

深海堆積物中の高分枝イソプレノイド炭化水素： C₂₅ HBI と C₃₀ HBI の GC/MS による解析*

荻原成騎**

(2004年9月21日受付, 2004年11月8日受理)

1. はじめに

C₂₅ および C₃₀ HBI (highly branched isoprenoid) は、地質試料および現世の海洋堆積物や海水中から広く検出される (Rowland and Robson, 1990)。また、複数の海生珪藻、*Haslea ostrearia* および *Rhizosolenia setigera* から特徴的に抽出されていることから、海生珪藻起源のバイオマーカーとして有効である (Volkman et al., 1994)。近年 GC/MS と NMR を組み合わせた分析によって、C₂₅ HBI の 3 から 5 不飽和、C₃₀ HBI の 5 および 6 不飽和の二重結合の位置が決定された (Belt, et al., 2000; Belt et al., 2001)。これらの研究結果を参照して、深海堆積物から検出された C₂₅ および C₃₀ HBI の GC/MS 解析結果を報告する。

2. 試料

本研究に用いた試料は、「しんかい2000」第821潜航で東海沖竜洋海底谷 (北緯34°12′, 東経137°46′) の水深1093mより採取した柱状採泥試料である。潜航地点の海底谷の中央部は、泥で完全に覆われ平坦であるが、西側斜面に近い谷底ではシロウリガイコロニーや変色域が斜面とほぼ平行に分布しているのが確認された (Ashi et al., 1996)。コロニー付近には長径5m以上に達する白色の変色域が多数認められた。これらは海底表層堆積物に繁殖したバクテリアによるものとみら

れ、白色の変色に加え部分的に赤褐色になっている所もある。研究に用いた採泥は、このような変色域において行った。採取した柱状試料は16cmであり、これを4分割し最表層の0～4cmを本研究に用いた。

3. 分析方法

凍結乾燥した粉末試料3gを丸底フラスコ(100ml)にとり、これに1M-KOH/メタノール(約20ml)を加え、ジムロート冷却管を装着し2時間還流した。冷却後、試料と溶媒を遠沈管に移し、遠心分離した。抽出残渣はベンゼン/メタノール(6/4)30mlを用いて超音波抽出した。ナスフラスコに集めた抽出溶媒は、ロータリーエバポレーターを用いて約10mlまで濃縮した。これを純水100ml中に投入し、ヘキサン/エーテル(9/1)50mlを用いて中性成分を抽出した。抽出溶媒は、ロータリーエバポレーターおよび窒素ガス気流下にて濃縮した。得られた中性成分は、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、脂肪族炭化水素画分(N-1)、多環芳香族炭化水素画分(N-2)、極性画分に分画した。カラムにはパスツールピペットを用い、また3wt%H₂Oに調整したメルク社製シリカゲル (grade 10180, 70-230mesh) を用いた。N-1画分はヘキサン4ml, N-2画分はヘキサン:ジクロロメタン(2:1)4ml, 極性画分はジクロロメタン:メタノール(1:1)7mlを用いて分画した。

* Highly branched isoprenoid hydrocarbons in deep sea sediment: GC/MS analysis of major C₂₅ and C₃₀ HBIs

** 東京大学大学院理学系研究科地球惑星科学専攻, 〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1

E-mail; ogi@eps.s.u-tokyo.ac.jp

Shigenori Ogiwara: Department of Earth and Planetary Science, Graduate School of Science, The University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

GC/MS 測定には ThermoQuest 社製 Voyager を使用した。試料はオンカラム注入法、使用カラムは HP-5 (内径0.25mm, 長さ30m, 膜厚0.25 μ m) であった。GC 昇温条件は40℃で1分保持し、4℃/分で300℃まで昇温した後、30分保持した。質量分析計は全イオンスキャンモード(m/z 50-520)、イオン化電圧は70eV に設定した。

GC/MS 分析には、内部標準として C₂₄D₅₀ を添加した。また、C₁₃ から C₃₃ までの *n*-アルカン混合試料に C₂₄D₅₀ を添加して同条件で分析を行った。GC 保持指数(Retention Index)は、各 HBI の保持時間の前後に湧出する *n*-アルカンの保持時間を比例配分して求めた。すなわち、保持指数 = [HBIの直前に湧出する *n*-アルカンの炭素数 + (HBIの保持時間 - 直前に湧出する *n*-アルカンの保持時間) / (HBIの直後に湧出する *n*-アルカンの保持時間 - 直前に湧出する *n*-アルカンの保持時間)] × 100 である。また、HBI 保持指数測定の GC 条件は、4℃/分で昇温であった。

4. 分析結果

Fig.1 に N-2 画分の分析結果(TIC; トータルイオンクロマトグラム)を示す。N-2 画分からは、一連の C₂₅ HBI (4 不飽和 3 種, 5 不飽和 2 種) および C₃₀ HBI (5 不飽和 3 種, 6 不飽和 3 種) が検出された。

Fig.2 に同定した C₂₅ HBI の GC ピーク番号,

マススペクトルおよび構造を示した。また、保持指標、文献値との比較、文献データと共通した特徴的なフラグメントイオンを Table 1 に示した。C₂₅ HBI の同定および構造決定は、Belt et al. (2000) で示された保持指標およびマススペクトルと対比して行った。本研究で同定した C₂₅ HBI は、Fig.1 中で示した GC ピーク No.1 から No.5 までの 5 種である。ピーク No.1 から No.5 までの異性体は、それぞれ、Belt et al.(2000) 中の XV, XII, XVII, XVIII, X と一致する。ただし、ピーク No.4 のマススペクトルは XVIII のそれとわずかに違いがある。XVIII では m/z 275, 289 が No.4 の場合よりも明瞭に認められる。

Fig.3 に同定した C₃₀ HBI のピーク番号、マススペクトルおよび構造を示した。また、Table 2 に C₃₀ HBI の保持指標および文献値を示した。C₃₀ HBI の同定は、GC/MS による保持指標とマススペクトルを Volkman et al.(1994) で示された保持指標とマススペクトルと比較した。これによると、本研究の GC ピーク No.6, No.7, No.9, No.10, No.11 は、それぞれ Volkman et al.(1994) の R1, R2, R3, R4, R5 に相当する。Volkman et al.(1994) では、C₃₀ HBI の構造決定は行われず、Belt et al.(2001) によって NMR を用いた C₃₀ HBI の詳細な構造決定が行われた。Fig.3 に示した C₃₀ HBI の構造決定は、Belt et al.(2001) で示された保持指標との比較、および得られた質量スベ

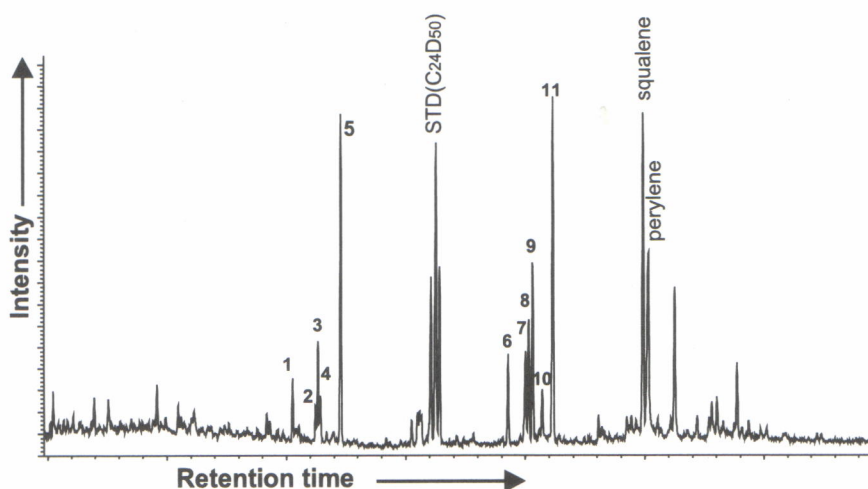


Fig. 1 Total ion chromatogram of N-2 fraction isolated from Ryuyo Canyon off Tokai. Sample: Shinkai 2K, Dive 821, Water depth 1093 m, N-2 fraction.

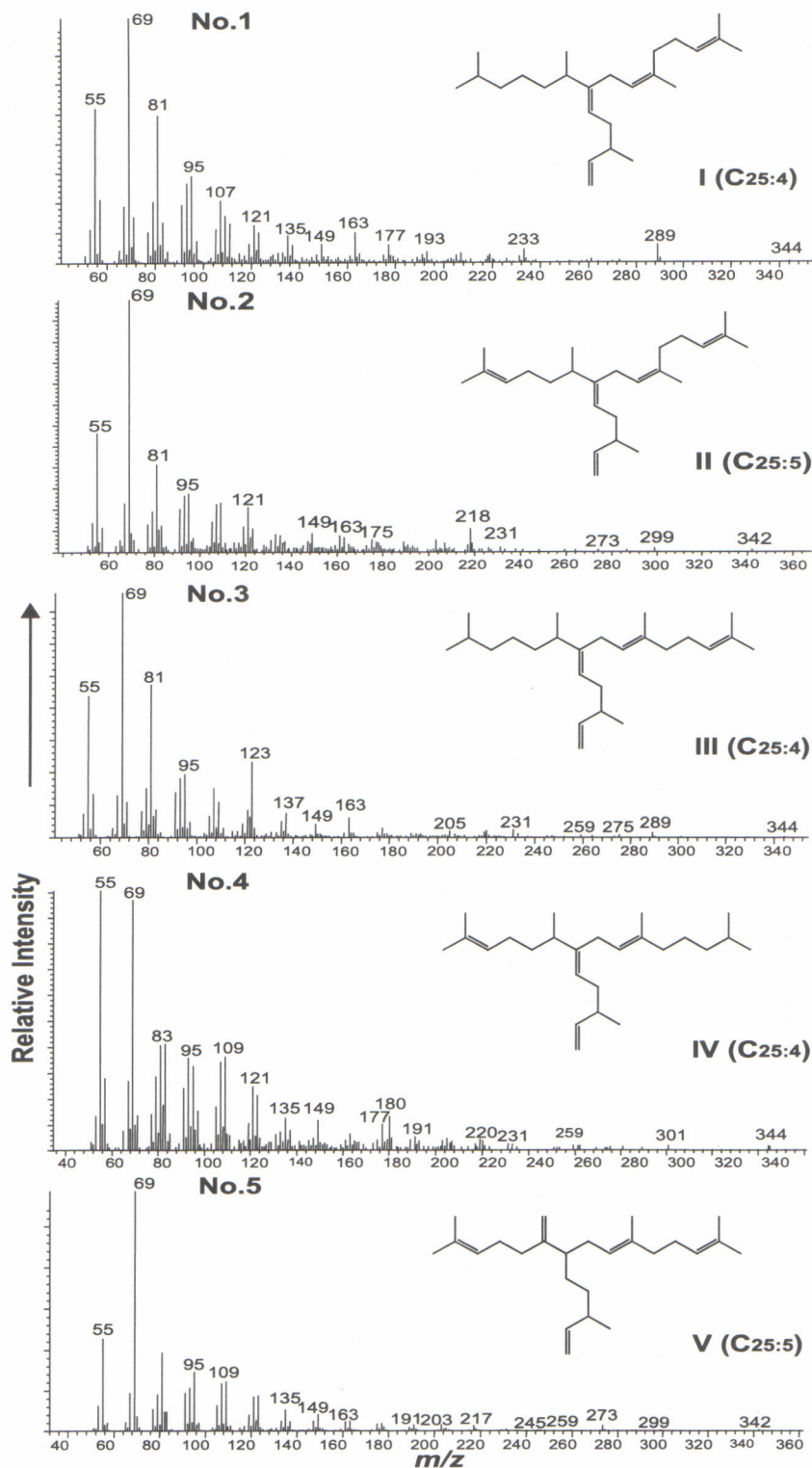


Fig. 2 Mass spectra of C₂₅ highly branched alkenes.
No.1-No.5: GC peak number, I-V: Compound names given in Table 1.

Table 1. Identification of C₂₅ and C₃₀ HBI

Peak no.*	HBI**	Formula	Molecular weight	Retention index		Base peak m/z	Diagnostic fragmentions (m/z)			
				This study	Reference					
1	I	C ₂₅ H ₄₄ (C25:4)	344	2082(HP-5)	2083(HP-5)***	69	163	233	289	
2	II	C ₂₅ H ₄₂ (C25:5)	342	2125(HP-5)	2126(HP-5)***	69	218	273	299	
3	III	C ₂₅ H ₄₄ (C25:4)	344	2130(HP-5)	2130(HP-5)***	69	123	163	231	289
4	IV	C ₂₅ H ₄₄ (C25:4)	344	2134(HP-5)	2136(HP-5)***	69(55)	109	180	220	301
5	V	C ₂₅ H ₄₂ (C25:5)	342	2174(HP-5)	2172(HP-5)***	69	259	273	299	
6	VI	C ₃₀ H ₅₂ (C30:5)	412	2516(HP-5)	2519(HP-5)****	2502(HP-1)*****	69	135	231	299 357
7	VII	C ₃₀ H ₅₀ (C30:5)	412	2555(HP-5)	no data	2550(HP-1)*****	55	231	259	315 327
8	VIII	C ₃₀ H ₅₀ (C30:6)	410	2562(HP-5)	2565(HP-5)****	no data	69	260	286	328 368
9	IX	C ₃₀ H ₅₂ (C30:5)	412	2571(HP-5)	2574(HP-5)****	2560(HP-1)*****	69	137	191	299 357
10	X	C ₃₀ H ₅₀ (C30:6)	410	2593(HP-5)	no data	2581(HP-1)*****	69	189	259	273 313
11	XI	C ₃₀ H ₅₀ (C30:6)	410	2617(HP-5)	2617(HP-5)****	2600(HP-1)*****	69	191	217	273 341

*Peak numbers refer to the chromatogram in Fig. 1

** I : (5E,8Z)-3,9,13-trimethyl-6-(1,5-dimethylhexyl)tetradeca-1,5,8,12-tetraene

II : (5E,8Z)-3,9,13-trimethyl-6-(1,5-dimethylhex-4-enyl)tetradeca-1,5,8,12-tetraene

III : (5E,8E)-3,9,13-trimethyl-6-(1,5-dimethylhexyl)tetradeca-1,5,8,12-tetraene

IV : (5E,8E)-3,9,13-trimethyl-6-(1,5-dimethylhex-4-enyl)tetradeca-1,5,8,12-tetraene

V : 3,9,13-trimethyl-6-(1-methylene-5-methylhex-4-enyl)tetradeca-1,8,12-triene

VI : (5E,8Z)-3,9,13,17-tetraethyl-6-(1,5-dimethylhexyl)octadeca-1,5,8,12,16-pentaene

VII : unknown

VIII : (5E,8Z)-3,9,13,17-tetraethyl-6-(1,5-dimethylhex-4-enyl)octadeca-1,5,8,12,16-pentaene

IX : (5E,8E)-3,9,13,17-tetraethyl-6-(1,5-dimethylhexyl)octadeca-1,5,8,12,16-pentaene

X : unknown

XI : (5E,8E)-3,9,13,17-tetraethyl-6-(1,5-dimethylhex-4-enyl)octadeca-1,5,8,12,16-pentaene

Belt et al. (2000), *Belt et al. (2001) and *****Volkman et al. (1994).

Table 2. Level of identification of HBI

Peak no.*	HBI**	Level***	Level in reference****	Reference
1	I	1	1	Belt et al., (2000)
2	II	1	1	Belt et al., (2000)
3	III	1	1	Belt et al., (2000)
4	IV	1	1	Belt et al., (2000)
5	V	1	1	Belt et al., (2000)
6	VI	2	1	Belt et al., (2001)
8	VIII	2	1	Belt et al., (2001)
9	IX	2	1	Belt et al., (2001)
11	XI	2	1	Belt et al., (2001)

* Peak numbers refer to the chromatogram in Fig. 1

** Compound numbers refer to Table 1 and Figs. 2 and 3.

*** 1: The mass spectrum and GC retention index are identical to those in reference;

2: Molecular ion in mass spectrum and GC retention index are identical to those in reference

**** 1: Identification was done by its mass and NMR spectra.

クトルの分子イオン（分子量）を手がかりにして行った。GC ピーク No.6, No.8, No.9, No.11 に相当する C₃₀ HBI の異性体は, Belt et al.(2001) 中の C₃₀ HBI 異性体の 4, 2, 3, 1 と GC 保持指標と分子量が一致する。Table 1 に示した C₃₀ HBI についての特徴的なフラグメントは, Belt

et al.(2001) ではマススペクトルは示されていないため, Volkman et al.(1994) のデータと比較した結果である。GC ピーク No.6, No.7, No.9, No.10, No.11 のマススペクトルは, それぞれ Volkman et al.(1994) の R1, R2, R3, R4, R5 とよく一致するが, ピーク No.7 に見られる m/z 242 は, R2 には見られない。R5 に見られる m/z 246 は, ピーク No.11 には欠如するなどの僅かな差異が認められた。

5. 考 察

これまでの研究では, C₂₅ および C₃₀ HBI の不飽和は培養した海生珪藻から検出され, 構造についての報告がなされた。

Belt et al.(2000) は, 底生珪藻 *Pleurosigma intermedium* から不飽和 C₂₅ HBI の分析を行い, 3 不飽和 2 種, 4 不飽和 4 種, 5 不飽和 2 種を記載した。本研究で検出された 4 不飽和 4 種, 5 不飽和 2 種を Belt et al.(2000) の結果と比較すると, 本研究では 3 不飽和 2 種と XVI (4 不飽和) を欠くが, 4 不飽和 3 種と 5 不飽和 2 種の構造が一致

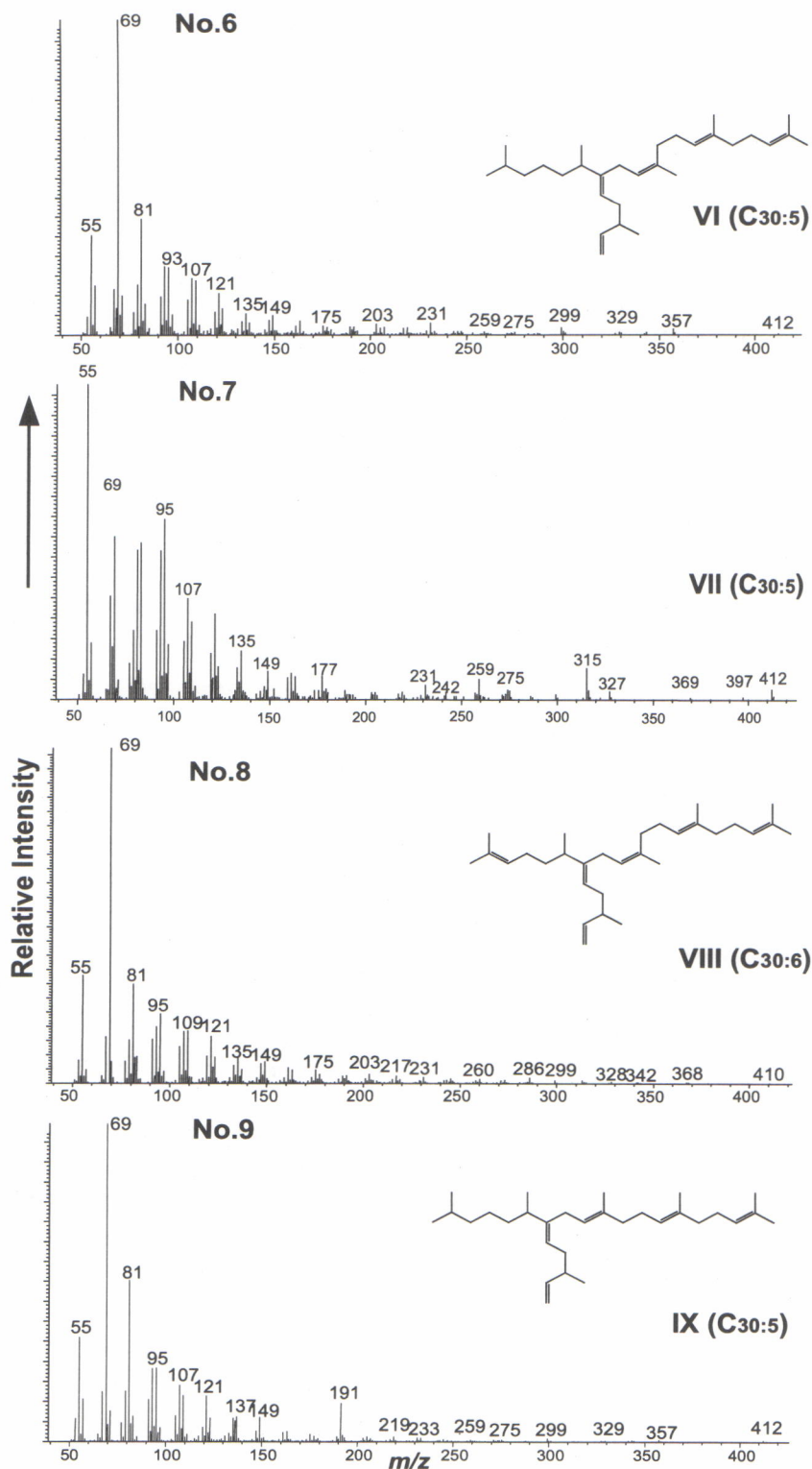


Fig. 3 Mass spectra of C₃₀ highly branched alkenes.
No.6-No.11: GC peak number, VI-XI: Compound names given in Table 1.

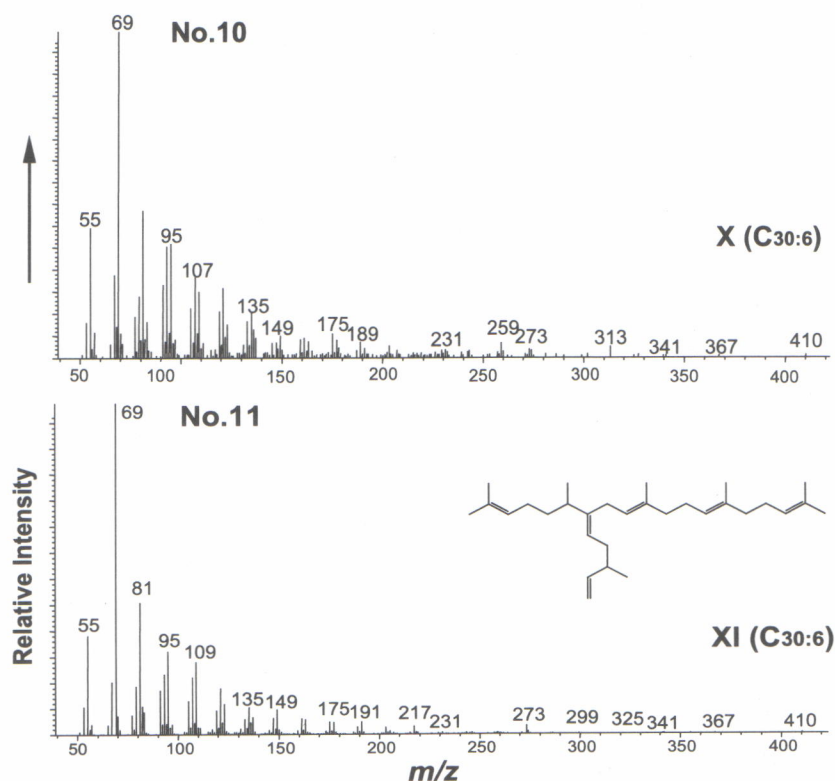


Fig. 3 (continued)

した。Allard et al.(2001)は、4種の *Haslea* を培養し C₂₅ HBI について 2 不飽和 2 種、3 不飽和 2 種、4 不飽和 5 種、5 不飽和 4 種、6 不飽和 1 種を検出し、さらに NMR を用いて構造を明らかにした。これを本研究の結果と比較すると、本研究の No.2 (5 不飽和)、No.5 (5 不飽和) は、それぞれ Allard et al.(2001)の XII, VIII と一致するが、4 不飽和については構造が一致する異性体は見られなかった。

C₃₀ HBI については、Volkman et al.(1994)が培養した *R. setigera* から 5 不飽和 3 種と 6 不飽和 2 種を報告したのに対して、Shinninghe Damsté et al.(1999)では同種の培養試料から C₃₀ HBI は検出されなかった。また、Belt et al.(2002)では *R. setigera* から 5 不飽和 2 種、6 不飽和 2 種を報告している。Volkman et al.(1994)で報告された C₃₀ HBI の 5 種のうち、R1, R3, R5 は、Belt et al.(2002)の 7, 9, 10 にそれぞれ相当する。また、Volkman et al.(1994)の R2 と R4 は、Belt et al.(2002)からは報告されず、逆に Belt et al.(2002)

の 8 は Volkman et al.(1994)からは未検出である。本研究で見出された C₃₀ HBI は 5 不飽和 3 種、6 不飽和 3 種であり、これは Volkman et al.(1994)と Belt et al.(2002)が報告した合計 6 種と一致する。また、Rowland et al.(2001)は、培養した *R. setigera* から C₃₀ HBI は 5 不飽和 3 種、6 不飽和 3 種検出した。これを本研究と比較すると、本研究の GC ピーク No.6, No.8, No.9, No.11が、それぞれ Rowland et al.(2001)の IX, VII, VIII, VI に相当する。また、Rowland et al.(2001)が構造不明とした C₃₀ HBI-5 不飽和、6 不飽和は、それぞれ本研究の No.7 (5 不飽和)および No.10 (6 不飽和) に相当すると考えられる。ただし、Rowland et al.(2001)は、GC クロマトグラムを示したのみで、これらの化合物のマススペクトルおよび保持指標のデータは示されていないため正確な対比を行うことはできなかった。このように、本研究で扱った試料は、これまで報告された C₃₀ HBI は 5 不飽和 3 種、6 不飽和 3 種を全て含む試料である。

6. 謝 辞

本研究に用いた深海堆積物試料は、東京大学海洋研究所の芦寿一朗博士の御好意によるものであります。また、本論を査読頂いた石渡良志東京大学名誉教授からは貴重なご助言を頂きました。記して感謝致します。

文 献

- Allard, W.G., Belt, S.T., Masse, G., Naumann, R., Robert, J.-M. and Rowland, S. (2001) Tetra-unsaturated sesterpenoids (Haslens) from *Haslea ostrearia* and related species. *Phytochemistry*, **56**, 795-800.
- Ashi, J., Segawa, J., Le Pichon, X., Lallemant, S., Kobayashi, K., Hattori, M., Mazzotti, S. and Aoike, K. (1996) Distribution of cold seepage at the Ryuyo Canyon off Tokai, the 1995 KAICO-Tokai Shinkai 2000" Dives", *JAM-STECC J. Deep Sea Res.*, **12**, 159-166.
- Belt, S., Allard, W.G., Masse, G., Robert, J.-M. and Rowland, S. (2000) Highly branched isoprenoids (HBIs): Identification of the most common and abundant sedimentary isomers. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **64**, 3839-3851.
- Belt, S., Allard, W.G., Masse, G., Robert, J.-M. and Rowland, S. (2001) Structural characterization of C₃₀ highly branched isoprenoid alkenes (rhizenes) in marine diatom *Rhizosolenia setigera*. *Tetrahedron Letters*, **42**, 5583-5585.
- Rowland, S.J. and Robson, J.N. (1990) The widespread occurrence of highly branched acyclic C₂₀, C₂₅ and C₃₀ hydrocarbons in recent sediments in biota - A review. *Marine Environmental Research*, **30**, 191-216.
- Rowland, S.J., Allard, W.G., Belt, S.T., Masse, G., Robert, J.-M., Blackburn, S., Frampton, D., Revill, A.T. and Volkman, J.K. (2001) Factors influencing the distributions of polyunsaturated terpenoids in the diatom, *Rhizosolenia setigera*. *Phytochem.*, **58**, 717-728.
- Sinninghe Damsté, J.S., Schouten, S., Rijpstra, W.I.C., Hopmans, E.C., Peletier, H., Gieskes, W.W.C. and Geenevasen, J.A.J. (1999) Structural identification of the C₂₅ highly branched isoprenoid pentaene in the marine diatom *Rhizosolenia setigera*. *Org. Geochem.*, **30**, 1581-1583.
- Volkman, J.K., Barrett, S.M. and Dunstan, G.A. (1994) C₂₅ and C₃₀ highly branched isoprenoid alkenes in laboratory cultures of two marine diatoms. *Org. Geochem.*, **21**, 407-414.