Res. Org. Geochem. **23/24,** 139−146 (2008) 〔有機地球化学会 30 周年記念事業 地球・環境有機分子検索マニュアル No.16〕

技術論文

# 海洋堆積物に含まれるホパノールの GC/MS による解析*

齋藤裕之**, ***・鈴木徳行**

（2008 年 8 月 20 日受付，2008 年 10 月 16 日受理）

## 1. はじめに

ホパノイドは五環式トリテルペノイド骨格を持つ化合物であり，主にバクテリアの細胞膜に由来する（Ourrison et al., 1979）。バクテリアの生体内で生成されるホパノイドの側鎖はヒドロキシル基，アミノ基，配糖体などの官能基を持つことが知られているが（Rohmer et al., 1992），自然界の土壌，堆積物，石油などに検出されるホパノイドでは，生物分解作用や続成作用によって官能基が変化しているものが少なくない。ヒドロキシル基を 1 つ持つホパノールについては海底堆積物，湖底堆積物，ピート層などを用いた研究例があるが（Innes et al., 1997; Quirk et al., 1984; Venkatesan et al., 1990），ヒドロキシ基を多数持つホパンポリオールについては主にバクテリアの培養試料を用いて研究が進められてきた（Rohmer et al., 1984）。最近，環境試料中のホパンポリオールの研究も行われるようになり，海底下数百メートルにある堆積物中にもホパンポリオールが存在することが示されている（Saito and Suzuki, 2007）。本報では，海底堆積物中に存在する各種ホパノールの GC/MS 分析結果を報告する。

## 2. 試　　料

分析試料として，ODP Leg 190 において四国沖南海トラフで採取された Site 1178 の海底堆積物試料を用いた。堆積物試料は海底下 130 m より採取された泥質堆積物で，有機炭素濃度は 0.68％であった。同試料についての他の分析結果は Saito and Suzuki（2007）に記載してある。船上で堆積物試料を採取した後，実験室での分析まで試料を −20℃で保存し，分析直前に凍結乾燥し，粉末試料を有機物分析に用いた。

## 3. 分析方法

### 3.1. ホパノールの抽出・分離

粉末試料 5 g を遠沈管に入れ，メタノール/ジクロロメタン（3/1），メタノール/ジクロロメタン（1/1），ジクロロメタンの順にそれぞれ 15 分間超音波抽出を 2 回ずつ行った。抽出物はロータリーエバポレーターで乾固し，0.5N 水酸化ナトリウム・メタノール溶液を加え 80℃で 3 時間還流しケン化を行った。その後，蒸留水を添加し，ヘキサン/ジエチルエーテル（9/1）で抽出することにより中性フラクションを得た。得られた中性フラクションはロータリーエバポレーターで半乾固し，ヘキサンに溶解させ，シリカゲルカラム（内径 6 mm，長さ 8 cm）によってさらに 4 つのフラクション（F1～ F4）に分画した。各フラクションはそれぞれ脂肪族炭化水素フラクション（F1；ヘキサン，4 ml），芳香族炭化水素フラクション（F2；ヘキサン/トルエン，1/1，4 ml），ケトンフラクション（F3；ヘキサン/酢酸エチル，9/1，5 ml），

*GC/MS analysis of hopanols in marine sediments

**北海道大学大学院理学研究院自然史科学部門地球惑星システム分野　〒060-0810　札幌市北区北 10 条西 8 丁目
e-mail:jm-hsaito@kochi-u.ac.jp, Tel:088-864-6726, Fax:088-864-6713
Hiroyuki Saito**,***and Noriyuki Suzuki**: Department of Natural History Sciences, Faculty of Science, Hokkaido University, N10W8, Kita-ku, Sapporo 060-0810, Japan
***高知大学海洋コア総合研究センター　〒783-8502　高知県南国市物部乙 200　Center for Advanced Marine Core Research, Kochi University, B200 Monobe, Nankoku, Kochi, 783-8502, Japan

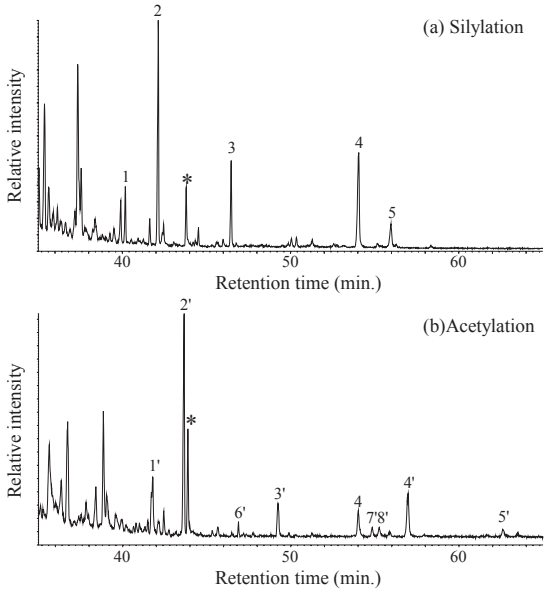


**Fig. 1.** M/z 191 mass chromatograms of (a) TMS ether derivatives and (b) acetyl derivatives of hopanols in the sediment sample of 1178A-15X from Site 1178. Peak numbers correspond to those in Table 1. Asterisks (*) represent TMS derivative of 17$\beta$ (H), 21$\beta$ (H)-bishomohopanoic acid.

極性脂質フラクション（F4；酢酸エチル／メタノール，1/1，4 ml）である。ホパノールは F4 の極性脂質フラクション中に検出される。

### 3.2. ホパノールの誘導体化

多くのホパノールを検出し同定するためにトリメチルシリル（TMS）化とアセチル化の二通りの誘導体化を行い比較した。F4 フラクションを試験管に移し，溶媒を蒸発させた後，BSTFA50 $\mu$l を添加して TMS 化（60℃，1 時間）を行った。アセチル化は，F4 フラクションにピリジン／無水酢酸（1/1，4 ml）を添加し，50℃で 1 時間反応させて行った。なお，アセチル化した F4 フラクションを加熱後，室温で一昼夜おき，未反応の官能基をなくすために，さらに TMS 化を行った。

### 3.3. ガスクロマトグラフィー質量分析（GC/MS）

TMS 化，またはアセチル化した F4 フラクションをそれぞれ Hewlett-Packard 社製 HP6890 ガスクロマトグラフ/HP MSD 5973 質量分析に導入して分析を行った。キャピラリーカラムは DB-5HT（Agilent 社製；内径 0.25 mm，長さ 30 m，膜厚 0.1 $\mu$m）を使用した。オーブン温度は，60℃で 2 分間保持し，250℃まで 10℃／分で昇温し，250℃から 320℃まで 3℃／分で昇温後，320℃で 20 分間保持した。キャリアガスとして高純度ヘリウムを用いた。イオン検出は質量範囲 m/z 50-750 で，2.14（scan/sec）のスキャン速度で質量スペクトルを取得した。なお，イオン源温度は 250℃，イオン化電圧は 70eV に設定した。検出されたホパノールと同程度の保持時間を持つ炭素数 40 以上の高分子量 *n*-アルカンが同じ試料中に存在しておらず，また，炭素数 40 以上の一連の *n*-アルカン標準試料を入手することが困難であったため，本報では保持指標を定めていない。

## 4. 結　　果

同じ海洋堆積物中に含まれるホパノールを TMS 化して得たホパノールトリメチルシリルエーテルとアセチル化して得たホパノールアセテートの m/z 191 マスフラグメントグラムを Fig. 1 の（a）と（b）にそれぞれ示した。同定された化合物の名称や特性を Table 1 に，質量スペクトルと構造式を Fig. 2 にそれぞれ示した。

### 4.1. ホパノールトリメチルシリルエーテル

TMS 化によって 5 種類のホパノールトリメチルシリルエーテルが十分に検出された（Fig. 1 および Table 1 のピーク番号 1-5）。ホパノイドに特徴的な質量スペクトルである m/z 191 を持つ化合物が他にも検出されたが，低濃度のため鮮明な質量スペクトルが得られなかったので，ここでは報告しない。ホパノールの同定は GC/MS による質量スペクトルを文献と比較して行った。フラグメント b（M-15）はメチル基の離脱する［M-$CH_3$］$^+$，c（M-90）はトリメチルシラノール（$C_3H_{10}OSi$）が離脱する［M-$C_3H_{10}OSi$］$^+$，d（m/z 369）は側鎖の離脱した A-E 環 $C_{27}H_{45}^+$，e（m/z 191）は C 環の開裂により ED 環と側鎖が離脱した AB 環 $C_{14}H_{23}^+$，f（M-221）は AB 環の離脱した［M-$C_{16}H_{29}$］$^+$，g（f-90）は f からトリメチルシラノールが 1 つ，h（f-180）は f からトリメチルシラノールが 2 つ離脱してできたフラグメントである。32, 35-アンヒドロホパンテトロールはその質量スペクトルから最初はカルボ

**Table 1.** Identification of trimethylsilyl ether derivatives nad acetyl derivatives of hopanols

| Peak No.* | Compound name | Carbon** number | Formula | Molecular weight | Base peak (m/z) | Diagnostic fragment ions (m/z)*** a | b | c | d | e | f | g | h | Identification**** level | References |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Trimethylsilyl ether | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 17$\beta$(H),21$\beta$(H)-homohopanol | 31 (34) | $C_{34}H_{62}OSi$ | 514 | 191 | 514 | 499 | 424 | 369 | 191 | 293 | 203 | | 2(1) | Venkatesan et al. (1989) |
| 2 | 17$\beta$(H),21$\beta$(H)-bishomohopanol | 32 (35) | $C_{35}H_{64}OSi$ | 528 | 191 | 528 | 513 | 438 | 369 | 191 | 307 | 217 | | 2(3) | Venkatesan et al. (1989) |
| 3 | trishomohopane-32,33-diol | 33 (39) | $C_{39}H_{74}O_2Si_2$ | 630 | 191 | 630 | 615 | | 369 | 191 | 409 | 319 | 229 | 2(1) | Schefuss et al. (2001) |
| 4 | 32,35-anhydrobacteriohopanetetrol | 35 (41) | $C_{41}H_{76}O_3Si_2$ | 672 | 191 | 672 | 657 | | 369 | 191 | 451 | | | 2(1) | Schefuss et al. (2002) |
| 5 | pentakishomohopane-32,33,34,35-tetrol (BHT) | 35 (47) | $C_{47}H_{94}O_4Si_4$ | 834 | 73 | | | 744 | | 191 | | | | 2(1) | Sinninghe Damsté et al. (2004) |
| | Acetate | | | | | | | | | | | | | | |
| 1' | 17$\beta$(H),21$\beta$(H)-homohopanol | 31 (33) | $C_{33}H_{56}O_2$ | 484 | 263 | 484 | 469 | 424 | 369 | 191 | 263 | 203 | | 2(1) | Neunlist and Rohmer (1985) |
| 2' | 17$\beta$(H),21$\beta$(H)-bishomohopanol | 32 (34) | $C_{34}H_{58}O_2$ | 498 | 277 | 498 | 483 | 438 | 369 | 191 | 277 | 217 | | 2(4) | Rohmer and Ourisson (1976) |
| 6' | bishomohopane-31,32-diol (or 30,32) | 32 (36) | $C_{36}H_{60}O_4$ | 556 | 191 | 556 | 541 | | 369 | 191 | 335 | 275 | 215 | 2(1) | Roidier et al. (1999); Watson and Farrimond (2000) |
| 3' | trishomohopane-32,33-diol | 33 (37) | $C_{37}H_{62}O_4$ | 570 | 349 | 570 | 555 | | 369 | 191 | 349 | 289 | 229 | 2(3) | Peiseler and Rohmer (1991) |
| 7' | tetrakishomohopane-32,33,34-triol | 34 (40) | $C_{40}H_{60}O_6$ | 642 | 191 | 642 | 627 | | 369 | 191 | 421 | | | 2(1) | Roidier et al. (1999); Watson and Farrimond (2000) |
| 8' | tetrakishomohopane-32,33,34-triol | 34 (40) | $C_{40}H_{60}O_6$ | 642 | 191 | 642 | 627 | | 369 | 191 | 421 | | | 2(1) | Roidier et al. (1999); Watson and Farrimond (2000) |
| 4' | 32,35-anhydrobacteriohopanetetrol | 35 (39) | $C_{39}H_{64}O_5$ | 612 | 191 | 612 | 597 | | 369 | 191 | 391 | 331 | 271 | 2(4) | Bednarczyk et al. (2005) |
| 5' | pentakishomohopane-32,33,34,35-tetrol (BHT) | 35 (43) | $C_{43}H_{70}O_8$ | 714 | 191 | 714 | 699 | 654 | 369 | 191 | 493 | 433 | | 2(3) | Mycke et al. (1987); Roidier et al. (1999) |

*Peak numbers refer to the chromatogram in Fig. 1.

**Carbon number within parenthesisin as a trimetylsilyl ether or acetyl derivative.

***a: $M^+$, b: $M^+$-$CH_3$, c: $M^+$-TMSOH or -AcOH, d :$M^+$-side chain, e: ring A+B, f: ring D+E+side chain, g: f-TMSOH or -AcOH, h: f-2TMSOH or -2AcOH

****Level of identification; 1: Interpretation of mass spectra data, 2: The mass spectra is identical to that reported in references, 3: Identification by authentic standard, 4: Identification was done by mass and NMR spectra. Numbers within parenthesis indicate the level of references.

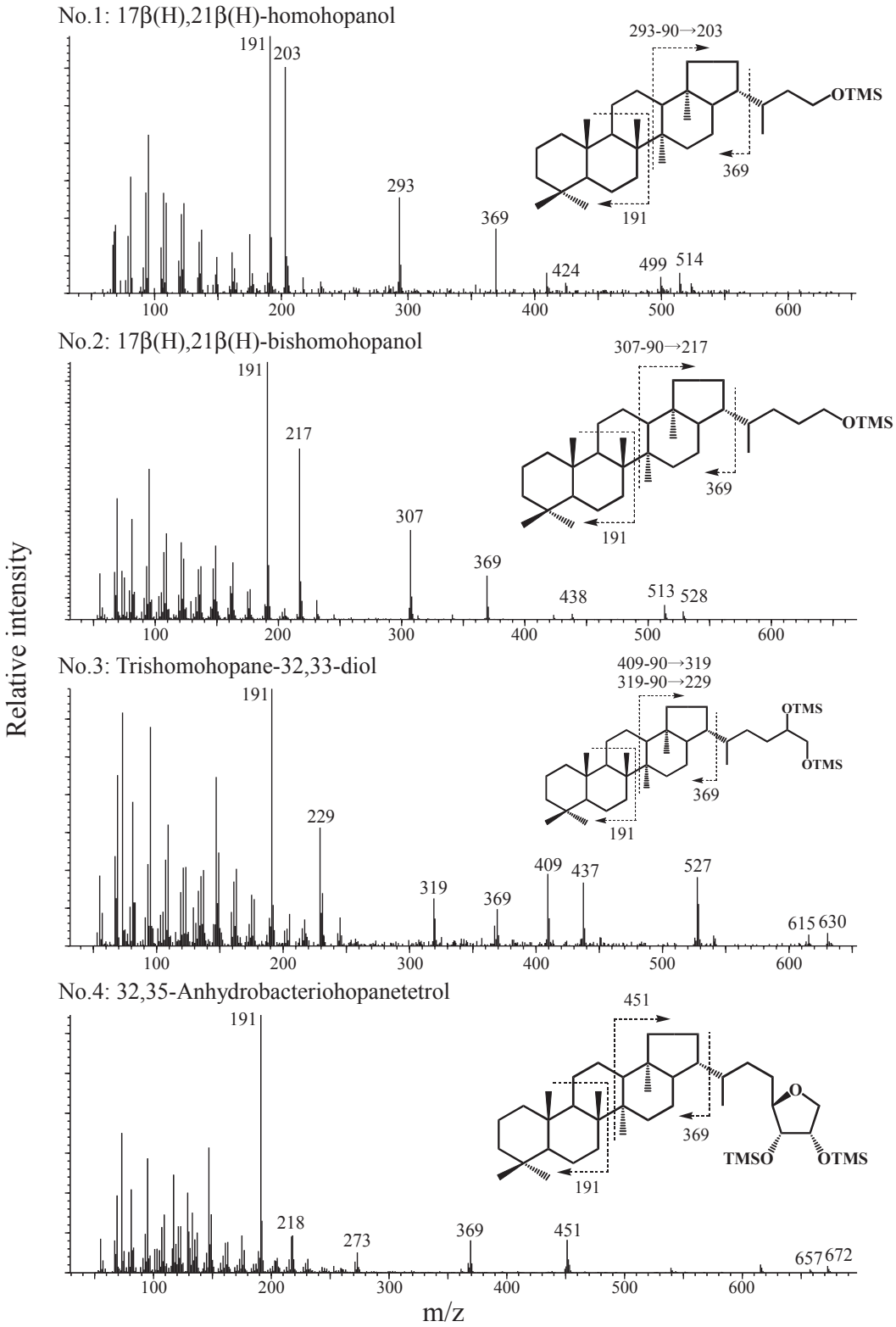


**Fig. 2.** Mass spectra of TMS ether derivatives and acetyl derivatives of hopanols. Numbers indicate GC peak number in Fig. 1.

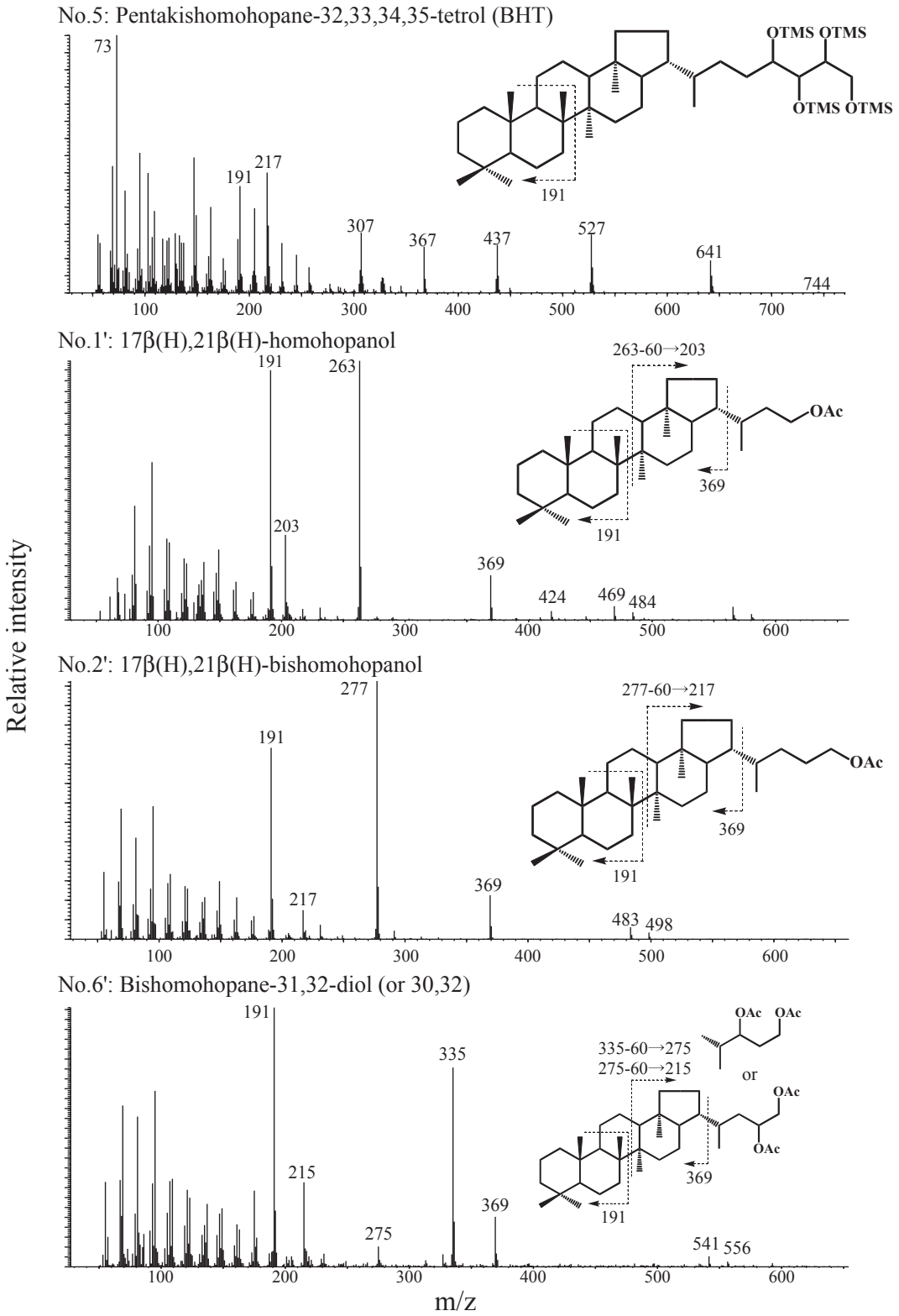


**Fig. 2.** (continued)

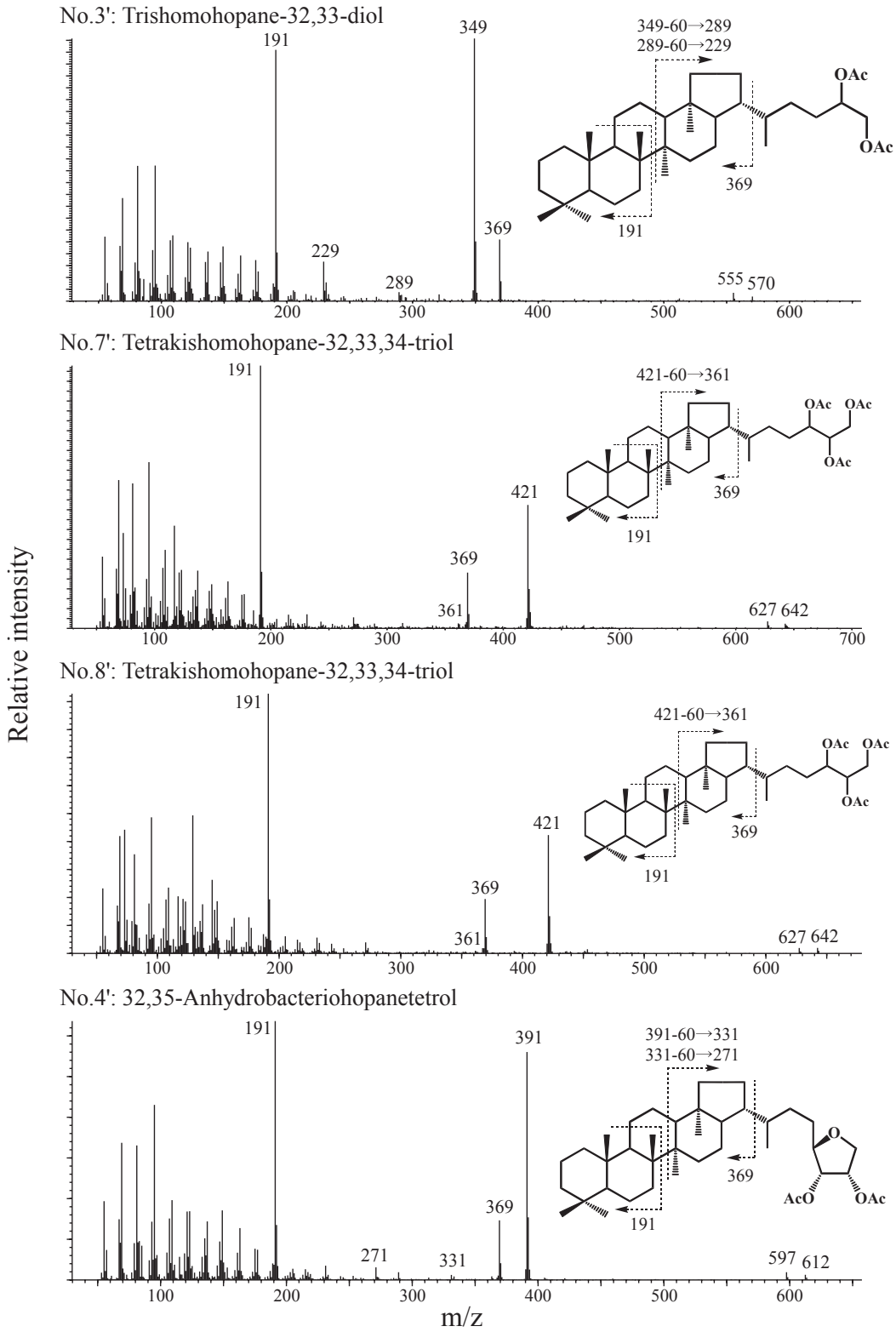


**Fig. 2.** (continued)

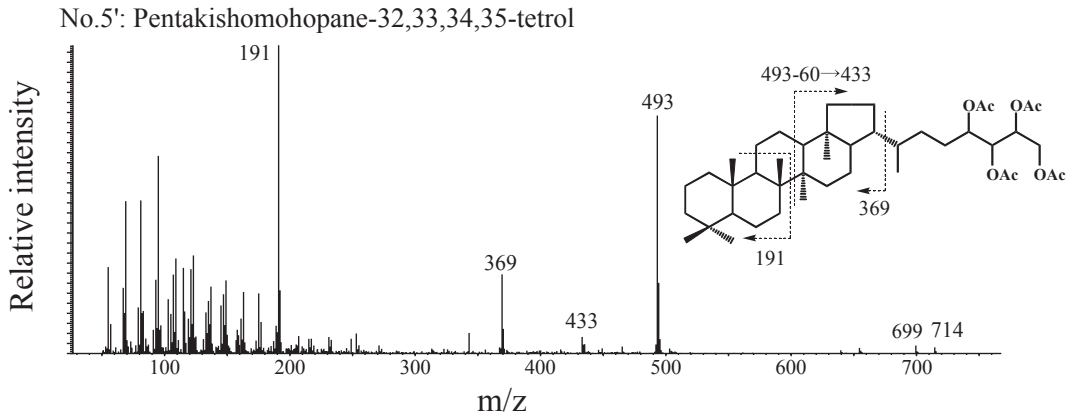


**Fig. 2.** (continued)

ニル基を持つ $C_{35}$ ホパンケトジオールと同定されたが（Schaeffer, 1993），最近の NMR 解析から正確な構造決定がなされている（Costantino et al., 2001; Bednarczyk et al., 2005）。ホパンテトロールのトリメチルシリルエーテルの質量スペクトルはこれまで Sinninghé Damste et al.（2004）でのみ報告されている。全ての質量スペクトルの解釈はまだ明らかではないが，側鎖の開裂にともなう $[M\text{-}193]^+$ や $[M\text{-}307]^+$ のフラグメントが特徴的である。

### 4.2. ホパノールアセテート

アセチル化によって 8 種類のホパノールトリアセテートが十分に検出された（Fig. 1 および Table 1 のピーク番号 1'-8'）。フラグメントの解釈はトリメチルシリルエーテルとほぼ同じであるが，誘導体化試薬の違いに起因して，トリメチルシラノールの離脱の替わりに酢酸（$C_2H_4O_2$）が離脱する。ヒドロキシル基を 1 つ持つホパノールでは e（m/z 191）と f（M-221）の相対強度が 17, 21-立体異性体により異なることが知られており，f/e 強度比は 17$\alpha$（H），21$\beta$（H）異性体，17$\beta$（H），21$\alpha$（H）異性体, 17$\beta$（H）, 21$\beta$（H）異性体の順に大きくなり，異性体の識別に有用である（Quirk et al. 1984）。TMS 化とアセチル化では同じ 17$\beta$（H），21$\beta$（H）ホパノールであっても，f/e 強度比の傾向は異なる。$C_{32}$ ホパンジオールのヒドロキシル基の位置として，30，31 位の炭素と 30，32 位の炭素が提案されている（Rodier et al., 1999; Watson and Farrimond, 2000）。質量スペクトルはほとんど同じなので，同定には NMR スペクトルなどによる構造決定が必要である。2 つの $C_{34}$ ホパントリオールの質量スペクトルはほぼ同一であることから 22R と 22S のエピマーと考えられるが，Peiseler and Rohmer（1992）で報告されている 34R と 34S の異性体の可能性も考えられる。

今回検出された海洋堆積物に含まれるホパノールの多くは，続成作用の過程で生成したジオホパノールである。生合成によって生成したバイオホパノイドと同様に，堆積物中の各種ホパノールにも両親媒性のものや高沸点のものが多量に含まれていると考えられる。さらに多くのジオホパノイドやバイオホパノイドを分析するためには側鎖を切断する化学的分解法や液体クロマトグラフィー質量分析計（LC/MS）を用いた分析法が有効である。

## 謝　辞

本研究の遂行に当たり北海道大学大学院の沢田健講師には貴重なご助言を頂きました。北海道大学大学院の山本正伸准教授および匿名の査読者からは有益なご指摘を頂きました。記して感謝致します。

## 引用文献

Bednarczyk A., Hernandez T.C., Schaeffer P., Adam P., Talbot H.M., Farrimond P., Riboulleau A., Largeau C., Derenne S., Rohmer M. and Albrecht P. (2005)

32,35-Anhydrobacteriohopanetetrol: an unusual bacteriohopanepolyol widespread in recent and past environments. *Org. Geochem.* **36**, 673-677.

Costantino V., Fattorusso E., Imperatore C. and Mangoni A. (2001) A biosynthetically significant new bacteriohopanoid present in large amounts in the Caribbean sponge *Plakortis simplex*. *Tetrahedron* **57**, 4045-4048.

Innes H.E., Bishop A.N., Head I.M. and Farrimond P. (1997) Preservation and diagenesis of hopanoids in recent lacustrine sediments of Priest Pot, England. *Org. Geochem.* **26**, 565-576.

Mycke B., Narjes F. and Michaelis W. (1987) Bacteriohopanetetrol from chemical degradation of an oil shale kerogen. *Nature* **326**, 179-181.

Neunlist S. and Rohmer M. (1985) The hopanoids of "*Methylosinus trichosporium*": aminobacteriohopanetriol and aminobacteriohopanetetrol. *J. Gen. Microbiol.* **131**, 1363-1367 (Supplementary Publication no. SUP28018).

Ourisson G., Albrecht P. and Rohmer M. (1979) The hopanoids: paleochemistry and biochemistry of a group of natural products. *Pure Appl. Chem.* **51**, 709-729.

Peiseler B. and Rohmer M. (1991) Prokaryotic triterpenoids. (22R, 32R)-34, 35-dinorbacteriohopane-32, 33-diols from *Acetobacter aceti* ssp. *xylinum*: new bacteriohopane derivatives with shortened side-chain. *J. Chem. Soc. Parkin Trans.* **1**, 2449-2453.

Peiseler B. and Rohmer M. (1992) Prokaryotic triterpenoids of the Hopane series. Bacteriohopanetetrols of new side-chain configuration from *Acetobacter* species. *J. Chem. Res.* (*S*). 298-299.

Quirk M.M., Wardroper A.M.K., Wheatley R.E. and Maxwell J.R. (1984) Extended hopanoids in peat environments. *Chem. Geol.* **43**, 25-43.

Rodier C., Lopiz P. and Neunlist S. (1999) $C_{32}$ and $C_{34}$ hopanoids in recent sediments of European lakes: novel intermediates in the early diagenesis of biohopanoids. *Org. Geochem.* **30**, 713-716.

Rohmer M., Bisseret P. and Neunlist S. (1992) The hopanoids, prokaryotic triterpenoids and precursors of ubiquitous molecular Fossils. In: Biomarkers in Sediments and Petroleum (eds. Moldowan J.M. , Albrecht P. and Philp R. P.), Prentice Hall, NJ. 1-17.

Rohmer M., Bouvier-Nave P. and Ourisson G. (1984) Distribution of hopanoid triterpenes in prokaryotes. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 1137-50.

Rohmer M. and Ourisson G. (1976) Structure des bactériohopanetétrols d'*Acetobacter xylinum*. *Tetrahedron Lett.* **17**, 3633-3636.

Saito H. and Suzuki N. (2007) Distributions and sources of hopanes, hopanoic acids and hopanols in Miocene to recent sediments from ODP Leg 190, Nankai Trough. *Org. Geochem.* **38**, 1715-1728.

Schaeffer P. (1993) Marqueurs biologiques de milieux évaporitiques. Ph.D. Thesis, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France.

Schefuss E., Versteegh G.J.M., Jansen J.H.F. and Sinninghe Damsté J.S. (2001) Marine and terrigenous lipids in southeast Atlantic sediments (Leg 175) as paleoenvironmental indicators: initial results. In: Wefer, G., Berger, C., Richter, C. (Eds.), *Proc. ODP, Sci. Results* **175**, Available from: http://www-odp.tamu. edu/publications/175_SR/chap_10/chap_10.htm.

Sinninghe Damsté J.S., Rijpstra W.I.C., Schouten S., Fuerst J.A., Jetten M.S.M. and Strous M. (2004) The occurrence of hopanoids in planctomycetes: implications for the sedimentary biomarker record. *Org. Geochem.* **35**, 561-566.

Venkatesan M.I., Ruth E. and Kaplan I.R. (1990) Triterpenols from sediments of Santa Monica Basin, Southern California Bight, U.S.A. *Org. Geochem.* **16**, 1015-1024.

Watson D.F. and Farrimond P. (2000) Novel polyfunctionalised geohopanoids in a recent lacustrine sediment (Priest Pot, UK). *Org. Geochem.* **31**, 1247-1252.