table.gif.lt_d022ad9843332f674d7cc830a3f1f629.res/periodic_table.gif
- [14] <https://www.intechopen.com/media/chapter/69423/media/F5.png>
- [15] Μαρία Οξενκιούν-Πετροπούλου (2020), Φασματομετρικές Μέθοδοι στην Σύγχρονη Ενόργανη Ανάλυση, ISBN 978-618-5309-88-6.
- [16] Θωμάς Σπανός (2013), κεφάλαιο 13:Επαγωγικά Συζευγμένο Πλάσμα - Φασματομετρία Μάζας, Διεθνές Πανεπιστήμιο Ελλάδος.
- [17] Vachaecke F. and Degryse P. (2012), Isotopic Analysis: Fundamentals and Applications Using ICP-MS.

Chapter 2.

SPECTROSCOPIC METHODS ULTRAVIOLET-VISIBLE (UV-VIS) FOR ENVIRONMENTAL ANALYSIS

Christina Chatzichristou

Instrumental Analysis Techniques, International Hellenic University (IHU), Faculty of Natural Sciences, Department of Chemistry, St. Loukas, 65404 Kavala, Greece, chrichat@chem.ihu.gr

2.1. Introduction

2.1.1. Properties of Light

Spectroscopic methods are a group of analytical methods based on the interaction between light and matter.

Light is electromagnetic radiation that has properties of waves. Light waves are made up of pulsating electric and magnetic fields perpendicular to each other (Fig. 2.1.).

The wave is described either in terms of its wavelength (λ), the crest-to-crest distance between waves or in terms of the frequency (ν), the number of complete oscillations that the wave makes each second. The number of wavelengths per unit distance, or distance per circle is the reciprocal of the wavelength and is called a wavenumber [1, 2].

The relationship between the wavelength and frequency is given by the following equation:

$$\lambda = \frac{c}{\nu} \quad (2.1)$$

Where λ is the wavelength in centimeters (cm), ν is the frequency in reciprocal seconds (s^{-1}), or Hz (Hertz), and c is the velocity of light (2.998×10^{10} cm/s).

The wavenumber (symbol: $\bar{\nu}$) of a monochromatic light beam is the inverse of its wavelength and is measured in cm^{-1} :

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c} \quad (2.2)$$

The units used to describe the wavelength are as follows:

\AA = angstrom = 10^{-10} meter = 10^{-8} centimeter = 10^{-4} micrometer
nm = nanometer = 10^{-9} meter = 10 angstroms = 10^{-3} micrometer
 μm = micrometer = 10^{-6} meter = 10^4 angstroms

Generally, in the ultraviolet and visible region of the spectrum we express the wavelength in nanometers while in the infrared region in micrometers. Especially in the infrared region, wavenumbers are often used in place of wavelength, and the unit is cm^{-1} [2].

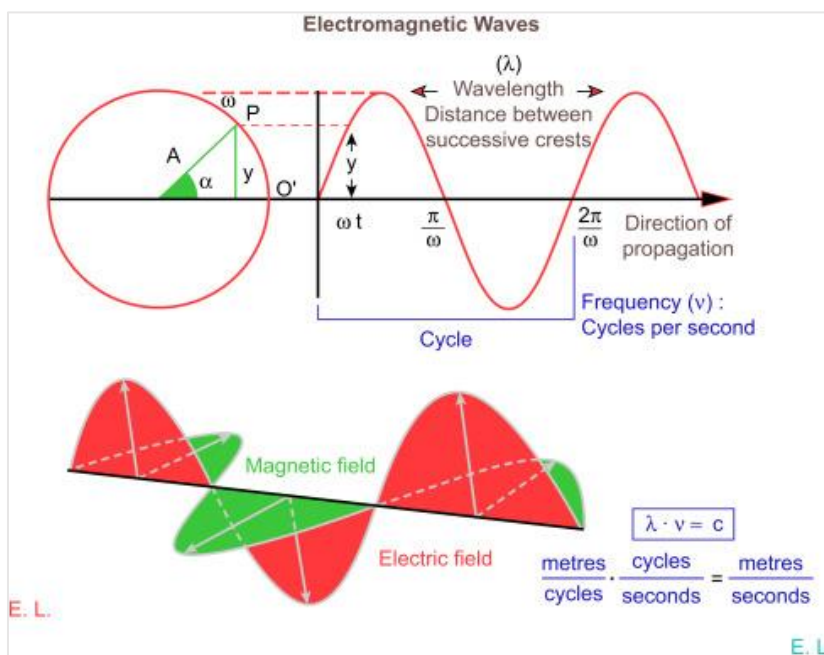


Fig. 2.1. Electromagnetic wave showing both the magnetic and electric fields [3]

In any electromagnetic wave, wavelength and frequency are related to the energy of a photon, E, by Planck's constant h (6.63×10^{-34} J·s) and c (2.998×10^{10} cm·s⁻¹), the velocity of radiant energy in a vacuum:

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (2.3)$$

The equation (2.3) shows that the shorter the wavelength or the greater the frequency, the greater the energy the higher the frequency, the higher the energy.

2.2. The Electromagnetic Spectrum

Electromagnetic spectrum covers a wide range of frequencies or wavelengths. Regions of the electromagnetic spectrum are labeled in (Fig. 2.2.). The types of atomic and molecular transitions that result from interactions of the radiation with a sample are also shown. The visible region, to which our eyes respond, is only a minute region of the entire spectrum.

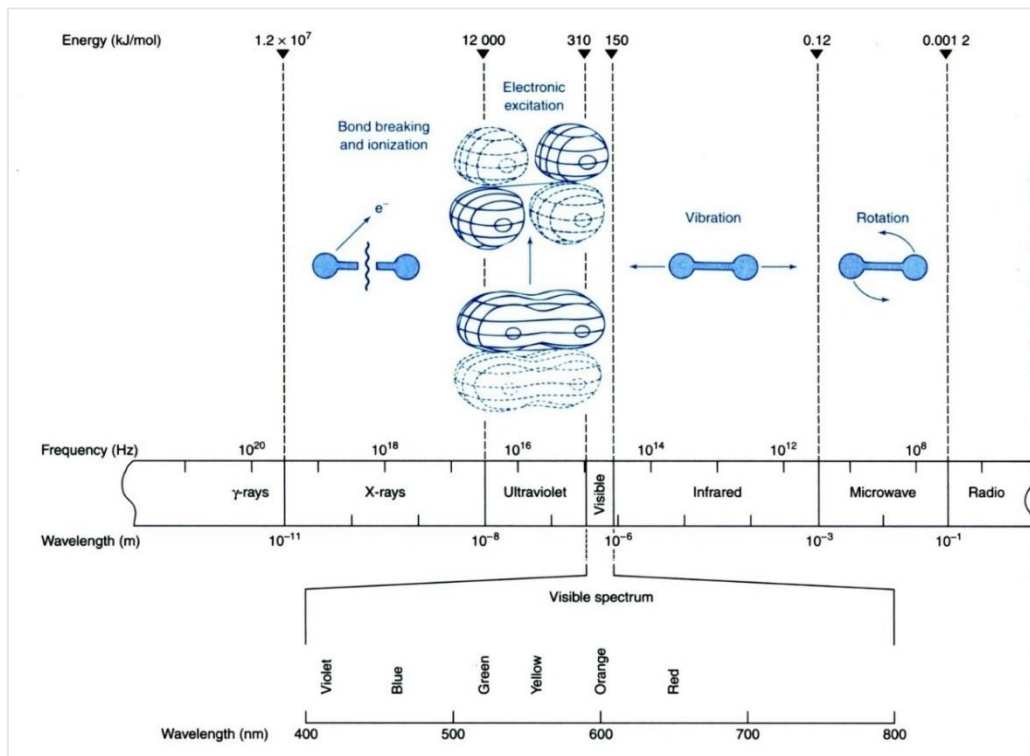


Fig. 2.2. Electromagnetic spectrum, showing representative molecular processes that occur when light in each region is absorbed. The visible spectrum spans the wavelength range 380-780 nanometers). (From the: D. C. Harris, "Fundamentals of Spectrophotometry," in Quantitative Chemical Analysis, Seventh ed., New York, W.H. Freeman and Company, 2007, p. 380) [1]

(Fig. 2.2.) Shows that the absorption of microwave radiation stimulates rotation of the molecules. The absorption of infrared radiation stimulates the vibrations. **Visible and ultraviolet radiation causes electron transitions to higher-energy orbitals**, while the absorption of X-rays and short-wavelength ultraviolet radiation, break the chemical bonds and ionize molecules.

Measurement principle

2.3. Bouguer-Lambert-Beer law

When monochromatic radiation of radiant power I_0 passes through a transparent cuvette of path length b cm, containing a homogeneous solution of a light-absorbing analyte, with concentration c mol.L⁻¹, its power is decreased to I because of absorption ($I \leq I_0$). The fraction of incoming radiation that passes through the solution is called Transmittance, and is given by the equation:

Transmittance:
$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2.4)$$

I_0 is the radiation coming in, I is the radiation coming out, (Fig. 2.3.).

T has the range 0 to 1. The percent transmittance is $100 \times T$ and ranges between 0 and 100%. If there is no absorption of the light passing through the solution, the transmittance is 100%.

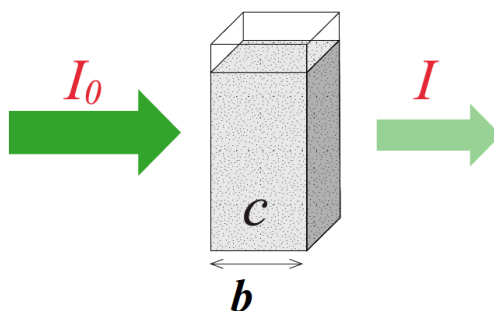


Fig. 2.3. Illustration of light attenuation because of the absorption while passing through an absorbing medium [10]

The most-used term in UV-Vis spectrometry to indicate the amount of absorbed light is the absorbance, defined as:

$$A = -\log T = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot b \cdot c \quad (2.5)$$

Where:

A and T are dimensionless sizes, ϵ is called molar absorptivity and has the units ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), b is the pathlength and commonly expressed in centimeters (cm) and c is the concentration of the analyte. C is usually given in units of moles per liter ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

The equation (2.5) is called Bouguer-Lambert-Beer law or simply Beer's law. According to this law, the absorption of the incident monochromatic radiation is directly proportional to the concentration of the absorbing analyte and the optical path of the cuvette in which the analyte solution is contained [4].

2.3.1. Deviations of the Beer-Lambert law

According to the Beer-Lambert Law equation (2.5) absorbance versus concentration plot, must be a straight line passing through the origin with a y-intercept of zero and a slope of ϵb . In many cases, a calibration curve deviates from this ideal behavior (Fig. 2.4.). These deviations from the Beer Lambert law can be classified into three categories:

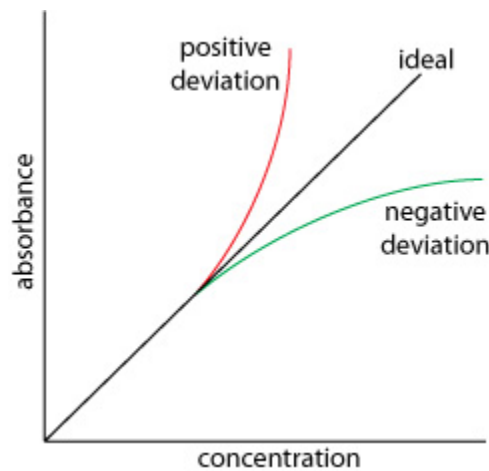


Fig. 2.4. Calibration curves showing positive and negative deviations from the ideal Beer's law [12]

- **Real Deviations:** These are fundamental deviations due to the limitations of the law itself. Beer law works well for solutions containing relatively low amounts of analyte (≤ 0.01 M). At concentrations greater than 0.01 M, the absorbing particles of the sample no longer behave independently of each other. The resulting interaction may change the analyte's absorptivity.
- **Chemical Deviations:** These are deviations observed when radiation-absorbing particles are coupled, dimensioned, or reacted with a solvent to produce products with a different absorption spectrum from the analyte.
- **Instrument Deviations:**
 - Beer's Law is applicable only for monochromatic radiation. Non-monochromatic radiation always results in a negative deviation from Beer's law. If the band of a wavelength selected on the spectrometer is such that the molar absorptivity of the analyte is essentially constant, deviations from Beer-Lambert law are minimal (Fig. 2.5.). For this reason, absorption measurements are taken at wavelengths near the wavelength of maximum absorption where the analyte absorptivity changes little with wavelength.
 - Stray radiation resulting from scattering or various reflections in the instrument, causes instrumental deviations.
 - Another deviation from Beer's law is caused by mismatched cells [1, 4, 5].

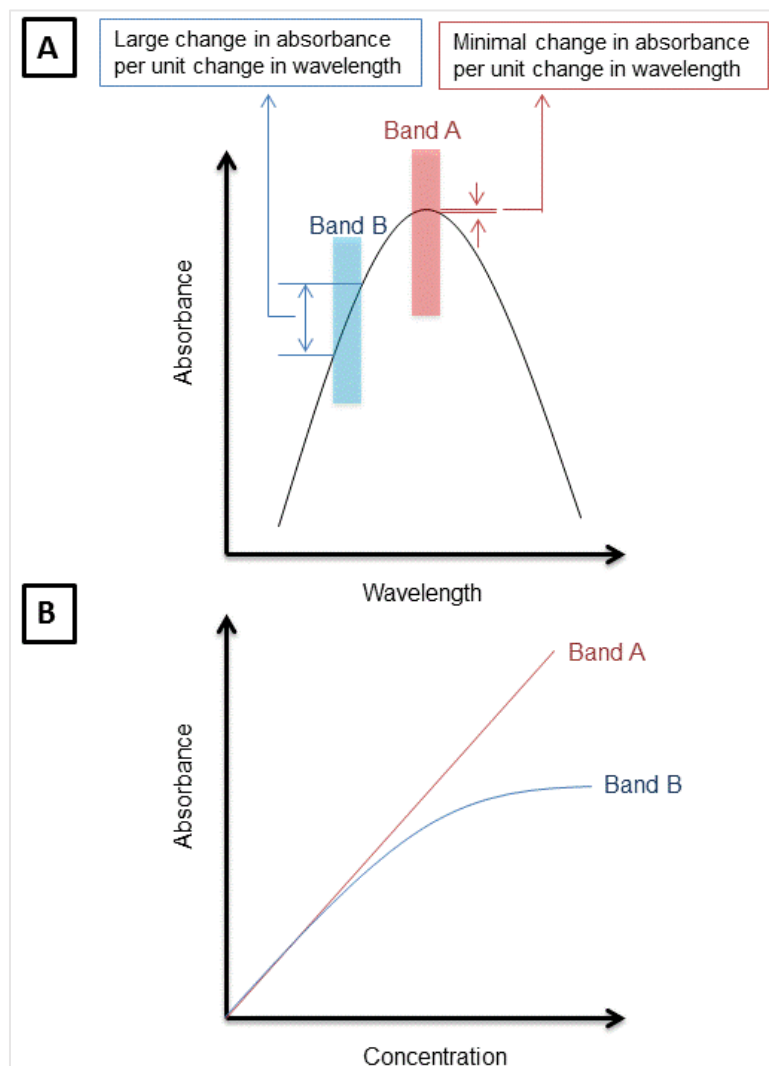


Fig. 2.5. The effect of polychromatic radiation upon Beer's Law [13]

2.4. UV-Vis Instrumentation

Most instruments used to measure absorption in the visible and ultraviolet region of the spectrum, regardless of the variations, consist of the following five parts: 1) a source of continuous radiation over the wavelengths of interest, 2) a monochromator for selecting a narrow band of wavelength from the source spectrum, 3) a sample cell, 4) a detector for converting radiant energy into an electrical signal, and 5) a device to read out the response of the detector (Fig. 2.6.) [4, 6].

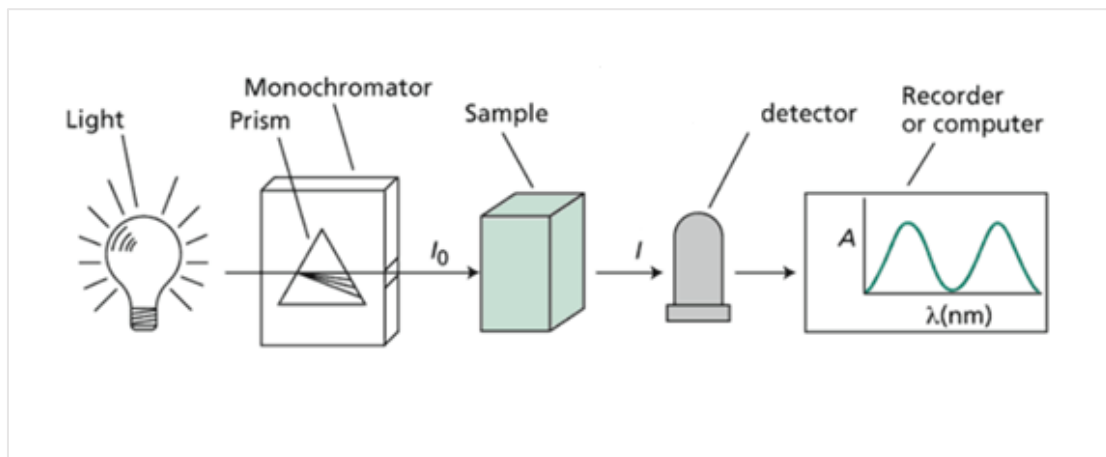


Fig. 2.6. Scheme of single beam UV-VIS spectrophotometer. Source:

<https://3005mit.wordpress.com/2016/04/05/lab-5-spectrophotometer>

2.4.1. Types of instruments

Although all spectrophotometers as mentioned above consist of the same basic components, however there are many differences between them depending on the area of use of the instrument, the manufacturer, the accuracy etc. [6].

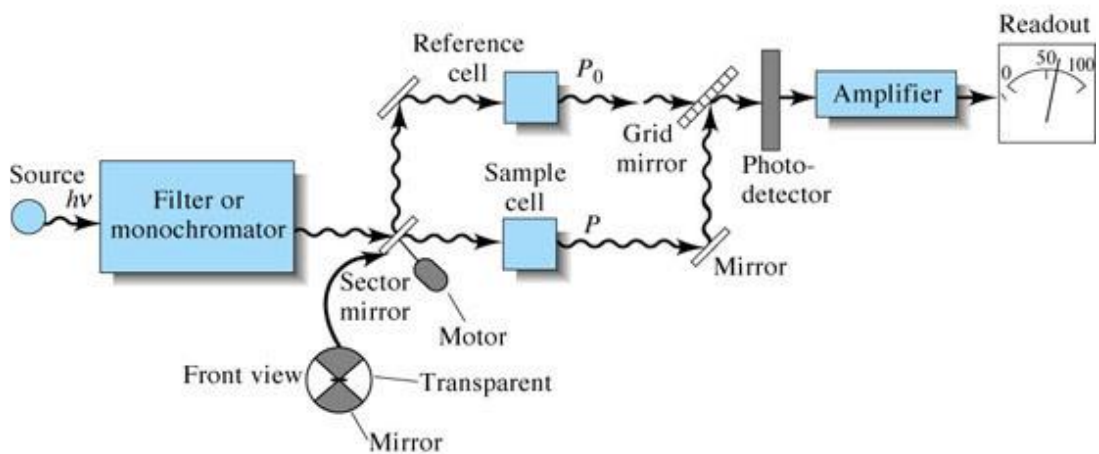
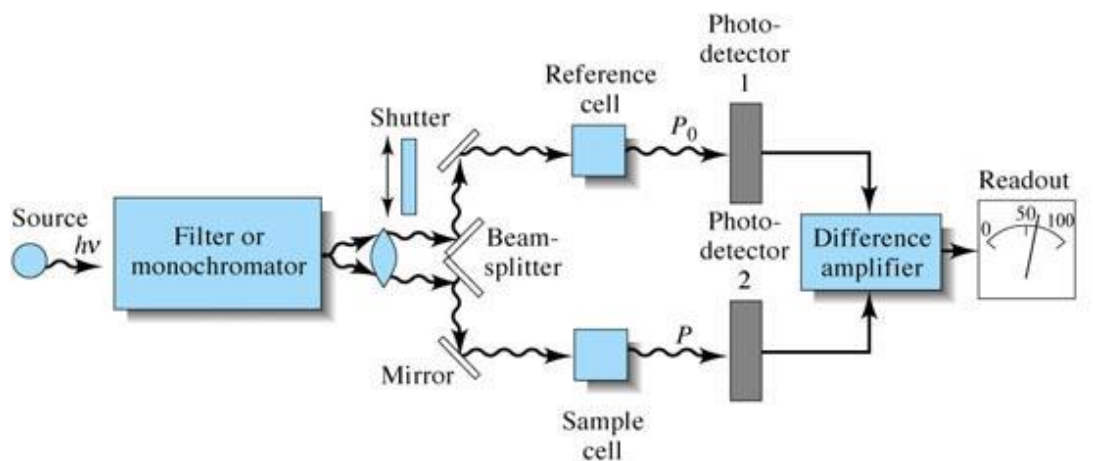
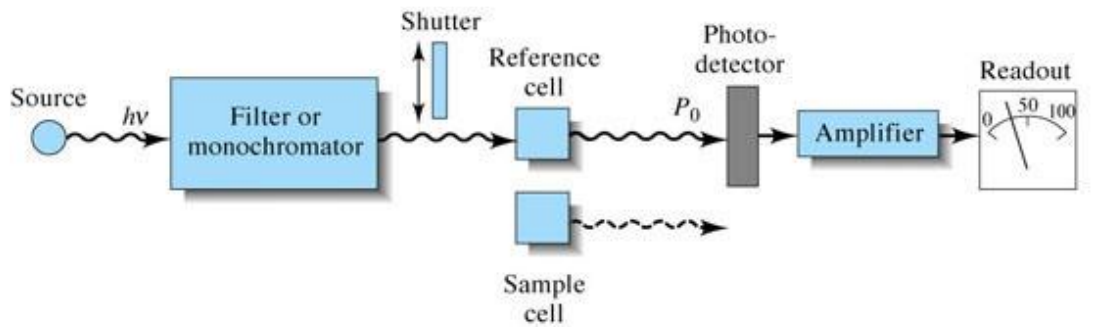
There are two major classes of devices: single-beam and double-beam.

Single-beam spectrophotometer: In a single-beam spectrophotometer, the monochromatic light beam passes directly through the sample solution held in the cuvette and then proceeds to the detector (Fig. 2.7.a). A single-beam spectrophotometer is difficult to use because the reference and the sample must be placed alternately in the beam. For measurements at multiple wavelengths, the reference must be run at each wavelength. Absorbance can also not be measured as a function of time (e.g., in kinetic experiments) because both the source intensity and the detector response slowly drift [1, 4, 7].

Double-beam spectrophotometer: In double-beam spectrophotometers, the light from the source, after passing through the monochromator, is divided into two separate beams: one for the sample solution and one for the blank or reference solution.

The split of the original beam can be done in two ways and there are two types of double-beam instruments: a double-beam-in-space instrument, in which two beams are formed in space by a V-shape mirror called a beam splitter (Fig. 2.7.b) and a double-beam-in-time instrument (Fig. 2.7.c), in which the beam is alternately sent through reference and sample cells before striking a single photodetector. These instruments are very useful for qualitative work in which the entire spectrum is required, and the

measurement becomes independent from variations in the intensity and spectral composition of the light source [1, 2, 4, 5, 6, 8].



© 2007 Thomson Higher Education

Fig. 2.7. Instrumental designs for UV-Visible spectrophotometers [5]

2.5. Developing a Quantitative Method for a Single Component using calibration curve

In developing a quantitative analytical procedure, the conditions under which give a reproducible linear relationship between the absorption and the concentration of the analyte must be found.

First, the most appropriate wavelength for the analysis is determined from an absorption spectrum. In most cases, the best wavelength corresponds to an absorption maximum leading to greater sensitivity and accuracy in the measurements.

The absorption spectrum in the visible and ultraviolet region of the analyte to be determined is obtained bibliographically or experimentally by means of a scanning spectrophotometer [4, 6, 9].

The next step in quantification according to the method of the calibration curve is to measure the absorbance of standards containing known concentrations of the analyte at the selected wavelength and construct a calibration curve to determine the range of concentrations for which Beer's law is valid. A sample of an unknown concentration can then be determined using the calibration curve [4, 9, 10].

In the following example, four standard solutions were measured at a selected wavelength and then the calibration curve was constructed by plotting the absorbance values as a function of the concentration (Fig. 2.8).

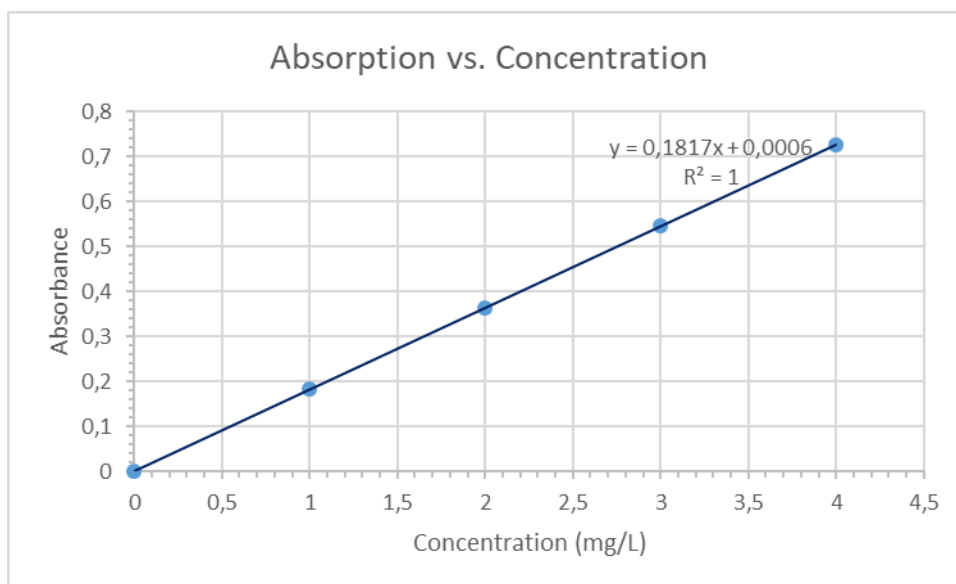


Fig. 2.8. Calibration curve

Using the calibration curve, the concentration of an unknown sample can be determined from its absorbance (Fig. 2.9.).

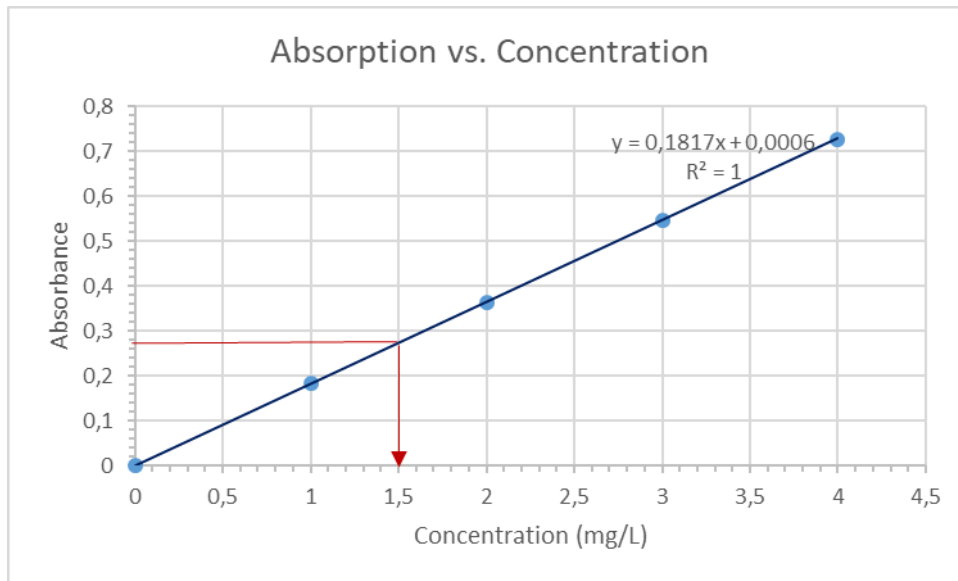


Fig. 2.9. Concentration determination of an unknown sample using calibration curve method

2.6. Applications of UV-Vis spectrophotometry in environmental analysis

UV-Vis spectrophotometry is a very useful analytical method in the analysis of environmental samples. Some of the UV-VIS methods are more widely used than other alternative methods due to their simplicity. An additional advantage of spectroscopy methods is that they easily are adapted to the analysis of samples in the field. Some of these methods are listed in Table 2.1.



Fig. 2.10. Environmental samples analysis with UV-Vis spectrophotometer [15]

Table 2.1 UV-Vis spectrometric (colorimetric) methods for the analysis of pollutants in waters and wastewaters [6,9,14].

Pollutant	Method	λ (nm)
As (III) or (V)	Arsenic in the sample is reduced to AsH ₃ , in acid solution, AsH ₃ reacts with silver diethylthiocarbamate in pyridine, forming a red complex.	535
Cr (VI)	Reacts with diphenylcarbazide in acid solution, forms a red-violet complex.	540
Fe (II) or (III)	Reduction to Fe (II) and forming an orange-red complex with o-phenanthroline in acidic solution.	510
Cl ⁻	Reaction with Hg(SCN) ₂ in an acidic solution in the presence of Fe (III), forming a highly colored [Fe (SCN)] ²⁺ .	480
NH ₄ ⁺	Ammonium forms with Nessler reagent K ₂ [HgI ₄] a yellow-brownish colored complex Hg ₂ OINH ₂ .	410
NO ₃ ⁻	Reacts with Cd to form NO ₂ ⁻ and then reacts with sulfanilamide solution. The produced diazonal ion is then reacts with N-(1-naphthyl)-ethylenediamine, forming a red colored azo dye.	540
PO ₄ ³⁻	Reaction with Ammonium molybdate to form a phosphomolybdate complex. This complex is reduced by ascorbic acid to intensely colored molybdenum blue.	690
SO ₄ ²⁻	Sulfate ions react with barium and form a barium sulfate suspension under controlled conditions. The resulting turbidity is determined spectrophotometrically at 420 nm	420
Phenol	Reacts with 4-aminoantipyrine and K ₃ Fe(CN) ₆ , forming yellow antipyrine dye	460

References

- [1] D. C. Harris, "Fundamentals of Spectrophotometry," in Quantitative Chemical Analysis, Seventh Edition ed., New York, W.H. Freeman and Company, 2007, p. 379.
- [2] G. D. Cristian, P. K. Dasgupta and K. A. Schug, "Spectrochemical Methods," in Analytical chemistry, Seventh Edition ed., John Wiley & Sons Inc., 2014, p. 479.
- [3] W. Emery and A. Camps, "Chapter 2 - Basic Electromagnetic Concepts and Applications to Optical Sensors," in Introduction to Satellite Remote Sensing: Atmosphere, Ocean and Land Applications, Elsevier Inc., 2017.
- [4] Δ. Γ. Θεμελής and Α. Σ. Ζώτου, Αναλυτική Χημεία, Θεσσαλονίκη: Ζήτη, 2017.
- [5] D. A. Skoog, J. F. Holler and S. R. Crouch, Principles of Instrumental Analysis, Thomson Brooks/Cole, 2007.
- [6] Θ. Π. Χατζηϊωάννου and Μ. Α. Κουππάρης, Ενόργανη Ανάλυση, Αθήνα, 2014.
- [7] J. Kenkel, Analytical Chemistry for Technicians Third Edition, CRC Press, LLC, 2003.
- [8] S. M. Nilapwar, M. Nardelli, H. V. Westerhoff and M. Verma, Methods in Enzymology, Elsevier Inc., 2011, pp. 59-75.
- [9] D. Harvey, Modern Analytical Chemistry, McGraw-Hill Companies, Inc., 2000.
- [10] C. A. De Caro and C. Haller, "UV/VIS Spectrophotometry - Fundamentals and Applications," 2015[Online]. Available: https://www.researchgate.net/publication/321017142_UVVIS_Spectrophotometry_-_Fundamentals_and_Applications. [Accessed 19 12 2020].
- [11] S. E. Manahan, "Frontmatter" Fundamentals of Environmental Chemistry, CRC Press LLC, 2001.
- [12] D. Harvey, "Overview of Spectroscopy," [Online]. Available: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Analytical_Chemistry_2.1_\(Harvey\)/10%3A_Spectroscopic_Methods/10.02%3A_Spectroscopy_Based_on_Absorption](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Analytical_Chemistry_2.1_(Harvey)/10%3A_Spectroscopic_Methods/10.02%3A_Spectroscopy_Based_on_Absorption). [Accessed 06 01 2021].
- [13] A. Mehta. [Online]. Available: <https://pharmaxchange.info/2012/05/ultraviolet-visible-uv-vis-spectroscopy-%E2%80%93-limitations-and-deviations-of-beer-lambert-law/>. [Accessed 07 01 2021].
- [14] C. Zhang, "UV-Visible and Infrared Spectroscopic Methods in Environmental Analysis," John Wiley & Sons, Inc., 2007.
- [15] Project, " BSB Monitox, Black Sea Basin interdisciplinary cooperation network for sustainable joint monitoring of environmental toxicants migration, improved evaluation of ecological state and human health impact of harmful substances, and public exposure

prevention," Expert Water Chemistry, Chatzichristou C., Chemistry Department, International Hellenic University, Greece.

CHAPTER 3.

GC-MS FINGERPRINTING OF PETROLEUM HYDROCARBONS IN FORENSIC ENVIRONMENTAL GEOCHEMISTRY

Sofia Mitkidou and Nikolaos Kokkinos

Instrumental Analysis Techniques International Hellenic University (IHU), St. Loukas, 65404 Kavala, Greece, Department of Chemistry, Hephaestus Advanced Laboratory, Division of Petroleum Forensic Fingerprinting, mitkidou@teiemt.gr, nck@chem.ihu.gr

Abstract

Oil is the most important source of energy and is the feedstock in the petrochemical industry for the production of most chemicals. However, in the oil and gas value chain there is always the risk of oil pollution of the environment. Oil pollution can be caused by maritime accidents, by leaks in refining, processing and distribution of petroleum products, but also by the disposal of drilling fluid wastewater. The characterization of oil pollutants and their connection with known sources is necessary not only in the assessment of environmental damage, but also in the selection of appropriate measures and ways to reduce pollution.

Petroleum fingerprinting is a powerful tool in Forensic Environmental Geochemistry. The identification of specific petroleum hydrocarbons targets is of great importance in the investigation of the environmental fingerprint of oil as it provides important information for the characterization and determination of the origin of petroleum pollutants. The ability of Gas Chromatography-Mass Spectrometry technique to separate, characterize and quantify complex mixtures of organic compounds with high sensitivity has made it an indispensable analytical tool. Target analytes are identified and quantified by the technique of selective ion monitoring (Single Ion Monitoring-SIM) in mass spectrometry. This study presents the utilization of Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) fingerprinting technique in the context of assessing petroleum hydrocarbon pollution in water samples and sediments from Nestos River area in Northern Greece. In addition, data were collected from the analysis of samples of both crude oil from offshore drilling in the Gulf of Kavala and from commercially available petroleum products, which are considered potential sources of pollution. The samples of the crude oil from Prinos and of the various petroleum products showed significant differences in the distribution of steranes (m/z 191), hopanes (m/z 217), methyl-dibenzothiophenes (m/z 198 and 212), as well as the

pristane / phytane (Pr / Ph). The results of the GC-MS analysis from both water and sediment samples revealed no oil pollution in the Nestos River area.

3.1. Introduction to chromatography

Tswett introduced chromatography as separation technique for the first time in 1906. The word “chromatography” comes from two Greek words “chroma” (color) and “graphien” (to write). Tswett’s work emphasized the separation of individual substances from both the matrix and from one another. The renaissance of chromatography started in 1931 after the publication of three important articles by German Edgar Lederer who based on Tswett’s previous published work [1].

Chromatography is defined as: “A physical method of separation in which the components to be separated are distributed between two phases, one of which is the stationary phase while the other is the mobile phase”[2]. Samples are dissolved in the mobile phase which travels through the stationary phase and separation occurs, because different compounds present different affinities between two phases resulting in their distinct distribution and behavior inside the system [3].

Many chromatographic techniques have been developed during time including column chromatography, paper chromatography, thin-layer chromatography (TLC), gas chromatography (GC), high-pressure liquid chromatography (HPLC), ion-exchange chromatography etc. [4]. Classification of chromatographic techniques is based on numerous criteria, the most important of which are the type of mobile phase, the shape of chromatographic bed and the type of stationary phase[5]. The mobile phase can be either a gas (GC) or liquid (LC) or a supercritical fluid (SFC) where stationary phase is usually a solid but it can also be a liquid [6].

Separations in the chromatographic system results from differences in the distribution constant K_c between several compounds that are going to be separated. Distribution constant (K_c) is defined as the ratio of the solute concentration in the stationary phase to its concentration in the mobile phase (Eq. 1.1). The higher the value of K_c the slower a compound moves through the chromatographic column and vice versa [7].

$$K_c = \frac{c_s}{c_m} \quad (\text{eq. 3.1})[7]$$

where: c_s is the concentration of the analyte in the stationary phase and c_m is its concentration in the mobile phase.

3.1.1. Gas Chromatography (GC)

The most widely used technique in oil industry is gas chromatography (GC). Due to the complex composition of petroleum and its products the role of gas chromatography is unambiguously very important since its introduction [8].

GC was basically introduced by James and Martin in 1952 who indicated for the first time that the chromatographic separation of organic compounds could be based on their volatility. Afterwards, in 1956 the first symposium on “vapor-phase” chromatography was arranged by the Hydrocarbon-Research Group of the Institute of Petroleum where significant predictions have been submitted [9]. Moreover, during the second international symposium in 1958 under the sponsorship of the Institute of Petroleum, Golay presented the advantages of the capillary columns and their application as a new technique in petroleum analysis. Therefore, GC has been widely accepted in oil industry [10].

Actually, GC is a column chromatographic method where the mobile phase is a gas and the stationary phase is either in solid or in liquid phase [6]. Gas liquid chromatography is the most common due to the advantage of separating the components based on the distribution between the liquid and gas phases. GC operation is based initially on the introduction of the sample via a septum in the injector in high temperature. A carrier gas (helium, hydrogen or nitrogen) transfer the sample onto the column where the stationary phase exists. Separation of mixture components occurs as mixture travels through the column and individual components of the sample exit the column in different times and enter the detector which provides a signal depending on the amount of eluting analytes (Fig. 3.1.). The abundance of each peak in a GC chromatograph is a relative measure of the amount of each component that exists in a sample depending on the type of the detector and the nature of the compound that is analyzed [3].

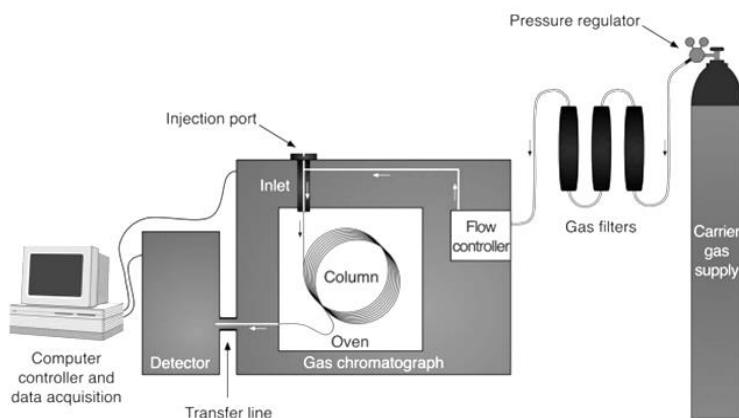


Fig. 3.1. Gas chromatograph instrumentation [3]

Stable volatile components of a mixture can be separated by their properties such as boiling point, molecular size and polarity [6]. Gas chromatography comprises a simple and rapid technique for investigation of volatile compounds of a mixture even in very complex samples [5].

Carrier gas is a permanent gas whose nature can affect separation characteristics of GC system and modify the sensitivity of detection. Most frequently used gases are helium and hydrogen due to their low molecular mass and diffusivity. Nitrogen also can be used, however its separation performance is poorer compared to helium and hydrogen and it is recommended for simple analytical procedures [5, 11].

In case of injectors they can be classified into vaporization and column injectors. A syringe is usually used for sample's introduction into the thermostatic injector causing rapid vaporization of the sample which mixes with carrier gas and moves inside the column. Columns that are used for GC can be divided into packed and capillary columns. Capillary columns are used more frequently, due to their higher separation capacity. The stationary phase is characterized by its film thickness (0.1-5 μm) which allows analytes to come into contact with the inner wall of capillary [11].

As chromatographic separation of compounds is based on their differences in the time they elute, retention time t_R (or better uncorrected retention time) comprises almost the most important feature of the chromatograph and it is a key tool for identifying components [12].

Specifically, it is a measure of the time from the injection of the sample into the system to the moment the component elutes from the column and is detected. Adjusted retention time t_R' can also be used and it is calculated by subtracting the dead time t_M corresponding to the retention time of a component that is not retained by the static phase (Fig. 3.2.). The retention time t_R under strictly defined chromatographic conditions can be considered a characteristic constant of the compound, but it is not considered a highly specific indicator as other compounds may also exhibit the same retention time. [3].

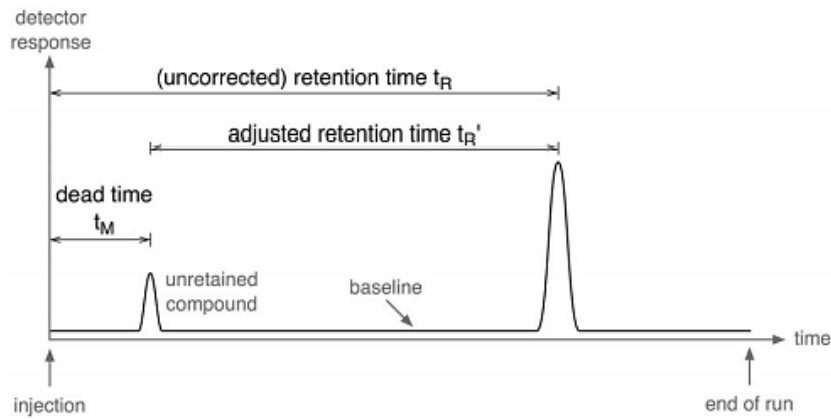


Fig. 3.2. Different retention times used in GC [3]

Chromatographic resolution R_s , is a function of column efficiency, selectivity and the capacity factor and mathematically can be expressed as:

$$R_s = \underbrace{1/4\sqrt{N}}_a \underbrace{\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right)}_b \underbrace{\left(\frac{k'}{k' + 1}\right)}_c \quad (\text{eq. 3.2.})[6]$$

where: a is column efficiency term, b is column selectivity term and c is capacity term.

Column efficiency can be calculated by:

$$N \left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2 = 16 \left(\frac{t_R}{w}\right)^2 = 5.5 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}}\right)^2 \quad (\text{eq. 3.3.})[6]$$

where: N is the number of theoretical plates, t_R is the retention time, σ is the standard deviation for a Gaussian peak, w is the peak width at baseline ($w = 4\sigma$)

and $w_{1/2}$ or w_h is the peak width at half height.

Theoretical plate number (N) is characteristic of separation capacity of a chromatographic column and can be calculated by:

$$N = 5.545(t_R/w_h)^2 \quad (\text{eq. 3.4.})[11]$$

Column selectivity refers to the distance, or relative separation, between two peaks (Fig. 3.3.) and is given by:

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{K_2}{K_1} \quad (\text{eq. 3.5.})[6]$$

where: a is separation factor, t_{R1} and t_{R2} are the retention times of components 1 and 2 respectively, t_0 (or t_m) is the retention time of unretained components, t'_{R1} and t'_{R2} are the adjusted retention times of components 1 and 2 respectively, K_1 and K_2 are the distribution coefficients of components 1 and 2, respectively.

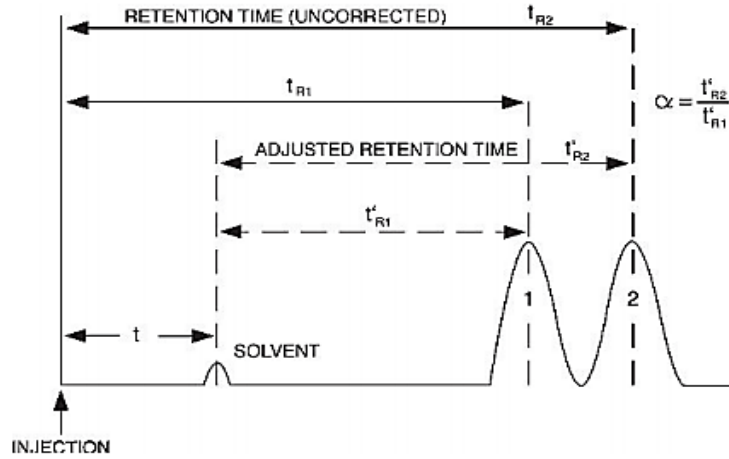


Fig. 3.3. Measurement of chromatographic retention [6]

Capacity or retention factor k' is a measure of the amount of time that a solute spends on the stationary phase relative to the mobile phase.

The higher the value of k' , the better the separation with broad peaks and long analysis times [6]. Capacity factor k' can be defined by the expression:

$$k' = \frac{V_R - V_0}{V_0} \quad (\text{eq. 1.6.})[13]$$

where: V_R is the retention volume of the solute and V_0 is the void volume of the solute.

In case of no change in the mobile phase flow rate occurs during the elution of the sample, capacity factor can be expressed as:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (\text{eq. 1.7.})[13]$$

where: t_R is the retention time of the solute and t_0 is retention time of unretained compounds.

Indicative differences between a chromatograph with non-optimal k' values and another one with more optimal k' values for the earlier and later eluting compounds is shown in (Fig. 3.4.) In the first chromatograph (a), there is a limited peak capacity and

the separation of a certain amount of compounds is possible within a certain period of time. On the contrary, in the second chromatograph (b) by lowering the temperature during the early portion of the chromatogram the retention factor raises and the components stay longer inside the column. Similarly, rise of the temperature during the latter portion of the chromatogram the retention factor decreases and the components leave the column faster [14].

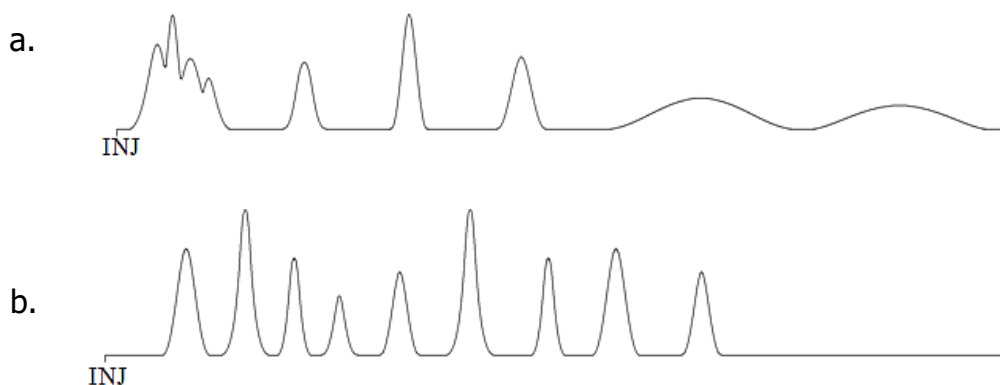


Fig. 3.4. Chromatographs with: a) non-optimal k' values and b) more optimal k' values [14]

3.1.2. GC Detectors

Together with the chromatographic column, detector comprises the heart of the chromatograph. Column separates the components but detector gives information about this separation. Without a detector, chromatography would be only a separation or a preparative technique [15].

GC detectors are classified by their mechanism of operation as concentration dependent, mass flow rate dependent or both of them. In case of a concentration detector, the signal is proportional to the concentration of the analyte in the carrier gas inside the detector cell whereas the signal of a mass flow detector is proportional to the mass flow rate of the analyte that spreads into the column cell by the carrier gas [15, 16].

An ideal detector requires some specific characteristics such as adequate sensitivity, reliability, detectability, specificity, linearity etc. [16]. Typical gas chromatography detectors as well as their applications, detection limits and their type are presented in Table 3.1.

Mass spectrometer (MS) is generally recognized as a high-powered detector for a gas chromatograph because of its high sensitivity and specificity, and its capability to

elucidate compound structure [17]. Target-compound analysis is one of the powerful advantages of GC-MS which has extensively applied in petroleum geochemistry [9]. Also, flame ionization detectors (FID) are widely used detectors for many types of hydrocarbons. However, it is difficult or impossible to identify several characteristic groups, such as biomarkers or PAHs using only GC-FID, as they are found at relatively low concentrations in oil and this specific method cannot provide information of individual molecules due to its two-dimensional data analysis [18].

Table 3.1 GC detectors and their characteristics [3]

Detector	Selectivity	Sensitivity	Linear	Type
Flame ionization detector (FID)	Most organic compounds	10–100pg	10 ⁷	Mass
Electron-capture detector (ECD)	Halides, nitrates, nitriles, peroxides, anhydrides, organometallics	50 fg	10 ⁵	Concentration
Thermal conductivity detector (TCD)	Universal	1 ng	10 ⁷	Concentration
Flame photometric detector (FPD)	S, P, Sn, B, As, Ge, Se, Cr	100 pg	10 ³	Mass
Nitrogen-phosphorus detector (NPD)	N, P	10 pg	10 ⁶	Mass
Photo-ionization detector (PID)	Aromatics, ketones, esters, aldehydes, amines, heterocyclics, organosulphurs, some organometallics	2 pg	10 ⁷	Concentration
Mass spectrometer (MS)	Universal Selective*	1 ng (scan) 1 pg (SIM)	10 ³ 10 ³	Mass

* In case of SIM (selected ion monitoring) operation mode.

3.1.3. Mass Spectrometry (MS)

Mass spectrometry is considered as a unique spectroscopic technique which is based on the generation of ions of organic or inorganic molecules (ionization process) that afterwards are resolved according to their mass-to-charge (m/z) ratio by subjecting them to electrostatic fields (mass analyzer) and finally detected (Fig. 3.5.). The uniqueness of this analytical technique is that it can combine both the detection and identification of an unknown compound [19]. The development of very high-resolution instrumentation has contributed to a huge amount of information regarding the composition of crude oil samples [20].

Mass analyzer is the most important part of mass spectrometer. Among different analyzers that have been used in terms of resolution, smaller units based upon quadrupole or ion trap technologies provide mass resolving power up to about 8,000. However, resolution can be improved by using FT-ICR MS (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance) or FT-Orbitrap analyzers [21, 22].

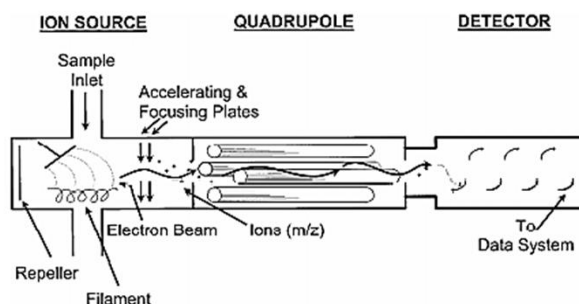


Fig. 3.5. Schematic of a typical mass spectrometer [19]

Typical mass spectra contain only positive fragment ions having charge +1. Hence, mass-to-charge ratio (m/z) is the molecular mass of the fragment divided by +1. An example of a mass spectrum is given in (Fig. 3.6.), where the relative abundance is plotted on y-axis and the m/z is plotted on the x-axis. The fragment (m/z) having the highest intensity is called base peak or base ion and is presented as 100% relative abundance. Furthermore, molecular ion or parent ion (M^+) is the fragment with the highest mass number and represents the positive charged molecule with m/z equal to the molecular mass of the compound. All other fragments originate from molecular ion fragment [19].

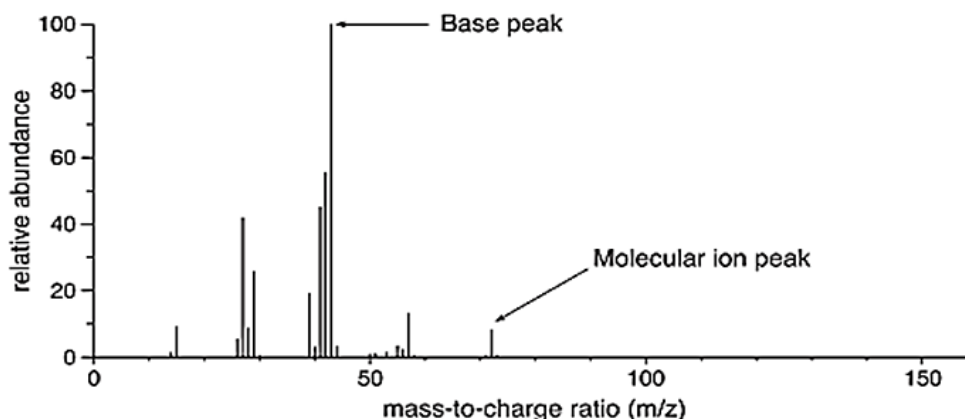


Fig. 3.6. Example of pentane mass spectrum [3]

Ionization method that is used in mass spectrometric detector characterizes the nature of data obtained. Several ionizations methods occur such as Electron Ionization (EI), Chemical Ionization (CI), Atmospheric-Pressure Chemical Ionization (APCI), Field Ionization (FI), Photoionization (PI) and others [23]. Certainly, there is not an ideal

ionization technique for all types of crude oil samples due to the complex character of petroleum components. Therefore, a combination of them is needed for an accomplished characterization of crude oils [22].

Electron ionization (EI) method is the most widely used among the others and it is based on the interaction of the analyte in gaseous phase with an electron beam (usually 70eV) which generates molecular radical ions that afterwards undergo decay forming fragment ions [23].

3.1.4. GC-MS

GC-MS is the synergistic combination of two powerful analytic techniques GC and MS [24]. It provides an accurate quantitation of volatile and semi-volatile compounds in petroleum samples [17]. Almost any gas chromatograph can be connected to a mass spectrometer providing a two-dimensional identification including GC retention time and mass spectrum for each component of the mixture [25].

In most cases a capillary GC column is interfaced directly to the MS detector via a heated capillary transfer line. The sample travels through GC column into the interface and then is processed by the MS detector. All of data obtained, are analyzed by a computer which converts the electrical impulses into visual displays and hard copy displays (Fig. 3.7.) [19].

Benchtop quadrupole GC-MS can be operated in several modes including scan (full) and selected ion monitoring (SIM). Scan mode refers to the case when mass spectrometer is used to scan the whole range of ions that are generated in the ion-source. Among these ions there are some characteristic and diagnostic of the compound of interest [27].

However, a significant disadvantage of quadrupole mass analyzers is the relatively low resolution due to long scan time and limited m/z range. Therefore, spectrum regions without ions of interest are recorded, while other useful ions do not reach the detector. Hence, at a particular time ions do not get into the interval of m/z values passed by mass detector. This fact actually leads to a decrease in sensitivity of scan mode to determine target compounds [23, 28]. Although they are inferior to magnetic field instruments in terms of sensitivity, resolution and superior mass range, their ease of use, relative accessibility, compact size and easy interconnection with GC or LC systems make them the most widely used mass spectrometers in the clinical laboratory.

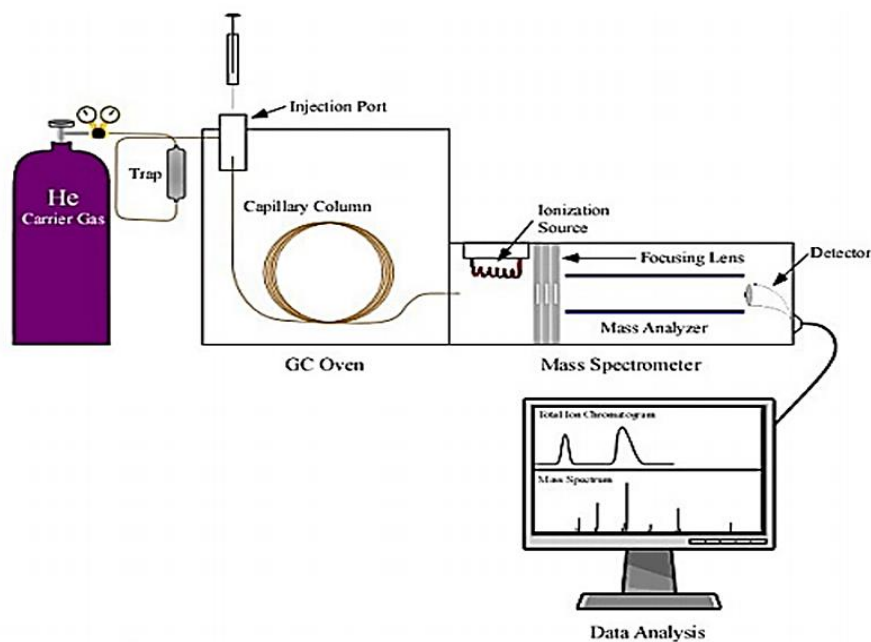


Fig. 3.7. Schematic of a GC-MS system [26]

A simple way to increase the sensitivity of the method is to use SIM (selected ion monitoring) mode. This technique allows the instrument to record the ion current at selected masses which are characteristic for the compound of interest. Thus, mass analyzer does not spend time scanning the entire mass range and it is set to monitor the intensity of specific m/z values. Furthermore, SIM mode decreases background noise providing selectivity into the experiment [24, 28, 29].

Reference spectral libraries are utilized by forensic scientists in order to have access to thousands of spectra trying to interpret and identify an unknown compound compared to a known one. However, in some cases where absolute identification is needed and similar isomers cannot be differentiated from one another, it is crucial to obtain a reference standard that can be run on the same instrument under identical conditions comparing mass spectra and retention times [3].

3.2. Petroleum Forensic Fingerprinting

“Fingerprinting” is called a group of techniques that helps in the identification of the sample’s origin or the identification of the pollutant, according to sample’s chemical composition [30].

Fingerprinting method started to develop for the first time in 1970 and its first application in realistic conditions was in the Exxon Valdez accident, where it was used for the identification of hydrocarbons in sea water up to their impact on aquatic life and the tracing for the suitability of food from the surrounding area for consumption.

Despite the fact that this method was initially designed for the identification only in aquatic systems, in the course it was improved in order to be able to get applied in plankton and in great depth soil samples [31, 32].

Characterization of spilled oils and their linking to potential sources is very important for environmental damage assessment, as accidental oil spills can cause severe damage to environment and ecosystem. Hence, successful forensic investigation and analysis of oil contaminants provides plethora of chemical fingerprinting data [17, 27]. Every crude oil exhibits a unique chemical fingerprint as it was formed under a variety of geological conditions and ages [18].

Analysis of specific petroleum hydrocarbons is of great significance in environmental forensics investigation as they provide important information for characterization and identification of oil spills. The selection of appropriate oil analytes for oil spill identification depends on the type of oil spilled, the specific environmental sections being assessed and on expected needs for comparison between current and future data [18].

Oil components targeted by analytical techniques like GC-MS can be classified into four main groups: 1) Individual saturated hydrocarbons including n-alkanes and isoprenoids, 2) EPA (Environmental Protection Agency) priority parent PAHs including their dominant alkylated homologues, 3) sulfur heterocyclic aromatic hydrocarbons and related alkylated homologues and 4) petroleum biomarkers that are polycyclic aliphatics [33, 34].

Target analytes are identified and quantified by characteristic ions from GC-MS in SIM modes. Overall distribution pattern and profile of oil constituents present differences between several oil samples and refined products (Fig. 3.8.) [18].

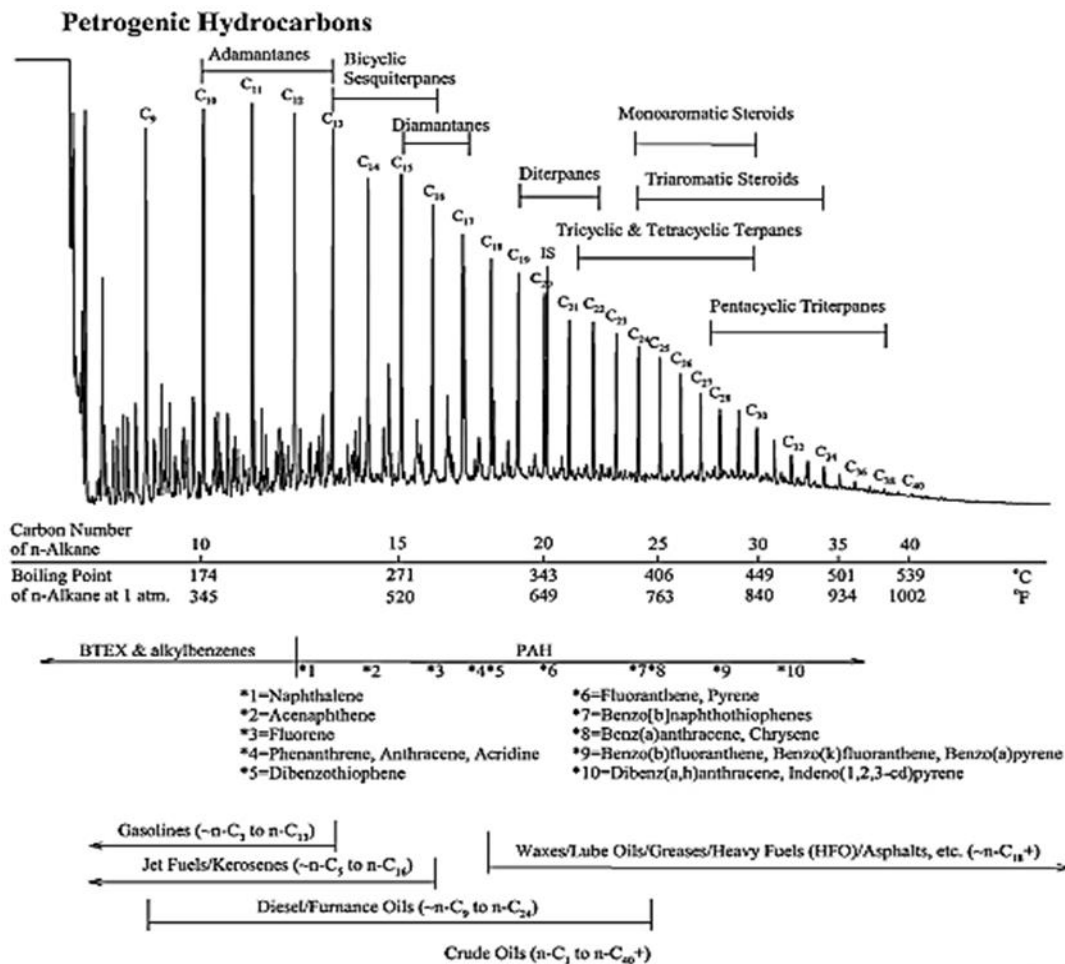


Fig. 3.8. Distribution of target compounds in GC-MS oil fingerprinting analysis [18]

3.2.1. Petroleum Biomarkers Analysis

Biomarkers are definitely a useful tool for petroleum exploration as they can provide information about depositional environment, age, initial organic matter etc. For instance, porphyrins, acyclic diterpanes, phytane and pristane originate from diagenesis and catagenesis of chlorophyll where the presence of steranes and hopanes can yield information about the age of source rock [35, 36].

Chemical analysis of biomarkers provides information of great significance to environmental forensics investigations [37]. Biomarker compounds are naturally occurring hydrocarbons, ubiquitous in crude oils and most petroleum products and more resistant to weathering processes compared to other compounds. Furthermore, their distribution is unique for different types of petroleum products representing specific fingerprinting which is particularly useful information in the correlation studies of oils or their products [38].

Saturated and aromatic biomarkers can be easily analyzed by GC-MS in SIM mode either on oil samples or on oilcuts. Electron impact is the most common ionization method which allows biomarker compounds generating characteristic fragment ions for each type of them [39]. Mass spectrometric fragmentation of common biomarkers is shown in Table 3.2. SIM mass chromatographs are used not only for quantification but also for biomarkers identifications increasing by this way the sensitivity of analysis [34, 39].

Table 3.2 Characteristic fragment ions of common biomarkers [40]

<u>Biomarker compound</u>	<u>Fragment ions (m/z)</u>
alkyl-cyclohexanes	83
methyl-alkyl-cyclohexanes	97
isoalkanes and isoprenoids	113, 127, 183
sesquiterpanes	123
Adamantanes	135, 136, 149, 163, 177, 191
Diamantanes	187, 188, 201, 215, 229
tri-, tetra-, penta-cyclic terpanes	191
25-norhopanes	177
28,30-bisnorhopanes	163, 191
Steranes	217, 218
5 α (H)-steranes	149, 217, 218
5 β (H)-steranes	151, 217, 218
X diasteranes	217, 218, 259
methyl-steranes	217, 218, 231, 232
monoaromatic steranes	253
triaromatic steranes	231

Normal alkanes (n-alkanes) fingerprints are widely used in organic geochemistry for inferring the source of sample's organic material. Also, long chain n-alkane content is used as indicator for depositional environment with marked terrigenous component [41]. Chromatograms that present an unimodal distribution from n-C10 to n-C33 with a maximum around n-C15 to n-C17, indicate an algal/microbial input to the organic matter while a bimodal distribution between n-C10 to n-C33 with maxima around n-C15 to n-C17 and n-C27 to n-C29 indicate an algal/microbial input with minor input of organic matter [42].

Acyclic isoprenoids are main components of plants, animals' tissues and bacterial cell walls. As chlorophyll is possibly the most ubiquitous molecule having an isoprenoid

chain, it could have significant contribution to organic matter in sediments. Occurrence of acyclic isoprenoids in biosphere comes from decomposition of phytol side chain of chlorophyll a molecule [43, 44].

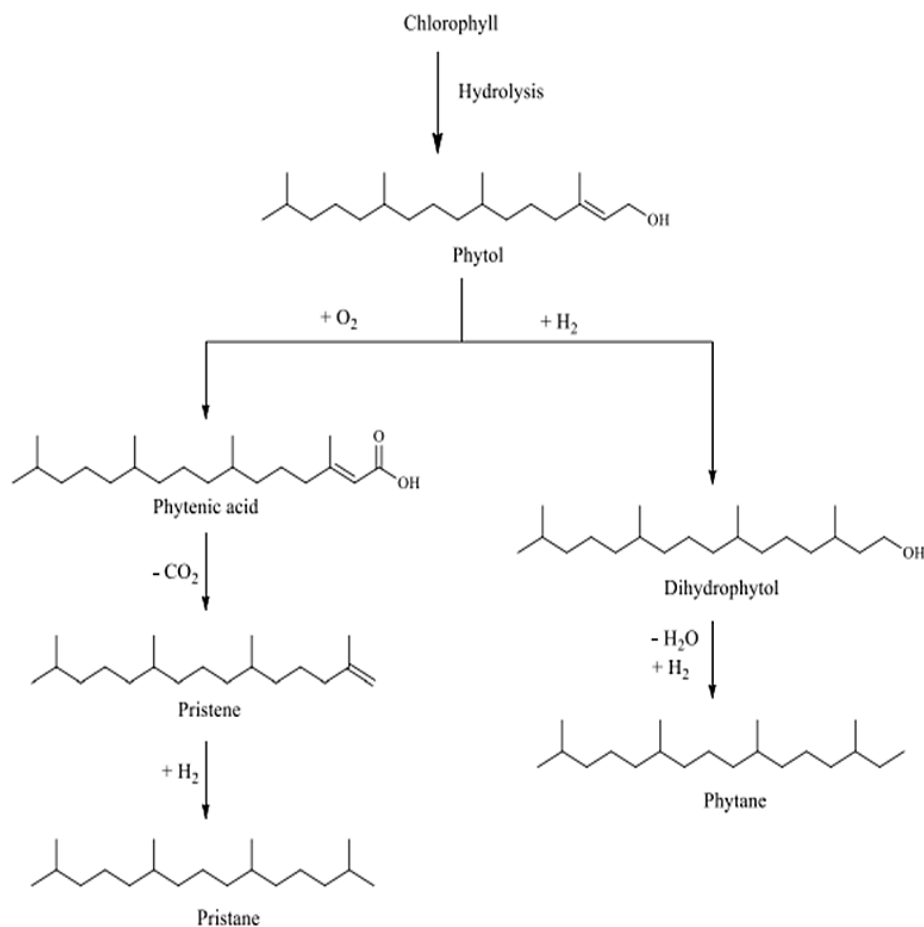


Fig. 3.9. Pristane and phytane formation from phytol [45]

Most abundant hydrocarbons that have been formed from repeating C₅ isoprene units and can be found in ancient sediments and petroleum are C₁₉ and C₂₀ regularly branched pristane and phytane respectively having head to tail linking of isoprene units. Pristane is produced under less anoxic conditions from dehydration and decarboxylation of phytol, whereas phytane under highly reducing conditions from reduction and dehydration of phytol (Fig. 3.9.) [45].

Triterpanes and steranes are the most common biomarkers found in crude oils and their middle and heavy refined products. Due to their relative resistance in to weathering processes they are considered as a very useful tool for forensics environmental investigations [46].

Hopanes are the most abundant pentacyclic triterpanes in most mature sediments and crude oils and mainly generate from C₃₅ bacteriohopanetetrol

(tetrahydroxybacteriohopane) and related bacteriohopanes which are found in lipid membranes of prokaryotic organisms [34, 47].

Gammacerane is a type of non-hopane type pentacyclic triterpane (Fig. 3.10.) that exists in trace amounts in almost all bitumens and oils and it is most abundant in sediments where it was formed by degradation of tetrahymanol which occurs in protozoa. Its occurrence indicates unusual saline environments like nonfreshwater lakes and marine sediments [45, 47, 48].

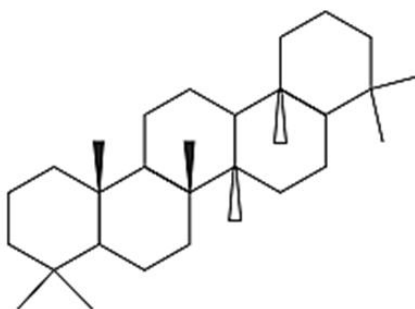


Fig. 3.10. Structure of gammacerane [45]

Oleanane is also another type of non-hopanoid pentacyclic triterpane which originates from Plantae having two isomers: 18 α (H)-oleanane and 18 β (H)-oleanane (Fig. 3.11.). Various oleananes have been found in extracts and oils from deltaic sediments and marine oils and specifically the alpha (α) configuration is the predominant in mature crude oil and rocks. As both structures present high resistance in biodegradation processes and water washing, oleanane is considered a very useful biomarker in oil-oil and oil-source correlations [45, 48, 49].

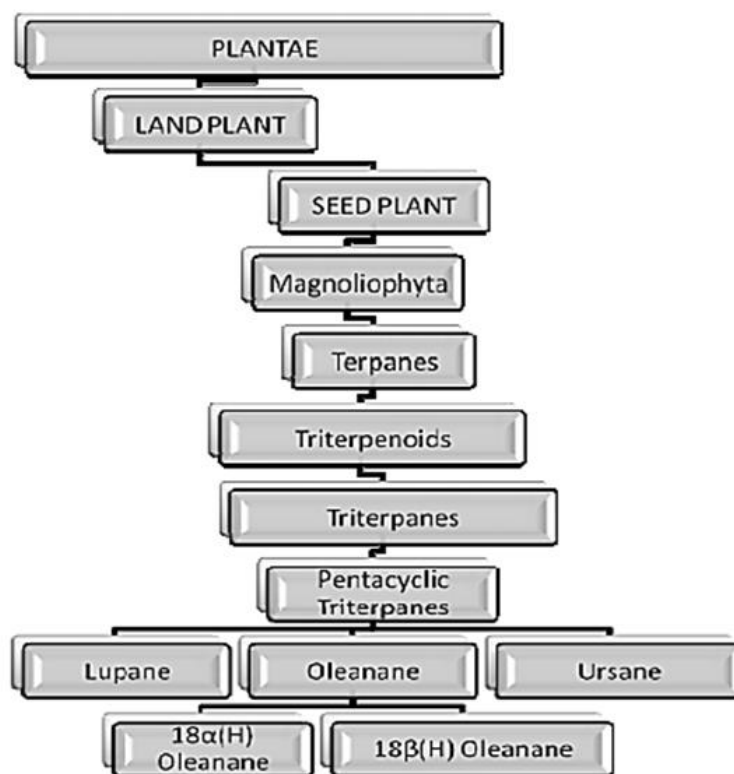


Fig. 3.11. Generation and classification of oleanane [49]

All hopanes yield a characteristic fragment ion with a m/z ratio of 191 whereas steranes of m/z 217 and 218, respectively [39]. The m/z 191 fragment is often the base peak of mass spectra of biomarkers. Generally, GC-MS chromatographs of terpanes (m/z 191) present a wide range in terpane distribution from C19 to C35 with C29 $\alpha\beta$ - and C30 $\alpha\beta$ -pentacyclic hopanes and C23 and C24 tricyclic terpanes being commonly the most abundant. In case of steranes (at m/z 217 and 218), the dominance of C27, C28 and C29 isomers are observed [37].

Typically, distribution patterns of biomarkers are different from oil to oil and by investigating several biomarker families' identification of oil contaminants and their potential source can be achieved [46].

3.2.2. Biomarker Diagnostic Parameters

Biomarker diagnostic parameters are widely used by geochemists for oil correlation, depositional environments, evaluation of thermal maturity and biodegradation in oil reservoir etc. Distribution of n-alkanes, Carbon preference index (CPI), degree of waxiness, steranes (m/z 217) distribution, triterpanes (m/z 191) distribution, presence of homohopanes and gammacerane as well as specific diagnostic ratios of biomarkers are some of the parameters that are used in oil fingerprinting [37].

As composition of most biomarkers between oil spilled samples and candidate source oils do not present any difference, comparison of diagnostic ratios (DRs) between them could be really beneficial because concentration effects are minimized. Furthermore, the differences of target biomarker distribution between samples are more obvious. DRs can either be calculated from quantitative (i.e., compound concentrations) or semi-quantitative data (i.e., peak areas or heights) [37, 40].

The ratio *pristane/phytane* (*Pr/Ph*) is one of the most widely used correlation parameter which indicates the depositional environment. In case of *Pr/Ph* ratio is less than unity highly reducing environments occur, whereas very high *Pr/Ph* ratios (more than 3) are related to terrestrial sediments. Finally, when *Pr/Ph* ratio is between 1 and 3, that is an indication of oxidizing environments [50].

Isoprenoids/n-alkanes (*Pr/n-C17* and *Ph/n-C18*) ratios are also very useful as they provide information about biodegradation, maturation and diagenetic conditions. In fresh crude oils and middle and heavy distillates, the *n-alkanes* C17 and C18 are more abundant compared to pristane and phytane respectively [37].

The ratio of *Ts* (*trisnorneohopane*) to *Tm* (*trisnorhopane*) more than (0.5) increases as the portion of shale in calcareous facies rises where generally high (>1) *C29/C30 hopanes ratios* in oils are generated from organic rich carbonates and evaporates [50, 51]. Finally, *sterane/hopane ratio* is relatively high in marine organic matter [37].

3.2.3. Weathering of biomarkers

After oil spilled into the water undergoes physical, chemical and biological alteration processes (weathering) which include spreading, evaporation, dispersion, dissolution, chemical oxidation, biodegradation, sedimentation etc. The concentration of hydrocarbon and non-hydrocarbon components varies among different sources [52].

In case of oil spilled on land, redistribution of oil components takes place in soil. Volatilization of lighter hydrocarbons into gaseous phase of porous medium causes hydrocarbon losses to the atmosphere, sorption onto solid particles or dissolution into soil water or groundwater. Separation of oil components occurs after their release into soil due to their different physicochemical properties [53, 54].

Weathering processes affect the status of biomarkers and crude oil constituents. Several biochemical reactions take place during weathering of petroleum biomarkers such as hydrolysis, cracking, metabolization etc. [55]. Resistance in biodegradation differs among several types of biomarker compounds, thus comparisons of their relative

amounts can be used to assess the biodegradation level. The concentration of fuel pollutants in soil or groundwater tends to decline with time due to biomineralization. Typically, n-alkanes are more biodegradable compared to other compounds and their disappearance in gas chromatographs is relatively fast. More heavily degraded oils present a large unresolved complex mixture (UCM or hump) in their chromatographs which is mainly composed of branched and cyclic compounds and biodegradation products [46].

A nine-scale level for biodegradation evaluation has been developed by Volkman et al. [56], according to which the first five levels rely on the removal of n-alkanes, isoprenoids, and alkylcyclohexanes whereas levels 7-9 can be identified by analysis of sterane and triterpane biomarkers Table 3.3.

Table 3.3 Levels of biodegradation based on the presence or absence of certain compounds [56]

Level of biodegradation	Compounds removed	Extent of biodegradation
1	None	Undegraded
2	Short n-alkanes	Minor
3	>90% of n-alkanes	Moderate
4	Alkylcyclohexanes; isoprenoids reduced	Moderate
5	Isoprenoids	Moderate
6	Bicyclic alkanes	Extensive
7	>50% of regular steranes	Very extensive
8	Steranes; hopanes reduced; demethylated hopanes abundant	Severe
9	Demethylated hopanes predominate; diasteranes formed; steranes gone	Extreme

3.3. PAHs and PASHs analysis

PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) are chemical compounds that consist of two or more fused aromatic rings. As environmental pollutants are considered those PAHs that contain from two up to seven benzene rings. Petrogenic and pyrogenic sources of PAHs cause environmental pollution where biogenic PAHs occur naturally in the environment. Thus, differentiation between the sources of PAHs is crucial in any case of forensics environmental investigation. Environmental forensic investigations can

certainly include both parent and alkylated PAHs combined with other compounds in order to enhance discrimination among the sources of PAH assemblages [57].

Pyrogenic PAHs tend to have fewer alkylated chains and fewer five-membered rings than petrogenic ones. Also, PAHs in 4-6 benzene rings are generally of pyrogenic origin and are produced mostly by the combustion of fossil fuels and organic materials. Some PAHs have been proposed as indicators of origin. Oil combustion is associated with high concentrations of the most volatile PAHs, such as fluorine, fluoroanthene and pyrene. Certain indicators are usually used to determine the origin of PAHs. Specifically, Phe/Ant values greater than 10 are attributed to PAHs of petroleum origin (e.g. value 14 is attributed to crude oil origin), while values less than 10 indicate pyrolytic origin (e.g. values 4-10 are attributed to gasoline combustion).

Determination of APAHs is based on their prominent parent ions. In case of methylated PAHs, the methyl on one hexagonal ring generally generates a characteristic $[M-H]^+$ ion with a seven carbon ring, whereas C2- or higher APAHs could lose methyl or longer alkyl fragments simultaneously to form $[M-15]^+$ and subsequently $[M-29]^+$ ions and so on. Analysis of alkylated PAH homologues commonly relies upon standardized GC-MS technique operating in SIM or single ion extraction (SIE) mode [58].

Compounds like benzothiophene (BT), dibenzothiophene (DBT), benzonaphthothiophenes (BNT) and their alkylated homologous series belong to (polycyclic aromatic sulfur hydrocarbons) PASHs family [59]. Identification peaks of DBT, isomers of methyl dibenzothiophene (MDBT) and isomers of dimethyl dibenzothiophene (DMDBT) and ethyl dibenzothiophene (EDBT) in crude oil can be achieved by operating GC-MS in SIM mode at m/z 184, 198 and 212, respectively [60].

3.3.1. Weathering of PAHs

PAHs having less than five rings are usually biodegradable by bacteria under aerobic conditions, but there is also evidence of anaerobic degradation. Specifically, alkylated PAH homologues have been widely used as environmental fate indicators and source-specific markers of oil pollutants [46].

Generally, non-alkylated PAHs are more susceptible to biodegradation than alkylated ones and hence weathering increases the proportion of more alkylated PAHs. Furthermore, several studies have shown that more weathered oils have a higher relative abundance of chrysenes and consequently a decrease in the relative ratios of

the sum of naphthalenes, phenanthrenes, dibenzothiophenes, and fluorenes to the sum of chrysenes was also observed [61, 62].

Crude oils and refined products from disparate sources present different PAH distribution patterns. Furthermore, PAHs are more resistant to weathering compared to their saturated hydrocarbon counterparts and volatile alkylbenzene compounds, thus PAHs are one of the most valuable fingerprinting compounds for oil identification. Some EPA priority parent PAHs and petroleum-specific alkylated (C1-C4) homologues of selected PAHs (alkylated naphthalene, phenanthrene, dibenzothiophene, fluorene, and chrysene) are widely used to meet the needs of an efficient oil investigation [63].

3.4. Methodology for determination of hydrocarbons in environmental samples

The experimental procedure for the determination of petroleum hydrocarbons in environmental samples is based on defined protocols and includes the sampling, preservation of the samples, the acquisition of the mixture of organic compounds by extraction techniques, the separation of the components by chromatographic spectroscopic techniques.

3.4.1. Sampling

The selected sample must be representative of all the water or sediment under study. Moreover, the sampling points must also represent the location of possible sources of contaminants. The sampling equipment has been prepared in the laboratory before sampling. All apparatuses should be thoroughly washed with detergent and water and rinsed with organic solvents. For the sampling of water samples for the determination of hydrocarbons, pure dark colored 2L glass bottles are used. The flask is rinsed with the sampling water and filled to the brim, overflowed, sealed and marked with the date and place of sampling. The bottles are stored in portable refrigerators with ice packs so that the samples are protected from the effects of light and heat until they are transported to the laboratory. For better preservation, it is desirable to acidify the sample with hydrochloric acid at pH1-2. In the laboratory, both water samples and pellet samples are stored in a refrigerator at 1-5 °C prior to analysis. The shelf life of the samples is 14 days, while the extracts can be stored for 40 days prior to analysis by GC-MS. To ensure the reliability of the analysis and to reduce accidental errors, blank samples and double samples are analyzed simultaneously, which are stored and processed with exactly the same method. The blank samples contain pure water instead

of the sampling material. The analysis of duplicate samples involves processing and analyzing the same sample twice, as two different samples in a random position.

3.4.2 Organic extract from water samples

The most commonly used extraction method for petroleum hydrocarbons in aqueous samples is liquid-liquid extraction, EPA 3510. In general, liquid-liquid extraction achieves separation of the compounds based on solubility in different immiscible liquids. Methylene chloride or a mixture of dichloromethane and n-hexane in a 1:1 ratio is used as extraction solvent. An amount of 500 mL water sample is initially shaken mechanically with 50 mL of solvent for 15min. The extraction is repeated three times with 50 mL of solvent each time (total 150 mL of extract). The extracts were dried through a chromatographic glass column containing anhydrous sodium sulfate and concentrated using a rotary evaporator to a final volume of 5 mL. Further evaporation of the solvent is achieved by the introduction of a gentle stream of nitrogen.

3.4.3 Separation by column chromatography

The complexity of the oil samples creates the need to separate them into individual fractions-groups of components. The most common technique used to separate the oil into individual fractions is the open column chromatography with adsorbent, aluminum oxide (Al₂O₃) or silica (SiO₂). First the saturated components are obtained by eluting with a soluble hydrocarbon, usually pentane or hexane, then by toluene the aromatic components are eluted and finally, by a 6:4 toluene-methanol mixture the hetero-compounds of nitrogen, sulfur and oxygen are obtained.

3.4.4 Recovery control and standard compounds

The o-terphenyl compound in solution with dichloromethane at a concentration of 100 ppm was used as a surrogate to control the recovery during the extraction process of the samples. Solutions of a mixture of n-alkanes, from C₁₂ to C₃₂ and of the polyaromatic hydrocarbons, naphthalene, fluorine, phenanthrene and anthracene were used as reference solutions. Sample of crude oil from the drillings of Prinos-Kavala and samples of petroleum products, jet oil, gasoline, motor oil, heating oil, marine oil, were used for spiking samples of clean water and clean sand.

3.4.5 Acquisition of organic extract from sediment samples

Soxhlet extraction is used, or sonication extraction. During Soxhlet extraction, the sample is placed in a special disposable porous case, which allows material to be moved. Continuously refluxing solvent flows through the porous material and dissolves the analytes, which are continuously collected in a boiling flask.

In the ultrasonic extraction, the sample is placed in a suitable organic solvent in an ultrasonic bath. The ultrasonic extraction technique is simple and easy; the extraction time is reduced, smaller volumes of solvents are used and many samples are extracted at the same time.

15 g of precipitate was mixed with 20 g of anhydrous sodium sulfate to dry the sample. Each mixture was extracted twice with a mixture of 50 mL dichloromethane and 5 mL methanol for 30 min each time. Simple filtration followed and the collected filtrates were dried over sodium sulfate and then first condensed with a rotary evaporator and then under a stream of nitrogen.

3.4.6 Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

The identification and quantification of hydrocarbons is done by gas chromatography - mass spectrometry. The Agilent 6890N gas chromatograph system equipped with MSD5975B mass spectrometer detector and capillary column with the following characteristics was used: DB-XXL, length 30 m, internal diameter (i.d.) 0.25 mm, coating thickness 0.25 μm . An Agilent 7683 series automatic sampler was used for the introduction of the samples with a 5 μL microsyringe, while the injection volume was 1 μL . Helium gas was used as the carrier gas. The carrier gas flow was constant throughout the analysis, 1.8 mL/min. The samples were introduced by split mode and a 1:10 split ratio. The column temperature was maintained isothermally at 50 $^{\circ}\text{C}$ for 2 minutes immediately after injection, then increased from 50 $^{\circ}\text{C}$ to 150 $^{\circ}\text{C}$ at a rate of 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and then increased to 300 $^{\circ}\text{C}$ at a rate of 6 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and maintained at the final temperature for 10 minutes. The ionization and fragmentation of the substances was performed by electron impact. The ionization conditions were: ionization energy 70 eV, ion production source temperature 250 $^{\circ}\text{C}$. The sample transfer line to the detector was kept constant at 280 $^{\circ}\text{C}$.

A full scan mode with a mass range of 50 to 700 and a Single Ion Monitoring technique (SIM mode) was used for analysis purposes. The data were processed with Agilent's

Chemstation software program enriched with the NIST MS Search V2.0 spectrum library. The identification of the components through their mass spectrum was done based on their structural characteristics, with the help of the NIST electronic library and bibliographic data.



Fig. 3.12. Agilent 6890N Gas Chromatograph coupled with a MSD 5973B

3.5. Results and discussion

3.5.1 Study area

The Study area of this work included Nestos River and the surrounding area in Northern Greece (Fig. 3.13). Nestos River is one of five biggest rivers in Greece and comprises the natural border between Macedonia and Thrace. It springs from Rila Mountain in Bulgaria having a total length of 234km, from which 135 belong to Greek land. As empties into Aegean Sea, Nestos forms its delta which is considered as a nature of miracle accommodating a variety of habitats, flora and fauna species and protected by RAMSAR Convention [64].

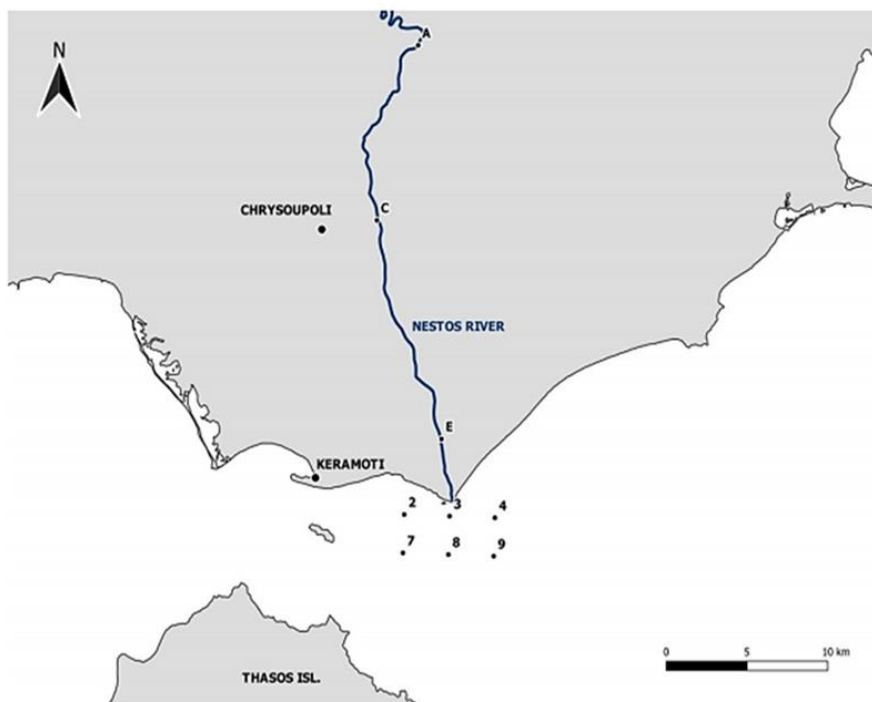


Fig. 3.13. Map of study area indicating the positions from where samples were taken across the river from the deltaic area and from the sea

3.5.2. Use of biomarkers in the correlation of petroleum pollutants

Identification of petroleum hydrocarbons and differentiations between crude oil and petroleum products were based on total ion chromatographs (TIC) and extracted ion chromatographs (EIC) of the spiked water and sediment samples.

For the study of the correlation of the samples with each other the following criteria were used:

- i. The shape of chromatograms corresponding to the peaks of n-alkanes in chromatograms.
- ii. The ratio between n-alkanes with even and odd numbers of carbon atoms.
- iii. The ratio between phytane and pristane.
- iv. The presence of parent and alkylated PAHs.
- v. The presence of alkyl-substituted and unsubstituted aromatic hydrocarbons.
- vi. The presence of sulfur heterocyclic aromatic compounds.

The analysis of TIC chromatograms of both the crude oil sample of the Prinos-Kavala basin and the samples of petroleum products indicates that the main components in all samples are normal alkanes. However, there are significant differences between the samples, both qualitatively and quantitatively. For example, in the gasoline and jetfuel chromatogram, peaks appear only within window C9-C13 of n-alkanes (Fig. 3.14.). In

general, the identification of gasoline in the environment is difficult, as volatile hydrocarbons evaporate rapidly. Gasoline chromatograms of the spiked samples after three days at room temperature showed significant differences from the original samples with obvious evaporation of most components (Fig. 3.15.). Usually, the identification of gasolines is based on the detection of characteristic compounds, which are used as additives, such as methyl tert-butyl ether (MTBE).

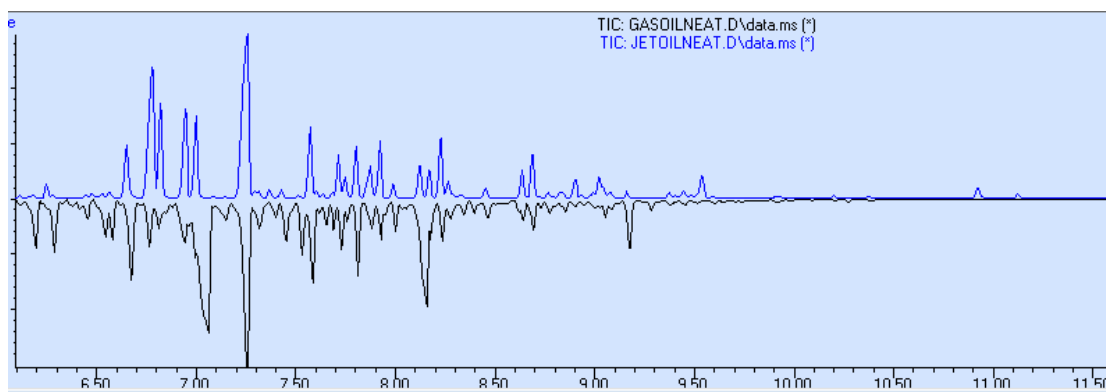


Fig. 3.14. Comparison of GC-MS TIC of gasoline and jet fuel samples

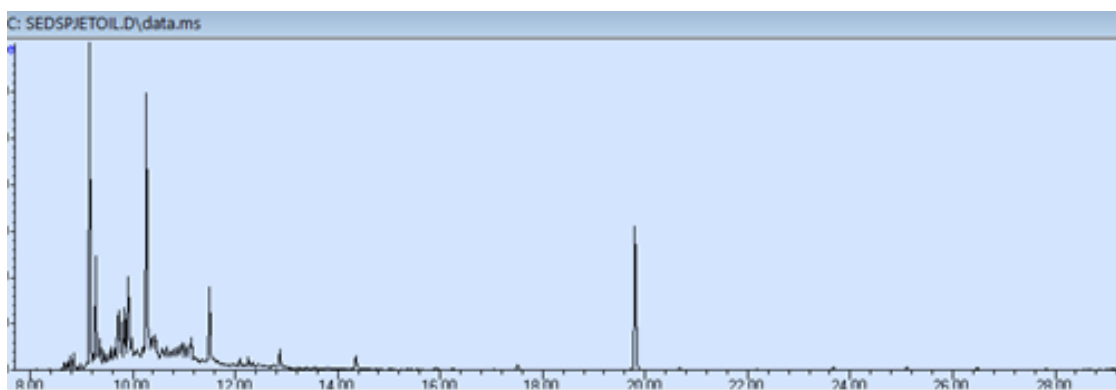


Fig. 3.15. GC-MS TIC of spiked sediment sample with jet fuel after three-day stay

The n-alkanes of the diesel fuel samples distribute in a carbon range from n-C10 to n-C29, much narrower than the carbon range from n-C8 to n-C40 for crude oil sample. Low molecular weight hydrocarbons were evaporated under experimental conditions (Fig. 3.16.). It is also indicated that gasoline samples contain higher amounts of cycloalkanes and aromatic compounds (EIC m/z 105) compared to diesel samples (Fig. 3.17.).

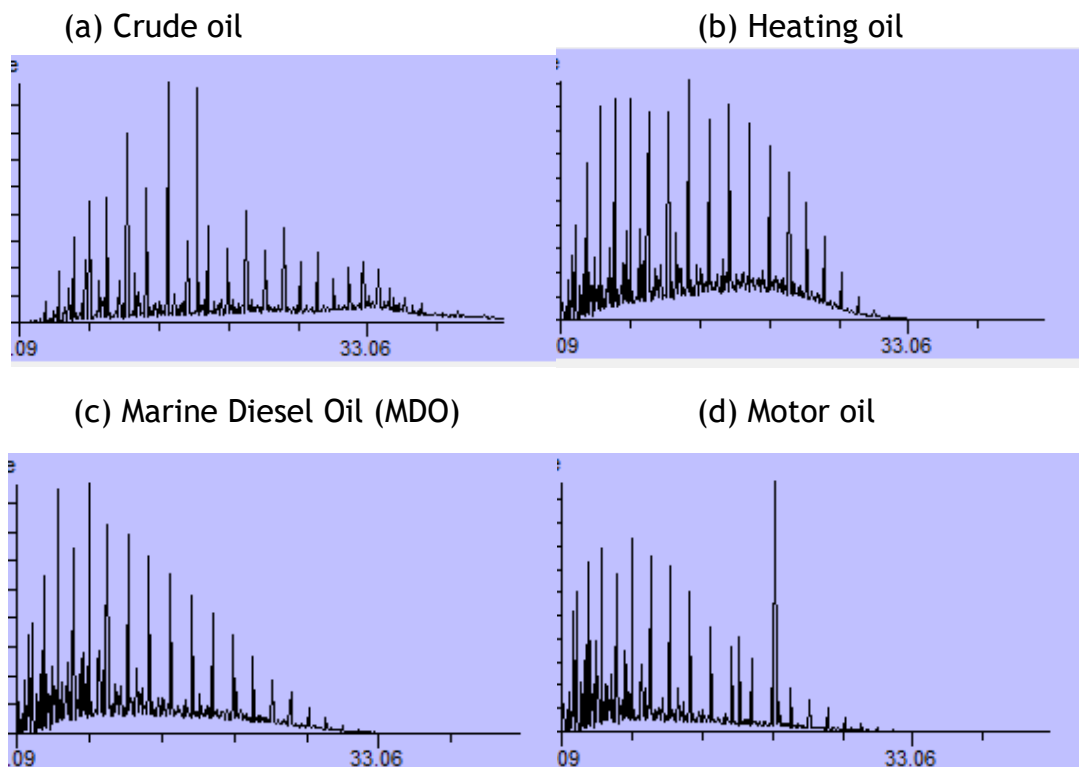


Fig. 3.16. GC-MS TIC of crude oil and petroleum products

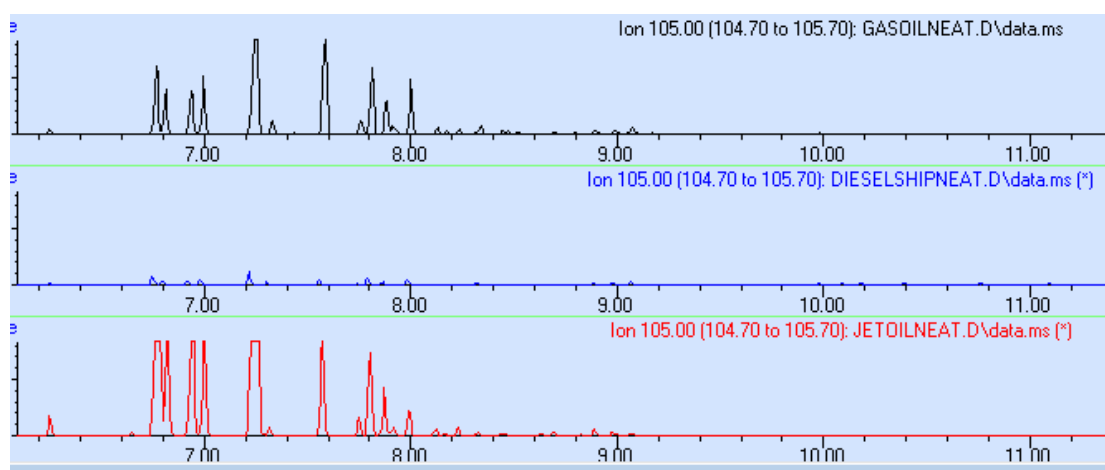


Fig. 3.17. GC-MSTIC of EIC m/z 105 of gasoline and diesel samples

The chromatogram in the diagnostic ion m/z 57 of the Prinos-Kavala sample showed high concentrations of normal alkanes C16-C17 and predominance of compounds with even number of carbon atoms in the region C19-C32, which indicates hypersaline. In addition, the relatively low concentrations of normal alkanes in the C21-C35 region are an additional indication of its marine origin. The CPI is calculated for the same sample at 0.84, which also indicates the origin of marine plants and sediments at great depths. The corresponding chromatograms of the petroleum product samples did not reveal any predominance in even or odd number of C atoms (Fig. 3.18.).

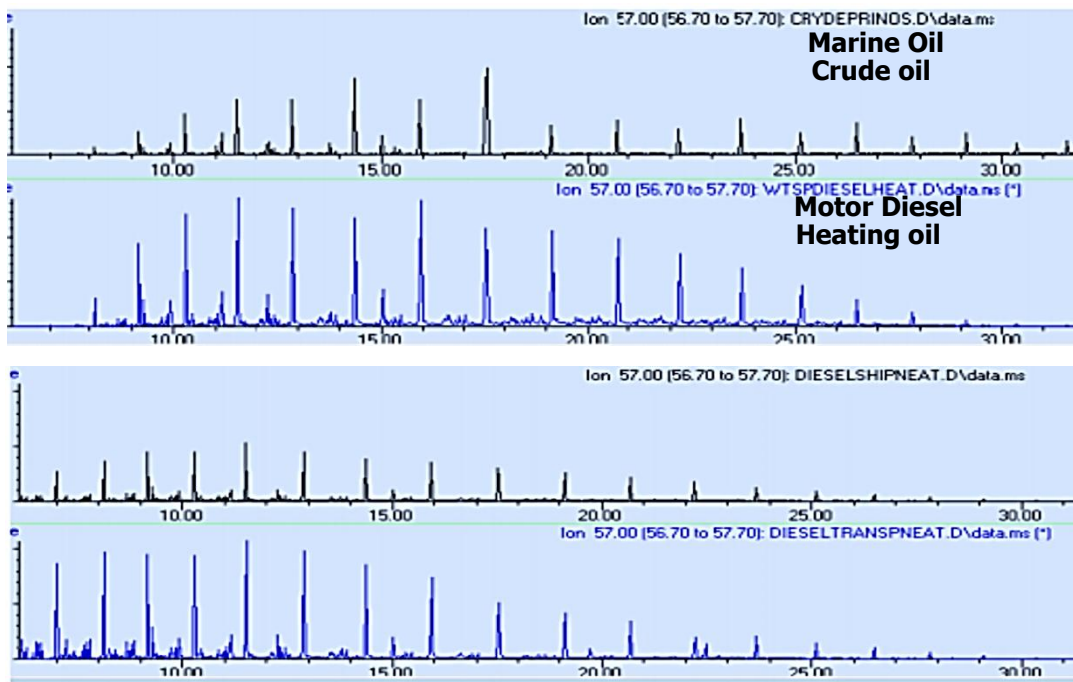


Fig. 3.18. Comparison of EIC of m/z 57 for crude oil and diesel oil samples

Moreover, in the crude oil sample, phytane is predominant over pristane and specifically it is the most abundant compound in the whole chromatogram. Contrariwise, the ratio Pr/Ph is more than 1.0 in case of petroleum products (Fig. 3.19.).

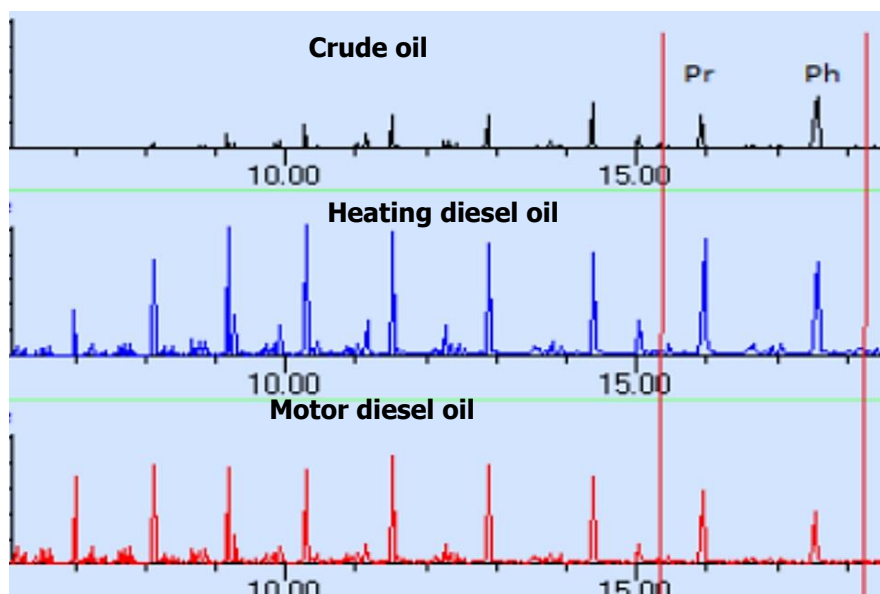


Fig. 3.19. Comparison of crude oil and petroleum products samples based on Pr/Ph ratio. For the correlations between crude oil and various products, the chromatograms in the diagnostic ions m/z 191 and m/z 217 were considered particularly useful. The m/z 191 is a very typical ion fragment of the terpane family ions, while m/z 217 is a

characteristic fragment of the steranium family. The chromatograms of the biomarkers in m/z 191 (Fig. 3.20.) and 217 (Fig. 3.21.) noticeably show that no terpanes and steranes were detected in the samples of petroleum products.

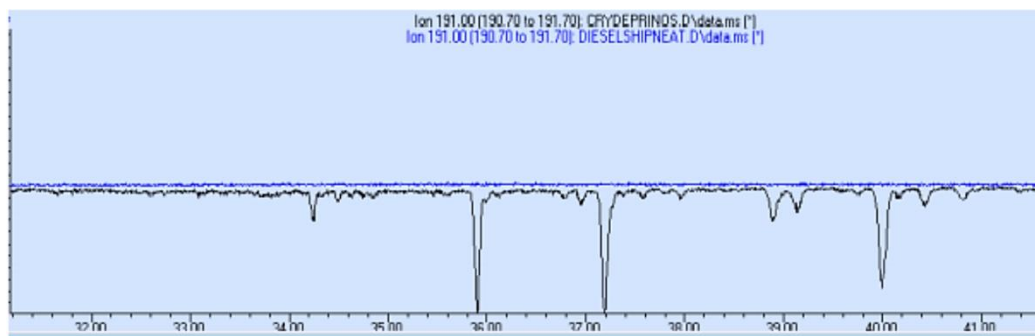


Fig. 3.20. Comparison of EIC at m/z 191 between crude oil and marine diesel oil samples

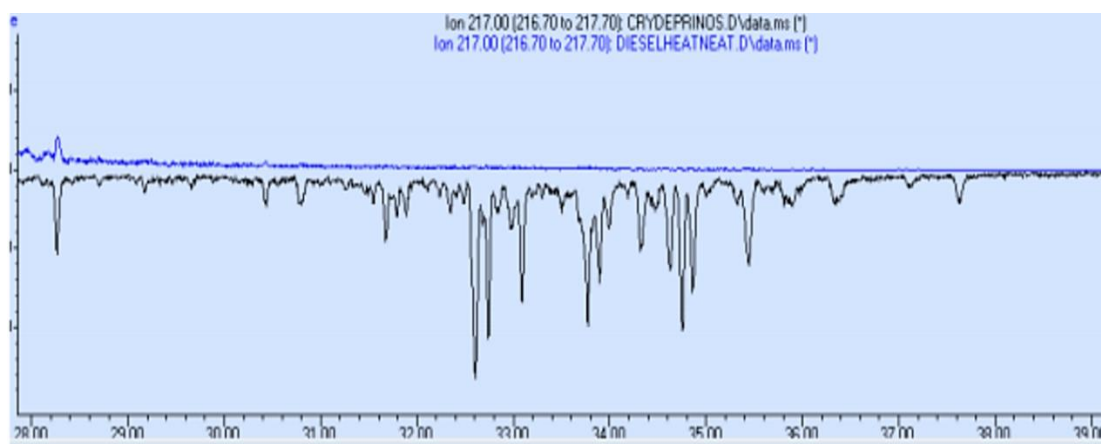


Fig. 3.21. Comparison of EIC at m/z 217 between crude oil and heating diesel oil samples

The main characteristic found in the chromatogram of Prinos' crude oil is the presence of gammacerane in a very high concentration, which indicates a high salinity environment in the genesis of petroleum.

Differentiations in alkylated dibenzothiophenes between crude oil and diesel oil samples were also detected at m/z 198, which is indicative of methyl-dibenzothiophenes compounds (Fig. 3.22.), and at m/z 212, which is a characteristic ion of dimethyl-DBT (Fig. 3.23.). In the case of diesel fuel, no dimethyl-dibenzothiophenes were detected (Fig. 3.24.).

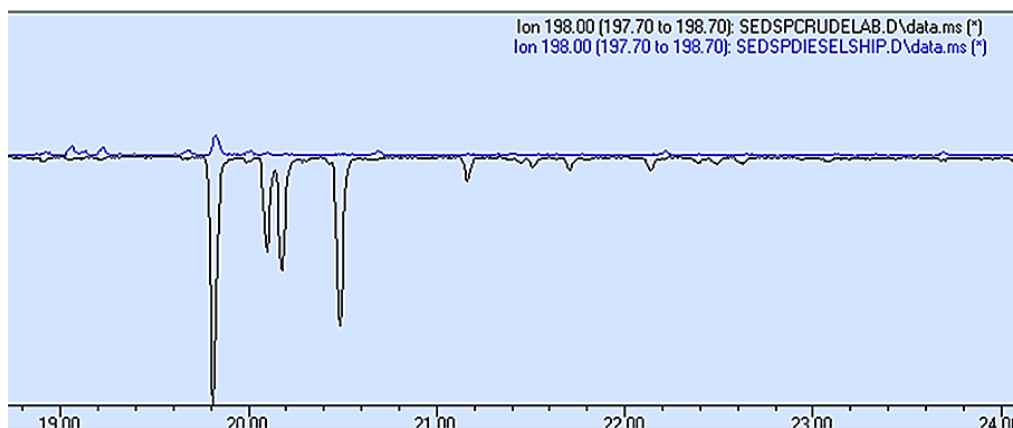


Fig. 3.22 Comparison of EIC (m/z 198) between crude oil and marine oil spiked samples

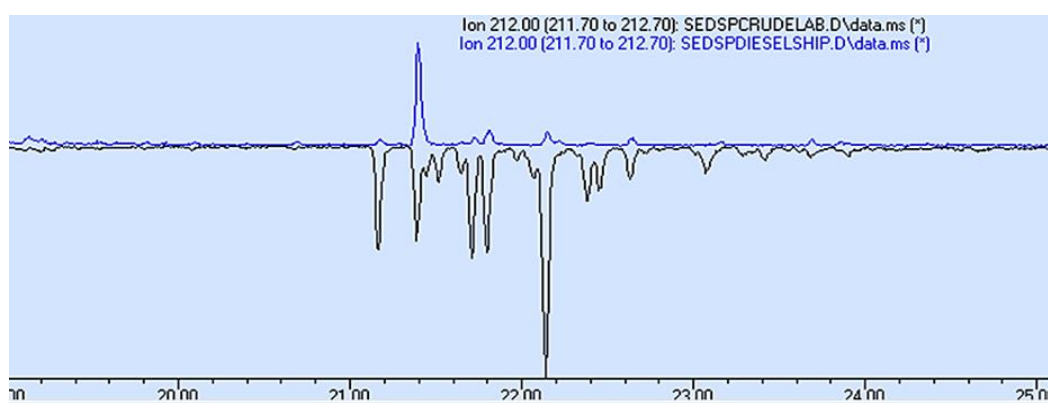


Fig. 3.23. Comparison of EIC (m/z 212) between crude oil and marine oil samples

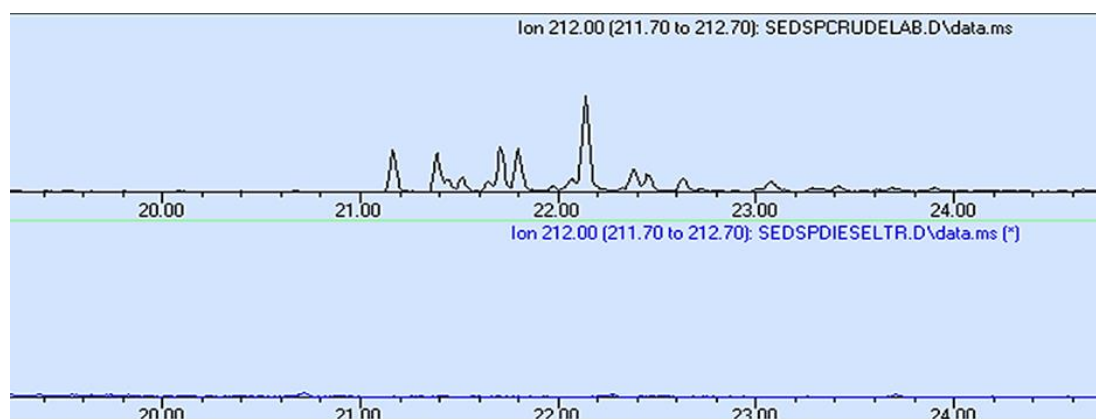


Fig. 3.24. Comparison of EIC (m/z 212) between crude oil and diesel fuel samples

3.5.3. Analysis of water and sediment samples

Analysis of the TIC of water and sediment samples from the area under study showed that no organic pollution was detected, neither in river water nor in river basin, sea water and sediment samples (Fig. 3.25.)

In contrast, in a previous study hydrocarbons were identified in samples from the harbor of Kavala city (Fig. 3.26.). Comparison of EIC at m/z 191 revealed no correlation with crude oil from Prinos, where biomarker gammacerane was also detected for crude oil sample (Fig. 3.24.).

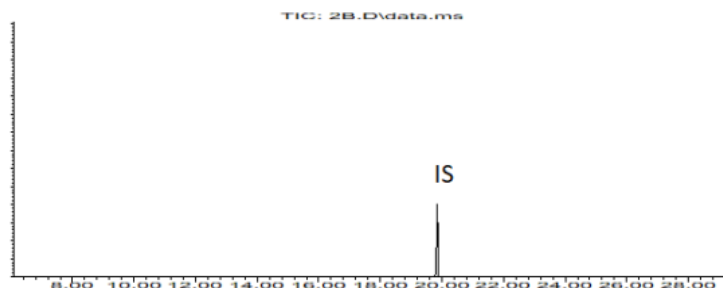


Fig. 3.25. TIC of water and sediment samples

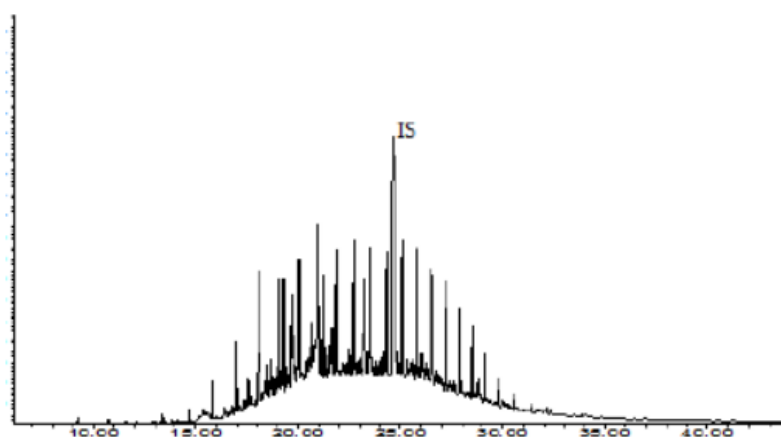


Fig. 3.26. TIC of the Kavala Port's sample

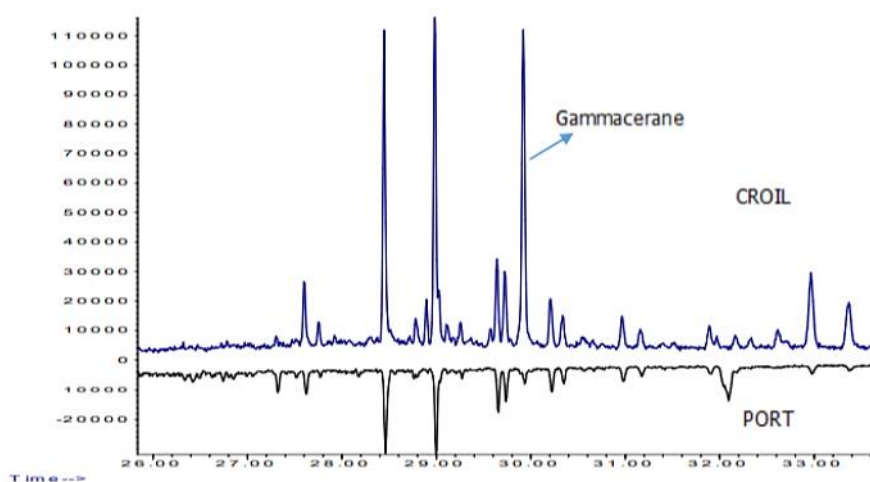


Fig. 3.27. Comparison of EIC (m/z 191) between crude oil from Prinos and sample from Kavala Port

Conclusions

The results of the chemical analyses from the spiked samples of the present study, gave useful information about the possibility of using the composition of biomarkers and the fingerprinting technique not only in the differentiation of pollutants from petroleum products but also in the investigation of their origin. GC-MS petroleum fingerprinting analysis is essential to monitor the contamination, to evaluate the damage and to overlook the environmental recovery. Nestos River is one of the major rivers of Greece with great economic and ecological significance. In the current work, a sample of Prinos crude oil and five samples of petroleum products were analyzed using the GC-MS technique. Significant differences were found in the scheme of the chromatograms corresponding to the n-alkane peaks, in the ratio between phytane and pristane, in the presence of aromatic hydrocarbons, in the presence of characteristic biomarkers such as steranes and hopanes and in the presence of heterocyclic sulfur aromatic compounds.

Although the oil company operating in the city of Kavala is considered as the main suspect for potential organic pollution, the analysis with GC-MS in both water and sediment samples proved that there is no organic pollution in the wider river area. Finally, a previous study showed that the hydrocarbons previously found in the port of Kavala had nothing to do with the crude oil produced in Prinos.

References

1. Ettre, L.S.: M.S. Tswett and the invention of chromatography. LC-GC North America. 21, 458-467 (2003)
2. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). Online version (2019-) created by S. J. Chalk. ISBN 0-9678550-9-8. <https://doi.org/10.1351/goldbook>
3. Stauffer, E., Dolan, J.A., Newman, R.: CHAPTER 8 - Gas Chromatography and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. In: Stauffer, E., Dolan, J.A., and Newman, R. (eds.) Fire Debris Analysis. pp. 235-293. Academic Press, Burlington (2008)
4. Coskun, O.: Separation Tecniques: CHROMATOGRAPHY. North Clin Istanbul. (2016). <https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757>

5. Meyer, V.R.: CHROMATOGRAPHY | Overview. In: Worsfold, P., Townshend, A., and Poole, C. (eds.) *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)*. pp. 89-98. Elsevier, Oxford (2005)
6. Ismail, B., Nielsen, S.S.: *Basic Principles of Chromatography*. In: Nielsen, S.S. (ed.) *Food Analysis*. pp. 473-498. Springer US, Boston, MA (2010)
7. Stauffer, E., Dolan, J.A., Newman, R.: CHAPTER 8 - Gas Chromatography and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. In: Stauffer, E., Dolan, J.A., and Newman, R. (eds.) *Fire Debris Analysis*. pp. 235-293. Academic Press, Burlington (2008)
8. Beens, J.: The role of gas chromatography in compositional analyses in the petroleum industry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 19, 260-275 (2000). [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(99\)00205-8](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(99)00205-8)
9. Blomberg, J., Schoenmakers, P.J., Brinkman, U.A.T.: Gas chromatographic methods for oil analysis. *J. Chromatogr. A*. 37 (2002)
10. Camin, D.L., Raymond, A.J., Research, S.: *Chromatography in the Petroleum Industry*. *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHIC SCIENCE*. 11, 14
11. Forgács, E., Cserhádi, T.: CHROMATOGRAPHY | Principles. In: Caballero, B. (ed.) *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*. pp. 1259-1267. Academic Press, Oxford (2003)
12. Etxebarria, N., Zuloaga, O., Olivares, M., Bartolomé, L.J., Navarro, P.: Retention-time locked methods in gas chromatography. *J. Chromatogr. A*. 7
13. Parris, N.A. ed: Chapter 2 Basic principles and terminology. In: *Journal of Chromatography Library*. pp. 7-18. Elsevier (1976)
14. k' - Retention or Capacity Factor. (2020, June 9). Retrieved May 25, 2021, from <https://chem.libretexts.org/@go/page/71827>
15. Guiochon, G., Guillemin, C.L. eds: Chapter 10 Methodology Detectors for Gas Chromatography. In: *Journal of Chromatography Library*. pp. 393-480. Elsevier (1988)
16. Pardue, H.L., Thiers, R.E., Ulrich, W.F.: *Gas Chromatography Detectors*. 9
17. Wang, Z., Fingas, M., Yang, C., Christensen, J.H.: *Crude Oil and Refined Product Fingerprinting: Principles*. In: *Environmental Forensics*. pp. 339-407. Elsevier (1964)
18. Yang, C., Brown, C.E., Hollebhone, B., Yang, Z., Lambert, P., Fieldhouse, B., Landriault, M., Wang, Z.: *Chemical Fingerprints of Crude Oils and Petroleum Products*. In: *Oil Spill Science and Technology*. pp. 209-304. Elsevier (2017)

19. Nielsen, S.S.: 26.3 Interpretation of Mass Spectra 462 26.4 Gas Chromatography-Mass Spectrometry 464 26.5 Liquid Chromatography-Mass Spectrometry 465 26.5.1 Electrospray Interface 466. *Mass Spectrometry*. 14
20. Niyonsaba, E., Manheim, J.M., Yerabolu, R., Kenttämä, H.I.: Recent Advances in Petroleum Analysis by Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 91, 156-177 (2019). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05258>
21. Par, J.R.J., Yaylayan, V.: *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. . *Mass Spectrometry*. 28
22. Panda, S.K., Andersson, J.T., Schrader, W.: Mass-spectrometric analysis of complex volatile and nonvolatile crude oil components: a challenge. *Anal Bioanal Chem.* 389, 1329-1339 (2007). <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1583-6>
23. Borisov, R.S., Kulikova, L.N., Zaikin, V.G.: Mass Spectrometry in Petroleum Chemistry (Petroleomics) (Review). *Pet. Chem.* 59, 1055-1076 (2019). <https://doi.org/10.1134/S0965544119100025>
24. Kitson, F.G., Larsen, B.S., McEwen, C.N.: Chapter 1 - What Is GC/MS? In: Kitson, F.G., Larsen, B.S., and McEwen, C.N. (eds.) *Gas Chromatography and Mass Spectrometry*. pp. 3-23. Academic Press, San Diego (1996)
25. D. J. Harvey, *GAS CHROMATOGRAPHY/Mass Spectrometry, MASS SPECTROMETRY*, p 106, University of Oxford, Oxford, UK, Elsevier (2005)
26. Wu, S., Lyu, G., Lou, R.: Applications of Chromatography Hyphenated Techniques in the Field of Lignin Pyrolysis. Presented at the March 7 (2012)
27. Wang, Z., Yang, C., Yang, Z., Brown, C., Hollebhone, B., Stout, S.: Petroleum biomarker fingerprinting for oil spill characterization and source identification. Presented at the December 31 (2016)
28. Clench, M.R., Tetler, L.W.: *Detectors: Mass Spectrometry*. 8
29. Sleeman, R., Carter, J.F.: Mass spectrometry: selected ion monitoring. In: *Encyclopedia of Analytical Science*. pp. 423-429 (2005)
30. J. H. Christensen, G. Tomasi, and A. B. Hansen, "Chemical Fingerprinting of Petroleum Biomarkers Using Time Warping and PCA," *Environmental Science & Technology*, vol. 39, no. 1, pp. 255-260, 2005/01/01 (2004)
31. Boehm, P.D., Douglas, G.S., Burns, W.A., Mankiewicz, P.J., Page, D.S., Bence, A.E.: Application of petroleum hydrocarbon chemical fingerprinting and allocation techniques after the Exxon Valdez oil spill. *Marine Pollution Bulletin.* 34, 599-613 (1997). [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(97\)00051-9](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(97)00051-9)

32. D. Broman, A. Colmsjö, B. Ganning et al., “‘Fingerprinting’ petroleum hydrocarbons in bottom sediment, plankton, and sediment trap collected seston,” *Marine Pollution Bulletin*, vol. 18, no. 7, pp. 380-388, 7//, (1987)
33. Meyer, B.M.: *Quantitative Oil Source-Fingerprinting Techniques and Their Application to Differentiating Crude Oil in Coastal Marsh Sediments*. 192
34. Wang, Z., Fingas, M., Yang, C., Christensen, J.H.: *Crude Oil and Refined Product Fingerprinting: Principles*. In: *Environmental Forensics*. pp. 339-407. Elsevier (1964)
35. He, M., Moldowan, M.J., Peters, K.E.: *Biomarkers: Petroleum*. In: Bobrowsky, P. and Marker, B. (eds.) *Encyclopedia of Engineering Geology*. pp. 1-13. Springer International Publishing, Cham (2018)
36. Peters KE, Moldowan JM, *The biomarker guide interpreting molecular fossils in petroleum and ancient sediments*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, 363pp (1993)
37. Yasser M. Moustafa: *Biomarkers*. In: Rania E. Morsi ED1 - Sasikumar Dhanarasu (ed.) *Chromatography and Its Applications*. p. Ch. 9. IntechOpen, Rijeka (2012)
38. Meyer, B.M., Overton, E.B., Turner, R.E.: *Oil Source Identification Using Diagnostic Biomarker Ratio Analyses*. *International Oil Spill Conference Proceedings*. 2014, 2064-2073 (2014). <https://doi.org/10.7901/2169-3358-2014.1.2064>
39. Hsu, C.S., Walters, C.C., Isaksen, G.H., Schaps, M.E., Peters, K.E.: *Biomarker Analysis in Petroleum Exploration*. In: Hsu, C.S. (ed.) *Analytical Advances for Hydrocarbon Research*. pp. 223-245. Springer US, Boston, MA (2003)
40. Wang, Z., Stout, S.A., Fingas, M.: *Forensic Fingerprinting of Biomarkers for Oil Spill Characterization and Source Identification*. 43
41. A. Shahzad, *Identification of potential hydrocarbon source rocks using biological markers in Kohat plateau, North Pakistan*, *Geology*, University of Peshawar, Peshawar (2006)
42. J. E. Cortes, J. M. Rincon, J. M. Jaramillo et al., *Biomarkers and compound-specific stable carbon isotope of n-alkanes in crude oils from Eastern Llanos Basin, Colombia*, *Journal of South American Earth Sciences*, vol. 29, no. 2, pp. 198-213, 3// (2010)
43. Eglinton, G., Calvin, M.: *CHEMICAL FOSSILS*. *Scientific American*. 216, 32-43 (1967)
44. Gonzalez-Vila, F.J.: *ALKANE BIOMARKERS. GEOCHEMICAL SIGNIFICANCE AND APPLICATION IN OIL SHALE GEOCHEMISTRY*. 18
45. Brocks, J.J.: *Sedimentary Hydrocarbons, Biomarkers for Early Life*. 43

46. Alimi, H., Ertel, T., Schug, B.: Fingerprinting of Hydrocarbon Fuel Contaminants: Literature Review. *Environmental Forensics*. 4, 25-38 (2003). <https://doi.org/10.1080/15275920303489>
47. Volkman, J.: Biological marker compounds as indicators of the depositional environments of petroleum source rocks. *Geological Society of London Special Publications*. 40, 103-122 (1988). <https://doi.org/10.1144/GSL.SP.1988.040.01.10>
48. Waplesandtsutomumach, D.: Application of sterane and triterpane biomarkers in petroleum exploration. 24
49. Ibad Mahmoodi, S.M., Bhattacharya, S.K.: Reliability of 18 α (H)-Oleanane Biomarker as Age Indicator of Source Deposition. *JGS Vol.1 No.1*. 1, (2013). https://doi.org/10.5176/2335-6774_1.1.6
50. Hunt, J.Meacham.: *Petroleum geochemistry and geology*. W.H. Freeman, New York (1996)
51. Connan, J.; Bouroullec, J.; Dessort, D. & Albrecht, P., The microbial input in carbonate-anhydrite facies of sabkha palaeoenvironment from Guatemala, A molecular approach. In: *advances in organic geochemistry 1985*. org. geochem., Vol. 10, 29-50 (1986)
52. Edema, N.: Effects of Crude Oil Contaminated Water on the Environment. In: Abdul-Raouf, M.E.-S. (ed.) *Crude Oil Emulsions- Composition Stability and Characterization*. InTech (2012)
53. Fine, P., Graber, E.R., Yaron, B.: Soil interactions with petroleum hydrocarbons: Abiotic processes. *Soil Technology*. 10, 133-153 (1997). [https://doi.org/10.1016/S0933-3630\(96\)00088-8](https://doi.org/10.1016/S0933-3630(96)00088-8)
54. Logeshwaran, P., Megharaj, M., Chadalavada, S., Bowman, M., Naidu, R.: Petroleum hydrocarbons (PH) in groundwater aquifers: An overview of environmental fate, toxicity, microbial degradation and risk-based remediation approaches. *Environmental Technology & Innovation*. 10, 175-193 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.eti.2018.02.001>
55. Reyes, C.Y., Moreira, ícaro T.A., Oliveira, D.A.F., Medeiros, N.C., Almeida, M., Wandega, F., Soares, S.A.R., Oliveira, O.M.C. de: Weathering of Petroleum Biomarkers: Review in Tropical Marine Environment Impacts. *OALib*. 01, 1-13 (2014). <https://doi.org/10.4236/oalib.1101004>

56. Volkman, J. K., Alexander, R., Kagi, R. I., and Woodhouse, G. W., Demethylated hopanes in crude oils and their applications in petroleum geochemistry. *Geochimica Cosmochimica Acta* 47: 785-794 (1983 b)
57. Boehm, P.: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). In: *Environmental Forensics: Contaminant Specific Guide*. pp. 313-337 (2005)
58. Yang, C., Zhang, G., Wang, Z., Yang, Z., Hollebhone, B., Landriault, M., Shah, K., Brown, C.E.: Development of a methodology for accurate quantitation of alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum and oil contaminated environmental samples. *Anal. Methods*. 6, 7760-7771 (2014). <https://doi.org/10.1039/C4AY01393J>
59. Li, M., Wang, T.-G., Simoneit, B.R.T., Shi, S., Zhang, L., Yang, F.: Qualitative and quantitative analysis of dibenzothiophene, its methylated homologues, and benzonaphthothiophenes in crude oils, coal, and sediment extracts. *Journal of Chromatography A*. 1233, 126-136 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.01.086>
60. Li, M., Wang, T., Zhong, N., Zhang, W., Sadik, A., Li, H.: Ternary Diagram of Fluorenes, Dibenzothiophenes and Dibenzofurans: Indicating Depositional Environment of Crude Oil Source Rocks. *Energy Exploration & Exploitation*. 31, 569-588 (2013). <https://doi.org/10.1260/0144-5987.31.4.569>
61. Engel, M.H., Macko, S.A. eds: *Organic Geochemistry: Principles and Applications*. Springer US, Boston, MA (1993)
62. Wang, Z. D., Fingas, M., Blenkinsopp, S., Sergy, G., Landriault, M., Sigouin, L., and Lambert, P., Study of the 25-years-old Nipisi oil spill: Persistence of oil residues and comparisons between source and subsurface sediments. *Environ. Sci. Technol.* 32:2222-2232. (1998)
63. Wang, Z., Fingas, M.F.: Development of oil hydrocarbon fingerprinting and identification techniques. *Marine Pollution Bulletin*. 47, 423-452 (2003). [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(03\)00215-7](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(03)00215-7)
64. Papastergios, G., Fernández-Turiel, J.-L., Georgakopoulos, A., Gimeno, D.: Natural and anthropogenic effects on the sediment geochemistry of Nestos river, Northern Greece. *Environ Geol.* 58, 1361-1370 (2009). <https://doi.org/10.1007/s00254-008-1639-8>

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	74
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ ΜΕ ΠΗΓΗ ΕΠΑΓΩΓΙΚΑ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΟ ΠΛΑΣΜΑ (ICP-MS)	75
Θωμάς Σπανός (ΔΙΠΑΕ)	
1.1. Τεχνική ICP-MS	75
1.1.1. Τι μετρούν τα φασματόμετρα μαζών	76
1.1.2. Οργανολογία ICP-MS	78
1.2. Επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα	79
1.2.1. Σχηματική αναπαράσταση δημιουργίας του επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος.....	80
1.2.2. Πλεονεκτήματα χρήσης του αργού.....	81
1.3. Σύστημα εισαγωγής δείγματος - εκνεφωτής (nebulizer)	82
1.3.1. Σύστημα διασύνδεσης ICP με φασματομετρία μαζών (interface	82
1.3.2. Οπτικό σύστημα.....	83
1.3.3. Σύστημα εστίασης ιόντων - φακοί ιόντων (ion focusing)	84
1.3.4. Κελί σύγκρουσης/αντίδρασης (CRC- collision/reaction cell)	84
1.3.5. Οπτική ιόντων.....	87
1.3.6. Αναλυτής μάζας - Τετράπολο	87
1.3.7. Ανιχνευτής ιόντων	88
1.4. Βαθμονόμηση και Ποσοτικοποίηση	89
1.4.1. Ποσοτική ανάλυση.....	89
1.4.2. Ημιποσοτική ανάλυση.....	90
1.4.3. Ισοτοπική αναλογία, για ισοτοπική ανάλυση και ισοτοπική αραίωση	90
1.5. Φάσμα μάζας ICP-MS.....	91
1.5.1. Σύγκριση τεχνικής ICP-MS με άλλες τεχνικές στοιχειακής ανάλυσης	92
1.6. Εκτομή με Laser-Επαγωγικά Συζευγμένο Πλάσμα-Φασματομετρία Μαζών, LA-ICP-MS.....	92
Αναφορές	93

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ - ΟΡΑΤΟΥ (UV-VIS) ΓΙΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ 94

Χρηστίνα Χατζηχρήστου (ΔΙΠΑΕ)

2.1. Εισαγωγή.....	94
2.1.1. Ιδιότητες του φωτός	94
2.2. Το Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα	95
2.3. Bouguer-Lambert-Beer Law	96
2.3.1. Αποκλίσεις από το νόμο του Beer	98
2.4. Οργανολογία UV-Vis	99
2.4.1. Τύποι Οργάνων	100
2.5. Ανάπτυξη ποσοτικής μεθόδου για ένα συστατικό χρησιμοποιώντας καμπύλη βαθμονόμησης.....	102
2.6. Εφαρμογές της φασματοφωτομετρίας UV-Vis στην περιβαλλοντική ανάλυση ...	103
Αναφορές	105

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ- ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ Η ΤΕΧΝΙΚΗ ΧΗΜΙΚΟΥ ΑΠΟΤΥΠΩΜΑΤΟΣ ΠΕΤΡΕΛΑΙΚΩΝ ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΩΝ ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΓΚΛΗΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΓΕΩΧΗΜΕΙΑ 106

Σοφία Μητκίδου & Νικόλαος Κόκκινος (ΔΙΠΑΕ)

Περίληψη.....	106
3.1. Εισαγωγή στη χρωματογραφία.....	107
3.1.1. Αέρια Χρωματογραφία (GC).....	108
3.1.2. GC Ανιχνευτές (Detectors)	113
3.1.3. Φασματομετρία μάζας (MS)	114
3.1.4. GC-MS	116
3.2. Τεχνική χημικού αποτυπώματος πετρελαίου (Petroleum Forensic Fingerprinting)	118
3.2.1. Ανάλυση βιοδεικτών πετρελαίου (Petroleum Biomarkers Analysis)	120
3.2.2. Διαγνωστικές παράμετροι βιοδεικτών (Biomarker Diagnostic Parameters)	124
3.2.3. Διεργασίες αλλοίωσης των βιοδεικτών με το χρόνο (Weathering of biomarkers).....	125
3.3. Ανάλυση των PAHs και των PASHs.....	127
3.3.1. Weathering των ΠΑΥς (PAHs)	128
3.4. Μεθοδολογία προσδιορισμού υδρογονανθράκων σε περιβαλλοντικά δείγματα .	128

Μεθοδολογικός οδηγός αναλυτικών τεχνικών υψηλής απόδοσης για την παρακολούθηση τοξικών χημικών ουσιών στο περιβάλλον

3.4.1. Δειγματοληψία	129
3.4.2. Παραλαβή οργανικού εκχυλίσματος από υδατικά δείγματα.....	129
3.4.3. Διαχωρισμός με χρωματογραφία στήλης.....	130
3.4.4. Έλεγχος ανάκτησης και πρότυπες ενώσεις	130
3.4.5. Παραλαβή οργανικού εκχυλίσματος από δείγματα ιζημάτων	130
3.4.6. Αέρια Χρωματογραφία-Φασματομετρία μάζας (GC-MS).....	131
3.5. Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	132
3.5.1. Περιοχή μελέτης (study area).....	132
3.5.2. Χρήση των βιοδεικτών στη συσχέτιση πετρελαιοειδών ρύπων	133
3.5.3. Ανάλυση υδατικών δειγμάτων και ιζημάτων	139
Συμπεράσματα	140
Αναφορές	141

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τα σύγχρονα περιβαλλοντικά προβλήματα απαιτούν κατάλληλη θεωρητική και εφαρμοσμένη επιστημονική γνώση για την προσέγγιση και την επίλυσή τους. Η διαφοροποίησή τους όμως και η ανάγκη για αποτελεσματική παρακολούθηση μιας μεγάλης ομάδας τοξικών ουσιών (ΤΟΧ) σε επίπεδα ιχνών και υπερ-ιχνών επέβαλαν την επεξεργασία διαφορετικών μεθόδων ανάλυσης, που χαρακτηρίζονται από υψηλή ευαισθησία, επιλεκτικότητα, αναπαραγωγιμότητα και ακρίβεια.

Ο μεθοδολογικός οδηγός δημοσιεύεται στο πλαίσιο του έργου με κωδικό BSB27, "Δίκτυο διεπιστημονικής συνεργασίας στη Λεκάνη της Μαύρης Θάλασσας για τη βιώσιμη από κοινού παρακολούθηση της μετανάστευσης τοξικών ουσιών στο περιβάλλον, βελτιωμένη αξιολόγηση της οικολογικής κατάστασης των επιπτώσεων επιβλαβών ουσιών στην ανθρώπινη υγεία και πρόληψη της έκθεσης του πληθυσμού" (ακρωνύμιο "MONITOX"), χρηματοδοτήθηκε από το Κοινό Επιχειρησιακό Πρόγραμμα CBC της ΕΥ "Λεκάνη Μαύρης Θάλασσας 2014-2020", το οποίο υλοποιήθηκε κατά τη διάρκεια των ετών 2018-2021 από το "Dunarea de Jos" Πανεπιστήμιο του Γαλατίου, Ρουμανία (Επικεφαλής του Προγράμματος) σε συνεργασία με το Ινστιτούτο Ζωολογίας, Δημοκρατία της Μολδαβίας, το Διεθνές Πανεπιστήμιο της Ελλάδας (ΔΙΠΑΕ-Καβάλα), το Ινστιτούτο Γεωλογίας και Σεισμολογίας, Δημοκρατία της Μολδαβίας και το Εθνικό Ινστιτούτο του Δέλτα του Δούναβη για Έρευνα και Ανάπτυξη, Tulcea, Ρουμανία.

Αυτός ο οδηγός παρουσιάζει κύριες τεχνικές που εφαρμόζονται για την ανάλυση ανόργανων και οργανικών ουσιών σε επίπεδο δικτύου MONITOX, αποτελώντας μέρος μιας σειράς μεθοδολογικών οδηγιών που πρόκειται να εκδοθούν στο πλαίσιο του έργου. Βασίζεται σε μια εκτενή προσωπική εμπειρία των συγγραφέων και στις καλές διεθνείς πρακτικές στη μελέτη των παραμέτρων διαφόρων περιβαλλοντικών παραγόντων.

Ο Μεθοδολογικός Οδηγός χωρίζεται σε τρία κεφάλαια και περιγράφει τις θεωρητικές αρχές των τεχνικών, ειδικά όργανα και περιβαλλοντικές εφαρμογές των σημαντικότερων αναλυτικών εργαλείων που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό βαρέων μετάλλων, ιχνοστοιχείων, επίμονων οργανικών ρύπων, πετρελαιοειδών και φυσικοχημικών παραμέτρων σε περιβαλλοντικά δείγματα. Οι συντάκτες και οι συγγραφείς ευχαριστούν ιδιαίτερα την καθηγήτρια δρ. Elena Zubcov, συντονιστή έργου του ιδρύματος εταίρου 2 (Ινστιτούτο Ζωολογίας), για την ανασκόπηση του μεθοδολογικού οδηγού.

Καβάλα Σεπτέμβριος 2021

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.

ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ ΜΕ ΠΗΓΗ ΕΠΑΓΩΓΙΚΑ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΟ ΠΛΑΣΜΑ (ICP-MS)

Θωμάς Σπανός

Τεχνικές Ενόργανης Ανάλυσης, Διεθνές Πανεπιστήμιο της Ελλάδος (ΔΙΠΑΕ), Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας, Αγ. Λουκάς, 65404 Καβάλα, Ελλάδα, tspanos@chem.ihu.gr

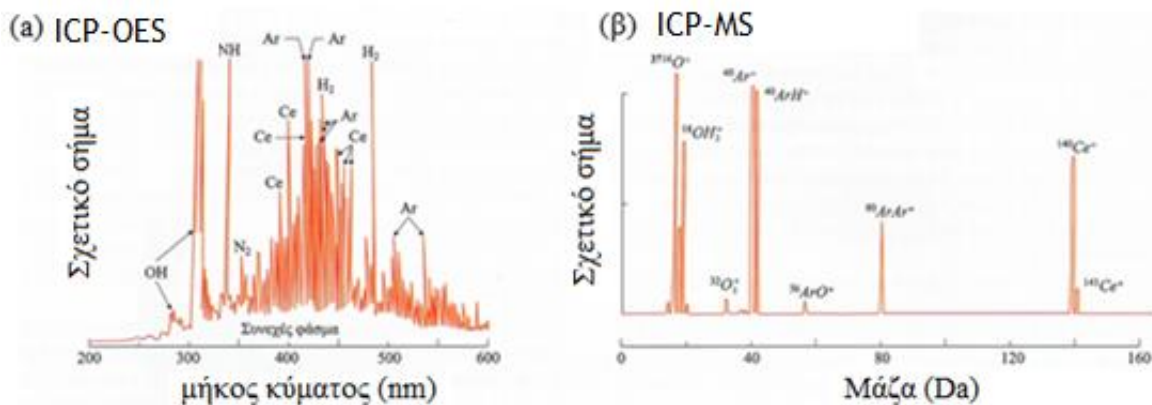
1.1. Τεχνική ICP-MS

Είναι η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη τεχνική φασματομετρίας ατομικών μαζών, όπου ο ιονισμός των στοιχείων του δείγματος γίνεται με πλάσμα αργού (Ar) παρόμοια με την τεχνική φασματομετρίας ατομικής εκπομπής με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP-AES ή ICP-OES), η διαφορά έγκειται στο γεγονός ότι ο διαχωρισμός και η ανίχνευση των ιόντων που σχηματίζονται από το δείγμα, γίνεται με φασματόμετρο μαζών, με βάση τον λόγο m προς το φορτίο τους z (m/z). Η τεχνική ICP-MS είναι συνδυασμένη τεχνική (hyphenated technique), αναλύει με επιτυχία σχεδόν όλα τα στοιχεία του περιοδικού πίνακα από το Li μέχρι το U, πραγματοποιώντας ταυτόχρονο προσδιορισμό μεγάλου αριθμού στοιχείων (πολυστοιχειακή ανόργανη ανάλυση), με όριο ανίχνευσης 0,01-1ppb. [1]. Στα στοιχεία που προσδιορίζει η τεχνική ICP-MS συμπεριλαμβάνονται: τα αλκάλια, οι αλκαλικές γαίες, τα μέταλλα, τα μεταλλοειδή και οι σπάνιες γαίες σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, με εφαρμογή σε τομείς όπως έρευνες γεωχημικές και περιβαλλοντικές, πυρηνικής χημείας, αναλύσεις βιολογικών δειγμάτων, φαρμακευτικά προϊόντα, εξειδικευμένες αναλύσεις τροφίμων, ισοτοπική ανάλυση κ.α.

Η τεχνική ICP-MS είναι σχετικά καινούργια τεχνική της Ενόργανης Χημικής Ανάλυσης. Αναπτύχθηκε στο τέλος της δεκαετίας του 1970, στην Αγγλία από τους GRAY και DATE και παράλληλα στην Αμερική και τον Καναδά από τους HOUK και DOUGLAS.

Η ανάγκη ανάπτυξης της ICP-MS προέκυψε από την αναγκαιότητα εξεύρεσης μιας βελτιωμένης τεχνικής για τον προσδιορισμό ιχνοποσοτήτων βαρέων μετάλλων, ιδίως όταν απαιτείται η εξεύρεση της αναλογίας των ισοτόπων τους, που σχηματίζουν καρβίδια με πολλές φασματικές γραμμές, που δυσκολεύουν την αξιολόγηση των φασμάτων εκπομπής τους. Γενικά ισχύει ότι τα φάσματα μαζών είναι απλούστερα από τα φάσματα εκπομπής. Στο (Σχήμα 1.1.) συγκρίνεται το φάσμα του στοιχείου δημητρίου

(Ce) που λήφθηκε με την τεχνική της ICP-AES και την τεχνική της ICP-MS, προκύπτει ότι με την ICP-MS λαμβάνεται φάσμα απλούστερο με λιγότερες κορυφές [15].



Σχήμα 1.1. Σύγκριση ενός φάσματος Δημητρίου (Ce) α) με την τεχνική ICP-OES β) με την τεχνική ICP-MS [15]

Σε σύγκριση με τις τεχνικές ατομικής απορρόφησης (AAS), η ICP-MS έχει μεγαλύτερη ταχύτητα, ακρίβεια και ευαισθησία, χαμηλότερα όρια, επίσης είναι πιο ευαίσθητη στον εντοπισμό ιχνών μολυσματικών ουσιών που προέρχονται από τα υαλικά και τα αντιδραστήρια και στον εντοπισμό ιόντων που μπορούν να παρεμποδίζουν την ανίχνευση άλλων ιόντων.

Σε σύγκριση με την τεχνική της ICP-OES, η ποικιλία των εφαρμογών ICP-MS την υπερβαίνει διότι μετρά σε ακόμη χαμηλότερα επίπεδα, με ανυπέβλητη αναπαραγωγικότητα σε σχέση με κάθε άλλη τεχνική και με μηδενικές χημικές παρεμποδίσεις.

1.1.1. Τι μετρούν τα φασματόμετρα μαζών

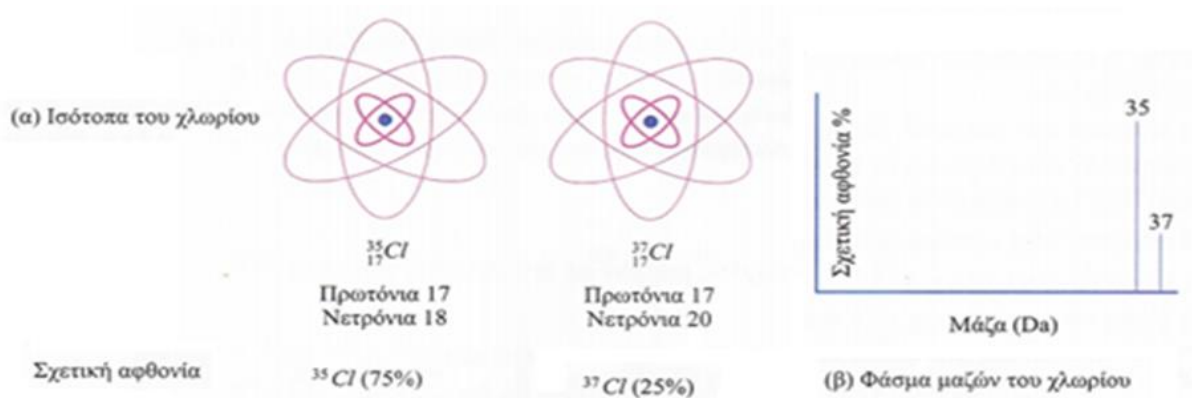
Τα φασματόμετρα μαζών διακρίνουν τις μάζες ισοτόπων. Τα ατομικά και τα μοριακά βάρη στην ατομική και μοριακή φασματομετρία μαζών εκφράζονται σε μονάδες ατομικής μάζας (amu, atomic mass units) ή Dalton (Da). Ένα amu ή Da ορίζεται ως το

1/12 της μάζας ενός ουδέτερου ατόμου $^{12}_6\text{C}$. Επομένως το ισότοπο του $^{12}_6\text{C}$ αντιστοιχεί σε 12 amu (Da) ακριβώς. Το μέσο ατομικό βάρος (A) ενός στοιχείου, που απαντά στην φύση ισούται με το άθροισμα των ατομικών μαζών A_n των n ισοτόπων του στοιχείου, πολλαπλασιασμένου με τις σχετικές αφθονίες (p_n) των ισοτόπων αυτών στην φύση (1-1). Ισότοπα καλούνται τα στοιχεία που έχουν τον ίδιο αριθμό πρωτονίων δηλαδή τον ίδιο ατομικό αριθμό (Z), αλλά διαφορετικό αριθμό νετρονίων (N), δηλαδή έχουν διαφορετικό ατομικό βάρος ($AB = Z+N$) [15].

$$A = \sum_{n=1}^n A_n \cdot \rho_n \quad (1-1)$$

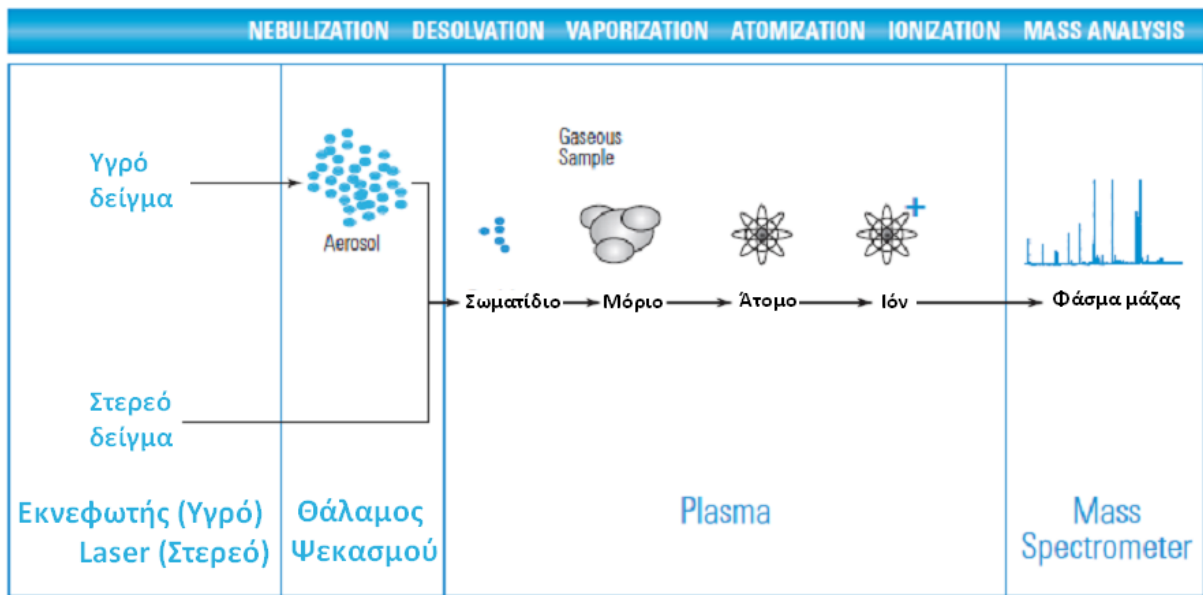
Παράδειγμα (Σχήμα 1.2.) Τα δυο κυριότερα ισότοπα του χλωρίου, (Σχήμα 1.2.(α)) έχουν ατομικό βάρος 35 και 37 και σχετική αφθονία 75% και 25% αντίστοιχα, δηλαδή και τα δυο έχουν από 17 πρωτόνια έκαστο, αλλά τα νετρόνια είναι 18 και 20 αντίστοιχα. Με εφαρμογή στην εξίσωση (1-1) προκύπτει ότι το ατομικό βάρος του χλωρίου είναι $A_{Cl} = 35,5$

Ο λόγος $\frac{^{35}\text{Cl} (75\%)}{^{37}\text{Cl} (25\%)} = \frac{3}{1}$ εκφράζει την σχετική αφθονία των δυο ισωτόπων όπως φαίνεται στο αντίστοιχο φάσμα μαζών σχήμα 2β.



Σχήμα 1.2. Κυριότερα ισότοπα του χλωρίου με το αντίστοιχο φάσμα μαζών τους [15]

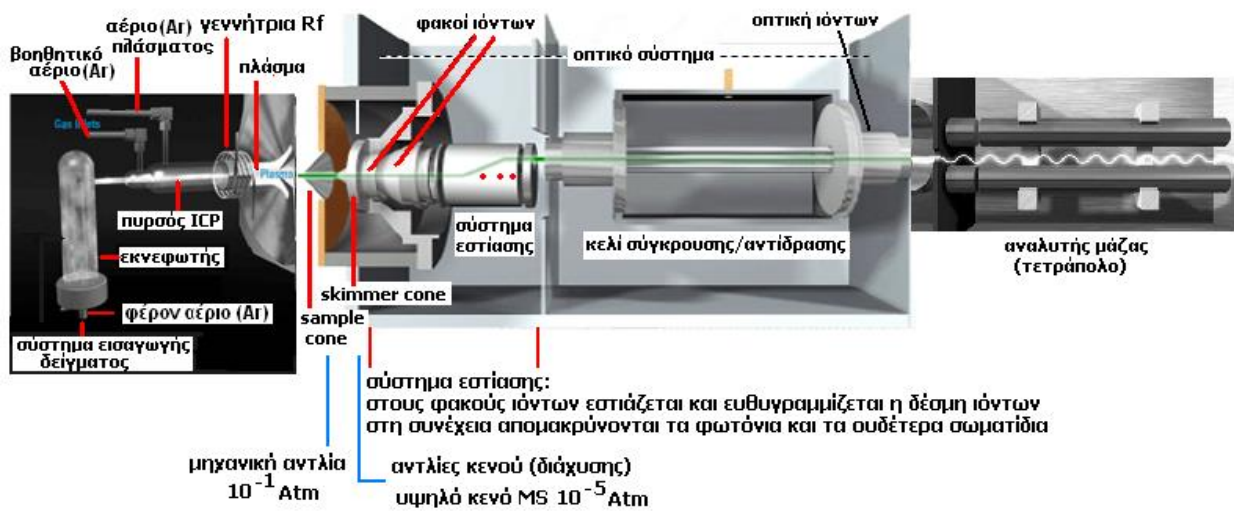
Τα δείγματα που μπορεί να αναλύσει η τεχνική ICP-MS είναι υγρά αλλά μπορεί να είναι και στερεά (ανάλογα με τον τρόπο εισαγωγής), στη συνέχεια γίνεται ιονισμός του δείγματος με το επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα, τέλος ένα φασματόμετρο μάζας (MS) διαχωρίζει και ποσοτικοποιεί τα ιόντα, (Σχήμα 1.3.).



Σχήμα 1.3. Σχηματική διάταξη ICP-MS από την εισαγωγή του δείγματος μέχρι το φάσμα μάζας [2, 3, 16]

1.1.2. Οργανολογία ICP-MS

Το φασματόμετρο ICP-MS, (Σχήμα 1.4.) αποτελείται από τα τμήματα:



Σχήμα 1.4. Φασματόμετρο ICP-MS [4, 16]

1. επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (πυρσός ICP και RF πηνίο)
2. σύστημα εισαγωγής δείγματος - εκνεφωτής (nebulizer)

3. σύστημα διασύνδεσης (interface): συνδέει την πηγή ιόντων ICP (ατμοσφαιρικής πίεσης) με το φασματόμετρο μάζας (υψηλό κενό)
4. οπτικό σύστημα
5. αναλυτή μάζας, ταξινομεί τα ιόντα σε σχέση με την αναλογία m/z
6. ανιχνευτή ιόντων μετρά τα ιδιαίτερα ιόντα που εξέρχονται από το τετράπολο
7. ηλεκτρονικό υπολογιστή για διαχείριση και αποτίμηση των δεδομένων

1.2. Επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα

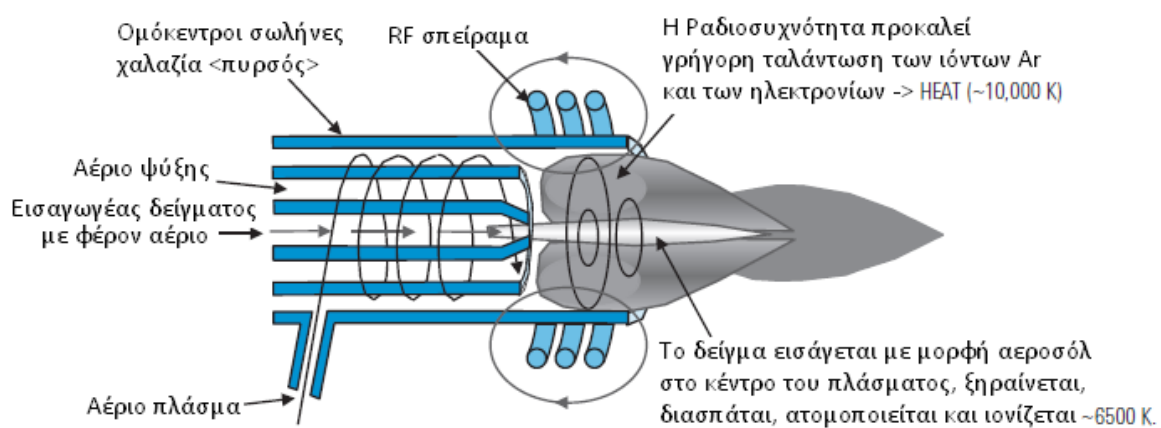
Το επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα Ar είναι ένα πολύ θερμό αέριο που ενεργοποιείται με επαγωγική θέρμανση από ένα ηλεκτρικό πηνίο, περιέχει μία επαρκή συγκέντρωση από ιόντα αργού και ηλεκτρόνια ώστε να κάνουν το αέριο ηλεκτρικά αγωγίμο. Στο πλάσμα τα θετικά ιόντα είναι σχεδόν όλα απλά φορτισμένα και υπάρχουν λίγα αρνητικά ιόντα, ουσιαστικά είναι ηλεκτρικώς ουδέτερο, γιατί σε κάθε θετικό φορτίο ιόντος αντιστοιχεί ένα ελεύθερο ηλεκτρόνιο.

Ένα επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP) για φασματομετρία δημιουργείται σε ένα πυρσό που αποτελείται από τρεις ομόκεντρους σωλήνες, συνήθως κατασκευασμένους από χαλαζία, (Σχήμα 1.5.). Αν ο εσωτερικός σωλήνας του πυρσού αποτελείται από ζαφείρι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την χώνευση των δειγμάτων και το υδροφθορικό οξύ. Η κορυφή του πυρσού είναι τοποθετημένη μέσα σε ένα επαγωγικό πηνίο-σπείραμα που τροφοδοτείται με μια ραδιο-συχνότητα (RF) από ηλεκτρικό ρεύμα και έτσι στην κορυφή του πυρσού το αργό μετατρέπεται σε πλάσμα.

Μια ροή αερίου αργού (συνήθως 14 έως 18 L/min) εισάγεται στον εξωτερικό σωλήνα του πυρσού και ένας ηλεκτρικός σπινθήρας (Tesla) εφαρμόζεται για λίγα δευτερόλεπτα για να εισαγάγει ελεύθερα ηλεκτρόνια εντός του ρεύματος του αργού. Τα ηλεκτρόνια αυτά αλληλοεπιδρούν με τη ραδιοσυχνότητα του μαγνητικού πεδίου που δημιουργείται από το επαγωγικό πηνίο και επιταχύνονται αρχικά προς τη μία κατεύθυνση και μετά προς την άλλη, καθώς το πεδίο μεταβάλλεται με υψηλή συχνότητα, συνήθως 27,12 ή 40,68 MHz [16]. Στη συνέχεια συγκρούονται με τα άτομα αργού, (Σχήμα 1.6.) και μερικές φορές η σύγκρουση αναγκάζει ένα άτομο αργού να χάσει ένα από τα ηλεκτρόνια του ($Ar \rightarrow Ar^+ + e^-$). Το απελευθερωμένο ηλεκτρόνιο με τη σειρά επιταχύνεται από το ταχέως μεταβαλλόμενο μαγνητικό πεδίο και η διαδικασία συνεχίζεται αυτόματα μέχρις ότου ο ρυθμός απελευθέρωσης των νέων ηλεκτρονίων από συγκρούσεις εξισορροπείται από τον ρυθμό ανασυνδυασμού των ηλεκτρονίων με ιόντα αργού. Έτσι δημιουργείται το πλάσμα, μια φλόγα «fireball» που αποτελείται κυρίως από άτομα αργού και ένα μικρό κλάσμα ελεύθερων ηλεκτρονίων και ιόντων αργού, που λόγω της μεγάλης

ηλεκτρονιακής πυκνότητας που επικρατεί στο χώρο αυτό, αναπτύσσονται με την τριβή μεγάλες θερμοκρασίες που φθάνουν μέχρι τους 10.000 K. Η κατάσταση αυτή ονομάζεται εκκένωση επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος και παράγει υπεριώδες φως, (δεν πρέπει να το κοιτάζει κανείς άμεσα). Η θερμοκρασία του πλάσματος είναι πολύ υψηλή, στην κορυφή του πυρσού είναι της τάξης των 10.000 K και περίπου 8.000 K στο κέντρο του πλάσματος (κανάλι), (Σχήμα 1.5.).

Μια δεύτερη ροή αργού (περίπου 1 L/min) εισάγεται στο μεσαίο σωλήνα για να κρατήσει το πλάσμα σε σταθερή θερμοκρασία και μακριά από την κορυφή του πυρσού.



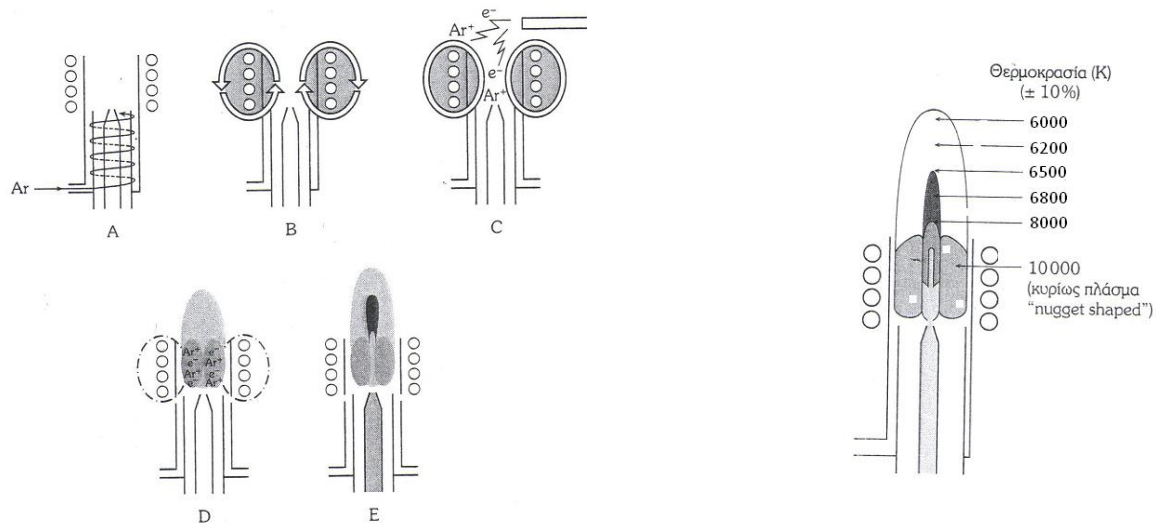
Σχήμα 1.5. Πυρσός επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος [3, 16]

Μια τρίτη ροή αργού (και πάλι συνήθως περίπου 1l/min) αερίου εισάγεται στον κεντρικό σωλήνα για να κρατήσει το πλάσμα μακριά από το άκρο του κεντρικού σωλήνα, αυτή η ροή του αερίου καθώς διέρχεται μέσα από το κέντρο του πλάσματος, σχηματίζει ένα κεντρικό κανάλι το οποίο είναι ψυχρότερο από το περιβάλλον πλάσμα, αλλά εξακολουθεί να είναι πολύ θερμότερο από μια χημική φλόγα.

1.2.1. Σχηματική αναπαράσταση δημιουργίας του επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος

A. το αέριο Ar στροβιλίζεται μέσα στον πυρσό, στο πάνω μέρος του οποίου υπάρχει το επαγωγικό πηνίο-σπείραμα, B. ραδιοσυχνότητα (RF) εφαρμόζεται στο επαγωγικό πηνίο, C. Σπινθήρας (Tesla) ιονίζει μερικώς το αργό, D. Τα ελεύθερα ηλεκτρόνια του αργού επιταχύνονται από το πεδίο ραδιοσυχνοτήτων προκαλώντας περαιτέρω ιονισμό του

αργού και έτσι δημιουργείται το πλάσμα, Ε. το αεροζόλ του δείγματος περνά από το εσωτερικό του πυρσού και δημιουργεί μια οπή στο πλάσμα, σχήμα 1.6.



Σχήμα 1.6. Αναπαράσταση των σταδίων δημιουργίας του επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος

Το πλάσμα αργού τροφοδοτείται από την αλληλεπίδραση που υπάρχει από ηλεκτρομαγνητικό πεδίο το οποίο δημιουργείται από μια γεννήτρια ραδιοσυχνότητας. Υπάρχουν οι γεννήτριες σταθερής συχνότητας (frequency stabilized Rf generators) που παράγουν σταθερή ραδιοσυχνότητα και οι γεννήτριες ελεύθερης διαδρομής (free ranging generators) στις οποίες η συχνότητα μεταβάλλεται καθώς αλλάζουν οι συνθήκες του πλάσματος έτσι ώστε να επιτυγχάνεται καλύτερη συμβατότητα της ραδιοσυχνότητας με το πλάσμα. Σήμερα χρησιμοποιούνται οι γεννήτριες ελεύθερης διαδρομής. Το πηγίο ψήχεται ομοιογενώς με νερό ή αέριο αργό.

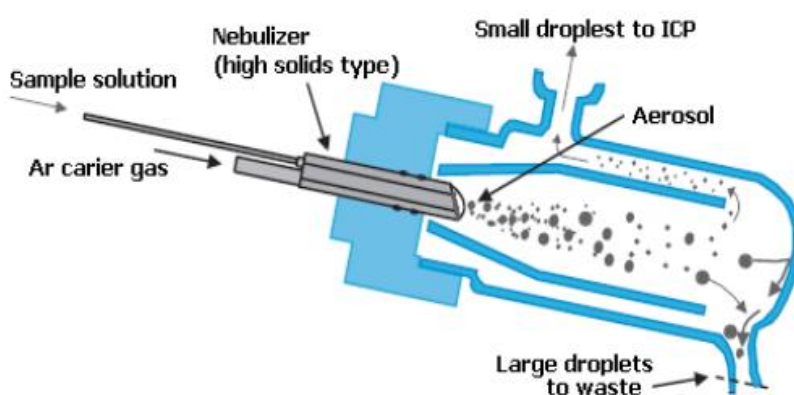
1.2.2. Πλεονέκτημα χρήσης του αργού

Για τη δημιουργία του πλάσματος χρησιμοποιούμε κυρίως αργό και λιγότερο το ήλιο. Με το πλάσμα αργού έχουμε τα παρακάτω πλεονεκτήματα έναντι των άλλων αερίων, το αργό είναι άφθονο (βρίσκεται στην ατμόσφαιρα 9340 ppm ως αποτέλεσμα της ραδιενεργού διάσπασης του καλίου), είναι φθηνότερο από άλλα ευγενή αέρια, είναι εμπορικά διαθέσιμο, αγοράζεται σε φιάλες με εγγυημένη καθαρότητα 99,999%, είναι χημικά αδρανές, επομένως δεν σχηματίζει δεσμούς με τα διάφορα προσδιοριζόμενα στοιχεία. Επίσης έχει υψηλότερο πρώτο δυναμικό ιονισμού 15,6 eV και έτσι μπορεί να ιονίσει τα περισσότερα στοιχεία του περιοδικού πίνακα, η αντίδραση ($Ar^+ + e^- \rightarrow Ar$) είναι περισσότερο ενεργειακά ευνοϊκή από την αντίδραση ($M^+ + e^- \rightarrow M$), αυτό

εξασφαλίζει ότι το δείγμα παραμένει ιονισμένο (ως M^+) ώστε ο φασματογράφος μάζας να μπορεί να το ανιχνεύσει.

1.3. Σύστημα εισαγωγής δείγματος - εκνεφωτής (nebulizer)

Το προς ανάλυση δείγμα εισάγεται με τη βοήθεια μιας περισταλτικής αντλίας σε μορφή διαλύματος στον εκνεφωτή (nebulizer), που το μετατρέπει σε μικροσταγόνες (αερόλυμα), αυτές εισέρχονται στο θάλαμο αεριοποίησης του δείγματος (spray chamber) και από εκεί στο εσωτερικό κανάλι του πυρσού με τη βοήθεια ρεύματος αργού, (Σχήμα 1.7.). Μέσα στον οριζόντιο πυρσό ένα σταγονίδιο του εκνεφεοποιημένου δείγματος εξατμίζεται και τυχόν στερεά που είναι διαλυμένα στο υγρό εξατμίζονται και διασπώνται σε άτομα [5].



Σχήμα 1.7. Εκνεφωτής [4]

Στις θερμοκρασίες που επικρατούν στο πλάσμα, ένα σημαντικό ποσοστό των ατόμων, από πολλά χημικά στοιχεία ιονίζεται, (κάθε άτομο χάνει το πιο χαλαρά δεσμευμένο ηλεκτρόνιο του και σχηματίζει ένα μεμονωμένο φορτισμένο ιόν) δηλαδή οι μικροσταγόνες, διασπώνται, αεριοποιούνται και ατομοποιούνται, μετά ιονίζονται χάνοντας ένα ηλεκτρόνιο.

Σε αυτές τις συνθήκες ιονίζονται σχεδόν όλα τα στοιχεία και δημιουργούνται ιόντα κυρίως απλού φορτίου (+). Η διαδικασία κρατά 10 ms από τη στιγμή που η μικροσταγόνα φτάνει στο πλάσμα.

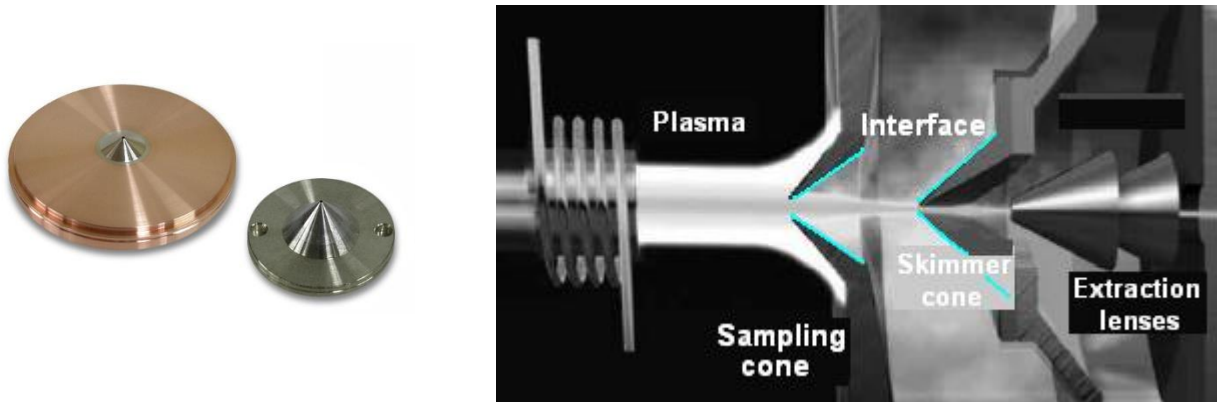
1.3.1. Σύστημα διασύνδεσης ICP με φασματομετρία μαζών (interface)

Το σύστημα διασύνδεσης της ICP με τη φασματομετρία μαζών, αναγκάζει ένα μέρος από τα ιόντα που δημιουργούνται στο πλάσμα να περάσουν μέσω μιας σειράς συνήθως 2 ανεστραμμένων κώνων, (Σχήμα 1.8.). Οι κώνοι είναι μεταλλικοί δίσκοι που

κατασκευάζονται από Cu, Ni ή Pt και είναι ουδέτερα φορτισμένοι. Έχουν μια κεντρική μικρή τρύπα 1mm ή και λιγότερο για να διατηρείται το υψηλό κενό στην περιοχή του φασματομέτρου, από την οποία περνούν τα ιόντα.

Ένα κλάσμα των σχηματιζόμενων ιόντων διέρχεται μέσω του πρώτου κώνου οπής ~ 1mm (δειγματολήπτης- sample cone) και στη συνέχεια ένα κλάσμα αυτού του αερίου διέρχεται από τον δεύτερο κώνο οπής ~ 0,4mm (αποκορυφωτής- skimmer cone). Μεταξύ πρώτου και δεύτερου κώνου δημιουργείται και συντηρείται κενό από μια μηχανική περιστροφική αντλία (10^{-1} Atm), ταυτόχρονα ο χώρος αυτός ψύχεται με νερό, κάτω από αυτές τις συνθήκες δεν δημιουργούνται άλλα ιόντα [16].

Μετά το δεύτερο κώνο, μέχρι και τον ανιχνευτή δημιουργείται και συντηρείται υψηλό κενό (10^{-5} Atm) από δυο ισχυρές τουρμπομοριακές αντλίες (απαραίτητο για τη λειτουργία της φασματομετρίας μάζας), αυτή η περιοχή ψύχεται με αέριο ήλιο οπότε τα άτομα που δεν έχουν ιονιστεί στο πλάσμα ψύχονται απότομα στους 4 K, υγροποιούνται και απομακρύνονται. Τα ιόντα που είναι φορτισμένα δεν υγροποιούνται και οδηγούνται προς το τετραπολικό φίλτρο μάζας, όπου και διαχωρίζονται με βάση το λόγο μάζα προς φορτίο.



Σχήμα 1.8. Οι δυο κώνοι ICP-MS [3]

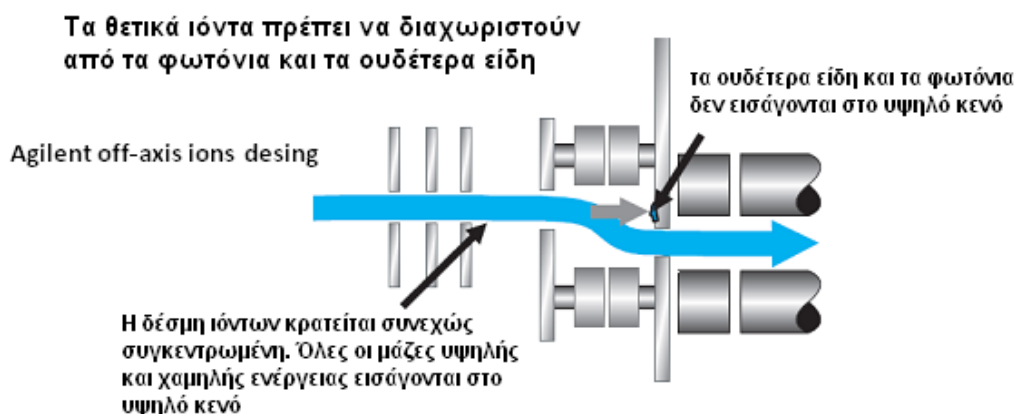
1.3.2. Οπτικό σύστημα

Αποτελείται από το:

- σύστημα εστίασης ιόντων (φακοί ιόντων και εστίαση ιόντων)
- το κελί σύγκρουσης/αντίδρασης και την
- οπτική ιόντων

1.3.3. Σύστημα εστίασης ιόντων - φακοί ιόντων (ion focusing)

Εστιάζουν τα ιόντα καθώς εξέρχονται από τον αποκορυφωτή κώνο μέχρι να φθάσουν στον αναλυτή μάζας (τετράπολο), σε μια συμπαγή δέσμη, (Σχήμα 1.9.). Με εφαρμογή θετικού δυναμικού στους φακούς ιόντων, τα ιόντα επιταχύνονται στο κέντρο των φακών. Χαμηλές τάσεις επικεντρώνουν τα μικρής μάζας ιόντα, ενώ μεγαλύτερες τάσεις επικεντρώνουν τα μεγάλης μάζας ιόντα [6, 7, 16].



Σχήμα 1.9. Φακοί ιόντων [4]

Παράλληλα οι φακοί ιόντων κάνουν ακόμη μια σπουδαία λειτουργία, εκτρέποντας την συμπαγή δέσμη με αποτέλεσμα να διαχωρίζονται τα θετικά ιόντα από:

- τα ανεπιθύμητα ουδέτερα σωματίδια που δημιουργήθηκαν ή μεταφέρθηκαν από το ICP, όπως άτομα αργού (Ar) και μόρια οξυγόνου (O₂)
- τα αρνητικά φορτισμένα άτομα και μοριακά ιόντα
- τα δραστικά μη σταθερά άτομα και ιόντα (metastable)
- τα φωτόνια που τα αποβάλλουν, διαφορετικά αν έφθαναν στον ανιχνευτή θα αύξαναν το υπόβαθρο θορύβου.

1.3.4. Κελί σύγκρουσης/αντίδρασης (CRC- collision/reaction cell)

Η δυνατότητα ανίχνευσης των παραδοσιακών αναλυτών τετραπόλων μάζας για ορισμένα κρίσιμα στοιχεία εμποδίζεται σοβαρά από τον σχηματισμό πολυατομικών φασματικών παρεμποδίσεων που δημιουργούνται από την αντίδραση του αργού (Ar) με διαλύτες, ή του δείγματος με βασικά ιονισμένα είδη, ή και μεταξύ τους συνδυασμός οπότε δημιουργούνται πολυατομικά ιοντικά είδη με αναλογία m/z ίδια με εκείνη του ιόντος της αναλυτέας ουσίας που ενδιαφέρει.

Το ICP-MS επιτρέπει τον συμπροσδιορισμό στοιχείων με ατομικές κλίμακες μάζας (amu) 7 έως 240 (Li έως U). Μερικές μάζες όμως δεν μπορούν να προσδιοριστούν λόγω ίδιας μάζας με σχηματιζόμενες ιοντικές παρεμποδίσεις.

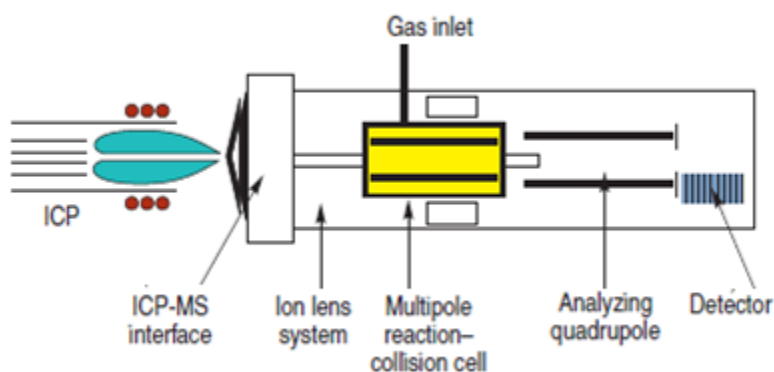
Παράδειγμα η μάζα 40, λόγω της αφθονίας του αργού (^{40}Ar) στο δείγμα, η μάζα 80 λόγω του διμερούς αργού ($^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$) και η μάζα 56 (λόγω του σχηματιζόμενου $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$), το τελευταίο των οποίων παρεμποδίζει σημαντικά την ανάλυση του Fe. Τα ανωτέρω προβλήματα εξαλείφονται αν το όργανο είναι εφοδιασμένο με κελί σύγκρουσης - αντίδρασης, μια νέα τεχνολογία που ουσιαστικά αφαιρεί τον σχηματισμό πολλών επιβλαβών ιοντικών ειδών, που παρεμποδίζουν πριν εισέλθουν στον αναλυτή μάζας.

Πως λειτουργεί το κελί σύγκρουσης/αντίδρασης

Το κελί είναι ένας κλειστός θάλαμος, που έχει οπή εισαγωγής και εξαγωγής, εντός αυτού μπορούν να πραγματοποιηθούν συγκρούσεις/αντιδράσεις [8, 16].

- πάντα στο κελί εισέρχεται ένα αέριο, οπότε η πίεση στο εσωτερικό του κελιού αυξάνει (η πίεση εξαρτάται από την παροχή του αερίου και την οπή εισαγωγής και εξαγωγής)
- η διαδρομή των ιόντων στο κελί ελέγχεται από το δυναμικό του κελιού και τις οπές εισαγωγής και εξαγωγής
- τα ιόντα μπαίνουν στο κελί και αντιδρούν με το αέριο που υπάρχει σ αυτό
- η κύρια χρήση του κελιού είναι η μείωση ή εξάλειψη των πολυατομικών παρεμβολών
- αν ένα κελί θα είναι σύγκρουσης ή αντίδρασης εξαρτάται από το πολύπολο (τετράπολο, εξάπολο ή οκτάπολο) και το αέριο που εισάγεται σε αυτό.

Το κελί σύγκρουσης/αντίδρασης τοποθετείται πριν από τον αναλυτή μάζας (quadrupole), (Σχήμα 1.10.) και με τη λειτουργία του απομακρύνει τα πολυατομικά φάσματα των ιόντων που παρεμποδίζουν.



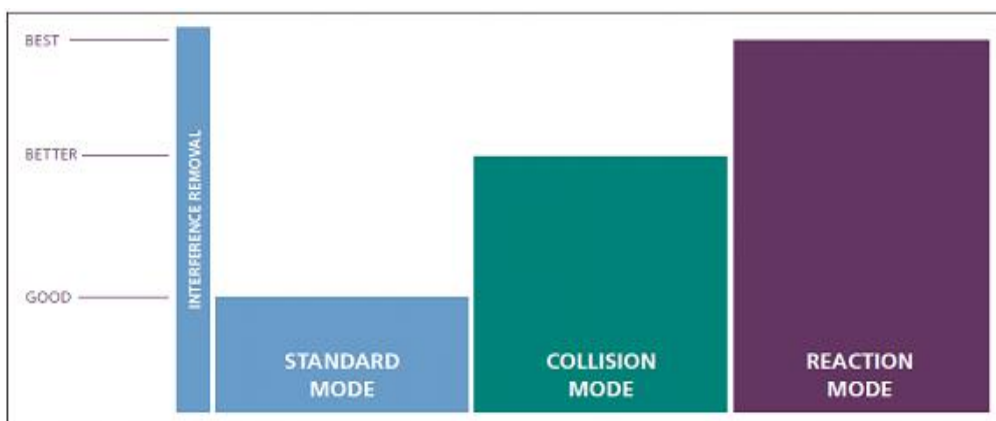
Σχήμα 1.10. Κελί σύγκρουσης/αντίδρασης [9]

Στον πίνακα 1 φαίνονται μερικές παρεμβολές στα αντίστοιχα στοιχεία της αναλυτέας ουσίας (analyte). Τέλος να σημειωθεί ότι τροφοδοτώντας την οπή του δειγματολήπτη ή του αποκορυφωτή κώνου με αέριο σύγκρουσης ή αντίδρασης έχουμε επιπλέον συγκρούσεις και αντιδράσεις που καταστρέφουν τα πολυατομικά ιόντα που παρεμποδίζουν. Στην περίπτωση που το κελί μπορεί να λειτουργεί και για τις δυο διαδικασίες ταυτόχρονα ονομάζεται universal και επιτρέπει περισσότερες εφαρμογές.

Πίνακας 1.1

Παρεμβολές - Interference	Αναλυτέα ουσία - Analyte
$^{12}\text{C}^{15}\text{N}$, $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^1\text{H}$	^{27}Al
$^{38}\text{Ar}^1\text{H}$	^{39}K
^{40}Ar	^{40}Ca
$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}$	^{51}V
$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^1\text{H}$	^{52}Cr
$^{36}\text{Ar}^{16}\text{O}$	^{52}Cr
$^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$	^{52}Cr
$^{23}\text{Na}^{40}\text{Ar}$	^{63}Cu
$^{38}\text{Ar}^{16}\text{O}^1\text{H}$	^{55}Mn
$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$	^{56}Fe
$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^1\text{H}$	^{57}Fe
$^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$	^{75}As
ArAr	^{80}Se

Στο (Σχήμα 1.11.) φαίνεται η δυνατότητα αφαίρεσης των παρεμποδίσεων της κάθε λειτουργίας. Η standard λειτουργία ενδείκνυται για στοιχεία που δεν έχουν παρεμποδίσεις, η λειτουργία με collision για απομάκρυνση λίγων παρεμποδίσεων και η λειτουργία με reaction για απομάκρυνση πολλών παρεμποδίσεων.



Σχήμα 1.11. Δυνατότητα αφαίρεσης παρεμποδίσεων [3]

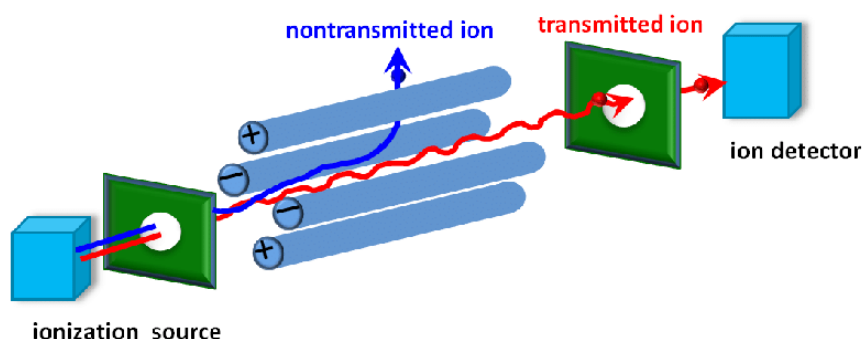
1.3.5. Οπτική ιόντων

Τα ιόντα που εξέρχονται από το κελί σύγκρουσης/αντίδρασης λόγω της απότομης αλλαγής πίεσης και θερμοκρασίας και με την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου στην είσοδο του αναλυτή μάζας, επιταχύνονται ελεγχόμενα και δημιουργούν μια ιοντική δέσμη κατευθυνόμενη στον αναλυτή μάζας.

1.3.6. Αναλυτής μάζας - Τετράπολο

Κύριο είδος αναλυτή μάζας είναι ο τετραπολικός που δίνει φάσμα εύκολο να ερμηνευτεί. Αποτελείται από 4 ηλεκτρικά αγωγίμους κυλίνδρους (διαμέτρου περίπου 1 cm και μήκους 15-20 cm) που τροφοδοτούνται με τάση συνεχούς ρεύματος, οι 2 κύλινδροι (1^ο ζεύγος) από τους 4 κυλίνδρους με + DC, ενώ οι άλλοι 2 κύλινδροι (2^ο ζεύγος) με - DC. Μια εναλλασσόμενη τάση ραδιοσυχνότητας (RF) εφαρμόζεται στο 1^ο ζεύγος και μια άλλη στο 2^ο με διαφορά φάσης 180^ο.

Το ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται ανάμεσα στους 4 κυλίνδρους προσανατολίζει τα ιόντα, ενώ το πεδίο ραδιοσυχνότητας τα επιταχύνει εναλλάξ προς τους κυλίνδρους και τα αναγκάζει να ακολουθήσουν μια περιστρεφόμενη πορεία, (Σχήμα 1.12.).



Σχήμα 1.12. Τετράπολο [10]

Η αναλογία DC/RF που ελέγχεται από τον υπολογιστή επιτρέπει μόνο ένα ορισμένο λόγο m/z να περνά από το τετράπολο σε μια δεδομένη στιγμή και θα φθάνει στον ανιχνευτή, έτσι τα ιόντα-σταθερά θραύσματα διαχωρίζονται βάσει του λόγου της μάζας προς το φορτίο τους (m/z) με ακρίβεια $\pm 0,05$ amu. Τα υπόλοιπα θραύσματα που είναι ασταθή σε αυτή την τάση συγκρούονται με τους κυλίνδρους και έτσι ποτέ δεν φθάνουν στον ανιχνευτή. Αν π.χ. ρυθμιστεί να περνά $m/z = 23/1$ μόνο τα ιόντα νατρίου θα περνούν ενώ τα άλλα ιόντα όχι, ομοίως αν ρυθμιστεί να περνά $m/z = 63/1$ μόνο τα ιόντα Cu θα περνούν από τον αναλυτή και θα ανιχνεύονται [10].

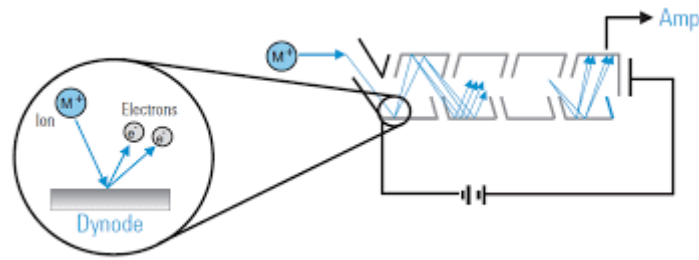
Στο τετράπολο οι επιλογές m/z μπορούν να αλλάζουν σε κάθε επιθυμητή στιγμή. Επειδή το δυναμικό στους κυλίνδρους του τετράπολου μπορεί να μεταβάλλεται πολύ γρήγορα αυτό σημαίνει ότι το τετράπολο μπορεί να διαχωρίζει πάνω από 5.000 μονάδες ατομικής μάζας (amu) το δευτερόλεπτο και η σάρωση τιμών δυναμικού πραγματοποιείται πολύ γρήγορα σε όλη την περιοχή 2-280 amu, διαρκεί περίπου 100 ms με διαχωριστική ικανότητα 1 amu σε όλη την περιοχή μαζών. Αυτή η ιδιότητα επιτρέπει στο τετράπολο να κάνει ταυτόχρονη πολυστοιχειακή ανάλυση, στην πραγματικότητα για σάρωση 25 στοιχείων με καλή ακρίβεια απαιτούνται 3-4 min. Με αυτό τον τρόπο βρίσκει τα διαφορετικά ισότοπα ενός στοιχείου.

Η καλή λειτουργία του τετράπολου απαιτεί τον προσεκτικό καθαρισμό του φιλμ που δημιουργείται στις ράβδους από τη συσσώρευση των ιόντων που απορρίπτονται στη διαδικασία ανάλυσης.

Υπάρχουν και άλλοι τύποι αναλυτών εκτός του τετραπόλου όπως: αναλυτές μαγνητικής εστίασης, αναλυτές χρόνου πτήσης, αναλυτές με παγίδα ιόντων (ion trap).

1.3.7. Ανιχνευτής ιόντων

Ανιχνεύει τα ιόντα που εξέρχονται από τον αναλυτή μάζας (τετράπολο) και έχουν διαχωριστεί από το λόγο m/z . Το ρεύμα των ιόντων είναι γενικά χαμηλό γι αυτό χρειάζεται ένας πολλαπλασιαστής. Ο ανιχνευτής μεταφράζει τον αριθμό των ιόντων που κτυπούν, σε ηλεκτρικό σήμα που σχετίζεται με τον αριθμό του ενδιαφέροντος στοιχείου μέσω χρήσης πρότυπων διακρίβωσης. Συνήθως χρησιμοποιείται ο πολλαπλασιαστής ηλεκτρονίων συνεχούς δυνόδου που αποτελείται από ένα αριθμό δυνόδων, (Σχήμα 1.13.). Τα εισερχόμενα θετικά φορτισμένα ιόντα προσπίπτουν στην πρώτη δύνοδο και παράγουν ένα ή περισσότερα δευτερεύοντα ηλεκτρόνια. Στη συνέχεια αυτά τα ηλεκτρόνια κτυπούν στη δεύτερη δύνοδο και ελευθερώνουν περισσότερα ηλεκτρόνια, μετά στην τρίτη δύνοδο κ.ο.κ. Με κάθε νέο κτύπημα παράγονται περισσότερα ηλεκτρόνια και το σήμα ενισχύεται 10^4 έως 10^7 φορές. Ο ανιχνευτής μετρά τα κτυπήματα ανά δευτερόλεπτο (counts per sec-cps), αποθηκεύει το ολικό σήμα από κάθε μάζα (m/z) και δίνει το ποιοτικό φάσμα του δείγματος, γενικά μετρά μερικές δεκάδες ιόντων το δευτερόλεπτο. Το μέγεθος κάθε κορυφής είναι ανάλογο της συγκέντρωσης ενός στοιχείου στο δείγμα [1, 11].



Σχήμα 1.13. Ανιχνευτής ιόντων [11]

1.4. Βαθμονόμηση και ποσοτικοποίηση

Ένα τυπικό ICP-MS είναι σε θέση να ανιχνεύσει στην περιοχή του 1 ng/L μέχρι έως 100 mg/L ανάλογα με το στοιχείο. Οι ποσοτικές μέθοδοι με ICP-MS περιλαμβάνουν τις μεθόδους:

- Εξωτερική βαθμονόμηση (με ή χωρίς εσωτερικό πρότυπο)
- Μέθοδο της σταθεράς προσθήκης
- Ημιποσοτική ανάλυση
- Μέτρηση ισοτοπικής αναλογίας
- Ισοτοπική αραίωση (IDMS)

1.4.1. Ποσοτική ανάλυση

Επιτυγχάνεται με εξωτερική βαθμονόμηση (με ή χωρίς εσωτερικό πρότυπο) είναι η πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδος για υγρά δείγματα. Με αυτήν μετράμε την ένταση του σήματος κάθε στοιχείου-επιλεγόμενου ισοτόπου (κτυπήματα-counts στον ανιχνευτή) που ενδιαφέρει και το συγκρίνουμε με την ένταση του σήματος της καμπύλης βαθμονόμησης για να βρούμε τη συγκέντρωσή του. Οι καμπύλες βαθμονόμησης γίνονται συνήθως με χρήση 3-5 προτύπων διαλυμάτων, στην περιοχή που ενδιαφέρει, επιπλέον το τυφλό δείγμα. Προσέχουμε τα διαλύματα αναφοράς-βαθμονόμησης να πλησιάζουν όσο γίνεται περισσότερο το άγνωστο διάλυμα. Υπάρχει δυνατότητα ταυτόχρονης ποσοτικής ανάλυσης έως 36 στοιχείων με ακρίβεια $\pm 1-2\%$.

Κάνοντας την ποσοτική ανάλυση έχουμε τη δυνατότητα καταγραφής του πλήρους φάσματος όλων των μαζών που περιέχονται στο δείγμα (άσχετα αν δεν μας ενδιαφέρουν όλες). Συνήθως η καταγραφή του πλήρους φάσματος διαρκεί 3-4 min με κατανάλωση 2-3 mL δείγμα.

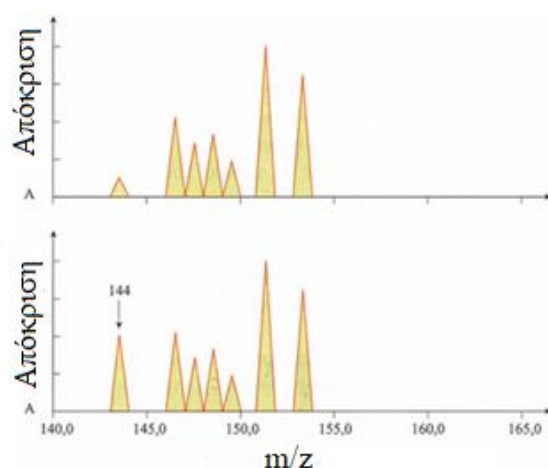
1.4.2. Ημιποσοτική ανάλυση

Χρησιμοποιείται προκειμένου να γνωρίσουμε γρήγορα όλα τα στοιχεία ενός τελείως άγνωστου δείγματος, σε οποιαδήποτε κλίμακα συγκέντρωσης, (με αποκλίσεις $\pm 30\%$ από τις πραγματικές τιμές συγκέντρωσης) [12].

Για να γίνει η ημιποσοτική ανάλυση απαιτείται μόνο η χρήση μιας καμπύλης βαθμονόμησης ενός πρότυπου ή ένα πρότυπο υψηλής ποιότητας για ημιποσοτική ανάλυση, που περιέχει οπωσδήποτε τρία στοιχεία. Ειδικό λογισμικό υπολογίζει μέχρι και 80 στοιχεία στο τελείως άγνωστο δείγμα με μικρή απόκλιση των πραγματικών τιμών συγκέντρωσης, έτσι δεν είναι υποχρεωτικό να βαθμονομήσουμε το ICP-MS για κάθε στοιχείο του δείγματος.

1.4.3. Ισοτοπική αναλογία, για ισοτοπική ανάλυση και ισοτοπική αραίωση

Για κάθε μετρούμενο στοιχείο μετράμε συνήθως ένα ισότοπο του (τυπικά μετράμε πάντα ένα ισότοπο), αντί την αναλογία ισωτόπων ή την φυσική αφθονία που είναι σταθερή στη φύση. Στα στοιχεία που έχουν περισσότερα του ενός σταθερά ισότοπα (περίπου το 80% των στοιχείων του περιοδικού συστήματος) εφαρμόζεται η τεχνική της ισοτοπικής αραίωσης, δηλαδή το δείγμα “εμπλουτίζεται” με διάλυμα γνωστής ποσότητας ισωτόπου και μετράται η μεταβολή του λόγου των κορυφών των δυο ισωτόπων πριν και μετά την αραίωση, (Σχήμα 1.14.). Έτσι γίνεται καλύτερος ποσοτικός προσδιορισμός επειδή το εμπλουτισμένο ισότοπο έχει τις ίδιες φυσικοχημικές ιδιότητες με το αναλυτέο στοιχείο, ενώ παράλληλα είναι το καλύτερο δυνατό εσωτερικό πρότυπο και δεν απαιτείται διάλυμα αναφοράς.



Σχήμα 1.14. Μέθοδος ισοτοπικής αραίωσης για τον προσδιορισμό του στοιχείου Σαμάριο (Sn) A. Ισότοπα σαμαρίου με τη φυσική σχετική αφθονία τους B. Σαμάριο εμπλουτισμένο με το ισότοπο ^{144}Sn [15]

Παράδειγμα μέτρησης της αναλογίας ισοτόπων είναι ο Pb, όπου το ένα ισότοπο προέρχεται από τη δημιουργία του στη γη, ενώ το άλλο είναι αποτέλεσμα διάσπασης ραδιενεργών ουσιών, έτσι οι ισοτοπικές αναλογίες διαφέρουν ανάλογα με την προέλευση του μολύβδου και σε αυτήν την περίπτωση πρέπει να μετρηθούν [17].

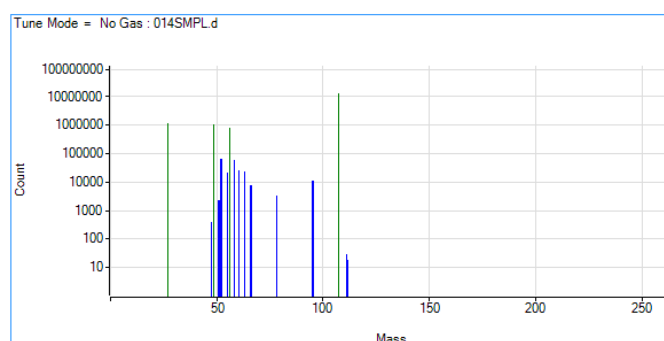
Οι προσδιορισμοί αναλογιών ισοτόπων χρησιμοποιούνται σε μια ποικιλία εφαρμογών γεωλογικών, πυρηνικών, στον προσδιορισμό πηγών ρύπανσης, πηγών ιχνοστοιχείων και ακαθαρσιών και σαν ιχνηθέτες σε βιολογικές μελέτες.

Στο (Σχήμα 1.15.) φαίνονται με χρώμα τα στοιχεία που αναλύονται με την ICP-MS, ενώ τα λευκά δεν αναλύονται ή δεν έχουν φυσικά ισότοπα. Οι ράβδοι παριστάνουν τον αριθμό και την φυσική αφθονία των ισοτόπων κάθε στοιχείου, που αναφέρεται και σαν ισοτοπικό δακτυλικό αποτύπωμα του στοιχείου.



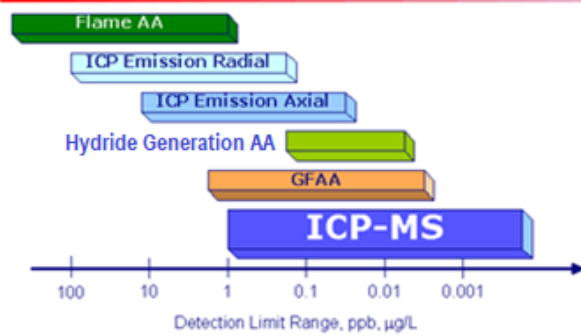
Σχήμα 1.15. Στοιχεία που αναλύονται με ICP-MS [13]

1.5. Φάσμα μάζας ICP-MS



Σχήμα 1.16. Φάσμα μάζας ICP-MS [16]

1.5.1. Σύγκριση τεχνικής ICP-MS με άλλες τεχνικές στοιχειακής ανάλυσης



Σχήμα 1.17. Σύγκριση διαφόρων ατομικών τεχνικών [12]

1.6. ΛΕΙΖΕΡ ΕΚΤΟΜΗ-ΕΠΑΓΩΓΙΚΑ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΟ ΠΛΑΣΜΑ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ, LA-ICP-MS

Η τεχνική αυτή που χρησιμοποιεί το laser ως μέσον διάλυσης των δειγμάτων, βρίσκει εφαρμογή στην απευθείας ανάλυση στερεών δειγμάτων (χωρίς προηγούμενη διαλυτοποίησή τους) και χωρίς να παρατηρείται απώλεια στο υλικό (μη καταστροφική τεχνική). Στη σχάση με χρήση laser, μια ισχυρή ακτίνα laser χτυπάει την επιφάνεια του δείγματος, που βρίσκεται με μορφή παστίλιας σε θάλαμο που διαρρέεται από αργό, σε επιφάνεια μερικών τετραγωνικών μικρομέτρων, με αποτέλεσμα να γίνεται εξόρυξη και εκτίναξη διαφόρων μικρών κομματιών του δείγματος. Το ατομοποιημένο δείγμα με τη βοήθεια ρεύματος αερίου αργού παρασέρνεται και κατευθύνεται προς τον ατομοποιητή πλάσματος (ICP), όπου πραγματοποιείται ατομοποίηση και ιονισμός. Το παραγόμενο πλάσμα εισέρχεται στο φασματόμετρο μαζών προς ανάλυση, (Σχήμα 1.18.) Teledyne LSX-213 G2.



Σχήμα 1.18. LA-ICP-MS, ICP-MS Agilent 7700X coupled with LA Teledyne LSX-213 G2 [16]

Αναφορές

- [1] ISO 17294-1 (2005), Water Quality of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-) - Part 1: General guidelines.
- [2] Agilent Atomic Spectroscopy-ICP-MS.
- [3] <http://www.analytical.gr/wp-content/uploads/2016/12/Agilent%20Atomic%20Spectroscopy-ICP-MS.pdf>
- [4] ICP-MS Principles and Hardware manual, Agilent Technologies, 2005
- [5] Aceto, M., (2016), The use of ICP-MS in food Traceability. In K. Miller (Ed.), Advances in Food Traceability Techniques and Technologies (pp. 137-164), UK: Woodhead Publishing.
- [6] Thomas, R. (2008), Practical guide to ICP-MS: a tutorial for beginners.
- [7] Thomas, R. (2004), Practical guide to ICP-MS, New York, N.Y.: Marcel Dekker.
- [9] Tyler, G. (2018), ICP-OES, ICP-MS and AAS Techniques Compared.” Horiba.
<https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcS03tC-yfKNFqMBnpowArasLbUCLYeZcuGbKA&usqp=CAU>
- [10] <https://www.researchgate.net/profile/Eliana-Alves-2/publication/329040300/figure/fig4/AS:694663832948740@1542632172204/Scheme-of-quadrupole-mass-analyzer-Q.png>
- [11] https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcSJ6MUCszTT3ix2Ah-L_HUBwVq1kr4sc8AlkrGnNY5K4raZIL3U-YdESnT5isEF2b3mA1c&usqp=CAU
- [12] The 30-Minute Guide to ICP-MS, https://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-74849tch_icpmsthirtyminuteguide.pdf
- [13] https://cdn.dal.ca/content/dam/dalhousie/images/sites/laser-ablation/periodic_table.gif.lt_d022ad9843332f674d7cc830a3f1f629.res/periodic_table.gif
- [14] <https://www.intechopen.com/media/chapter/69423/media/F5.png>
- [15] Μαρία Οξενκιούν-Πετροπούλου (2020), Φασματομετρικές Μέθοδοι στην Σύγχρονη Ενόργανη Ανάλυση, ISBN 978-618-5309-88-6.
- [16] Θωμάς Σπανός (2013), κεφάλαιο 13:Επαγωγικά Συζευγμένο Πλάσμα - Φασματομετρία Μάζας, Διεθνές Πανεπιστήμιο της Ελλάδος.
- [17] Vachaecke F. and Degryse P. (2012), Isotopic Analysis: Fundamentals and Applications Using ICP-MS.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ - ΟΡΑΤΟΥ (UV-VIS) ΓΙΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Χρηστίνα Χατζηχρήστου

Τεχνικές Ενόργανης Ανάλυσης, Διεθνές Πανεπιστήμιο Ελλάδος (ΔΙΠΑΕ), Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας, Αγ. Λουκάς, 65404 Καβάλα, Ελλάδα, chrichat@chem.ihu.gr

2.1. Εισαγωγή

2.1.1. Ιδιότητες του φωτός

Οι φασματοσκοπικές μέθοδοι είναι μια ομάδα αναλυτικών μεθόδων που βασίζονται στην αλληλεπίδραση μεταξύ φωτός και ύλης.

Το φως είναι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία που έχει ιδιότητες κυμάτων.

Τα κύματα φωτός αποτελούνται από παλλόμενα ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία κάθετα μεταξύ τους (Σχήμα 2.1.).

Το κύμα περιγράφεται με όρους μήκους κύματος, λ (wavelength), το οποίο είναι η απόσταση των μεγίστων μεταξύ δύο συνεχόμενων κυμάτων, ή με όρους συχνότητας, ν (frequency), η οποία αποτελεί τον αριθμό των ταλαντώσεων που ολοκληρώνει το κύμα ανά δευτερόλεπτο. Το πλήθος των κυμάτων στη μονάδα του μήκους ή η απόσταση ανά κύκλο, ονομάζεται κυματαριθμός και είναι το αντίστροφο του μήκους κύματος [1, 2].

Η σχέση μεταξύ του μήκους κύματος και της συχνότητας δίνεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$\lambda = \frac{c}{\nu} \quad (2.1)$$

όπου λ είναι το μήκος κύματος σε εκατοστά (cm), ν είναι η συχνότητα σε (s^{-1}), ή Hertz (Hz), και c είναι η ταχύτητα του φωτός (3×10^{10} cm/s).

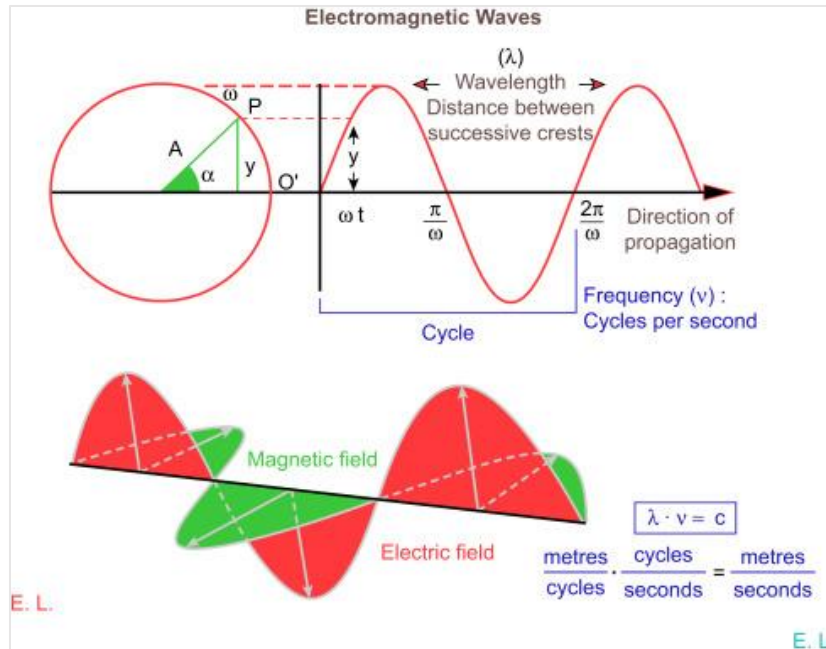
Ο κυματαριθμός (σύμβολο: $\bar{\nu}$) μιας μονοχρωματικής δέσμης φωτός είναι το αντίστροφο του μήκους του κύματος και μετριέται σε cm^{-1} :

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c} \quad (2.2)$$

Οι μονάδες που χρησιμοποιούνται για την περιγραφή του μήκους κύματος έχουν ως εξής:

\AA = angstrom = 10^{-10} μέτρα = 10^{-8} εκατοστόμετρα = 10^{-4} μικρόμετρα
nm = νανόμετρα = 10^{-9} μέτρα = 10 angstroms = 10^{-3} μικρόμετρα
 μm = μικρόμετρα = 10^{-6} μέτρα = 10^4 angstroms

Γενικά, στην υπεριώδη και ορατή περιοχή του φάσματος το μήκος κύματος εκφράζεται σε νανόμετρα ενώ στην υπέρυθη περιοχή σε μικρόμετρα. Ειδικά στην υπέρυθη περιοχή, χρησιμοποιείται συχνά ο κυματαριθμός αντί του μήκους κύματος, εκφρασμένος σε cm^{-1} [2].



Σχήμα 2.1. Ηλεκτρομαγνητικό κύμα που δείχνει τόσο το μαγνητικό όσο και το ηλεκτρικό πεδίο μαζί με τους ορισμούς της συχνότητας και του μήκους κύματος [10] Σε οποιοδήποτε ηλεκτρομαγνητικό κύμα, το μήκος κύματος και η συχνότητα σχετίζονται με την ενέργεια ενός φωτονίου, E , μέσω της εξίσωσης:

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (2.3)$$

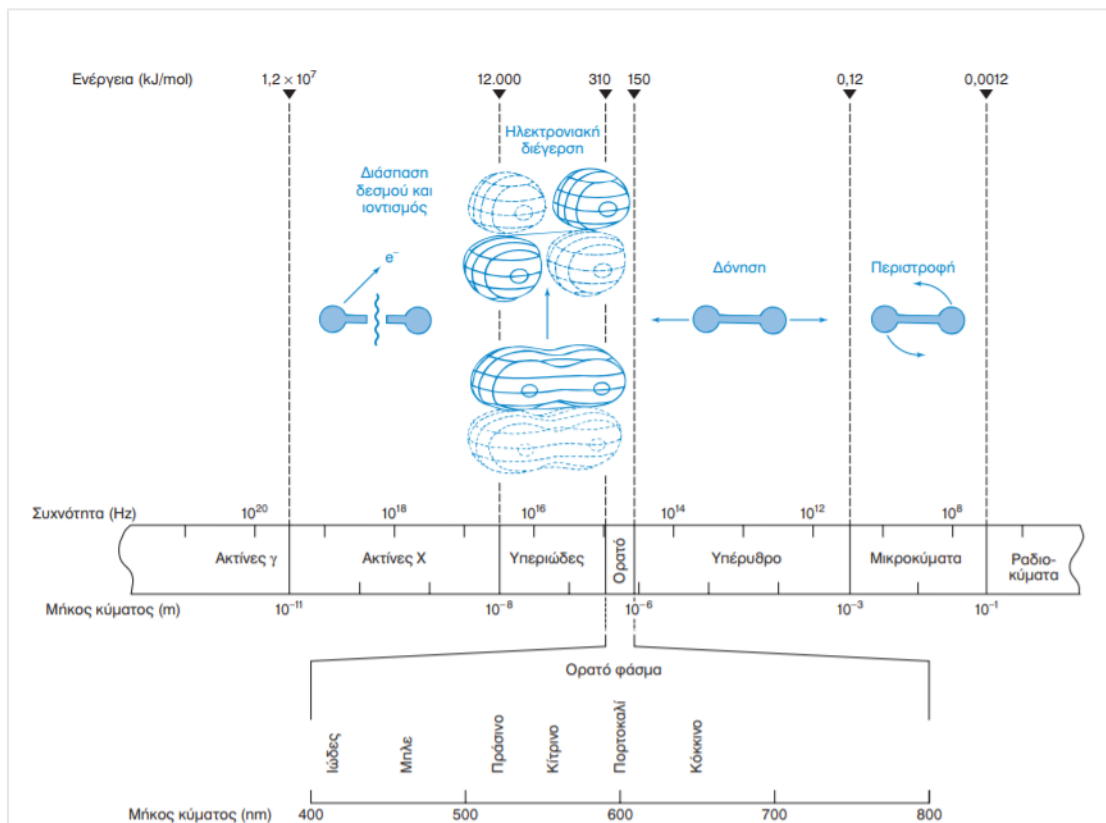
Όπου h είναι η σταθερά του Planck ($6,63 \times 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$).

Από την εξίσωση (2.3) φαίνεται ότι όσο μικρότερο είναι το μήκος κύματος ή όσο μεγαλύτερη είναι η συχνότητα, τόσο υψηλότερη είναι η ενέργεια.

2.2. Το Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα

Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα καλύπτει ένα ευρύ φάσμα συχνοτήτων ή μηκών κύματος. Οι περιοχές του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος επισημαίνονται στο (Σχήμα 2.2.). Δείχνονται επίσης οι τύποι ατομικών και μοριακών μεταπτώσεων που προκύπτουν από τις αλληλεπιδράσεις της ακτινοβολίας με το δείγμα. Η ορατή περιοχή, στην οποία

ανταποκρίνονται τα μάτια μας, αντιπροσωπεύει ένα μικρό μόνο μέρος του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος.



Σχήμα 2.2. Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα. Αναφέρεται μια αντιπροσωπευτική μοριακή διαδικασία που λαμβάνει χώρα όταν απορροφάται φως στη συγκεκριμένη περιοχή. Το ορατό φάσμα καλύπτει τα μήκη κύματος από 380 έως 780 nm. (Από το D. C. Harris, "Βασικές αρχές φασματοφωτομετρίας," στο Ποσοτική Χημική Ανάλυση, Τόμος II, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο 2010, σ. 435).

Το (Σχήμα 2.2.) δείχνει ότι η απορρόφηση της ακτινοβολίας μικροκυμάτων διεγείρει την περιστροφή των μορίων. Η απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας διεγείρει τις δονήσεις. Η ορατή και η υπεριώδης ακτινοβολία προκαλούν μεταπτώσεις ηλεκτρονίων σε τροχιακά υψηλότερης ενέργειας ενώ η απορρόφηση ακτίνων X και ακτινοβολίας υπεριώδους που έχουν μικρό μήκος κύματος, διασπών τους χημικούς δεσμούς και προκαλούν έτσι ιοντισμό των μορίων.

2.3. Bouguer-Lambert-Beer law

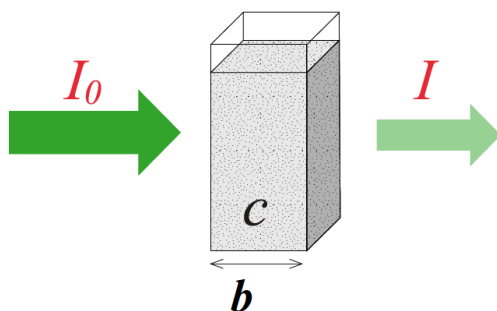
Όταν μονοχρωματική ακτινοβολία ισχύος I_0 διέρχεται από μια διαφανή κυψελίδα μήκους διαδρομής b (cm), η οποία περιέχει ομογενές διάλυμα του αναλύτη, με συγκέντρωση c (mol/L), η ισχύς της μειώνεται σε I λόγω απορρόφησης ($I \leq I_0$). Το κλάσμα της

εισερχόμενης ακτινοβολίας, που διέρχεται από το διάλυμα, ονομάζεται διαπερατότητα (transmittance) και δίνεται από την εξίσωση:

$$\text{Διαπερατότητα: } T = \frac{I}{I_0} \quad (2.4)$$

I_0 είναι η ισχύς της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, I είναι η ισχύς της ακτινοβολίας που εξέρχεται από το δείγμα, (Σχήμα 2.3.).

Το T έχει εύρος από το 0 ως 1. Η επί τοις εκατό διαπερατότητα είναι $100 \times T$ και έχει εύρος από 0 μέχρι 100%. Όταν δεν απορροφάται καθόλου φως η διαπερατότητα είναι 100% [3].



Σχήμα 2.3. Απεικόνιση της εξασθένησης του φωτός λόγω της απορρόφησης [11]

Ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος όρος στη φασματομετρία UV-Vis για να δείξει την ποσότητα του απορροφούμενου φωτός είναι η απορρόφηση, που ορίζεται ως

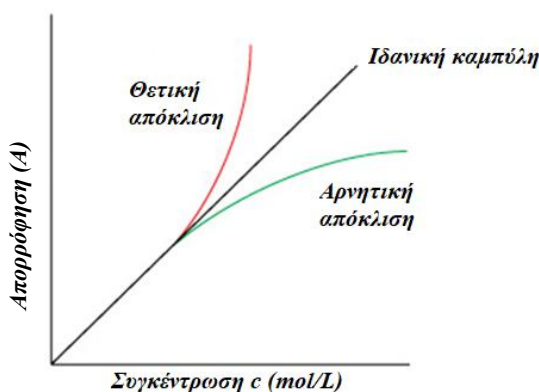
$$\text{Απορρόφηση: } A = -\log T = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot b \cdot c \quad (2.5)$$

Όπου:

Η A και T είναι αδιάστατα μεγέθη, Η ποσότητα ϵ ονομάζεται γραμμομοριακή απορροφητικότητα και έχει μονάδες ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), το b είναι η οπτική διαδρομή και δίνεται συνήθως σε εκατοστόμετρα (cm) και το c είναι η συγκέντρωση του αναλύτη. Το c δίνεται συνήθως σε μονάδες $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (M). Η εξίσωση (2.5) είναι γνωστή ως νόμος Bouguer-Lambert-Beer ή απλά νόμος Beer. Σύμφωνα με αυτόν η απορρόφηση της προσπίπτουσας μονοχρωματικής ακτινοβολίας από το διάλυμα του αναλύτη είναι ευθέως ανάλογη με τη συγκέντρωση c της ουσίας που απορροφά το φως στο δείγμα και της οπτικής διαδρομής της κυψελίδας μέσα στην οποία βρίσκεται το διάλυμα της ουσίας [3].

2.3.1. Αποκλίσεις από το νόμο του Beer

Σύμφωνα με το νόμο Lambert-Beer εξίσωση (2.5), η γραφική παράσταση της απορρόφησης έναντι της συγκέντρωσης πρέπει να είναι ευθεία γραμμή η οποία διέρχεται από την αρχή των αξόνων (μηδενική τιμή τεταγμένης επί την αρχή) με κλίση ίση με ϵb). Σε πολλές περιπτώσεις, η καμπύλη βαθμονόμησης αποκλίνει από αυτήν την ιδανική συμπεριφορά (Σχήμα 2.4.).



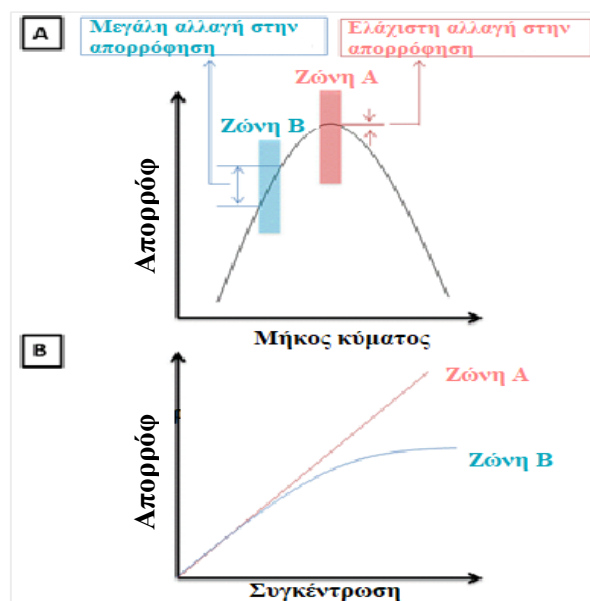
Σχήμα 2.4. Καμπύλες αναφοράς με θετικές και αρνητικές αποκλίσεις από το νόμο του Beer [12]

Αυτές οι αποκλίσεις από τον νόμο Beer-Lambert μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες:

- **Πραγματικές αποκλίσεις:** Αυτές είναι θεμελιώδεις αποκλίσεις λόγω των περιορισμών του ίδιου του νόμου. Ο νόμος του Beer λειτουργεί καλά σε διαλύματα που περιέχουν σχετικά χαμηλές ποσότητες αναλύτη ($\leq 0,01$ M). Σε συγκεντρώσεις που είναι μεγαλύτερες από 0,01 M, τα απορροφούντα σωματίδια του δείγματος δεν συμπεριφέρονται πλέον ανεξάρτητα το ένα από το άλλο. Η προκύπτουσα αλληλεπίδραση μπορεί να αλλάξει την μοριακή απορροφητικότητα (ϵ) [4].
- **Χημικές αποκλίσεις:** Οι αποκλίσεις αυτές εμφανίζονται όταν τα απορροφούντα σωματίδια υφίστανται σύζευξη, διάσπαση ή όταν αντιδρούν με το διαλύτη παράγοντας προϊόντα που έχουν διαφορετικό φάσμα απορρόφησης από τον αναλύτη.
- **Οργανολογικές αποκλίσεις:**
 - Ο νόμος του Beer ισχύει μόνο για μονοχρωματική ακτινοβολία. Η μη μονοχρωματική ακτινοβολία οδηγεί σε αρνητική απόκλιση. Εάν η ζώνη μηκών κύματος που επιλέγεται στο φασματόμετρο είναι τέτοια ώστε η γραμμομοριακή

απορροφητικότητα του αναλύτη να είναι ουσιαστικά σταθερή, οι αποκλίσεις από τον νόμο Beer-Lambert ελαχιστοποιούνται (Σχήμα 2.5.). Για το λόγο αυτό, οι μετρήσεις απορρόφησης λαμβάνονται σε μήκη κύματος κοντά στο μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης όπου η απορροφητικότητα του αναλύτη αλλάζει λίγο με το μήκος κύματος.

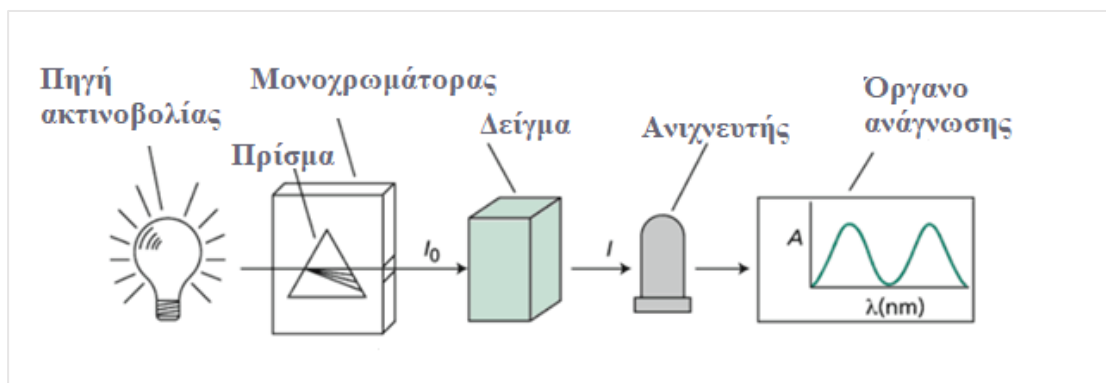
- Η παράσιτη ακτινοβολία (Stray radiation) που προκύπτει από σκέδαση ή από διάφορες ανακλάσεις στο όργανο, προκαλεί οργανολογικές αποκλίσεις από το νόμο του Beer.
- Μια άλλη απόκλιση που συνδέεται με το νόμο του Beer μπορεί να προκληθεί από τη χρήση οπτικά αταίριαστων κυψελίδων [1, 3, 5].



Σχήμα 2.5. Επίδραση της πολυχρωματικότητας της ακτινοβολίας στο νόμο του Beer [13]

2.4. Οργανολογία UV-Vis

Τα περισσότερα όργανα που χρησιμοποιούνται για την μέτρηση της απορρόφησης στην ορατή και την υπεριώδη περιοχή του φάσματος ανεξάρτητα από τις παραλλαγές, αποτελούνται από τα εξής πέντε τμήματα: 1) μια πηγή ακτινοβολίας σταθερής ισχύος 2) έναν επιλογέα μήκους κύματος για την απομόνωση της επιθυμητής ακτινοβολίας 3) μία κυψελίδα για την τοποθέτηση του δείγματος, 4) έναν ανιχνευτή που μετατρέπει το οπτικό σήμα σε ηλεκτρικό και 5) ένα σύστημα μέτρησης, το οποίο συνήθως περιλαμβάνει ενισχυτή του σήματος και όργανο ανάγνωσης (Σχήμα 2.6.) [3, 6].



Σχήμα 2.6. Σχηματικό διάγραμμα φασματοφωτόμετρου UV-Vis απλής δέσμης.

Πηγή: <https://3005mit.wordpress.com/2016/04/05/lab-5-spectrophotometer>

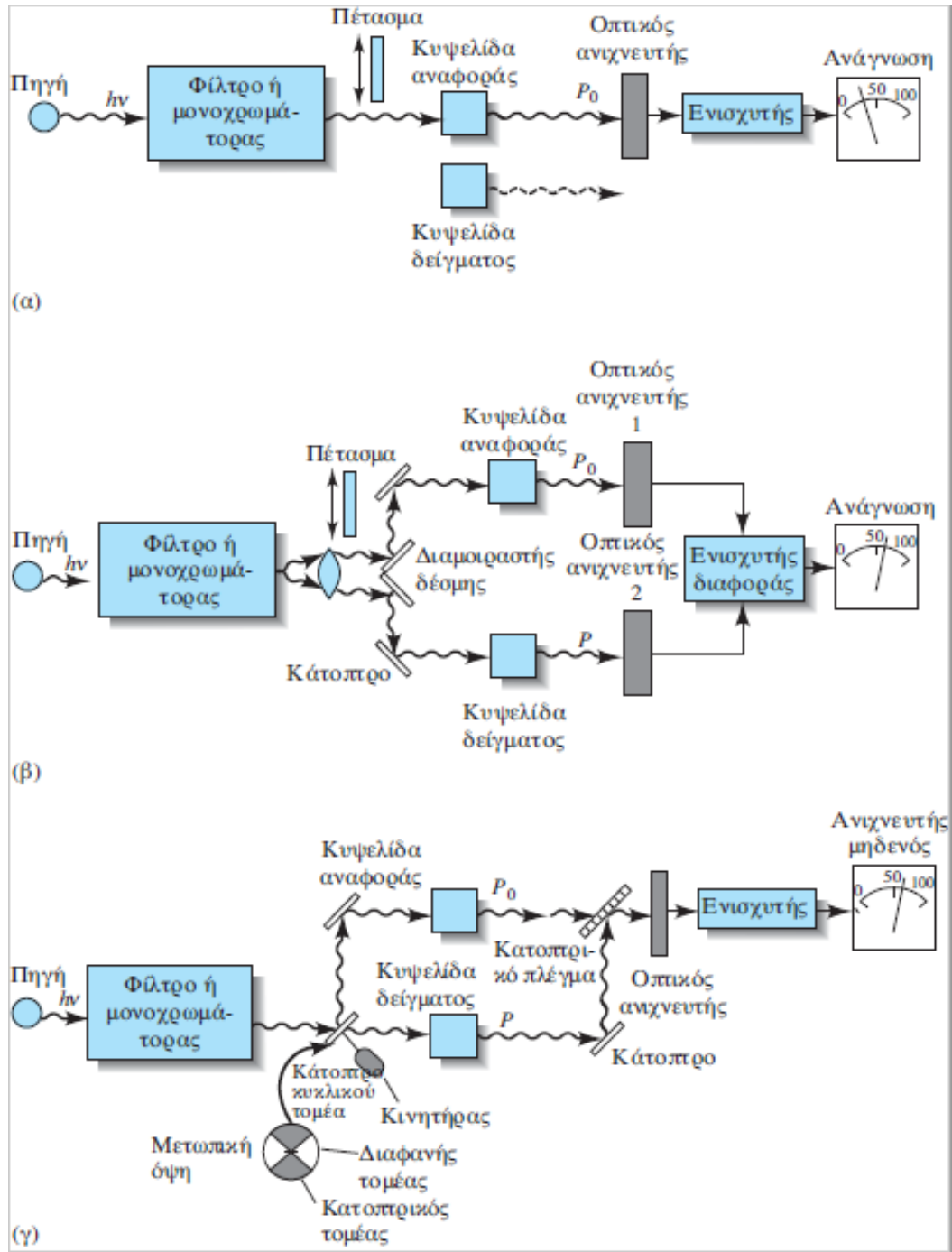
2.4.1. Τύποι Οργάνων

Αν και όλα τα φασματοφωτόμετρα όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, αποτελούνται από τα ίδια βασικά τμήματα ωστόσο υπάρχουν πολλές διαφορές μεταξύ τους ανάλογα με την περιοχή χρησιμοποίησης του οργάνου, τον κατασκευαστή, την ακρίβεια κλπ. [6]. Υπάρχουν δύο κύριες κατηγορίες συσκευών: απλής δέσμης και διπλής δέσμης.

Φασματοφωτόμετρα απλής δέσμης: Σε ένα φασματοφωτόμετρο μονής δέσμης, η μονοχρωματική δέσμη φωτός διέρχεται κατευθείαν από το διάλυμα του δείγματος που βρίσκεται στην κυψελίδα και στη συνέχεια προχωρά στον ανιχνευτή (Σχήμα 2.7.α). Ένα φασματοφωτόμετρο μονής δέσμης είναι δύσχρηστο επειδή το δείγμα και το διάλυμα αναφοράς πρέπει να τοποθετούνται εναλλάξ στη δέσμη της ακτινοβολίας. Για μετρήσεις σε πολλά μήκη κύματος, το διάλυμα αναφοράς πρέπει να μετρείται σε κάθε μήκος κύματος ξεχωριστά. Η απορρόφηση επίσης δεν μπορεί να μετρηθεί ως συνάρτηση του χρόνου (π.χ. σε κινητικά πειράματα) επειδή και η ένταση της πηγής και η απόκριση του ανιχνευτή μετατοπίζονται αργά [3, 7, 8].

Φασματοφωτόμετρα διπλής δέσμης: Στα φασματοφωτόμετρα διπλής δέσμης, η ακτινοβολία από την πηγή, αφού περάσει μέσα από το μονοχρωμάτορα, χωρίζεται σε δύο ξεχωριστές δέσμες: μία για το διάλυμα του δείγματος και μία για το τυφλό ή το διάλυμα αναφοράς. Ο διαχωρισμός της αρχικής δέσμης μπορεί να γίνει με δύο τρόπους και υπάρχουν δύο τύποι οργάνων διπλής δέσμης: **όργανο διπλής δέσμης στο χώρο** (Σχήμα 2.7.β), στο οποίο οι δύο δέσμες σχηματίζονται από έναν καθρέφτη σχήματος V που ονομάζεται διαμοιραστής δέσμης και **όργανο διπλής δέσμης στο χρόνο** (Σχήμα 2.7.γ), στο οποίο η δέσμη αποστέλλεται εναλλάξ στην κυψελίδα αναφοράς και στην κυψελίδα του δείγματος πριν προσπέσει σε έναν μόνο φωτοανιχνευτή. Αυτά τα όργανα

είναι πολύ χρήσιμα για ποιοτική ανάλυση στην οποία απαιτείται ολόκληρο το φάσμα και η μέτρηση με τον τρόπο αυτό είναι ανεξάρτητη από τις διακυμάνσεις στην ένταση και τη φασματική σύνθεση της πηγής του φωτός [1, 2, 3, 4, 5, 6, 9].



Σχήμα 2.7. Διάφοροι τεχνικοί σχεδιασμοί φασματοφωτομέτρων για την περιοχή UV-Vis [14]

2.5. Ανάπτυξη ποσοτικής μεθόδου για ένα συστατικό χρησιμοποιώντας καμπύλη βαθμονόμησης

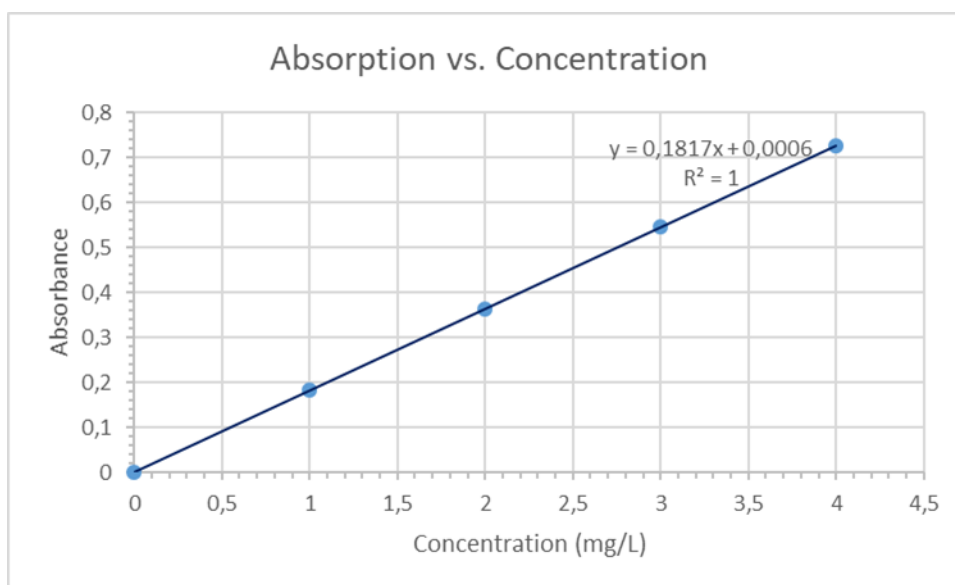
Κατά την ανάπτυξη μιας ποσοτικής αναλυτικής διαδικασίας, πρέπει να βρεθούν οι συνθήκες υπό τις οποίες δίνεται μια αναπαραγώγιμη γραμμική σχέση μεταξύ της απορρόφησης και της συγκέντρωσης του αναλύτη.

Αρχικά, καθορίζεται το καταλληλότερο μήκος κύματος για την ανάλυση από το φάσμα απορρόφησης. Το καλύτερο μήκος κύματος αντιστοιχεί σε ένα μέγιστο απορρόφησης που οδηγεί σε μεγαλύτερη ευαισθησία και ακρίβεια στις μετρήσεις.

Το φάσμα απορρόφησης στην ορατή και υπεριώδη περιοχή του προς ανάλυση προσδιοριζόμενου διαλύματος λαμβάνεται βιβλιογραφικά ή πειραματικά με τη βοήθεια ενός φασματοφωτόμετρου σάρωσης [3, 6, 10].

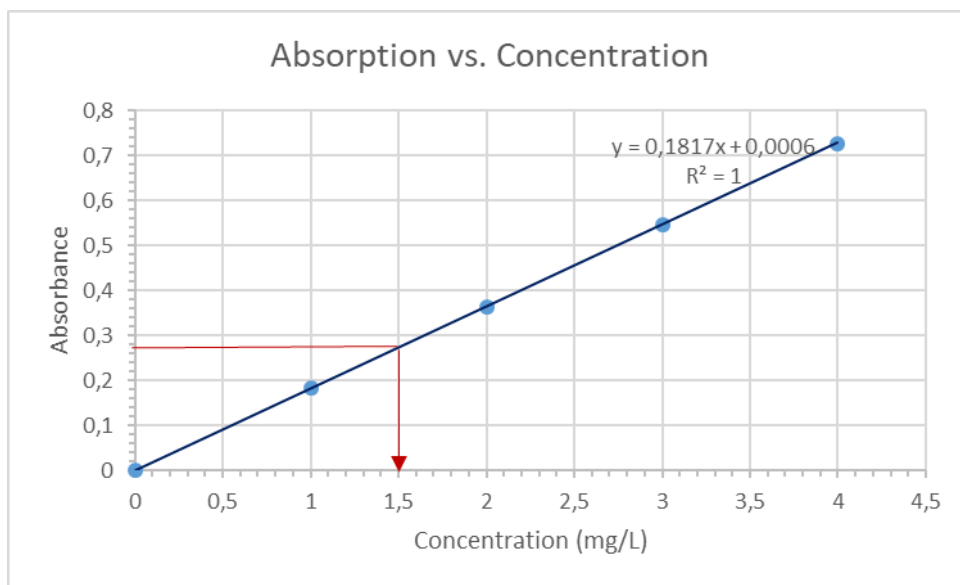
Το επόμενο βήμα στην ποσοτικοποίηση είναι η μέτρηση πρότυπων διαλυμάτων στο επιλεγμένο μήκος κύματος και η κατασκευή μιας καμπύλης βαθμονόμησης για τον προσδιορισμό του εύρους συγκεντρώσεων για τις οποίες ισχύει ο νόμος του Beer. Ένα δείγμα άγνωστης συγκέντρωσης μπορεί στη συνέχεια να προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας την καμπύλη βαθμονόμησης [3, 10, 11].

Στο ακόλουθο παράδειγμα, μετρήθηκαν τέσσερα πρότυπα διαλύματα σε επιλεγμένο μήκος κύματος και στη συνέχεια η καμπύλη βαθμονόμησης κατασκευάστηκε παριστάνοντας γραφικά τις τιμές της απορρόφησης ως συνάρτηση της συγκέντρωσης (Σχήμα 2.8).



Σχήμα 2.8. Καμπύλη βαθμονόμησης

Χρησιμοποιώντας την καμπύλη βαθμονόμησης, η συγκέντρωση ενός άγνωστου δείγματος μπορεί να προσδιοριστεί από την απορρόφησή του (Σχήμα 2.9.).



Σχήμα 2.9. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης ενός αγνώστου δείγματος χρησιμοποιώντας την καμπύλη βαθμονόμησης

2.6. Εφαρμογές της φασματοφωτομετρίας UV-Vis στην περιβαλλοντική ανάλυση

Η φασματοφωτομετρία UV-Vis είναι μια πολύ χρήσιμη αναλυτική μέθοδος στην ανάλυση περιβαλλοντικών δειγμάτων. Ορισμένες από τις μεθόδους UV-VIS χρησιμοποιούνται ευρύτερα από άλλες εναλλακτικές μεθόδους λόγω της απλότητάς τους. Ένα πρόσθετο πλεονέκτημα των μεθόδων φασματοσκοπίας είναι ότι προσαρμόζονται εύκολα στην ανάλυση των δειγμάτων στο πεδίο. Ορισμένες από αυτές τις μεθόδους παρατίθενται στον πίνακα 2.1.



Εικόνα 2.10. Ανάλυση περιβαλλοντικών δειγμάτων με φασματοφωτόμετρο UV/Vis [15]

Πίνακας 2.1 Φασματομετρικές (χρωματομετρικές) μέθοδοι UV-Vis για την ανάλυση ρύπων στα ύδατα και τα λύματα [6, 9, 14].

Ρύπος	Μέθοδος	λ (nm)
As (III) or (V)	Το αρσενικό στο δείγμα ανάγεται σε AsH_3 σε όξινο διάλυμα, η AsH_3 αντιδρά στη συνέχεια με διαιθυλοθειοκαρβαμικό άργυρο σε πυριδίνη, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο κόκκινου χρώματος.	535
Cr (VI)	Αντιδρά με διφαινυλοκαρβαζίδιο σε όξινο διάλυμα, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο βιολετί χρώματος.	540
Fe (II) or (III)	Αναγωγή προς Fe(II) και σχηματισμός ερυθρού συμπλόκου με ο-φαινανθρολίνη.	510
Cl ⁻	Αντίδραση με $Hg(SCN)_2$ σε όξινο περιβάλλον παρουσία Fe (III), οπότε σχηματίζεται ένα εξαιρετικά χρωματισμένο σύμπλοκο ιόν $[Fe(SCN)]^{2+}$.	480
NH ₄ ⁺	Τα ιόντα του αμμωνίου σχηματίζουν με το αντιδραστήριο Nessler $K_2[HgI_4]$ ένα κολλοειδές κίτρινο καστανόχρωμο σύμπλοκο Hg_2OINH_2 .	410
NO ₃ ⁻	Αντιδρούν με Cd προς NO ₂ ⁻ και μετά με την αντίδραση με σουλφαναμιδίο και N-(1-ναφθυλο) αιθυλενοδιαμίνη, σχηματίζεται αζόχρωμα κόκκινου χρώματος.	540
PO ₄ ³⁻	Με την επίδραση μολυβδαινικού αμμώνιου σχηματίζεται φωσφορομολυβδαινικό αμμώνιο το οποίο ανάγεται στη συνέχεια με ασκορβικό οξύ προς κυανό του μολυβδαινίου.	690
SO ₄ ²⁻	Τα θειικά ιόντα αντιδρούν με το βάριο και σχηματίζουν ένα εναιώρημα θειικού βαρίου υπό ελεγχόμενες συνθήκες. Η προκύπτουσα θολότητα προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά στα 420 nm.	420
Φαινόλη	Αντίδραση με 4-αμινοαντιπυρίνη παρουσία $K_3Fe(CN)_6$, σχηματίζεται κίτρινη χρωστική ουσία.	460

Αναφορές

- [1] D. C. Harris, «Fundamentals of Spectrophotometry,» σε Quantitative Chemical Analysis, Seventh Edition επιμ., New York, W.H. Freeman and Company, 2007, p. 379.
- [2] G. D. Cristian, P. K. Dasgupta και K. A. Schug, «Spectrochemical Methods,» σε Analytical chemistry, Seventh Edition επιμ., John Wiley & Sons Inc., 2014, p. 479.
- [3] Δ. Γ. Θεμελής και Α. Σ. Ζώτου, Αναλυτική Χημεία, Θεσσαλονίκη: Ζήτη, 2017.
- [4] D. A. Skoog, J. F. Holler και S. R. Crouch, Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, 6η Έκδοση επιμ., Μ. Ι. Καραγιάννης και Κ. Ευσταθίου, Επιμ., Αθήνα: Ευρυδίκη Π. Κωσταράκη, 2007, pp. 386-400.
- [5] D. A. Skoog, J. F. Holler και S. R. Crouch, Principles of Instrumental Analysis, 6th επιμ., Thomson Brooks/Cole, 2007.
- [6] Θ. Π. Χατζηγιάννου και Μ. Α. Κουππάρης, Ενόργανη Ανάλυση, Αθήνα, 2014.
- [7] J. V. Kenkel, Analytical Chemistry for Technicians Third Edition, CRC Press, LLC, 2003.
- [8] D. C. Harris, «Βασικές αρχές φασματοφωτομετρίας,» σε Ποσοτική Χημική Ανάλυση, τόμ. ΙΙ, Ν. Χανιωτάκης και Μ. Φουσκάκη, Επιμ., Ηράκλειο, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2010, p. 435.
- [9] S. . M. Nilapwar, M. Nardelli, H. . V. Westerhoff και M. Verma, «Methods in Enzymology,» Elsevier Inc. , 2011.
- [10] W. Emery και A. Camps, «Chapter 2 - Basic Electromagnetic Concepts and Applications to Optical Sensors,» σε Introduction to Satellite Remote Sensing: Atmosphere, Ocean and Land Applications, Elsevier Inc., 2017.
- [11] C. A. De Caro και C. Haller, September 2015. [Ηλεκτρονικό]. Available: https://www.researchgate.net/publication/321017142_UVVIS_Spectrophotometry_-_Fundamentals_and_Applications. [Πρόσβαση 19 12 2020].
- [12] D. Harvey. [Ηλεκτρονικό]. Available: [https://chem.libretexts.org/Under_Construction/Purgatory/Book%3A_Analytical_Chemistry_2.0_\(Harvey\)/10_Spectroscopic_Methods/10.2%3A_Spectroscopy_Based_on_Absorption](https://chem.libretexts.org/Under_Construction/Purgatory/Book%3A_Analytical_Chemistry_2.0_(Harvey)/10_Spectroscopic_Methods/10.2%3A_Spectroscopy_Based_on_Absorption). [Πρόσβαση 07 01 2021].
- [13] A. Mehta. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://pharmaxchange.info/2012/05/ultraviolet-visible-uv-vis-spectroscopy-%E2%80%93-limitations-and-deviations-of-beer-lambert-law/>. [Πρόσβαση 07 01 2021].
- [14] D. A. Skoog, J. F. Holler και S. R. Crouch, Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, 6η Έκδοση επιμ., Μ. Ι. Καραγιάννης και Κ. Η. Ευσταθίου, Κωσταράκη, 2007.
- [15] Progett, " BSB Monitox, Black Sea Basin interdisciplinary cooperation network for sustainable joint monitoring of environmental toxicants migration, improved evaluation of ecological state and human health impact of harmful substances, and public exposure prevention," Expert Water Chemistry, Chatzichristou C., Chemistry Department, International Hellenic University, Greece.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.

ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ- ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ Η ΤΕΧΝΙΚΗ ΧΗΜΙΚΟΥ ΑΠΟΤΥΠΩΜΑΤΟΣ ΠΕΤΡΕΛΑΙΚΩΝ ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΩΝ ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΓΚΛΗΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΓΕΩΧΗΜΕΙΑ

Σοφία Μητκίδου και Νικόλαος Κόκκινος

Προηγμένο Εργαστήριο Ήφαιστος, Division of Petroleum Forensic Fingerprinting (PFF), Σχολή Θετικών Επιστημών, Διεθνές Πανεπιστήμιο της Ελλάδος, Άγιος Λουκάς, Καβάλα 654 04, Ελλάδα, mitkidou@chem.ihu.gr, nck@chem.ihu.gr

Περίληψη

Το πετρέλαιο αποτελεί την πιο σημαντική πηγή ενέργειας και είναι η πρώτη ύλη στην πετροχημική βιομηχανία για την παραγωγή των περισσότερων χημικών προϊόντων. Όμως, στην αλυσίδα αξίας του πετρελαίου και φυσικού αερίου ελλοχεύει πάντα ο κίνδυνος πετρελαϊκής ρύπανσης του περιβάλλοντος. Πετρελαϊκή ρύπανση μπορεί να προκληθεί από ναυτιλιακά ατυχήματα, από διαρροές των εγκαταστάσεων διύλισης, επεξεργασίας και διανομής πετρελαιοειδών αλλά και από τη διάθεση του νερού των γεωτρητικών διεργασιών. Ο χαρακτηρισμός των πετρελαϊκών ρύπων και η σύνδεσή τους με γνωστές πηγές είναι απαραίτητος όχι μόνο στην εκτίμηση περιβαλλοντικών ζημιών, αλλά και στην επιλογή των κατάλληλων μέτρων και τρόπων καταπολέμησης της ρύπανσης. Η τεχνική χημικού αποτυπώματος (fingerprinting) του πετρελαίου αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο στην Περιβαλλοντική Εγκληματολογική Γεωχημεία (Forensic Environmental Geochemistry). Η ταυτοποίηση συγκεκριμένων υδρογονανθράκων-στόχων του πετρελαίου έχει μεγάλη σημασία στην έρευνα του περιβαλλοντικού αποτυπώματος του πετρελαίου καθώς παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τον χαρακτηρισμό και τον προσδιορισμό προέλευσης των πετρελαϊκών ρύπων. Η δυνατότητα της συνδυασμένης τεχνικής GC-MS να διαχωρίζει, να χαρακτηρίζει και να ποσοτικοποιεί σύνθετα μείγματα οργανικών ενώσεων με υψηλή ευαισθησία την έχει καταστήσει ως ένα απαραίτητο αναλυτικό εργαλείο. Οι αναλύτες-στόχοι αναγνωρίζονται και ποσοτικοποιούνται μέσω των χαρακτηριστικών ιόντων τους με την τεχνική της επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (Single Ion Monitoring-SIM) στη φασματογραφία μαζών. Η εν λόγω μελέτη παρουσιάζει την εφαρμογή της τεχνικής Fingerprinting με τη χρήση Αέριας Χρωματογραφίας - Φασματομετρίας μάζας (GC-MS) στην αποτίμηση της ρύπανσης από υδρογονάνθρακες πετρελαίου σε υδάτινα δείγματα

και ιζήματα της περιοχής του ποταμού Νέστου στη Βόρεια Ελλάδα. Επιπλέον, συγκεντρώθηκαν δεδομένα από την ανάλυση δειγμάτων τόσο αργού πετρελαίου από τις υπεράκτιες γεωτρήσεις στον κόλπο της Καβάλας όσο και εμπορικά διαθέσιμων προϊόντων πετρελαίου, τα οποία θεωρούνται πιθανές πηγές ρύπανσης. Τα δείγματα αργού πετρελαίου από τον Πρίνο και των διάφορων πετρελαϊκών προϊόντων παρουσίασαν σημαντικές διαφοροποιήσεις ως προς την κατανομή των στερανίων (m/z 191), χοπανίων (m/z 217), μεθυλοδιβενζοθειοφαινίων (m/z 198 και 212), καθώς και του λόγου πριστανίου/φυτανίου (Pr/Ph). Τα αποτελέσματα της GC-MS ανάλυσης των υδατικών και εδαφικών δειγμάτων απέδειξαν ότι δεν ανιχνεύθηκε κανένα είδος πετρελαϊκής ρύπανσης στην περιοχή του ποταμού Νέστου.

3.1. Εισαγωγή στη χρωματογραφία

Η χρωματογραφία εισήχθη ως τεχνική διαχωρισμού για πρώτη φορά από τον Tswett το 1906. Η λέξη «χρωματογραφία» προέρχεται από δύο ελληνικές λέξεις «chroma» (χρώμα) και «graphien» (για να γράψει). Το έργο του Tswett εστίασε στο διαχωρισμό μεμονωμένων ουσιών τόσο από τη μήτρα (matrix) όσο και μεταξύ τους. Η «αναγέννηση» της χρωματογραφίας σηματοδοτήθηκε το 1931 μετά τη δημοσίευση τριών σημαντικών άρθρων από τον Γερμανό Edgar Lederer που βασίστηκε στο προηγούμενο δημοσιευμένο έργο του Tswett [1].

Η χρωματογραφία ορίζεται ως: «Μια φυσική μέθοδος διαχωρισμού στην οποία τα συστατικά που πρόκειται να διαχωριστούν κατανέμονται μεταξύ δύο φάσεων, μία εκ των οποίων είναι η στατική φάση (stationary phase), ενώ η άλλη είναι η κινητή φάση (mobile phase)» [2]. Η αρχή λειτουργίας της βασίζεται στην ιδιότητα των συστατικών ενός μίγματος να διέρχονται με διαφορετικές ταχύτητες μέσα από ένα σύστημα μιας αέριας κινητής φάσης και μιας στερεής στατικής φάσης. Η διαφορά στην ταχύτητα μετακίνησης κάθε ένωσης οφείλεται στη διαφορετική χημική συγγένεια που έχει η ένωση προς τις δύο αυτές φάσεις [3].

Πολλές χρωματογραφικές τεχνικές έχουν αναπτυχθεί κατά το πέρασμα των χρόνων, όπως χρωματογραφία στήλης, χρωματογραφία χάρτου, χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC), αέρια χρωματογραφία (GC), υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC), χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων κ.λπ. [4]. Η ταξινόμηση των χρωματογραφικών τεχνικών βασίζεται σε πολλά κριτήρια, τα σημαντικότερα εκ των οποίων είναι ο τύπος της κινητής φάσης, το σχήμα της χρωματογραφικής κλίνης (chromatographic bed) και ο τύπος της στατικής φάσης [5]. Η κινητή φάση μπορεί να

είναι είτε κάποιο αέριο (GC) ή υγρό (LC) είτε κάποιο υπερκρίσιμο ρευστό (SFC), ενώ η στατική φάση είναι συνήθως κάποιο στερεό (σπανιότερα υγρό) [6].

Οι διαχωρισμοί στο χρωματογραφικό σύστημα προκύπτουν από διαφορές στη σταθερά κατανομής K_c μεταξύ διαφόρων ενώσεων που πρόκειται να διαχωριστούν εξίσωση (1.1). Όσο υψηλότερη είναι η τιμή της K_c τόσο πιο αργά κινείται μια ένωση μέσω της χρωματογραφικής στήλης και το αντίστροφο [7].

$$K_c = \frac{c_s}{c_m} \quad (1.1) [7]$$

όπου: c_s είναι η συγκέντρωση της προς ανάλυση ουσίας στη στατική φάση και c_m είναι η συγκέντρωσή της στην κινητή φάση.

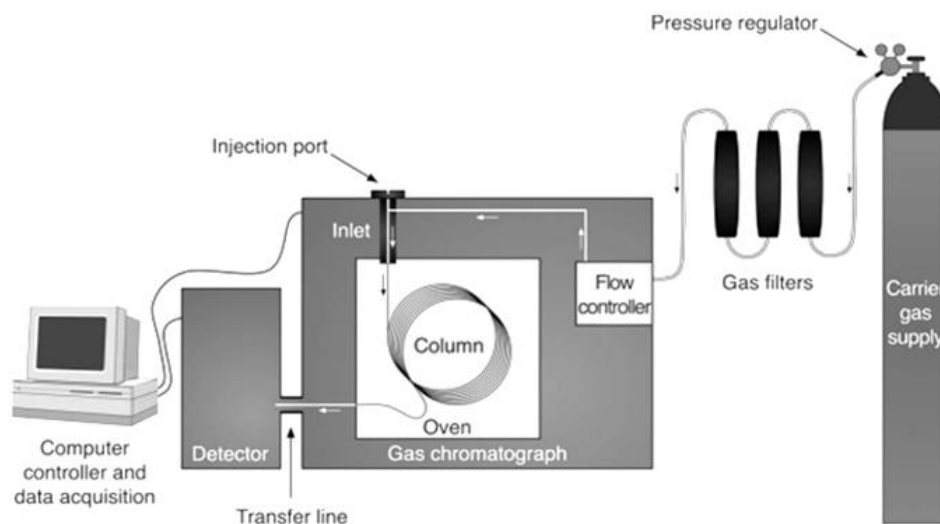
3.1.1. Αέρια Χρωματογραφία (GC)

Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική στη βιομηχανία πετρελαίου είναι η αέρια χρωματογραφία (GC). Λόγω της σύνθετης σύστασης του πετρελαίου και των προϊόντων του, ο ρόλος της αέριας χρωματογραφίας θεωρείται αναμφίβολα πολύ σημαντικός από τότε που καθιερώθηκε [8].

Η GC εισήχθη βασικά από τους James και Martin το 1952, οι οποίοι υπέδειξαν για πρώτη φορά ότι ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των οργανικών ενώσεων θα μπορούσε να βασίζεται στην πτητικότητά τους. Μετέπειτα, το 1956 διοργανώθηκε το πρώτο συμπόσιο για τη χρωματογραφία φάσης ατμών (vapor-phase) από την Ομάδα Έρευνας Υδρογονανθράκων του Ινστιτούτου Πετρελαίου (Hydrocarbon Research Group of the Institute of Petroleum) όπου παρουσιάστηκαν σημαντικές εφαρμογές [9]. Επιπλέον, κατά τη διάρκεια του δεύτερου διεθνούς συμποσίου το 1958 υπό την χορηγία του Ινστιτούτου Πετρελαίου, ο Golay παρουσίασε τα πλεονεκτήματα των τριχοειδών στηλών (capillary columns) και την εφαρμογή τους ως μια νέα τεχνική στην ανάλυση του πετρελαίου. Έκτοτε, η GC είχε γίνει πλέον ευρέως αποδεκτή στη βιομηχανία πετρελαίου [10].

Στην πραγματικότητα, η GC είναι μια μέθοδος χρωματογραφίας στήλης όπου η κινητή φάση είναι ένα αέριο και η στατική φάση είναι είτε σε στερεή μορφή ή σε υγρή μορφή [6]. Η αέρια υγρή χρωματογραφία είναι η πιο συνηθισμένη λόγω του πλεονεκτήματος του διαχωρισμού των συστατικών με βάση την κατανομή μεταξύ υγρής και αέριας φάσης. Η λειτουργία GC βασίζεται αρχικά στην έγχυση του δείγματος μέσω ενός ελαστικού διαφράγματος (septum) στον εισαγωγέα (injector) σε υψηλή θερμοκρασία. Ένα φέρον αέριο (ήλιο, υδρογόνο ή άζωτο) μεταφέρει το δείγμα στη στήλη όπου υπάρχει η στατική φάση. Ο διαχωρισμός των συστατικών του μίγματος επιτυγχάνεται

καθώς το μείγμα κινείται μέσω της στήλης και τα μεμονωμένα συστατικά του δείγματος εξέρχονται από τη στήλη σε διαφορετικές χρονικές στιγμές και εισέρχονται στον ανιχνευτή ο οποίος παρέχει ένα σήμα ανάλογα με την ποσότητα των αναλυτών έκλουσης (Εικ. 3.1.). Η αφθονία κάθε κορυφής σε ένα χρωματογράφημα GC είναι ένα σχετικό μέτρο της ποσότητας κάθε συστατικού που υπάρχει στο δείγμα ανάλογα με τον τύπο του ανιχνευτή και τη φύση της ένωσης που αναλύεται [3].



Εικ. 3.1. Βασικός εξοπλισμός αέριου χρωματογράφου [3]

Τα σταθερά πτητικά συστατικά ενός μείγματος μπορούν να διαχωριστούν με βάση τις ιδιότητές τους, όπως το σημείο βρασμού, το μοριακό μέγεθος και η πολικότητα [6]. Η αέρια χρωματογραφία αποτελεί μια απλή και γρήγορη τεχνική για την έρευνα πτητικών ενώσεων ενός μίγματος ακόμη και σε πολύπλοκα δείγματα [5].

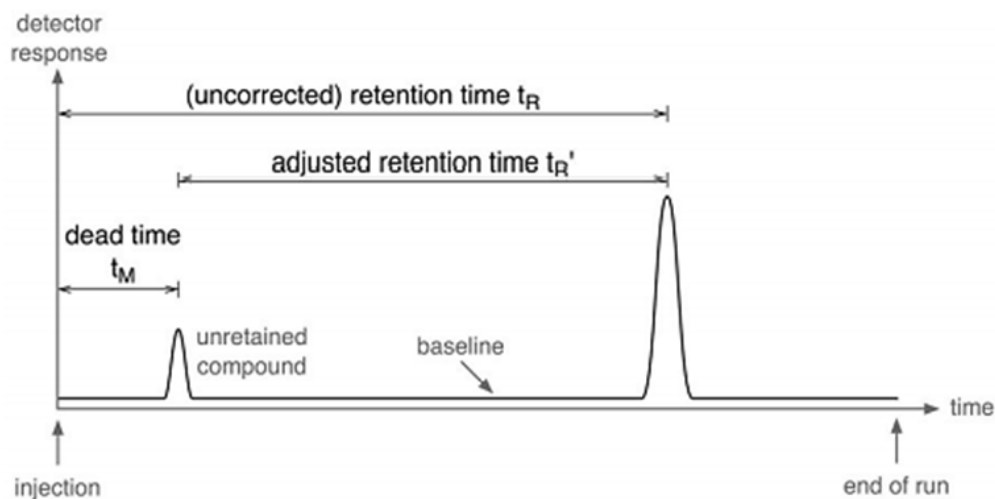
Το φέρον αέριο είναι ένα σταθερό αέριο του οποίου η φύση μπορεί να επηρεάσει τα χαρακτηριστικά διαχωρισμού του συστήματος GC και να τροποποιήσει την ευαισθησία της ανίχνευσης. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα αέρια είναι το ήλιο και το υδρογόνο λόγω της χαμηλής μοριακής τους μάζας και διάχυσης. Το άζωτο μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί, ωστόσο η απόδοση διαχωρισμού είναι χαμηλότερη σε σύγκριση με το ήλιο και το υδρογόνο και συνιστάται μόνο στην περίπτωση απλών αναλυτικών διαδικασιών [5, 11].

Στην περίπτωση των εγχυτήρων (injectors), αυτοί μπορούν να ταξινομηθούν σε ψεκαστήρες εξάτμισης και στήλης (vaporization and column injectors). Μια σύριγγα χρησιμοποιείται συνήθως για την εισαγωγή του δείγματος στον θερμοστατούμενο εγχυτήρα προκαλώντας ταχεία εξάτμιση του δείγματος που αναμιγνύεται με το φέρον αέριο και κινείται μέσα στη στήλη. Οι στήλες που χρησιμοποιούνται διακρίνονται σε

πακεταρισμένες (packed) και τριχοειδείς (capillary) στήλες. Οι τριχοειδείς στήλες χρησιμοποιούνται συχνότερα λόγω της μεγαλύτερης διαχωριστικής τους ικανότητας. Η στατική φάση χαρακτηρίζεται από το πάχος της μεμβράνης (0,1-5 μm) που επιτρέπει στους αναλυτές να έρθουν σε επαφή με το εσωτερικό τοίχωμα της στήλης [11].

Καθώς ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των ενώσεων βασίζεται στις διαφορές τους ως προς τον χρόνο έκλυσης, ο χρόνος κατακράτησης t_R (ή προτιμότερα μη διορθωμένος χρόνος κατακράτησης-uncorrected retention time) αποτελεί σχεδόν το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό του χρωματογραφήματος και αποτελεί ένα βασικό εργαλείο στην ταυτοποίηση των συστατικών [12]. Συγκεκριμένα, είναι μία μέτρηση του χρόνου από τη στιγμή έγχυσης του δείγματος στο σύστημα έως τη στιγμή που το συστατικό εκλύεται από τη στήλη και ανιχνεύεται. Ο προσαρμοσμένος χρόνος κατακράτησης t_R' (adjusted retention time) μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί και υπολογίζεται αφαιρώντας τον νεκρό χρόνο (t_M : dead time) που αντιστοιχεί στον χρόνο κατακράτησης ενός συστατικού που δεν κατακρατείται από τη στατική φάση (Εικ. 3.2.).

Ο χρόνος κατακράτησης t_R υπό αυστηρά καθορισμένες χρωματογραφικές συνθήκες μπορεί να θεωρηθεί χαρακτηριστική σταθερά της ένωσης, αλλά δεν θεωρείται απόλυτα εξειδικευμένος δείκτης καθώς κι άλλες ενώσεις μπορούν επίσης να εμφανίζουν τον ίδιο χρόνο κατακράτησης [3].



Εικ. 3.2. Διαφορετικοί χρόνοι κατακράτησης που χρησιμοποιούνται στη GC [3]

Η χρωματογραφική ανάλυση R_s (chromatographic resolution), είναι συνάρτηση της απόδοσης της στήλης, της επιλεκτικότητας και του συντελεστή χωρητικότητας και μαθηματικά μπορεί να εκφραστεί ως:

$$R_s = \underbrace{1/4\sqrt{N}}_a \underbrace{\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right)}_b \underbrace{\left(\frac{k'}{k' + 1}\right)}_c \quad (3.2.) [6]$$

όπου: a είναι όρος της αποδοτικότητας της στήλης, b είναι όρος της επιλεκτικότητας της στήλης και c είναι όρος της χωρητικότητας.

Η απόδοση της στήλης (column efficiency) μπορεί να υπολογιστεί ως εξής:

$$N \left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2 = 16 \left(\frac{t_R}{w}\right)^2 = 5.5 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}}\right)^2 \quad (3.3.) [6]$$

όπου: N είναι ο αριθμός των θεωρητικών πλακών, t_R είναι ο χρόνος κατακράτησης, σ είναι η τυπική απόκλιση για μια κορυφή Gaussian, w είναι το πλάτος κορυφής στη γραμμή βάσης ($w = 4\sigma$) και $w_{1/2}$ ή w_h είναι το πλάτος κορυφής στο μισό ύψος.

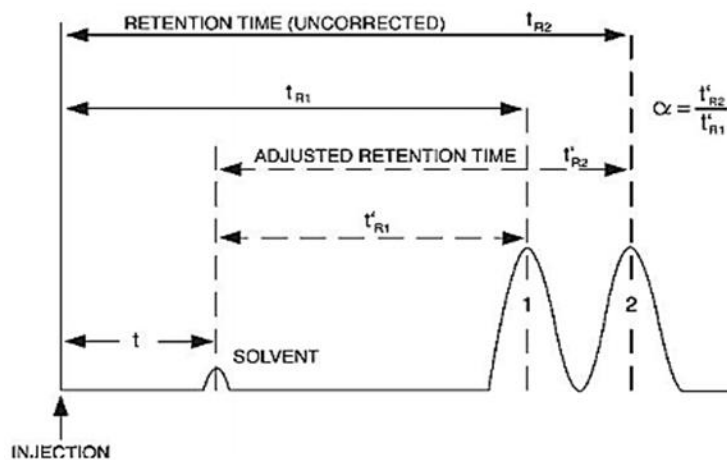
Ο θεωρητικός αριθμός πλακών (N) είναι χαρακτηριστικός της χωρητικότητας διαχωρισμού μιας χρωματογραφικής στήλης και μπορεί να υπολογιστεί ως εξής:

$$N = 5.545(t_R/w_h)^2 \quad (3.4.) [11]$$

Η επιλεκτικότητα της στήλης (column selectivity) αναφέρεται στην απόσταση, ή στο σχετικό διαχωρισμό, μεταξύ δύο κορυφών (Εικ. 3.3.) και δίνεται από την εξίσωση 1.5.

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{K_2}{K_1} \quad (3.5.) [6]$$

όπου: α είναι ο συντελεστής διαχωρισμού, t_{R1} και t_{R2} είναι οι χρόνοι κατακράτησης των συστατικών 1 και 2 αντίστοιχα, t_0 (ή t_m) είναι ο χρόνος κατακράτησης των μη συγκρατημένων συστατικών, τα t'_{R1} και t'_{R2} είναι οι προσαρμοσμένοι χρόνοι κατακράτησης των συστατικών 1 και 2 αντίστοιχα και K_1 και K_2 είναι οι συντελεστές κατανομής των συστατικών 1 και 2, αντίστοιχα.



Εικ. 3.3. Μέτρηση χρόνων κατακράτησης και επιλεκτικότητας στήλης [6]

Η χωρητικότητα (capacity) ή ο συντελεστής κατακράτησης (retention factor) k' είναι μία μέτρηση του χρόνου που παραμένει ο αναλύτης (analyte) στη στατική φάση σε σχέση με την κινητή φάση. Όσο υψηλότερη είναι η τιμή του k' , τόσο καλύτερος είναι ο διαχωρισμός με πιο διευρυμένες κορυφές και μεγαλύτερους χρόνους ανάλυσης [6]. Ο συντελεστής χωρητικότητας k' μπορεί να οριστεί από την εξίσωση:

$$k' = \frac{V_R - V_0}{V_0} \quad (3.6.) [13]$$

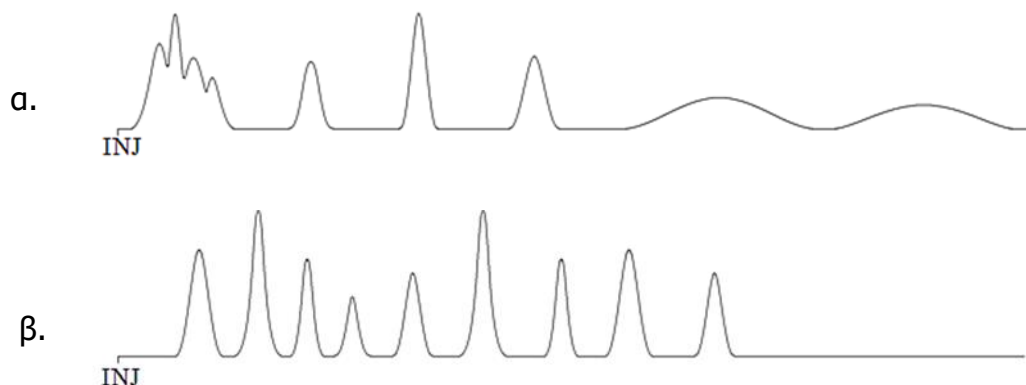
όπου: V_R είναι ο όγκος κατακράτησης της διαλυμένης ουσίας και V_0 είναι ο κενός όγκος (void volume) της διαλυμένης ουσίας.

Σε περίπτωση που δεν υπάρχει αλλαγή στον ρυθμό ροής της κινητής φάσης κατά την έκλυση του δείγματος, ο συντελεστής χωρητικότητας μπορεί να εκφραστεί ως:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (3.7.) [13]$$

όπου: t_R είναι ο χρόνος κατακράτησης της διαλυμένης ουσίας και t_0 ο χρόνος κατακράτησης των μη συγκρατημένων ενώσεων.

Ενδεικτικές διαφορές μεταξύ ενός χρωματογραφήματος με τις μη βέλτιστες (non-optimal) τιμές k' και ενός άλλου με τις βέλτιστες (optimal) τιμές k' για τις νωρίτερα και τις μεταγενέστερα εκλούμενες ενώσεις φαίνονται στην (Εικ. 3.4.).



Εικ. 3.4. Χρωματογραφήματα με : α) μη βέλτιστες τιμές k' , β) βέλτιστες τιμές k' [14]

Στο πρώτο χρωματογράφημα (α), υπάρχει περιορισμένη χωρητικότητα (capacity) και ο διαχωρισμός ορισμένης ποσότητας ενώσεων είναι δυνατός εντός συγκεκριμένης χρονικής περιόδου. Αντίθετα, στο δεύτερο χρωματογράφημα (β) μειώνοντας τη θερμοκρασία κατά τη διάρκεια του πρώιμου τμήματος του χρωματογραφήματος ο παράγοντας κατακράτησης αυξάνεται και τα συστατικά παραμένουν περισσότερο μέσα στη στήλη. Παρομοίως, η αύξηση της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια του τελευταίου τμήματος του χρωματογραφήματος ο συντελεστής κατακράτησης μειώνεται και τα συστατικά αφήνουν τη στήλη γρηγορότερα [14].

3.1.2. GC Ανιχνευτές (Detectors)

Μαζί με τη χρωματογραφική στήλη, ο ανιχνευτής αποτελεί την «καρδιά» του χρωματογράφου. Η στήλη ναι μεν διαχωρίζει τα στοιχεία αλλά ο ανιχνευτής δίνει πληροφορίες σχετικές με αυτόν τον διαχωρισμό. Χωρίς τον ανιχνευτή, η χρωματογραφία θα ήταν απλά μόνο ένας διαχωρισμός ή μια προπαρασκευαστική τεχνική [15].

Οι ανιχνευτές GC ταξινομούνται Πίνακας 3.1 με βάση τον μηχανισμό λειτουργίας τους ως εξαρτώμενοι από τη συγκέντρωση, εξαρτώμενοι από τον ρυθμό ροής της μάζας ή εξαρτώμενοι και από τα δύο. Στην περίπτωση ενός ανιχνευτή συγκέντρωσης (concentration detector), το σήμα είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση του αναλύτη στο φέρον αέριο μέσα στο κελί του ανιχνευτή, ενώ το σήμα ενός ανιχνευτή ροής μάζας (mass flow detector) είναι ανάλογο με τον ρυθμό ροής της μάζας του αναλύτη που εξαπλώνεται στο κελί της στήλης από το φέρον αέριο [15, 16].

Ένας ιδανικός ανιχνευτής απαιτεί ορισμένα ειδικά χαρακτηριστικά, όπως επαρκή ευαισθησία, αξιοπιστία, ανιχνευσιμότητα, εξειδίκευση, γραμμικότητα κ.λπ. [16]. Οι τυπικοί ανιχνευτές αέριας χρωματογραφίας καθώς και οι εφαρμογές τους, τα όρια ανίχνευσης και ο τύπος τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1.

Το φασματομέτρο μάζας (mass spectrometer-MS) αναγνωρίζεται γενικά ως ανιχνευτής υψηλής ισχύος για έναν αέριο χρωματογράφο λόγω της υψηλής ευαισθησίας, της εξειδίκευσής του και της ικανότητάς του να διακρίνει τη δομή μιας ένωσης [17]. Η ανάλυση των ενώσεων-στόχων (target compounds) είναι ένα από τα ισχυρά πλεονεκτήματα της σύζευξης GC-MS που έχει εφαρμοστεί εκτενώς στη γεωχημεία πετρελαίου [9].

Επίσης, οι ανιχνευτές ιονισμού φλόγας (flame ionization detectors-FID) χρησιμοποιούνται ευρέως για την ανίχνευση πολλών τύπων υδρογονανθράκων. Ωστόσο, είναι δύσκολο ή αδύνατο να προσδιοριστούν πολλές χαρακτηριστικές ενώσεις, όπως είναι οι βιοδείκτες (biomarkers) ή οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (ΠΑΥς) χρησιμοποιώντας μόνο GC-FID, καθώς συναντώνται σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις στο πετρέλαιο και η συγκεκριμένη μέθοδος δεν μπορεί να παρέχει περισσότερες πληροφορίες για μεμονωμένα μόρια λόγω της δισδιάστατης ανάλυσης δεδομένων της [18].

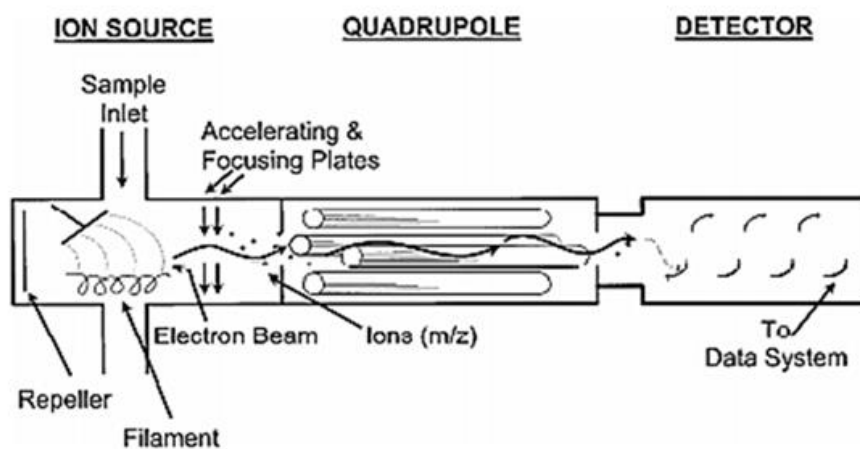
Πίνακας 3.1 Ανιχνευτές GC και τα χαρακτηριστικά τους [3].

Ανιχνευτής	Εφαρμογή	Ευσαιθησία	Γραμμικότητα	Τύπος
Flame ionization detector (FID)	Most organic compounds	10–100pg	10 ⁷	Mass
Electron-capture detector (ECD)	Halides, nitrates, nitriles, peroxides, anhydrides, organometallics	50 fg	10 ⁵	Concentration
Thermal conductivity detector (TCD)	Universal	1 ng	10 ⁷	Concentration
Flame photometric detector (FPD)	S, P, Sn, B, As, Ge, Se, Cr	100 pg	10 ³	Mass
Nitrogen-phosphorus detector (NPD)	N, P	10 pg	10 ⁶	Mass
Photo-ionization detector (PID)	Aromatics, ketones, esters, aldehydes, amines, heterocyclics, organosulphurs, some organometallics	2 pg	10 ⁷	Concentration
Mass spectrometer (MS)	Universal Selective*	1 ng (scan) 1 pg (SIM)	10 ³ 10 ³	Mass

* Σε περίπτωση λειτουργίας σε επιλεγμένη σάρωση ιόντων (SIM mode)

3.1.3. Φασματομετρία μάζας (MS)

Η φασματομετρία μάζας (MS) θεωρείται ως μια μοναδική φασματοσκοπική τεχνική η οποία βασίζεται στη δημιουργία ιόντων οργανικών ή ανόργανων μορίων (διαδικασία ιονισμού) που στη συνέχεια αναλύονται σύμφωνα με την αναλογία της μάζας τους προς το φορτίο (m/z) καθώς εισέρχονται μέσω ηλεκτροστατικού πεδίου (αναλυτής μάζας) και τελικά ανιχνεύονται (detector) (Εικ. 3.5.).

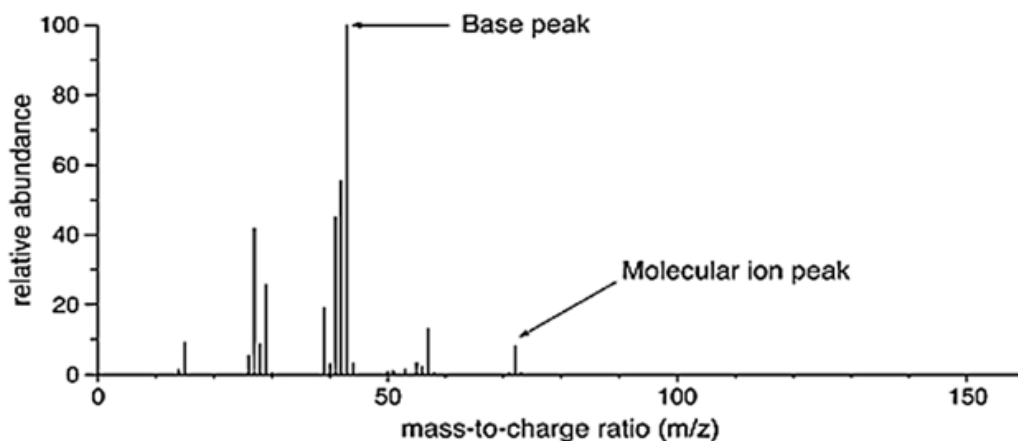


Εικ. 3.5. Σχηματική διάταξη φασματομέτρου μάζας [19]

Η μοναδικότητα αυτής της αναλυτικής τεχνικής είναι ότι μπορεί να συνδυάσει τόσο την ανίχνευση όσο και την ταυτοποίηση μιας άγνωστης ένωσης [19]. Η ανάπτυξη οργάνων πολύ υψηλής ανάλυσης (high-resolution) έχει συμβάλει στην τεράστια συλλογή πληροφοριών σχετικά με τη σύνθεση δειγμάτων αργού πετρελαίου [20].

Ο αναλυτής μάζας (mass analyzer) είναι το πιο σημαντικό μέρος του φασματομέτρου μάζας. Μεταξύ των διαφορετικών αναλυτών που έχουν χρησιμοποιηθεί όσον αφορά την ανάλυση, μικρότερες μονάδες που βασίζονται σε τεχνολογία τετραπόλου (quadrupole) ή τεχνολογία παγίδευσης ιόντων (ion trap) παρέχουν ισχύ ανάλυσης μάζας έως περίπου 8.000. Ωστόσο, η ανάλυση μπορεί να βελτιωθεί χρησιμοποιώντας FT-ICRMS (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance) or FT-Orbitrap analyzers [21, 22].

Τα τυπικά φάσματα μαζών περιέχουν μόνο θετικά ιόντα θραυσματοποίησης με φορτίο +1. Ως εκ τούτου, ο λόγος μάζας προς φορτίο (m/z) είναι η μοριακή μάζα του θραύσματος διαιρούμενη με +1. Ένα παράδειγμα φάσματος μαζών δίνεται στην (Εικ. 3.6.), όπου η σχετική αφθονία (relative abundance) απεικονίζεται στον άξονα y και το πηλίκιο m/z απεικονίζεται στον άξονα x .



Εικ. 3.6. Παράδειγμα φάσματος μαζών του πεντανίου [3]

Το θραύσμα (m/z) που έχει την υψηλότερη ένταση ονομάζεται βασική κορυφή (base peak) ή βασικό ιόν (base ion) και παρουσιάζεται ως σχετική αφθονία 100%. Επιπλέον, το μοριακό ιόν (molecular ion) ή το μητρικό ιόν (M^+) είναι το θραύσμα με τον υψηλότερο αριθμό μάζας και αντιπροσωπεύει το θετικό φορτισμένο μόριο με m/z ίσο με τη μοριακή μάζα της ένωσης. Όλα τα άλλα θραύσματα προέρχονται από το θραύσμα του μοριακού ιόντος [19].

Η μέθοδος ιονισμού που χρησιμοποιείται στον φασματομετρικό ανιχνευτή μάζας χαρακτηρίζει τη φύση των δεδομένων που λαμβάνονται. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι ιονισμού όπως ο ιονισμός ηλεκτρονίων (EI), ο χημικός ιονισμός (CI), ο χημικός ιονισμός

ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI), ο ιονισμός πεδίου (FI), ο φωτοϊονισμός (PI) και άλλες [23]. Βεβαίως, δεν υπάρχει ιδανική τεχνική ιονισμού για όλους τους τύπους δειγμάτων αργού πετρελαίου λόγω του πολύπλοκου χαρακτήρα των συστατικών του πετρελαίου. Επομένως, απαιτείται συνδυασμός αυτών για μία αποτελεσματική ταυτοποίηση των διαφόρων δειγμάτων αργού πετρελαίου [22].

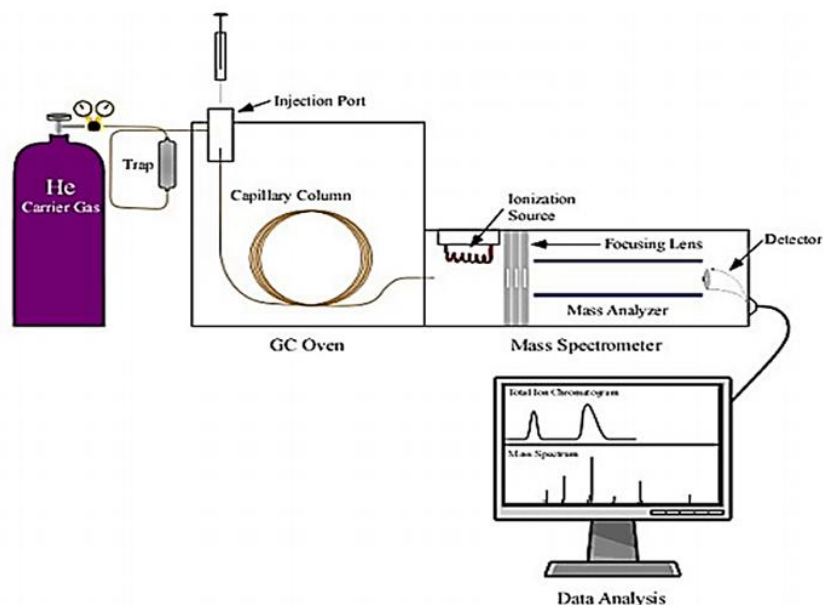
Η μέθοδος ιονισμού ηλεκτρονίων (Electron Ionization-EI) είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μεταξύ άλλων και βασίζεται στην αλληλεπίδραση της προς ανάλυση ουσίας σε αέρια φάση με μια δέσμη ηλεκτρονίων (συνήθως 70eV) η οποία δημιουργεί ριζικά ιόντα που στη συνέχεια υφίστανται αποσύνθεση σχηματίζοντας ιόντα θραυσματοποίησης [23].

3.1.4. GC-MS

Η μέθοδος GC-MS είναι ο συνεργιστικός συνδυασμός δύο ισχυρών αναλυτικών τεχνικών της αέριας χρωματογραφίας (GC) και της φασματομετρίας μάζας (MS) [24]. Παρέχει ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό πτητικών και ημιπτητικών ενώσεων σε δείγματα πετρελαίου [17]. Σχεδόν οποιοσδήποτε αέριος χρωματογράφος μπορεί να συνδεθεί με ένα φασματόμετρο μάζας παρέχοντας μια δισδιάστατη αναγνώριση συμπεριλαμβανομένου του χρόνου κατακράτησης και του φάσματος μάζας για κάθε συστατικό του μείγματος [25].

Στις περισσότερες περιπτώσεις μια τριχοειδής στήλη GC συνδέεται απευθείας με τον ανιχνευτή MS μέσω θερμαινόμενης τριχοειδούς οδού μεταφοράς (capillary transfer line). Το δείγμα «ταξιδεύει» μέσω της στήλης GC στη διεπιφάνεια και στη συνέχεια υποβάλλεται σε επεξεργασία από τον ανιχνευτή MS. Όλα τα δεδομένα που λαμβάνονται, αναλύονται από έναν υπολογιστή που μετατρέπει τους ηλεκτρικούς παλμούς σε αντίγραφα οπτικής απεικόνισης και έντυπης μορφής (Εικ. 3.7.) [19].

Η μέθοδος GC-MS μπορεί να λειτουργήσει με διάφορους τρόπους, όπως η πλήρης σάρωση (scan mode) και η επιλεγμένη σάρωση ιόντων (SIM mode). Η λειτουργία scan mode αναφέρεται στην περίπτωση που χρησιμοποιείται φασματόμετρο μάζας για τη σάρωση ολόκληρου του εύρους των ιόντων που παράγονται στην πηγή ιόντων. Μεταξύ αυτών των ιόντων υπάρχουν κάποια χαρακτηριστικά και διαγνωστικά ιόντα της ένωσης-στόχου [27].



Εικ. 3.7. Σχηματική διάταξη της μεθόδου GC-MS [26]

Ωστόσο, ένα σημαντικό μειονέκτημα των τετραπολικών (quadrupole) αναλυτών μάζας είναι η χαμηλή σχετικά διακριτική ικανότητα, λόγω του μεγάλου χρόνου σάρωσης και του περιορισμένου εύρους m/z . Ως εκ τούτου, καταγράφονται περιοχές φάσματος χωρίς ιόντα ενδιαφέροντος, ενώ άλλα χρήσιμα ιόντα δεν φτάνουν στον ανιχνευτή. Αυτό το γεγονός στην πραγματικότητα οδηγεί σε μείωση της ευαισθησίας της λειτουργίας σάρωσης για τον προσδιορισμό των ενώσεων-στόχων [23, 28]. Αν και είναι κατώτερα από τα όργανα μαγνητικού τομέα όσον αφορά την ευαισθησία, την ανάλυση και το εύρος ανώτερης μάζας, η ευκολία χρήσης τους, η σχετική προσιτότητα, το συμπαγές μέγεθος και η ικανότητα εύκολης διασύνδεσης με συστήματα GC ή LC τα καθιστούν την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μάζα φασματομέτρα στο κλινικό εργαστήριο.

Ένας απλός τρόπος για να αυξηθεί η ευαισθησία της μεθόδου είναι χρήση της λειτουργίας SIM (selected ion monitoring-επιλεγμένη παρακολούθηση ιόντων). Αυτή η τεχνική επιτρέπει στο όργανο να καταγράφει το ρεύμα ιόντων σε επιλεγμένες μάζες που είναι χαρακτηριστικές για την ένωση ενδιαφέροντος. Έτσι, ο αναλυτής μάζας δεν ξοδεύει χρόνο σάρωσης ολόκληρου του εύρους μάζας και έχει ρυθμιστεί να παρακολουθεί μόνο την ένταση συγκεκριμένων τιμών m/z . Επιπλέον, η λειτουργία SIM μειώνει τον θόρυβο (background noise) αυξάνοντας την ευαισθησία και την επιλεκτικότητα της μεθόδου [24, 28, 29].

Οι βιβλιοθήκες φασμάτων αναφοράς (reference spectral libraries) χρησιμοποιούνται από τους ειδικούς προκειμένου να έχουν πρόσβαση σε χιλιάδες φάσματα έτσι ώστε να ερμηνεύσουν και να αναγνωρίσουν μια άγνωστη ένωση σε σύγκριση με μια γνωστή.

Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις όπου απαιτείται απόλυτη αναγνώριση και εφόσον κάποια ισομερή δεν μπορούν να διαφοροποιηθούν το ένα από το άλλο, είναι σημαντικό να χρησιμοποιείται ένα πρότυπο αναφοράς (reference standard) που μπορεί να αναλυθεί στο ίδιο όργανο υπό πανομοιότυπες συνθήκες συγκρίνοντας τα φάσματα μαζών και τους χρόνους κατακράτησης [3].

3.2. Τεχνική χημικού αποτυπώματος πετρελαίου (Petroleum Forensic Fingerprinting)

Η τεχνική "fingerprinting" είναι ένα σύνολο μεθόδων που βοηθούν στην ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό της προέλευσης ενός ρύπου με βάση τη χημική ανάλυση του δείγματος [30].

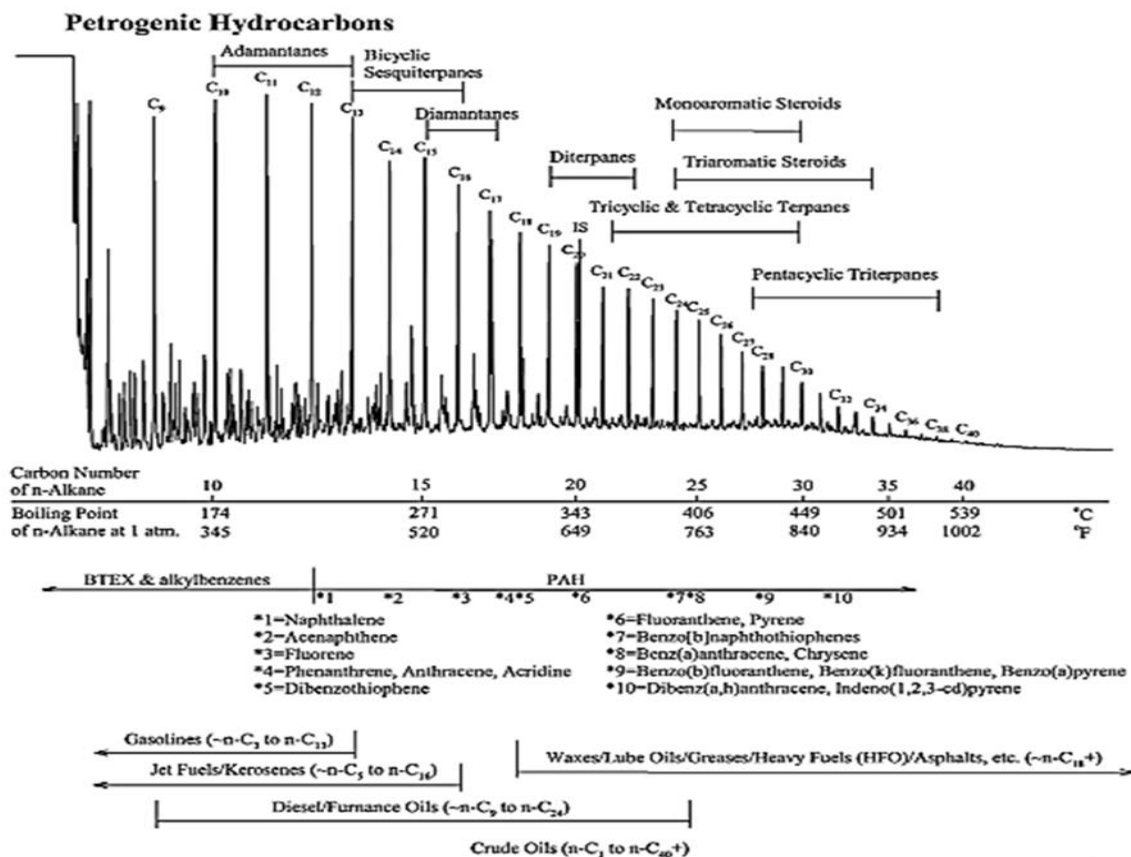
Η συγκεκριμένη μέθοδος άρχισε να αναπτύσσεται για πρώτη φορά το 1970 και η πρώτη εφαρμογή της σε ρεαλιστικές συνθήκες ήταν στο ατύχημα του Exxon Valdez, όπου χρησιμοποιήθηκε τόσο για την ανίχνευση υδρογονανθράκων στη θάλασσα όσο και για τις επιπτώσεις τους στην υδρόβια ζωή και την εξέταση της καταλληλότητας των τροφίμων προς κατανάλωση από τη γύρω περιοχή. Παρά το γεγονός ότι αυτή η μέθοδος σχεδιάστηκε αρχικά για την ταυτοποίηση μόνο σε υδρόβια συστήματα, στην πορεία βελτιώθηκε έτσι ώστε να μπορεί να εφαρμοστεί και σε δείγματα πλαγκτόν και εδάφους από μεγάλο βάθος [31, 32].

Ο χαρακτηρισμός των πετρελαιοκηλίδων (oil spills) και η σύνδεσή τους με πιθανές πηγές (potential sources) είναι πολύ σημαντικές παράμετροι για την εκτίμηση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων, καθώς οι τυχαίες πετρελαιοκηλίδες μπορούν να έχουν καταστροφικές συνέπειες στο περιβάλλον και το οικοσύστημα. Ως εκ τούτου, η επιτυχής «εγκληματολογική» (forensics) έρευνα και η ανάλυση των ρύπων πετρελαίου παρέχει πληθώρα δεδομένων χημικών αποτυπώματων (chemical fingerprinting data) [17, 27]. Κάθε δείγμα αργού πετρελαίου παρουσιάζει ένα μοναδικό χημικό αποτύπωμα (chemical fingerprint) καθώς σχηματίστηκε κάτω από διαφορετικές γεωλογικές συνθήκες [18].

Η ανάλυση συγκεκριμένων υδρογονανθράκων πετρελαίου έχει μεγάλη σημασία στην περιβαλλοντική εγκληματολογία, καθώς παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τον χαρακτηρισμό και την ταυτοποίηση των πετρελαιοκηλίδων. Η επιλογή των κατάλληλων συστατικών-στόχων του πετρελαίου (oil analytes) για την ταυτοποίηση των πετρελαιοκηλίδων εξαρτάται από τον τύπο του πετρελαίου που διαρρέεται, από τα χαρακτηριστικά της περιοχής που μολύνεται και από τις ανάγκες σύγκρισης μεταξύ των τρεχόντων και των μελλοντικών δεδομένων [18].

Τα συστατικά-στόχοι του πετρελαίου που αναλύονται με τεχνικές όπως η GC-MS μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις κύριες κατηγορίες: 1) μεμονωμένοι κορεσμένοι υδρογονάνθρακες συμπεριλαμβανομένων των κανονικών αλκανίων (n-alkanes) και των ισοπρενοειδών (Individual saturated hydrocarbons including n-alkanes and isoprenoids), 2) πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, ΠΑΥs (PAHs), συμπεριλαμβανομένων των χαρακτηριστικών αλκυλιωμένων ομολόγων τους, 3) ετεροκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες θείου (sulfur heterocyclic aromatic hydrocarbons) και τα αλκυλιωμένα ομόλογα τους και 4) βιοδείκτες πετρελαίου (petroleum biomarkers) [33, 34].

Οι αναλύτες-στόχοι αναγνωρίζονται και ποσοτικοποιούνται με βάση τα χαρακτηριστικά ιόντα τους από την τεχνική GC-MS σε λειτουργία SIM. Το σχήμα κατανομής (distribution pattern) και το προφίλ των συστατικών του πετρελαίου παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ διαφόρων δειγμάτων πετρελαίου και πετρελαϊκών προϊόντων (Εικ. 3.8.) [18].



Εικ. 3.8. Κατανομή των ενώσεων-στόχων στη GC-MS ανάλυση δειγμάτων πετρελαίου [18]

3.2.1. Ανάλυση βιοδεικτών πετρελαίου (Petroleum Biomarkers Analysis)

Οι βιοδείκτες αποτελούν αναμφισβήτητα ένα χρήσιμο εργαλείο για την εξερεύνηση του πετρελαίου καθώς παρέχουν πληροφορίες σχετικά με το περιβάλλον εναπόθεσης, την ηλικία, την αρχική οργανική ύλη κ.λπ. Για παράδειγμα, οι πορφυρίνες, τα άκυκλα διτερπάνια, το φυτάνιο (phytane) και το πριστάνιο (pristane) προέρχονται από τα στάδια της διαγένεσης (diagenesis) και της καταγένεσης (catagenesis) της χλωροφύλλης, ενώ η παρουσία στερανίων (steranes) και χοπανίων (hopanes) μπορεί να δώσει πληροφορίες σχετικά με την ηλικία του μητρικού πετρώματος γένεσης (source rock) [35, 36].

Η χημική ανάλυση των βιοδεικτών παρέχει πληροφορίες τεράστιας σημασίας για έρευνες περιβαλλοντικής εγκληματολογίας (environmental forensics investigations) [37]. Οι βιοδείκτες είναι φυσικοί υδρογονάνθρακες οι οποίοι συναντώνται στο αργό πετρέλαιο και στα περισσότερα προϊόντα πετρελαίου και παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στις διάφορες διαδικασίες αλλοίωσης της χημικής σύστασης (weathering processes) σε σύγκριση με τα υπόλοιπα συστατικά. Επιπλέον, η κατανομή τους είναι μοναδική μεταξύ διαφορετικών προϊόντων πετρελαίου παρέχοντας συγκεκριμένο χημικό αποτύπωμα, που αποτελεί ιδιαίτερη χρήσιμη πληροφορία στις μελέτες συσχέτισης πετρελαίων ή προϊόντων τους [38].

Οι κορεσμένοι καθώς και οι αρωματικοί βιοδείκτες μπορούν εύκολα να αναλυθούν με την τεχνική GC-MS σε λειτουργία SIM σε δείγματα πετρελαίου ή σε κλάσματα αυτού. Ο βομβαρδισμός ηλεκτρονίων (electron impact) είναι η πιο συνηθισμένη μέθοδος ιονισμού που επιτρέπει στους βιοδείκτες να δημιουργούν χαρακτηριστικά ιόντα θραυσματοποίησης [39].

Η θραυσματοποίηση των πιο κοινών βιοδεικτών πετρελαίου φαίνεται στον Πίνακα 3.2. Τα χρωματογραφήματα μάζας σε λειτουργία SIM χρησιμοποιούνται όχι μόνο για ποσοτικοποίηση αλλά και για ταυτοποιήσεις των βιοδεικτών αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία της ανάλυσης [34, 39].

Το χημικό αποτύπωμα των κανονικών αλκανίων (n-alkanes) χρησιμοποιείται ευρέως στην οργανική γεωχημεία (organic geochemistry) για την τεκμηρίωση της προέλευσης του οργανικού περιεχομένου του δείγματος. Επίσης, η παρουσία κανονικών αλκανίων μακράς αλυσίδας χρησιμοποιείται ως δείκτης για το περιβάλλον εναπόθεσης με έντονο περιεχόμενο σε τριγενή (terrigenous) ιζήματα [41].

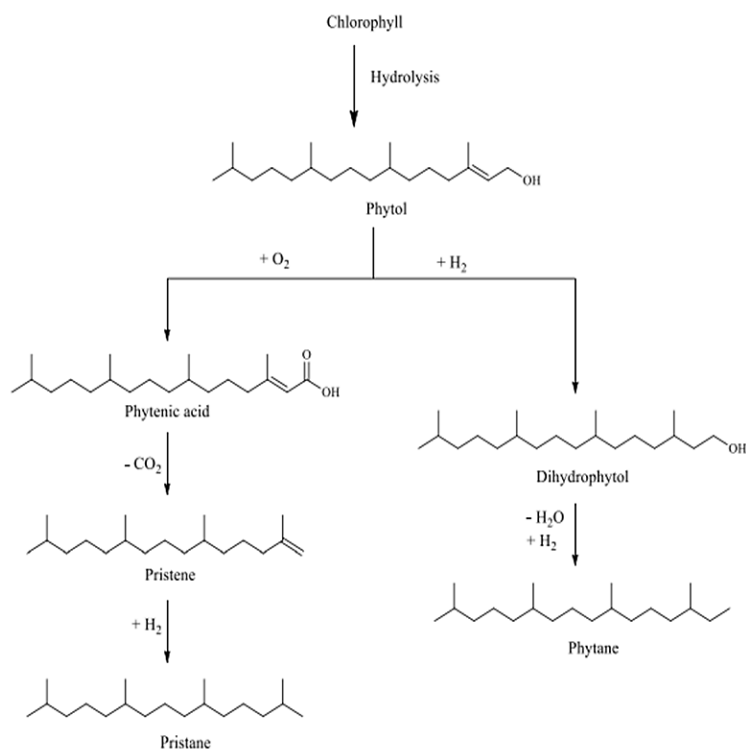
Πίνακας 3.2 Χαρακτηριστικά ιόντα θραυσματοποίησης των πιο κοινών βιοδεικτών [40]

<u>Βιοδείκτες</u>	<u>Ιόντα θραυσματοποίησης (m/z)</u>
alkyl-cyclohexanes	83
methyl-alkyl-cyclohexanes	97
isoalkanes and isoprenoids	113, 127, 183
Sesquiterpanes	123
Adamantanes	135, 136, 149, 163, 177, 191
Diamantanes	187, 188, 201, 215, 229
tri-, tetra-, penta-cyclic terpanes	191
25-norhopanes	177
28,30-bisnorhopanes	163, 191
Steranes	217, 218
5 α (H)-steranes	149, 217, 218
5 β (H)-steranes	151, 217, 218
X diasteranes	217, 218, 259
methyl-steranes	217, 218, 231, 232
monoaromatic steranes	253
triaromatic steranes	231

Τα χρωματογραφήματα που παρουσιάζουν μονοκόρυφη (unimodal) κατανομή από n-C10 έως n-C33 με μέγιστο περίπου από n-C15 έως n-C17, υποδεικνύουν προέλευση (input) από άλγη και μικρόβια, ενώ η κατανομή με δύο μέγιστα (δικόρυφη, bimodal) μεταξύ n-C10 έως n-C33 με μέγιστα περίπου από n-C15 έως n-C17 και n-C27 έως n-C29 υποδεικνύει μικρότερη συνεισφορά από άλγη και μικρόβια στο σύνολο της οργανικής ύλης [42].

Τα κυκλικά ισοπρενοειδή είναι τα κύρια συστατικά των φυτών, των ιστών των ζώων και των βακτηριακών κυτταρικών τοιχωμάτων. Καθώς η χλωροφύλλη είναι πιθανώς το πιο διαδεδομένο μόριο που διαθέτει ισοπρενοειδή αλυσίδα (isoprenoid chain), θα μπορούσε να έχει σημαντική συνεισφορά στο οργανικό περιεχόμενο των ιζημάτων. Η ύπαρξη άκυκλων ισοπρενοειδών στη βιόσφαιρα προέρχεται από την αποικοδόμηση της πλευρικής αλυσίδας της φυτόλης (phytol) ενός μορίου χλωροφύλλης [43, 44].

Οι περισσότεροι υδρογονάνθρακες που έχουν σχηματιστεί από επαναλαμβανόμενες μονάδες ισοπρενίου (C₅H₈) και μπορούν να βρεθούν στα αρχαία ιζήματα και στο πετρέλαιο είναι οι διακλαδισμένοι υδρογονάνθρακες C₁₉ και C₂₀, πριστάνιο και φυτάνιο αντίστοιχα, που περιέχουν στα μόρια τους σύνδεση κεφαλής προς ουρά των μονάδων ισοπρενίου. Το πριστάνιο (pristane) παράγεται κάτω από λιγότερο ανοξικές συνθήκες με αφυδάτωση και αποκαρβοξυλίωση της φυτόλης, ενώ το φυτάνιο (phytane) κάτω από ισχυρές αναγωγικές συνθήκες μέσω αναγωγής και αφυδάτωσης της φυτόλης (Εικ. 3.9.) [45].

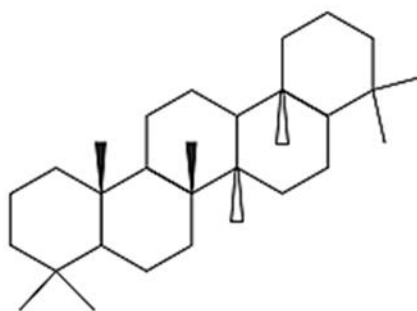


Εικ. 3.9. Σχηματισμός πριστανίου και φυτανίου από τη φυτόλη [45]

Τα τριτερπάνια (triterpanes) και τα στεράνια (steranes) είναι οι πιο συνηθισμένοι βιοδείκτες που συναντώνται στο αργό πετρέλαιο και στα μεσαία και βαριά προϊόντα διύλισής του. Λόγω της σχετικής αντοχής τους στις διάφορες διαδικασίες αλλοίωσης των συστατικών (weathering), αποτελούν ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο στις «εγκληματολογικές» περιβαλλοντικές έρευνες [46].

Τα χοπάνια (hopanes) αποτελούν τα πιο διαδεδομένα πεντακυκλικά τριτερπάνια στα περισσότερα ώριμα ιζήματα και στο αργό πετρέλαιο και προέρχονται κυρίως από το χοπανοειδές τετραϋδροξυ-βακτηριοχοπάνιο (tetrahydroxy-bacteriohopane) C₃₅ και τα συγγενή βακτηριοχοπάνια που βρίσκονται στις λιπιδικές μεμβράνες των προκαρυωτικών οργανισμών [34, 47].

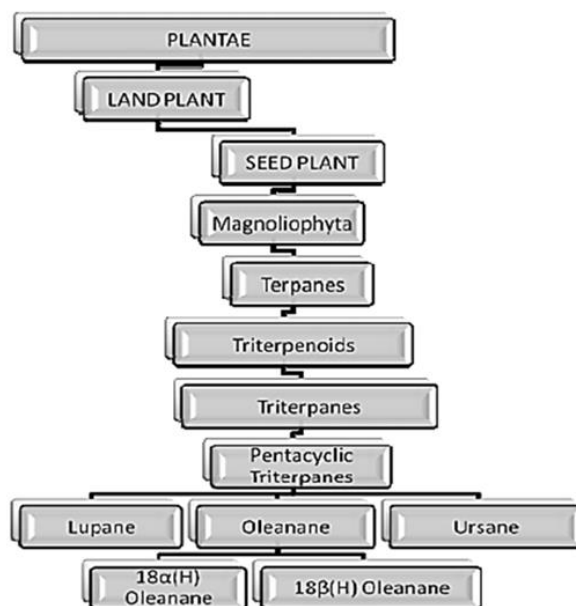
Το γαμμακεράνιο (gammacerane) είναι ένα μη-χοπανοειδές (non-hopane) πεντακυκλικό τριτερπάνιο (Εικ. 3.10.) που συναντάται σε μικροποσότητες σε σχεδόν όλα τα ασφαλτένια και τα πετρέλαια και βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία σε ιζήματα που σχηματίστηκαν από την αποικοδόμηση της τετραχυμανόλης (tetrahymanol) που προέρχεται από πρωτόζωα. Η ύπαρξή του υποδηλώνει ασυνήθιστα αλατούχα περιβάλλοντα όπως λίμνες και θαλάσσια ιζήματα [45, 47, 48].



Εικ. 3.10. Δομή του γαμμακερανίου [45]

Το ολεανάνιο (oleanane) είναι επίσης ένας άλλος τύπος μη χοπανοειδούς πεντακυκλικού τριτερπανίου που προέρχεται από το Plantae κι έχει δύο ισομερή: 18α(H)-ολεανάνιο και 18β(H)-ολεανάνιο (Εικ. 3.11.). Διάφορα ολεανάνια έχουν βρεθεί σε εκχυλίσματα και πετρέλαια από δελταϊκά και θαλάσσια ιζήματα και συγκεκριμένα η απεικόνιση *άλφα* (*α*) κυριαρχεί στο ώριμο αργό πετρέλαιο και στα πετρώματα. Δεδομένου ότι και οι δύο δομές παρουσιάζουν υψηλή αντοχή στις διαδικασίες βιοαποικοδόμησης (biodegradation) και στην έκπλυση με νερό, το ολεανάνιο θεωρείται πολύ χρήσιμος βιοδείκτης σε συσχετισμούς μεταξύ διαφόρων δειγμάτων πετρελαίου καθώς και μεταξύ πετρελαίων και μητρικών πετρωμάτων (source rocks) [45, 48, 49].

Όλα τα χοπάνια δίνουν ένα χαρακτηριστικό ιόν θραυσματοποίησης με αναλογία m/z 191, ενώ τα στεράνια αντίστοιχα σε m/z 217 και 218 [39]. Το θραύσμα με m/z 191 είναι συχνά η βασική κορυφή των φασμάτων μάζας των βιοδεικτών. Γενικά, τα χρωματογραφήματα GC-MS των τερπανίων (m/z 191) παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα κατανομής από C19 έως C35 με τα C29αβ- και C30αβ-πεντακυκλικά χοπάνια και τα C23 και C24 τρικυκλικά τερπάνια να είναι συνήθως τα πιο διαδεδομένα. Στην περίπτωση των στερανίων (σε m/z 217 και 218), κυριαρχούν τα ισομερή των C27, C28 και C29 [37].



Εικ. 3.11. Προέλευση και ταξινόμηση του ολεανάνιου [49]

Συνήθως, τα μοτίβα κατανομής των βιοδεικτών διαφέρουν μεταξύ των δειγμάτων πετρελαίου και διερευνώντας την ύπαρξη αρκετών οικογενειών βιοδεικτών είναι δυνατόν να επιτευχθεί η ανίχνευση των πετρελαϊκών ρυπαντών και η συσχέτιση τους με το πιθανό μητρικό πέτρωμα [46].

3.2.2. Διαγνωστικές παράμετροι βιοδεικτών (Biomarker Diagnostic Parameters)

Οι διαγνωστικές παράμετροι των βιοδεικτών χρησιμοποιούνται ευρέως από τους γεωχημικούς για τη συσχέτιση πετρελαίων, το περιβάλλον εναπόθεσης, την εκτίμηση της θερμικής ωριμότητας (thermal maturity) και της βιοαποικοδόμησης σε ένα κοίτασμα πετρελαίου κ.λπ. Η κατανομή των κανονικών αλκανίων, ο δείκτης CPI (Carbon Preference Index), ο βαθμός κηρώδους (degree of waxiness), η κατανομή των στερανίων (m/z 217) και των τριτερπανίων (m/z 191), η παρουσία ομοχοπανίων και γαμμακερανίου, καθώς και οι ειδικές διαγνωστικές αναλογίες (diagnostic ratios) των βιοδεικτών είναι μερικές από τις παραμέτρους που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία του χημικού αποτυπώματος (fingerprinting) του πετρελαίου [37].

Καθώς η σύσταση των περισσότερων βιοδεικτών μεταξύ των διαφόρων δειγμάτων πετρελαϊοκηλίδων και του πιθανού πετρελαίου προέλευσης τους δεν παρουσιάζει καμία διαφορά, η σύγκριση των διαγνωστικών λόγων (diagnostic ratios-DR) μεταξύ τους θα μπορούσε να είναι πραγματικά ωφέλιμη επειδή η επίδραση της συγκέντρωσης ελαχιστοποιείται. Επιπλέον, οι διαφορές της κατανομής των βιοδεικτών-στόχων μεταξύ των δειγμάτων είναι πιο εμφανείς. Τα DR μπορούν να υπολογιστούν είτε από ποσοτικά

δεδομένα (δηλαδή συγκεντρώσεις ενώσεων) είτε από ημι-ποσοτικά δεδομένα (δηλαδή περιοχές κορυφών ή ύψη) [37, 40].

Ο λόγος πριτανίου/φυτανίου (Pr/Ph) είναι μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες παραμέτρους συσχέτισης που καθορίζει το περιβάλλον εναπόθεσης. Στην περίπτωση όπου ο λόγος Pr/Ph είναι μικρότερος από τη μονάδα, υποδεικνύει έντονα αναγωγικά περιβάλλοντα, ενώ οι πολύ υψηλοί λόγοι Pr/Ph (πάνω από 3) σχετίζονται με χερσαία (terrestrial) ιζήματα. Τέλος, όταν ο λόγος Pr/Ph κυμαίνεται μεταξύ 1 και 3, αποτελεί ένδειξη οξειδωτικού περιβάλλοντος [50].

Οι λόγοι ισοπρενοειδή/η-αλκάνια (Pr/n-C17 και Ph/n-C18) είναι επίσης πολύ χρήσιμοι καθώς παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τη βιοαποικοδόμηση, την ωρίμανση και τις συνθήκες διαγένεσης. Στο μη βιοαποδομημένο αργό πετρέλαιο και στα μεσαία και βαριά αποστάγματα του, τα η-αλκάνια C17 και C18 είναι πιο διαδεδομένα σε σύγκριση με το πριστάνιο και το φυτάνιο αντίστοιχα [37].

Επίσης, όταν ο λόγος Ts (τρισονορνεοχοπάνιο) προς Tm (τρισονορχοπάνιο), Ts/Tm, είναι μεγαλύτερος από 0,5 αυξάνεται και το περιεχόμενο σε σχιστόλιθο (shale) ενώ γενικά υψηλές αναλογίες (>1) C29/C30 χοπανίων στο πετρέλαιο προέρχονται από οργανικά πλούσια ανθρακικά άλατα [50, 51]. Τέλος, η αναλογία στερανίου/χοπανίου είναι σχετικά υψηλή στη θαλάσσια οργανική ύλη [37].

3.2.3. Διεργασίες αλλοίωσης των βιοδεικτών με το χρόνο (Weathering of biomarkers).

Από τη στιγμή που μία πετρελαιοκηλίδα έρχεται σε επαφή με το νερό υπόκειται σε διάφορες φυσικές, χημικές και βιολογικές διεργασίες αλλοίωσης (weathering) που περιλαμβάνουν εξάπλωση, εξάτμιση, διασπορά, διάλυση, χημική οξείδωση, βιοαποικοδόμηση, καθίζηση κ.λπ. Η συγκέντρωση των υδρογονανθρακικών και μη υδρογονανθρακικών συστατικών ποικίλλει μεταξύ διαφορετικών πηγών [52].

Σε περίπτωση διαρροής του πετρελαίου στο έδαφος, ανακατανομή των συστατικών του πετρελαίου λαμβάνει χώρα. Η εξάτμιση των ελαφρύτερων υδρογονανθράκων του πορώδους μέσου προκαλεί απώλεια υδρογονανθράκων στην ατμόσφαιρα, απορρόφηση σε στερεά σωματίδια ή διάλυση στο νερό του εδάφους ή σε υπόγεια ύδατα. Ο διαχωρισμός των συστατικών του πετρελαίου μετά την απελευθέρωσή τους στο έδαφος οφείλεται στις διαφορετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες [53, 54].

Το weathering επηρεάζει την κατάσταση των βιοδεικτών και των συστατικών αργού πετρελαίου. Αρκετές βιοχημικές αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα, όπως υδρόλυση,

κατακερματισμός, μεταβολισμός κ.λπ. [55]. Η αντίσταση στη βιοαποικοδόμηση διαφέρει μεταξύ διαφόρων τύπων βιοδεικτών, επομένως συγκρίσεις μεταξύ σχετικών ποσοτήτων τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση του επιπέδου βιοαποικοδόμησης. Η συγκέντρωση των πετρελαϊκών ρύπων στο έδαφος ή στα υπόγεια ύδατα τείνει να μειώνεται με το χρόνο λόγω της βιο-αποδόμησης. Συνήθως, τα n-αλκάνια είναι πιο βιοαποικοδομήσιμα σε σύγκριση με άλλες ενώσεις και η «εξαφάνισή» τους στα αέρια χρωματογραφήματα είναι σχετικά γρήγορη. Τα περισσότερα βιοαποικοδομήσιμα πετρέλαια παρουσιάζουν ένα μεγάλο μη διαχωριζόμενο πολύπλοκο μείγμα (unresolved complex mixture-UCM) στα χρωματογραφήματα τους, το οποίο αποτελείται κυρίως από διακλαδισμένες και κυκλικές ενώσεις καθώς και προϊόντα βιοαποικοδόμησης [46]. Μία κλίμακα εννέα επιπέδων για την έκταση της βιοαποικοδόμησης έχει αναπτυχθεί από τους Volkman και συνεργάτες [56], σύμφωνα με την οποία τα πρώτα πέντε επίπεδα βασίζονται στην απομάκρυνση των n-αλκανίων, των ισοπρενοειδών και των αλκυλοκυκλοεξανίων, ενώ τα επίπεδα 7-9 μπορούν να ταυτοποιηθούν με την ανάλυση των βιοδεικτών στερανίων και τριτερπανίων Πίνακας 3.3.

Πίνακας 3.3 Επίπεδα βιοαποικοδόμησης με βάση την παρουσία ή την απουσία ορισμένων ενώσεων [56]

Level of biodegradation	Compounds removed	Extent of biodegradation
1	None	Undegraded
2	Short n-alkanes	Minor
3	>90% of n-alkanes	Moderate
4	Alkylcyclohexanes; isoprenoids reduced	Moderate
5	Isoprenoids	Moderate
6	Bicyclic alkanes	Extensive
7	>50% of regular steranes	Very extensive
8	Steranes; hopanes reduced; demethylated hopanes abundant	Severe
9	Demethylated hopanes predominate; diasteranes formed; steranes gone	Extreme

3.3. Ανάλυση των PAHs και των PASHs

Οι ΠΑΥς (πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες) είναι χημικές ενώσεις που αποτελούνται από δύο ή περισσότερους συγχωνευμένους αρωματικούς δακτυλίους. Ως τοξικοί περιβαλλοντικοί ρύποι θεωρούνται κυρίως οι ΠΑΥς που περιέχουν από δύο έως επτά δακτυλίους βενζολίου. Οι πετρογενείς (petrogenic) και πυρογενείς (pyrogenic) πηγές των ΠΑΥς προκαλούν περιβαλλοντική ρύπανση ενώ οι βιογενείς (biogenic) ΠΑΥς υπάρχουν φυσικά στο περιβάλλον. Έτσι, η διαφοροποίηση μεταξύ των πηγών των ΠΑΥς είναι ζωτικής σημασίας σε κάθε περίπτωση περιβαλλοντικής εγκληματολογικής έρευνας [57].

Οι πυρογενείς ΠΑΥς τείνουν να έχουν λιγότερες αλκυλιωμένες αλυσίδες και λιγότερους πενταμελείς δακτυλίους από τους πετρογενείς. Επίσης, οι ΠΑΥς με 4-6 βενζολικούς δακτυλίους είναι γενικά πυρογενούς προέλευσης και παράγονται ως επί το πλείστον από την καύση ορυκτών καυσίμων και οργανικών υλικών. Ορισμένοι ΠΑΥς έχουν προταθεί ως δείκτες προέλευσης. Η καύση του πετρελαίου συνδέεται με υψηλές συγκεντρώσεις των πιο πτητικών ΠΑΥς, όπως το φλουορένιο, το φλουορανθένιο και το πυρένιο.

Στον προσδιορισμό της προέλευσης των ΠΑΥ χρησιμοποιούνται συνήθως ορισμένοι δείκτες. Συγκεκριμένα, τιμές Phe/Ant μεγαλύτερες του 10 αποδίδονται σε ΠΑΥ πετρογενούς προέλευσης (π.χ. τιμή 14 αποδίδεται σε προέλευση από αργό πετρέλαιο), ενώ αντίστοιχα τιμές μικρότερες του 10 υποδηλώνουν πυρολυτική προέλευση (π.χ. τιμές 4-10 αποδίδονται σε καύση βενζίνης).

Ο προσδιορισμός των αλκυλιωμένων ΠΑΥς (APAHs) βασίζεται στα μητρικά τους ιόντα. Στην περίπτωση μεθυλιωμένων ΠΑΥς, το μεθύλιο (C1-) σε έναν εξαγωνικό δακτύλιο γενικά δημιουργεί ένα χαρακτηριστικό ιόν $[M-H]^+$ με ένα δακτύλιο 7 ατόμων C, ενώ οι C2- ή περισσότερο αλκυλιωμένοι APAHs θα μπορούσαν να χάσουν ταυτόχρονα θραύσματα μεθυλίου ή μεγαλύτερου αλκυλίου για να σχηματίσουν τα ιόντα $[M-15]^+$ και στη συνέχεια $[M-29]^+$ κ.ο.κ. Η ανάλυση των αλκυλιωμένων ομολόγων ΠΑΥς βασίζεται συνήθως στην τυποποιημένη τεχνική GC-MS που λειτουργεί σε SIM mode ή στην εξαγωγή μεμονωμένων ιόντων (single ion extraction-SIE mode) [58].

Ενώσεις όπως το βενζοθειοφαίνιο (BT), το διβενζοθειοφαίνιο (DBT), τα βενζοαφθοθειοφαίνια (BNT) και τα αλκυλιωμένα ομόλογά τους ανήκουν στην οικογένεια των PASHs (πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες θείου) [59]. Οι κορυφές αναγνώρισης (identification peaks) του DBT, τα ισομερή του μεθυλο-

διβενζοθειοφαινίου (MDBT) και τα ισομερή του διμεθυλο-διβενζοθειοφαινίου (DMDBT) και του αιθυλο-διβενζοθειοφαινίου (EDBT) στο αργό πετρέλαιο μπορούν να ανιχνευθούν με την τεχνική GC-MS σε λειτουργία SIM σε m/z 184, 198 και 212, αντίστοιχα [60].

3.3.1. Weathering των ΠΑΥς (PAHs)

Οι ΠΑΥς που έχουν λιγότερους από πέντε δακτυλίους είναι συνήθως βιοαποικοδομήσιμοι από βακτήρια υπό αερόβιες συνθήκες, αλλά υπάρχουν επίσης ενδείξεις αναερόβιας αποδόμησης. Συγκεκριμένα, τα αλκυλιωμένα ομόλογα των ΠΑΥς έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως δείκτες της περιβαλλοντικής αλλοίωσης των ΠΑΥς και ως ειδικοί δείκτες της προέλευσης των πετρελαϊκών ρύπων [46].

Γενικά, οι μη αλκυλιωμένοι ΠΑΥς είναι πιο ευαίσθητοι στη βιοαποικοδόμηση από τους αλκυλιωμένους και ως εκ τούτου το weathering αυξάνει την αναλογία περισσότερων αλκυλιωμένων ΠΑΥς. Επιπλέον, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα περισσότερο αποδομημένα πετρέλαια (weathered oils) έχουν υψηλότερη αφθονία σε χρυσένια (chrysenes) και κατά συνέπεια παρατηρείται μείωση των σχετικών λόγων του άθροισματος των ναφθαλενίων (naphthalenes), των φαινανθρενίων (phenanthrenes), των διβενζοθειοφαινίων (DBT) και των φλουορενίων (fluorenes) προς το άθροισμα των χρυσενίων [61, 62].

Το αργό πετρέλαιο και τα προϊόντα διύλισης του από διαφορετικές πηγές παρουσιάζουν διαφορετικά προφίλ κατανομής των PAHs. Επιπλέον, οι PAHs είναι πιο ανθεκτικοί στο weathering σε σύγκριση με τους αντίστοιχους κορεσμένους υδρογονάνθρακες και τις πτητικές ενώσεις του αλκυλοβενζολίου, επομένως οι PAHs αποτελούν μία από τις πιο πολύτιμες ενώσεις στην ανάλυση χημικού αποτυπώματος του πετρελαίου. Ορισμένοι μητρικοί EPA priority-PAHs και τα αλκυλιωμένα ομόλογα (C1-C4) επιλεγμένων PAHs (alkylatednaphthalene, phenanthrene, dibenzothiophene, fluorene, andchrysene) χρησιμοποιούνται ευρέως στην τεχνική fingerprinting [63].

3.4. Μεθοδολογία προσδιορισμού υδρογονανθράκων σε περιβαλλοντικά δείγματα

Η πειραματική διαδικασία για τον προσδιορισμό υδρογονανθράκων πετρελαίου σε περιβαλλοντικά δείγματα βασίζεται σε καθορισμένα πρωτόκολλα και περιλαμβάνει τη δειγματοληψία, τη συντήρηση των δειγμάτων, την παραλαβή του μίγματος των οργανικών ενώσεων με τεχνικές εκκύλισης, τον διαχωρισμό των συστατικών με χρωματογραφικές τεχνικές και τον προσδιορισμό των συστατικών με φασματοσκοπικές τεχνικές.

3.4.1. Δειγματοληψία

Το δείγμα που συλλέγεται πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικό του συνόλου του νερού ή του ιζήματος που πρέπει να μελετηθεί. Επιπλέον, τα σημεία δειγματοληψίας πρέπει να αντιπροσωπεύουν και τη θέση πιθανών πηγών ρύπων. Ο εξοπλισμός δειγματοληψίας έχει προετοιμαστεί στο εργαστήριο πριν τη δειγματοληψία. Όλα τα σκεύη θα πρέπει να έχουν πλυθεί καλά με απορρυπαντικό και νερό και να ξεπλυθούν με οργανικούς διαλύτες. Για τη δειγματοληψία υδάτινων δειγμάτων για τον προσδιορισμό υδρογονανθράκων χρησιμοποιούνται καθαρές σκουρόχρωμες γυάλινες φιάλες, όγκου 2 L. Η φιάλη ξεπλένεται με το νερό δειγματοληψίας και γεμίζεται μέχρι επάνω, με υπερχειλίση, σφραγίζεται και επισημαίνεται με την ημερομηνία και το σημείο δειγματοληψίας. Οι φιάλες διατηρούνται σε φορητά ψυγεία με παγοκύστες, ώστε τα δείγματα να είναι προστατευμένα από την επίδραση του φωτός και τη θερμότητα μέχρι να μεταφερθούν στο εργαστήριο. Για την καλύτερη συντήρησή τους είναι επιθυμητό να γίνεται οξίνιση του δείγματος με υδροχλωρικό οξύ σε pH 1-2. Στο εργαστήριο, τόσο τα δείγματα νερού, όσο και τα δείγματα ιζημάτων αποθηκεύονται σε ψυγείο σε θερμοκρασίες 1-5 °C μέχρι την ανάλυσή τους. Ο χρόνος συντήρησης των δειγμάτων είναι 14 ημέρες, ενώ τα εκχυλίσματα μπορεί να συντηρηθούν 40 ημέρες μέχρι την ανάλυσή τους με GC-MS.

Για την εξασφάλιση της αξιοπιστίας των αναλύσεων και τον περιορισμό των τυχαιών σφαλμάτων αναλύονται ταυτόχρονα τυφλά δείγματα και διπλά δείγματα, τα οποία αποθηκεύονται και επεξεργάζονται με την ίδια ακριβώς μέθοδο. Τα τυφλά δείγματα περιέχουν καθαρό νερό αντί του υλικού δειγματοληψίας. Η ανάλυση διπλού δείγματος περιλαμβάνει την επεξεργασία και ανάλυση του ίδιου δείγματος δύο φορές, σαν δύο διαφορετικά δείγματα σε τυχαία θέση.

3.4.2. Παραλαβή οργανικού εκχυλίσματος από υδατικά δείγματα

Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος εκχύλισης για υδρογονάνθρακες πετρελαίου σε υδατικά δείγματα είναι η εκχύλιση υγρού-υγρού, EPA 3510. Γενικά, η υγρή-υγρή εκχύλιση επιτυγχάνει τον διαχωρισμό των ενώσεων με βάση τη διαλυτότητα σε διαφορετικά μη αναμίξιμα υγρά. Ως διαλύτης εκχύλισης χρησιμοποιείται μεθυλενοχλωρίδιο ή μίγμα δικλωρομεθανίου (dichloromethane) και n-εξανίου (n-hexane) σε αναλογία 1:1. Ποσότητα υδατικού δείγματος 500 mL ανακινείται αρχικά μηχανικά με 50 mL διαλύτη για 15min. Η εκχύλιση επαναλαμβάνεται τρεις φορές με 50 mL διαλύτη κάθε φορά (σύνολο 150 mL εκχυλίσματος). Τα εκχυλίσματα ξηραίνονται

διερχόμενα μέσω χρωματογραφικής γυάλινης στήλης που περιέχει άνυδρο θειικό νάτριο και συμπυκνώνονται με χρήση περιστροφικού εξατμιστήρα (rotary evaporator) σε τελικό όγκο 5 mL. Περαιτέρω εξάτμιση του διαλύτη πραγματοποιείται με εισαγωγή ήπιας ροής αζώτου.

3.4.3. Διαχωρισμός με χρωματογραφία στήλης

Η πολυπλοκότητα των δειγμάτων πετρελαίου δημιουργεί την ανάγκη διαχωρισμού τους σε επιμέρους κλάσματα-ομάδες συστατικών. Η πιο διαδεδομένη τεχνική, που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό του πετρελαίου σε επιμέρους κλάσματα, είναι της χρωματογραφίας ανοικτής στήλης με προσροφητικό υλικό, οξείδιο του αργιλίου (Al₂O₃) ή οξείδιο του πυριτίου (SiO₂). Πρώτα λαμβάνονται τα κορεσμένα συστατικά με διαλύτη έκλυσης έναν άπολο υδρογονάνθρακα, συνήθως πεντάνιο ή εξάνιο, στη συνέχεια με διαλύτη έκλυσης τολουόλιο εκλούνται τα αρωματικά συστατικά και τέλος με μίγμα τολουολίου-μεθανόλης σε αναλογία 6:4 λαμβάνονται οι ετεροενώσεις αζώτου, θείου και οξυγόνου.

3.4.4. Έλεγχος ανάκτησης και πρότυπες ενώσεις

Για τον έλεγχο της ανάκτησης κατά τη διαδικασία της εκχύλισης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε ως surrogate η ένωση o-terphenyl σε διάλυμα σε διχλωρομεθάνιο συγκέντρωσης 100 ppm. Ως διαλύματα αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα μίγματος κ-αλκανίων, από C₁₂ έως C₃₂ και των πολυαρωματικών υδρογονανθράκων, ναφθαλίνιου, φλουορένιου, φαινανθρένιου και ανθρακένιου. Δείγμα αργού πετρελαίου από τις γεωτρήσεις του Πρίνου-Καβάλας και δείγματα προϊόντων πετρελαίου, jet oil, gasoline, motor oil, heating oil, marine oil, χρησιμοποιήθηκαν για εμβολιασμό δειγμάτων καθαρού νερού και καθαρής άμμου.

3.4.5. Παραλαβή οργανικού εκχυλίσματος από δείγματα ιζημάτων

Χρησιμοποιείται εκχύλιση Soxhlet, ή εκχύλιση με χρήση υπερήχων (sonication). Κατά την εκχύλιση Soxhlet, το δείγμα τοποθετείται σε ειδική πορώδη θήκη μιας χρήσεως, που επιτρέπει τη μετακίνηση υλικού. Διαλύτης που συνεχώς βράζει με κάθετο ψυκτήρα επαναρρέει μέσω του πορώδους υλικού και διαλύει τους αναλύτες, οι οποίοι συλλέγονται συνεχώς σε φιάλη βρασμού.

Στην εκχύλιση με υπέρηχους, το δείγμα τοποθετείται με κατάλληλο οργανικό διαλύτη σε λουτρό υπερήχων. Η τεχνική της εκχύλισης με υπέρηχους είναι απλή και εύκολη και

επιπλέον μειώνεται ο χρόνος εκκύλισης, χρησιμοποιούνται μικρότεροι όγκοι διαλυτών και εκκυλίζονται ταυτόχρονα πολλά δείγματα.

Ποσότητα 15g ιζήματος αναμίχθηκαν με 20g άνυδρου θειικού νατρίου για ξήρανση του δείγματος. Κάθε μίγμα εκκυλίστηκε δύο φορές με μίγμα 50 mL διχλωρομεθανίου και 5mL μεθανόλης για 30min κάθε φορά. Ακολούθησε απλή διήθηση και τα διηθήματα που συλλέχθηκαν ξηράθηκαν με θειικό νάτριο και στη συνέχεια συμπυκνώθηκαν αρχικά με περιστροφικό εξατμιστήρα και στη συνέχεια κάτω από ρεύμα αζώτου.

3.4.6. Αέρια Χρωματογραφία-Φασματομετρία μάζας (GC-MS)

Η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των υδρογονανθράκων γίνεται με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας. Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα αέριου χρωματογράφου της Agilent 6890N με ανιχνευτή φασματογράφο μάζας MSD5975B και τριχοειδή στήλη με τα εξής χαρακτηριστικά: DB-ALB, μήκος 30 m, εσωτερική διάμετρο (i.d.) 0,25 mm, πάχος επικάλυψης 0,25 μm. Για την εισαγωγή των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε αυτόματος δειγματολήπτης της Agilent σειρά 7683 με μικροσύριγγα των 5 μL, ενώ ο όγκος έγχυσης ήταν 1 μL. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε αέριο He. Η ροή του φέροντος αερίου ήταν σταθερή σε όλη τη διάρκεια της ανάλυσης, 1,8 mL/min. Η εισαγωγή των δειγμάτων έγινε με διαμερισμό δείγματος (split mode) και λόγο διαμερισμού 1:10. Η θερμοκρασία της στήλης διατηρήθηκε ισοθερμικά στους 50 °C για 2 λεπτά αμέσως μετά την ένεση, στη συνέχεια αυξήθηκε από 50 °C σε 150 °C με ρυθμό 15 °C/min και κατόπιν αυξήθηκε στους 300 °C με ρυθμό 6 °C/min και διατηρήθηκε στην τελική θερμοκρασία για 10 λεπτά. Ο ιοντισμός και η θραυσματοποίηση των ουσιών πραγματοποιήθηκε με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (Electron Impact). Οι συνθήκες ηλεκτρονικού ιονισμού ήταν: Ενέργεια ιονισμού 70eV, θερμοκρασία της πηγής των ιόντων 250 °C. Η γραμμή μεταφοράς του δείγματος στον ανιχνευτή διατηρήθηκε σταθερή στους 280 °C. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε πλήρης σάρωση (full scan mode) με εύρος μαζών από 50 έως 700 και τεχνική παρακολούθησης μεμονωμένων ιόντων (λειτουργία SIM). Τα δεδομένα επεξεργάστηκαν με το λογισμικό πρόγραμμα Chemstation της Agilent, το οποίο συνοδευόταν από τη βιβλιοθήκη φασμάτων NIST MS Search V2.0. Η ταυτοποίηση των συστατικών μέσω του φάσματος μαζών τους έγινε με

Βάση τα δομικά χαρακτηριστικά τους, με τη βοήθεια της ηλεκτρονικής βιβλιοθήκης NIST και βιβλιογραφικών δεδομένων.

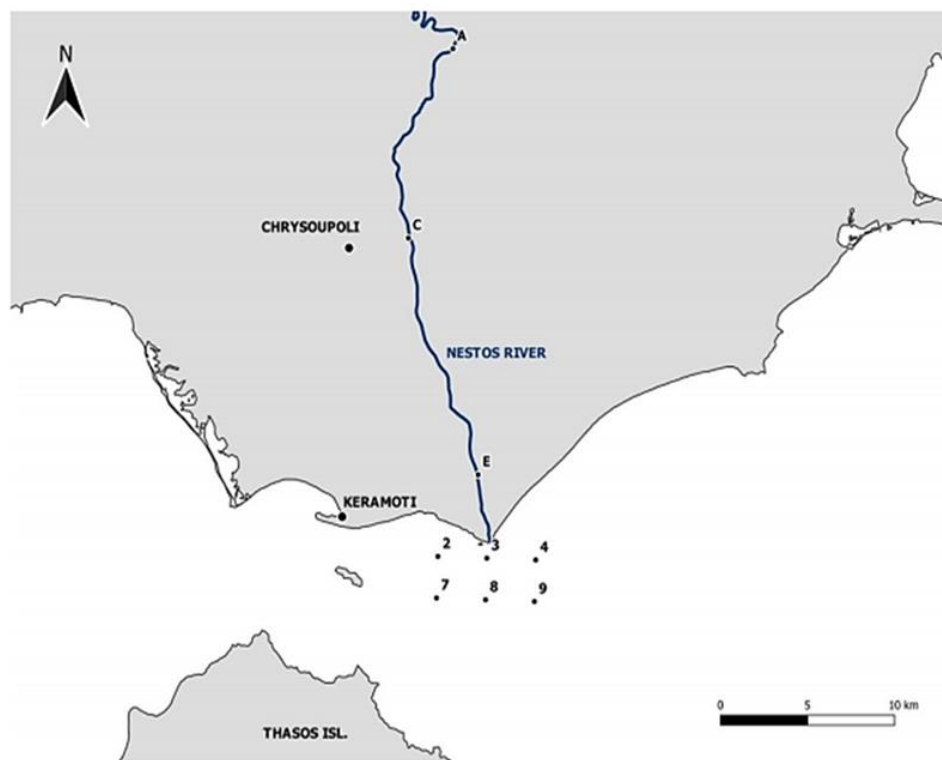


Εικ. 3.12. Αέριος χρωματογράφος Agilent 6890N με φασματογράφο μάζας 5975B

3.5. Αποτελέσματα και συζήτηση

3.5.1. Περιοχή μελέτης (study area)

Η περιοχή μελέτης της συγκεκριμένης εργασίας για έλεγχο τυχόν ρύπανσης από πετρελαιοειδή περιλαμβάνει τον ποταμό Νέστο και την ευρύτερη περιοχή του στη Βόρεια Ελλάδα (Εικ. 3.13.). Ο ποταμός Νέστος είναι ένας από τους πέντε μεγαλύτερους ποταμούς στην Ελλάδα και αποτελεί τα φυσικό σύνορο μεταξύ Μακεδονίας και Θράκης. Πηγάζει από το βουνό Rila της Βουλγαρίας, με συνολικό μήκος 234 km από το οποίο τα 135 ανήκουν σε ελληνική γη. Καθώς ρέει στο Αιγαίο Πέλαγος, ο Νέστος σχηματίζει το δέλτα (delta) του που θεωρείται ως θαύμα της φύσης καθώς φιλοξενεί μια τεράστια ποικιλία ζώων, ειδών χλωρίδας και πανίδας και προστατεύεται από τη Σύμβαση RAMSAR [64].



Εικ. 3.13. Χάρτης της περιοχής μελέτης που δείχνει τις θέσεις από τις οποίες ελήφθησαν τα δείγματα κατά μήκος του ποταμού από την περιοχή του δέλτα και από τη θάλασσα

3.5.2. Χρήση των βιοδεικτών στη συσχέτιση πετρελαιοειδών ρύπων

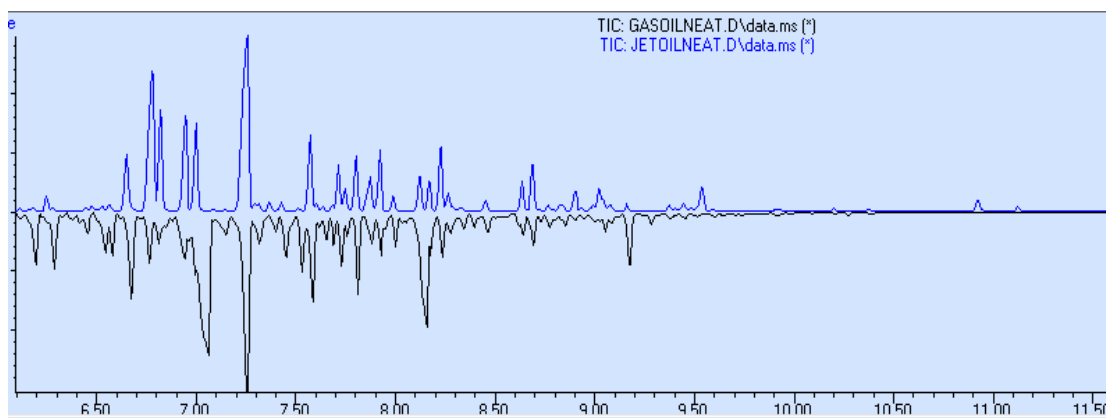
Η ταυτοποίηση των πετρελαϊκών υδρογονανθράκων καθώς και οι διαφοροποιήσεις μεταξύ του αργού πετρελαίου από τον Πρίνο και των διαφόρων προϊόντων πετρελαίου στηρίχτηκαν στα συνολικά χρωματογραφήματα ιόντων (total ion chromatographs-TIC) και σε επιλεγμένα χρωματογραφήματα ιόντων (extracted ion chromatographs-EIC) των εμβολιασμένων (spiked) δειγμάτων νερού και χώματος.

Στη μελέτη της συσχέτισης των δειγμάτων μεταξύ τους χρησιμοποιήθηκαν:

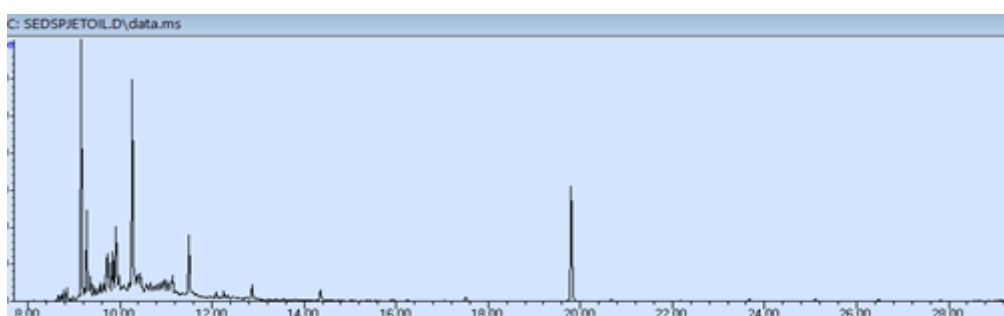
- i. Το σχήμα των χρωματογραφημάτων που αντιστοιχεί στις κορυφές των n-αλκανίων στα χρωματογραφήματα.
- ii. Η αναλογία μεταξύ n-αλκανίων με περιττό και ζυγό αριθμό ατόμων άνθρακα.
- iii. Ο λόγος μεταξύ φυτανίου και πριστανίου.
- iv. Η παρουσία μητρικών και αλκυλιωμένων ΠΑΥς.
- v. Η παρουσία αλκυλο-υποκατεστημένων και μη υποκατεστημένων αρωματικών υδρογονανθράκων.
- vi. Η παρουσία ετεροκυκλικών αρωματικών ενώσεων θείου.

Η ανάλυση των χρωματογραφημάτων TIC τόσο του δείγματος αργού πετρελαίου της λεκάνης Πρίνου-Καβάλας όσο και των δειγμάτων προϊόντων πετρελαίου υποδεικνύει ότι

τα κύρια συστατικά σε όλα τα δείγματα είναι τα κανονικά αλκάνια. Μεταξύ όμως των δειγμάτων παρατηρούνται σημαντικές διαφοροποιήσεις τόσο ποιοτικές όσο και ποσοτικές. Για παράδειγμα, στο χρωματογράφημα του δείγματος βενζίνης και αεροπορικής βενζίνης εμφανίζονται κορυφές μόνο εντός του παραθύρου C9-C13 των n-αλκανίων (Εικ. 3.14.). Γενικά, η ταυτοποίηση των βενζινών στο περιβάλλον είναι δύσκολη, καθώς οι πτητικοί υδρογονάνθρακες εξατμίζονται γρήγορα. Τα χρωματογραφήματα των βενζινών των εμβολιασμένων δειγμάτων μετά από τρεις ημέρες παραμονής σε θερμοκρασία περιβάλλοντος έδειξαν σημαντικές διαφοροποιήσεις σε σχέση με τα αρχικά δείγματα και εξατμισμό των περισσότερων συστατικών. (Εικ. 3.15.). Συνήθως, η ταυτοποίηση των βενζινών στηρίζεται στην ανίχνευση χαρακτηριστικών ενώσεων, που χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα, όπως μεθυλοτριτοταγής βουτυλαιθέρας (MTBE).



Εικ. 3.14. Σύγκριση GC-MS TIC χρωματογραφημάτων βενζίνης και αεροπορικής



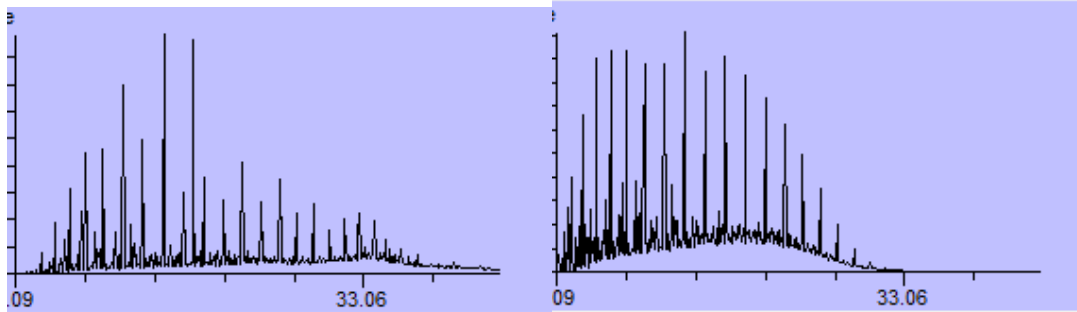
Εικ. 3.15. GC-MS TIC χρωματογράφημα εμβολιασμένου δείγματος χώματος με αεροπορική βενζίνη μετά από παραμονή τριών ημερών

Τα n-αλκάνια των δειγμάτων των καυσίμων diesel κατανέμονται σε μια περιοχή ατόμων άνθρακα από C10 έως C29, σε αντίθεση με το δείγμα του αργού πετρελαίου όπου κυμαίνονται από C8 έως C40. Οι υδρογονάνθρακες χαμηλού μοριακού βάρους

εξατμίστηκαν υπό τις επικρατούσες πειραματικές συνθήκες (Εικ.3.16.). Επίσης, υποδεικνύεται ότι τα δείγματα βενζινών περιέχουν υψηλότερες ποσότητες κυκλοαλκανίων και αρωματικών ενώσεων (EIC m/z 105), σε σύγκριση με τα δείγματα diesel (Εικ. 3.17.).

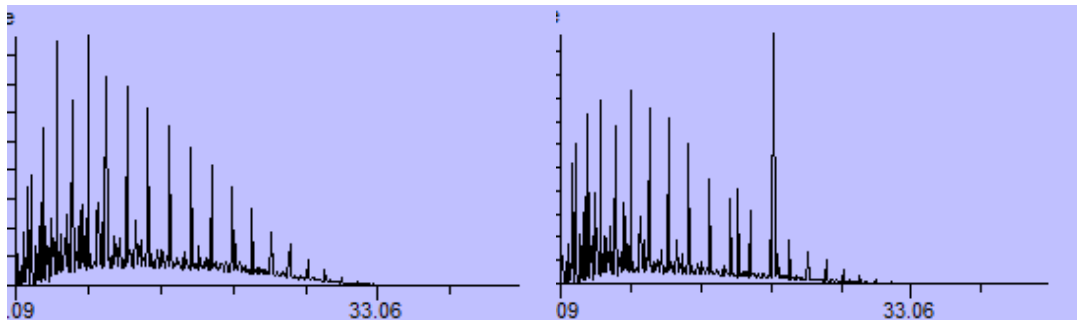
(a) Crude oil

(b) Heating oil



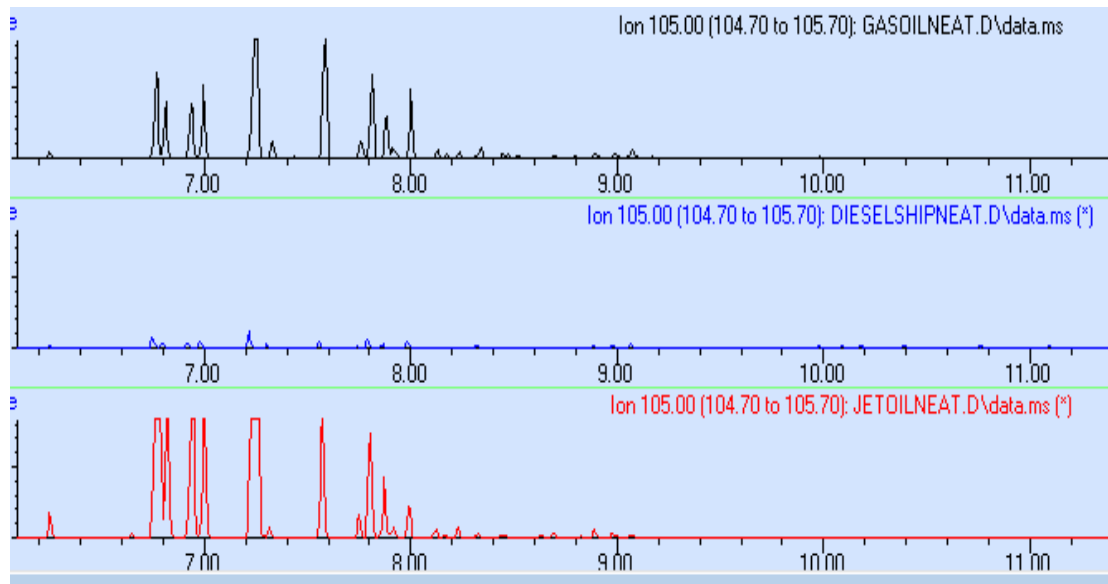
(c) Marine Diesel Oil (MDO)

(d) Motor oil



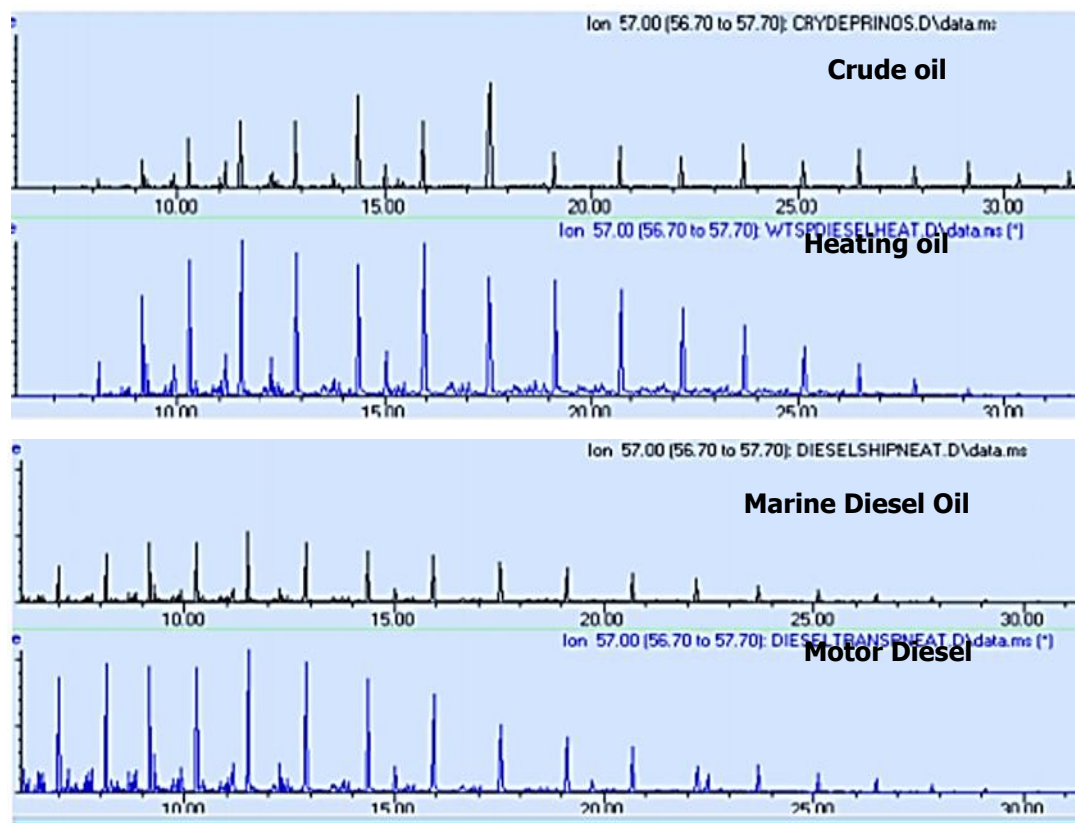
Εικ. 3.16. GC-MS χρωματογραφήματα TIC των δειγμάτων αργού πετρελαίου και προϊόντων πετρελαίου

Στο χρωματογράφημα στο διαγνωστικό ιόν m/z 57 του δείγματος Πρίνου-Καβάλας παρατηρούνται υψηλές συγκεντρώσεις στα κανονικά αλκάνια C16-C17 και υπεροχή των ενώσεων με άρτιο αριθμό ατόμων άνθρακα στην περιοχή C19-C32, το οποίο υποδεικνύει περιβάλλον υψηλής αλατότητας (hypersaline). Επιπλέον, οι σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις των κανονικών αλκανίων στην περιοχή C21-C35 είναι μια πρόσθετη ένδειξη της θαλάσσιας προέλευσής του.



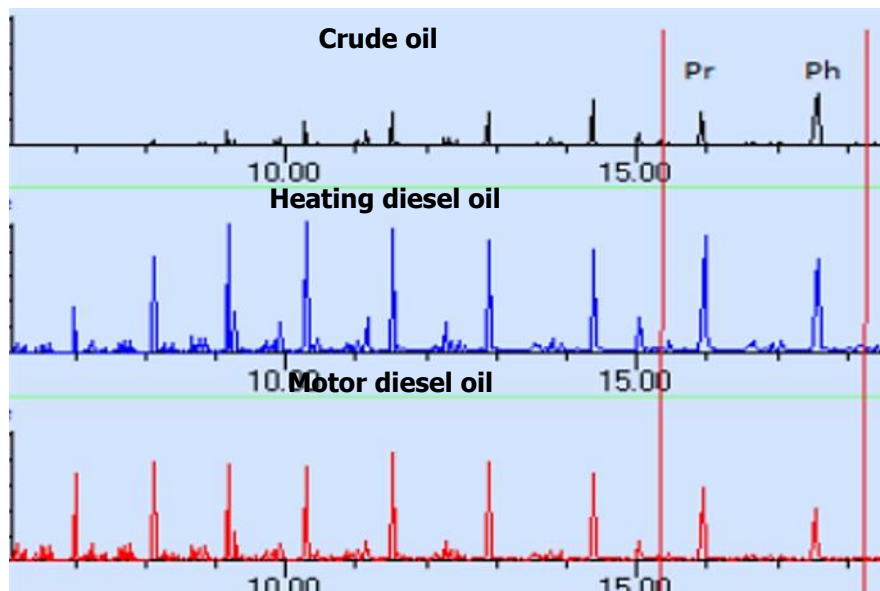
Εικ. 3.17. GC-MS Χρωματογραφήματα EIC m/z 105 δειγμάτων βενζινών και diesel

Ο δείκτης CPI υπολογίζεται για το ίδιο δείγμα με τιμή 0.84, που υποδεικνύει επίσης την προέλευση από θαλάσσια φυτά και ιζήματα σε μεγάλα βάθη. Στα αντίστοιχα χρωματογραφήματα των δειγμάτων των προϊόντων πετρελαίου δεν παρατηρήθηκε κάποια υπεροχή σε άρτιο ή περιττό αριθμό ατόμων C (Εικ. 3.18.).



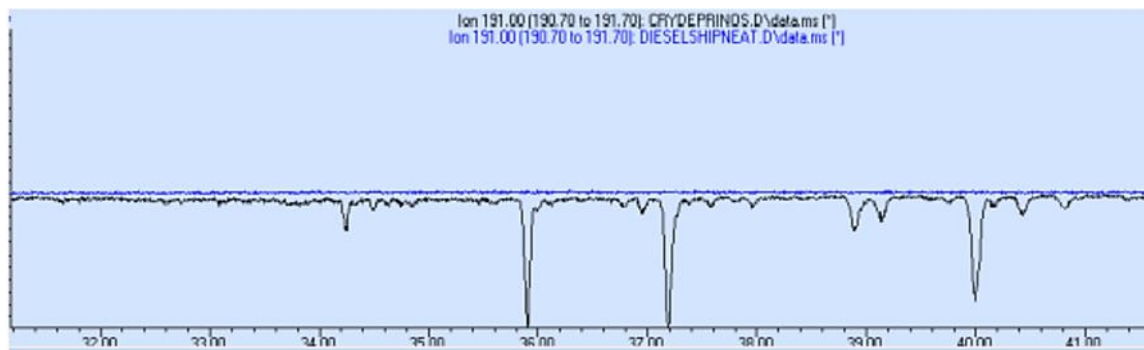
Εικ. 3.18. Σύγκριση EIC m/z 57 για τα δείγματα αργού πετρελαίου και ντίζελ

Επιπλέον, στο δείγμα του αργού πετρελαίου το φυτάνιο υπερισχύει έναντι του πριστανίου και μάλιστα αποτελεί και την πιο έντονη κορυφή σε ολόκληρο το χρωματογράφημα. Αντίθετα, η αναλογία Pr/Ph είναι μεγαλύτερη από 1,0 στην περίπτωση των προϊόντων πετρελαίου (Εικ. 3.19.)

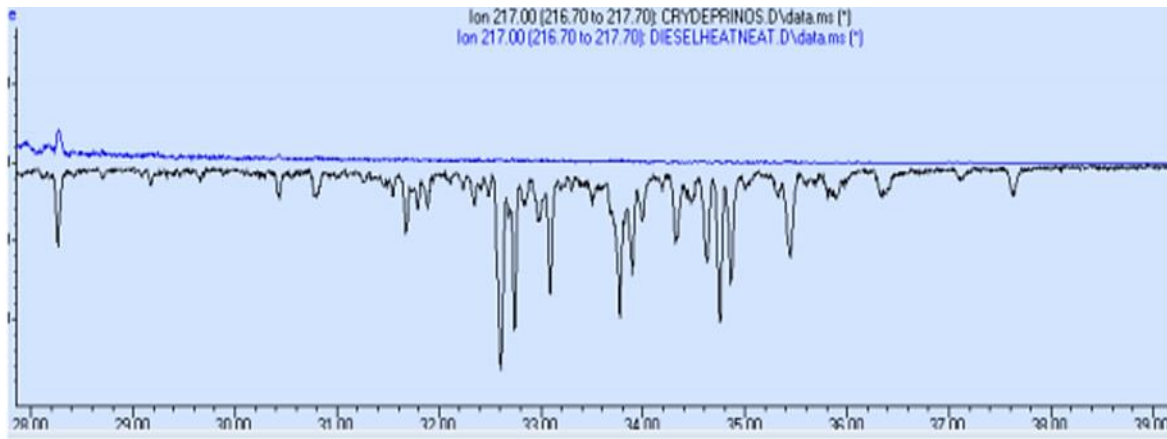


Εικ. 3.19. Σύγκριση μεταξύ του δείγματος αργού πετρελαίου και των προϊόντων πετρελαίου με βάση τον λόγο Pr/Ph.

Για τους συσχετισμούς μεταξύ του αργού πετρελαίου και των διαφόρων προϊόντων, τα χρωματογραφήματα στα διαγνωστικά ιόντα m/z 191 και m/z 217 θεωρήθηκαν ιδιαίτερα χρήσιμα. Το m/z 191 είναι ένα πολύ χαρακτηριστικό θραύσμα ιόντων της οικογένειας τερπανίων, ενώ το m/z 217 είναι χαρακτηριστικό θραύσμα για την οικογένεια στερανίων. Τα χρωματογραφήματα των βιοδεικτών σε m/z 191 (Εικ. 3.20.) και 217 (Εικ. 3.21.) αποδεικνύουν ότι δεν ανιχνεύθηκαν καθόλου τερπάνια και στεράνια στα δείγματα των προϊόντων πετρελαίου.



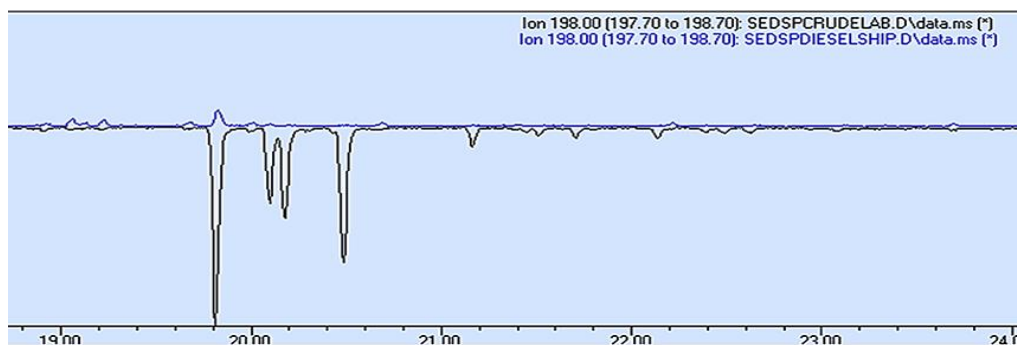
Εικ. 3.20. Σύγκριση EIC σε m/z 191 μεταξύ του δείγματος αργού πετρελαίου και του πετρελαίου ναυτιλίας



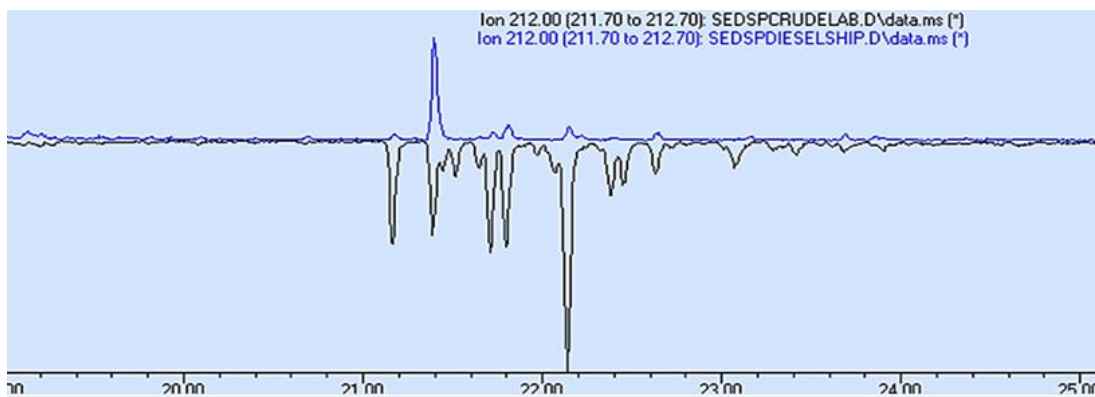
Εικ. 3.21. Σύγκριση EIC σε m/z 217 μεταξύ του δείγματος του αργού πετρελαίου και του πετρελαίου θέρμανσης

Το κύριο χαρακτηριστικό που εντοπίζεται στο χρωματογράφημα του α. πετρελαίου του Πρίνου είναι η παρουσία του γαμμακερανίου (*gamma*cerane) σε ιδιαίτερα υψηλή συγκέντρωση, το οποίο θεωρείται ως ενδεικτικό περιβάλλοντος γένεσης πετρελαίου με υψηλή αλατότητα.

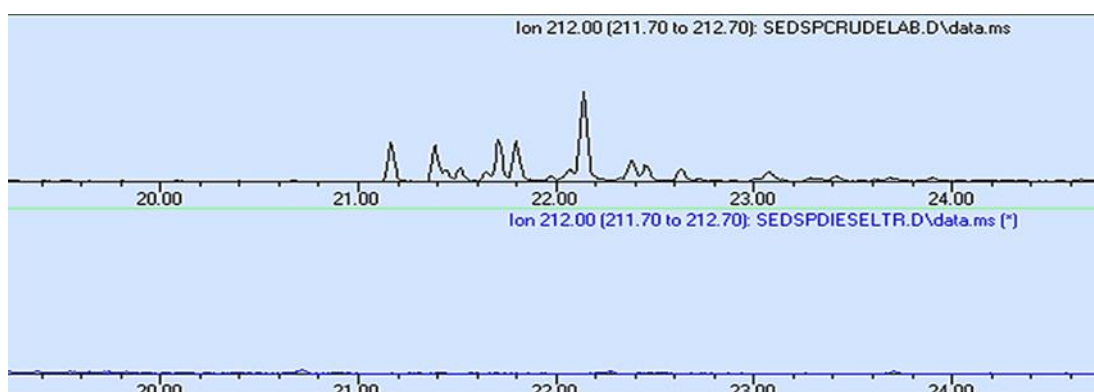
Οι διαφοροποιήσεις στα αλκυλιωμένα διβενζοθειοφαίνια (alkylated DBT) μεταξύ δείγματος αργού πετρελαίου και των καυσίμων ντίζελ εντοπίστηκαν επίσης και σε m/z 198 το οποίο είναι ενδεικτικό των ενώσεων των μεθυλο-διβενζοθειοφαινών (methyl-DBT) (Εικ. 3.22.), και σε m/z 212, που αποτελεί χαρακτηριστικό ιόν των διμεθυλο-διβενζοθειοφαινών (dimethyl-DBT) (Εικ. 3.23.). Στην περίπτωση του πετρελαίου κίνησης δεν ανιχνεύθηκαν καθόλου διμεθυλο-διβενζοθειοφαίνια (Εικ. 3.24.).



Εικ. 3.22. Σύγκριση EIC (m/z 198) μεταξύ του δείγματος αργού πετρελαίου και του πετρελαίου ναυτιλίας



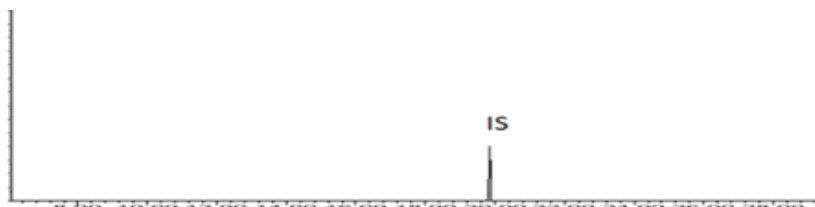
Εικ. 3.23. Σύγκριση EIC (m/z 212) μεταξύ του δείγματος αργού πετρελαίου και του πετρελαίου ναυτιλίας



Εικ. 3.24. Σύγκριση EIC (m/z 212) μεταξύ του δείγματος αργού πετρελαίου και πετρελαίου κίνησης

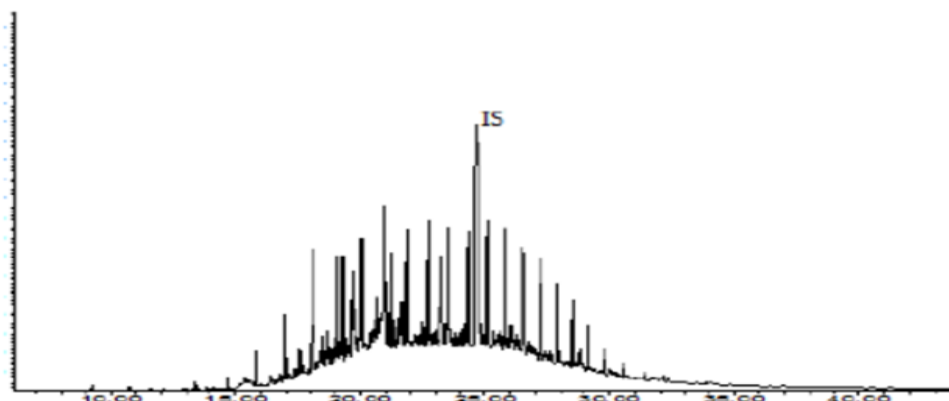
3.5.3. Ανάλυση υδατικών δειγμάτων και ιζημάτων

Η ανάλυση των χρωματογραφημάτων TIC των δειγμάτων νερού και χώματος από την περιοχή μελέτης ξεκάθαρα απέδειξε ότι δεν ανιχνεύθηκε καθόλου οργανική ρύπανση, ούτε στα δείγματα του νερού του ποταμού, ούτε στο θαλασσινό νερό ούτε στα δείγματα χώματος (Εικ. 3.25.).

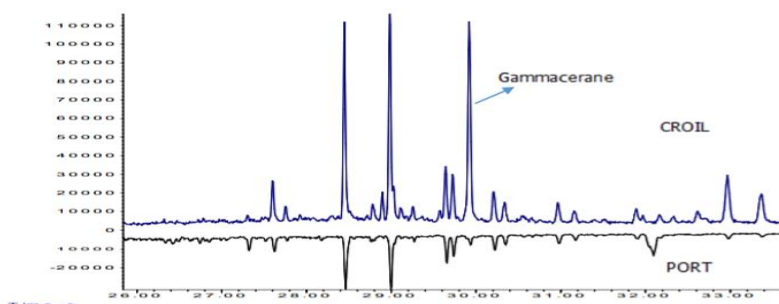


Εικ. 3.25. Χρωματογράφημα TIC υδατικού δείγματος από την περιοχή μελέτης (IS: surrogate) που αποδεικνύει την απουσία ρύπανσης από υδρογονάνθρακες πετρελαίου. Αντίθετα σε προηγούμενη μελέτη μας, υδρογονάνθρακες εντοπίστηκαν σε δείγματα από το λιμάνι της πόλης της Καβάλας (Εικ. 3.26.). Η σύγκριση του EIC στο m/z 191 έδειξε

ότι δεν υπάρχει καμία συσχέτιση με το αργό πετρέλαιο από τον Πρίνο, στο οποίο ανιχνεύεται χαρακτηριστικά το χοπάνιο γαμμακεράνιο (Εικ. 3.24.).



Εικ. 3.26. TIC του δείγματος από το λιμάνι της Καβάλας



Εικ. 3.27. Σύγκριση EIC (m/z 191) μεταξύ του αργού πετρελαίου από τον Πρίνο και του δείγματος από το λιμάνι της Καβάλας

Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων από τα εμβολιασμένα δείγματα (spiked samples) της παρούσας μελέτης, έδωσαν χρήσιμες πληροφορίες για τη δυνατότητα χρήσης της σύστασης των βιοδεικτών και της τεχνικής fingerprinting στη διαφοροποίηση των ρύπων από πετρελαιοειδή και στη διερεύνηση της προέλευσής τους. Η ταυτοποίηση του χημικού αποτυπώματος του πετρελαίου (oil fingerprinting) με την τεχνική GC-MS είναι πολύ σημαντική για την παρακολούθηση της μόλυνσης, την εκτίμηση της ζημιάς και την εύρεση κατάλληλου τρόπου αντιμετώπισης.

Ο ποταμός Νέστος είναι ένας από τους σημαντικότερους ποταμούς της Ελλάδας με μεγάλη οικονομική και οικολογική σημασία. Στην παρούσα εργασία έγινε η ανάλυση με την τεχνική GC-MS ενός δείγματος αργού πετρελαίου από τον Πρίνο και πέντε δειγμάτων προϊόντων πετρελαίου. Ανιχνεύτηκαν σημαντικές διαφορές στο σχήμα των

χρωματογραφημάτων που αντιστοιχεί στις κορυφές των n-αλκανίων, στον λόγο μεταξύ φυτανίου και πριστανίου, στην παρουσία αρωματικών υδρογονανθράκων, στην παρουσία χαρακτηριστικών βιοδεικτών, όπως στερανίων και χοπανίων και στην παρουσία ετεροκυκλικών αρωματικών ενώσεων θείου.

Παρόλο που η εταιρεία πετρελαίου που δραστηριοποιείται στην πόλη της Καβάλας θεωρείται ως βασικός ύποπτος για τυχόν οργανική ρύπανση, εντούτοις η ανάλυση με GC-MS τόσο στα δείγματα νερού αλλά και ιζήματος απέδειξε ότι δεν υπάρχει καμία οργανική ρύπανση στην ευρύτερη περιοχή του ποταμού. Τέλος, προηγούμενη μελέτη έδειξε ότι οι υδρογονάνθρακες που βρέθηκαν παλαιότερα στο λιμάνι της Καβάλας δεν είχαν καμία σχέση με το αργό πετρέλαιο που παράγεται στον Πρίνο.

Αναφορές

1. Ettre, L.S.: M.S. Tswett and the invention of chromatography. LC-GC North America. 21, 458-467 (2003)
2. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). Online version (2019-) created by S. J. Chalk. ISBN 0-9678550-9-8. <https://doi.org/10.1351/goldbook>
3. Stauffer, E., Dolan, J.A., Newman, R.: CHAPTER 8 - Gas Chromatography and Gas Chromatography—Mass Spectrometry. In: Stauffer, E., Dolan, J.A., and Newman, R. (eds.) Fire Debris Analysis. pp. 235-293. Academic Press, Burlington (2008)
4. Coskun, O.: Separation Techniques: CHROMATOGRAPHY. North Clin Istanbul. (2016). <https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757>
5. Meyer, V.R.: CHROMATOGRAPHY | Overview. In: Worsfold, P., Townshend, A., and Poole, C. (eds.) Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition). pp. 89-98. Elsevier, Oxford (2005)
6. Ismail, B., Nielsen, S.S.: Basic Principles of Chromatography. In: Nielsen, S.S. (ed.) Food Analysis. pp. 473-498. Springer US, Boston, MA (2010)
7. Stauffer, E., Dolan, J.A., Newman, R.: CHAPTER 8 - Gas Chromatography and Gas Chromatography—Mass Spectrometry. In: Stauffer, E., Dolan, J.A., and Newman, R. (eds.) Fire Debris Analysis. pp. 235-293. Academic Press, Burlington (2008)
8. Beens, J.: The role of gas chromatography in compositional analyses in the petroleum industry. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 19, 260-275 (2000). [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(99\)00205-8](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(99)00205-8)
9. Blomberg, J., Schoenmakers, P.J., Brinkman, U.A.T.: Gas chromatographic methods for oil analysis. J. Chromatogr. A. 37 (2002)
10. Camin, D.L., Raymond, A.J., Research, S.: Chromatography in the Petroleum Industry. JOURNAL OF CHROMATOGRAPHIC SCIENCE. 11, 14

11. Forgács, E., Cserhádi, T.: CHROMATOGRAPHY | Principles. In: Caballero, B. (ed.) Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition). pp. 1259-1267. Academic Press, Oxford (2003)
12. Etxebarria, N., Zuloaga, O., Olivares, M., Bartolomé, L.J., Navarro, P.: Retention-time locked methods in gas chromatography. *J. Chromatogr. A.* 7
13. Parris, N.A. ed: Chapter 2 Basic principles and terminology. In: *Journal of Chromatography Library*. pp. 7-18. Elsevier (1976)
14. k' - Retention or Capacity Factor. (2020, June 9). Retrieved May 25, 2021, from <https://chem.libretexts.org/@go/page/71827>
15. Guiochon, G., Guillemin, C.L. eds: Chapter 10 Methodology Detectors for Gas Chromatography. In: *Journal of Chromatography Library*. pp. 393-480. Elsevier (1988)
16. Pardue, H.L., Thiers, R.E., Ulrich, W.F.: *Gas Chromatography Detectors*. 9
17. Wang, Z., Fingas, M., Yang, C., Christensen, J.H.: Crude Oil and Refined Product Fingerprinting: Principles. In: *Environmental Forensics*. pp. 339-407. Elsevier (1964)
18. Yang, C., Brown, C.E., Hollebone, B., Yang, Z., Lambert, P., Fieldhouse, B., Landriault, M., Wang, Z.: Chemical Fingerprints of Crude Oils and Petroleum Products. In: *Oil Spill Science and Technology*. pp. 209-304. Elsevier (2017)
19. Nielsen, S.S.: 26.3 Interpretation of Mass Spectra 462 26.4 Gas Chromatography-Mass Spectrometry 464 26.5 Liquid Chromatography-Mass Spectrometry 465 26.5.1 Electrospray Interface 466. *Mass Spectrometry*. 14
20. Niyonsaba, E., Manheim, J.M., Yerabolu, R., Kenttämaa, H.I.: Recent Advances in Petroleum Analysis by Mass Spectrometry. *Anal.Chem.* 91, 156-177 (2019). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05258>
21. Par, J.R.J., Yaylayan, V.: *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. . *Mass Spectrometry*. 28
22. Panda, S.K., Andersson, J.T., Schrader, W.: Mass-spectrometric analysis of complex volatile and nonvolatile crude oil components: a challenge. *Anal Bioanal Chem.* 389, 1329-1339 (2007). <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1583-6>
23. Borisov, R.S., Kulikova, L.N., Zaikin, V.G.: Mass Spectrometry in Petroleum Chemistry (Petroleomics) (Review). *Pet. Chem.* 59, 1055-1076 (2019). <https://doi.org/10.1134/S0965544119100025>
24. Kitson, F.G., Larsen, B.S., McEwen, C.N.: Chapter 1 - What Is GC/MS? In: Kitson, F.G., Larsen, B.S., and McEwen, C.N. (eds.) *Gas Chromatography and Mass Spectrometry*. pp. 3-23. Academic Press, San Diego (1996)
25. D. J. Harvey, *GAS CHROMATOGRAPHY/Mass Spectrometry, MASS SPECTROMETRY*, p 106, University of Oxford, Oxford, UK, Elsevier (2005)
26. Wu, S., Lyu, G., Lou, R.: Applications of Chromatography Hyphenated Techniques in the Field of Lignin Pyrolysis. Presented at the March 7 (2012)
27. Wang, Z., Yang, C., Yang, Z., Brown, C., Hollebone, B., Stout, S.: Petroleum biomarker fingerprinting for oil spill characterization and source identification. Presented at the December 31 (2016)
28. Clench, M.R., Tetler, L.W.: *Detectors: Mass Spectrometry*. 8

29. Sleeman, R., Carter, J.F.: Mass spectrometry: selected ion monitoring. In: Encyclopedia of Analytical Science. pp. 423-429 (2005)
30. J. H. Christensen, G. Tomasi, and A. B. Hansen, "Chemical Fingerprinting of Petroleum Biomarkers Using Time Warping and PCA," Environmental Science & Technology, vol. 39, no. 1, pp. 255-260, 2005/01/01 (2004)
31. Boehm, P.D., Douglas, G.S., Burns, W.A., Mankiewicz, P.J., Page, D.S., Bence, A.E.: Application of petroleum hydrocarbon chemical fingerprinting and allocation techniques after the Exxon Valdez oil spill. Marine Pollution Bulletin.34, 599-613 (1997). [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(97\)00051-9](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(97)00051-9)
32. D. Broman, A. Colmsjö, B. Ganning et al., "'Fingerprinting' petroleum hydrocarbons in bottom sediment, plankton, and sediment trap collected seston," Marine Pollution Bulletin, vol. 18, no. 7, pp. 380-388, 7//, (1987)
33. Meyer, B.M.: Quantitative Oil Source-Fingerprinting Techniques and Their Application to Differentiating Crude Oil in Coastal Marsh Sediments. 192
34. Wang, Z., Fingas, M., Yang, C., Christensen, J.H.: Crude Oil and Refined Product Fingerprinting: Principles. In: Environmental Forensics. pp. 339-407. Elsevier (1964)
35. He, M., Moldowan, M.J., Peters, K.E.: Biomarkers: Petroleum. In: Bobrowsky, P. and Marker, B. (eds.) Encyclopedia of Engineering Geology. pp. 1-13. Springer International Publishing, Cham (2018)
36. Peters KE, Moldowan JM, The biomarker guide interpreting molecular fossils in petroleum and ancient sediments. Prentice Hall, Englewood Cliffs, 363pp (1993)
37. Yasser M. Moustafa: Biomarkers. In: Rania E. Morsi ED1 - SasikumarDhanarasu (ed.) Chromatography and Its Applications. p. Ch. 9. IntechOpen, Rijeka (2012)
38. Meyer, B.M., Overton, E.B., Turner, R.E.: Oil Source Identification Using Diagnostic Biomarker Ratio Analyses. International Oil Spill Conference Proceedings.2014, 2064-2073 (2014). <https://doi.org/10.7901/2169-3358-2014.1.2064>
39. Hsu, C.S., Walters, C.C., Isaksen, G.H., Schaps, M.E., Peters, K.E.: Biomarker Analysis in Petroleum Exploration. In: Hsu, C.S. (ed.) Analytical Advances for Hydrocarbon Research. pp. 223-245. Springer US, Boston, MA (2003)
40. Wang, Z., Stout, S.A., Fingas, M.: Forensic Fingerprinting of Biomarkers for Oil Spill Characterization and Source Identification. 43
41. A. Shahzad, Identification of potential hydrocarbon source rocks using biological markers in Kohat plateau, North Pakistan, Geology, University of Peshawar, Peshawar (2006)
42. J. E. Cortes, J. M. Rincon, J. M. Jaramillo et al., Biomarkers and compound-specific stable carbon isotope of n-alkanes in crude oils from Eastern Llanos Basin, Colombia, Journal of South American Earth Sciences, vol. 29, no. 2, pp. 198-213, 3// (2010)
43. Eglinton, G., Calvin, M.: CHEMICAL FOSSILS. Scientific American. 216, 32-43 (1967)
44. Gonzalez-Vila, F.J.: ALKANE BIOMARKERS. GEOCHEMICAL SIGNIFICANCE AND APPLICATION IN OIL SHALE GEOCHEMISTRY. 18
45. Brocks, J.J.: Sedimentary Hydrocarbons, Biomarkers for Early Life. 43

46. Alimi, H., Ertel, T., Schug, B.: Fingerprinting of Hydrocarbon Fuel Contaminants: Literature Review. *Environmental Forensics*.4, 25-38 (2003). <https://doi.org/10.1080/15275920303489>
47. Volkman, J.: Biological marker compounds as indicators of the depositional environments of petroleum source rocks. *Geological Society of London Special Publications*.40, 103-122 (1988). <https://doi.org/10.1144/GSL.SP.1988.040.01.10>
48. Waples and Tuttle, D.: Application of sterane and triterpane biomarkers in petroleum exploration. 24
49. IbadMahmoodi, S.M., Bhattacharya, S.K.: Reliability of 18 α (H)-Oleanane Biomarker as Age Indicator of Source Deposition. *JGS Vol.1 No.1.1*, (2013). https://doi.org/10.5176/2335-6774_1.1.6
50. Hunt, J. Meacham.: *Petroleum geochemistry and geology*. W.H. Freeman, New York (1996)
51. Connan, J.; Bouroullec, J.; Dessort, D. & Albrecht, P., The microbial input in carbonate-anhydrite facies of sabkhalaeo-environment from Guatemala, A molecular approach. In: *advances in organic geochemistry 1985*. org. geochem., Vol. 10, 29-50 (1986)
52. Edema, N.: Effects of Crude Oil Contaminated Water on the Environment. In: Abdul-Raouf, M.E.-S. (ed.) *Crude Oil Emulsions- Composition Stability and Characterization*. InTech (2012)
53. Fine, P., Graber, E.R., Yaron, B.: Soil interactions with petroleum hydrocarbons: Abiotic processes. *Soil Technology*.10, 133-153 (1997). [https://doi.org/10.1016/S0933-3630\(96\)00088-8](https://doi.org/10.1016/S0933-3630(96)00088-8)
54. Logeshwaran, P., Megharaj, M., Chadalavada, S., Bowman, M., Naidu, R.: Petroleum hydrocarbons (PH) in groundwater aquifers: An overview of environmental fate, toxicity, microbial degradation and risk-based remediation approaches. *Environmental Technology & Innovation*.10, 175-193 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.eti.2018.02.001>
55. Reyes, C.Y., Moreira, ícaro T.A., Oliveira, D.A.F., Medeiros, N.C., Almeida, M., Wandega, F., Soares, S.A.R., Oliveira, O.M.C. de: Weathering of Petroleum Biomarkers: Review in Tropical Marine Environment Impacts. *OALib*.01, 1-13 (2014). <https://doi.org/10.4236/oalib.1101004>
56. Volkman, J. K., Alexander, R., Kagi, R. I., and Woodhouse, G. W., Demethylated hopanes in crude oils and their applications in petroleum geochemistry. *Geochimica Cosmochimica Acta* 47: 785-794 (1983 b)
57. Boehm, P.: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). In: *Environmental Forensics: Contaminant Specific Guide*. pp. 313-337 (2005)
58. Yang, C., Zhang, G., Wang, Z., Yang, Z., Hollebhone, B., Landriault, M., Shah, K., Brown, C.E.: Development of a methodology for accurate quantitation of alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum and oil contaminated environmental samples. *Anal. Methods*.6, 7760-7771 (2014). <https://doi.org/10.1039/C4AY01393J>
59. Li, M., Wang, T.-G., Simoneit, B.R.T., Shi, S., Zhang, L., Yang, F.: Qualitative and quantitative analysis of dibenzothiophene, its methylated homologues, and benzonaphthothiophenes in crude oils, coal, and sediment extracts. *Journal of Chromatography A*. 1233, 126-136 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.01.086>

60. Li, M., Wang, T., Zhong, N., Zhang, W., Sadik, A., Li, H.: Ternary Diagram of Fluorenes, Dibenzothiophenes and Dibenzofurans: Indicating Depositional Environment of Crude Oil Source Rocks. *Energy Exploration & Exploitation*.31, 569-588 (2013). <https://doi.org/10.1260/0144-5987.31.4.569>
61. Engel, M.H., Macko, S.A. eds: *Organic Geochemistry: Principles and Applications*. Springer US, Boston, MA (1993)
62. Wang, Z. D., Fingas, M., Blenkinsopp. S., Sergy, G., Landriault, M., Sigouin, L., and Lambert, P., Study of the 25-years-old Nipisi oil spill: Persistence of oil residues and comparisons between source and subsurface sediments. *Environ. Sci. Technol.* 32:2222-2232. (1998)
63. Wang, Z., Fingas, M.F.: Development of oil hydrocarbon fingerprinting and identification techniques. *Marine Pollution Bulletin*.47, 423-452 (2003). [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(03\)00215-7](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(03)00215-7)
64. Papastergios, G., Fernández-Turiel, J.-L., Georgakopoulos, A., Gimeno, D.: Natural and anthropogenic effects on the sediment geochemistry of Nestos river, Northern Greece. *EnvironGeol.* 58, 1361-1370 (2009). <https://doi.org/10.1007/s00254-008-1639-8>



The editor of the material:

International Hellenic University, Kavala
Department of Chemistry,
Agios Lucas 65404 Kavala, Greece
Phone: +30 2510 462169
Email: tspanos@chem.ihu.gr
Website: <https://www.ihu.gr>

ISBN 978-618-85036-1-8

Joint Operational Programme Black Sea Basin 2014-2020
International Hellenic University, Kavala, Greece
September, 2021

Joint Operational Programme Black Sea Basin 2014-2020 is co-financed by the European Union through the European Neighbourhood Instrument and by the participating countries: Armenia, Bulgaria, Georgia, Greece, Republic of Moldova, Romania, Turkey and Ukraine. This publication was produced with the financial assistance of the European Union. Its contents are the sole responsibility of *International Hellenic University* and do not necessarily reflect the views of the European Union.