

Spektrometria masowa i analiza izotopowa biomarkerów frakcji nasyconej

Mass spectrometry and isotopes analysis of the saturated fraction biomarkers

Wojciech Bielań, Marek Janiga

Instytut Nafty i Gazu – Państwowy Instytut Badawczy

STRESZCZENIE: Analiza GC-IRMS poszerza i potwierdza (lub nie) interpretację opartą na wynikach z analiz GC-MS. Przykładowo jest bardzo przydatna w określaniu środowiska sedymentacji materii organicznej. Analiza GC-MS biomarkerów i oparte na niej wyniki są wiarygodne, ale dopiero badania GC-IRMS mogą je potwierdzić. W niniejszej pracy próbowano poprzez analizy izotopowe potwierdzić pochodzenie: BNH (28,30-bisnorhopanu) od bakterii chemoautotroficznych, a także wyższych karotenoidów i ich pochodnych od bakterii *Chlorobiaceae* czy *Chromatiaceae*. Przeprowadzono badania biomarkerów na aparacie GC-IRMS oraz EA-IRMS. Otrzymane chromatogramy z analiz IRMS porównywano z archiwalnymi analizami GC-MS dla tych samych próbek w celu identyfikacji poszczególnych związków chemicznych. Oprócz dotychczasowej metodyki przygotowania próbek do analiz zastosowano też niestandardową metodę polegającą na rozdziale n-alkanów od węglowodorów rozgałęzionych. Oznaczono na GC-IRMS powtarzalność metody oraz wartości $\delta^{13}\text{C}$ wybranych biomarkerów z frakcji nasyconej. Stwierdzono, że próbki z małą zawartością biomarkerów nie nadają się do analiz. Z drugiej strony zbyt duże stężenie analitu podanego na chromatograf gazowy powoduje wzrost linii bazowej i gorszy rozdział pików, co również stanowi problem. Wstępnie oznaczono wartości $\delta^{13}\text{C}$ dla biomarkerów frakcji nasyconej z grupy hopenów: bisnorhopanu (BNH), oleananu, C_{29} norhopanu, C_{30} hopanu, moretanu i serii C_{31} – C_{35} homohopenów oraz dla surowych rop naftowych. Stwierdzono względnie niewielkie różnice w wartości $\delta^{13}\text{C}$ pomiędzy BNH a hopenami i BNH a surowymi ropami, co sugeruje najprawdopodobniej to samo źródło pochodzenia wszystkich biomarkerów (w tym BNH). Próbowano również oznaczać biomarkery we frakcji aromatycznej metodą GC-IRMS, co jednak się nie udało. Chcąc w przyszłości przeprowadzać takie oznaczenia, należy najprawdopodobniej zastosować specjalną metodykę przygotowania próbek frakcji aromatycznej.

Słowa kluczowe: spektrometria masowa, analiza izotopowa, biomarkery, hopeny, środowisko sedymentacji materii organicznej.

ABSTRACT: GC-IRMS analysis extends and confirms (or not) the interpretation based on the results of GC-MS analyses. For example, it is very useful in determining the sedimentation environment of organic matter. GC-MS analysis of biomarkers and the results are reliable, but only GC-IRMS studies can confirm it. In this study, the origin of BNH (28,30-bisnorhopane from chemoautotrophic bacteria) and origin of higher carotenoids and their derivatives from *Chlorobiaceae* or *Chromatiaceae* bacteria were confirmed through isotopic analyzes. Biomarkers were analyzed using the GC-IRMS and EA-IRMS apparatus. The obtained chromatograms from the IRMS analyses were compared with the archival GC-MS analyses for the same samples in order to identify individual chemical compounds. In addition to the existing methodology of sample preparation for analyses, a non-standard method was also used, consisting in the separation of n-alkanes from branched hydrocarbons. The repeatability of the method was determined on the GC-IRMS and the values of $\delta^{13}\text{C}$ for selected biomarkers from the saturated fraction were determined. It was found that samples with low biomarker content are not suitable for analysis. On the other hand, too high concentration of the analyte causes an increase of the chromatogram baseline and worse separation of the peaks, which is also a problem. For the crude oils the $\delta^{13}\text{C}$ values were initially determined for the biomarkers of the saturated fraction from the hopanes group: bisnorhopane (BNH), oleanane, C_{29} norhopane, C_{30} hopane, moretane and the C_{31} – C_{35} homohopane series. Relatively small differences in $\delta^{13}\text{C}$ values were found between BNH/hopanes and BNH/crude oils, which suggests the same source of origin for all biomarkers (including BNH). Determining biomarkers in the aromatic fraction using the GC-IRMS method was not successful. In the future, a special methodology for preparing samples for carbon isotopic analyses of aromatic fraction will be required.

Key words: mass spectrometry, isotopes analysis, biomarkers, hopanes, sedimentation environment of organic matter.

Autor do korespondencji: W. Bielań, e-mail: wojciech.bielen@inig.pl

Artykuł nadesłano do Redakcji: 29.01.2021 r. Zatwierdzono do druku: 28.07.2021 r.

Wstęp

Temat związany z oznaczaniem biomarkerów nasyconych i aromatycznych, w tym wyższych karotenoidów, w celu określania głównie warunków sedymentacji, ale też m.in. genetyki czy stopnia dojrzałości termicznej materii organicznej, jest zgłębiany w Zakładzie Geologii i Geochemii w INiG – PIB od kilku lat w ramach prac statutowych czy w projekcie INGA. W tym celu stosowany zakres badań jest rozbudowywany o kolejne badania geochemiczne (GC-MS – chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią masową, GC-IRMS – chromatografia gazowa sprzężona z izotopową spektrometrią masową, EA-IRMS – analiza elementarna sprzężona z izotopową spektrometrią masową) oraz sedymentologiczne.

Wprowadzenie teoretyczne

Biomarkery

Typ biomarkerów występujących w ropach naftowych czy ekstraktach bitumicznych otrzymanych ze skał charakteryzuje i przybliża warunki paleośrodowiska (Matyasik, 2011). Substancja autochtoniczna zazwyczaj jest źródłem informacji na temat warunków panujących w otaczających wodach, natomiast substancja allochtoniczna charakteryzuje najbliższe źródło pochodzenia materii organicznej i typ wód transportujących materiał organiczny (Murray et al., 1997; Obermajer et al., 2000).

Bisnorhopan i aromatyczne karotenoidy

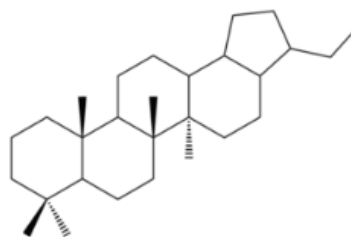
Bisnorhopany to grupa hopenów zubożonych o część grup metylowych (rys. 1 i 3). 28,30-bisnorhopan występuje w postaci trzech epimerów: 17 α , 18 α , 21 β (H); 17 β , 18 α , 21 α (H) i 17 β , 18 α , 21 β (H). Podczas analizy następuje koelucja tych epimerów (Moldowan et al., 1984) (rys. 2).

28,30-bisnorhopan powstaje niezależnie od kerogenu, pochodzi z bituminów (tzw. „niezwiązany” węglowodór). W związku z tym wraz ze wzrostem stopnia dojrzałości termicznej ropy naftowej stężenie 28,30-bisnorhopanu spada. Wysokie stężenie BNH jest charakterystyczne dla materii organicznej deponowanej w warunkach anoksydacyjnych (niskie wartości wskaźnika Pr/Ph). Wskaźnik bisnorhopan/C₃₀ hopen jest użyteczny przy porównywaniu próbek o podobnym stopniu dojrzałości termicznej materii organicznej (Garner, 2019). Zaobserwowano również zmniejszającą się

zawartość bisnorhopanu wraz ze spadkiem zawartości siarki organicznej, co świadczy o tym, że potencjalna dojrzałość termiczna jest czynnikiem wpływającym na zawartość bisnorhopanu (Mackenzie i Maxwell, 1983). Inni (Hughes et al., 1985) wskazywali jednak na przeciwny trend, polegający na tym, że względna zawartość bisnorhopanu wzrastała wraz ze spadkiem zawartości siarki, sugerując, że jego stężenia są prawdopodobnie bardziej kontrolowane przez obecność siarki niż przez dojrzałość termiczną.

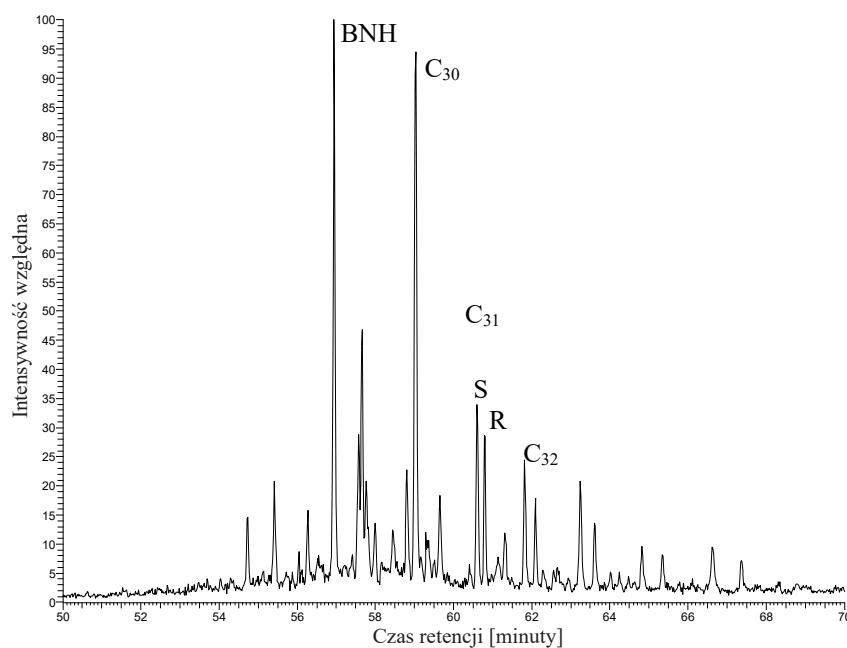
Analiza izotopowa jest użyteczna do określania, czy 28,30-bisnorhopan pochodzi od bakterii chemoautotroficznyczych (Schoell et al., 1992). Potwierdzenie bakteryjnego pochodzenia BNH uszczegóławia określanie środowiska sedymentacji materii organicznej w stosunku do samego stwierdzenia obecności BNH przy użyciu GC-MS (Matyasik i Bieleń, 2013).

Wartości $\delta^{13}\text{C}$ izomerów bisnorhopanu dla niedojrzałych rop naftowych są niższe o 8–9‰ niż dla surowej ropy i o 6–8‰ niższe niż dla hopenów. Takie wyniki sugerują, że prekursor bisnorhopanu zajmował specyficzną i inną niszę ekologiczną w porównaniu



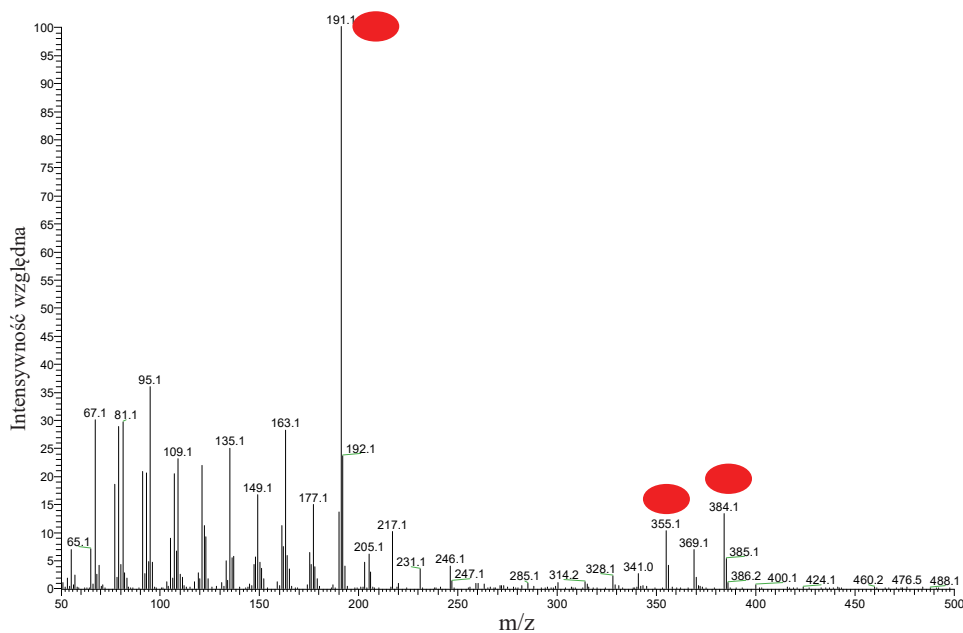
Rys. 1. Wzór strukturalny 28,30-bisnorhopanu

Fig. 1. Structural formula of 28,30-bisnorhopane



Rys. 2. Skład hopenów (m/z 191) we frakcji nasyconej ekstraktu bitumicznego – próbka Krosno-8; BNH – 17 α 21 β (H)-28,30-bisnorhopan, C₃₀ – hopen, C₃₁(S) – homohopan, C₃₁(R) – homohopan

Fig. 2. Composition of hopanes (m/z 191) in the saturated fraction of bituminous extract – Krosno-8 sample



Rys. 3. Spektrogram przedstawiający widmo masowe 17α 21β(H)-28,30-bisnorhopanu (m/z macierzysty 384, m/z potomny 191) – próbka Krosno-8

Fig. 3. Spectrogram showing the mass spectrum of 17α 21β (H)-28,30-bisnorhopane (parent m/z = 384, daughter m/z = 191) – Krosno-8 sample

z organizmami syntetyzującymi hopany. Zubożenie $\delta^{13}\text{C}$ w bisnorhopanie wymaga biosyntezy przez organizm, który wykorzystuje substraty zubożone w $\delta^{13}\text{C}$, a mianowicie bakterie chemoautotroficzne (nitryfikacyjne i/lub utleniające siarkę) (Peters et al., 2005; Garner, 2019). Obecność BNH w ropach naftowych wskazuje na anoksyczne i ubogie w minerały ilaste warunki depozycji skały macierzystej, mimo to brak BNH nie wyklucza sedimentacji w takich warunkach (Peters et al., 2005).

W podobny sposób można wykorzystywać badania izotopowe frakcji aromatycznej. Aromatyczne związki karotenoidowe i ich pochodne, takie jak arylowe izoprenoidy, uszczegółwiają warunki środowiska sedimentacji materii organicznej (m.in. obecność anoksji w strefie fotycznej, wody euksyniczne, głębokość chemokliny w kolumnie wody itp. (Drozd i Bieleń, 2020)). Same badania GC-MS jednak nie dają wystarczających podstaw do wyciągania wniosków ze względu na brak możliwości potwierdzenia bakteryjnego pochodzenia arylowych izoprenoidów. Wyniki badań izotopowych są bardzo pomocne w tej kwestii. Arylowe izoprenoidy są wzbogacone w izotop ^{13}C w stosunku do całej frakcji nasyconej (Holman i Grice, 2018).

Metodyka badań

Przygotowanie próbek (ekstrakcja bituminów ESO, rozdział grupowy SARA) i analizę geochemiczną GC-MS biomarkerów przeprowadzono według metodyki opisywanej w pracach Bielenia (2019) i Wencel (2020).

Rozdział n-alkanów od węglowodorów rozgałęzionych i cyklicznych zawartych we frakcji nasyconej

Poniższa metodyka została opracowana na podstawie literatury dotyczącej rozdziału n-alkanów od rozgałęzionych węglowodorów nasyconych (Flanigen et al., 1978; Hoering i Freeman, 1984; West et al., 1990; Hird et al., 1992; Köster et al., 1998; Bieleń i Matyasik, 2014) oraz konsultacjach (M. Rospondek). Proces rozdzielania n-alkanów od alkanów rozgałęzionych prowadzono w kolumnach szklanych o pojemności 15–20 ml z wykorzystaniem adsorbentu w postaci sit molekularnych UOP ABS DEO PWD 3000 (średnica porów poniżej 6Å). Adsorbent był uprzednio wygrzewany przez 6 godzin w temperaturze 250°C. Najpierw

na dnie kolumny umieszczano niewielką ilość waty szklanej uformowanej w kształt kulki w celu uniemożliwienia wydostania się adsorbentu z kolumny podczas rozdziału. Następnie umieszczano adsorbent do wysokości 4/5 pipety i delikatnie (palcami lub długopisem) uderzano pipetę, tak aby lepiej upakować adsorbent. Kolumnę wypełnioną adsorbentem przemywano kilkoma niewielkimi porcjami cykloheksanu (3 × 3 ml), tak aby nie dopuścić do jej wyschnięcia. Zmierzone *martwe objętości* kolumn wynosiły około 3 ml. Na tak przygotowaną kolumnę podawano roztwór 1 ml próbki rozpuszczonej w cykloheksanie o stężeniu 30 mg/ml, a następnie kilka niewielkich porcji cykloheksanu (każda po 5 ml). Eluat zbierano do uprzednio zważonego naczynka wagowego.

Analiza IR/MS

Wyniki oznaczeń składu izotopowego węgla wyraża się jako:

$$\delta^{13}\text{C} = \left[\frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{próbka}} - ^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{PDB}})}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{PDB}})} \right] \times 1000\text{‰}$$

Wartością odniesienia (PDB, ang. *Pee Dee Belemnite*) jest skład izotopowy węgla w węglanie wapnia rostrum *Belemnitella americana* z formacji Peedee w Południowej Karolinie (USA). Wyniki analiz to różnice pomiędzy składem izotopowym próbki a składem izotopowym PDB wyrażone w promilach (Hoefs, 2004; Sharp, 2007; Groot, 2009).

Do oznaczeń składu izotopowego pierwiastków posiadających trwałe izotopy (węgiel, azot, tlen, wodór i siarka) wykorzystuje się spektrometry masowe (IRMS, ang. *isotope ratio mass spectrometer*). Laboratorium Geochemii Nafty i Gazu

posiada spektrometr masowy Delta V Advantage firmy Thermo Scientific. Ze względu na wysoką czułość oraz brak możliwości podawania bezwzględny wyniku każde oznaczenie składa się z badania próbki oraz gazu referencyjnego, którego skład izotopowy jest określany przy użyciu certyfikowanych wzorców. Próbka musi trafić na spektrometr w postaci gazowej. Z tego względu ulega spaleniu w analizatorze elementarnym (Flash 2000) lub urządzeniu GC Isolink połączonym z chromatografem Trace GC Ultra. Przepływy z analizatora, chromatografu oraz gazów referencyjnych zbierane są w ConFlo, urządzeniu pozwalającym „zarządzać” strumieniami gazów trafiającymi do spektrometru. Do oznaczeń składu izotopowego węgla próbka musi być w postaci ditlenku węgla, dla wodoru – w postaci H_2 , dla tlenu – w postaci CO, a dla azotu – w postaci N_2 . Te rodzaje gazów są referencyjne dla odpowiednich oznaczeń. Chromatograf na jednym z dozowników posiada dołączony pirolizer Pyroprobe 6150 (CDS Analytical).

Próbki ulegają rozdziałowi na chromatografie Trace GC Ultra przy użyciu kolumny kapilarnej TR-5MS o długości 30 m i średnicy 0,25 mm (Thermo Fischer Scientific). Program temperaturowy rozpoczyna się w $60^\circ C$ (utrzymywanych przez 1 min). Później następuje narost ($4^\circ C/min$) temperatury do $310^\circ C$ (utrzymywanych przez 18 min). Temperatura dozownika wynosi $240^\circ C$. Kolejne rozdzielone składniki gazu opuszczające kolumnę są spalane/pirolizowane do CO_2 , H_2 , N_2 , CO i H_2O w reaktorach urządzenia GC IsoLink (temperatura $1000^\circ C$ i $1400^\circ C$). W celu wyeliminowania wilgoci produkty spalania wraz z gazem nośnym przepływają przez rurkę nafiowaną, a następnie trafiają do Conflo IV (ang. *open split*) i na IRMS Delta V Advantage.

Specyfika oznaczeń IRMS nie pozwala na tworzenie wielopunktowych krzywych kalibracyjnych. Kalibracja jednopunktowa jest wykonywana dla danej serii oznaczeń przy wykorzystaniu wzorca o podobnej matrycy oraz o zbliżonym składzie izotopowym do tego, jakiego spodziewamy się w próbkach. W związku z tym do wykonania kalibracji użyto wzorca Alphasgas isotope – CO_2 . Certyfikowany wzorzec gazowy został zakupiony w firmie AirLiquide Polska. Wzorzec został sporządzony w akredytowanym laboratorium AirLiquide Deutschland GmbH w Dusseldorfie. Kalibracja była wykonywana poprzez nasyżkę gazu do dozownika chromatografu. Kalibracja została przeprowadzona poprzez sześciokrotną analizę wzorca Alphasgas isotope – CO_2 ($\delta^{13}C = -36,2\text{‰}$ vs. PDB; SD = 0,2‰).

Próbki stałe są spalane w analizatorze elementarnym Flash 2000 w jednym z dwóch reaktorów (osobny do oznaczeń węgla i azotu oraz wodoru i tlenu), a następnie trafiają na kolumnę rozdzielającą produkty spalania/pirolizy (CO , CO_2 , N_2 i O_2) i ConFlo IV (aparatury łączące urządzenia peryferyjne, gazy referencyjne i spektrometr). Analiza typu BSIA (ang. *bulk*

stable isotope analysis) pozwala poznać skład izotopowy całej próbki. Do analiz węgla i azotu wykorzystywany jest reaktor oksydacyjno-redukcyjny, na którego wypełnienie składają się tlenek chromu, zredukowana miedź i srebrzony kobalt. Do analiz tlenu i wodoru wykorzystywany jest reaktor pirolityczny wypełniony węglem szklistym (nazwa handlowa Glassy Carbon). Wzorzec używany do kalibracji to NBS-22 (IAEA). Jest to olej o wartości $\delta^{13}C = -30,031\text{‰}$ vs. PDB; SD = 0,043‰ (Silverman, 1964).

Wyniki

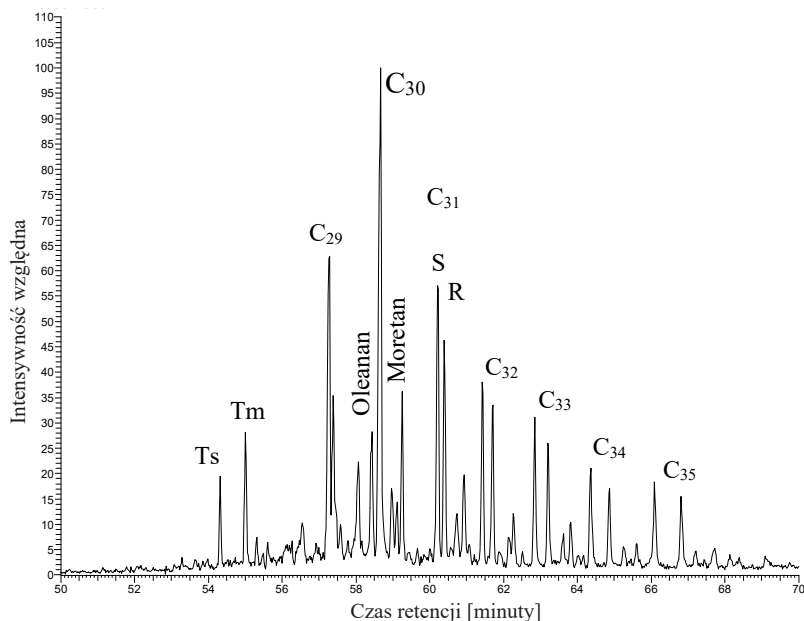
Do badań pod kątem biomarkerów na aparacie GC-IRMS i/lub EA-IRMS wybrano 16 próbek rop naftowych i ekstraktów bitumicznych. W części próbek analizowano zarówno frakcję nasyconą, jak i aromatyczną, natomiast w części tylko nasyconą lub tylko aromatyczną. Poza tym frakcję nasyconą poddano rozdziałowi na węglowodory rozgałęzione oraz n-alkany i na tych pierwszych wykonano analizę GC-IRMS. Analiza węglowodorów rozgałęzionych została przeprowadzona tylko w przypadku dwóch próbek (Łodyna-90k i Osobnica-25), ponieważ w pozostałych przypadkach ilości otrzymanej frakcji były zbyt małe do jej wykonania. Poza tym poddano analizie izotopowej EA-IRMS cztery próbki surowych rop naftowych. Otrzymane chromatogramy z analiz GC-IRMS porównywano z archiwalnymi analizami GC-MS (przykładowy chromatogram na rysunku 4) tych samych próbek w celach identyfikacji poszczególnych związków chemicznych.

Poniżej wymienione próbki zostały poddane badaniom:

- ekstrakty bitumiczne – powierzchniowe: Dukla-2D, Tylawa-11, Tylawa-12;
- ekstrakty bitumiczne: Krosno-2, Krosno-3, Krosno-8, Menility-3, Menility-6, Menility-14;
- ropy naftowe: Sękowa, Stara Wieś, Draganowa-2, Łodyna-90k, Osobnica-25, Węglówka-261, August-64.

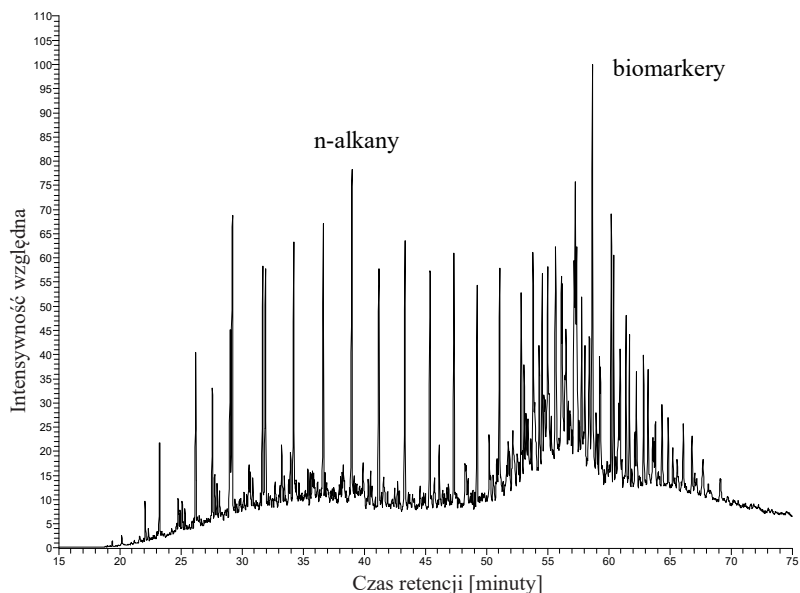
Na rysunkach 5–6 przedstawiono chromatogramy (otrzymane z analiz na GC-MS) całej frakcji nasyconej oraz frakcji nasyconej po oddzieleniu od niej n-alkanów dla tych samych dwóch przykładowych próbek. Po rozdziale biomarkery są dużo bardziej wyeksponowane (rys. 5). Ma to zwłaszcza znaczenie w próbkach o wysokim stopniu dojrzałości termicznej, ponieważ w tego typu próbkach biomarkery występują we względnie małych ilościach.

W celu rozpoznania podstawowych węglowodorów i określenia powtarzalności wyników ich oznaczeń wykorzystano wzorzec *FID test mix*. Nie jest to wzorzec składu izotopowego i nie był używany do kalibracji. W tabeli 1 przytoczono wyniki trzech analiz oraz policzone wartości odchylenia standardowego i względnego odchylenia standardowego.



Rys. 4. Skład hopanów (m/z 191) we frakcji nasyconej ekstraktu bitumicznego – próbka Dukla-2D

Fig. 4. Composition of hopanes (m / z 191) in the saturated fraction of bituminous extract – Dukla-2D sample



Rys. 5. Skład frakcji nasyconej otrzymanej z ekstraktu bitumicznego – próbka Dukla-2D

Fig. 5. Composition of the saturated fraction obtained from bituminous extract – Dukla-2D sample

Analizując próbki frakcji nasyconej oraz wykorzystując wyniki analizy wzorca i analizy GC-MS próbek, udało się rozpoznać węglowodory nasycone oraz biomarkery występujące we frakcji nasyconej. Bimodalna dystrybucja węglodorów występuje w próbce Łodyna-90k. Większe ilości biomarkerów zidentyfikowano w próbce Dukla-2D. W wielu próbkach widać szeroką i wysoko usytuowaną linię bazową, co negatywnie wpływa na oznaczanie składu izotopowego poszczególnych związków. Może być to związane z dużą

ilością związków występujących w próbce, które nie rozdzielają się wystarczająco, aby po spalaniu w reaktorze urządzenia IsoLink stworzyć pik. W takim przypadku CO₂ będący produktem ich spalania tworzy stałe tło, które podnosi linię bazową.

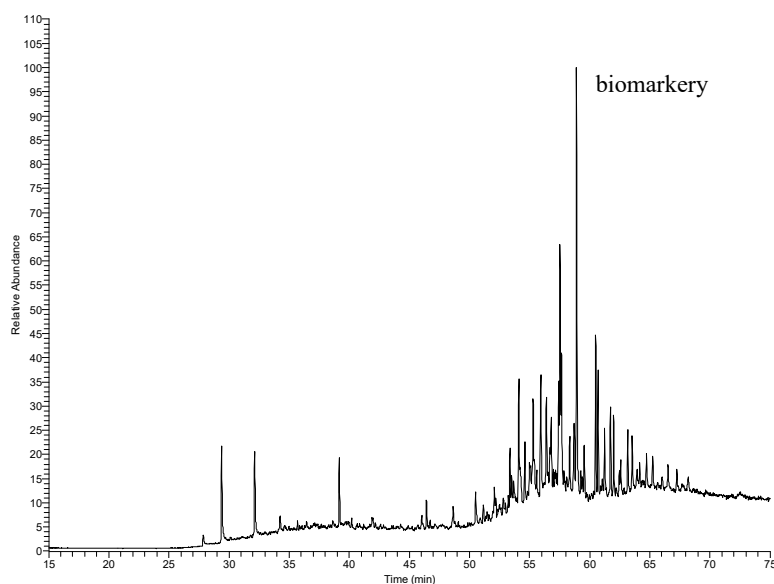
Wykonano również analizy frakcji nasyconej rozdzielonej na n-alkany i węglowodory rozgałęzione dla próbek rop naftowych Łodyna-90k oraz Osobnica-25. Analiza frakcji nasyconej – węglodorów rozgałęzionych pozwoliła uzyskać skład izotopowy dla pristanu i fitanu, jednak wyniki dla biomarkerów (pomimo ich względnie dużych ilości) mogą być zaburzone przez szeroką i wysoką linię bazową.

Wykonano także analizy frakcji aromatycznej, ale wyniki były niezadowalające. Wykonując analizy dla kilku próbek oraz wielokrotne powtórki analiz wybranych próbek, zaobserwowano znaczące różnice w wyglądzie chromatogramów. Z tego powodu zrezygnowano z analizy frakcji aromatycznej pod kątem wyznaczania wartości δ¹³C dla wyższych karotenoidów i ich pochodnych, w tym izorenieratanu.

W przypadku próbki Łodyna-90k została sprawdzona powtarzalność poprzez sześciokrotną analizę. Wyniki znajdują się w tabeli 2, a wyliczone parametry statystyczne – w tabeli 3. Odchylenia standardowe (SD) oraz względne odchylenia standardowe (RSD) przyjmują wartości wyższe niż te obliczone dla wzorca *FID test mix*, co jest najprawdopodobniej związane z wpływem matrycy próbki i wysokim poziomem linii bazowej. Niemniej jednak wartości są zadowalające – RSD dla żadnego związku nie przekracza 5% (Michalski i Mytych, 2008). Tylko w przypadku n-C₁₄, n-C₂₆ i n-C₂₈ przyjmuje wartości powyżej 4%, a w przypadku n-C₂₀ i n-C₂₃ – powyżej 3%. Trudno wytłumaczyć znaczące różnice SD i RSD dla wyników oznaczeń niektórych węglodorów.

Poddano badaniom izotopowym δ¹³C frakcję nasyconą ekstraktów bitumicznych i rop naftowych.

Zidentyfikowano biomarkery z grupy hopanów (m/z 191) i oznaczono wartości izotopowe, które przedstawiono w tabelach 4 (ekstrakty bitumiczne) i 5 (ropy naftowe). W tabelach tych ujęto część (najbardziej wiarygodne analizy pod kątem oznaczania wartości δ¹³C) próbek ekstraktów bitumicznych i rop naftowych. W każdej próbce oznaczano δ¹³C dla: bisnorhopanu (BNH), oleananu, C₂₉ norhopanu, C₃₀ hopanu, moretanu oraz serii C₃₁–C₃₅ homohopanów, jak również dla surowych rop naftowych (tabela 5).



Rys. 6. Skład frakcji nasyconej po oddzieleniu n-alkanów, otrzymanej z ekstraktu bitumicznego – próbka Dukla-2D

Fig. 6. Composition of the saturated fraction after the separation of n-alkanes, obtained from the bituminous extract – Dukla-2D sample

Tabela 1. Wyniki analiz składu izotopowego węgla węglowodorów wzorca *FID test mix* oraz parametry statystyczne [% vs. PDB, %]

Table 1. Results of carbon isotopic composition for the *FID test mix* standard and statistical parameters [% vs. PDB, %]

	I	II	III	Odchylenie standardowe	Względne odchylenie standardowe
				[%]	[%]
n-C ₁₄	-33,3	-33,4	-33,4	0,1	0,2
n-C ₁₅	-28,6	-28,9	-28,9	0,2	0,7
n-C ₁₆	-34,2	-34,2	-34,3	0,1	0,3

Spśród zestawionych w tabeli 5 próbek rop naftowych tylko w przypadku próbki Łodyna-90k udało się oznaczyć skład izotopowy węgla dla BNH. Wartości $\delta^{13}\text{C}$ dla: BNH, C₃₀ hohanu, C₃₁–C₃₅ homohopanów oraz surowej ropy dla próbki Łodyna-90k wskazują na takie samo źródło pochodzenia BNH jak hohanów. Wstępnie można zatem założyć, że BNH w tej ropie ma pochodzenie inne niż od bakterii chemoautotroficznych.

Na rysunkach 7–8 przedstawiono wykresy pokazujące wartości $\delta^{13}\text{C}$ poszczególnych biomarkerów w próbkach ekstraktów bitumicznych. Na rysunku 8 podana jest wartość średnia $\delta^{13}\text{C}$ dla szeregu C₃₁–C₃₅ homohopanów w odróżnieniu od rysunku 7, na którym znajdują się wartości izotopowe poszczególnych biomarkerów z grupy homohopanów. Wyniki izotopowe na tym etapie badań są traktowane jako wstępne i prawdopodobne, lecz nie ostateczne.

Zasadnicze znaczenie ma porównywanie wartości $\delta^{13}\text{C}$ biosnorhohanu względem wartości izotopów reszty biomarkerów

(dla tej samej próbki), szczególnie: C₃₀ hohanu, C₂₉ norhohanu, C₃₁–C₃₅ homohopanów czy surowych rop. Brak różnic wskazuje na takie samo źródło pochodzenia BNH i reszty hohanów, natomiast różnice w wartościach rzędu kilku promili (6–9) świadczą o różnym pochodzeniu, o czym wspomniano we wprowadzeniu teoretycznym (pochodzenie BNH od bakterii chemoautotroficznych). Należy pamiętać, że porównywanie wartości $\delta^{13}\text{C}$ pomiędzy różnymi próbkami ma sens tylko dla tych o podobnym stopniu dojrzałości termicznej.

Porównując $\delta^{13}\text{C}$ BNH i $\delta^{13}\text{C}$ C₃₀ hohanu w obrębie tej samej próbki, stwierdza się, że najprawdopodobniej źródło pochodzenia obu tych biomarkerów było to samo w przypadku wszystkich próbek ekstraktów bitumicznych podanych w tabeli 4. Niestety brak wyników dla C₂₉ norhohanu i istnienie tylko częściowych wyników dla C₃₁–C₃₅ homohopanów powodują, że teza ta wymaga dalszego sprawdzenia.

Na rysunkach 9–10 przedstawiono wartości $\delta^{13}\text{C}$ poszczególnych biomarkerów w próbkach rop naftowych. W przypadku rop naftowych dodatkowo wykonano analizę EA-IRMS pod kątem oznaczenia wartości $\delta^{13}\text{C}$ (sumaryczna wartość wszystkich składników chemicznych) tzw. surowych rop (tab. 5).

Tabela 2. Wyniki analiz składu izotopowego węgla węglowodorów próbki Łodyna-90k – powtarzalność [% vs. PDB]

Table 2. Results of the carbon isotopic composition of the Łodyna-90k sample – repeatability [% vs. PDB]

	I	II	III	IV	V	VI
n-C ₁₄	-29,2	-30,7	-28,7	-29,3	-28,8	-26,8
n-C ₁₅	-28,3	-29,6	-29,5	-28,7	-28,6	-27,7
n-C ₁₆	-28,6	-28,4	-28,6	-28,8	-28,7	-28,1
n-C ₁₇	-29,3	-29,2	-29,7	-29,8	-29,9	-29,2
n-C ₁₈	-30,4	-30,9	-30,9	-31,1	-29,8	-30,2
n-C ₁₉	-29,4	-30,3	-29,7	-30,6	-29,6	-29,3
n-C ₂₀	-29,7	-30,8	-31,3	-30,6	-29,0	-29,3
n-C ₂₁	-30,6	-30,7	-31,1	-31,8	-30,4	-29,5
n-C ₂₂	-29,4	-29,8	-29,7	-30,5	-29,2	-28,7
n-C ₂₃	-29,2	-29,3	-31,0	-31,2	-29,2	-28,8
n-C ₂₄	-28,7	-29,1	-28,7	-30,1	-29,2	-28,2
n-C ₂₅	-28,9	-28,8	-28,2	-30,5	-29,2	-28,0
n-C ₂₆	-29,2	-28,6	-30,6	-31,9	-29,3	-28,3
n-C ₂₇	-29,4	-28,3	-28,8	-29,7	-29,5	-29,3
n-C ₂₈	-30,5	-28,7	-32,9	-30,0	-29,7	-29,2
n-C ₂₉	-28,5	-28,9	-28,4	-29,6	-30,0	-29,1
n-C ₃₀	-31,2	-30,4	-31,0	-29,5	-29,9	-29,1

Tabela 3. Parametry statystyczne składu izotopowego węgla węglowodorów próbki Łodyna-90k – powtarzalność [% vs. PDB, %]
Table 3. Statistical parameters of the carbon isotopic composition of the Łodyna-90k sample – repeatability [% vs. PDB, %]

	Wartość najmniejsza	Wartość największa	Średnia rytmetyczna	Odchylenie standardowe	Względne odchylenie standardowe
	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
n-C ₁₄	-30,7	-26,8	-28,9	1,3	4,4
n-C ₁₅	-29,6	-27,7	-28,7	0,7	2,4
n-C ₁₆	-28,8	-28,1	-28,5	0,2	0,8
n-C ₁₇	-29,9	-29,2	-29,5	0,3	1,2
n-C ₁₈	-31,1	-29,8	-30,6	0,5	1,6
n-C ₁₉	-30,6	-29,3	-29,8	0,5	1,8
n-C ₂₀	-31,3	-29,0	-30,1	0,9	3,1
n-C ₂₁	-31,8	-29,5	-30,7	0,7	2,4
n-C ₂₂	-30,5	-28,7	-29,5	0,6	2,0
n-C ₂₃	-31,2	-28,8	-29,8	1,0	3,5
n-C ₂₄	-30,1	-28,2	-29,0	0,6	2,2
n-C ₂₅	-30,5	-28,0	-28,9	0,9	3,0
n-C ₂₆	-31,9	-28,3	-29,7	1,3	4,5
n-C ₂₇	-29,7	-28,3	-29,2	0,5	1,8
n-C ₂₈	-32,9	-28,7	-30,2	1,5	4,9
n-C ₂₉	-30,0	-28,4	-29,1	0,6	2,2
n-C ₃₀	-31,2	-29,1	-30,2	0,9	2,8

Tabela 4. Wartości δ¹³C poszczególnych biomarkerów frakcji nasyconej dla próbek ekstraktów bitumicznych
Table 4. δ¹³C values of individual biomarkers of the saturated fraction for bituminous extract samples

δ ¹³ C	Dukla-2D	Dukla-2A	Tylawa-11	Tylawa-12	Krosno-8
BNH	-31,13	-28,49	-33,21	-34,30	-27,60
Oleanan	n.o.	-29,50	n.o.	-34,60	n.o.
C ₂₉ hop.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.
C ₃₀ hop.	-31,17	-30,04	-32,65	-32,90	-28,50
Moretan	n.o.	-30,80	-32,02	n.o.	n.o.
C ₃₁ (S) homohop.	-31,71	-31,41	-30,15	-34,69	-29,80
C ₃₁ (R) homohop.	-31,52	-29,36	-28,55	-31,84	-32,30
C ₃₂ (S) homohop.	-30,59	-30,68	n.o.	-35,33	-34,10
C ₃₂ (R) homohop.	-30,19	-30,01	n.o.	-34,65	-34,80
C ₃₃ (S) homohop.	-31,42	-30,74	n.o.	-32,02	n.o.
C ₃₃ (R) homohop.	-29,97	n.o.	n.o.	-32,98	n.o.
C ₃₄ (S) homohop.	-29,98	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.
C ₃₄ (R) homohop.	-28,59	-29,60	n.o.	-33,67	n.o.
C ₃₅ (S) homohop.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.
C ₃₅ (R) homohop.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.

n.o. – nie obliczono ze względu na zbyt małą ilość danego związku chemicznego lub jego brak oraz słaby rozdział pików na chromatogramie

Podsumowanie

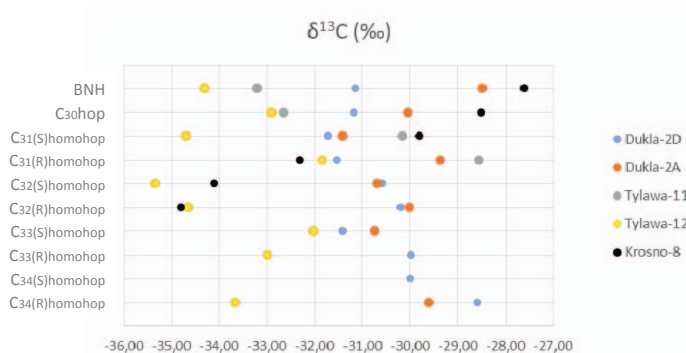
Przeprowadzono badania biomarkerów w próbkach ekstraktów bitumicznych i rop naftowych metodami GC-IRMS oraz EA-IRMS. Do przygotowania próbek zastosowano oprócz standardowej metody rozdziału na frakcje: nasyconą, aromatyczną,

żywicę i asfaltyny, również metodę rozdziału n-alkanów od węglowodorów rozgałęzionych. Wyznaczono powtarzalność metody oznaczania izotopów metodą GC-IRMS dla frakcji nasyconej. Stwierdzono, że próbki z małą zawartością biomarkerów nie powinny być wykorzystywane do tego typu analiz. Z drugiej strony zbyt duże stężenie węglowodorów w próbce

Tabela 5. Wartości $\delta^{13}\text{C}$ poszczególnych biomarkerów frakcji nasyconej dla próbek rop naftowych
Table 5. $\delta^{13}\text{C}$ values of individual biomarkers of the saturated fraction for crude oils samples

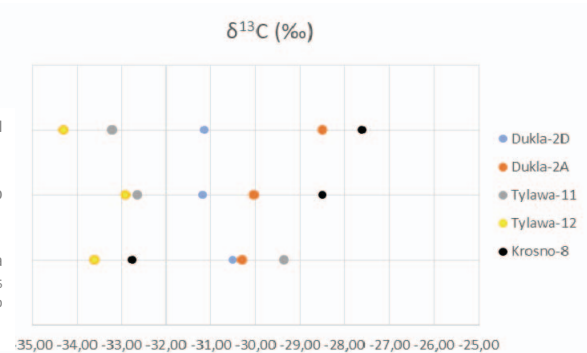
$\delta^{13}\text{C}$	Łodyna-90k	Osobnica-25	Węglówka-261	August-64
BNH	-29,83	n.o.	n.o.	n.o.
Oleanan	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.
C ₂₉ hop.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.
C ₃₀ hop.	-29,20	-33,03	-29,17	-31,04
Moretan	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.
C ₃₁ (S) homohop.	-30,95	n.o.	n.o.	-31,36
C ₃₁ (R) homohop.	-28,58	n.o.	n.o.	-30,96
C ₃₂ (S) homohop.	-30,50	n.o.	n.o.	n.o.
C ₃₂ (R) homohop.	-31,39	n.o.	n.o.	n.o.
C ₃₃ (S) homohop.	-26,41	-28,05	n.o.	n.o.
C ₃₃ (R) homohop.	-31,57	-30,00	n.o.	n.o.
C ₃₄ (S) homohop.	-30,27	n.o.	n.o.	n.o.
C ₃₄ (R) homohop.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.
C ₃₅ (S) homohop.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.
C ₃₅ (R) homohop.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.
Surowa ropa	-26,80	-27,88	-25,94	-27,13

n.o. – nie obliczono ze względu na zbyt małą ilość danego związku chemicznego lub jego brak oraz słaby rozdział pików na chromatogramie



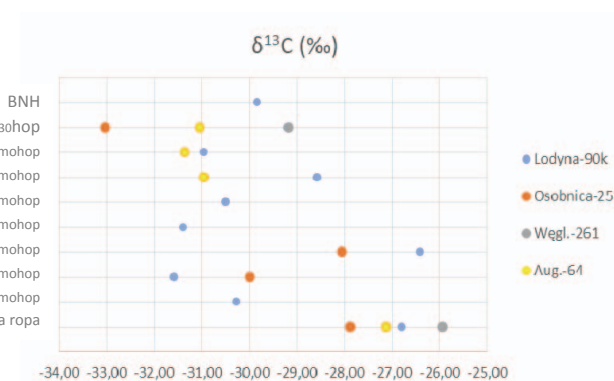
Rys. 7. Wartości $\delta^{13}\text{C}$ biomarkerów nasyconych – próbki ekstraktów bitumicznych

Fig. 7. $\delta^{13}\text{C}$ values for the saturated biomarkers – bituminous extract samples



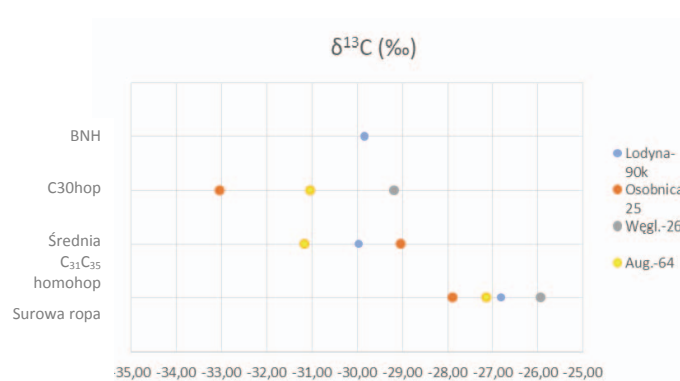
Rys. 8. Wartości $\delta^{13}\text{C}$ biomarkerów nasyconych – próbki ekstraktów bitumicznych

Fig. 8. $\delta^{13}\text{C}$ values for the saturated biomarkers – bituminous extract samples



Rys. 9. Wartości $\delta^{13}\text{C}$ biomarkerów nasyconych – próbki rop naftowych

Fig. 9. $\delta^{13}\text{C}$ values for the saturated biomarkers – crude oils samples



Rys. 10. Wartości $\delta^{13}\text{C}$ biomarkerów nasyconych – próbki rop naftowych

Fig. 10. $\delta^{13}\text{C}$ values for the saturated biomarkers for the crude oils samples

podanej na chromatograf gazowy powoduje wzrost linii bazowej i gorszy rozdział pików. Próbowano również oznaczać biomarkery we frakcji aromatycznej metodą GC-IRMS, co jednak się nie powiodło. Chcąc w przyszłości przeprowadzać takie oznaczenia, należy zastosować specjalną metodykę przygotowania próbek frakcji aromatycznej.

Wstępnie oznaczono wartości $\delta^{13}\text{C}$ biomarkerów frakcji nasyconej z grupy hopenów: bisnorhopanu (BNH), oleananu, C_{29} norhopanu, C_{30} hopenu, moretanu oraz serii $\text{C}_{31}\text{--}\text{C}_{35}$ homohopenów oraz wartości $\delta^{13}\text{C}$ surowych rop naftowych. Stwierdzono względnie niewielkie różnice w wartości $\delta^{13}\text{C}$ pomiędzy BNH a hopenami i surowymi ropami, co sugeruje najprawdopodobniej to samo źródło pochodzenia wszystkich biomarkerów (w tym BNH).

Obecnie planowana jest kontynuacja prac związanych z opisywanym tematem we współpracy ze specjalistami z dziedziny mikrobiologii.

Artykuł powstał na podstawie pracy statutowej pt. *Wpływ metody przygotowania próbek na wyniki GC-MS i GC-IRMS* – praca INiG – PIB na zlecenie MNISW; nr zlecenia: 0053/SG/2020, nr archiwalny: DK-4100-0041/2020.

Literatura

- Bieleń W., 2019. Związki arylowoizoprenoidowe jako wskaźniki charakteru środowiska sedymentacji. *Nafta-Gaz*, 9: 546–554. DOI: 10.18668/NG.2019.09.03.
- Bieleń W., Matyasik I., 2014. Ropy naftowe i ekstrakty bitumiczne o niskiej zawartości biomarkerów – preparatyka próbek przeznaczonych do analizy GC-MS. *Nafta-Gaz*, 12: 868–873.
- Drozd A., Bieleń W., 2020. Sedymentologiczna i geochemiczna charakterystyka dolnych warstw krośnieńskich fałdu Gorlic i łuski Stróż (jednostka śląska, Karpaty zewnętrzne). *Nafta-Gaz*, 12, 877–894. DOI: 10.18668/NG.2020.12.01 .
- Flanigen E.M., Bennett J.M., Grose R.W., Cohen J.P., Patton R.L., Kirchner R.M., Smith J.V., 1978. Silicalite, a new hydrophobic crystalline silica molecular sieve. *Nature*, 271: 512–516.
- Garner L., 2019. The use of 28,30-Bisnorhopane as a stratigraphic marker. <<https://igilt.com/news/the-use-of-2830-bisnorhopane-as-a-stratigraphic-marker/>> (dostęp: październik 2020).
- Groot P., 2009. Handbook of stable isotope analytical techniques. *Elsevier B.V.*
- Hird S.J., Evans R., Rowland S.J., 1992. Isolation and characterization of sedimentary and synthetic highly branched C_{20} and C_{25} monoenes. *Marine Chemistry*, 37(1–2): 117–129. DOI: 10.1016/0304-4203(92)90060-N.
- Hoefs J., 2004. Stable isotope geochemistry. *Springer-Verlag*.
- Hoering T.C., Freeman D.H., 1984. Shape-selective sorption of monomethylalkanes by silicalite, a zeolitic form of silica. *Journal of Chromatography*, 316: 333–341. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)96163-6.
- Holman A.I., Grice K., 2018. $\delta^{13}\text{C}$ of aromatic compounds in sediments, oils and atmospheric emissions: A review. *Organic Geochemistry*, 123: 27–37. DOI: 10.1016/j.orggeochem.2018.06.004.
- Hughes W.B., Holba A.G., Miller D.E., Richardson J.S., 1985. Geochemistry of greater Ekofisk crude oils. [W:] Thomas B.M. (eds). *Petroleum Geochemistry in Exploration of the Norwegian Shelf*. Springer, Dordrecht. DOI: 10.1007/978-94-009-4199-1_5.
- Köster J., Rospondek M., Schouten S., Kotarba M., Zubrzycki A., Sinnighe Damste J.S., 1998. Biomarker geochemistry of a foreland basin: the Oligocene Menilite Formation in the Flysch Carpathians of Southeast Poland. *Organic Geochemistry*, 29: 649–669. DOI: 10.1016/S0146-6380(98)00182-X.
- Mackenzie A.S., Maxwell J.R., 1983. Biological marker and isotope studies of North Sea crude oils and sediments. *World Petroleum Congress, 11th World Petroleum Congress, London, UK*.
- Matyasik I., 2011. Biomarkery w charakterystyce genetycznej systemów naftowych. *Prace Naukowe Instytutu Nafty i Gazu*, 177: 1–220.
- Matyasik I., Bieleń W., 2013. Oznaczanie jakościowe i ilościowe (za pomocą pułapki jonowej Polaris Q) związków chemicznych: oleananu i bisnorhopanu, stosowanych w interpretacji geochemicznej. *Nafta-Gaz*, 5: 361–367.
- Michalski R., Mytych J., 2008. Akredytacja laboratoriów badawczych według normy PN-EN ISO/IEC 17025. *Wydawnictwo Elamed, Kraków*.
- Moldovan J.M., Seifert W.K., Arnold E., Clardy J., 1984. Structure proof and significance of stereoisomeric 28,30-bisnorhopanes in petroleum and petroleum source rocks. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 48: 1651–1661. DOI: 10.1016/0016-7037(84)90334-X.
- Murray A.P., Sosrowidjojo I.B., Alexander R., Kagi R.I., Norgate C.M., Summons E., 1997. Oleananes in oils and sediments: evidence of marine influence during early diagenesis? *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 61(6): 1261–1276. DOI: 10.1016/S0016-7037(96)00408-5.
- Obermajer M., Osadetz K.G., Fowler M.G., Snowdon L.R., 2000. Light hydrocarbon (gasoline range) parameter refinement of biomarker-based oil–oil correlation studies an example from Williston Basin. *Organic Geochemistry*, 31(10): 959–976. DOI: 10.1016/S0146-6380(00)00114-5.
- Peters K.E., Walters C.C., Moldovan J.M., 2005. The Biomarker Guide. Volume 2: Biomarkers and Isotopes in the Petroleum Exploration and Earth History. 2nd ed. *United Kingdom: Cambridge University Press*: 561–563.
- Schoell M., McCaffrey M.A., Fago F.J., Moldovan M., 1992. Carbon isotopic compositions of 28,30-bisnorhopane and other biological markers in a Monterey crude oil. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 56(3): 1391–1399. DOI: 10.1016/0016-7037(92)90070-Y.
- Sharp Z., 2007. Principles of stable isotope geochemistry. *Pearson Prentice Hall*.
- Silverman S.R., 1964. Investigations of petroleum origin and evolution mechanisms by carbon isotope studies. [W:] Craig H., Miller S.L., Wasserburg G.J. (eds.). *Isotopic and Cosmic Chemistry*: 92–102.
- Wencel K., 2020. Kompilacja parametrów analizy termicznej z cechami genetycznymi próbek powierzchniowych wraz z modyfikacją preparatyki próbek. *Praca własna, nr zlec. 1848/SG/2020, Archiwum Instytutu Nafty i Gazu – Państwowego Instytutu Badawczego, Kraków*.
- West N., Alexander R., Kagi R.I., 1990. The use of silicalite for rapid isolation of branched and cyclic alkane fractions for petroleum. *Organic Geochemistry*, 15(5): 499–501. DOI: 10.1016/0146-6380(90)90095-H.



Mgr inż. Wojciech BIELEŃ
Starszy specjalista badawczo-techniczny w Zakładzie Geologii i Geochemii
Instytut Nafty i Gazu – Państwowy Instytut Badawczy
ul. Lubicz 25 A
31-503 Kraków
E-mail: wojciech.bielen@inig.pl



Mgr inż. Marek JANIGA
Asystent w Zakładzie Geologii i Geochemii
Instytut Nafty i Gazu – Państwowy Instytut Badawczy
ul. Lubicz 25 A
31-503 Kraków
E-mail: marek.janiga@inig.pl