



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 543.683

doi: 10.17308/sorpchrom.2025.25/13578

Идентификация методом ВЭЖХ-МС маркеров нефти – индикаторов биодеградации

Иван Сергеевич Комротов¹✉,

Виталий Вячеславович Челноков¹, Сабухи Ильич Нифталиев²

¹Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия,
komxim@yandex.ru✉

²Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

Аннотация. Маркеры нефти – это специальные химические вещества, добавляемые в небольших количествах к исходной нефти для идентификации, отслеживания продукта на различных этапах его жизненного цикла и оценки биодеградации при хранении. Существующие методы определения маркеров, в основном, предполагают применение ВЭЖХ, дающей приемлемые результаты, если в растворах нет посторонних соединений, схожих с искомыми маркерами по своей химической природе, которые могут иметь одно и то же время удерживания с определяемой меткой, что значительно затрудняет использование методики.

В связи с актуальностью проблемы определения маркеров нефти, проведены работы по идентификации соединений, которые могут использоваться как индикаторы биодеградации, с применением совмещенного метода ВЭЖХ-МС. В этом случае, помимо времени удерживания, критерием присутствия маркера будет служить еще его молекулярная масса.

Разработанная методика базируется на индивидуальных характеристиках 5 искусственных маркеров, концентрации которых варьировались в пределах 5-100 ppm, необходимых для построения градирочного графика с высоким критерием линейности. Определены уравнения прямых. Достоверность разработанной методики проверена хроматографированием смеси меток в «слепой» пробе.

Ключевые слова: маркеры нефти, биодеградация, ВЭЖХ-МС, градирочный график, масс-спектр.

Для цитирования: Комротов И.С., Челноков В.В., Нифталиев С.И. Идентификация методом ВЭЖХ-МС маркеров нефти – индикаторов биодеградации // Сорбционные и хроматографические процессы. 2025. Т. 25, № 6. С. 942-950. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13578>

Original article

Identification of oil markers – indicators of biodegradation by HPLC-MS

Ivan S. Komrotov¹✉, Vitaliy V. Chelnokov¹, Sabukhi I. Niftaliev²

¹Mendeleev university of chemical technology, Moscow, Russian Federation, komxim@yandex.ru✉

²Voronezh State University of Engineering Technology, Voronezh, Russian Federation

Abstract. Oil markers are special chemical substances added in small quantities to the original oil for identification, product tracking at various stages of its life cycle and assessment of biodegradation during storage. Existing methods for marker determination mainly involve the use of HPLC, which gives acceptable results if the solutions do not contain foreign compounds similar to the desired markers in their chemical nature, which can have the same retention time with the determined label, which significantly complicates the use of the technique.

Due to the relevance of the problem of determining oil markers, work has been carried out to identify compounds that can be used as indicators of biodegradation, using a combined HPLC-MS method. In this case, in addition to the retention time, the criterion for the presence of the marker will also be its molecular weight.



The developed technique is based on the individual characteristics of 5 artificial markers, the concentrations of which varied within 5-100 ppm, necessary for constructing a calibration graph with a high linearity criterion. The equations of straight lines are determined. The reliability of the developed method was verified by chromatography of a mixture of labels in a "blind" sample.

Keywords: oil markers, biodegradation, HPLC-MS, calibration schedule, mass spectrum

For citation: Komrotov I.S., Chelnokov V.V., Niftaliev S.I. Identification of oil markers – indicators of biodegradation by HPLC-MS. *Sorbtionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2025. 25(6): 942-950. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13578>

Введение

Оценка биодеградации нефти с помощью маркеров – одно из ключевых применений геохимических методов [1-4]. Микроорганизмы разлагают компоненты нефти избирательно: сначала легкоусвояемые соединения, затем более устойчивые. Эта последовательность позволяет использовать устойчивые биомаркеры как «внутренние стандарты» для оценки степени разложения [5, 6].

Маркеры бывают искусственные (добавляемые исследователями) и природные, содержащиеся в сырой нефти, соединения. На практике применяют различные методы и их сочетание для детектирования этих анализаторов.

Разработан и валидирован метод газовой хроматографии – тройной квадрупольной масс-спектрометрии без предварительного фракционирования для определения органических соединений серы, предположительно являющихся геохимическими маркерами сырой нефти [7].

Авторами обсуждается современное состояние масс-спектрометрии как надежного аналитического метода для идентификации и количественного определения метаболитов карбоновых кислот, являющихся индикаторами аэробной и анаэробной биодеградации углеводородов. Уделено внимание предварительной обработке образцов, селективному групповому концентрированию, а также газовой и жидкостной хроматографии, предшествующей масс-спектрометрии, для снижения влияния матрицы и дискриминации ионизации [8].

Три метода были использованы для обнаружения биодеградации сырой нефти бактериальными и грибковыми

изолятами: спектрофотометрия, окисительно-восстановительное титрование (метод Тильльманса) и газовой хроматомасс-спектрометрией - ГХ-МС – (углеводородный анализ) [9].

Исследована способность изолятов грибов минерализовать смесь четырёх полициклических ароматических углеводородов (ПАУ), маркеров биодеградации нефти, количественные изменения которых определены методом ГХ-МС (н-алканы C8-C16, C36 и пристан) [10].

Авторами методом резонансной масс-спектрометрии с Фурье преобразованием детектированы азот-, серо- и кислородсодержащие соединения, присутствующие в сырой нефти с целью получения информации о степени биодеградации [11].

Скорость биодеградации сырой нефти изолятами грибов и наночистящими оксидами железа анализировалась для нескольких периодов инкубации количественно методом ГХ-МС [12].

Недавнее исследование отслеживало ход биодеградации сырой нефти путем анализа изменения количества выбранных соединений, маркеров, методом газовой хроматографии: общие нефтяные углеводороды (TPH), Σ н-алканы (C13-C18), Σ изопреноиды (C15-C20), соотношения Pr/n-C₁₇ и Ph/n-C₁₈ [13].

Биодеградация нефти происходит в следующей последовательности [14]: н-алканы (прямые цепи) → изопреноидные алканы (пристан, фитан) → циклоалканы (нафтены) → ароматические углеводороды → сложные биомаркеры (стераны, терпаны). Устойчивые маркеры (стераны, гопаны, диастераны) разрушаются в последнюю очередь, служа точкой отсчета.



Ключевые маркеры и индексы для оценки биодеградации следующие.

А) Маркеры-мишени (легкоразлагаемые).

Основные – это н-алканы (C_{10} – C_{40}), для которых индексами могут служить:

- исчезновение пиков на хроматограмме ГХ-ПИД (особенно в диапазоне C_{15} – C_{25});

- величина CPI (Carbon Preference Index) – показатель нечетности, рассчитываемая по уравнению:

$$CPI = 0.5 * [(\Sigma_{\text{нечет.}} n-C_{25}-C_{34}) / (\Sigma_{\text{чет.}} n-C_{24}-C_{34}) + (\Sigma_{\text{нечет.}} n-C_{25}-C_{34}) / (\Sigma_{\text{чет.}} n-C_{26}-C_{34})]$$

Для свежей нефти $CPI \approx 1$ (нет преобладания четных/нечетных), а при биодеградации микробы предпочитают нечетные цепи – CPI растет.

Кроме н-алканов другими легкоразлагаемыми мишениями являются изопреноиды (пристан – Pr, фитан – Ph), индексами которых являются Pr/n- C_{17} и Ph/n- C_{18} . В свежей нефти: Pr/n- C_{17} и Ph/n- C_{18} < 1 , при биодеградации: н-алканы (n- C_{17} , n- C_{18}) исчезают быстрее изопреноидов, соотношения резко увеличиваются (могут достигать > 10).

Б) Устойчивые маркеры (референсные). В основном, в эту группу входят:

- тритерпаны (гопаны), особенно устойчивы $17\alpha(H)$, $21\beta(H)$ -гопаны (C_{27} – C_{35}). Индекс: Отношение концентрации целевого компонента (н-алкана, стерана) к C_{30} - 17α -гопану (n- C_{17} / C_{30} -гопан, C_{29} -стераны / C_{30} -гопан). При биодеградации величина числителя падает, что ведет к уменьшению индекса;

- стераны (регулярные C_{27} – C_{29}), разрушаются позже н-алканов, но раньше гопанов. Индекс биодеградации определяется отношением стеранов к гопанам (напр., C_{29} -aaa-стераны / C_{30} -гопан);

- диастераны (C_{27} – C_{29}), которые еще более устойчивы, чем регулярные стераны, используемые для оценки сильной биодеградации.

Наиболее достоверные данные можно получить при применении маркеров группы Б.

Проведено исследование биодеградации трициклических терпанов в подземных резервуарах методами ГХ-МС, ИК-Фурье-МС и молекулярного моделирования [15]. По данным биодеградации гопанов и результатов компьютерного моделирования авторы предположили, что не трициклические терпаны, вероятно, образуются в результате окисления и удаления метильной группы в положении C-10 трициклических терпанов. Данное исследование представляет собой многометодный метод изучения механизма биодеградации сырой нефти.

Группой ученых прогнозирована кинетика разложения ключевых групп углеводородов в сырой нефти для оценки скорости и константы биоремедиации. Большинство н-алканов (C_9 – C_{29}) разложились за 25 дней, а средняя скорость биодеградации гопанов ($H30$), превысила 10 мкг/г в день. По полученным данным и исходя из углеводородного состава нефти, можно прогнозировать степень биодеградации нефти при хранении в присутствии некоторых бактерий [16].

С применением газовой хроматографии с масс-спектрометрией определена степень биодеградации нефти по изменению соотношения диастеран/стеран [17].

На основе изменения маркеров проводится классификация стадий биодеградации [18] (табл.1).

Цель настоящей работы – разработать простотой, высокоэффективный способ определения добавляемых в сырую нефть искусственных маркеров – индикаторов биодеградации.

Экспериментальная часть

В качестве искусственных меток биодеградации, добавляемых в сырую нефть «Urals» из месторождения им. А. Усольцева (Ханты-Мансийский автономный округ, ООО «ЛУКОЙЛ-Западная Сибирь») использовали пять веществ с



Таблица 1. Стадии биодеградации сырой нефти

Table 1. Stages of biodegradation of crude oil

Стадия	Изменения в нефти	Ключевые индексы
0 (нет)	Нет изменений	Все индексы ≈ значениям для свежей нефти
1 (легкая)	Исчезли н-алканы (C_{10} - C_{18})	$Pr/n-C_{17} > 0.5$; $CPI > 1.2$
2 (умеренная)	Исчезли >90% н-алканов, изопреноиды частично сохранены	$Pr/n-C_{17} > 3$; $Ph/n-C_{18} > 2$
3 (сильная)	Изопреноиды исчезли; стераны/терпаны интактны	$Pr, Ph \ll$ гопаны; стераны/гопаны стабильны
4 (очень сильная)	Стераны частично разрушены; диастераны и гопаны сохраняются	C_{29} -стераны/ C_{30} -гопан \downarrow ; диастераны/гопаны стабильны
5 (экстремальная)	Гопаны и диастераны частично разрушены; остаются высокомолекулярные арены и смолы	Концентрация гопанов $\downarrow >50\%$; меняются стерические соотношения

высокими молекулярными массами, входящих в группу Б – устойчивых маркеров. Выбор таких соединений обусловлен тем, что они могут быть индикаторами биоразложения в течение продолжительного времени.

Так как искусственно добавляемые маркеры нелетучие соединения, то количественный анализ можно провести методом ВЭЖХ. В нефти могут содержаться соединения, схожие по своей химической природе с искомыми маркерами и имеющие одно и тоже время удерживания с определяемой меткой, то предложено использование совмещенного метода ВЭЖХ-МС. В таком случае, помимо времени удерживания, критерием присутствия маркера будет служить его молекулярная масса.

Хроматографическое разделение образцов проводили на базе жидкостного хроматографа Thermo Scientific UltiMate 3000 с масс-спектрометрическим детектором TSQ Fortis при следующих условиях: капиллярная колонка RSLC 120 C18, 75 X 3 мм; температура термостата автосемплера 30°C; температура термостата колонки 30 °C; скорость потока элюента 0.3 см³/мин; температура распылителя 100°C; напряжение на капилляре 4.5 кВ; скорость регистрации элементов m/z 32.5 (m/z)/sec.

Режим работы блока ВЭЖХ предполагает линейный переход элюента от соотношения ацетонитрила и метанола 66.6 и 33.4% к соотношению 0 и 100% соответственно. Исследовались растворы с концентрацией маркеров 5-100 ppm. В качестве растворителя меток использовался ацетонитрил.

Обсуждение результатов

На первом этапе экспериментальной части были получены времена удерживания и масс-спектры, на основании которых можно определить фрагменты m/z маркеров нефти, используемых как аналитический сигнал при разработке методики и ее апробации (рис. 1). Опыты проводились для каждой добавляемой метки отдельно, с концентрацией 5 ppm.

Аналогичным образом были исследованы хроматограммы и масс-спектры остальных искусственных маркеров. Из полученных масс-спектров каждого индивидуального соединения были выбраны наиболее интенсивные и характеристические фрагменты m/z в соответствии с молекулярными массами соединений (табл. 2). Значения фрагментов m/z использовались для регистрации хроматограмм меток в режиме по выделенному иону.

Для построения градуировочных графиков были приготовлены растворы с

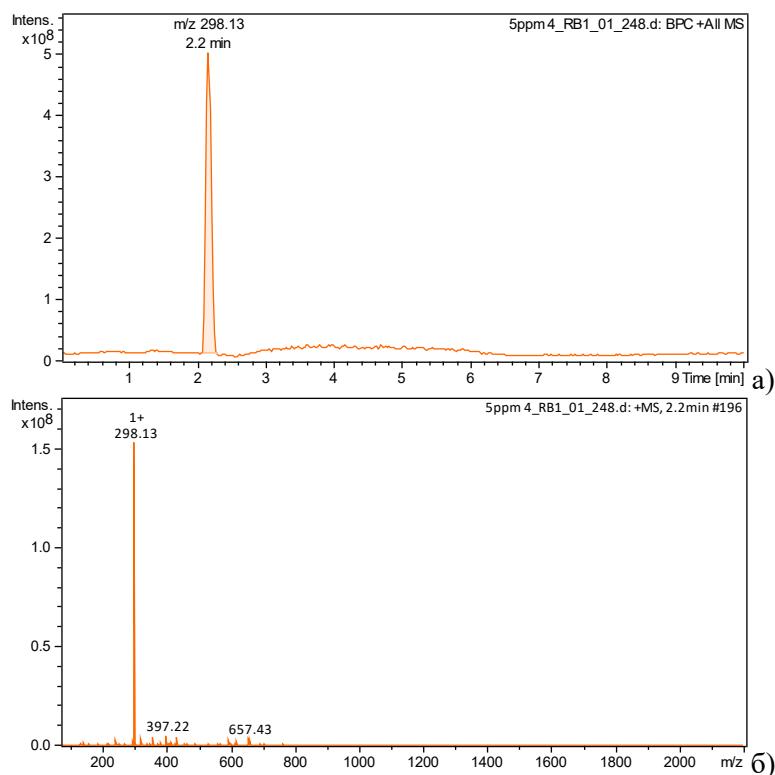


Рис. 1. Хроматограмма (а) и масс-спектр (б) первого маркера
Fig. 1. Chromatogram (a) and mass spectrum (b) of the first marker

Таблица 2. Значения фрагментов m/z исследуемых маркеров

Table 2. Values of the m/z fragments of the studied markers

№ метки	Молекулярная масса	Значение фрагмента m/z
1	297	298 ⁺
2	339	340 ⁺
3	381	382 ⁺
4	423	424 ⁺
5	487	488 ⁺

концентрациями маркеров: 5, 10, 25, 50, 75, 100 ppm. В качестве аналитического сигнала для построения градиуровочного графика используется площадь пика с соответствующим значением фрагмента m/z . По полученным данным построены графики зависимости площади пика от концентрации вещества для каждого искусственного маркера, вводимого в сырую нефть (рис. 2).

При исследовании биодеградации сырой нефти с течением времени выяснилось, что концентрации маркеров практически не меняются. Появилась необходимость в исследовании более низких содержаний меток: 0.1-1 ppm.

Получены хроматограммы и масс-спектры маркеров в выбранном диапазоне концентраций. На рис. 3 приведены таковые для искусственно добавляемого в нефть маркера с самой маленькой молекулярной массой. Построен градиуровочный график для этого образца (рис. 4), критерий линейности пройден ($R^2=0.9969$).

Уравнение для нахождения неизвестных концентраций первого маркера в данном диапазоне:

$$x = \frac{y - 13\ 264\ 219.43}{542\ 839\ 965.71},$$

где y – площадь пика, x – концентрация, ppm.

Аналогичным образом получены хро-

чайным образом было выбрано неизвест-

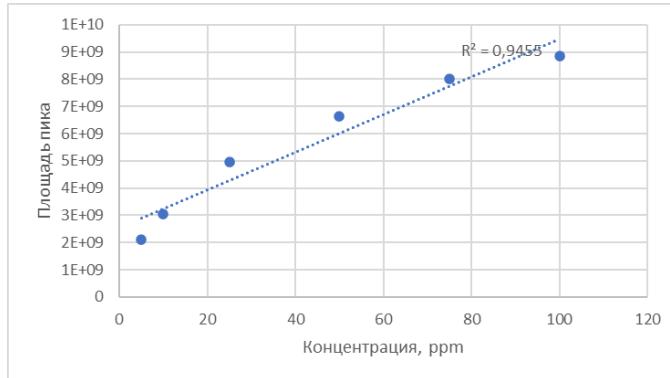


Рис. 2. График зависимости площади пика от концентрации для 1 маркера
Fig. 2. Graph of the dependence of the peak area on the concentration for 1 marker

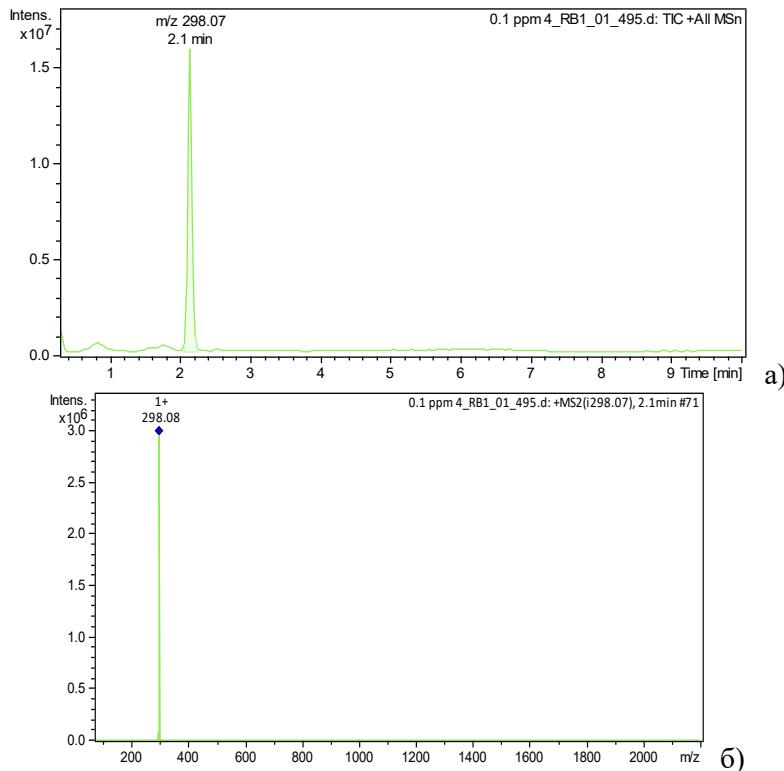


Рис. 3. Хроматограмма (а) и масс-спектр (б) первого маркера (концентрация – 0.1 ppm)
Fig. 3. Chromatogram (a) and mass spectrum (b) of the first marker (concentration – 0.1 ppm)

матограммы и масс-спектрометры для четырех других искусственных маркеров, для каждого построены градуировочные графики, найдены уравнения для расчета концентраций. Критерий линейности для графиков четырех маркеров находятся в интервале $R^2=0.9937-0.9973$.

Для проверки методики определения на смеси меток была приготовлена «слепая» проба. При ее приготовлении слу-

чное количество маркеров из 5 изучаемых (каждый образец был зашифрован для корректности эксперимента). В конечном растворе пробы концентрации маркеров находились в диапазоне от 0.1 до 1 ppm. На рис. 5 приведены полученные хроматограмма и масс-спектры.

Установлено, что в «слепой» пробе находились 1, 2 и 5 метки в концентрациях 0.15, 0.2, 0.4 ppm, что соответствует действительности.

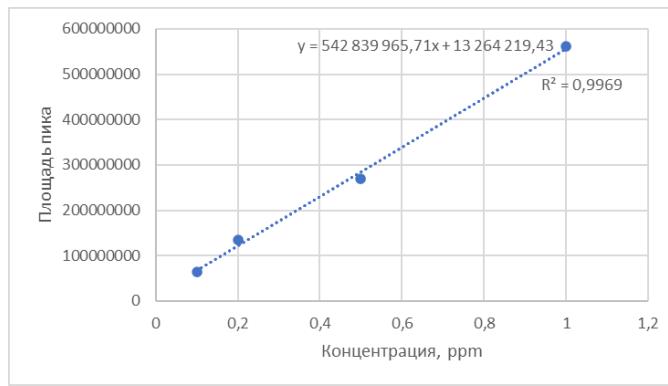


Рис. 4. График зависимости площади пика от концентрации для первого маркера
 Fig. 4. Graph of the dependence of the peak area on the concentration for the first marker

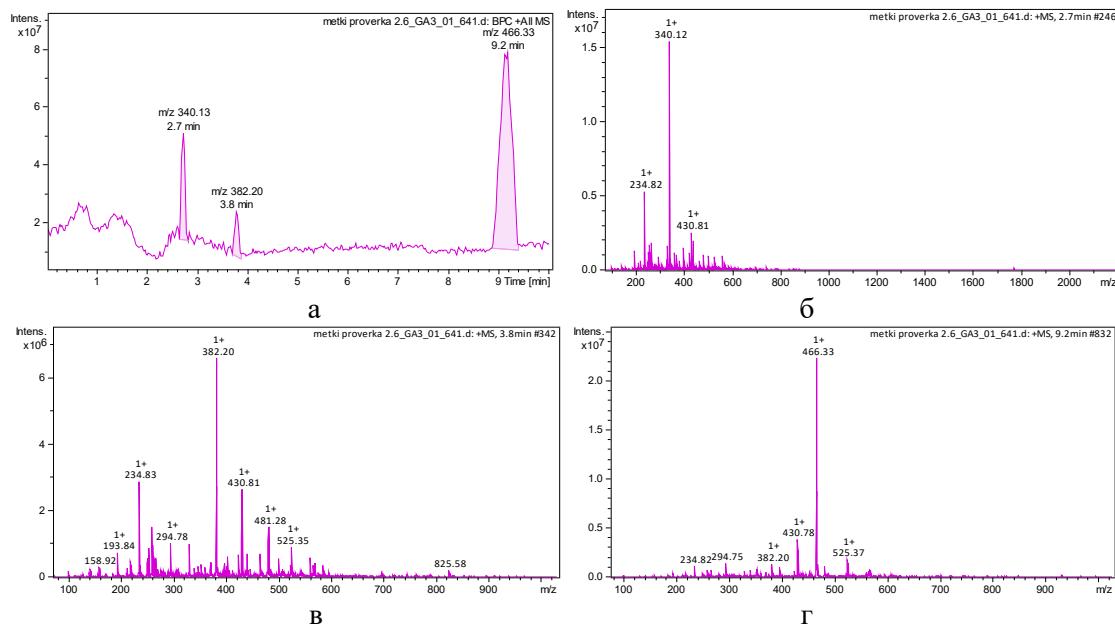


Рис. 5. Хроматограмма (а) и масс-спектры исследуемой смеси меток
 Fig. 5. Chromatogram (a) and mass spectra of the studied mixture of labels

Исходя из того, что все маркеры и их концентрации были определены верно, можно сделать вывод, что градуировочные графики и полученные уравнения нахождения концентраций верны – разработанная методика является работоспособной для смеси меток в диапазоне концентраций от 0.1 до 1 ppm.

Снижение концентраций меток в результате хранения, транспортировки нефти будет свидетельствовать о ее биодеградации. Апробированная методика универсальна: можно применять на нефти из различных месторождений, несмотря на их различный углеводородный

состав (отпадает необходимость для каждого образца нефти проведение качественного и количественного анализа предполагаемых природных меток, входящих в ее состав).

Заключение

Маркеры биодеградации сырой нефти играют критически важную роль в геохимии нефти, экологической оценке и биоремедиации. Они служат «отпечатками пальцев» или «индикаторами» процессов микробного разложения нефти в природных условиях или при искусственном очищении загрязнений.



Маркеры могут указать на то, что нефть подверглась воздействию микроорганизмов. По их присутствию и концентрации можно судить, произошла ли деградация вообще. Ни один маркер не используется изолированно. Интерпретация должна всегда основана на комплексном анализе изменений в целых группах соединений и их соотношениях. Поэтому актуально в качестве маркеров использовать несколько химических соединений, содержание которых можно детектировать современными физико-химическими методами.

Авторами разработана методика хромато-масс-спектрометрического определения концентраций, искусственно вводимых в сырью нефть пяти маркеров – индикаторов биодеградации, характеризующихся невысокой летучестью, относительно большими молекулярными массами и устойчивостью. Методика апробирована на «слепом» образце, определяемые концентрации на уровне 0.1-1 ppm.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

Список литературы/References

1. Ma Z., Zhang Y., Wang Y., Liu Y. *Geofluids*. 2024; 1(14): 4832039. <https://doi.org/10.1155/2024/4832039>
2. Ali F., Abbas S., Hanif M., Zhang S., Ahmad R., Zhang Y., Fathy D. *Journal of the Geological Society of India*. 2025; 101(4): 508-521. <https://doi.org/10.17491/jgsi/2025/174122>
3. Miranda F.L.E.C., Nery do Amaral D., Cerqueira J.R., Garcia K.S., Queiroz A.F. D.S., Machado M.E. *ACS omega*. 2024; 9(37): 38633-38647. <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c04189>
4. Wang Z., Chang X., Xu Y., Zhang P., Shi B., Ge T., Su, L. *Energy & Fuels*. 2023; 37(3): 1975-1997. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.2c03750>
5. Arekhi M., Terry L.G., John G.F., Clement T.P. *Science of The Total Environment*. 2021; 791: 148056. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148056>
6. Stout S.A., Hardenstine J. *Environmental Forensics*. 2025; 26(2): 163-179.
7. Sampaio F.X.A., Garcia K.S., de Souza Queiroz A.F., Machado M.E. *Fuel Processing Technology*. 2021; 217: 106813. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2021.106813>
8. Ehiosun K.I., Grimaud R., Lobinski R. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*. 2022; 35: e00172. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2022.e00172>
9. Mohammed S.A., Omar Zrary T.J., Hasan A.H. *Biologia*. 2023; 78(12): 3637-3651. <https://doi.org/10.1007/s11756-023-01513-4>
10. Fallahi M., Sarempour M., Mirzadi Gohari, A. *Scientific Reports*. 2023; 13(1): 22153. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-49630-z>
11. Wang, D., Li, M., Chen, J., Chen, H., & Shi, Q. *Fuel*. 2024; 359: 130499. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2023.130499>
12. Kalaiarasu S., Sharmila K.J., Jayakumar S. *Afr. J. Biomed. Res.* 2024; 27(3s): 954-965. <https://doi.org/10.53555/AJBR.v27i3S.2177>
13. Briganti A., Voltaggio M., Resitano M., Viggi C.C., Aulenta F., Carusi C., Rainaldi E. *Applied Geochemistry*. 2025; 183: 106334. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2025.106334>
14. Chuah L.F., Chew K.W., Bokhari A., Mubashir M., Show P.L. *Environmental Research*. 2022; 213: 113721. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113721>
15. Wang D., Li M., Jin Z., Xiao H., He M., Ma Y., Qin H. *Energy & Fuels*, 2025; 39(11): 5237-5246. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.4c05401>
16. Pi Y.R., Bao M.T. *Petroleum Science*. 2022; 19(4): 1905-1914. <https://doi.org/10.1016/j.petsci.2022.01.022>
17. Al-Dolaimy A.M., Al-Beyati F.M., Al-Mallah A.Y. *The Iraqi Geological Journal*. 2021; 54(1): 87-100. <https://doi.org/10.46717/igj.54.1C.7Ms-2021-03-27>
18. Jones D.M., Head I.M., Gray N.D., Adams J.J., Rowan A.K., Aitken C.M., Larter S.R. *Nature*. 2008; 451(7175): 176-180. <https://doi.org/10.1038/nature06484>



Информация об авторах / Information about the authors

И.С. Комротов – аспирант РХТУ им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

В.В. Челноков – д.т.н., профессор кафедры логистики и экономической информатики РХТУ им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

С.И. Нифалиев – д.х.н., профессор, заведующий кафедрой неорганической химии и химической технологии Воронежского государственного университета инженерных технологий, Воронеж, Россия

I.S. Komrotov – Ph. D. student of D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russian Federation E-mail: komxim@yandex.ru

V.V. Chelnokov – Doctor of Technical Sciences, Professor of the Department of Logistics and Economic Informatics of D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russian Federation E-mail: Chelnokov.v.v@muctr.ru

S.I. Nifaliev – Doctor of Chemical Sciences, Professor, Head of the Department of Inorganic Chemistry and Chemical Technology of Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

*Статья поступила в редакцию 07.08.2025; одобрена после рецензирования 19.11.2025;
принята к публикации 26.11.2025.*

*The article was submitted 07.08.2025; approved after reviewing 19.11.2025;
accepted for publication 26.11.2025.*