Res. Org. Geochem. **31**, 51−68 (2015)

技術論文

海洋堆積物中ステロールの GC/MS 分析：TMS エーテル誘導体化 *

山本 修一 **, *** ・近藤 寛 **** ・石渡 良志 ***** ・上村 仁 *****

（2015 年 8 月 17 日受付，2015 年 11 月 9 日受理）

1. はじめに

ステロールは原生動物，菌，植物，動物などの真核生物に普遍的に含まれるが，原核生物では一部のシアノバクテリアにも含まれることが知られている（たとえば，Hatcher and McGillivary, 1979; Huang and Meinschein, 1979; Volkman, 1986）。真核生物では細胞膜を構成する脂質として，またステロイドホルモンとしての働きをしており，存在状態も遊離型，脂肪酸と結合したエステル型，さらに植物では配糖体としても存在する（Bean, 1973）。構造は四環のステロイド骨格と側鎖からなり，二重結合の位置と数，側鎖の炭素数，置換基の種類と立体配位の違いにより非常に多様である。構造は生物種によって異なることから海洋堆積物や湖沼堆積物中の有機物の起源を知るバイオマーカー (Gaskell and Eglinton, 1976; Huang and Meinschein, 1979; Volkman et al., 1981; Volkman et al., 1987)，また堆積物の続成的変化を知る指標（Lee et al., 1979; de Leeuw, 1983），また生物の化学的分類学の指標 (Jones et al., 1994）として使用されてきた。現世の堆積物で検出されているステロールとして，炭素数 26～30，二重結合の位置 5, 7, 22, 24 位，3 位のヒドロキシル基は α，β 配位，側鎖の置換基は 23 位や 24 位にメチル基，エチル基，プロピル基，また 4 位にメチル基をもつ 4- メチルステロールが知られており，これまで海洋堆積物では 50 種以上のステロールが報告されている（Smith et al., 1982; Brassell and Eglinton, 1983）。本研究では，エクアドル沖海洋堆積物で同定された 36 種のステロールのトリメチルシリル（TMS）誘導体のマススペクトルとその特徴およびフラグメンテーションについて述べる。

2. 試料および分析方法

本研究で用いた試料は，ODP（Ocean Drilling Program）Leg 111 においてエクアドル沖約 400 km のパナマ海盆の Site 677（1° 12.14’ N, 83° 44.22’ W, 水深 3461 m) で採取された試料の表層泥（004H）を用いた。

凍結乾燥した試料約 5 g に 1N KOH／メタノール（5％水を含む）50 mL を加え，80℃，3 時間，湯浴中で還流し，脂質成分をケン化抽出した。抽出液を遠心分離した後，n-ヘキサン／ジエチルエーテル（9:1）にて中性脂質成分を抽出した。抽出液は濃縮後，薄層クロマトグラフィー（薄層プレート：Whatman, silicagel PLK5F, 20×20 cm）に抽出試料と標準物質をスポットし，n-ヘキサン／酢酸エチル（7:3）で展開し，炭化水素画分と脂肪族アル

*GC-MS analysis of sterols in a marine sediment: TMS ether derivatives

**創価大学・理工学部・共生創造理工学科
***創価大学・自然環境研究センター，〒 192-8577 東京都八王子市丹木町 1-236
e-mail: syama@soka.ac.jp
****長崎大学・教育学部・地学教室，長崎県長崎市文教町 1-14
*****東京都立大学・大学院・理学研究科，東京都八王子市南大沢 1-1
Shuichi Yamamoto, Hiroshi Kondo, Ryoshi Ishiwatari, Hitoshi Uemura
**Department of Science and Engineering for Sustainable Innovation, Faculty of Science and Engineering
***Research Center for Natural Environment
Soka University, 1-236 Tangicho, Hachioji, Tokyo, 192-8577 Japan.

コール・ステロール画分に分けた。脂肪族アルコール・ステロール画分は，N,O-Bis（trimethylsilyl）–acetoamide（BSA）（和光純薬工業社）を用いて，80℃，30 分間加熱し，トリメチルシリル（TMS）誘導体化した。

GC-MS の測定には，Varian 3700 GC-Finnigan INCOS 50 の GC-MS 装置を用いた。ガスクロマトグラフは，分析カラム：UP-2（Hewlett Packard（現，Agilent）社製，長さ 25 m，内径 0.25 mm，膜厚 0.25 μm），注入口：splitless，注入口温度：300℃，カラム温度：60℃ 1 分恒温後，60–200℃（30℃／分），200–310℃（2℃／分）310℃に 30 分間恒温，質量範囲：50–650 ダルトンの条件を用いた。

化合物の同定レベルは，Table 1 に示すように，1：マスフラグメントの解釈，2：文献およびライブラリー（Nist02, Wiley7n）との照合，3：標準物質との照合，である。

ステロールの同定は GC の保持時間と GC/MS によるマススペクトルをステロール標準物質および文献データ（Henderson et al., 1972; Huang and Meinschein, 1978; Smith et al., 1982; Smith et al., 1983; Volkman et al., 1990; 近藤ら，1991a, 1991b; Nist02 および Wiley7n ライブラリー）と比較検討して行なった。なお，ステロールの同定に際しては，マススペクトルの特徴的なフラグメントイオンだけでなく，保持時間も重要であることから（Volkman et al., 1981）；（Smith et al., 1982; Smith et al., 1983）；（de Leeuw, 1983）の文献における保持時間も参照した。

3. 結果および考察

3.1. 同定されたステロールと基本的なフラグメンテーション

Fig. 1 および Table 1 にガスクロマトグラム（TIC）の後半部分と同定されたステロールのリストを示す。同定されたステロールは，Δ^5-ステロール 4 種，5α-スタノール 5 種，5β-スタノール 2 種，Δ^{22}-ステロール 5 種，$\Delta^{5,22}$-ステロール 6 種，$\Delta^{24(28)}$-ステロール 5 種，$\Delta^{5,24(28)}$-ステロール 4 種，Δ^7-ステロール 2 種，4α-メチルスタノール 4 種，4α-メチル Δ^{22}-ステロール 2 種の 10 グループ，39 種である。

ステロールの基本的なフラグメンテーションには Fig. 2 に示すような 7 つのフラグメンテーションがあり，Table 2 に示すように，これらの組み合わせによってほとんどの主要なフラグメントイオンを説明できる。フラグメントイオンの生成は，側鎖（SC）を維持したまま TMS エーテル基の脱離を伴うフラグメントイオンの生成と，SC の開裂を伴うフラグメントイオンの生成に大別される。TMS エーテルに由来するフラグメントイオンには $[HO\text{-}Si(CH_3)_3]^+$(m/z 90) あるい

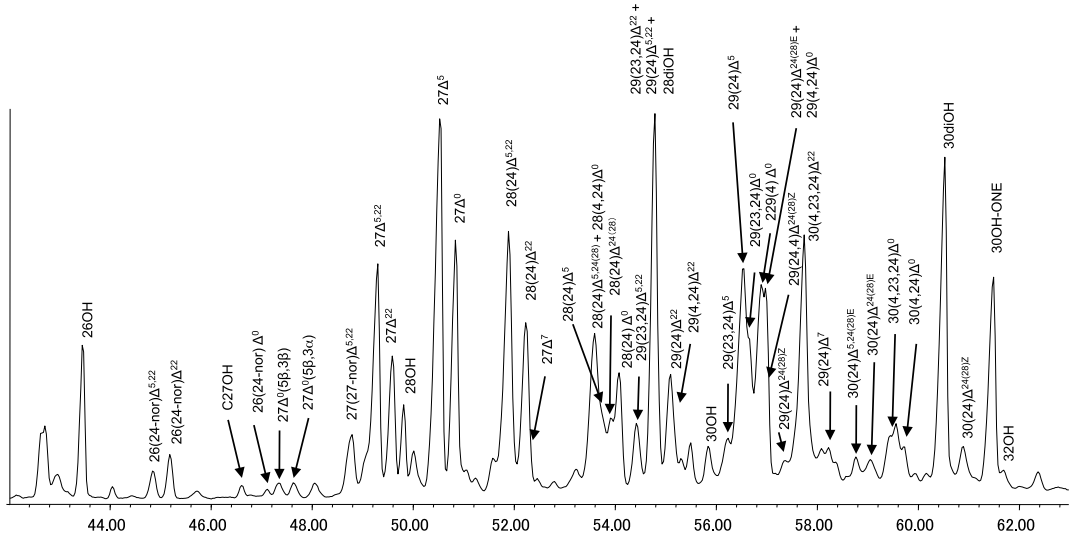

Fig. 1. Total ion chromatogram of sterols (TMS ethers) from the sediment of ODP Leg 111 site 677. Abbreviation is shown in Table 1.

Table 1. Sterols identified in the sediment of ODP Leg 111 site 677.

RT (min)	Abbreviation[a]	Systematic name	Trivial name	Formula (TMS)	MW (TMS)	Retention Index[b]	Identification Level[c]
44.839	26(24-nor)$\Delta^{5,22}$	24-nor-cholesta-5,22-dien-3β-ol-TMS	24-nordehydrocholesterol	$C_{29}H_{50}OSi$	442	2645	2
45.181	26(24-nor)Δ^{22}	24-nor-5α(H)-cholest-22-en-3β-ol-TMS	24-nordehydrocholestanol	$C_{29}H_{52}OSi$	444	2656	2
47.086	26(24-nor)Δ^{0}	24-nor-5α(H)-cholestan-3β-ol-TMS	occelasterol	$C_{29}H_{54}OSi$	446	2715	2
47.341	27Δ^{0}(5β,3β)	5β(H)-cholestan-3β-ol-TMS	coprostanol	$C_{30}H_{56}OSi$	460	2724	2
47.626	27Δ^{0}(5β,3α)	5β(H)-cholestan-3α-ol-TMS	epicoprostanol	$C_{30}H_{56}OSi$	460	2733	2
48.706	27(27-nor,24)$\Delta^{5,22}$	27-nor-24-methylcholesta-5,22-dien-3β-ol-TMS		$C_{30}H_{52}OSi$	456	2766	2
49.303	27$\Delta^{5,22}$	cholesta-5,22-dien-3β-ol-TMS	22-dehydrocholesterol	$C_{30}H_{52}OSi$	456	2785	2
49.588	27Δ^{22}	5α(H)-cholest-22-en-3β-ol-TMS	22-dehydrocholestanol	$C_{30}H_{54}OSi$	458	2793	2
50.526	27Δ^{5}	cholest-5-en-3β-ol-TMS	cholesterol	$C_{30}H_{54}OSi$	458	2824	3
50.839	27Δ^{0}	5α(H)-cholestan-3β-ol-TMS	cholestanol	$C_{30}H_{56}OSi$	460	2835	3
51.891	28(24)$\Delta^{5,22}$	24-methylcholesta-5,22-dien-3β-ol-TMS	brassicasterol	$C_{31}H_{54}OSi$	470	2870	2
52.232	28(24)Δ^{22}	24-methyl-5α(H)-cholest-22-en-3β-ol-TMS	brassicastanol	$C_{31}H_{56}OSi$	472	2881	2
52.260	27Δ^{7}	5α(H)-cholest-7-en-3β-ol-TMS	lathosterol	$C_{30}H_{54}OSi$	458	2882	2
53.568	28(24)$\Delta^{5,24(28)}$	24-methylcholesta-5,24(28)-dien-3β-ol-TMS	24-methylenecholesterol	$C_{31}H_{54}OSi$	470	2926	2
53.625	28(4)Δ^{0}	4α-methyl-5α(H)-cholestan-3β-ol-TMS		$C_{31}H_{58}OSi$	474	2928	1
53.739	28(24)Δ^{5}	24-methylcholest-5-en-3β-ol-TMS	campesterol	$C_{31}H_{56}OSi$	472	2931	3
53.910	28(24)$\Delta^{24(28)}$	24-methyl-5α(H)-cholest-24(28)-en-3β-ol-TMS		$C_{31}H_{56}OSi$	472	2937	2
54.080	28(24)Δ^{0}	24-methyl-5α(H)-cholestan-3β-ol-TMS		$C_{31}H_{58}OSi$	474	2943	2
54.421	29(23,24)$\Delta^{5,22}$	23,24-dimethylcholesta-5,22-dien-3β-ol-TMS		$C_{32}H_{56}OSi$	484	2954	2
54.819	29(23,24)Δ^{22}	23,24-dimethyl-5α(H)-cholest-22-en-3β-ol-TMS		$C_{32}H_{58}OSi$	486	2967	2
54.734	29(24)$\Delta^{5,22}$	24-ethylcholesta-5,22-dien-3β-ol-TMS	stigmasterol	$C_{32}H_{56}OSi$	484	2964	3
55.075	29(24)Δ^{22}	24-ethyl-5α(H)-cholest-22-en-3β-ol-TMS		$C_{32}H_{58}OSi$	486	2975	2
54.478	29(4,24)Δ^{22}	4α,24-dimethyl-5α(H)-cholest-22-en-3β-ol-TMS		$C_{32}H_{58}OSi$	486	2976	2
56.241	29(23,24)Δ^{5}	23,24-dimethylcholest-5-en-3β-ol-TMS		$C_{32}H_{58}OSi$	486	3014	2
56.525	29(24)Δ^{5}	24-ethylcholest-5-en-3β-ol-TMS	β-sitosterol	$C_{32}H_{58}OSi$	486	3024	3
56.554	29(24)$\Delta^{5,24(28)E}$	24-ethylcholesta-5,24(28)E-dien-3β-ol-TMS	fucosterol	$C_{32}H_{56}OSi$	484	3025	2
56.668	29(23,24)Δ^{0}	23,24-dimethyl-5α(H)-cholestan-3β-ol-TMS		$C_{32}H_{60}OSi$	488	3029	2
56.867	29(24)Δ^{0}	24-ethyl-5α(H)-cholestan-3β-ol-TMS	stigmastanol	$C_{32}H_{60}OSi$	488	3036	2
56.923	29(24)$\Delta^{24(28)E}$	24-ethyl-5α(H)-cholest-24(28)E-en-3β-ol-TMS	fucostanol	$C_{32}H_{58}OSi$	486	3038	2
56.980	29(4,24)Δ^{0}	4α,24-dimethyl-5α(H)-cholestan-3β-ol-TMS		$C_{32}H_{60}OSi$	488	3040	1
57.009	29(24)$\Delta^{5,24(28)Z}$	24-ethylcholesta-5,24(28)Z-dien-3β-ol-TMS	isofucosterol	$C_{32}H_{56}OSi$	484	3041	2
57.322	29(24)$\Delta^{24(28)Z}$	24-ethyl-5α(H)-cholest-24(28)Z-en-3β-ol-TMS	isofucostanol	$C_{32}H_{58}OSi$	486	3052	2
57.748	30(4,23,24)Δ^{22}	4α,23,24-trimethyl-5α(H)-cholest-22-en-3β-ol-TMS	dinosterol	$C_{33}H_{60}OSi$	500	3067	2
58.231	29(24)Δ^{7}	24-ethyl-5α(H)-cholest-7-en-3β-ol-TMS		$C_{32}H_{58}OSi$	486	3083	2
58.772	30(24)$\Delta^{5,24(28)E}$	24(E)-propylidenecholest-5-en-3β-ol-TMS		$C_{33}H_{58}OSi$	498	3102	2
59.141	30(24)$\Delta^{24(28)E}$	24(E)-propylidene-5α(H)-cholestan-3β-ol-TMS		$C_{33}H_{60}OSi$	500	3115	2
59.426	30(4,23,24)Δ^{0}	4α,23,24-trimethyl-5α(H)-cholestan-3β-ol-TMS	dinostanol	$C_{33}H_{62}OSi$	502	3124	1
59.710	30(4,24)Δ^{0}	4α-methyl-24-ethyl-5α(H)-cholestan-3β-ol-TMS		$C_{33}H_{62}OSi$	502	3134	1
60.876	30(24)$\Delta^{24(28)Z}$	24(Z)-propylidene-5α(H)-cholestan-3β-ol-TMS		$C_{33}H_{60}OSi$	500	3173	2

[a]Abbreviation: n(m)Δp; n:carbon number of sterol, m:position of methyl or ethyl group in side chain, p:position of double bond

[b]Retention Index was measured by the programmed temperature GC-MS analysis same as in the text using the retention times of n-C_{26} - n-C_{32} alcohol.

[c]1: interpretation of mass fragmentation pattern, 2: comparison with mass spectrum from libraly（Nist02 and Wiley7n) or literature (Brooks et al., 1968; Smith et al., 1983; Volkman et al., 1990; Kondo et al., 1990, 1991), 3: identification by authentic standard.

は $[HO\text{-}Si(CH_3)_2]^+$(*m/z* 75) がある。また TMS エーテル基を含み 1–10 位および 3–4 位で開裂すると $[(CH_3)_3Si\text{-}OC_3H_4]^+$(*m/z* 129) が生じる。これらの基が分子イオンから脱離して生成するイオンには $[M\text{-}90]^+$ と $[M\text{-}129]^+$ があり，さらにメチル基が脱離して生成する $[M\text{-}(90+15)]^+$，$[M\text{-}(129+15)]^+$ イオンがある。一方，SC に関連したフラグメンテーションには，SC，SC1，SC2，SC+C_2H_3 および SC+C_3H_5 がある。SC，SC1，SC2 は，それぞれ 17–20 位，20–22 位，22–23 位の開裂である。また，SC+C_2H_3 は SC の開裂とそれに続く D 環の 13–17 位と 15–16 位の炭素鎖（C_2H_3）の開裂，また SC+C_3H_5 は SC の開裂とそれに続く D 環の 13–17 位と 14–15 位の炭素鎖（C_3H_5）の開裂である。これらのフラグメンテーションの組み合わせはステロールの構造によって異なってくる（Table 2）。ステロールの同定においては，このようなフラグメンテーションと保持時間が重要になる。Fig. 1 に示したように，クロマトグラムの後半部に出現するステロールは他のステロールやアルコール類と重なっているものが多いが，現れる順序は使用するカラムの極性な

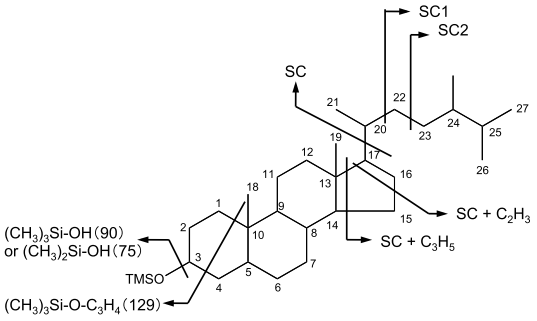

Fig. 2. Diagnostic fragmentation of sterols (TMS ethers).

Table 2. Diagnostic fragmentations of sterol.

Group	Diagnostic fragmentation		
	Ions retaining the side chain	Ions involving loss of the side chain	others
Δ^5-sterol	M, M-15 M-90, M-(90+15) M-129	M-90-SC=255 → $-C_2H_3$+H=229 → $-C_3H_5$-H=213	$(CH_3)_3Si\text{-}O\text{-}C_3H_4$=129
5*α*-stanol **5*β*-stanol**	M, M-15 M-90, M-(90+15)	M-SC-C_3H_5-H=305 M-90-SC=257 → $-C_2H_3$=230 → $-C_3H_5$-H=215	$CH_3)_2SiOH$=75
Δ^{22}-sterol	M, M-15	M-SC1-H=374 → $-CH_3$=359 M-SC-2H=345 → $-C_2H_3$-H=317 M-90-SC=257 → $-C_3H_5$-H=215	$CH_3)_2SiOH$=75
$\Delta^{5,22}$-sterol	M, M-15 M-90, M-(90+15) M-129	M-90-SC=255 M-90-SC-C_3H_5-H=213	$(CH_3)_3Si\text{-}O\text{-}C_3H_4$=129 SC
$\Delta^{24(28)}$-sterol	M, M-15	M-SC2-H=388 → $-CH_3$=373 M-SC-2H=345 → $-C_3H_5$-H=305 M-90-SC2-H=298 → $-CH_3$=283 M-90-SC-2H=255 → $-C_2H_3$+H=229 → $-C_3H_5$+H=215	$CH_3)_2SiOH$=75
$\Delta^{5,24(28)}$-sterol	M, M-15 M-90, M-(90+15) M-129	M-SC2-H=386 M-90-SC2-H=296 → $-CH_3$=281 M-90-SC=255 → $-C_2H_3$+H=229 → $-C_3H_5$-H=213	$CH_3)_2SiOH$=75 $(CH_3)_3Si\text{-}O\text{-}C_3H_4$=129
Δ^7-sterol	M, M-15 M-90, M-(90+15)	M-90-SC=255 → $-C_2H_3$+H=229 → $-C_3H_5$-H=213	$CH_3)_2SiOH$=75
4*α*-Me-stanol	M, M-15 M-90, M-(90+15) M-129	M-SC-C_3H5=320 M-90-SC=271 → $-C_3H_5$-H=229 M-129-SC1+H=261	$CH_3)_2SiOH$=75 $(CH_3)_3Si\text{-}O\text{-}C_3H_4$=129
4*α*-Me-Δ^{22}-sterol	M, M-15	M-SC1-H=388 → $-CH_3$=373 M-SC-2H=359 M-90-SC=271 → $-C_3H_5$-H=229	$(CH_3)_3Si\text{-}O\text{-}C_3H_4$=129

*SC, SC1 and SC2 are shown in Fig. 2.

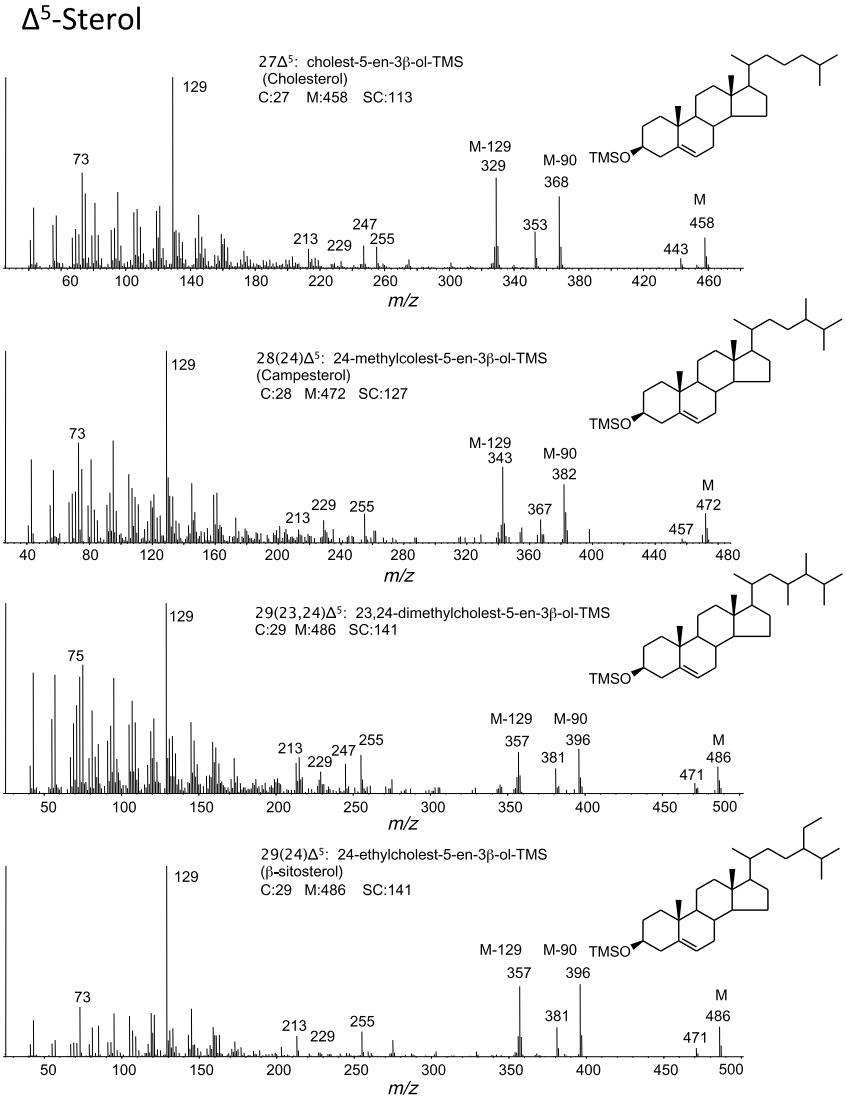

Fig. 3. Mass spectra of Δ^5-sterol.

どの違いによって若干の違いはあるがほとんど一致している。

3.2. Δ^5-ステロール

Δ^5-ステロールとして 27Δ^5: cholest-5-en-3β-ol (cholesterol), 28(24)Δ^5: 24-methylcholest -5-en-3β-ol(campesterol), 29(23,24)Δ^5: 23,24-dimethylcholest-5-en-3β-ol, 29(24)Δ^5: 24-ethylcholest -5-en-3β-ol (β-sitosterol) の 4 種が見いだされた（Fig. 3）。

Δ^5- ステロールの側鎖の開裂を伴う共通のフラグメントイオンには，*m/z* 129，*m/z* 255，*m/z* 229，*m/z* 213 がある（Fig. 2 および Table 2）。*m/z* 129 イオンは Δ^5-ステロールに共通なベースピークであり，特徴的なフラグメントイオンでもある。他のフラグメントイオンのうち，*m/z* 229 イオンは cholest-5-en-3β-ol や 24-ethylcholest -5-en-3β-ol では弱いが，*m/z* 255 イオンと *m/z* 213 イオンはいずれにも現れている。*m/z* 255 イオンは分子イオン $[M]^+$ から $HO\text{-}Si(CH_3)_3$ と SC が脱離して生じたイオンである（Table 2）。*m/z* 229 イオンは *m/z* 255 イオンからさらに D 環の C_2H_3 が脱離（+H を伴う。以後+H のように表記する。）したものであり，また *m/z* 213

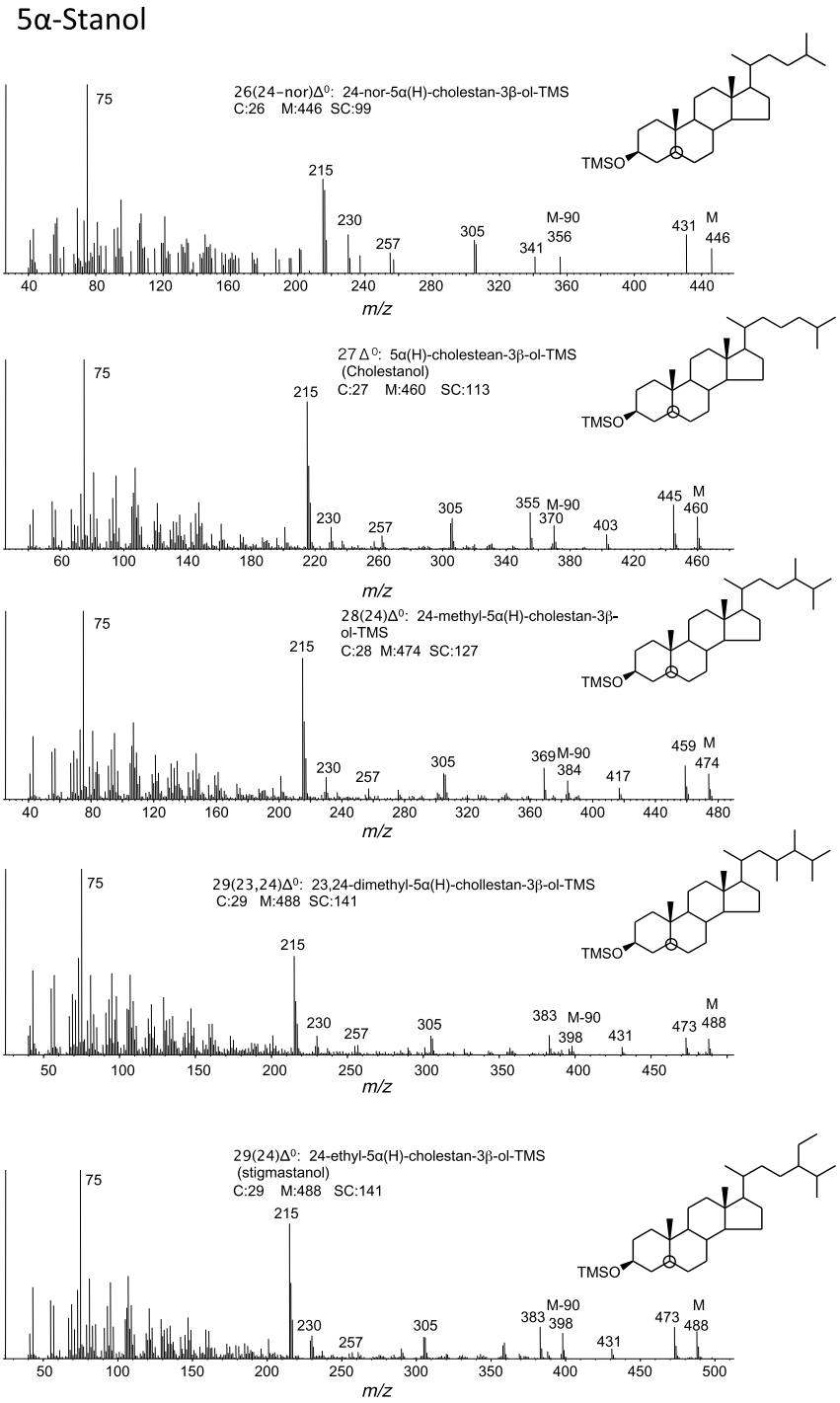

Fig. 4. Mass spectra of 5α-stanol.

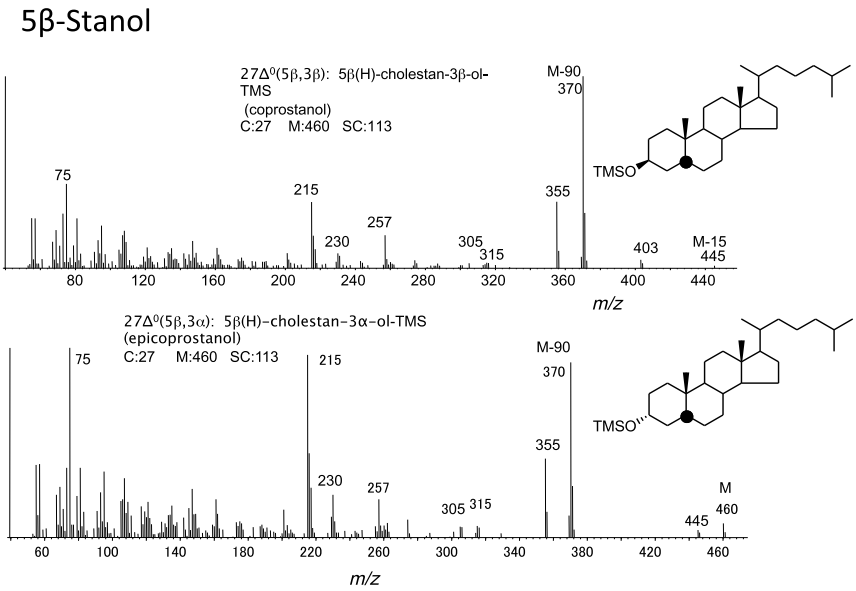

Fig. 5. Mass spectra of 5*β*-stanol.

イオンは *m/z* 255 イオンからさらに D 環の C_3H_5 が脱離（–H）したものである（Table 2）。

一方，SC を維持したままのイオンには $[M]^+$, $[M\text{-}15]^+$, $[M\text{-}90]^+$, $[M\text{-}(90+15)]^+$, $[M\text{-}129]^+$ イオン（Fig. 3 および Table 2）がある。それぞれ，分子イオン $[M]^+$，$[M]^+$ からメチル基が脱離したもの，$[M]^+$ から $O\text{-}Si(CH_3)_3$ が脱離したもの，さらにメチル基が脱離したもの，$[M]^+$ から $(CH_3)_3Si\text{-}OC_3H_4$ が脱離したものである。

3.3. 5*α*(H)-スタノールおよび 5*β*(H)-スタノール

5*α*-スタノールとして 26(24-nor)Δ^0: 24-nor-5*α*(H)-cholestan-3*β*-ol，27Δ^0: 5*α*(H)-cholestan -3*β*-ol (cholestanol)，28(24)Δ^0: 24-methyl-5*α*(H)-cholestan-3*β*-ol, 29(23,24)Δ^0: 23,24- dimethyl-5*α*(H)-cholestan-3*β*-ol, 29(24)Δ^0: 24-ethyl-5*α*(H)-cholestan-3*β*-ol (stigmastanol) の 5 種，また 5*β*-スタノールとして 27Δ^0(5*β*,3*β*): 5*β*(H)-cholestan-3*β*-ol(coprostanol) および 27Δ^0(5*β*,3*α*): 5*β*(H)-cholestan-3*α*-ol (epicoprostanol) の 2 種が見いだされた（Fig. 4 および Fig. 5）。

5*α*(H)-スタノールと 5*β*(H)-スタノールでは基本的に同様のフラグメンテーションが起こっており，強度は異なるが現れるイオンの種類は共通している。5*α*(H)-スタノールと 5*β*(H)-スタノールの SC の開裂を伴う共通のイオンには，*m/z* 75，*m/z* 305，*m/z* 257，*m/z* 230，*m/z* 215 がある（Fig. 4，Fig. 5 および Table 2）。*m/z* 75（Fig. 2）は 5*α*(H)-スタノールに共通なベースピークであり，強く現れることが知られている（Brooks et al., 1968）が，脂肪族アルコールなどヒドロキシ基の TMS 誘導体に現れるイオンでもある。*m/z* 305 は $[M]^+$ から SC が脱離し，さらに D 環の C_3H_5 が脱離（–H）したものである。*m/z* 257 イオンは $[M]^+$ から $HO\text{-}Si(CH_3)_3$ と SC が脱離したものであり，*m/z* 230 イオンは *m/z* 257 イオンからさらに D 環の C_2H_3 が脱離したものである（Table 2）。かなり強い *m/z* 215 イオンは，*m/z* 257 イオンから D 環の C_3H_5 が脱離（–H）したもの（Table 2）で，5*α*(H)-スタノールに特徴的なフラグメントイオンである（Brooks et al., 1968; Ballantine et al., 1975; de Leeuw, 1983）。その他 SC を維持したままのイオンには，$[M]^+$，$[M\text{-}15]^+$，$[M\text{-}90]^+$，$[M\text{-}(90+15)]^+$ イオンがある（Table 2）。

3.4. Δ^{22}-ステロール

Δ^{22}-ステロールとして 26(24-nor)Δ^{22}: 24-norcholest-22-en-3*β*-ol(24-nordehydro -cholestanol)，27Δ^{22}: 5*α*(H)-cholest-22-en-3*β*-ol(22-dehydrocholestanol), 28(24)Δ^{22}: 24-methyl-5*α*(H)-cholest-22-en-3*β*-ol (brassicastanol)，29(23,24)Δ^{22}: 23,24-dimethyl- 5*α*(H)-cholest-22-en-3*β*-ol，29(24)Δ^{22}: 24-ethyl-5

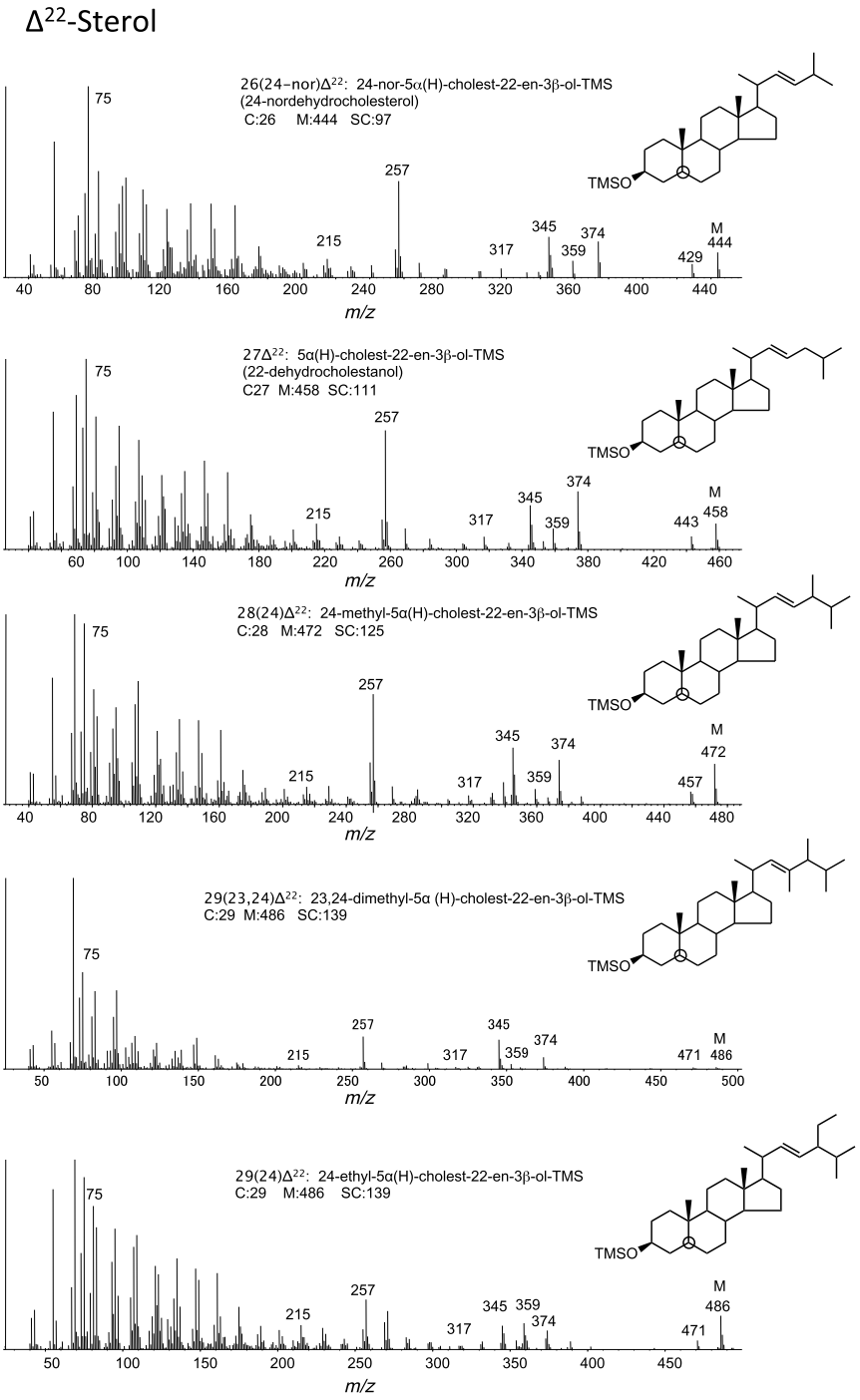

Fig. 6. Mass spectra of Δ^{22}-Sterol.

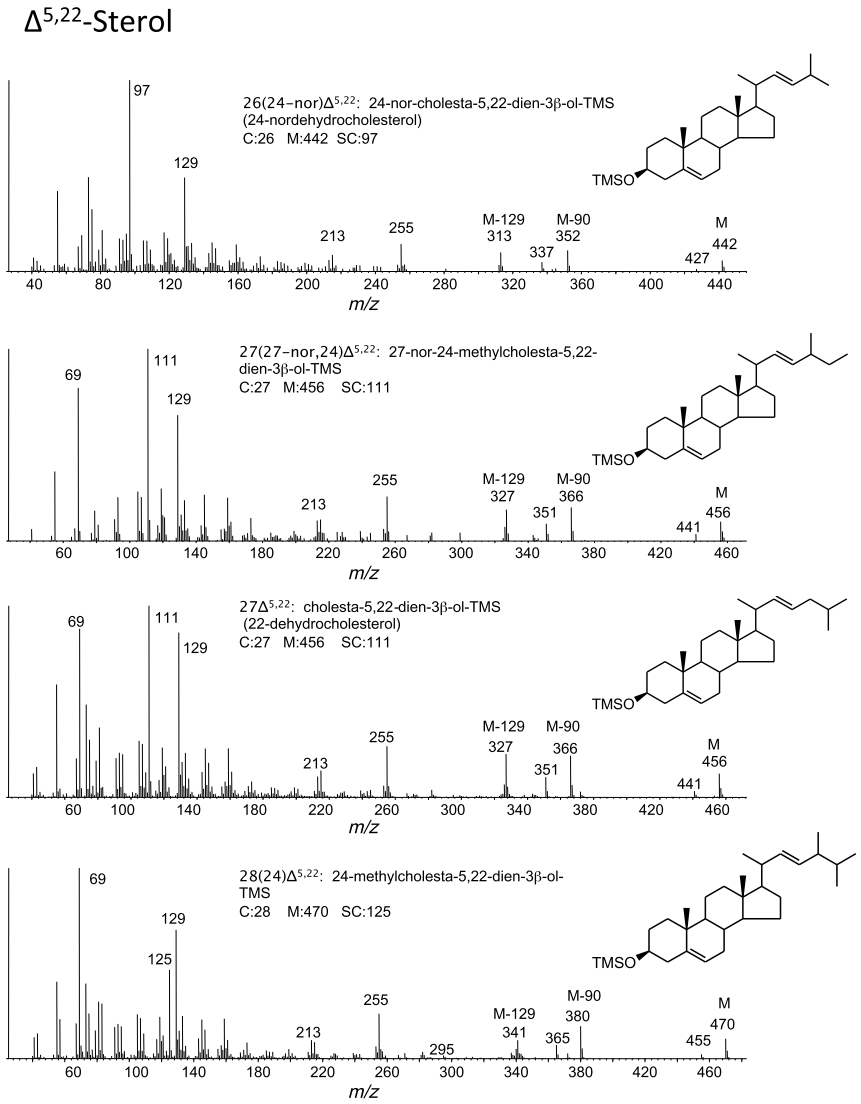

Fig. 7. Mass spectra of $\Delta^{5,22}$-Sterol.

α(H)-cholest- 22-en-3β-ol の 5 種が見いだされた（Fig. 6）。

Δ^{22}- ステロールの SC の開裂を伴う共通のフラグメントイオンには，*m/z* 374，*m/z* 359，*m/z* 345，*m/z* 317，*m/z* 257，*m/z* 215，*m/z* 75（Fig. 6 および Table 2）がある（Rahier and Benveniste, 1989）。*m/z* 374 イオンは $[M]^+$ から SC1（Fig. 2）が脱離（–H）したもので，さらにメチル基が脱離して *m/z* 359 イオンを生じる。*m/z* 345 イオンは $[M]^+$ から SC が脱離（–2H）したもので，さらに D 環の C_2H_3 が脱離（–H）して *m/z* 317 を生じる。200 ダルトン以上では *m/z* 257 イオンが最大の強度になる特徴があり，Δ^{22}-ステロールを特徴づけるフラグメントイオンである（Wyllie and Djerassi, 1968; Volkman et al., 1981; Ballantine et al., 1976）。また，*m/z* 257 イオンは 5α-スタノールと同様にステロール骨格は飽和である（Ballantine et al., 1976）ことを示しており，$[M]^+$ から $HO\text{-}Si(CH_3)_3$ と SC が脱離したものである。*m/z* 215 イオンは，*m/z* 257 イオンから D 環の C_3H_5 が脱離（–H）したものである。一方，SC

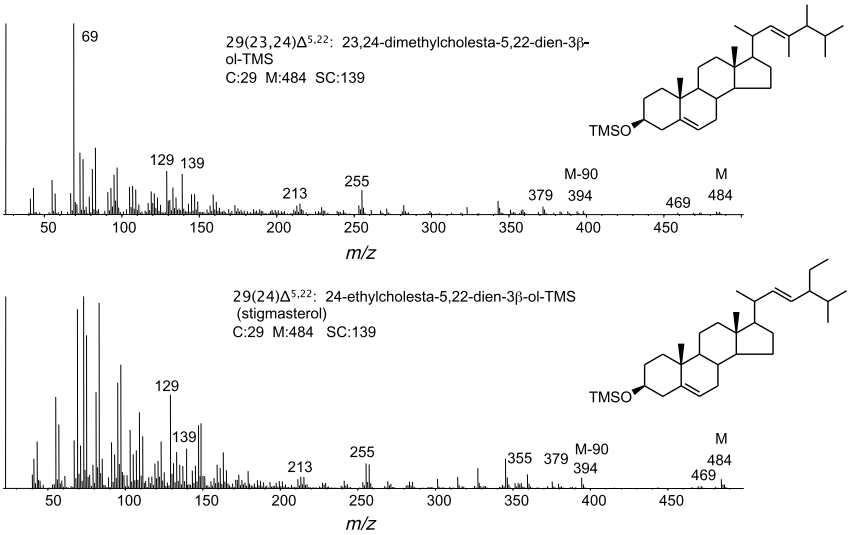

Fig. 7. (continue)

を維持したイオンには $[M]^+$ および $[M-15]^+$ イオンがある。

3.5. $\Delta^{5,22}$-ステロール

$\Delta^{5,22}$-ステロールとして 26(24-nor)$\Delta^{5,22}$: 24-norcholesta-5,22-dien-3β-ol(24-nor -dehydrocholesterol), 27(27-nor,24)$\Delta^{5,22}$: 27-nor-24-methylcholesta-5,22-dien-3β-ol, 27$\Delta^{5,22}$: cholesta-5,22-dien-3β-ol(22-dehydrocholesterol), 28(24)$\Delta^{5,22}$: 24-methylcholesta -5,22-dien-3β-ol (brassicasterol), 29(23,24)$\Delta^{5,22}$: 23,24-dimethylcholesta -5,22-dien-3β-ol, 29(24)$\Delta^{5,22}$: 24-ethylcholest-5,22-dien-3β-ol (stigmasterol) の 6 種が見いだされた（Fig. 7）。

$\Delta^{5,22-}$ ステロールの SC の開裂を伴う共通のフラグメントイオンには *m/z* 129, *m/z* 255, *m/z* 213 がある。*m/z* 129 イオン以外のイオンはいずれも Δ^5-ステロールに共通のフラグメンテーションによるイオンである（Fig. 2 および Table 2）。また，Δ^5-ステロールに見られる $[M]^+$, $[M-15]^+$, $[M-90]^+$, $[M-(90+15)]^+$ および $[M-129]^+$ のイオンは，$\Delta^{5,22}$-ステロールではかなり明確に現れている（Fig. 7）。また SC の脱離に伴う *m/z* 255 や *m/z* 213 イオンも強く現れている（Huang and Meinschein, 1976; Huang and Meinschein, 1978; Rahier and Benveniste, 1989）。SC そのもののフラグメントイオンは，Δ^5-ステロールや Δ^{22}-ステロールにはほとんど見られないことから $\Delta^{5,22}$-ステロールの特徴であり，*m/z* 97, *m/z* 111, *m/z* 125, *m/z* 139 のイオンにそれぞれ現れている（Fig. 7 および Table 2）。これらのイオンは $\Delta^{5,22}$- ステロールの側鎖を知る上で重要なイオンである。

3.6. $\Delta^{24(28)}$-ステロール

$\Delta^{24(28)}$-ステロールとして 28(24)$\Delta^{24(28)}$: 24-methy1-5α(H)-cholest-24(28)-en-3β-ol, 29(24)$\Delta^{24(28)E}$: 24-ethy1-5α(H)-cholest-24(28)E-en-3β-ol (fucostanol), 29(24)$^{\Delta 24(28)Z}$: 24-ethyl-5α(H)-cholest-24(28)Z-en-3β-ol (isofucostanol), 30(24)$\Delta^{24(28)E}$: 24(E)-propylidene -5α(H)-cholestan-3β-ol および 30(24)$\Delta^{24(28)Z}$: 24(Z)-propylidene-5α(H)-cholestan-3β-ol の 5 種が見いだされた（Fig. 8）。

$\Delta^{24(28)}$-ステロールでは $[M]^+$, $[M-15]^+$ 以外に，*m/z* 388, *m/z* 373, *m/z* 345, *m/z* 305, *m/z* 298, *m/z* 283, *m/z* 255, *m/z* 229 および *m/z* 215 のイオンが共通に現れている。$[M]^+$, $[M-15]^+$ 以外のイオンはいずれも SC の開裂を伴うステロール骨格に由来するイオンである（Table 2）。*m/z* 345 イオンは $[M]^+$ から SC が脱離（–2H）したものであり，*m/z* 305 イオンはさらに D 環の C_3H_5 が脱離（–H）したものである。*m/z* 255 イオンは $[M]^+$ から $HO\text{-}Si(CH_3)_3$ と SC が脱離（–2H）したものであり，*m/z* 229 イオンおよび *m/z* 215 イオンはさらに D 環の C_2H_3 および C_3H_5 が脱離（いずれも +H）したものであ

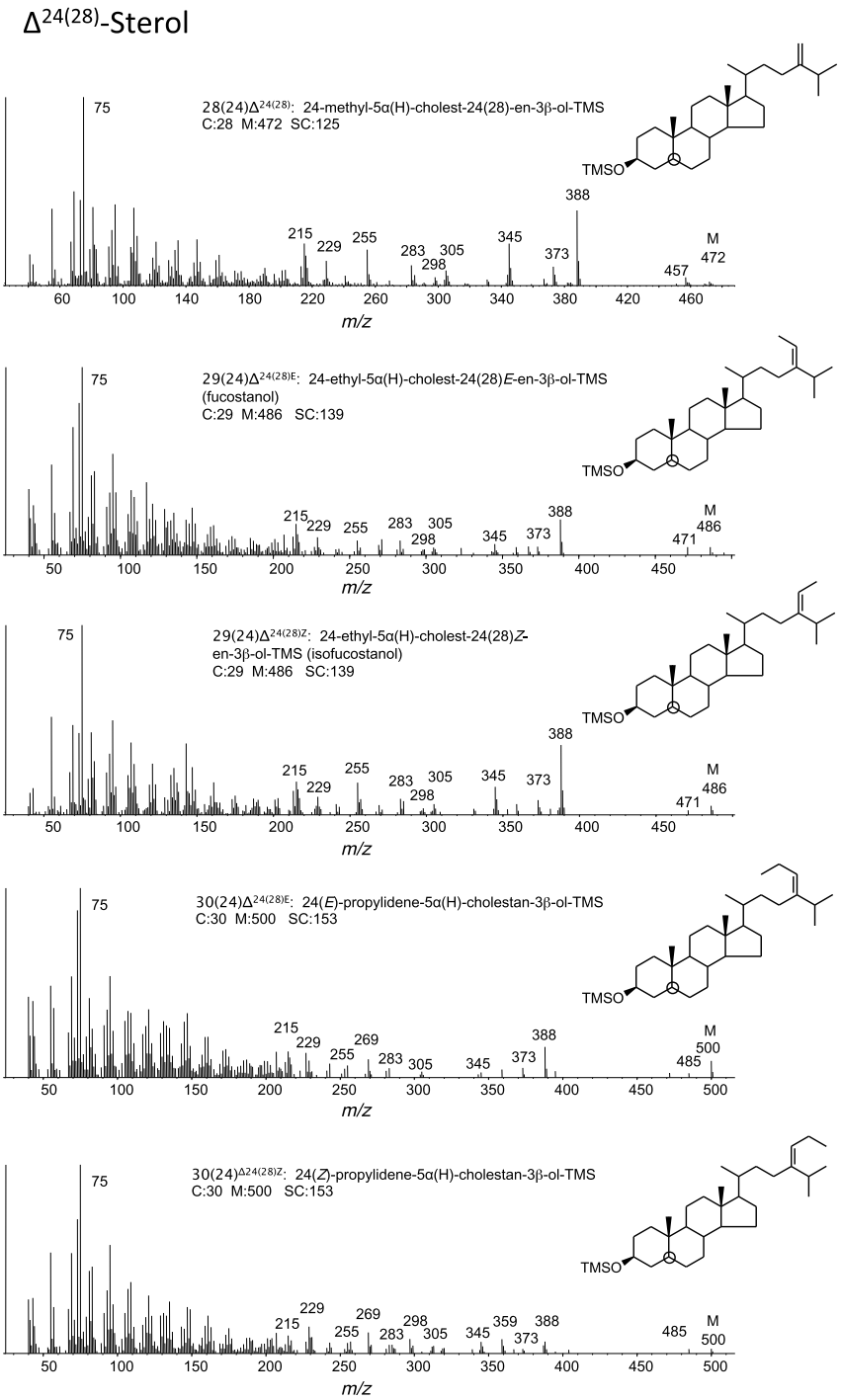

Fig. 8. Mass spectra of $\Delta^{24(28)}$-Sterol.

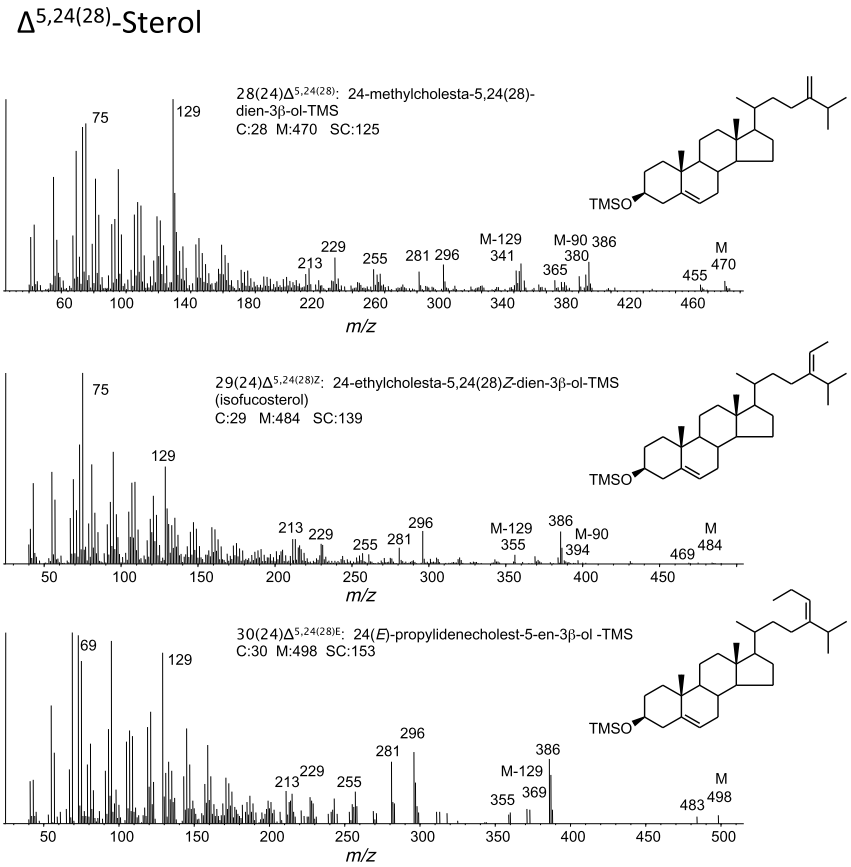

Fig. 9. Mass spectra of $\Delta^{5,24828)}$-Sterol.

る。一方，*m/z* 388 は $[M]^+$ から SC2（Fig. 2）が脱離（–H）したものであり，また *m/z* 298 は *m/z* 388 からさらに $HO\text{-}Si(CH_3)_3$ が脱離（–H）したものである（Table 2）。また *m/z* 373 および *m/z* 283 のイオンは，これらのイオンからメチル基がそれぞれ脱離したものである（Table 2）。一般に SC2（Fig. 2）のような C–C 結合の開裂は起こりにくいが，24(28) の二重結合が 23–24 位に転移した結果 SC2 の開裂が起こったものと考えられる。したがって，これら *m/z* 388，*m/z* 373，*m/z* 298 および *m/z* 283 のイオンは $\Delta^{24(28)}$-ステロールに特徴的なイオンである（Ballantine et al., 1977; Brooks et al., 1972）。

3.7. $\Delta^{5,24(28)}$-ステロール

$\Delta^{5,24(28)}$-ステロールとして 28(24)$\Delta^{5,24(28)}$: 24-methylcholesta-5,24(28)-dien-3β-ol (24-methylenecholesterol), 29(24)$\Delta^{5,24(28)E}$: 24-ethylcholesta-5,24(28)*E*-dien-3β-ol (fucosterol), 29(24)$\Delta^{5,24(28)Z}$: 24-ethyl -cholesta-5,24(28) *Z*-dien-3b-ol (isofucostero1), 30(24)$\Delta^{24(28)E}$: 24(*E*)-propylidenecholest-5-en -3β-ol の 4 種（ただし，24-ethylcholesta-5,24(28)*E*-dien-3β-ol は差スペクトルをとることが困難なためマススペクトルは不掲載）が見いだされた（Fig. 9）。

$\Delta^{5,24(28)}$- ステロールでは，*m/z* 386, *m/z* 296, *m/z* 281, *m/z* 255, *m/z* 229, *m/z* 213 および *m/z* 129 のイオンが共通して現れている。これらのイオンのうち，Δ^5-ステロールに特徴的な *m/z* 129 イオン以外のイオンはいずれも $\Delta^{24(28)}$-ステロールと共通のフラグメンテーションによる（Table 2）。また，SC を維持したままの $[M]^+$，$[M\text{-}15]^+$，$[M\text{-}90]^+$，$[M\text{-}(90+15)]^+$ および $[M\text{-}129]^+$ のイオンは，Δ^5-ステロールと共通のフラグメンテーションによるイオンである（Table 2）。

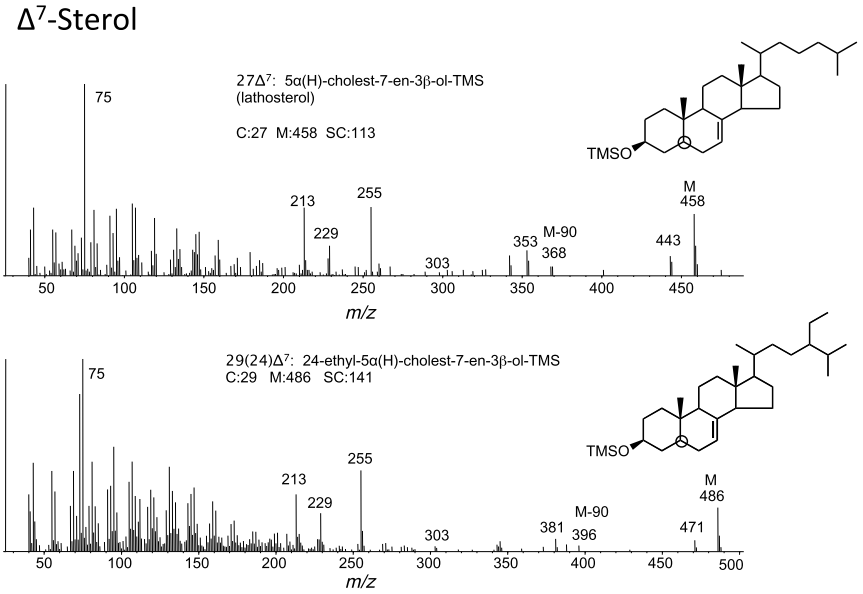

Fig. 10. Mass spectra of Δ^7-Sterol.

したがって，$\Delta^{5,24(28)}$-ステロールのフラグメンテーションはΔ^5-ステロールと$\Delta^{24(28)}$-ステロールのフラグメンテーションを合わせたものになる。これは *m/z* 129，$[M-129]^+$，$[M-90]^+$ イオンからΔ^5-ステロールであること，また SC2（Fig. 2）の開裂を伴う *m/z* 386，*m/z* 296 から$\Delta^{24(28)}$-ステロールであることを意味しており，これらのフラグメントイオンをもつステロールは$\Delta^{5,24(28)}$-ステロールになる（Knights, 1967; Brooks et al., 1972; Ballantine et al., 1975）。

3.8. Δ^7-ステロール

Δ^7- ステロールには 27Δ^7: 5α(H)-cholest-7-en-3β-ol (lathosterol) と 29(24)Δ^7: 24-ethyl -5α(H)-cholest-7-en-3β-ol の 2 種が見いだされた（Fig. 10）。

Δ^7-ステロールはステロール骨格に二重結合をもつΔ^5-ステロールと共通の *m/z* 255，*m/z* 229，*m/z* 213 のイオンの他，$[M]^+$，$[M-15]^+$，$[M-90]^+$，$[M-(90+15)]^+$ のイオンが現れている（Table 2）。しかしながら，Δ^5-ステロールに特徴的な *m/z* 129 および $[M-129]^+$ イオンはなく，むしろ 5α-スタノールに特徴的な *m/z* 75 イオンが現れるところにΔ^7-ステロールの特徴がある（Table 2）。

3.9. 4α-Me-スタノール

4α-Me-スタノールは 4 位にメチル基をもつ 5α(H)-スタノールで，28(4)Δ^0: 4α-methyl -5α(H)-cholestan-3β-ol，29(4,24)Δ^0: 4α,24-dimethyl-5α(H)-cholestan-3β-ol，30(4,23,24)Δ^0: 4α,23,24-trimethyl-5α(H)-cholestan-3β-ol (dinostanol)，30(4,24)Δ^0: 4α-methyl,24-ethyl- 5α(H)-cholestan-3β-ol の 4 種が見いだされた（Fig. 11）。

4α-Me- スタノールでは，$[M]^+$, $[M-15]^+$，$[M-90]^+$，$[M-(90+15)]^+$ イオンおよび *m/z* 75 イオンが 5α(H)-スタノールと共通のイオンとして現れている。また，4α-Me- スタノールが 4 位にメチル基をもつこと（+14 ダルトン）によるフラグメントイオンとして *m/z* 320，*m/z* 271，*m/z* 229 イオンが現れている（Table 2 および Fig. 11）。一方，Δ^5-ステロールに特徴的な *m/z* 129 および M-129 のイオンが現れている（Tabel 2）。これは 4α-Me-スタノールでは 4 位にメチル基があるために $(CH_3)_3Si\text{-}O\text{-}C_3H_4$ の脱離（Fig. 2）がおこっていると考えられる。また *m/z* 261 の $[M-129-SC1(+H)]^+$ イオン（Table 2）はΔ^5-ステロールの場合 *m/z* 247 イオンとしてわずかに現れていた（Fig. 3）が，4α-Me-スタノールの場合，かなり強いイオンとして現れている（Fig. 11）。

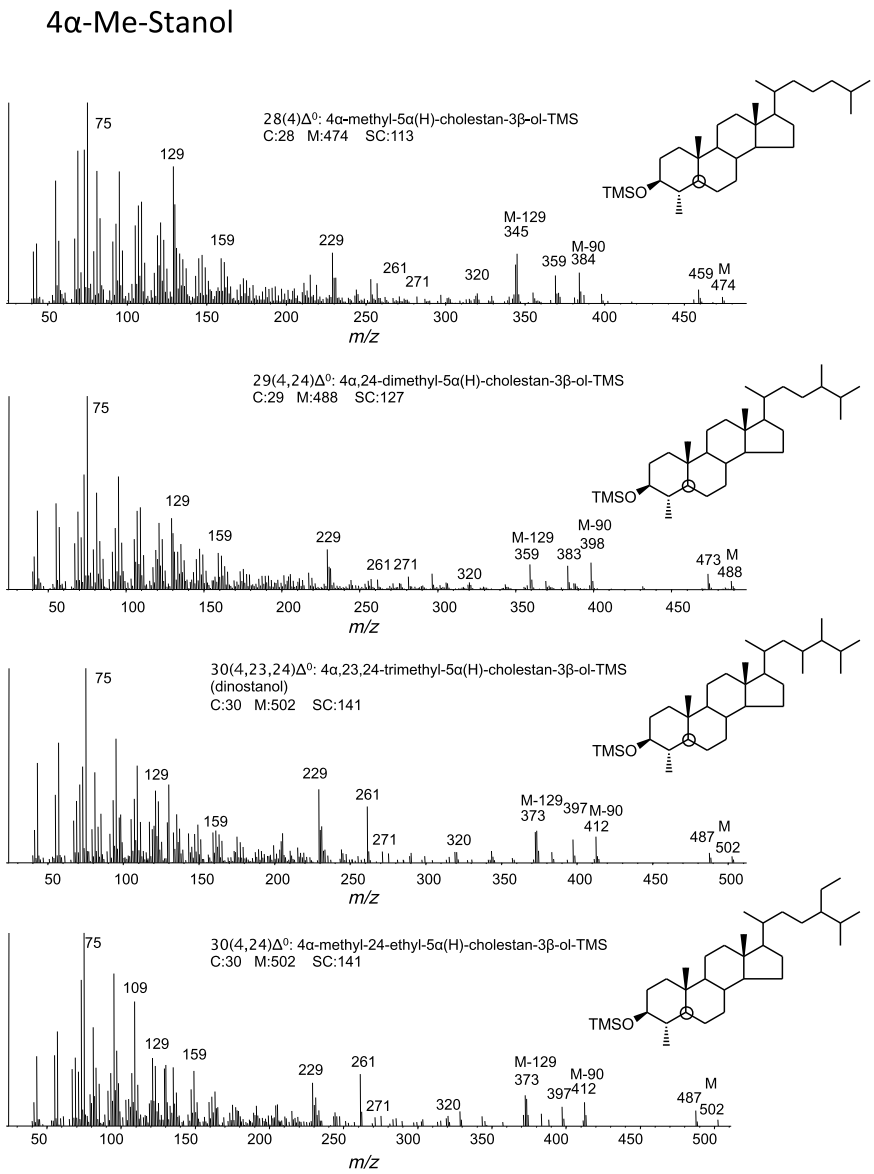

Fig. 11. Mass spectra of 4*α*-Me-Stanol.

3.10. 4*α*-Me-Δ^{22}-ステロール

4*α*-Me-Δ^{22}-ステロールは4位にメチル基をもつΔ^{22}-ステロールで，29(4,24)Δ^{22}: 4*α*,24-dimethyl-5*α*(H)-cholest-22E-en-3b-ol および 30(4,23,24)Δ^{22}: 4*α*,23,24-trimethyl -5*α*(H)-cholest-22–en-3*β*-ol (dinosterol) の2種が見いだされた（Fig. 12）。

4*α*-Me-Δ^{22}-ステロールでは $[M]^+$, $[M\text{-}15]^+$ の他，*m/z* 388，m/z 373，*m/z* 359，*m/z* 271 および *m/z* 229 イオンが共通に現れている。これらのフラグメントイオンはΔ^{22}-ステロールの4位にメチル基をもつもの（+14 ダルトン）として解釈可能である（Table 2 および Fig. 12）。

4. マスクロマトグラムによる同定

それぞれのステロールに特徴的なフラグメントイオン（Table 2）を利用したマスクロマトグラムによる解析（Fig. 13）は，ステロールの同定において

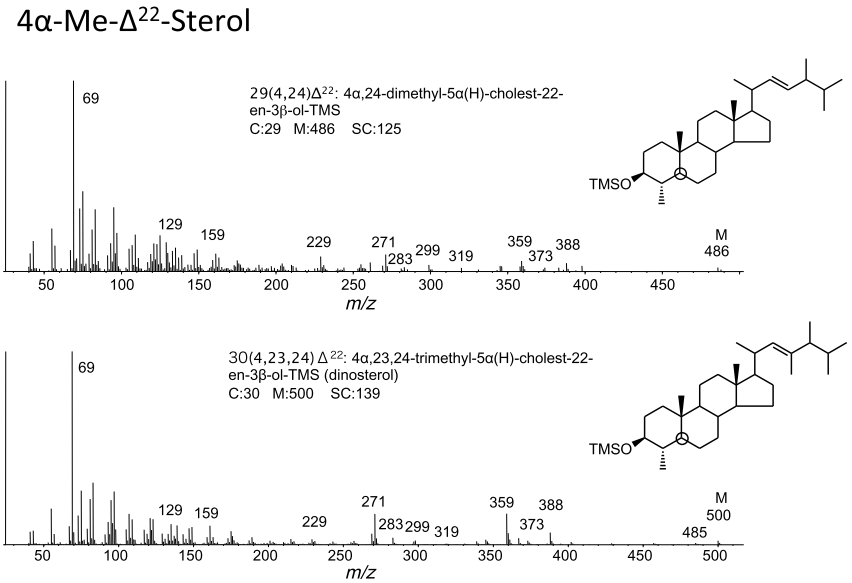

Fig. 12. Mass spectra of 4*α*-Me-Δ^{22}-Sterol.

極めて効果的である。*m/z* 255 イオンは Δ^5-, $\Delta^{5,22}$-, $\Delta^{5,24(28)}$- および Δ^7-ステロールに特徴的なイオンである。しかしながら $\Delta^{5,24(28)}$-ステロールでは強度が弱いため明確ではない。*m/z* 129 は Δ^5-, $\Delta^{5,22}$-, $\Delta^{5,24(28)}$-ステロールに特徴的なイオンであるが，*m/z* 255 イオンと同様に $\Delta^{5,24(28)}$- ステロールは明確ではない。しかし，*m/z* 255 と *m/z* 129 イオンのクロマトグラムを比較することで，*m/z* 129 イオンのない Δ^7- ステロールを確認することができる。また *m/z* 215, *m/z* 229，*m/z* 257，*m/z* 386，*m/z* 388 の各イオンのクロマトグラムにおいて 5*α*- および 5*β*-スタノール，4*α*-Me-スタノール，Δ^{22}-ステロール，$\Delta^{5,24(28)}$-ステロール，$\Delta^{24(28)}$- および 4*α*-Me-Δ^{22}-ステロールをそれぞれ確認できる。

同じ炭素数のステロールにおける二重結合の有無，二重結合の位置と数の違い，また不斉炭素に結合している官能基の *α*・*β* 位のアノマー，二重結合におけるシス・トランス異性体における保持時間の特徴も同定にとって重要である。たとえば，炭素数 27 の Δ^5-ステロール（27Δ^5）で比較すると，5*α*-スタノール（27Δ^0, *m/z* 215）の保持時間は 27Δ^5 (*m/z* 255) より若干長いこと，また 5*β*-スタノール（27Δ^0(5*β*,3*α*) および 27Δ^0(5*β*,3*α*)，いずれも *m/z* 215）の保持時間は 27Δ^5 (*m/z* 255) よりかなり短い。また 5 位と 27 位の二重結合の位置と数の違いでは，保持時間は 27Δ^5 (*m/z* 255)，27Δ^{22} (*m/z* 257)，27$\Delta^{5,22}$(*m/z* 255) の順に短くなる。一方，5 位と 7 位の二重結合の位置の違いでは，27Δ^5 と 27Δ^7（いずれも *m/z* 255）に見られるように，5 位の方が保持時間は短い。24-28 位の二重結合におけるシス・トランス構造異性体においては，たとえば 29(24)$\Delta^{5,24(28)E}$ と 29(24)$\Delta^{5,24(28)Z}$（いずれも *m/z* 386）のようにシス型の方が保持時間は短い。

一方，4*α*-Me- スタノールや 4*α*-Me-Δ^{22}-ステロールのように 4 位にメチル基がある場合には，たとえば 28(24)Δ^0 (*m/z* 215) と 29(4,24)Δ^0 (*m/z* 229) のようにメチル基一つ分の 14 ダルトンの違いと，炭素数 1 つ分の保持時間の違いで同定可能である。

謝　辞

海洋研究開発機構 力石嘉人博士（編集委員）と匿名の査読者 1 名には，有益なコメントをいただきました。感謝申し上げます。

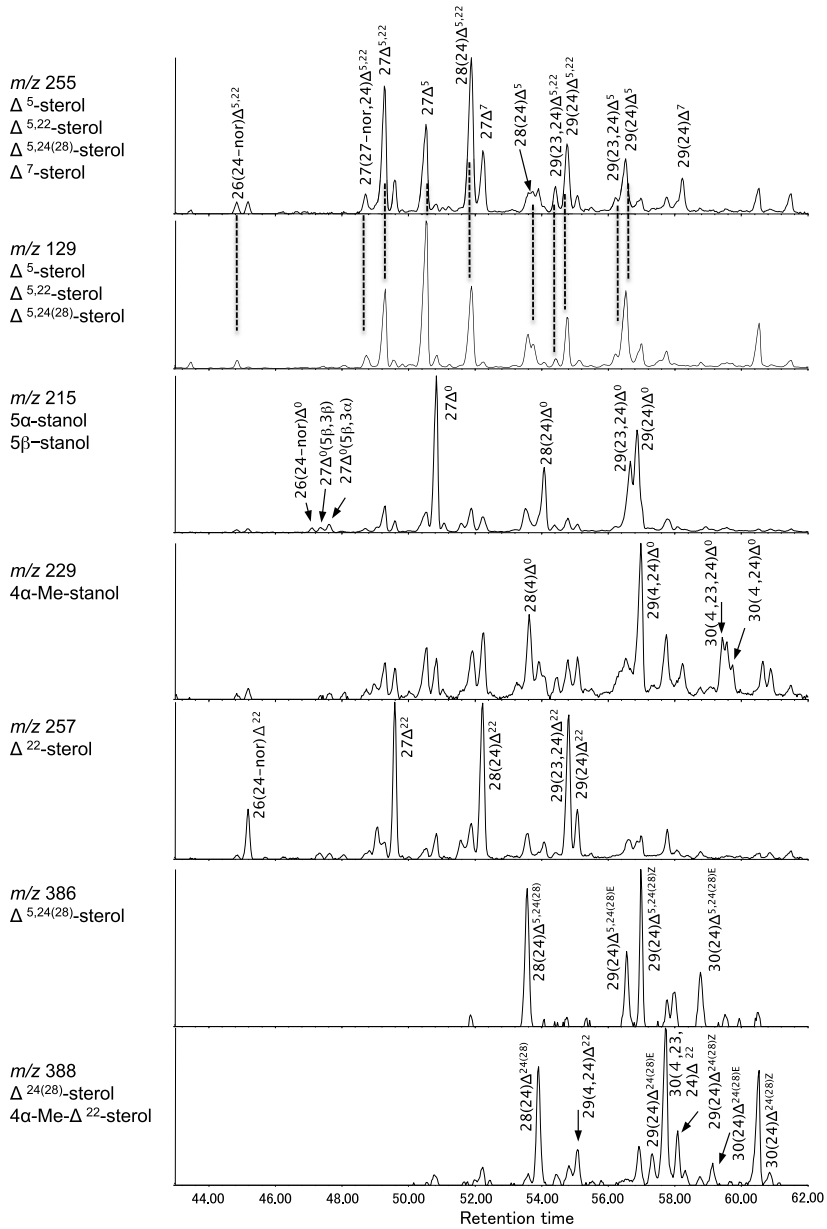

Fig. 13. Mass chromatograms of sterols (TMS ethers).

文　献

Ballantine J.A., Roberts J.C. and Morris R.J. (1975) Sterols of the cookie Cerastodermaedute Evaluation of thermostable liquid phases for the gas-liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of the trimethylsilylethers of marine sterols. *J. Chromatogr.* 103, 289-304.

Ballantine J.A., Roberts J.C. and Morris R.J. (1976) Marine sterols. III—the sterol compositions of oceanic jellyfish. The use of gas chromatographic mass spectrometric techniques to identify unresolved components. *Biol. Mass Spectrom.* 3, 14-20.

Ballantine J.A., Lavis J.A., Roberts J.C. and Morris

R.J. (1977) Marine sterols V. Sterols of some Tunicata. The occurrence of staurated ring systems in these filter feeding organisms. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **30**, 29-44.

Bean G.A. (1973) Phytosterols, in: Paoletti R., Kritchevsky D. (Eds.), Advances in Lipid Research, Academic Press, New York, pp. 193-218.

Brassell S.C. and Eglinton G. (1983) Steroids and triterpenoids in deep sea sediments as environmental and diagenetic indicators. Advances in Organic Geochemistry 1981, 684-697.

Brooks C.J.W., Horning E.C. and Young J.S. (1968) Characterization of Sterols by Gas Chromatography-Mass Spectrometry of the Trimethylsilyl Ethers. *Lipid* **3**, 391-402.

Brooks C.J.W., Knights B.A., Sucrow W. and Raduchel B. (1972) The characterization of 24-ethylidene sterols. *Steroids* **20**, 487-497.

de Leeuw J.W. (1983) Free, esterified and residual bound sterols in Black Sea Unit I sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* **47**, 455-465.

Gaskell S.J. and Eglinton G. (1976) Sterols of a contemporary lacustrine sediment. *Geochim. Cosmochim. Acta* **40**, 1221-1228.

Hatcher P.G. and McGillivary P.A. (1979) Sewage contamination in the New York Bight. Coprostanol as an indicator. *Env. Sci. & Tech.* **13**, 1225-1229.

Henderson W., Reed W.E. and Steel G. (1972) The origin and incorpostion of organic molecules in sediments as elucidated by studies of the sedimentary sequence from a residual bleistocene lake, in: Gaertner H.R.V., Hehner H. (Eds.), Advances in Organic Geochemistry 1971, Pergamon Press, pp. 335-352.

Huang W.Y. and Meinschein W.G. (1976) Sterols as source indicators of organic materials in sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* **40**, 323-330.

Huang W.Y. and Meinschein W.G. (1978) Sterols in sediments from Baffin Bay, Texas. *Geochim. Cosmochim. Acta* **42**, 1391-1396.

Huang W.Y. and Meinschein W.G. (1979) Sterols as ecological indicators. *Geochim. Cosmochim. Acta* **43**, 739-745.

Jones G.J., Nichols P.D. and Shaw P.M. (1994) Analysis of microbial sterols and hopanoids, in: Goodfellow M., O'Donnell A.G. (Eds.), Chemical Methods in Prokaryotic Systematics. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 163-195.

Knights B.A. (1967) Identification of plant sterols using combined GLC/mass spectrometry. *J. Chromatogr. Sci.* **5**, 273-282.

近藤寛・石渡良志・山本修一・上村仁（1991a）現世堆積物中のステロールI　主なステロールの GC/MS による解析 . 長崎大学教育学部自然科学研究報告 **44**, 57-75.

近藤寛・石渡良志・山本修一・上村仁（1991b）現世海洋堆積物中のステロール II. 4-デスメチルステロールの GC/MS による解析 . 長崎大学教育学部自然科学研究報告 **45**, 27-47.

Lee C., Farrington J.W. and Gagosian R.B. (1979) Sterol geochemistry of sediments from the western North Atlantic Ocean and adjacent coastal areas. *Geochim. Cosmochim. Acta* **43**, 35-46.

Rahier A. and Benveniste P. (1989) Mass spectral Identification of Phytosterols, in: Nes W.D., Parish E.J. (Eds.), Analysis of sterols and other biologically significant steroids. Academic Press, San Diego, pp. 223-250.

Smith D.J., Eglinton G., Morris R.J. and Poutanen E.L. (1982) Aspects of the steroid geochemistry of a recent diatomaceous sediment from the Namibian Shelf. *Oceanol. Acta* **5**, 365-378.

Smith D.J., Eglinton G., Morris R.J. and Poutanen E.L. (1983) Aspects of the steroid geochemistry of an interfacial sediment from the Peruvian upwelling. *Oceanol. Acta* **6**, 211-219.

Volkman J.K., Gillan F.T. and Johns R.B. (1981) Sources of neutral lipids in a temperate intertidal sediment. *Geochim. Cosmochim. Acta* **45**, 1817-1981.

Volkman J.K. (1986) A review of sterol markers for marine and terrigenous organic matter. *Org. Geochem.* **9**, 83-99.

Volkman J.K., Farrington J.W. and Gagosian R.B. (1987) Marine and terrigenous lipids in coastal sediments from the Peru upwelling region at 15-S: sterols and triterpene alcohols. *Org. Geochem.* **11**,

463-477.

Volkman J.K., Kearney P. and Jeffrey S.W. (1990) A new source of 4-methyl sterols and 5[alpha](H)-stanols in sediments: prymnesiophyte microalgae of the genus Pavlova. *Org. Geochem.* **15**, 489-497.

Wyllie S.G. and Djerassi C. (1968) Mass spectrometry in structural and stereochimcal problems. CXLVI. Mass spectrometric fragmentatios typical of sterols with unsaturated side chains. *J. Org. Chem.* **33**, 305-313.