

脂質・色素分子の安定水素同位体組成*

力石嘉人**

(2007年4月27日受付, 2007年5月18日受理)

Abstract

Gas chromatograph/pyrolysis/isotope ratio mass spectrometer (GC/pyrolysis/IRMS) and pyrolysis elemental analyzer/isotope ratio mass spectrometer (pyrolysis-EA/IRMS) are relatively new instruments for on-line determination of stable hydrogen isotopic composition (D/H) of organic compounds, which allow easy and rapid access to their isotopic composition in various biological and geological samples. The hydrogen isotopic composition is a potential tool for the reconstruction of hydrological cycle in paleoenvironment. Combined with carbon isotopic composition ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$), it has also been used for the evaluation of sources and delivery of organic compounds in geological as well as geographical samples. This paper reviews recent studies on the compound-specific hydrogen isotope analysis of lipids and pigments, which consists of brief summaries of (1) biological controls on the isotopic composition, (2) isotopic modification associated with biodegradation and diagenesis, and (3) its application in organic geochemistry.

1. はじめに

かつて有機物の安定水素同位体比分析には、試料を真空下で酸化剤や還元剤と反応させ、精製した H_2 ガスの同位体比を測定するという手法(封管燃焼法)が用いられてきた(例えば, Epstein and Yapp, 1976; Epstein et al., 1976; Chikaraishi and Naraoka, 2001)。この封管燃焼法は、1 試料の同位体比測定に少なくとも $50\mu\text{g}$ の水素が必要であり、測定にいたる前処理に数日を要した(例えば, Coleman et al., 1982; Kendall and Coplen, 1985; Motz et al., 1997)。また、堆積物などの環境試料に含まれる有機化合物の分子レベルでの同位体比測定には、あらかじめ試料中の個々の有機化合物を高純度で多量(水素量で少なくとも 50mg 以上)に単離する必要があった。

しかし近年の研究(例えば, Tobias and Brenna, 1996, 1997)と技術発展により、ガスクロマトグラフ/熱分解/同位体比質量分析計(Gas chromatograph/pyrolysis/isotope ratio mass spectrometer, GC/pyrolysis/IRMS)や熱分解型元素分析計/同位体比質量分析計(pyrolysis elemental analyzer/isotope ratio mass spectrometer, pyrolysis-EA/IRMS)が開発され、有機物の H_2 ガスへの変換・精製・同位体比測定がオンラインで行えるようになった(例えば, Burgoyne and Hayes, 1997; Hillkert et al., 1999)。GC/pyrolysis/IRMS (Fig. 1)は、揮発性の有機化合物であれば、試料に含まれる1つ1つの化合物を単離することなく、個々の化合物の水素同位体比を一度の分析で連続的に測定することができる。測定に必要な試料量は一化合物あたり数 ng 水素であり、測定に要する時間は一試料あたり

*Stable hydrogen isotopic composition of lipids and pigments

**独立行政法人海洋研究開発機構 地球内部変動研究センター 〒237-0061 神奈川県横須賀市夏島町 2-15
e-mail: ychikaraishi@jamstec.go.jp, Tel: 046-867-9778, Fax: 046-867-9775

Yoshito Chikaraishi: Institute for research on Earth Evolution, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology 2-15 Natsushima-cho, Yokosuka, 237-0061, Japan

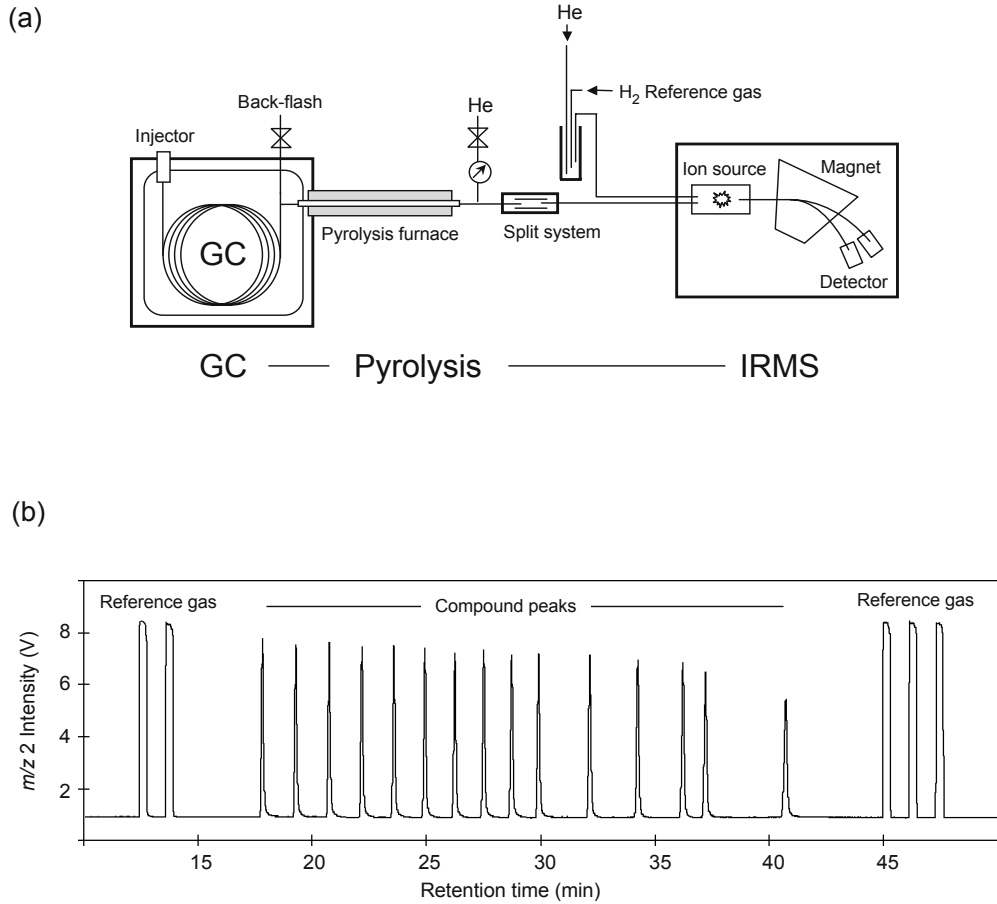


Fig. 1. Schematic of (a) a typical GC/pyrolysis/IRMS system and (b) its m/z 2 chromatogram.

およそ1時間である。pyrolysis-EA/IRMS (Fig. 2) は、あらかじめ試料から測定対象の有機化合物を単離しなければならないが、揮発性の有無に関わらずほとんどの有機化合物の水素同位体比を測定することができる。測定に必要な試料量は数 μg 水素であり、測定に要する時間は一試料あたりおよそ10分である。このように、GC/pyrolysis/IRMS・pyrolysis-EA/IRMSの開発・普及により、現在では有機化合物の水素同位体比が誰でも簡易に測定できるようになり、生体試料から地質試料までの様々な試料に含まれる有機化合物の分子レベル水素同位体比研究が世界中で積極的に行われるようになった。

有機化合物の分子レベル水素同位体比研究の主な目的には、

(1) 有機化合物の水素同位体比からそれらが合成

された当時の環境(環境水の水素同位体比・湿度・温度など)を復元すること(例えば, Anderson et al., 2001; Sachse et al., 2004a)

(2) 炭素同位体比と同時に解析することで、環境試料に含まれる有機化合物の詳細な起源を明らかにすること(例えば, Chikaraishi and Naraoka, 2005)

の2つが挙げられる。有機物と環境水の水素同位体比の相関関係は、封管燃焼法を用いていた1970~90年代の研究において、植物セルロース(例えば, Epstein and Yapp, 1976; Epstein et al., 1976)や脂質画分(有機溶媒やアルカリけん化により抽出される成分全体; Northfelt et al., 1981; Sternberg et al., 1986; Sternberg, 1988)などで見いだされ、実際にいくつかの研究で過去の水環境の復元が試みられてきた(例えば, Buhay and

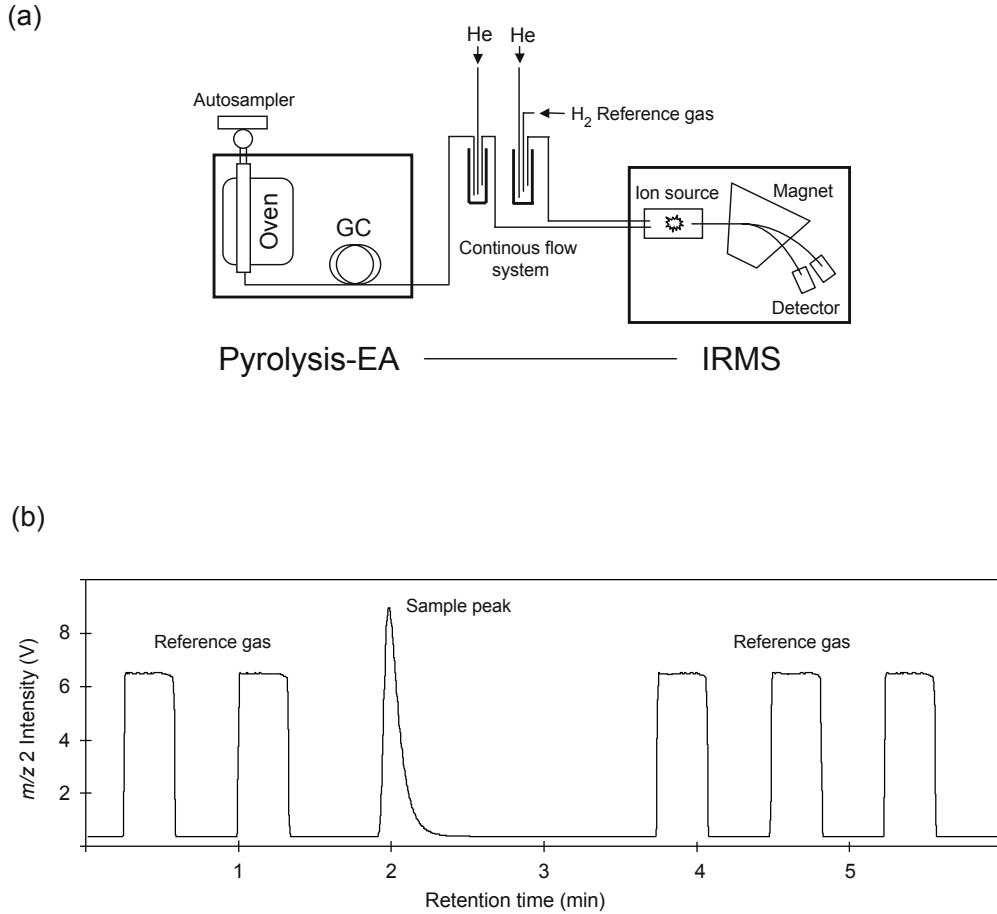


Fig. 2. Schematic of (a) a typical pyrolysis-EA/IRMS system and (b) its m/z 2 chromatogram.

Edwards, 1995; Pendall et al., 1999)。分子レベル水素同位体比分析を用いることで、これらの研究を進展させ、詳細な古環境復元ができると期待される。また、有機化合物の炭素同位体比は、土壌や堆積物などの環境試料に含まれる有機物の起源や運搬過程を解析するツールとして広く使われてきた（例えば、Freeman et al., 1990; Yamada and Ishiwatari, 1999; Naraoka and Ishiwatari, 2000）。これらの研究に水素同位体比の情報を加え、水素・炭素同位体比 2次元同時解析を行うことで、より詳細な起源推定や輸送過程の解明が期待される。

本稿は、GC/pyrolysis/IRMS・pyrolysis-EA/IRMSを用いた最近の分子レベル水素同位体比研究の総説として、「有機化合物の水素同位体比測定法」を概説し(2章)、「生物に含まれる脂質・色素分子の水素同位体比をコントロールするメカニズ

ム」と「生物分解と続成作用に伴う水素同位体比の変化」について、これまでに得られている知見をまとめる(3・4章)。また、これらの水素同位体比を用いた「応用研究」を紹介する(5章)。

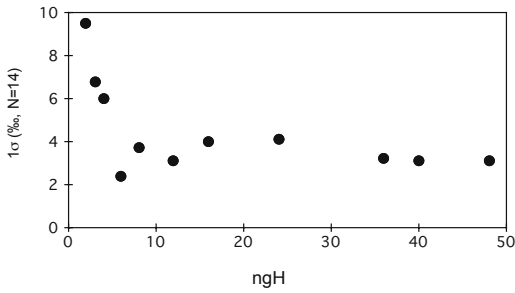
2. 有機化合物の水素同位体比測定法

2.1. 安定水素同位体比の定義

水素には質量数 1 (H) と 2 (D) が安定同位体として存在し、その質量差により自然界の様々な物理的・化学的プロセスで同位体分別 (isotopic fractionation) を起こす。試料中の安定水素同位体比は、国際標準物質の標準平均海水 (Standard Mean Ocean Water, SMOW, D/H=0.00015576) に対する千分偏差 (δD 値, 単位パーミル: ‰) で定義される (式 1)。

$$\delta D \text{ 値} = [(R_{\text{試料}}/R_{\text{SMOW}}) - 1] \times 1000 \quad (\text{‰}) \quad \text{式 1}$$

(a) GC/pyrolysis/IRMS



(b) pyrolysis-EA/IRMS

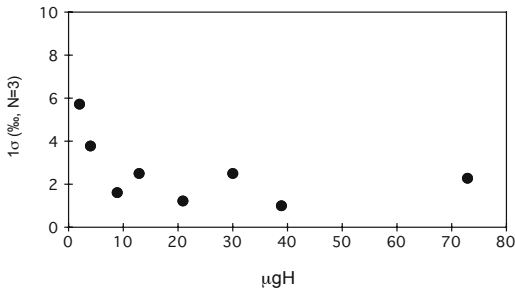


Fig. 3. Dependence of standard deviation (1σ) on the injected sample amount, for the δD measurement of docosane by (a) GC/pyrolysis/IRMS and (b) pyrolysis-EA/IRMS in authors' laboratory.

R は同位体存在比率 (D/H) を示す。例えば, D/H = 0.00015732 の試料の場合, SMOW との D/H の差 (+0.00000156) は, $\delta D = +10\%$ と表される。試料の δD 値が正であれば, SMOW と比較して D に富む (同位体的に重い) ことを示し, 負であれば H に富む (同位体的に軽い) ことを示す。

化合物 A に対する化合物 B の同位体比の差は, ϵ 値で表される (式 2)。

$$\epsilon \text{ 値} = [(\delta D_B + 1000) / (\delta D_A + 1000) - 1] \times 1000 \text{ (‰)} \quad \text{式 2}$$

ϵ 値の絶対値が大きければ, 2 つの化合物の間の同位体分別が大きいことを示し, ϵ 値の絶対値が小さければ, 同位体分別が小さいことを示す。 δD_A , δD_B の絶対値が小さい場合には, ϵ 値は ΔD 値 (式 3) で近似できる。

$$\Delta D \text{ 値} = \delta D_B - \delta D_A \text{ (‰)} \quad \text{式 3}$$

なおこれらの同位体比の定義や同位体分別についての詳細は, 酒井・松久 (1996) や Hayes (2001)

などを参照していただきたい。

2.2. GC/pyrolysis/IRMS

GC/pyrolysis/IRMS (GC/thermal conversion/IRMS, GC/TC/IRMS と記載されることもある) の装置の概略を Fig. 1a に, 得られる代表的なクロマトグラムを Fig. 1b に示す。装置や測定法についての詳細は数編の論文・総説がすでに発表されているのでそれらを参照していただきたい (例えば, Burgoyne and Hayes, 1997; Hillkert et al., 1999; 力石・奈良岡, 2004; Sessions, 2006)。GC/pyrolysis/IRMS は, 個々の有機化合物の分離を行う GC 部・有機化合物を H_2 ガスへ熱分解する pyrolysis 部・ H_2 ガスの同位体比を測定する IRMS 部から成る。試料 (複数の揮発性有機化合物の混合物) は, 一般にヘキサン溶液として GC に導入される。個々の有機化合物はキャリアーガスとしてヘリウムを用いた GC のキャピラリーカラムによって分離され, GC オープン内でカラムと直結したセラミック製マイクロボリュウム熱分解炉 (内径: 0.5~0.6 mm, 長さ: 30~34 cm, 触媒: グラファイト, 温度: 1400~1500°C) に連続的に導入される。導入された有機化合物はそれぞれ, 水素ガス (H_2)・グラファイト (C)・一酸化炭素 (CO: 分析対象の有機化合物が酸素を含む場合) に熱分解され, キャリアーガスと共に IRMS に導入され, イオン化の後, m/z 2 (H_2^+) と 3 (HD^+ 及び H_3^+) の強度が測定される。実際の測定では, Fig. 1b に示すようなクロマトグラムが得られ, H_3^+ の補正の後 (Sessions et al., 2001a, 2001b), 個々の有機化合物の水素同位体比が決定される。測定に必要な試料量は一化合物あたり数 ng 水素であり, 測定精度は $\pm 3\sim 10\%$ 程度である。一般的に, 測定精度は試料量に依存する。例えば著者の研究室では, 水素量が 2 ng では $\pm 10\%$ 程度の測定精度であり, 5 ng 以上では $\pm 4\%$ 以下の測定精度である (Fig. 3a)。

GC/pyrolysis/IRMS で同位体比を測定する上で非常に重要な注意点は, Fig. 4a に示すように個々の有機化合物を必ずベースライン上で分離しなければならないことである。Figs. 4b, c のようにピークが重なっている場合や, Fig. 4d のようにピークのバックグラウンドに unresolved complex

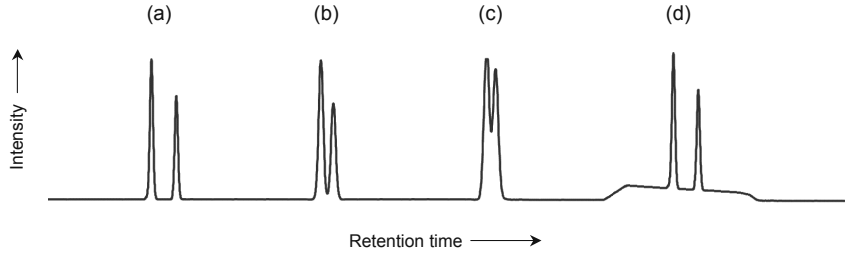


Fig. 4. Schematic chromatograms of four types of compound-peak separation. Baseline separation must be required for accurate δD analysis by GC/pyrolysis/IRMS.

mixture (UCM) とよばれる GC で分離不能な成分がある場合には正確な同位体比を得ることができない。これは水素同位体比分析に限らず、ガスクロマトグラフ/燃焼/同位体比質量分析計 (GC/combustion/IRMS) による炭素・窒素同位体比分析においても共通である。また試料は GC で分析可能な揮発性の有機化合物に限定され、あらかじめ水酸基 ($-\text{OH}$)・カルボキシル基 ($-\text{COOH}$)・アミノ基 ($-\text{NH}_2$) などの実験室中の水蒸気などと容易に交換可能な水素 (exchangeable-H) を誘導体化などにより除去しなければならない。

2.3. pyrolysis-EA/IRMS

pyrolysis-EA / IRMS (EA / pyrolysis / IRMS, thermal conversion EA/IRMS, TCEA/IRMS と記載されることもある) は、試料の導入と熱分解を行う EA 部・生成した H_2 ガスと同位体標準ガスの導入を行う連続フロー (continuous flow) 部・ H_2 ガスの同位体比を測定する IRMS 部から構成される (Fig. 2a)。有機化合物は専用の銀カプセルに秤量後、小さく丸めて、オートサンブラにセットされる。銀カプセルがオートサンブラから 1250~1500°C の熱分解炉 (セラミック管, 熱分解触媒: グラファイト) にキャリアーガスの He ガスとともに導入され、有機化合物は水素ガス (H_2)・グラファイト (C)・一酸化炭素 (CO : 分析対象の有機化合物が酸素を含む場合) に熱分解される。生成した H_2 ガスは、キャリアーガスと共に continuous flow 部を経て IRMS に導入され、 m/z 2 (H_2^+) と 3 (HD^+ 及び H_3^+) の強度が測定される。実際の測定では、Fig. 2b に示すようなクロマトグラムが得られ、 H_3^+ の補正の後、水素同位体比が測定される。測定に必要な試料量は数 μg 水素

であり、測定精度は $\pm 3 \sim 10\%$ 程度である。GC/pyrolysis/IRMS と同様に、測定精度は試料量に依存する。例えば著者の研究室では、水素量が $2\mu\text{g}$ では $\pm 6\%$ 程度の測定精度であり、 $5\mu\text{g}$ 以上では $\pm 4\%$ 以下の測定精度である (Fig. 3b)

pyrolysis-EA/IRMS を用いて、環境試料に含まれる有機化合物の分子レベル同位体比分析を行うためには、あらかじめ試料に含まれる有機化合物を単離・精製しなければならない。これはかつて非常に大きな課題であったが、pyrolysis-EA/IRMS では測定に必要な試料量が少ないこと (水素量で数 μg 程度) と、近年の高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いた有機化合物の単離・分取システムのオートメーション化などにより、現在ではほとんど問題ではなくなりつつある。GC/pyrolysis/IRMS とは異なり、pyrolysis-EA/IRMS では揮発性の有無に関わらずほとんどの有機化合物の水素同位体比を測定することができる。但し、GC/pyrolysis/IRMS と同様に、あらかじめ水酸基 ($-\text{OH}$)・カルボキシル基 ($-\text{COOH}$)・アミノ基 ($-\text{NH}_2$) などの exchangeable-H を誘導体化などにより除去しなければならない (標準化合物を用いて交換した水素の同位体比を見積もり、補正を行う方法もある、例えば、Cormie et al., 1994a, 1994 b)。

2.4. 脂質・色素分子の水素同位体比分析

脂質分子の多くは揮発性を持つ (または誘導体化により容易に揮発性を獲得する) ため、その水素同位体比分析には一般的に GC/pyrolysis/IRMS が用いられる (例えば、Sessions et al., 1999; Chikaraishi et al., 2004b)。一般的な分析手順は、(1) 植物・土壌・堆積物などの試料からの有機溶

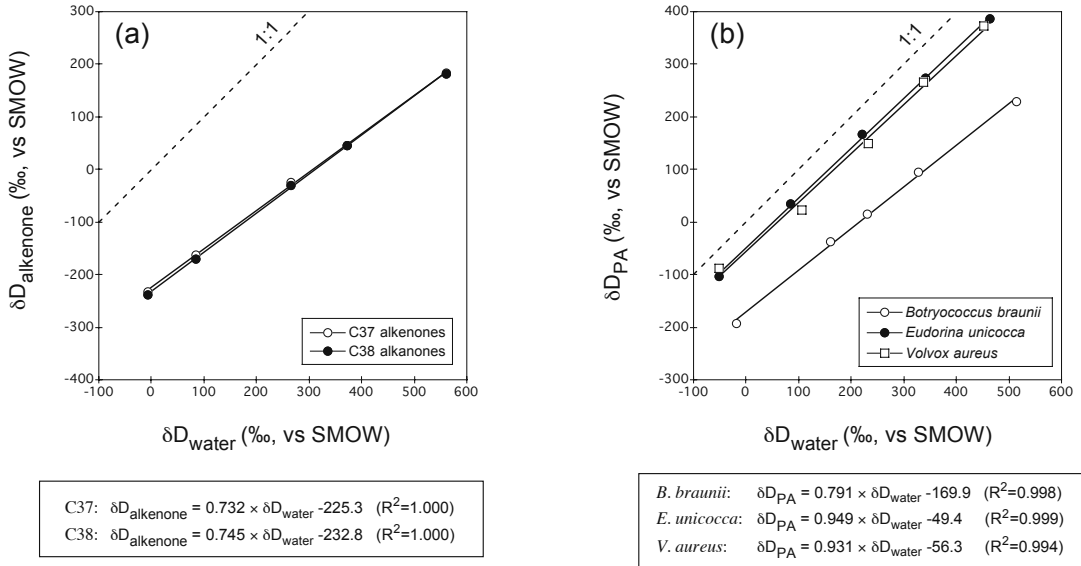


Fig. 5. Relationships between lipid and water δD values in cultures: (a) C₃₇ and C₃₈ alkenones from *Emiliana huxleyi* (Englebrecht and Sachs, 2005); (b) palmitic acid (PA, C₁₆ n-alkanoic acid) from *Botryococcus braunii*, *Eudorina unicocca* and *Volvox aureus* (Zhang and Sachs, 2007).

媒抽出, (2) シリカゲルカラムなどの化学分画法による分画・精製, (3) 誘導体化が必要な分子への誘導体化, (4) GC/pyrolysis/IRMSによる同位体比の測定で構成される。一方, Chlorophyllなどの色素分子は難揮発性の強共役系分子でありGCで分析することができないため, その水素同位体比分析には一般的に pyrolysis-EA/IRMS が用いられる (Chikaraishi et al., 2005a)。一般的な分析手順は, (1) 試料からの有機溶媒抽出, (2) 液-液分離などによる脂質成分の除去, (3) HPLCによる個々の色素分子の単離, (4) pyrolysis-EA/IRMSによる同位体比の測定で構成される。

3. 生物に含まれる脂質・色素分子の水素同位体比をコントロールするメカニズム

3.1. 環境水の水素同位体比

生体を構成する脂質・色素分子の水素同位体比は, 一般的に環境水の水素同位体比を強く反映する (Estep and Hoering, 1980)。いくつかの培養実験で脂質分子と環境水の水素同位体比の間に強い相関関係が見いだされており (Fig. 5; Englebrecht and Sachs, 2005; Zhang and Sachs, 2007), また土壌や堆積物などの環境試料に含まれる脂質分子と雨水や湖水などの環境水の間にも水素同位体比の相関関

係が報告されている (Xie, et al., 2000; Sauer et al., 2001; Huang et al., 2002, 2004; Sachs et al., 2004b; Hou et al., 2006; 例えば, Fig. 6)。これらの結果は, 1970~90年代に得られていた植物脂質成分と環境水の水素同位体比の相関関係 (例えば, Sternberg, 1988) を化合物レベルで裏付け, 脂質・色素分子の水素同位体比からそれらが合成された当時の水環境を復元する際の基礎情報 (根拠) となる。

3.2. 生合成系における同位体分別

脂質・色素分子の水素同位体比は, 環境水の水素同位体比の他に生合成系における同位体分別 (一般的には同位体的に軽い水素“H”の優先的利用) を反映し, それぞれの生合成系に依存した同位体比を示す (Sessions et al., 1999, 2002; Chikaraishi et al., 2004a, 2004b, 2004c, 2005a; Sessions and Hayes, 2005; Chikaraishi and Naraoka, 2007)。これまでに世界中の研究者がこの生合成系における同位体分別とそのメカニズムを研究してきたが, 実際同位体分別の大きさは, 生合成反応によって, 光合成系の異なる植物種 (C3, C4, CAM 植物) 間や樹木-草本間で異なる場合 (Chikaraishi and Naraoka, 2003; Chikaraishi et al., 2004b, Bi et al., 2005; Liu et

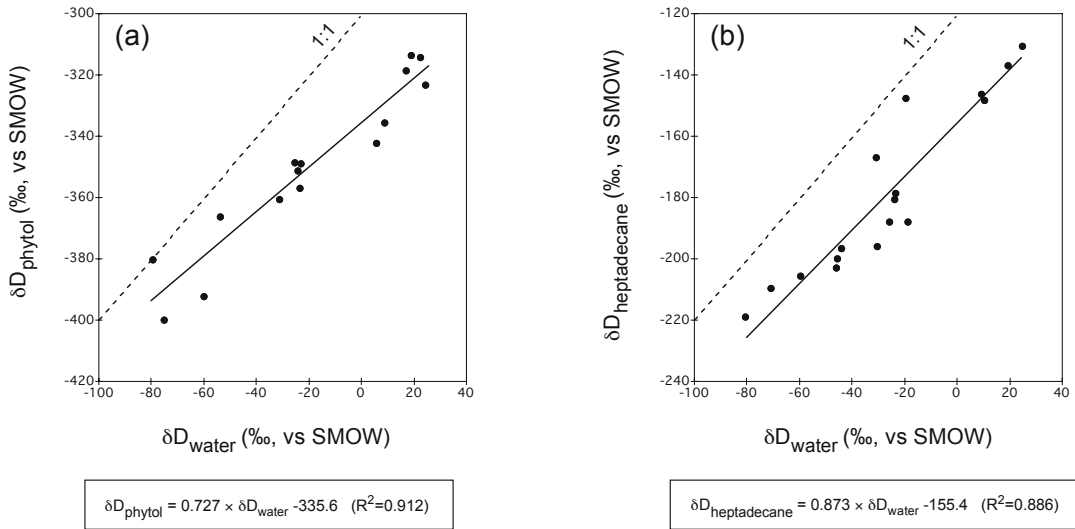


Fig. 6. Relationships between sedimentary lipid and lake water δD values from 36 lakes in the eastern North America: (a) phytol and (b) heptadecane (C_{17} *n*-alkane) (Huang et al., 2004).

al., 2006; Hou et al., 2007a) と異なる場合 (Chikaraishi and Naraoka, 2007) があり, また温度・乾湿状態・季節などの生育環境に依存するとの報告もあり (例えば, Sessions, 2006), 個々の生物種における各生合成系の同位体分別の正確な大きさはまだほとんどわかっていない。本稿では, これまでに比較的研究が進んでいる陸上植物をモデルとして, 環境水に対する脂質・色素分子の同位体比の差 (ϵ 値) を Fig. 7 にまとめ, 以下に解説する。

- (1) 光合成において, H_2O から H^- を得る反応 (NADPH 合成) の同位体分別は非常に大きく, NADPH の ϵ 値は約 -600% になる (例えば, Schmidt et al., 2003)。
- (2) 脂質・色素分子を構成する水素は, 環境水や NADPH に由来するため, 一般的に ϵ 値がマイナスになる (例えば, Sessions et al., 1999)。
- (3) 水素化反応 (hydrogenation) に伴う同位体分別は非常に大きく, 生成物へ付加した水素は同位体的に非常に軽い (Fig. 8a)。例えば, phytol 合成における hydrogenation 由来の水素の ϵ 値は約 -600% と見積もられる (Chikaraishi et al., 2004a)。
- (4) 脱水素反応 (dehydrogenation) に伴う同位体分別も非常に大きく, 脱離した水素は同位体的に

軽くなり, 一方で反応物上に残された水素は同位体的に重くなる (Fig. 8b)。例えば stearic acid から oleic acid への不飽和化反応では, 反応せずに残った stearic acid 上の水素が同位体的に重くなり, その程度は反応の flux (どれだけ反応が進んだのか) に依存する (Chikaraishi et al., 2004c)。

- (5) 合成系に水素交換反応 (H-exchange reaction) が含まれる場合には, 生成物の ϵ 値は, 0% に近くなる (Sessions et al., 1999; Chikaraishi et al., 2004a)。

これらの結果, sesquiterpenoids や triterpenoids, phytol 以外の diterpenoids の ϵ 値は, 約 $-180\sim-220\%$ になり, diterpenoids に 6 つの水素が付加した構造の phytol の ϵ 値は, hydrogenation 由来の同位体的に軽い水素の寄与により, 約 $-280\sim-320\%$ になる (Chikaraishi et al., 2004a)。chlorophyllide *a* の ϵ 値は, 合成系中の hydrogenation と dehydrogenation を反映し, 約 $-30\sim-70\%$ となり, その結果, chlorophyllide と phytol から成る chlorophylls の ϵ 値は, 約 $-180\sim-200\%$ になる (Chikaraishi et al., 2005a)。一方, alkyl lipids は, 生合成系に炭素伸長反応 (elongation) や H-exchange reaction, hydrogenation や dehydrogenation, *n*-alkanoic acids・*n*-alkanols・*n*-alkanes への分岐が

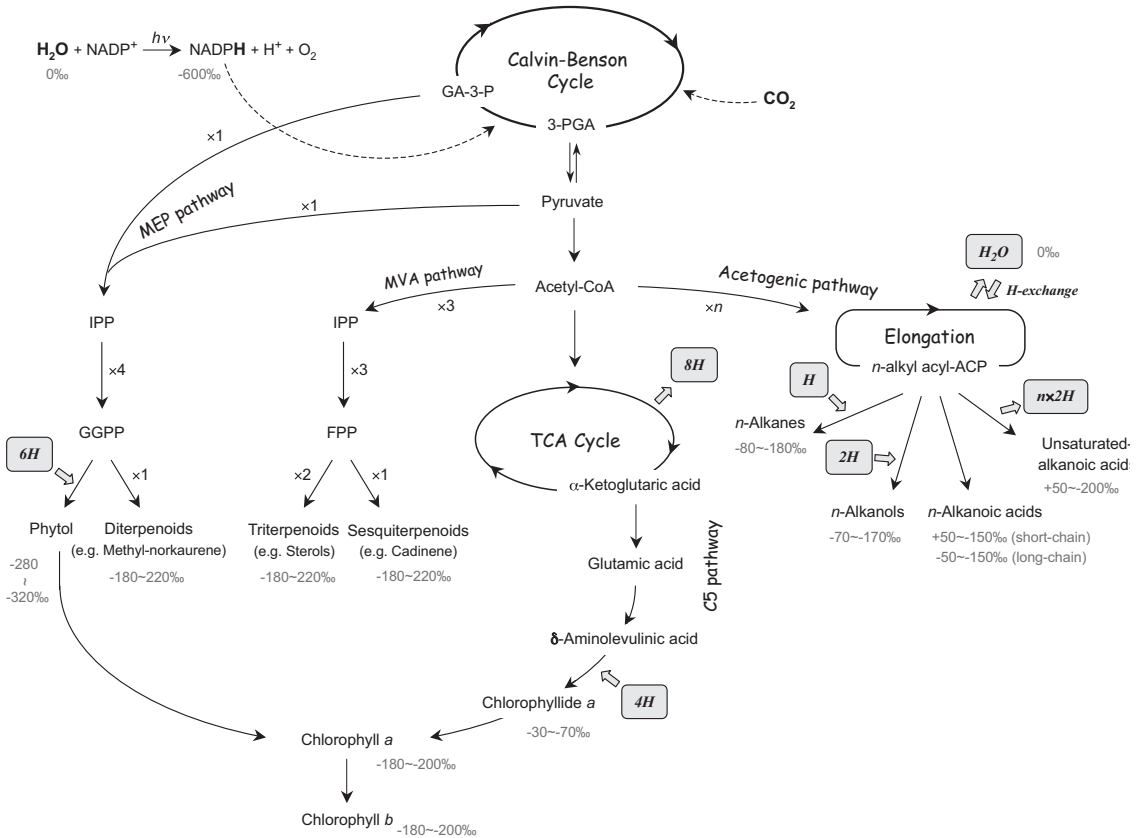


Fig. 7. Lipid and pigment biosynthetic pathways in terrestrial plants with likely ϵ values (‰ relative to ambient water). Abbreviation [acetyl-CoA: acetyl coenzyme-A; *n*-alkyl acyl-ACP: *n*-alkyl acyl-acyl carrier protein; FPP: farnesyl pyrophosphate; GA-3-P: D-glyceraldehyde-3-phosphate; GGPP: geranylgeranyl pyrophosphate; IPP: isopentenyl pyrophosphate; MEP: 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate; MVA: mevalonic acid; NADP+: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; 3-PGA: 3-phosphoglyceric acid; TCA: tricarboxylic acid]

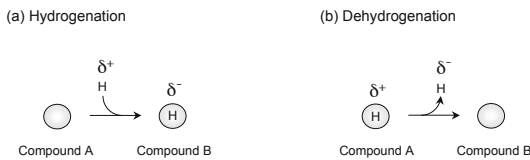


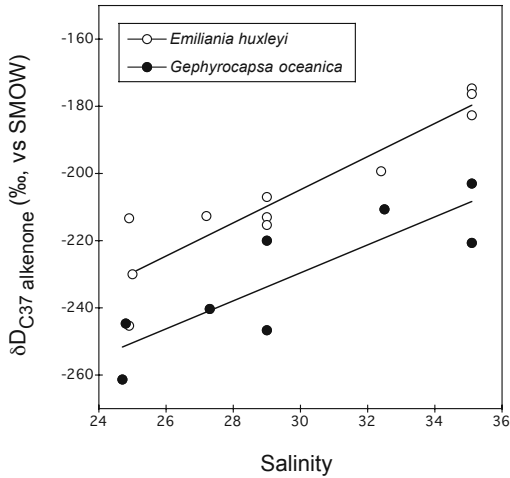
Fig. 8. A simple model of hydrogen isotopic fractionations during (a) hydrogenation and (b) dehydrogenation.

含まれるために非常に多様な ϵ 値を示す。とくに炭素数 20 以下の短鎖の *n*-alkanoic acids や unsaturated-alkanoic acids の ϵ 値は, dehydrogenation の flux を強く反映し, +50 ~ -200 ‰ になる (Chikaraishi et al., 2004c)。長鎖 *n*-alkanols・長鎖 *n*-alkanes の ϵ 値は, 長鎖 *n*-alkanoic acids に比べて

20 ~ 30 ‰ 小さく, それぞれ, -70 ~ -170 ‰, -80 ~ -180 ‰ になる (Chikaraishi and Naraoka, 2007; Hou et al., 2007a)。

3.3. その他の要因

水素源の同位体比・生合成系における同位体分別の他に, 脂質・色素分子の水素同位体比は様々な環境情報を反映する。例えば, *Emiliania huxleyi* や *Gephyrocapsa oceanica* の炭素数 37 の alkenone の水素同位体比は, 培養水の塩分濃度 (salinity) とよい相関を示し (Fig. 9; Schouten et al., 2006), 植物葉中の hexacosanoic acid, octacosanoic acid, triacontanoic acid (それぞれ, C₂₆, C₂₈, C₃₀ *n*-alkanoic acid) の水素同位体比は, 水の利用率を反映する (Hou et al., 2007b)。また, 土壌中の tricosane



E. huxleyi: $\delta D_{\text{alkenone}} = 4.93 \times \text{Salinity} - 352.6$ ($R^2=0.858$)
G. Oceanica: $\delta D_{\text{alkenone}} = 4.16 \times \text{Salinity} - 354.4$ ($R^2=0.739$)

Fig. 9. Relationships between C₃₇ alkenone δD values and salinity in *Emiliana huxleyi* and *Gephyrocapsa oceanica* cultures (Schouten et al., 2006).

(C₂₃ *n*-alkane) の水素同位体比が温度と相関すること (Xie et al., 2004) や、heptacosane, nonacosane, hentriacontane (それぞれ, C₂₇, C₂₉, C₃₁ *n*-alkane) の水素同位体比が陸上環境の乾湿と相関すること (Liu and Huang, 2005) も報告されている。

一般的に陸上植物の脂質・色素分子の水素同位体比は、水生植物 (藻類や水草など) のそれに比べて大きい (同位体的に重い)。これは陸上植物の場合は、水素源となる葉水 (leaf water) が、蒸発や蒸散作用により雨水 (meteoric water) よりも同位体的に重くなり、その結果、見かけの同位体分別 (apparent isotopic fractionation) が小さくなるためであると解釈されている (Fig. 10; Sachse et al., 2004, 2006; Smith and Freeman, 2006)。しかし自然環境において、土壌水や葉水の水素同位体比が実際にどの程度重くなり、またそれが脂質・色素分子の水素同位体比にどの程度影響を与えているのかは、まだほとんど評価されていない。

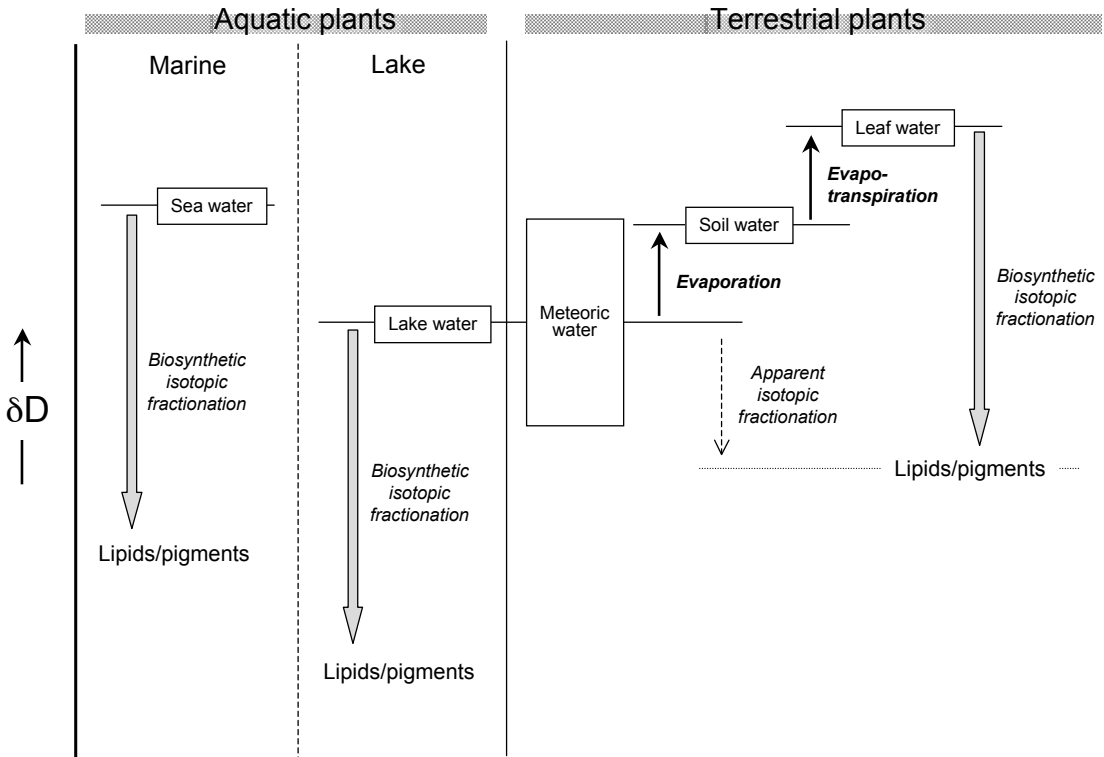


Fig. 10. Conceptual diagram of relative δD values for aquatic and terrestrial plants.

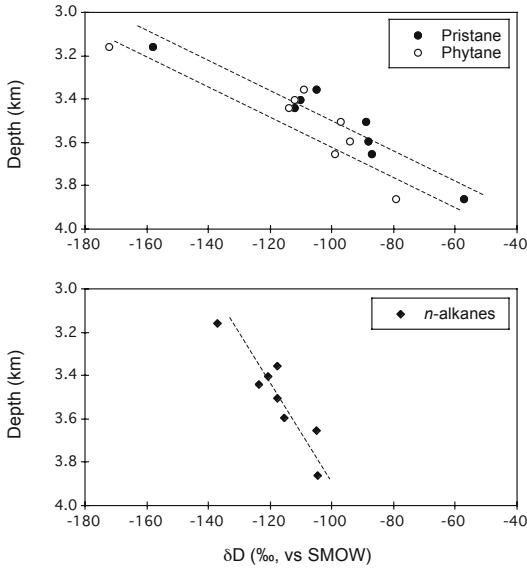


Fig. 11. Depth profiles of δD values of *n*-alkanes, pristane and phytane from Late Jurassic marine mudstones (Dawson et al., 2007).

4. 生物分解と続成作用に伴う水素同位体比の変化

脂質・色素分子の水素同位体比を古環境復元などの研究に应用する場合には、生物分解と続成作用に伴う水素同位体比の変化を理解しておく必要がある。一般的に、生物分解に伴う同位体分別は、脂質・色素分子のような炭素・水素数の多い有機化合物ではほとんど無視できるほど小さいと考えられており、実際に長鎖 *n*-alkane の微生物分解では有意な同位体比変化は観察されない (Pond et al., 2002)。また sterol などの脂質分子は、動物(従属栄養生物)の捕食作用により構造の異なる sterol への部分的な変更(例えば、 β -sitosterol から fucosterol への変更)が加えられるが、その際にも有意な同位体比変化は観察されない (Chikaraishi, 2006)。

一方で、続成作用に伴う水素同位体比の変化は、重水素水を用いた室内実験 (Oba and Naraoka, 2003; Sessions et al., 2004) や堆積岩などに含まれる有機化合物の経年変化 (Dawson et al., 2005; Radlke et al., 2005; Pedentchouk et al., 2006; Schimmelmann et al., 2006; Dawson et al., 2007) から、非常に大きいことが予想されている。例えば、Sessions et al. (2004) は、室内実験から、*n*-alkane

の炭素に直接結合している水素でさえ 50~100°C では $10^4 \sim 10^8$ 年で交換すると報告している。また Dawson et al. (2007) は、ジュラ紀後期の堆積岩より得られた *n*-alkanes, pristane, phytane の水素同位体比の深度分布から、これらの分子が続成作用に伴い同位体的に重くなること、さらに pristane, phytane の同位体比変化率が *n*-alkane のそれに比べて大きいことを報告している (Fig. 11)。一方で、Yang and Huang (2003) は、中新世の植物化石と現世の植物に含まれる *n*-alkane の水素同位体比の間に有意な差が見られないことから、自然環境では少なくとも *n*-alkane の水素同位体比は $1.5 \sim 2.0 \times 10^8$ 年程度は安定していると見積もっている。このように、脂質・色素分子の水素同位体比が続成変化に伴い実際にどの程度変化するのは、今後十分に評価しなければならない課題である。

5. 応用研究

5.1. 古環境の復元

3・4章で述べたように「脂質・色素分子の水素同位体比をコントロールするメカニズム」や「生物分解と続成作用に伴う水素同位体比の変化」にはまだまだ未解明な部分が多く、現時点では、脂質・色素分子の水素同位体比から過去の環境情報を正確(定量的)に復元することは残念ながら困難である。しかしいくつかの研究では、脂質・色素分子の同位体比変動とその環境要因の関係をプロキシとして用いることで、有機化合物の水素同位体比からこれまでにわからなかった過去の環境情報を復元している (Sachse et al., 2004; Schefuß et al., 2005; Pagani et al., 2006; Shuman et al., 2006)。例えば、Schefuß et al. (2005) は、低緯度域では植物の脂質分子の水素同位体比が降水量変動に依存すること(降水量が多い湿潤環境では降水の同位体比が小さくなり、植物の脂質分子の水素同位体比も小さくなる)を利用し、赤道アフリカ・コンゴ川沖の堆積物に含まれる nonacosane (C_{29} *n*-alkane) の水素同位体比から過去 2 万年間の中央アフリカ域の乾湿変動を求めた (Fig. 12a)。そして、20,000 年前から 17,100 年前の乾燥状態・13,000 年前にかけての降水量の増加・Younger Dryas 期の急速な乾燥化・9,000 年前にかけての

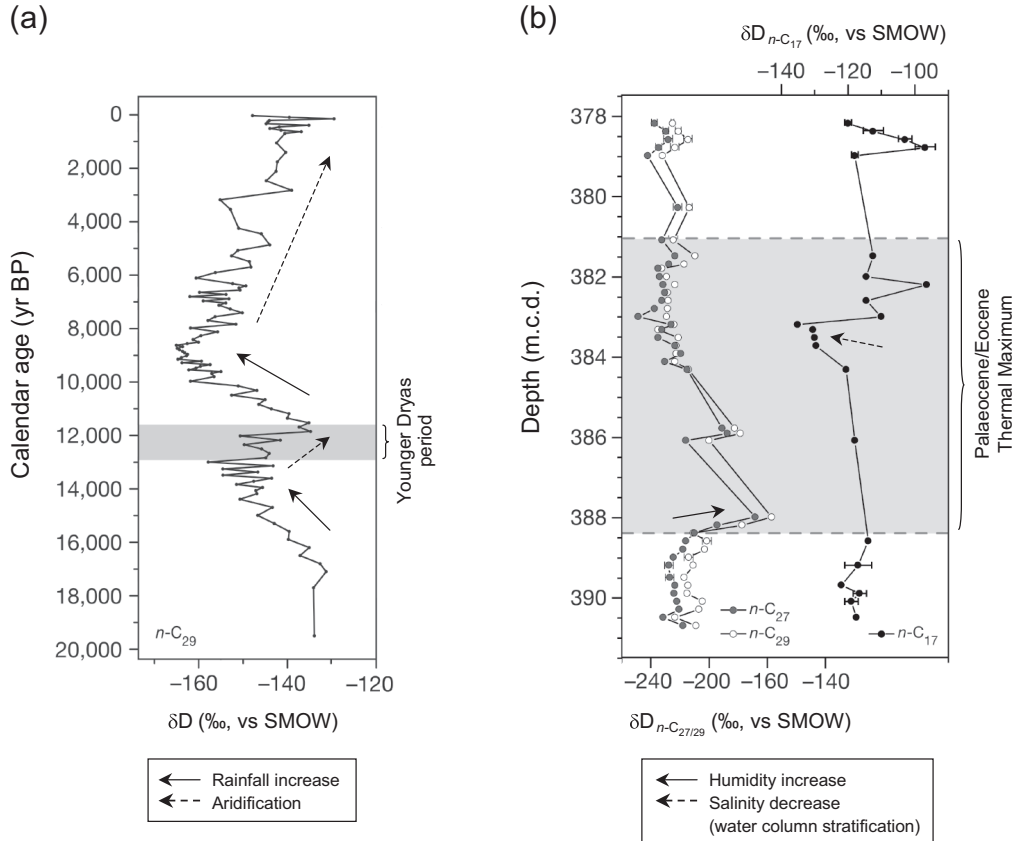


Fig. 12. Relationships between climatic change and δD records of lipids: (a) nonacosane (C_{29} n -alkane) from marine sediment core close to the Congo River in Africa (Scheffuß et al., 2005); and (b) heptadecane, heptacosane and nonacosane (C_{17} , C_{27} , C_{29} n -alkane, respectively) from marine sediment core in the central Arctic Ocean (Pagani et al., 2006).

降水量の増加・その後の緩やかな乾燥化を明らかにした。また、Pagani et al. (2006) は、植物の脂質分子の水素同位体比が降水の水素同位体比と湿度変動を反映することと藻類の脂質分子の水素同位体比が海洋表層水の水素同位体比を強く反映することを利用し、北極海堆積物に含まれる heptacosane, nonacosane (C_{27} , C_{29} n -alkane, 陸上植物由来) と heptadecane (C_{17} n -alkane, 海洋藻類由来) の水素同位体比から Palaeocene / Eocene Thermal Maximum (PETM) における北極圏の水環境の変遷を求めた (Fig. 12b)。そして、PETM の初期に中緯度域から極域に運ばれる湿気が増加したことや、PETM の後期に海洋が成層化したことを明らかにした。

5.2. 水素・炭素同位体比 2 次元解析による起源推定

土壌や堆積物に含まれる有機化合物の炭素同位体比は、それらを作り出した生物の炭素源や炭素固定経路、さらに成長速度などに依存した同位体分別を反映する (例えば, Hayes, 1993, 2004)。一方で有機化合物の水素同位体比は、環境水の水素同位体比や生育環境の乾湿状態などの炭素同位体比とは異なる要因で変動する (3 章を参照)。そのため、炭素同位体比に加えて水素同位体比を解析することで、環境試料に含まれる有機化合物のより詳細な起源・輸送過程、それらの経年変化などを明らかにすることができる (Chikaraishi and Naraoka, 2005, 2006; Chikaraishi et al., 2005b; Krull et al., 2006; Chikaraishi et al., 2007)。例えば、Chikaraishi et al. (2007) は、群馬県・榛名湖堆積物

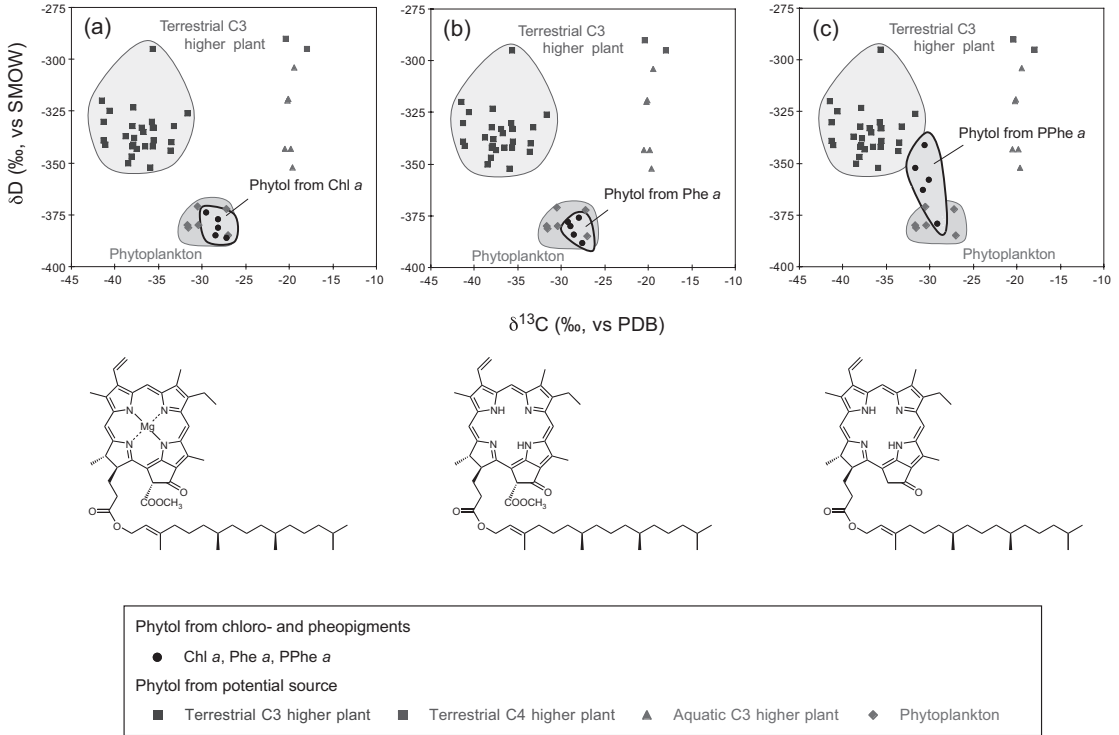


Fig. 13. δD - $\delta^{13}C$ cross plots of phytol from (a) chlorophyll *a*, (b) pheophytin *a*, and (c) pyropheophytin *a* from lake Haruna sediment with that from modern phytoplankton in and terrestrial plants around the lake. (Chikaraishi et al., 2007). Abbreviation [Chl *a*: chlorophyll *a*; Phe *a*: pheophytin *a*; PPhe *a*: pyropheophytin *a*]

に含まれる chlorophyll *a*, pheophytin *a*, pyropheophytin *a* の側鎖 phytol の水素・炭素同位体比から, chlorophyll *a*, pheophytin *a* の phytol が植物プランクトンに由来し, 一方で pyropheophytin *a* の phytol が陸上 C3 植物と植物プランクトンの両方に由来することを明らかにした (Fig. 13)。また, Chikaraishi et al. (2005b) は, 岩手県・大槌川から大槌湾を経て太平洋に至る表層堆積物に含まれる sterol の水素・炭素同位体比から, 河川堆積物には C3 植物の寄与が大きく, 海洋に向かうにつれ C4 植物と海洋藻類の寄与が大きくなることを明らかにし, 陸-海洋系における有機物の運搬メカニズムを評価した (Fig. 14 a)。Krull et al. (2006) は, オーストラリア・クィーンズランドの土壤に含まれる *n*-alkane の水素・炭素同位体比の経年変化を調べ, この地域の植生が, C4 植物主体の草本生態系から C3 植物主体の樹木生態系へ移行したことを明らかにした (Fig. 14b)。

5.3. その他の研究

有機化合物の分子レベル水素同位体比は, 古環境の復元や有機物の起源推定の他にも様々な研究分野で使われている。例えば, 石油や石油根岩岩に含まれる *n*-alkane, pristane, phytane の水素同位体比は, 石油の起源や熟成過程の評価などと関連し広く研究されている (Li et al., 2001; Dawson et al., 2004; Schimmelmann et al., 2004; Dawson et al., 2005; Sun et al., 2005; Tang et al., 2005; Xiong et al., 2005; Liu et al., 2006; Tuo et al., 2006; Dawson et al., 2007), 隕石に含まれるカルボン酸・アミノ酸・多環芳香族炭化水素などの水素同位体比も積極的に研究されている (Huang et al., 2005; Pizzarello and Huang, 2005; Wang et al., 2005; Oba and Naraoka, 2006)。また, 地球化学以外の分野でも, 例えば, 市販のフルーツジュースに含まれる香料成分 (低分子アルコールなど) が天然物であるか人工添加物であるかの判別などにも, 分子レベル水素同位体比分析が用いられている (Hör et

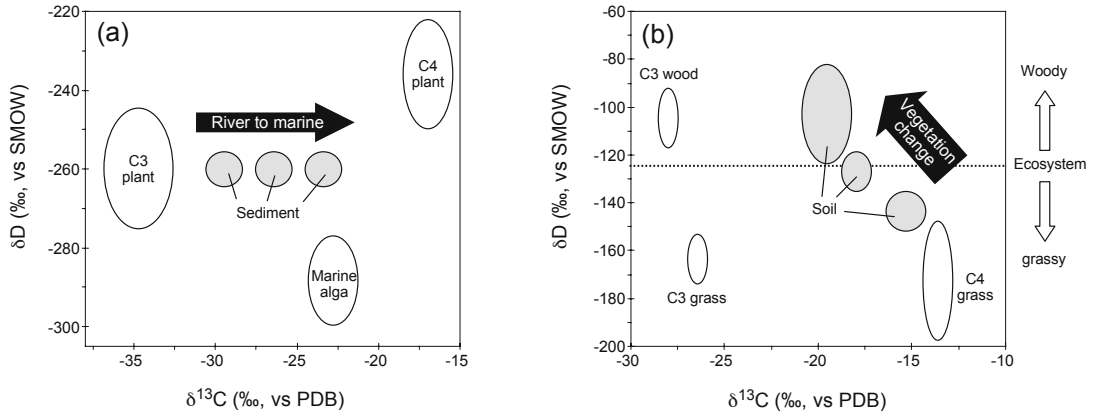


Fig. 14. δD - $\delta^{13}C$ cross plots of lipids with respect to spatial and temporal change records: (a) sterol in surface sediments along a transect from Ohtsuchi river to Northwestern Pacific Ocean (Chikaraishi et al., 2005 b); and (b) long-chained even-carbon number n -alkanes from soils with a grassland-woodland vegetation sequence in central Queensland, Australia (Krull et al., 2006).

al., 2001; Bilke and Monsandl, 2002; Kelly et al., 2003; Preston et al., 2003; Kathrin et al., 2005; Elss et al., 2006)。

6. まとめ

GC/pyrolysis/IRMS・pyrolysis-EA/IRMSの開発・普及により、この数年間に生体試料から地質試料までの様々な試料に含まれる有機化合物の分子レベル水素同位体比研究が世界中で積極的に行われるようになった。5章で紹介してきたように、有機化合物の水素同位体比は、過去の水環境を復元するうえで優れたツールになり、また炭素同位体比を組み合わせることで、有機化合物の起源推定や運搬過程の解明などにも信頼性の高い情報を提供する。しかし一方で、3・4章で紹介してきたように、生物の脂質・色素分子の水素同位体比をコントロールするメカニズムや、生物分解と続成作用に伴う水素同位体比の変化についての研究はまだ十分ではなく、今後明らかにしなければならない課題も多い。

有機化合物の分子レベル水素同位体比研究はまだ始まったばかりであり、最近の国際学会においても有機化合物の水素同位体比研究のセッションが頻繁に開催されているように、国際的にも非常に注目されている研究分野である。例えば、2005年のIMOG (International Meeting on Organic

Geochemistry)で、Griceらは、陸上植物の脂質分子の水素同位体比への温度・光量・二酸化炭素濃度・水ストレスの影響を報告している。また2006年のGoldschmidt Conferenceで、Sessionsらは、続成作用に伴う水素同位体比変化のメカニズムを報告し、Ohkouchiらは、南極海堆積物中のphytol, sterolの水素同位体比変化(200%以上のネガティブシフトが観測される)を過去の南極氷床の融解の証拠として報告している。このように、今後非常に早いスピードで有機化合物の水素同位体比研究が進展していくことが予想され、生体内で水素同位体比をコントロールしているメカニズムや、続成作用に伴う同位体比の変化が解明され、過去の水環境を精度良く復元することができる日も近いと考えられる。今後の研究の発展を強く期待したい。

謝 辞

奈良岡浩教授(岡山大)、山本正伸助教授(北海道大学)には本稿の査読を通し、貴重なご助言を頂きました。記して厚く感謝致します。

引用文献

Andersen N., Paul H. A., Bernasconi S. M., McKenzie J. A., Behrens A., Schaeffer P. and Albrecht P. (2001) Large and rapid climate variability during

- the Messinian salinity crisis : Evidence from deuterium concentrations of individual biomarkers. *Geology* **29**, 799-802.
- Bi X., Sheng G., Liu X., Li C. and Fu J. (2005) Molecular and carbon and hydrogen isotopic composition of *n*-alkanes in plant leaf waxes. *Org. Geochem.* **36**, 1405-1417.
- Bilke S. and Monsandl A. (2002) $^3\text{H}/^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotope ratios of trans-anethole using gas chromatography-isotope ratio mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3935-3937.
- Buhay W. M. and Edwards W. D. (1995) Climate in Southwestern Ontario, Canada, between AD 1610 and 1885 inferred from oxygen and hydrogen isotopic measurements of wood cellulose from tree in different hydrologic settings. *Quat. Res.* **44**, 438-446.
- Burgoyne T. W. and Hayes J. M. (1997) Quantitative production of H_2 by pyrolysis of gas chromatographic effluents. *Anal. Chem.* **70**, 5136-5141.
- Chikaraishi Y. (2006) Carbon and hydrogen isotopic composition of sterols in natural marine brown and red macroalgae, and in associated shellfish. *Org. Geochem.* **37**, 428-436.
- Chikaraishi Y. and Naraoka H. (2001) Organic hydrogen-carbon isotope signatures of terrestrial higher plants during biosynthesis for distinctive photosynthetic pathways. *Geochem. J.* **35**, 451-458.
- Chikaraishi Y. and Naraoka H. (2003) Compound-specific δD - $\delta^{13}\text{C}$ analyses of *n*-alkanes extracted from terrestrial and aquatic plants. *Phytochemistry* **63**, 361-371.
- 力石嘉人・奈良岡浩 (2004) 超微量有機分子の安定水素・炭素同位体比測定とその応用. *ぶんせき* **8**, 456-462.
- Chikaraishi Y. and Naraoka H. (2005) $\delta^{13}\text{C}$ and δD identification of sources of lipid biomarkers in sediments of Lake Haruna (Japan). *Geochim. Cosmochim. Acta* **69**, 3285-3297.
- Chikaraishi Y. and Naraoka H. (2006) Carbon and hydrogen isotope variation of plant biomarker in a plant-soil system. *Chem. Geol.* **231**, 190-202.
- Chikaraishi Y. and Naraoka H. (2007) $\delta^{13}\text{C}$ and δD relationships among three *n*-alkyl compound classes (*n*-alkanoic acid, *n*-alkane and *n*-alkanol) of terrestrial higher plants. *Org. Geochem.* **38**, 198-215.
- Chikaraishi Y., Naraoka H. and Poulson S. R. (2004a) Carbon and hydrogen isotopic fractionation during lipid biosynthesis in a higher plant (*Cryptomeria japonica*). *Phytochemistry* **65**, 323-330.
- Chikaraishi Y., Naraoka H. and Poulson S. R. (2004b) Hydrogen and carbon isotopic fractionations of lipid biosynthesis among terrestrial (C3, C4 and CAM) and aquatic plants. *Phytochemistry* **65**, 1369-1381.
- Chikaraishi Y., Suzuki Y. and Naraoka H. (2004c) Hydrogen isotopic fractionations during desaturation and elongation associated with polyunsaturated fatty acid biosynthesis in marine macroalgae. *Phytochemistry* **65**, 2293-2300.
- Chikaraishi Y., Matsumoto K., Ogawa N. O., Suga H., Kitazato H. and Ohkouchi N. (2005a) Hydrogen, carbon and nitrogen isotopic fractionations during chlorophyll biosynthesis in C3 higher plants. *Phytochemistry* **66**, 911-920.
- Chikaraishi Y., Yamada Y. and Naraoka H. (2005b) Carbon and hydrogen isotope compositions of sterols from riverine and marine sediments. *Limnol. Oceanogr.* **50**, 1763-1770.
- Chikaraishi Y., Matsumoto K., Kitazato H. and Ohkouchi N. (2007) Sources and transformation processes of pheopigments: Carbon and hydrogen isotopic evidence from Lake Haruna, Japan. *Org. Geochem.* **38**, 985-1001.
- Coleman M. L., Shepherd T. J., Durham J. J., Rouse J. E. and Moore, G. R. (1982) Reduction of water with zinc for hydrogen isotope analysis. *Anal. Chem.* **54**, 993-995.
- Cormie A. B., Schwarcz H. P. and Gray J. (1994a) Determination of the hydrogen isotopic composition of bone collagen and correction for hydrogen exchange. *Geochim. Cosmochim. Acta* **58**, 365-375.
- Cormie A. B., Schwarcz H. P. and Gray J. (1994b) Relation between hydrogen isotopic ratios of bone collagen and rain. *Geochim. Cosmochim. Acta* **58**, 377-391.

- Dawson D., Grice K., Wang S. X., Alexander R. and Radke J. (2004) Stable hydrogen isotopic composition of hydrocarbons in torbanites (Late Carboniferous to Late Permian) deposited under various climatic conditions. *Org. Geochem.* **35**, 189-197.
- Dawson D., Grice K. and Alexander R. (2005) Effect of maturation on the indigenous δD signatures of individual hydrocarbons in sediments and crude oils from the Perth Basin (Western Australia). *Org. Geochem.* **36**, 95-104.
- Dawson D., Grice K., Alexander R. and Edwards D. (2007) The effect of source and maturity on the stable isotopic compositions of individual hydrocarbons in sediments and crude oils from the Vulcan Sub-basin, Timor Sea, northern Australia. *Org. Geochem.* **38**, 977-984.
- Elss S., Preston C., Apple M., Heckel F. and Schreier P. (2006) Influence of technological processing on apple aroma analyzed by high resolution gas chromatography-mass spectrometry and on-line gas chromatography-combustion/pyrolysis-isotope ratio mass spectrometry. *Food Chem.* **98**, 269-276.
- Englebrecht A. C. and Sachs J. P. (2005) Determination of sediment provenance at drift sites using hydrogen isotopes and unsaturation ratios in alkenones. *Geochim. Cosmochim. Acta* **69**, 4523-4565.
- Epstein S. and Yapp C. J. (1976) Climatic implications of the D/H ratio of hydrogen in C-H groups in tree cellulose. *Earth Planet. Sci. Lett.* **30**, 252-261.
- Epstein S., Yapp C. J. and Hall J. H. (1976) The determination of the D/H ratio of non-exchangeable hydrogen in cellulose extracted from aquatic and land plants. *Earth Planet. Sci. Lett.* **30**, 241-251.
- Estep M. F. and Hoering T. C. (1980) Biogeochemistry of the stable Hydrogen isotopes. *Geochim. Cosmochim. Acta* **44**, 1197-1206.
- Freeman K. H., Hayes J. M., Trendel J.-M. and Albrecht P. (1990) Evidence from carbon isotope measurements for diverse origins of sedimentary hydrocarbons. *Nature* **343**, 254-256.
- Hayes J. M. (1993) Factors controlling ^{13}C contents of sedimentary organic compounds: Principles and evidence. *Mar. Geol.* **113**, 111-125.
- Hayes J. M. (2001) Fractionation of carbon and hydrogen isotopes in biosynthetic processes. *Rev. Mineral. Geochem.* **43**, 225-277.
- Hayes J. M. (2004) Isotopic order, biogeochemical processes, and earth history *Geochim. Cosmochim. Acta* **68**, 1691-1700.
- Hillkert A. W., Douthett C.B., Schlüter H. J. and Brand W. A. (1999) Isotope ratio monitoring gas chromatography/mass spectrometry of D/H by high temperature conversion isotope ratio mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* **13**, 1226-1230.
- Hör K., Ruff C., Weckerle B., König T. and Schreier P. (2001) Flavor authenticity studies by $^3H/^1H$ ratio determination using on-line gas chromatography pyrolysis isotope ratio mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 21-25.
- Hou J., Huang Y., Wang Y., Shuman B., Oswald W. W., Faison E. and Foster D. R. (2006) Postglacial climate reconstruction based on compound-specific D/H ratios of fatty acids from Blood Pond, New England. *Geochem. Geophys. Geosys.* **7**, Q 03008, doi:10.1029/2005 GC 001076.
- Hou J., D'Andrea W. J., MacDonald D. and Huang Y. (2007a) Hydrogen isotopic variability in leaf waxes among terrestrial and aquatic plants around Blood Pond, Massachusetts (USA). *Org. Geochem.* in press.
- Hou J., D'Andrea W. J., MacDonald D. and Huang Y. (2007b) Evidence for water use efficiency as an important factor in determining the δD values of tree leaf waxes. *Org. Geochem.* **38**, 1251-1255.
- Huang Y., Shuman B., Wang Y. and Webb III T. (2002) Hydrogen isotope ratios of palmitic acid in lacustrine sediments record late Quaternary climate variations. *Geology* **30**, 1103-1106.
- Huang Y., Shuman B., Wang Y. and Webb III T. (2004) Hydrogen isotope ratios of individual lipids in lake sediments as novel tracers of climatic and environmental change: a surface sediment test. *J. Paleolimnol.* **31**, 363-375.

- Huang Y., Wang Y., Alexander M. R., Lee T., Pose-Petruck C., Fuller M. and Pizzarello S. (2005) Molecular and compound-specific isotopic characterization of monocarboxylic acids in carbonaceous meteorites. *Geochim. Cosmochim. Acta* **69**, 1073-1084.
- Kendall C. and Coplen T. B. (1985) Multisample conversion of water to hydrogen by zinc for stable isotope determination. *Anal Chem.* **57**, 1437-1440.
- Kahle K., Preston C., Richling E., Heckel F. and Schreier P. (2005) On-line gas chromatography combustion / pyrolysis isotope ratio mass spectrometry (HRGC-C/P-IRMS) of major volatiles from pear fruit (*Pyrus communis*) and pear products. *Food Chem.* **91**, 449-455.
- Kelly S. D., Rhodes C., Lofthouse J. H., Anderson D., Burwood C. E., Dennis M. J. and Brereton P. (2003) Detection of sugar syrups in apple juice by $\delta^2\text{H}\%$ and $\delta^{13}\text{C}\%$ analysis of hexamethylenetetramine prepared from fructose. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 1801-1806.
- Krull E., Sachse D., Mügler I., Thiele A. and Gleixner G. (2006) Compound-specific $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^2\text{H}$ analyses of plant and soil organic matter: A preliminary assessment of the effects of vegetation change on ecosystem hydrology. *Soil Biol. Biochem.* **38**, 3211-3221.
- Li M., Huang Y., Obermajer M., Jiang C., Snowdon L. R. and Fowler M. G. (2001) Hydrogen isotopic compositions of individual alkanes as a new approach to petroleum correlation: case studies from the Western Canada Sedimentary Basin. *Org. Geochem.* **32**, 1387-1399.
- Liu W. and Huang Y. (2005) Compound specific D/H ratios and molecular distributions of higher plant leaf waxes as novel paleoenvironmental indicators in the Chinese Loess Plateau. *Org. Geochem.* **36**, 851-860.
- Liu W., Yang H. and Li L. (2006) Hydrogen isotopic compositions of n-alkanes from terrestrial plants correlate with their ecological life forms. *Oecologia* **150**, 330-338.
- Motz J. E., Edwards T. W. D. and Buhay W. M. (1997) Use of nickel-tube pyrolysis for hydrogen-isotope analysis of water and other compounds. *Chem. Geol.* **140**, 145-149.
- Naraoka H. and Ishiwatari R. (2000) Molecular and isotopic abundances of long-chain n-fatty acids in open marine sediments of the western North Pacific. *Chem. Geol.* **165**, 23-36.
- Northfelt D. W., DeNiro M. J. and Epstein S. (1981) hydrogen and carbon isotopic ratios of the cellulose nitrate and saponifiable lipid fractions prepared from annual growth rings of a California redwood. *Geochim. Cosmochim. Acta* **45**, 1895-1998.
- Oba Y. and Naraoka H. (2003) A different behavior of hydrogen isotope exchange in aqueous solutions between two PAH isomers (fluoranthene and pyrene). *Res. Org. Geochem.* **18**, 29-36.
- Oba Y. and Naraoka H. (2006) Carbon isotopic composition of acetic acid generated by hydrous pyrolysis of macromolecular organic matter from the Murchison meteorite. *Meteor. Planet. Sci.* **41**, 1175-1181.
- Pagani M., Pedentchouk N., Huber M., Sluijs A., Schouten S., Brinkhuis H., Sinninghe Damsté J. S., Dickens G. R. and the Expedition 302 Scientist (2006) Arctic hydrology during global warming at the Palaeocene/Eocene thermal maximum. *Nature* **442**, 671-675.
- Pedentchouk N., Freeman K. H. and Harris N. B. (2006) Different response of δD values of n-alkanes, isoprenoids, and kerogen during thermal maturation. *Geochim. Cosmochim. Acta* **70**, 2063-2072.
- Pendall E., Betancourt J. L. and Leavitt S. W. (1999) Paleoclimatic significance of δD and $\delta^{13}\text{C}$ values in piñon pine needles from packrat middens spanning the last 40,000 years. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* **147**, 53-72.
- Preston C., Richling E., Elss S., Appl M., Heckel F., Hartlieb A. and Schreier P. (2003) On-line gas chromatography combustion/pyrolysis isotope ratio mass spectrometry (HRGC-C / P-IRMS) of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) volatiles. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 8027-8031.

- Pizzarello S. and Huang Y. (2005) The deuterium enrichment of individual amino acids in carbonaceous meteorites: A case for the presolar distribution of biomolecule precursors. *Geochim. Cosmochim. Acta* **69**, 599-605.
- Pond K. L., Huang Y., Wang Y. and Kulpa C. F. (2002) Hydrogen isotopic composition of individual n-alkanes as an intrinsic tracer for bioremediation and source identification of petroleum contamination. *Environ. Sci. Technol.* **36**, 724-728.
- Radlke J., Bechtel A., Gaupp R., Püttmann W., Schwark L., Sachse D. and Gleixner G. (2005) Correlation between hydrogen isotope ratios of lipid biomarkers and sediment maturity. *Geochim. Cosmochim. Acta* **69** 5517-5530.
- Saches D., Radke J., Gaupp R., Schwark L., Lüniger G. and Gleixner G. (2004a) Reconstruction of palaeohydrological conditions in a lagoon during the 2nd Zechstein cycle through simultaneous use of δD values of individual n-alkanes and $\delta^{18}O$ and $\delta^{13}C$ values of carbonates. *Int. J. Earth Sci.* **93**, 554-564.
- Saches D., Radke J. and Gleixner G. (2004b) Hydrogen isotope ratios of recent lacustrine sedimentary n-alkanes record modern climate variability. *Geochim. Cosmochim. Acta* **68** 4877-4889.
- Saches D., Radke J. and Gleixner G. (2006) δD values of individual n-alkanes from terrestrial plants along a climatic gradient-Implications for the sedimentary biomarker record. *Org. Geochem.* **37**, 469-483.
- 酒井均・松久幸敬(1996)安定同位体地球化学, 東京大学出版会
- Sauer P. E., Eglinton T. I., Hayes J. M., Schimmelmann A. and Sessions A. L. (2001) Compound-specific D/H ratios of lipid biomarkers from sediments as a proxy for environmental and climatic conditions. *Geochim. Cosmochim. Acta* **65**, 213-222.
- Schefuß E., Schouten S. and Schneider R. R. (2005) Climatic controls on central African hydrology during the past 20,000 years. *Nature* **437**, 1003-1006.
- Schimmelmann A., Sessions A. L., Boreham C. J., Edward D. S., Logan G. A. and Summons R. E. (2004) D/H ratios in terrestrially sourced petroleum systems. *Org. Geochem.* **35**, 1169-1195.
- Schimmelmann A., Sessions A. L. and Mastalerz M. (2006) Hydrogen isotopic (D/H) composition of organic matter during diagenesis and thermal maturation. *Annu. Rev. Earth. Planet. Sci.* **64**, 501-533.
- Schmidt H.-L., Werner R. A. and Eisenreich W. (2003) Systematics of 2H patterns in natural compounds and its importance for the elucidation of biosynthetic pathways. *Phytochem. Rev.* **2**, 61-85.
- Schouten S., Ossebaar J., Schreiber K., Kienhuis M. V. M., Langer G., Benthien A. and Bijma J. (2006) 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*. *Biogeoscience* **3**, 113-119.
- Sessions A. L. (2006) Isotope-ratio detection for gas chromatography. *J. Sep. Sci.* **29**, 1946-1961.
- Sessions A. L. and Hayes J. M. (2005) Calculation of hydrogen isotopic fractionations in biogeochemical systems. *Geochim. Cosmochim. Acta* **69**, 593-597.
- Sessions A. L., Burgoyne T. W., Schimmelmann A. and Hayes J. M. (1999) Fractionation of hydrogen isotopes in lipid biosynthesis. *Org. Geochem.* **30**, 1193-1200.
- Sessions A. L., Burgoyne T. W. and Hayes J. M. (2001 a) Correction of H_3^+ contributions in hydrogen isotope ratio monitoring mass spectrometry. *Anal. Chem.* **73**, 192-199.
- Sessions A. L., Burgoyne T. W. and Hayes J. M. (2001 b) Determination of the H_3 factor in hydrogen isotope ratio monitoring mass spectrometry. *Anal. Chem.* **73**, 200-207.
- Sessions A. L., Jahnke L. L., Schimmelmann A. and Hayes J. M. (2002) Hydrogen isotope fractionation in lipids of the methane-oxidizing bacterium *Methylococcus capsulatus*. *Geochim. Cosmochim. Acta* **66**, 3955-3969.
- Sessions A. L., Sylva S. P., Summons R. E. and Hayes J. M. (2004) Isotopic exchange of carbon-bound

- hydrogen over geologic timescales. *Geochim. Cosmochim. Acta* **68**, 1545-1559.
- Shuman B., Huang Y., Newby P. and Wang Y. (2006) Compound-specific isotopic analyses track changes in seasonal precipitation regimes in the Northeastern United States at ca 8200 cal yr BP. *Quat. Sci. Rev.* **25**, 2992-3002.
- Smith F. A. and Freeman K. H. (2006) Influence of physiology and climate on δD of leaf wax *n*-alkanes from C₃ and C₄ grasses. *Geochim. Cosmochim. Acta* **70**, 1172-1187.
- Sternberg L da S. L. (1988) D/H ratios of environmental water recorded by D/H ratios of plant lipids. *Nature* **333**, 59-61.
- Sternberg L da S. L., DeNiro M. J. and Ajie H. O. (1986) Isotopic relationships between saponifiable lipids and cellulose nitrate prepared from red, brown and green algae. *Planta* **169**, 320-324.
- Sun Y., Chen Z., Xu S. and Cai P. (2005) Stable carbon and hydrogen isotopic fractionation of individual *n*-alkanes accompanying biodegradation: evidence from a group of progressively biodegraded oils. *Org. Geochem.* **36**, 225-238.
- Tang Y., Huang Y., Ellis G. S., Wang Y., Kralert P.G., Gillaizeau B., Ma Q. and Hwang R. (2005) A kinetic model for thermally induced hydrogen and carbon isotope fractionation of individual *n*-alkanes in crude oil. *Geochim. Cosmochim. Acta* **69**, 4505-4520.
- Tobias H. J. and Brenna J. T. (1996) High-precision D/H measurement from organic mixtures by gas chromatography continuous-flow isotope ratio mass spectrometry using a palladium filter. *Anal. Chem.* **68**, 3002-3007.
- Tobias H. J. and Brenna J. T. (1997) On-line pyrolysis as a limitless reduction source for high-precision isotopic analysis of organic-derived hydrogen. *Anal. Chem.* **69**, 3148-3152.
- Tuo J. Zhang M., Wang X. and Zhang C. (2006) Hydrogen isotope ratios of aliphatic and diterpenoid hydrocarbons in coals and carbonaceous mudstones from the Liaohé Basin, China. *Org. Geochem.* **37**, 165-176.
- Wang Y., Huang Y., Alexander C. M. O'D., Fogel M. and Cody C. (2005) Molecular and compound-specific hydrogen isotope analyses of insoluble organic matter from different carbonaceous chondrite groups. *Geochim. Cosmochim. Acta* **69**, 3711-3721.
- Xie S., Nott C. J., Avsejs L. A., Volders F., Maddy D., Chambers F. M., Gledhill A., Carter J. F. and Evershed R. P. (2000) Palaeoclimate records in compound-specific δD values of a lipid biomarker in ombrotrophic peat. *Org. Geochem.* **31**, 1053-1057.
- Xie S., Nott C. J., Avsejs L. A., Maddy D., Chambers F. M. and Evershed R. P. (2004) Molecular and isotopic stratigraphy in an ombrotrophic mire for paleoclimate reconstruction. *Geochim. Cosmochim. Acta* **68**, 2849-2862.
- Xiong Y., Geng A., Pan C., Liu D. and Peng P. (2005) Characterization of the hydrogen isotopic composition of individual *n*-alkanes in terrestrial source rocks. *Appl. Geochem.* **20**, 455-464.
- Yamada K. and Ishiwatari R. (1999) Carbon isotopic compositions of long-chain *n*-alkanes in the Japan Sea sediments: implications for paleoenvironmental changes over the past 85 kyr. *Org. Geochem.* **30**, 367-377.
- Yang H. and Huang Y. (2003) Preservation of lipid hydrogen isotope ratios in Miocene lacustrine sediments and plant fossils at Clarkia, northern Idaho, USA. *Org. Geochem.* **34**, 413-423.
- Zhang Z. and Sachs J. P. (2007) Hydrogen isotope fractionation in freshwater algae: I. Variations among lipids and species. *Org. Geochem.* **38**, 582-608.