

丛粒藻烷类非烃化合物的分离、富集与 气相色谱纯化、制备

廖 晶^{1,2}, 张玉娇^{1,2}, 卢 鸿^{1*},
冯 乔³, 彭平安¹, 盛国英¹

(1. 中国科学院 广州地球化学研究所 有机地球化学国家重点实验室, 广东 广州 510640; 2. 中国科学院大学, 北京 100049;
3. 山东省沉积成矿作用与沉积矿产重点实验室, 山东科技大学, 山东 青岛 266000)

摘 要: 气相制备色谱(pGC)作为分离、纯化高纯度单体化合物的有效手段, 被广泛应用于许多领域。国外地球化学方面已有众多关于化石燃料生物标志物的应用实例, 而国内这方面的应用相对较少。本文选取富含丛粒藻烷类生物标志物的茂名页岩特殊样品, 尝试对非烃馏分中的目标化合物开展分离、富集和纯化、制备。在经过硅胶/氧化铝柱色谱初次分离后, 取非烃组分进行纯硅胶柱色谱二次分离, 之后再采用气相制备色谱开展精细分离和纯化, 成功制备出非烃馏分中 3 个与丛粒藻烷相关联的目标化合物, 纯度高达 95% 以上。以此为例, 介绍了气相制备色谱的使用原理和目标化合物分离、富集、纯化的经验。

关键词: 柱色谱; 气相制备色谱; 生物标志化合物; 丛粒藻烷; 非烃化合物

中图分类号: P599; P593 文献标识码: A 文章编号: 0379-1726(2018)02-0134-07

Separation, purification, and preparation of botryococcane-related non-hydrocarbons by gas preparative chromatography

LIAO Jing^{1,2}, ZHANG Yu-jiao^{1,2}, LU Hong^{1*}, FENG Qiao³, PENG Ping-an¹ and SHENG Guo-ying¹

1. State Key Laboratory of Organic Geochemistry, Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China;
2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;
3. Shandong Provincial Key Laboratory of Depositional Mineralization and Sedimentary Minerals, Shandong University of Science and Technology, Qingdao 266000, China

Abstract: Gas preparative chromatography (pGC) has found extensive application in several fields due to its high efficiency in the preparation of pure compounds; it proved to be effective for fossil fuel biomarker studies, as well. For the special oil shale extracts in the Maoming Basin, which display abundant occurrences of biomarker botryococcane derived from the green alga *Botryococcus braunii*, certain target compounds that occurred in the polar fraction had to be separated and purified for structural studies. After primary separation with the conventional “SARA” method of silica gel/ aluminum oxide column chromatography and secondary separation by means of silica gel column chromatography, pGC was used to carry out the final delicate separation and preparation. In this procedure, three non-hydrocarbon target compounds were successfully extracted with high purity (>95%). Using this vivid example, the operating principle and procedure of pGC and the separation experience of target compounds are introduced in this paper.

Key words: column chromatography; gas preparative chromatography; biomarkers; botryococcane; non-hydrocarbons

收稿日期(Received): 2017-07-03; 改回日期(Revised): 2017-09-26; 接受日期(Accepted): 2017-11-01

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项 A 类(XDA14010102); 国家重点研发计划“深地资源勘查开采”重点专项(2017YFC060310102); 国家自然科学基金(41673066, 41473045, 41602130, 41673045)

作者简介: 廖晶(1990-), 女, 博士研究生, 地球化学专业。E-mail: liaojing09@163.com

* 通讯作者(Corresponding author): LU Hong, E-mail: luhong@gig.ac.cn; Tel: +86-20-85290191

0 引 言

制备级气相色谱(Gas preparative chromatography, pGC)是纯化挥发性、半挥发性萜烯类等化合物的强有力的技术手段^[1], 一般而言, 凡是能被气相色谱检测到的化合物几乎都可以制备。pGC 通常采用大直径色谱柱来纯化更多的化合物^[2], 对挥发性、半挥发性萜烯类化合物以及同分异构体的分离制备比制备级高效液相色谱(pre-HPLC)更具有实用价值^[3-4]。

迄今为止, pGC 已被广泛应用于合成化学^[5-7]、分析化学^[4,8]、精细化工行业^[9]、化妆品中芳香成分的制备^[10-11]、环境化学^[12-14]、生物制药^[15-17]等许多领域。有机地球化学方面, 国际上也不乏对化石燃料生物标志化合物的应用实例。早在 1982 年 Rullkötter *et al.*^[18]就曾利用 pGC 分离了西格陵兰和苏伊士湾第三系沉积样品饱和烃组分中的 C₂₈-降羽扇烷; Alexander *et al.*^[19]通过该方法富集了原油中丰度很低的 1, 8-二甲基萜; Wingert *et al.*^[20]甚至做到了纯化原油样品中的孕甾烷和 20-甲基孕甾烷的同分异构体; Sutton *et al.*^[21]通过该方法从生物降解原油样品的“UCM”鼓包中分离出了 C₂₆-脱甲基三芳甾烷等化合物。这些化合物的制备除了用于确定化学结构外, 还可提高单体同位素分析等其他方面的应用。Eglinton *et al.*^[8]通过 pGC 制备了植物脂质、原油等样品中的单体烃类、甾类和脂肪酸类化合物, 用以更好地进行 ¹⁴C 定年; Pearson *et al.*^[22]采用该方法测定了圣塔莫尼卡盆地表层沉积样品中的单体长链烷烃(C₂₄~C₃₃)的放射性 ¹⁴C 和稳定碳同位素 δ¹³C 值, 来分析烷烃的来源; Slater *et al.*^[23]应用 pGC 纯化了细菌磷脂酸甲酯后, 根据其单体放射性 ¹⁴C 分析来研究原油的微生物降解。目前, 国内在有机地球化学领域对 pGC 的应用相对较少, 尚未见到化石燃料生物标志化合物方面的制备级研究。

本文尝试将气相色谱制备的方法介绍并引入到有机地球化学的研究上来, 为此, 选取了与丛粒藻烷类相关的非烃化合物为实例进行分离方法和仪器纯化方面的介绍。鉴于目标化合物存在于非烃馏分中, 直接开展仪器纯化、制备会有较大的难度和损害, 因此, 本文首先通过柱色谱对非烃馏分开展了二次分离, 再用 pGC 来精细分离、纯化并成功制备出 3 个未知化合物。以此为例, 介绍了 pGC 的仪器原理和使用方法以及化合物分离、富集和纯化方面的经验。

1 制备色谱的工作原理

pGC 主要由气相色谱仪和制备馏分收集装置两个部分组成, 图 1 为示意图。气相色谱部分与一般仪器型号基本相同, 区别只在于气相制备色谱采用大口径色谱柱, 目的是为了增大目标化合物的进样量。关键部件是制备馏分收集器(Gerstel-PFC), 主要由恒温室、分流器、冷阱和电磁阀组成。其工作原理是: 在大口径色谱柱后配备馏分分流器, 样品经色谱柱分离后, 通过馏分分流器的分流作用, 10%进入 FID 检测器, 以确定目标化合物的流出时间; 其余 90%进入馏分收集装置, 目标化合物通过冷阱捕集来实现收集。

恒温室: 由双向可控硅恒温电路控温, 可调节范围为室温至 300 °C, 正常收集时一般设置为 300 °C。

分流器: 有 7 个分支, 每个分支末端接一个收集管(体积为 100 μL)。靠近排气孔的分支作为废弃馏分收集管, 其余 6 支分别收集所需要的目标馏分。

冷阱: 对馏分收集管进行恒温甚至降温(可调节温度范围从室温到-10 °C), 使收集的馏分气体快速冷凝, 以此达到冷阱捕集的目的。

电磁阀: 每个分支上都装有微电脑控制^[25]的四氟体、低压、耐腐蚀电磁阀, 其开、闭状态直接决定了每个分支的馏分收集, 对收集效果影响很大, 要严格防止漏气和堵塞。

在数控式、按峰式制备色谱收集器中, 控制信号由色谱峰本身形成, 因此只适用于分离峰的收集。微电脑控制器控制整个收集时间段内 6 个收集分支与 1 个废弃馏分分支上的电磁阀的开闭。不收集时, 打开废弃馏分分支的电磁阀, 此时, 馏分全部进入废气收集管; 收集某特定化合物时, 根据 FID 检测器测得的该化合物的保留时间范围, 打开指定收集管分支编号的电磁阀, 此时, 该收集管便会收集目标化合物。在每一次进样程序升温的同一时间段只能打开一个电磁阀, 此时, 其余电磁阀都处于关闭状态, 以此保证收集不受干扰。

2 实验部分

2.1 样品概况

样品采自茂名盆地古近纪油柑窝组地层。茂名盆地位于广东省西部, 是我国东部典型的第三纪含

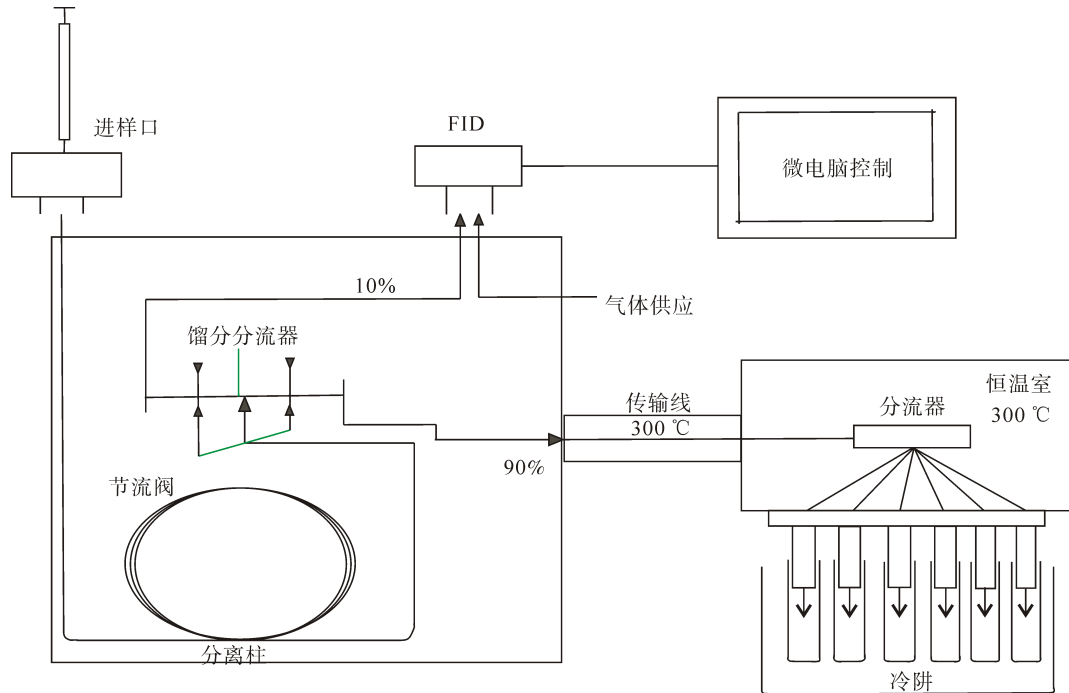
图1 制备级气相色谱及其馏分收集原理示意图^[24]

Fig.1 Schematic diagram of gas preparative chromatography and its fraction collection

油气盆地。盆地内第三系地层自下而上划分为古近系上垌组(E_{2s})、油柑窝组(E_{2-3y})和新近系黄牛岭组(N_{1h})、尚村组(N_{1sh})、老虎岭组(N_{1l})和高棚岭组(N_{2g})^[26]。油页岩主要产于油柑窝组(E_{2-3y})地层中,油页岩矿床主要分布在盆地西南部,自西向东有高州石鼓、茂名金塘和电白羊角3个采矿区。本次所用的油页岩样品,与文献[26-28]富含丛粒藻烷的样品一致,主要产自金塘矿区油页岩剖面的上部层位,靠近油柑窝组和黄牛岭组的分界线,含有丰富的丛粒藻烷。

2.2 族组分分离

使用内径约1 cm、长30 cm的空心玻璃柱进行族组分初次分离。填充料使用体积比为4:1的硅胶和氧化铝,硅胶为0.180~0.150 mm(80~100目),填充硅胶到柱20 cm处,氧化铝使用化学纯,所用洗脱化学试剂均为色谱纯。用80 mL的正己烷洗脱得到饱和烃组分;50 mL的正己烷:二氯甲烷(体积比为3:2)洗脱得到芳香烃组分;30 mL的甲醇洗脱得到非烃组分(目标化合物所在馏分)。

2.3 非烃化合物的柱色谱二次分离

由于目标化合物存在于非烃组分中,因此,需要用非烃组分来进行气相色谱制备。由于非烃组分中化合物极性较强,种类繁多,UCM鼓包也很高(图

2),直接高浓度进样不仅不利于高纯度单体的制备(受到邻近杂峰的干扰),还会损坏色谱柱,降低柱效。同时,非烃样品浓度过大直接会使样品黏度变大,也不利于进样系统的正常运行。因此,到气相制备色谱上制备之前需要尽可能将非烃馏分中的目标化合物和杂质化合物分离开来。

为此,再次使用内径约1 cm、长约30 cm的空心玻璃柱进行了摸索性的二次分离。为保证方法的推广性,所用填充料为国际上通用的0.212~0.062 mm(70~230目)的纯硅胶,填充到柱25 cm处左右。由于摸索性试验中正己烷不能再洗脱出任何化合物,而二氯甲烷可将所有目标化合物以及大部分化合物都直接洗脱下来,考虑到丛粒藻烷的链烷烃结构,后续的实验中尝试采用正己烷与二氯甲烷的极性配比梯度洗脱。最终,经过几次摸索性分离实验后,获得了一个目标化合物富集效果明显、且稳定、能够进行重复试验的方案。方案如下:对初次分离获得的非烃馏分用40 mL的正己烷:二氯甲烷(体积比为3:1)洗脱得到N1组分;再用40 mL的正己烷:二氯甲烷(体积比为2:1)洗脱得到N2组分;60 mL的正己烷:二氯甲烷(体积比为1:1)混合试剂洗脱得到N3组分;最后用30 mL的甲醇洗脱得到N4组分。所有化学试剂均为色谱纯,经GC-MS检测可知3个目标化合物主要在N2和N3组分中。

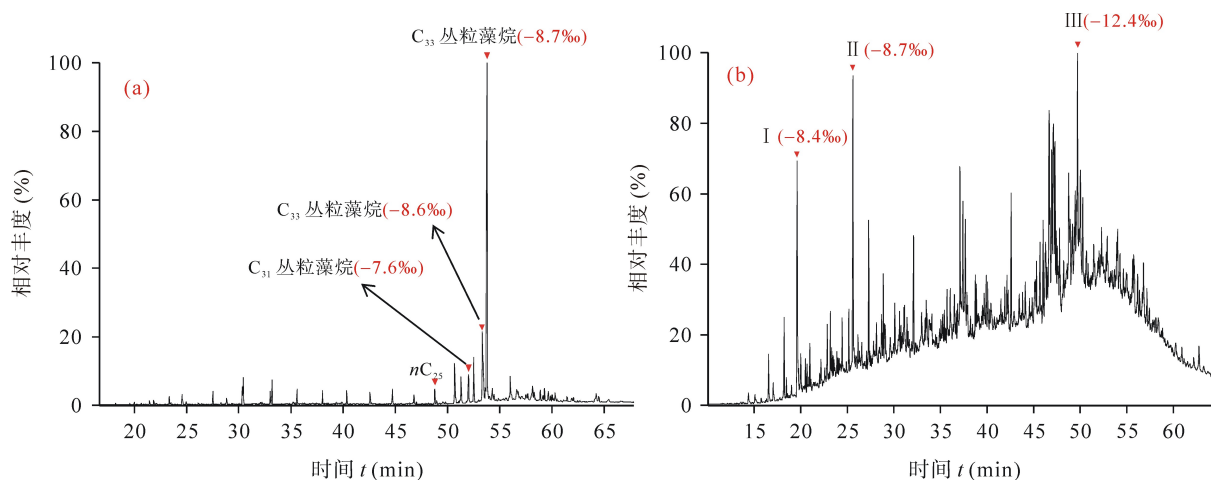


图 2 饱和烃与非烃馏分中的丛粒藻烷类与目标化合物

Fig.2 Botryococcanes in the saturated fraction (a) and the target compounds in the non-hydrocarbon fractions (b)

2.4 pGC 的精细分离与纯化

针对 N2 和 N3 组分中的 3 个目标化合物, 进一步再在制备色谱上开展精细分离和纯化。气相色谱使用安捷伦 7890A, 色谱柱使用大口径安捷伦 DB-5 气相毛细管柱, 规格为 60 m × 0.53 mm × 1.5 μm。高纯氦气为载气, 流速为 3 mL/min。非烃 N2 组分的升温程序设置为: 初始温度为 80℃, 保留 2 min, 30℃/min 升到 300℃, 保留 40 min; 非烃 N3 组分的升温程序设置为: 初始温度为 80℃, 保留 2 min, 3℃/min 升到 220℃, 10℃/min 升到 300℃, 保留 10 min。为使样品浓度维持在一个稳定值, 溶剂使用挥发性较小的色谱纯异辛烷, 调配浓度约 50 mg/mL, 使用自动进样器进样, 每针进样 5 μL。

微电脑控制器设置为 22.30~22.60 min 打开 1 号分支阀门, 收集化合物 I 进入 1 号管; 26.69~26.96 min 打开 2 号分支阀门, 收集化合物 II 进入 2 号管; 48.79~49.62 min 打开 3 号分支阀门, 收集化合物 III 进入 3 号管; 其余时间打开 0 号分支阀门, 收集其他废弃馏分进入 0 号废气管。

2.5 其他仪器分析

2.5.1 气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)分析

气相色谱使用热电 DSQII, 色谱柱为 HP-5 MS 弹性石英毛细柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)。升温程序设置为: 初始温度为 80℃, 保留 2 min, 4℃/min 升到 295℃, 保留 25 min。载气流速: 1.2 mL/min。质谱离子化方式为 EI, 70 eV。数据采集方式为全扫模式。

2.5.2 气相色谱-同位素比值质谱联用仪(GC-irMS)分析

气相色谱使用 HP6890, 联用同位素比值质谱。

色谱柱为 HP-5 弹性石英毛细柱(30 m × 0.32 mm × 0.25 μm)。升温程序设置为: 初始温度 80℃ 保留 2 min, 10℃/min 升到 130℃, 4℃/min 升到 300℃, 保留 15 min。单个化合物在经由色谱柱分离后, 逐一在 860℃ 高温下以 CuO 为催化剂完全转化为 CO₂。每个样品做 3 次, 误差小于 0.5‰。

3 结果与讨论

3.1 饱和烃组分与非烃组分的 GC-MS 分析

所取样品的饱和烃馏分中含有丰富的 C₃₁ 和 C₃₃ 丛粒藻烷类生物标志物(图 2a), 其中 C₃₃ 丛粒藻烷占绝对优势, 说明该样品生物母源输入主要是丛粒藻。对饱和烃馏分开展的单体烃稳定碳同位素分析的结果表明: C₃₁ 和 C₃₃ 丛粒藻烷的单体碳同位素(-7.6‰、-8.6‰和-8.7‰)非常重, 这成为探讨丛粒藻烷同源化合物的一个典型的比对特征。为寻找丛粒藻烷类生物标志物的前身物, 我们首先对非烃馏分开展了气相色谱-质谱分析(图 2b)。非烃馏分中化合物的结构大多都不能根据质谱碎片推断得出。然后, 对非烃馏分中的主要化合物进行了尝试性单体碳同位素分析, 发现未知结构化合物 I、II、III 的单体碳同位素分别为-8.4‰、-8.7‰和-12.4‰(图 2), 与 C₃₁ 和 C₃₃ 丛粒藻烷的单体碳同位素(-7.6‰、-8.6‰和-8.7‰)非常接近, 初步推断这 3 个化合物可能与丛粒藻烷同源。为此, 这 3 个化合物 I、II、III 被选定为目标化合物, 尝试通过制备实验将化合物制备出来, 以便于后续的化合物结构鉴定工作。

3.2 非烃组分柱色谱分离效果

从非烃组分的二次柱色谱分离的 GC-MS 检验结果可以发现, 目标化合物 I、II 最终稳定地出现在 N3 组分中, 目标化合物 III 稳定地出现在 N2 组分中(图 3)。由图 3 可知, 柱色谱分离效果很显著, 经过柱色谱二次分离后 3 个目标化合物的相对丰度显著提高, 不相关化合物大大减少, 大大方便了后续的制备实验; 提高了制备效率、减少了非烃化合物对色谱柱的破坏。非烃分离实验的成功, 也说明柱色谱对于分离富集非烃中结构相近的特定的非烃化合物具有明显效果, 是减少后续色谱柱损耗的有效途径之一。

3.3 pGC 的精细分离与纯化

根据制备色谱中 10% 的馏分开展 FID 检测的色

谱图以及目标峰的流出时间, 微电脑控制器分别收集化合物 I、II 和 III(如图 4a、4b 所示, 由于色谱柱填料、内径、膜厚以及检测器的差异, 与 GC-MS 的色谱图略有差别), 收集时间段分别为 22.30~22.60 min (I); 2.69~22.96 min (II); 48.79~49.62 min (III)。恒重后, 最终制备得到的化合物 I、II 和 III 质量分别为 1.0 mg、0.8 mg 和 1.2 mg。

制备出的 3 个单体化合物分别进行纯度分析, 结果如图 5 所示, 可见目标化合物中不含其他杂峰, 单体纯度均大于 95%, 完全满足各种实验的纯度需求。说明对于某些严格要求纯度的分析测试来说, 气相色谱制备的方法是较为合适的前处理手段。

对制备出的 3 个化合物 I、II、III 分别进行了单体碳同位素分析验证, 结果(-8.3‰、-8.5‰和 -9.2‰)仍然很重, 说明开展这 3 个化合物的结构研究有可能对追溯丛粒藻烷的前身物。

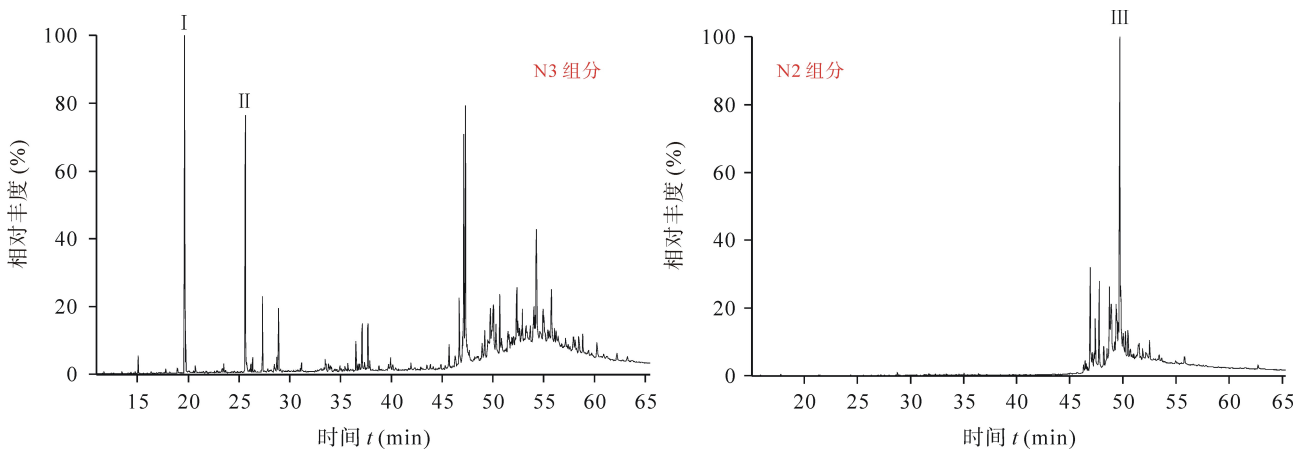


图 3 非烃二次分离后的 N2 和 N3 组分中目标化合物 I、II、III 的分布

Fig.3 Distribution of the target compounds I, II, and III in N2 and N3 constituents obtained from secondary separation

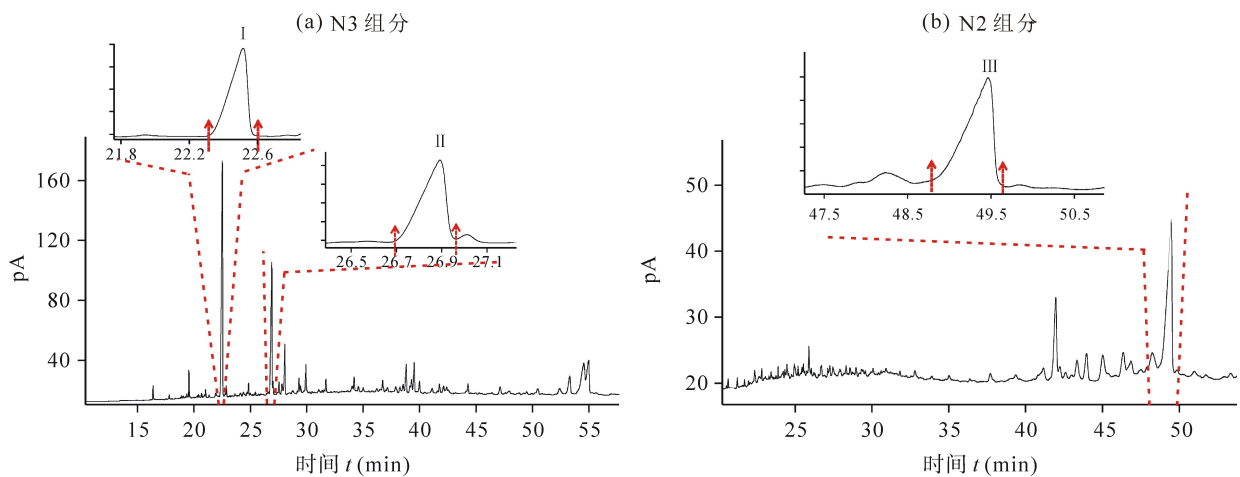


图 4 气相制备色谱上目标化合物 I、II (a) 以及 III (b) 的截取示意图

Fig.4 Capture of the target compounds I, II (a), and III (b) with gas preparative chromatography

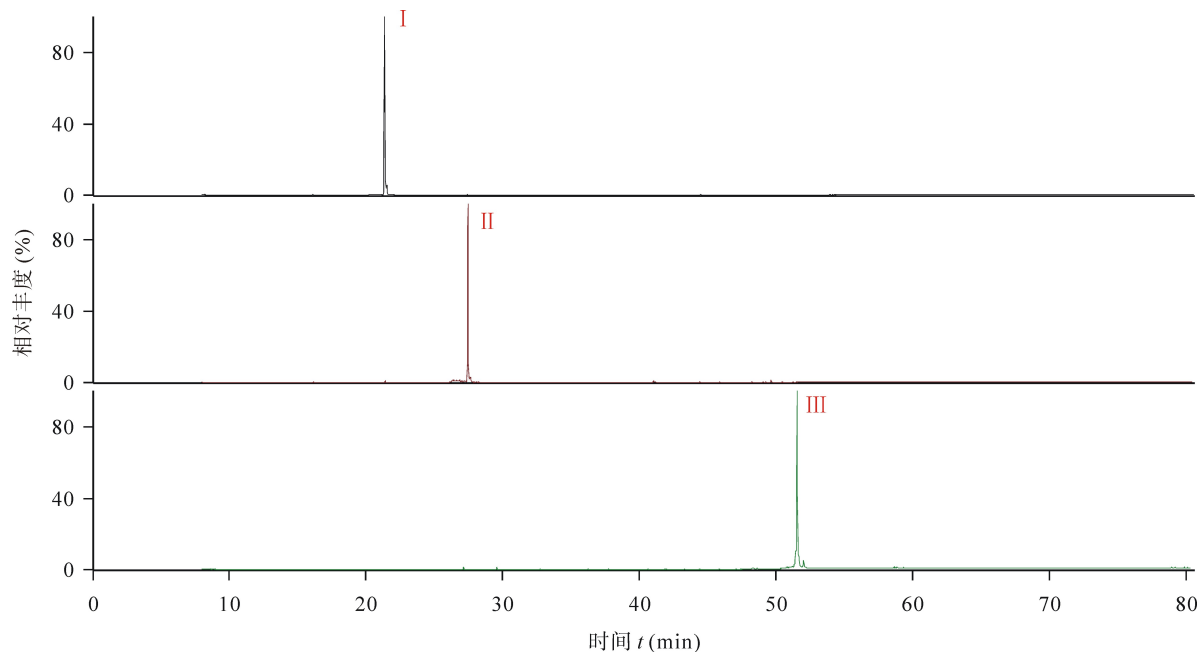


图 5 分离制备出来的三个单体目标化合物 I、II、III 的色谱图

Fig.5 TIC of the separated monomeric target compounds I, II, and III

3.4 pGC 的制备经验

pGC 制备过程中主要得到以下几点经验:

(1) 制备样品的处理: 极性较弱或化合物种类较少且目标化合物丰度较大的样品可以直接进行制备; 对于化合物种类繁多、极性较强, 尤其是目标化合物并非主峰的样品(如芳香烃组分或非烃组分), 使用 pGC 制备之前, 需要先对目标化合物开展柱色谱、薄层色谱等方法进行目标化合物的分离、富集, 尽可能除去杂峰的干扰。

(2) 微电脑收集控制: 使用微电脑控制电磁阀收集目标化合物之前, 需多次确定进样的重复性良好, 收集时微电脑设置的收集时间段与目标化合物的出峰时间一致, 尽可能保证一次制备就能够收到高纯度单体, 避免因杂质过多需要的二次制备, 提高回收率。

(3) 关于收集管的应用: 由于收集管为双通式 100 μL 易碎裂玻璃管, 收集单体过多导致收集管负荷过重可能会造成化合物损失, 因此, 隔一段时间需将收集管卸下(一般每天), 溶剂洗出所收集到的单体化合物, 收集管内溶剂吹干后装上仪器继续制备。整个过程中对于收集管都要轻拿轻放, 避免碰撞。

4 结 论

本文对 pGC 的工作原理以及功能进行了较为详

细的介绍, 并以在非烃馏分中寻找丛粒藻烷类化合物的前身物样品为例, 在确定目标化合物后, 通过摸索性试验建立了一套有效的制备方案, 分享了制备过程中一些关于样品处理、微电脑收集控制以及收集管应用方面的经验。最终制备的 3 个单体化合物经 GC-MS 检验发现, 基本上没有杂峰, 纯度大于 95%, 说明获得的目标化合物纯度较高, 完全可以满足核磁共振等具有高纯度要求的分析测试研究。实践表明, pGC 仪器是一种较为合适的前处理手段。

参考文献(References):

- [1] Nojima S, Kiemle D J, Webster F X, Roelofs W L. Submicro scale NMR sample preparation for volatile chemicals [J]. *J Chem Ecol*, 2004, 30(11): 2153–2161.
- [2] Henly R S, Royer D J. Preparative gas chromatography [J]. *Methods Enzymol*, 1969, 14: 450–464.
- [3] Zuo H L, Yang F Q, Huang W H, Xia Z N. Preparative gas chromatography and its applications [J]. *J Chromatogr Sci*, 2013, 51(7): 704–715.
- [4] Rühle C, Niere J O, Morrison P D, Jones R C, Caradocdavies T T, Cauty A J, Michael G G, Vicki A T, Marriott P J. Characterization of tetra-aryl benzene isomers by using preparative gas chromatography with mass spectrometry, nuclear magnetic resonance spectroscopy, and X-ray crystallographic methods [J]. *Anal Chem*, 2010, 82(11): 4501–4509.
- [5] Crandall J K, Machleder W H. Peracid oxidation of tetramethylallene [J]. *J Am Chem Soc*, 1968, 90(26): 7292–7296.
- [6] Marshall J A, Pike M T. Stereoselective total synthesis of γ -eudes-mol [J]. *Tetrahedron Lett*, 1966, 7(41): 4989–4992.

- [7] Krafft C, Brennecke S, Ott F, Backes M, Salzer R, Grunenberg J, Jakob P L, Gerhard E K, Berthold W. High-impact sulfur compounds: Constitutional and configurational assignment of sulfur-containing heterocycles [J]. *Chem Biodiver*, 2008, 5(6): 1204–1212.
- [8] Eglinton T I, Aluwihare L I, Bauer J E, Druffel E, McNichol A P. Gas chromatographic isolation of individual compounds from complex matrices for radiocarbon dating [J]. *Anal Chem*, 1996, 68(5): 904–912.
- [9] 白鹏, 邵想想, 易秉智. 金属丝网载体气液色谱分离过程的研究[J]. *化工科技*, 2007, 15(3): 29–31.
Bai Peng, Shao Xiang-xiang, Yi Bing-zhi. Study on separating process of gas liquid chromatography using wire mesh as carrier [J]. *Sci Technol Chem Ind*, 2007, 15(3): 29–31.
- [10] Ledauphin J, Saint Clair J F, Lablanquie O, Guichard H, Fournier N, Guichard E, Barillier D. Identification of trace volatile compounds in freshly distilled calvados and cognac using preparative separations coupled with gas chromatography-mass spectrometry [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(16): 5124–5134.
- [11] Marriott P J, Eyres G T, Dufour J P. Emerging opportunities for flavor analysis through hyphenated gas chromatography [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(21): 9962–9971.
- [12] Currie L A, Eglinton T I, Benner B A, Pearson A. Radiocarbon “dating” of individual chemical compounds in atmospheric aerosol: First results comparing direct isotopic and multivariate statistical apportionment of specific polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. *Nucl Instr Meth Phys Res B*, 1997, 123(1/4): 475–486.
- [13] Ball G I, Xu L, McNichol A P, Aluwihare L I. A two-dimensional, heart-cutting preparative gas chromatograph facilitates highly-resolved single-compound isolations with utility towards compound-specific natural abundance radiocarbon (^{14}C) analyses [J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1220: 122–131.
- [14] Meinert C, Schymanski E, Küster E, Kühne R, Schürmann G, Brack W. Application of preparative capillary gas chromatography (pcGC), automated structure generation and mutagenicity prediction to improve effect-directed analysis of genotoxicants in a contaminated groundwater [J]. *Environ Sci Pollut R*, 2010, 17(4): 885–897.
- [15] Codina A, Ryan R W, Joyce R, Richards D S. Identification of multiple impurities in a pharmaceutical matrix using preparative gas chromatography and computer-assisted structure elucidation [J]. *Anal Chem*, 2010, 82(21): 9127–9133.
- [16] Needham L L, Hill R H Jr, Orti D L, Patterson, D.G., Kimbrough R D, Groce D F, Liddle J A. Investigation of hyperkeratotic activity of polybrominated biphenyls in firemaster FF-1 [J]. *J Toxicol Env Health A*, 1982, 9(5/6): 877–887.
- [17] Smith K, Reynolds N, Downie S, Patel A, Rennie M J. Effects of flooding amino acids on incorporation of labeled amino acids into human muscle protein [J]. *Am J Physiol Endoc M*, 1998, 275(1): E73–E78.
- [18] Rullkötter J, Leythaeuser D, Wendisch D. Novel 23, 28-bisnorlupanes in Tertiary sediments: Widespread occurrence of nuclear demethylated triterpanes [J]. *Geochim Cosmochim Acta*, 1982, 46(12): 2501–2509.
- [19] Alexander R, Kagi R I, Sheppard P N. Relative abundance of dimethylnaphthalene isomers in crude oils [J]. *J Chromatogr A*, 1983, 267: 367–372.
- [20] Wingert W S, Pomerantz M. Structure and significance of some twenty-one and twenty-two carbon petroleum steranes [J]. *Geochim Cosmochim Acta*, 1986, 50(12): 2763–2769.
- [21] Sutton P A, Lewis C A, Rowland S J. Isolation of individual hydrocarbons from the unresolved complex hydrocarbon mixture of a biodegraded crude oil using preparative capillary gas chromatography [J]. *Org Geochem*, 2005, 36(6): 963–970.
- [22] Pearson A, Eglinton T I. The origin of n-alkanes in Santa Monica Basin surface sediment: a model based on compound-specific $\Delta^{14}\text{C}$ and $\delta^{13}\text{C}$ data [J]. *Org Geochem*, 2000, 31(11): 1103–1116.
- [23] Slater G F, Nelson R K, Kile B M, Reddy C M. Intrinsic bacterial biodegradation of petroleum contamination demonstrated in situ using natural abundance, molecular-level ^{14}C analysis [J]. *Org Geochem*, 2006, 37(9): 981–989.
- [24] Yang F Q, Wang H K, Chen H, Chen J D, Xia Z N. Fractionation of volatile constituents from Curcuma rhizome by preparative gas chromatography [J]. *J Anal Methods Chem*, 2011, 2011: 1–6.
- [25] 胡裕杰, 王栋良, 姚建华, 钱益民, 张夏妹, 陈玲莉. 微电脑控制气相制备色谱收集器[J]. *色谱*, 1988, 6(3): 178–180.
Hu Yu-jie, Wang Dong-liang, Yao Jian-hua, Qian Yi-min, Zhang Xia-mei, Chen Ling-li. A microprocessor controlled gas chromatography preparative collector [J]. *Chinese J Chromatogr*, 1988, 6(3): 178–180 (in Chinese with English abstract).
- [26] 李殿超, 朱建伟, 严焕榕, 郭敏, 郑志文. 广东省茂名盆地油页岩的沉积特征及分布规律[J]. *吉林大学学报(地球科学版)*, 2006, 36(6): 938–943.
Li Dian-chao, Zhu Jian-wei, Yan Huan-rong, Guo Min, Zheng Zhi-wen. Sedimentary characteristics and distribution rule of oil shale in Maoming Basin in Guangdong Province [J]. *J Jilin Univ (Earth Sci Ed)*, 2006, 36(6): 938–943 (in Chinese with English abstract).
- [27] 傅家谟, 徐芬芳, 陈德玉, 刘德汉, 胡成一, 贾蓉芬, 徐世平, Brassell A S, Eglinton G. 茂名油页岩中生物输入的标志化合物[J]. *地球化学*, 1985, 14(2): 99–114.
Fu Jia-mo, Xu Fen-fang, Chen De-yu, Liu De-han, Hu Cheng-yi, Jia Rong-fen, Xu Shi-ping, Brassell A S, Eglinton G. Biomarker compounds of biological inputs in Maoming oil shale [J]. *Geochimica*, 1985, 14(2): 99–114 (in Chinese with English abstract).
- [28] Brassell S C, Brereton R G, Eglinton G, Grimalt J, Liebezeit G, Marlowe I T, Pflaumann U, Sarnthein M. Palaeoclimatic signals recognized by chemometric treatment of molecular stratigraphic data [J]. *Org Geochem*, 1986, 10(4/6): 649–660.