

文章编号: 0254 - 5357(2008)06 - 0435 - 06

古气候古环境研究中类脂化合物单体同位素分析

王晓华^{1,2}, 石丽明³, 刘美美⁴, 孙青^{4*}, 储国强¹

(1. 中国科学院地质与地球物理研究所, 北京 100029; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049;
3. 中国地质大学(北京)地球科学与资源学院, 北京 100083; 4. 国家地质实验测试中心, 北京 100037)

摘要: 高精度准确测定类脂化合物单体同位素比值对重建古气候古环境具有重要意义。论述了古气候、古环境研究中适合单体同位素分析的类脂化合物提取、分离富集方法, 介绍了单体化合物碳、氢同位素的仪器分析方法。

关键词: 类脂化合物; 单体同位素比值; 样品前处理; 气相色谱-同位素比值质谱技术
中图分类号: O628; P593 **文献标识码:** A

Specific Isotope Analysis of Lipid Biomarker Compounds Applied in Paleoclimate and Paleoenvironment Reconstruction

WANG Xiao-hua^{1,2}, SHI Li-ming³, LIU Mei-mei⁴, SUN Qing^{4*}, CHU Guo-qiang¹

(1. Institute of Geology and Geophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100029, China;
2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China;
3. School of the Earth Sciences and Resources, China University of Geoscience, Beijing 100083, China;
4. National Research Center for Geoanalysis, Beijing 100037, China)

Abstract: The technique of gas chromatography-isotope ratio mass spectrometry (GC-IRMS) has obtained significant development since 1970s. The development make it possible to measure the compound-specific isotope ratio of lipid biomarkers in organic matters. This paper presents the development in sample preparation (extraction and separation), improvement of the instruments and analytical methods of GC-IRMS, and its applications in the research on paleoclimate and paleoenvironment reconstruction.

Key words: lipid biomarkers compound; specific isotope ratio; sample preparation; gas chromatography-isotope ratio mass spectrometry

自世界上第一台色谱-同位素比值质谱(GC-IRMS)商业化以来,类脂化合物的单体同位素就成为古气候、古环境研究的有力工具^[1-2]。类脂化合物(烷烃、脂肪酸、醇、烯酮等)的单体碳同位素被广泛应用于追溯沉积物的来源^[3-15],推测植被的相对变化,研究控制植被扩张的环境与气候因素^[15-18]。类脂化合物的单体氢同位素组成^[19-21]对突发性气

候事件高度敏感,反映了生物合成时利用的水源的氢同位素组成和一些与水循环有关的有机地球化学信息^[22],可以重建过去的温度、湿度、大气降水同位素(δD)的变化^[19,23]。

精确分析沉积物、石笋等环境介质中有机化合物单体同位素比值对重建古气候古环境具有重要意义。环境介质中有机化合物组成复杂、含量低,用

收稿日期: 2008-04-18; 修订日期: 2008-07-22

基金项目: 国家自然科学基金项目资助(40772119;40572101); 国土资源部百人计划项目资助; 国家地质实验测试中心院长基金项目资助; 国土资源部地质大调查项目资助(1212010816028)

作者简介: 王晓华(1983-),女,山东烟台人,硕士研究生,第四纪地质学专业。E-mail: yingkongshi7@163.com。

通讯作者: 孙青(1967-),女,安徽寿县人,研究员,地球化学专业。E-mail: sunqingemail@yahoo.com.cn。

GC-IRMS 测定有机质单体化合物同位素组成的灵敏度比气相色谱、气相色谱/质谱低得多,测量的精度依赖于高含量目标化合物间的分离程度高低,分离程度高,测量精度高;与气相色谱、气相色谱/质谱测量所需的样品前处理相比,GC-IRMS 测量需要更加高效的提取富集方案和更加彻底的目标物分离、纯化措施。前处理过程中避免同位素分馏对获得准确的同位素比值至关重要^[24]。本文主要介绍类脂化合物的提取、净化分离方法,以及 GC-IRMS 分析单体同位素比值的方法。

1 类脂化合物的提取

提取环境样品中生物标志化合物的溶剂主要有氯仿、二氯甲烷、正己烷和甲醇等。提取方法主要有索氏提取、超声提取、微波消解、超临界流体萃取、加速溶剂萃取等,各种提取方法各有优缺点。

索氏提取是一种经典高效的提取方法,但所用时间太长,有机试剂用量大。

超声提取设备相对便宜,适宜于样品量小、批量样品的操作,并且重复进行可以提高提取效率;但重复进行比较繁琐,时间、试剂用量和劳动力耗费很大^[25]。

微波消解是基于有机试剂在电磁场中震荡,吸收电磁辐射的能量发生重排而转化为热能,不像传统的通过红外能或热传导来加热,微波消解能够使溶剂整体同时升温^[25]。较之传统的提取方法(索氏提取、超声提取),微波消解提取的优势是样品回收率较高,提取时间缩短,试剂用量较少^[26-27]。

超临界流体萃取技术是在超临界状态下,将超临界流体与待提取的物质接触,使其有选择性地把握极性、沸点和分子量不同的成分依次萃取出来,从而达到提取、分离提纯的目的。超临界流体萃取的优势是样品需要量少,萃取速度快,并且还是一种环境友好的提取方法^[28]。

对于复杂样品的前处理,人们作了多种尝试(自动索氏提取、超声提取、微波消解和超临界萃取等),以期找到一种高效、快捷的方法取代传统的萃取法。20世纪90年代发展起来的加速溶剂萃取是一种在提高温度(50~200℃)和压力(1013~2016 MPa)的条件下,用有机溶剂萃取的方法。该方法的优点是自动化程度高、有机溶剂用量少、速度快、基体影响小、萃取效率高、选择性好^[29-30]。加速溶剂萃取目前被广泛应用于类脂化合物的提取,并取得了很好的效果^[19-20,22,31-33];但较高的温度可能导致某些脂肪酸类生物标志化合物分解。

目前古气候古环境研究中,索氏提取、超声提取和加速溶剂萃取是广泛使用的类脂化合物提取方法;而微波消解和超临界流体萃取没有得到广泛的应用。

类脂化合物可以分为自由相和键合相类脂化合物。未经处理的干燥或湿润样品利用上述溶剂提取的方法只能提取颗粒表面的和溶剂可以达到的颗粒内部的有机质——分散可溶有机质或自由相类脂化合物。经典的键合相类脂化合物是指分散可溶有机质提取后的样品经 KOH-甲醇溶液回流皂化后释放的与大分子结合的类脂化合物。目前存在许多不同的化学处理方法,不同的化学处理可以释放不同来源的类脂化合物。近年来比较引人注目的化学处理方法是盐酸酸解法,被认为可以释放细菌来源的通过酰胺键与其他细胞等结合的脂肪酸。酸解法还是一种对碳酸盐含量高的样品的常用的处理方法^[33-36]。直接萃取法提取碳酸盐中分散可溶有机质;但是碳酸盐中还存在相当数量的晶包有机质^[37],可以通过样品酸解增加生物标志化合物的提取量,减少样品的使用量。例如,石笋中含有的生物标志化合物非常低,最丰富的生物标志化合物 $n-C_{16}$ 脂肪酸的含量小于 $2 \mu\text{g/g CaCO}_3$,一般需要 70~100 g CaCO_3 才能提取满足丰度分析所需的目标化合物^[38],酸解后降低了污染,同时释放了溶剂直接提取不能提取的大分子键合相的有机化合物,样品的使用量降至 10 g,时间分辨率从千年提高至 10~100 年^[39]。但是自由相和键合相类脂化合物的分布和碳同位素组成可能存在明显差异^[36],自由相和键合相类脂化合物的同时提取,可能损失许多环境信息,因为不同的有机组分可能来自不同的源,反映不同的气候变化。近年来,顺序提取的方法在土壤和沉积物的提取中受到关注^[40],一些研究集中在顺序提取的优化和提取物反映的古气候、古环境意义方面的研究。

2 类脂化合物的净化分离

提取的类脂化合物中,存在成千上万种有机化合物,在色谱图上表现为未分峰;此外,GC-IRMS 分析所需进样量远远超过普通色谱柱的容量,致使峰宽变宽、拖尾,分辨率降低,分离效果变差;但类脂化合物的单体同位素准确分析需要保证目标化合物不受共流出组分的干扰,在 GC-MS 图上表现出基线分离^[24]。所以,单体同位素分析对目标物的净化分离要求比类脂化合物的丰度分析(GC 和 GC-MS

分析)高,一般采取多级分离方案,即在族分离之后,依据目标化合物和共流出杂质化合物间性质的差异,采取特殊的方法,分离纯化目标化合物。

在对正构烷烃进行单体同位素分析时,为了提高测定结果的精度和准确度,需要将正构和异构烷烃分离开来,以减少不同构型的分子化合物之间的相互影响^[41-43]。利用交叉通道的三维网状交叉结构5A分子筛选择吸收正构烷烃,可以将正构和异构烷烃分离^[44]。传统的分析流程是把5A分子筛与溶解在苯、甲苯、异构辛烷或环己烷中的样品回流24 h^[45],正构烷烃被分子筛吸附,然后用稀氢氟酸溶解分子筛,把吸附在分子筛上的正构烷烃释放出来^[42],这种前处理方法可以用于定量分析正构烷烃的丰度和单体同位素比值。Collister^[45]和Grice等^[42]发展了一种更加新颖的方法:不用氢氟酸溶解分子筛,而是利用正己烷回流的方式,洗脱吸附在分子筛上的正构烷烃,这种快速、安全的分离流程适合正构烷烃的单体碳同位素分析;但不能用于定量分析低分子量正构烷烃的丰度。随后Grice等^[42]改进了这种分离方法,用含12%环己烷的正戊烷溶液来解析吸附在5A分析筛上的正构烷烃($C_8 \sim C_{30}$),回收率达到90%以上,而且没有同位素分馏的迹象,适用于单体同位素分析。尿素络合或尿素络合的薄层色谱法可以分离正构和异构烷烃,并且适合正构烷烃的单体同位素分析,是一种危险性较小的方法;但通常由于操作过程中的蒸发作用而丢失低分子量的烃^[46],而且效果不如分子筛法,同时,低温络合用时太长(4~5天);常温络合用时短,但操作不便。

脂肪酸的净化和分离相对成熟,类脂经简单的硅胶柱色谱分离后获得的脂肪酸馏分,衍生化后上机测定时,100%的甲基硅酮色谱柱不能分离16:1/16:0或18:2/18:1/18:0脂肪酸甲酯等化合物对,AgNO₃络合色谱可以有效地把饱和与不饱和脂肪酸分离开来,16:0、18:0和18:1脂肪酸甲酯的回收率达到100%,AgNO₃络合色谱分离前后的 $\delta^{13}C$ 值没有发生同位素分馏^[47]。另一可能发生的问题是一些脂肪酸(16:1或18:1)与异构体的共洗脱,只能测定目标物与异构体总和的同位素比值^[48]。

长链不饱和酮的单体同位素分析,尤其是单体氢同位素分析十分困难,在C₃₇和C₃₈长链烯酮的GC和GC-MS分析时需要1 ng左右的进样量,在这种条件下,各种烯酮化合物能很好地分离;然而对于单体同位素的测量,单体碳同位素比值测量需要70 ng

的进样量,单体氢同位素比值测量至少需要400 ng的进样量,远远超过普通气相色谱柱的容量,使得碳链长度相同但饱和度不同的烯酮共洗脱。一些有关长链烯酮同位素研究只是报道共洗脱烯酮的混合 δD 值^[49-50]。William等^[51]利用AgNO₃硅胶色谱,比较有效地分离了不同数目双键的长链烯酮,用于单体烯酮化合物氢同位素分析,提高了分析精度(C_{37:3}的精度为1.7‰,C_{37:2}为0.6‰)。Schwab等^[52]利用高效液相色谱(HPLC)净化长链烯酮,减少了进样量,并使长链烯酮的回收率达到最高;但他没有列出长链烯酮的回收率。标准加入法研究表明,当C_{37:3}长链烯酮的回收率达到92%时,可以准确测定长链烯酮的单体同位素比值,分离过程不引起长链烯酮的同位素分馏^[52]。

对于一些化合物(如甾醇、羟基何伯烷、三萜醇)在自然界含量较高,且生物源比较确定,是古环境研究的良好工具;但它们具有相似的分子量、极性和挥发性,分离起来比较困难。传统的净化方式,尿素络合、柱色谱、AgNO₃络合硅胶薄层色谱等对目标物的分离效果不佳、回收率低不易重复、而且容易造成同位素分馏;而HPLC法是分离这些化合物的有效方式。脂肪酸、甾醇和甲藻甾醇经HPLC净化后回收率较高(达60%以上),而且HPLC进样和组分收集实现了自动化,可以快速、重复进行,分离效果稳定可靠^[24,52]。HPLC法分离净化类脂化合物用于单体同位素分析是一种比较理想的选择。

3 气相色谱-同位素比值质谱分析

1976年Sano首次提出在气相色谱和质谱之间加一个燃烧炉来实现复杂混合物中的单体化合物同位素组成的在线分析,随后经多人改造,提高了GC-IRMS在线测定有机质单体化合物同位素组成的灵敏度和精度,目前GC-IRMS分析类脂化合物单体碳同位素所需进样量50~100 ng,分析单体氢同位素所需进样量200~400 ng,使得有机质的同位素组成研究达到了分子水平^[53]。

仪器接口技术、色谱各种参数和数据处理方式等明显影响了单分子同位素分析结果的精度和准确度^[54-56]。GC-IRMS仪器的氧化炉、除水和分流装置,以及与其他装置相连的接口带来许多潜在问题,例如氧化炉接口,通常的做法是用口径很大的玻璃或陶瓷炉管与毛细管连接,死体积增加,且易于产生泄漏。Leroy等^[54]把传统的玻璃或陶瓷

管的炉子换成聚酰亚胺毛细氧化管炉子,这种设计的优势是:接口减少,降低了泄漏发生的可能性;在氧化炉处没有死体积,减少了化合物间的干扰,使色谱峰的分辨率几乎不会有损失,测定的同位素比值更加准确。

在测定碳同位素比值时,由于色谱分离的同位素效应, $^{13}\text{CO}_2$ 的 m/z 45 信号平均而言比 $^{12}\text{CO}_2$ 的 m/z 44 早 150 ms,这种时间移位主要取决于化合物的性质和色谱的参数,例如固定相的极性、柱温和载气流量,所以峰检测的时间窗设置不合适可能导致峰信息丢失,峰积分不完整会严重影响同位素的准确测定^[57]。气相色谱升温程序不仅影响有机化合物的分离,而且影响基线的斜率,所以影响单体同位素测定结果。选择单一升温速率或在待测化合物溢出的时间范围内保持较平缓的升温梯度,对多拐点基线模式进行分段数据处理等方法可提高分析结果的精度和准确度^[43]。此外,分流进样和载气流速也会影响 $\delta^{13}\text{C}$ 的测定^[56]。

样品的净化和分离技术可以减少但不能消除共洗脱对测量精度和准确度的影响,在测定气相色谱流出物的单体同位素比值的同时,需要利用质谱定性检测样品,可以了解是否存在共洗脱的影响,以控制和保证同位素比值测量质量。质谱定性检测有在线和离线两种方式,在线方式的 GC-IRMS 设备同时并联四级杆质谱,经 GC 分离的样品被分流,一部分进入四级杆质谱定性,一部分进入磁质谱测量同位素比值,保证了定性和同位素比值测定的物质的一致性,但降低了检测信号。有些实验室采用离线检测的方式;但离线方式难以保证定性和同位素比值测定的物质的一致性。近来, Vetter^[58]等通过对 GC-IRMS 的色谱进行求导,发现导数色谱可以监测目标物的同位素测量时是否受到共流出杂质的影响,有助于区分合格与不合格数据,可以对目标物的同位素分析进行有效的质量监控。

4 结语

样品前处理是高精度准确分析类脂化合物的单体同位素的关键。目前,在古气候古环境的有机地球化学研究方面,经典的索氏提取、超声提取方法和新颖的加速溶剂萃取类脂化合物方法共存;但研究介质中类脂化合物的不同提取方法、提取效率缺乏系统比较。加速溶剂萃取提取古气候研究介质中类脂化合物的方法应用虽广;但方法优化并不多见。自由相和键合相类脂化合物的顺序提取物

可能反映了不同的古气候古环境意义,因此,顺序提取方法的研究将备受瞩目。类脂化合物常用的分离富集方法难以满足同位素准确测定要求,一般需要选择合适的多级分离方法降低共流出物对目标化合物分析的影响,简单的柱色谱之后采取无氢氟酸溶解的分子筛络合法、硝酸银络合色谱和高效液相色谱分离净化类脂化合物用于单体同位素分析是比较理想的选择。仪器接口技术、色谱参数和数据处理方式等的改进明显提高了单分子同位素分析结果的精度和准确度。总之,随着气相色谱-同位素比值质谱技术的不断完善,相关前处理技术的逐步发展,类脂化合物单体碳、氢同位素的测定将会更加准确,精度更高。

5 参考文献

- [1] Enno Schefuß, Stefan Schouten, Ralph R Schneider. Climatic controls on central African hydrology during the past 20000 years [J]. *Nature*, 2005, 437: 1003 - 1006.
- [2] Yoshito Chikaraishi, Hiroshi Naraoka. $\delta^{13}\text{C}$ and δD identification of sources of lipid biomarkers in sediments of Lake Haruna (Japan) [J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2005, 69(13): 3285 - 3297.
- [3] Collister J W, Rieley G, Stern B, Eglinton G, Fry B. Compound-specific $\delta^{13}\text{C}$ analyses of leaf lipids from plants with differing carbon dioxide metabolisms [J]. *Organic Geochemistry*, 1994, 21: 619 - 627.
- [4] Simoneit B R T. Compound-specific carbon isotope analyses of individual long-chain alkanes and alkanolic acid in Harmattan aerosols [J]. *Atmospheric Environment*, 1997, 31: 2225 - 2233.
- [5] James W Collister, Gareth Rieley, Benjamin Stern. Compound-specific $\delta^{13}\text{C}$ analyses of leaf lipids from plants with differing carbon dioxide metabolisms [J]. *Org Geochem*, 1994, 21: 619 - 627.
- [6] Donna C Ballentine, Stephen A Macko, Vaughan C Turekian. Variability of stable carbon isotopic compositions in individual fatty acids from combustion of C_3 and C_4 plants: Implications for biomass burning [J]. *Chemical Geology*, 1998, 152: 151 - 161.
- [7] Chu Guoqiang, Sun Qing, Li Shengqiang, Zheng Mianping, Jia Xinxian, Lu Caifen, Liu Jiaqi, Liu Tungsheng. Long-chain alkenone distributions and temperature dependence in lacustrine surface sediments from China [J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2005, 69: 4985 - 5003.
- [8] 郑艳红,程鹏,周卫建. 正构烷烃及单体碳同位素的古植被与古气候意义 [J]. *海洋地质与第四纪地质*, 2005, 25(1): 99 - 103.
- [9] 郭志刚,杨作升,林田,李钜源. 东海泥质区单体正构

- 烷烃的碳同位素组成及物源分析[J]. 第四纪研究, 2006, 26(3):384-390.
- [10] 段毅, 马兰华. 生物标志化合物碳同位素地球化学研究的几个相关问题[J]. 地球科学进展, 1996, 11(4):356-361.
- [11] Gareth Rieley, Robert J Collier, David M Jones, Geoffrey Eglinton, Paul A Eakin, Anthony E Fallick. Sources of sedimentary lipids deduced from stable carbon isotope analyses of individual compounds [J]. *Nature*, 1991, 352:425-427.
- [12] Duan Y, Wen Q B, Luo B J. Isotopic composition and probable origin of individual fatty acids in modern sediments from Ruoergai Marsh and Nansha Sea, China [J]. *Organic Geochemistry*, 1997, 27:583-589.
- [13] 段毅, 文启彬, 郑国东, 罗斌杰. 南沙海洋现代沉积物中的单体醇化合物碳同位素研究[J]. 中国科学, 1997, 27(2):164-167.
- [14] 段毅, 王智平. 南沙海洋沉积单体长链正构烷烃成因的碳同位素证据[J]. 科学通报, 2001, 46(23):2003-2006.
- [15] Huang Yongsong, Lydie Dupont, Michael Sarnthein, John M Hayes, Geoffrey Eglinton. Mapping of C₄ plant input from North West Africa into the North East Atlantic sediments [J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2000, 64:3505-3513.
- [16] Huang Y, Street-Perrott F A, Metcalfe S E, Brenner M, Moreland M, Freeman K H. Climate change as the dominant control on glacial-interglacial variations in C₃ and C₄ plant abundance [J]. *Science*, 2001, 293:1647-1651.
- [17] Huang Yongsong, Street-Perrott F Alayne, Perrott R Alan, Metzger Pierre, Geoffrey Eglinton. Glacial interglacial environmental changes inferred from molecular and compound-specific $\delta^{13}\text{C}$ analyses of sediments from Sacred Lake, Mt. Kenya [J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1999, 63:1383-1404.
- [18] Huang Yongsong, Steven C Clemens, Liu Weiguo, Wang Yi, Warren L Prell. Large-scale hydrological change drove the late Miocene C₄ plant expansion in the Himalayan foreland and Arabian Peninsula [J]. *Geology*, 2007, 35(6):531-534.
- [19] Hou Juzhi, Huang Yongsong, Wang Yi. Postglacial climate reconstruction based on compound-specific D/H ratios of fatty acids from Blood Pond, New England [J]. *Geochimistry Geophysics Geosystems*, 2006, 7(3):1-11.
- [20] Sauer P E Eglinton, Hayes T I, Schimmelmann Arndt J M, Sessions Alex L. Compound-specific D/H ratios of lipid biomarkers from sediments as a proxy for environmental and climatic conditions [J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2001, 65:213-222.
- [21] Huang Yongsong, Bryan Shuman, Wang Yi, Thompson Webb III. Hydrogen isotope ratios of palmitic acid in lacustrine sediments record late quaternary climate variations [J]. *Geology*, 2002, 30(12):1103-1106.
- [22] Ashley A Jones, Alex L Sessions, Brian J Campbell, Li Chao, David L Valentine. D/H ratios of fatty acids from marine particulate organic matter in the California Borderland Basins [J]. *Organic Geochemistry*, 2008, 39(5):485-500.
- [23] Nott C J, Xie S. n-alkane distributions in ombrotrophic mires as indicators of vegetation change related to climatic variations [J]. *Organic Geochemistry*, 2000, 31:231-235.
- [24] Rienk H Smittenberg, Julian P Sachs. Purification of dinosterol for hydrogen isotopic analysis using high-performance liquid chromatography mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2007 (1169):70-76.
- [25] Oksana Kornilova, Antoni Rosell-Melé. Application of microwave-assisted extraction to the analysis of biomarker climate proxies in marine sediments [J]. *Organic Geochemistry*, 2003, 34:1517-1523.
- [26] Pastora A, Vázquez E, Ciscar R, Guardia M de la. Efficiency of the microwave-assisted extraction of hydrocarbons and pesticides from sediments [J]. *Analytica Chimica Acta*, 1997, 344:241-249.
- [27] Blanco E V, Mahia P L, Lorenzo S M, Rodríguez D P, Fernández E F. Optimization of microwave-assisted extraction of hydrocarbons in marine sediments: Comparison with the Soxhlet extraction method [J]. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 2000, 366:283-288.
- [28] Hopfgartner G, Veuthey Jean-Luc, Fazil O G la ar, Armand Buchs. Extraction of biomarkers from sediments with supercritical carbon dioxide: A comparative study with solvent extraction and thermodesorption methods [J]. *Organic Geochemistry*, 1990, 15:397-402.
- [29] 牟世芬, 刘克纳, 阎炎, 侯小平, 宋强, 沈冬青. 加速溶剂萃取技术及其在环境分析中的应用 [J]. 环境化学, 1997, 16(4):387-391.
- [30] 牟世芬, 刘建勇. 加速溶剂萃取的原理及应用 [J]. 现代科学仪器, 2001(3):18-20.
- [31] Huang Yongsong, Bryan Shuman, Wang Yi, Thompson Webb III. Hydrogen isotope ratios of individual lipids in lake sediments as novel tracers of climatic and environmental change: A surface sediment test [J]. *Journal of Paleolimnology*, 2004, 31:363-375.
- [32] William J D'Andrea, Huang Yongsong. Long chain alkenones in Greenland lake sediments: Low $\delta^{13}\text{C}$ values and exceptional abundance [J]. *Organic Geochemistry*, 2005, 36:1234-1241.
- [33] Liu Weiguo, Huang Yongsong. Compound specific D/H ratios and molecular distributions of higher plant leaf waxes as novel paleoenvironmental indicators in the Chinese Loess Plateau [J]. *Organic Geochemistry*, 2005, 36:851-860.

- [34] 管红香,陈多福,宋之光.冷泉渗漏区海底微生物作用及生物标志化合物[J].海洋地质与第四纪地质,2007,27(5):75-83.
- [35] 王兆云,程克明.碳酸盐岩中不同赋存状态有机质地球化学特征对比及对成烃的贡献[J].沉积学报,2000,18(4):600-605.
- [36] 熊永强,耿新华,赵青芳,刘金萍,王彦美,耿安松.济阳拗陷下古生界碳酸盐岩的分子有机地球化学特征[J].地质论评,2006,52(1):132-136.
- [37] 周中毅,范善发,谢觉新.晶包有机质——认识碳酸盐岩生油机制的另一侧面[J].沉积学报,1991,9(增刊):112-119.
- [38] Xie Shucheng, Yi Yi, Huang Junhua, Hu Chaoyong, Cai Yanjun, Matthew Collins, Andy Baker. Lipid distribution in a subtropical southern China stalagmite as a record of soil ecosystem response to palaeoclimate change[J]. *Quaternary Research*,2003(60):340-347.
- [39] Blytha A J, Bakerb A, Collins M J, Penkmanc K E H, Gilmour M A, Mosse J S, Gentyf D, Drysdale R N. Molecular organic matter in speleothems and its potential as an environmental proxy [J]. *Quaternary Science Reviews*,2008,27:905-921.
- [40] DisnaJ R R, Stefanova M, Bourdon S, Laggoun-Defarge F. Sequential fatty acid analysis of a peat core covering the last two millennia (Tritrivakely lake, Madagascar): Diagenesis appraisal and consequences for palaeoenvironmental reconstruction[J]. *Organic Geochemistry*,2005,36:1391-1404.
- [41] Richard D Pancost, Jaap S Sinninghe Damste. Carbon isotopic compositions of prokaryotic lipids as tracers of carbon cycling in diverse settings [J]. *Chemical Geology*,2003,195:29-58.
- [42] Grice Kliti, Romain de Mesmay, Andrew Glucina, Wang Sue. An improved and rapid 5A molecular sieve method for gas chromatography isotope ratio mass spectrometry of n -alkanes ($C_8 \sim C_{30} +$) [J]. *Organic Geochemistry*,2008, :284-288.
- [43] 李钜源.单分子烃碳同位素分析方法及影响因素探讨[J].地球学报,2004,25(2):109-113.
- [44] Murphy M T J. Analytical methods[M]//Eglinton G, Murphy M T J. *Organic Geochemistry*. Berlin:Springer, 1969:74-88.
- [45] Collister J W. An isotopic biogeochemical study of the Green River oil shale (Piceance Creek Basin, Colorado) [D]. USA:Indiana University,1992:207.
- [46] Xu S, Sun Y. An improved method for the micro-separation of straight chain and branched/cyclic alkanes: Urea inclusion paper layer chromatography [J]. *Organic Geochemistry*,2005,36:1334-1338.
- [47] Beth Trust Hammer, Marilyn L Fogel, Thomas C Hoering. Stable carbon isotope ratios of fatty acids in seagrass and redhead ducks [J]. *Chemical Geology*,1998,152:29-41.
- [48] Chuanlun L Zhang, Lia Yiliang, Qi Ye Jon Fong, Aaron D Peacock, Elizabeth Blunt, Fang Jiasong, Derek R Lovley, David C White. Carbon isotope signatures of fatty acids in *Geobacter metallireducens* and *Shewanella algae* [J]. *Chemical Geology*,2003,195:17-28.
- [49] Englebrecht A C, Sachs J P. Determination of sediment provenance at drift sites using hydrogen isotopes and unsaturation ratios in alkenones [J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*,2005,69:4253-4265.
- [50] Schouten S, Ossebaar J, Schreiber K, Kienhuis M V M, Langer G, Benthien A, Bijma J. The effect of temperature, salinity and growth rate on the stable hydrogen isotopic composition of long chain alkenones produced by *Emiliania Huxleyi* and *Gephyrocapsa Oceanica* [J]. *Biogeosciences*,2006,3:113-119.
- [51] William J D'Andrea, Zhonghui Liu, Marcelo Da Rosa Alexandre, Wattlely Sarah, Timothy D. Herbert, Huang Yongsong. An efficient method for isolating individual long-chain alkenones for compound-specific hydrogen isotope analysis [J]. *Analytical Chemistry*,2007,79:3430-3435.
- [52] Schwab V F, Sachs J P. Alkenone purification for hydrogen isotope analysis by HPLC-MS: implications for paleoenvironmental reconstruction [J]. *Geophysical Research Abstracts*,2008(10):EGU2008-A-02301.
- [53] 熊永强,耿安松. GC-IRMS 技术在地球化学中的应用现状与前景[J].矿物岩石地球化学通报,1996,15(2):128-131.
- [54] Leroy Ellis, Ann L Fincannon. Improvements in IRM-GC/MS analyses: Advanced techniques in tube furnace design and sample preparation [J]. *Organic Geochemistry*,1998,29:1101-1117.
- [55] Ricci M P, Merritt D A, Freeman K H, Hayes J M. Acquisition and processing of data for isotope-ratio-monitoring mass-spectrometry [J]. *Organic Geochemistry*,1994,21:561-571.
- [56] Walter Vetter, Simon Gaul, Joachim Melche. Improved quality control in gas chromatography interfaced to stable isotope ratio mass spectrometry by application of derivative chromatography [J]. *Analytica Chimica Acta*,2007,590:49-54.
- [57] Wolfram Meier-Augenstein. Stable isotope analysis of fatty acids by gas chromatography isotope ratio mass spectrometry [J]. *Analytica Chimica Acta*,2002,465:63-79.
- [58] Vetter Walter, Simon Gaul, Joachim Melcher. Improved quality control in gas chromatography interfaced to stable isotope ratio mass spectrometry by application of derivative chromatography [J]. *Analytica Chimica Acta*,2007,590:49-54.