



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                  |                                                                                               |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title            | 安定同位体の天然存在量および安定同位体標識の検出法—1 : ガスクロマトグラフ-同位体比質量分析計                                             |
| Author(s)        | 滝沢, 侑子; 力石, 嘉人                                                                                |
| Citation         | 低温科学, 79, 1-11                                                                                |
| Issue Date       | 2021-03-20                                                                                    |
| DOI              | <a href="https://doi.org/10.14943/lowtemsci.79.1">https://doi.org/10.14943/lowtemsci.79.1</a> |
| Doc URL          | <a href="https://hdl.handle.net/2115/81013">https://hdl.handle.net/2115/81013</a>             |
| Type             | departmental bulletin paper                                                                   |
| File Information | 04_p001-011_LT79.pdf                                                                          |



# 安定同位体の天然存在量および安定同位体標識の 検出法— 1 : ガスクロマトグラフ-同位体比質量分析計

滝沢 侑子<sup>1)</sup>, カ石 嘉人<sup>1)</sup>

2020 年 11 月 25 日受付, 2021 年 2 月 10 日受理

有機化合物に含まれる水素・炭素・窒素などの安定同位体の存在比を, 分子レベル (化合物レベル), もしくは分子内の個々の元素レベルで測定するための主要な分析装置として, ガスクロマトグラフ-同位体比質量分析計 (GC-IRMS) がある. 本稿では, GC-IRMS の原理と, 生理・生態学分野への利用方法を解説する.

## Stable isotope analysis-1: gas chromatograph-isotope ratio mass spectrometer

Yuko Takizawa and Yoshito Chikaraishi

One of the most general instruments for determining the inter- and intra-molecular isotopic heterogeneity in natural environments is gas chromatograph-isotope ratio mass spectrometer (GC-IRMS), which allows a rapid and precise determination of stable hydrogen, carbon, and nitrogen isotope ratios of individual compounds even in complex mixture of components. We review a brief outline of GC-IRMS and its application to physiological and ecological studies.

キーワード: 安定同位体, GC-IRMS, 同位体生理学, 同位体生態学, 有機地球化学

Stable isotope, GC-IRMS, Isotope Physiology, Isotope Ecology, Isotope Geochemistry

### 1. はじめに

有機化合物を構成する水素・炭素・窒素・酸素などには安定同位体が存在し, その比率 (安定同位体比: D/H,  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  など) は, 自然界の様々な反応プロセス (過程) において僅かに変化する (Fry, 2006 など). 例えば, 大気二酸化炭素の  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  は約 0.01109 であるのに対して, その二酸化炭素を原料に植物が光合成で作ったブドウ糖の  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  は約 0.01080 であり, 原料の二酸化炭素に比べてわずかに  $^{12}\text{C}$  に富む. このように, 原料の中の軽い同位体 ( $^{12}\text{C}$  など)

が優先的に反応し, その反応が非定量的\*<sup>1</sup> である (原料の一部が反応せずに残存する) 場合には, 生成物に軽い同位体が濃縮 (例えば, ブドウ糖に  $^{12}\text{C}$  が濃縮) し, 残った原料に重い同位体が濃縮 (例えば, 二酸化炭素に  $^{13}\text{C}$  が濃縮) する. この原理は, 数秒スケールで起こる生物化学的な反応から, 数十・数百万年スケールで起こる地質学的な反応まで, 地球上で起こるあらゆる反応に共通する一般則として広く知られている. これらの法則に基づいて, 安定同位体比は, 反応素過程の 5W2H (Who, What, When, Where, Why, How, How many) を読み解くツールとして, 古くから多くの研究で用いられてきた (詳しくは安定同位体地球化学などの書籍を参照していただきたい).

本稿では, 有機化合物の安定同位体比を, 分子レベル (化合物レベル), もしくは分子内の個々の元素レベルで測定するための主要な分析装置である「ガスクロマトグラフ-同位体比質量分析計 (GC-IRMS: gas chromatograph-isotope ratio mass spectrometer)」について解説する.

連絡先

滝沢 侑子

北海道大学低温科学研究所

〒060-0819 札幌市北区北 19 条西 8 丁目

Tel. 011-706-5486

e-mail: takizaway@lowtem.hokudai.ac.jp

1) 北海道大学低温科学研究所

Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan

\*<sup>1</sup> <http://www.lowtem.hokudai.ac.jp/isophysiol/products/cn6/pgl71.html>

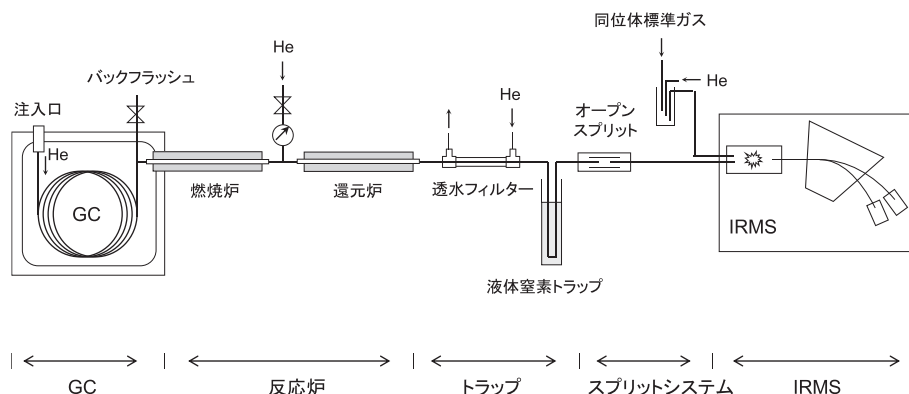


図 1: GC-IRMS の概念図

graph - isotope ratio mass spectrometer)」の、装置の概要と、その技術を利用した研究例 (GC-IRMS を使った研究で明らかになったこと) の一部を紹介したい。なお本稿で説明する GC-IRMS は、著者らの研究室で運用している Thermo Fisher Scientific 社製の拡張型安定同位体比質量分析計 Delta V advantage と、Agilent 社製のガスクロマトグラフ 7890B をガスクロ型前処理装置 GC-C/TC III を介して接続した装置<sup>\*2</sup>であり、説明の多くは著者らのこれまでの使用経験に基づいたものであることを予めご了承ください。また GC-IRMS の機器そのものや使用条件、GC-IRMS の測定技術を利用した研究例については、既にいくつかの論文や総説が発表されているため、それらも併せて参照されたい (例えば, Sessions 2006; Evershed et al. 2007; 力石・大場 2008)。

## 2. GC-IRMS の概要

### 2.1. 安定同位体比の定義

安定同位体の組成比の表記は、平均存在度 (例えば,  $^{12}\text{C}:99.89\%$ ,  $^{13}\text{C}:1.1\%$ ) や存在比 (例えば,  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}=0.0111$ ) などが一般的である。しかし、自然界の様々な反応プロセス (過程) における同位体比の僅かな変化を捉える際には、国際標準物質の安定同位体存在比に対する「千分偏差 ( $\delta$  値, 単位‰, 式 1)」が、伝統的に用いられている。

$$\delta \text{ 値} = [(R_{\text{試料}}/R_{\text{国際標準物質}}) - 1] \times 1000 \quad (\text{式 1})$$

R は水素・炭素・窒素いずれかの存在比 (それぞれ, D/H,  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) を示す。国際標準物質は、測定した元素にあわせて、標準平均海水 (V-SMOW: Vienna-

Standard Mean Ocean Water, D/H=0.000155576), Peedee 層ベレムナイト炭酸塩 (V-PDB: Vienna-Peedee Belemnite,  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}=0.011180$ ), または大気窒素 (Air: Atmospheric Nitrogen,  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}=0.0036765$ ) のいずれかが用いられる。これらの標準物質は、国際原子力機関 (IAEA) によって管理されている。試料の  $\delta$  値が、国際標準物質に対して「正」であればその試料は重い同位体 (D,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) を多く含むことを示し、「負」であれば軽い同位体 (H,  $^{12}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ ) を多く含むことを示す。なお  $\delta$  値は国際単位系 (SI) ではないため、 $\delta$  値に代わる新しい定義が提案されているものの、現時点ではどれも定着しておらず、 $\delta$  値の使用が続いている。安定同位体比の「‰」という単位 (表記) は、将来的に変わる可能性があることに留意されたい。

### 2.2. 装置の概要

GC-IRMS には主に 5 つの構成要素がある (図 1) :

- (1) 試料に含まれる複数の有機化合物を分離する「GC」
  - (2) それぞれの有機化合物を  $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$  ガスに変換する「反応炉」
  - (3) 測定に不要なガス成分や水分を除去する「トラップ」
  - (4) 加圧系の装置 (GC) と真空系の装置 (IRMS) を接続する「スプリットシステム」
  - (5)  $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$  ガスの安定同位体比を測定する「IRMS」
- 測定の対象とする有機化合物は、揮発性を持たせるために前処理の段階で化学修飾され、ヘキサンやジクロロメタンなどの有機溶媒に溶かされた状態で GC へ導入される。溶液中に混在する有機化合物は、ガラス製の GC キャピラリーカラム (長さ 30 または 60 m, 内径 0.25 または 0.32 mm, 膜厚 0.1 から 0.5  $\mu\text{m}$  が用いられることが多い) によってそれぞれ分離され、その後は連続的にセラミック製の反応炉 (長さ 32-34 cm, 内径 0.5 mm) に導入される。(2)~(4) の構成の子細は、測定対象とす

<sup>\*2</sup> <http://www.lowtem.hokudai.ac.jp/isophysiol/products/cn6/pg233.html>

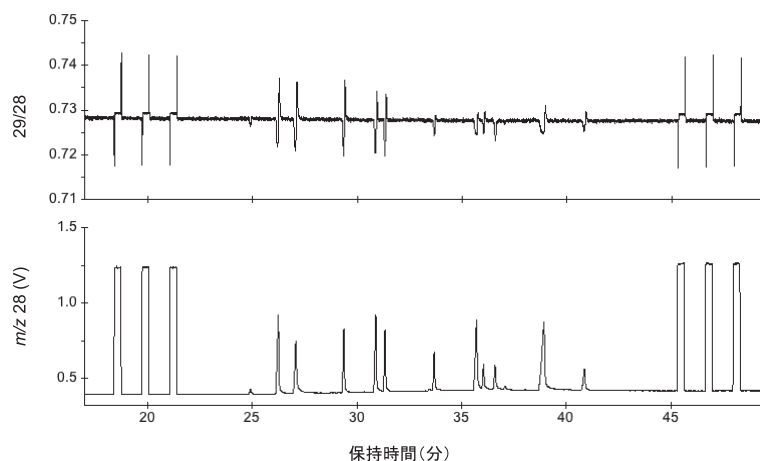


図2：GC-IRMSで得られたクロマトグラムの例

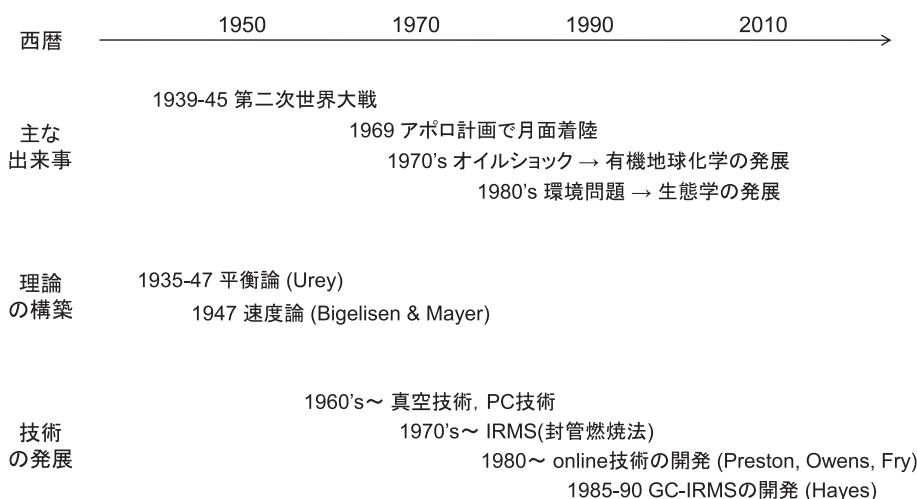


図3：GC-IRMSの開発史

る分子や元素、また GC-IRMS の仕様（メーカーや、バージョン）によって異なるが、いずれの手段においても、最終的には、反応炉内で生成された試料由来の  $H_2$ ,  $CO_2$ , もしくは  $N_2$  ガスがキャリアガス（He）と共に IRMS に導入され、同位体比が測定される仕組みとなっている。実際に測定をおこなうと、図2に示すようなクロマトグラムが得られ、試料に含まれる複数の有機化合物が、GCによって分離され、1つ1つのピークが示す有機化合物の同位体比が測定されていることがわかる。

### 2.3. 開発の歴史

同位体の研究（理論および測定技術）は、この80年間の社会情勢に強く影響を受けながら発展してきた歴史がある（図3）。自然界における同位体存在比の変化（同位体分別）に関する理論は、原子爆弾の開発に伴って1930-40年代に集中的に研究され、Ureyによって「平衡論的同位体分別」が<sup>2</sup>、Bigelisen, Mayerによって「速度

論的同位体分別」の理論が完成した（同位体分別に関する詳細は、著者らのウェブサイト<sup>\*3</sup>や、安定同位体地球化学などの書籍を参照されたい）。その後1960年代には、米国等による宇宙開発（アポロ計画など）に伴って、真空技術や計算機（PC技術）が発展し、同位体比質量分析計（IRMS）が開発された経緯がある。開発当初の同位体比測定は、対象とする試料を石英管内で燃焼・還元し、生成したガスを手作業で真空ラインを用いて分離・精製し、IRMSに導入するというもので、封管燃焼法、Bulk法、またはDual Inlet法と呼ばれている。この方法は、試料全体に含まれる水素・炭素・窒素の同位体比を精密に測定することが可能な現在も用いられている重要な技術であり、特に標準試料の同位体比を決定するために欠かせないものである。ただし、封管燃焼法による測定の特徴として、元素あたり数ミリモル（mmol）程度の

<sup>\*3</sup> <http://www.lowtem.hokudai.ac.jp/isophysiol/products/cn6/pgl71.html>

試料量が要求される上に、試料の燃焼・還元、および真空ラインを用いたガスの分離・精製にかなり時間がかかる（著者らの経験では「一週間で十数試料の測定」が限界である）。また、有機化合物の酸素同位体比の測定に関しては、試料から「有機化合物由来の酸素」を確実に抽出する技術が未だに開発されておらず、優れた封管燃焼法が存在しないという点にも注意されたい（例えば、Saurer et al. 1998）。1970-80 年代になると、オイルショックの影響を受けて、世界的に「石油資源の成因や起源」を理解するための研究が進むようになり、その手段のひとつとして「化石燃料（石油・石炭）に含まれる炭化水素の分子レベルでの同位体比分析」の需要が高まった（「有機地球化学」研究の黎明期である）。その後は人間活動に伴う環境の変化を評価したり、生態系の構造を理解したりするために、多量の生物試料の同位体比分析をより簡便に実施できる測定手法の需要が高まった。その背景を受けて、前述したような手間のかかる「手作業でのガスの精製」を行わずに同位体比分析を可能とするための「自動分析（オンライン）技術」の研究が進んだ。その結果、既存の GC や元素分析計（EA：Elemental analyzer）などを改良して作られた「試料のガス化・生成したガスの分離・精製を行う前処理装置」と、「同位体比を測定する IRMS」とを、「スプリットシステム（詳細は後述）」で接続した GC-IRMS、EA-IRMS が開発された。このように、現在用いられている GC-IRMS の基本的な原理は、1990 年代には既に完成していたといえる（Hayes et al., 1990）。

なお、GC-IRMS を示す表記として、論文等では様々な略記が使われている。isotope ratio monitoring-GC-MS (irm-GC-MS) と表記されることや、炭素・窒素同位体比を測定する条件の装置を GC-combustion-IRMS (GC-C-IRMS)、水素同位体比を測定する条件の装置を GC-pyrolysis-IRMS (GC-P-IRMS)、GC-thermal conversion-IRMS (GC-TC-IRMS) と表記することもある。また、近年、測定装置を示す時には「GC-IRMS: gas chromatograph - isotope ratio mass spectrometer」のように「-」を、測定法を示す時には「GC/IRMS: gas chromatography/isotope ratio mass spectrometry」のように「/」を用いることが多くなっている。

## 2.4. GC-IRMS を用いた安定同位体比の測定における重要事項

### 2.4.1. 反応炉

水素同位体比の測定には、熱分解炉（触媒：グラファイト、温度：1400-1500℃）が用いられる。導入された有

機化合物は、熱分解によって  $H_2$ , C（グラファイト）に加えて、有機化合物に酸素原子が含まれる場合は CO が生成される。炭素・窒素同位体比の測定には、燃焼炉（酸化剤：NiO, CuO, 触媒：Pt, 温度：800-1150℃）と還元炉（還元剤：Cu, 温度：550-650℃）が用いられる。導入された有機化合物は、燃焼炉で、 $CO_2$ ,  $H_2O$ ,  $N_2$ , 種々の窒素酸化物 ( $N_xO_y$ ) に酸化分解され、その後還元炉にて、窒素酸化物が  $N_2$  に還元される。

反応炉では、試料が炉に与える負荷の大きさに伴って（例えば、分析数の多さや、測定試料の質など）、触媒の劣化や、酸化・還元剤の消耗が起こることが一般的である。炉の内部での反応効率の低下は、人為的な同位体分別をもたらす要因になり、クロマトグラム上でのピーク形状の悪化（テーリングなど）や、試料が持つ同位体比を正しく測定できないなどといった、測定結果の不確かさを増大させる要因にもなる。また分析数が増えていくと、水素同位体比測定においては試料由来のグラファイトが、炭素・窒素同位体比測定においては酸化不足によって  $CO_2$  ではなくグラファイトが生成され、炉内に蓄積してしまう。グラファイトの存在は、炉内の流路を塞ぐ（狭くする）方向に働くため、流速の増大と、反応効率の低下をもたらす。加えてグラファイトそのものが「有機化合物のグラファイト化の触媒」にもなるため、一度作られてしまうとグラファイト化反応が連鎖的に進行し、さらにグラファイト化そのものが同位体分別を伴うため、炭素同位体比の測定が極めて困難になる。また、フッ素 (F) などのハロゲンが含まれる有機化合物の測定にも注意が必要である。水素同位体比測定では、熱分解炉内でフッ化水素 (HF) が生成され、GC-IRMS のキャピラリーカラムなどの様々な部品を腐蝕する。炭素・窒素同位体比測定では、炉内の酸化剤・還元剤と不可逆的に反応し ( $CuF_2$  や  $NiF_2$  を生じる)、酸化・還元力を低下させる。上に挙げてきたこれらの問題は「炉の交換」によってのみ改善されるため、試料の質や測定数にあわせて、メンテナンスの必要性やその頻度について、よく注意されたい。

### 2.4.2. バックフラッシュシステム

バックフラッシュシステムとは、試料あるいは GC 導入時に用いる溶媒に含まれている「反応炉に負荷をかける有機化合物」を、反応炉に入れることなく外部に排出する仕組みである。図 4 に示すように、「開」時には、GC からのフローと、反応炉を逆流したフローが同時に GC 外部へと排出されるため、溶媒等の反応炉への侵入を防ぐことができる。一方「閉」時は、GC からのフローがそのまま反応炉に送られ、試料の有機化合物を熱分解、



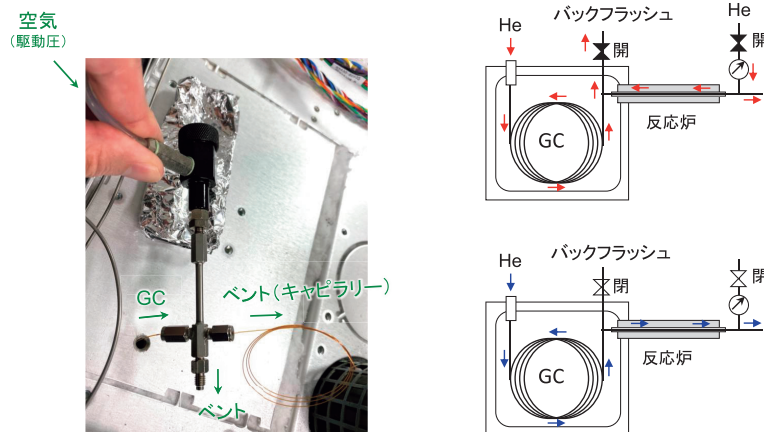
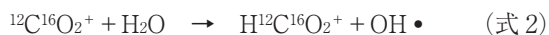


図4：バックフラッシュシステム

あるいは酸化分解することができる。このように、バックフラッシュシステムを活用して、酸化剤・還元剤の消耗と、触媒の劣化を防ぐことは、安定的な（再現性の高い）測定をするうえで重要である。

#### 2.4.3. 透水膜

炭素・窒素同位体比測定では、有機化合物の燃焼により、水（ $\text{H}_2\text{O}$ ）が生成する。この $\text{H}_2\text{O}$ が試料由来の $\text{CO}_2$ 等とともにIRMSでイオン化されると、式2の反応が起こり、



$m/z$  45 の  $\text{H}^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2^+$  が生成する。 $m/z$  45 は  $^{13}\text{CO}_2$  と同じであるため、分析計内の水の存在自体が、測定によって得られる同位体比を大きく見積もってしまう要因となる (Leckrone and Hayes, 1997, 1998)。これを防ぐために、還元炉とオープンスプリットの間などに、水を除去する透水膜 (Nafion<sup>TM</sup> フィルター) を配置する必要がある (図5)。この透水膜は、経年劣化、とくに光により著しく劣化する性質があるため、暗所に設置するか、あるいはアルミ箔等で覆い遮光することが求められ、定期的な交換も必須である (著者らの研究室では約2年毎に交換している)。

#### 2.4.4. スプリットシステム

GCは加圧系の分析機器であり、0.4 bar (=約10 psi, 40 kPa) 以上のガス圧で、試料を分離する。一方でIRMSは減圧系の分析機器であり、 $10^{-6}$  mbarの真空中で、質量数の異なるイオンを分離する。これらの異なる圧力系の分析機器同士を繋ぎ、加圧系から減圧系への試料の導入をおこなうのが「オープンスプリットシステム」

である (図6)。オープンスプリットシステムでは、GC側（加圧系）から来たキャピラリーカラムの先端が開放系になっており、そこに、IRMS（減圧系）へとつながるキャピラリーカラムが挿入されている。この仕組みにより、反応炉で生成した試料由来のガスは、一部がIRMS側のキャピラリーカラムに引きこまれそのままIRMSに導入され、一方残りの大部分は測定機の系外に排出される。

この基本原理に従って、様々なタイプのオープンスプリットシステムが運用されている。例えば、内径0.32 mmのキャピラリーカラム (GC側) に、0.1 mmのキャピラリーカラム (IRMS側) を挿入したシンプルなもの (図6a) から、ヘリウムガスで満たされた円筒上のガラス管に、GC側のキャピラリーカラムとIRMS側のキャピラリーカラムとの双方を挿入し、IRMS側のカラムを上下に出し入れすることによって、IRMSへ導入するタイミングを制御したり、導入する濃度を調整したりするもの (図6b) がある。

IRMSへの導入量は、IRMS側のキャピラリーカラムの長さや内径、IRMSの真空度により決定される。例えば、短いキャピラリーカラムを用いると、GCから来た試料ガスの導入量が増加するが、IRMSの真空度が悪くなり、結果としてIRMSのメンテナンス頻度を高くする必要がある。そのため、研究対象の試料量や、研究室で実施可能なメンテナンス頻度を考えたうえで、IRMS側のキャピラリーカラムの長さや内径を調整することが推奨される。

#### 2.4.5. 分子ピークのベースライン分離

GC-IRMSでの同位体比分析では、図2に示すように、クロマトグラム上で、同位体比を測定したい有機化合物のピークが、ターゲットではない他の化合物や夾雑物等

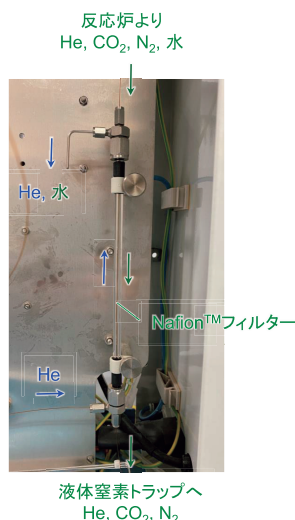


図5：透水膜

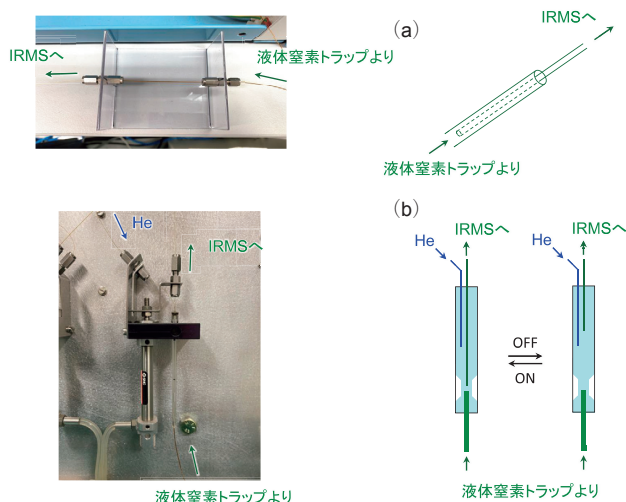


図6：オープンスプリットシステム

に由来するピークから、確実に分離されている必要がある。例えば、異なる同位体を持つガス（例えば、 $^{12}\text{CO}_2$  と  $^{13}\text{CO}_2$ ）が、キャピラリーカラム内を流れる時には、同位体効果により溶出時間に僅かな差があることが報告されており (Ricci et al., 1994), 著者らの経験的には、二酸化炭素の場合、 $m/z$  45 の  $^{13}\text{CO}_2$  が  $m/z$  44 の  $^{12}\text{CO}_2$  よりも僅かに先に溶出することがわかっている。このような場合には、クロマトグラム上のピークの、前半部が同位体的に重く、後半部が同位体的に軽くなると考えられる (図2の 45/44 を参照)。実際に、キャピラリーカラム内での溶出時間に差が生まれる詳細なメカニズムは十分に解明されていないものの、同位体比を正確に測定するためには、ピークの一部ではなく「ピーク全体」をより正確に積分する必要があるため、ベースラインの分離は慎重におこなわれるべきである。

#### 2.4.6. 誘導体化における同位体分別

同位体比を測定したい有機化合物が、極性官能基（ヒドロキシ基：-OH, カルボキシル基：-COOH, アミノ基：-NH<sub>2</sub> など）を持つ場合には揮発性を持たせるために、また、クロマトグラム上でのピーク分離能や S/N（シグナル／ノイズ）比を向上させるために、官能基を化学的に修飾し極性を下げる処理がおこなわれる。これを「誘導体化」という。しかし誘導体化においては、誘導体化剤と測定対象の有機化合物や元素の組み合わせによって、人為的な同位体分別が生じ、それが測定値に不確かさをもたらすため、十分に注意を払う必要がある (Rieley, 1994)。

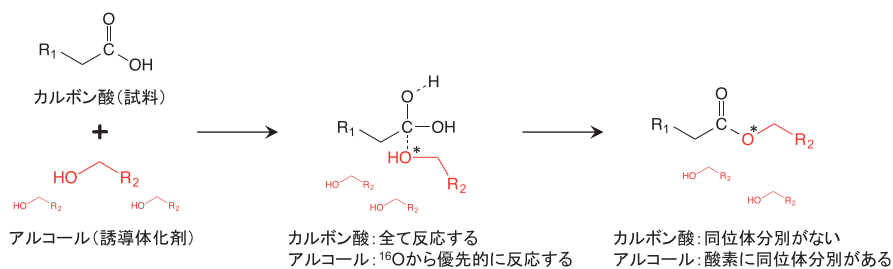
例えば、カルボン酸 ( $\text{R}_1\text{-COOH}$ ) とアルコール ( $\text{R}_2\text{-OH}$ ) を反応させ、エステル ( $\text{R}_1\text{-CO-OR}_2$ ) を生成 (カルボン

酸をエステル化、もしくは、アルコールをアシル化) するときには、「カルボキシル基の炭素」と「アルコールの酸素」の結合生成によって、同位体分別（軽い同位体である  $^{12}\text{C}$ ,  $^{16}\text{O}$  の優先的な反応）が生じる (図7)。カルボン酸（試料）に対して、アルコール（誘導体化剤）が過剰量存在する「エステル化」をおこなう時には、反応が 100% 進行した場合にヒドロキシル基の酸素に同位体分別が生じる (図7a, ただし、カルボキシル基の炭素は 100% 反応するので、同位体分別は無い)。一方で、アルコール（試料）に対して、カルボン酸（誘導体化剤）が過剰量存在する「アシル化」をおこなう時には、反応が 100% 進行した場合にカルボキシル基の炭素に同位体分別が生じる (図7b, ただし、アルコールの酸素は 100% 反応するので、同位体分別は無い)。これらの誘導体化に伴う人為的な同位体分別は、理論上は、有機化合物と誘導体化剤のモル比を調節することによって最小化できる<sup>\*1</sup>が、例えば試料に含まれるマトリックス（誘導体化剤と反応しうる、巨大な有機化合物：セルロースやリグニンなど）の存在や、目的の有機化合物以外に混合している化合物（夾雑物）の影響も受けるので注意されたい。

また、アミノ酸を対象とした場合は、アミノ基 (-NH<sub>2</sub>) 周辺の立体構造は生体を構成するアミノ酸 20 種類のあいだでそれぞれ異なっているため、誘導体化剤との反応性もそれぞれに差があると考えられる。アミノ酸の誘導体化（アシル化）における同位体効果の大きさもまた、20 種それぞれで異なる (Corr et al., 2007) ことにも留意したい。加えて、アミノ酸同士での競争反応も起こるた

<sup>\*1</sup> 誘導体化における同位体分別は、有機化合物と誘導体化剤のモル比が 1 : ∞ のとき最大になり、1 : 1 のときゼロになる。

## (a) エステル化



## (b) アシル化

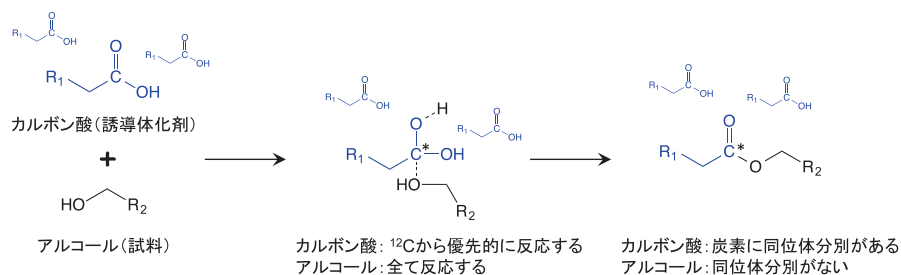


図 7：誘導体化における同位体分別 (\*印は同位体分別を起こす元素)

め (Chikaraishi and Ohkouchi, 2010), 複数のアミノ酸を対象とした測定においては, 前述したような, 誘導体化剤のモル比を調節する<sup>\*4</sup>といった方法は現実的ではない。一方で, 炭素数の異なる直鎖アルコール ( $\text{R-OH}$ ,  $\text{R}$  の炭素数が 16-30 など) の誘導体化 (アシル化) 反応における同位体効果の大きさは, たとえ炭素数が異なっても, ヒドロキシ基周辺の立体構造はほとんど等しいため, 試料中の全アルコールと誘導体化剤のモル比で決定される。

誘導体化反応において, 誘導体基に含まれる元素の同位体的な影響は, 一般的に式 3 を用いて補正される。

$$\begin{aligned} n_{\text{誘導体化後}} \times \delta_{\text{誘導体化後}} \\ = n_{\text{誘導体化前}} \times \delta_{\text{誘導体化前}} + n_{\text{誘導体基}} \times \delta_{\text{誘導体基}} \end{aligned} \quad (\text{式 3})$$

$n$  は, 誘導体化前後の試料および誘導体基の「元素数」を示す。 $\delta_{\text{誘導体化後}}$  は測定によって得られるため,  $\delta_{\text{誘導体化前}}$  を求めるにあたっては, 予め  $\delta_{\text{誘導体基}}$  を知る必要がある。一般的な手順として, 同位体比 ( $\delta_{\text{誘導体化前}}$ ) 既知の標品を用いて試料と同じ条件で誘導体化をおこない, 式 3 より  $\delta_{\text{誘導体基}}$  を得る。次に, 対象とする試料を同じ誘導体化剤を用いて誘導体化し, 実際に得られた測定値 ( $\delta_{\text{誘導体化後}}$ ) から  $\delta_{\text{誘導体化前}}$  を求めることが多い。この際,  $\delta_{\text{誘導体基}}$  が一定であると計算しやすいが, 誘導体化反応において同位体分別がある場合には (アミノ酸のアシル化における炭素, アルコールのアセチル化における炭素など),  $\delta_{\text{誘導体基}}$  が一定にならないので,  $\delta_{\text{誘導体化前}}$  の計算が困難になる。この困難を克服するため, これまでに様々な取り組みが

なされてきたが, 残念ながら, 優れた解決法は未だに開発されていない。

## 2.4.7. GC カラムの選択

GC カラムは, 測定対象の有機化合物の分子量や極性などに応じて, 様々なものが販売されている。それらのうち, カラムの固定相にハロゲン (F など) が含まれているものを除いたほとんどのカラムが, GC-IRMS で使用することができる。一般的に, 無極性や微極性の内径  $0.32 \text{ mm} \times$  長さ  $30 \text{ m}$  もしくは  $60 \text{ m}$  の低ブリードカラム (例えば, Agilent 社製の HP-1 MS や HP-5 など) で, 固定相の膜厚が薄いタイプ ( $0.1$  から  $0.32 \mu\text{m}$ ) が用いられる。膜厚の厚いカラムは, GC オープン温度の上昇に伴い, カラムから固定相が溶出し, クロマトグラムのバックグラウンドを上昇させるだけでなく, 燃焼炉や還元炉内の反応剤の著しい劣化の原因になるため, その点に留意されたい。

キャリアーガスの流速は, GC-MS などと比べると遅い  $1.0$  から  $1.4 \text{ ml/分}$  の範囲の定流量 (constant flow) に設定されることが多く, これは熱分解炉や燃焼炉において十分な反応時間を確保するためである。例えば, 早い流速 (例えば,  $2.0 \text{ ml/分}$ ) では反応効率の著しい低下に伴う同位体分別が生じることによって, 正確な同位体比を得ることが困難になり (Chikaraishi et al., 2010), また極端に遅い流速 (例えば,  $0.5 \text{ ml/分}$ ) では GC のピーク分離能の著しい低下によって, クロマトグラム上でのベースライン分離 (2.4.6 章を参照) が難しくなるため



である。

測定対象の有機化合物によってどの GC カラムを選択するべきかはケースバイケースであるが、以上の要素を参考に決定して頂きたい。

#### 2.4.8. 同位体比のキャリブレーション

試料に含まれる有機化合物の同位体比を得るためには、一般的に、同位体比既知の標準有機化合物 (Reference materials, Schimmelmann et al., 2016) を用意し、

- (1) 標準ガスの同位体比を 0‰ として、標準有機化合物の測定を行い、測定値と標準有機化合物も持つ既知の値の関係式 (1 次相関式) を作成する (図 8)
- (2) 標準有機化合物の測定時と同じ条件で試料を測定し、(1) の関係式を用いて試料の同位体比を計算する

という方法が一般的である。種々の標準有機化合物 (Reference materials) は、IAEA やインディアナ大学<sup>\*5</sup>、昭光サイエンス<sup>\*6</sup> などから販売されている。(1) の関係式 (図 8) の作成においては、測定対象の有機化合物の同位体比の範囲を、できるだけ広くカバーできるように複数の標準有機化合物を用いることが重要であり、この作業こそが得られた結果 (補正值) の確度の担保になる。また、(1) の関係式の傾きは、一般的に 1.0 にならないことの方が多く、これは「IRMS の装置固有の特性」や「GC-IRMS 系内での同位体分別」などに起因する。とくに後者は有機化合物の種類や測定条件にも依存するため、標準有機化合物として採用する有機化合物は、測定対象の有機化合物と同一のもの、またはできるだけ構造が類似したものを採用する必要がある。

なお、同位体比既知の標準ガスを用いて、その標準ガスの同位体比から試料の有機化合物の同位体比を計算するキャリブレーション法を用いている論文等が多く存在する。これは、「(1) の関係式の傾きを 1.0」と仮定した上で算出された方法であり、同位体的に正しい値が得られてない (= 確度が十分に担保されていない) 可能性に留意したい。

### 3. 生理・生態学研究への利用

ここまでは、安定同位体比の天然存在度を測定するための装置: GC-IRMS の基本原理を解説してきた。ここ

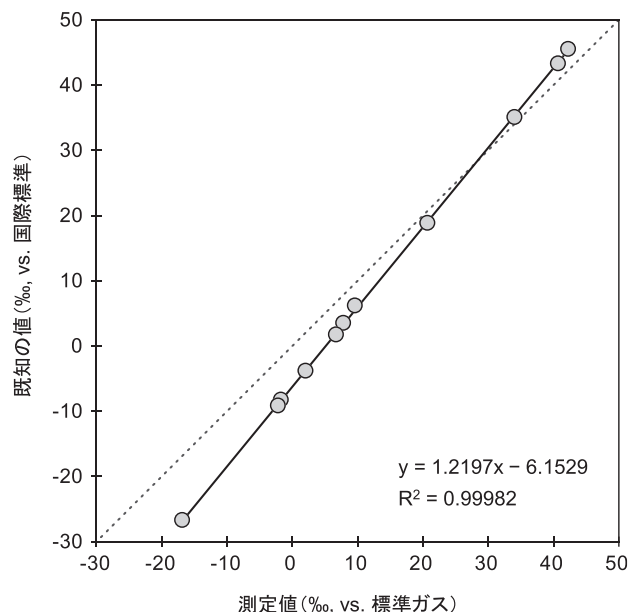


図 8: GC-IRMS で得られた測定値 (x 軸) に対する同位体比既知の標準有機化合物の  $\delta$  値 (y 軸) の関係

からは、実際に測定して得られた安定同位体比の天然存在度から、何をどのように評価できるかについて、その利用方法の一部を紹介する。

安定同位体の天然存在度に差をもたらす要因のひとつが「同位体分別」であり、その変化の法則性は、2.3 で述べたように「平衡論的同位体分別」または「速度論的同位体分別」のいずれかで説明可能である。特に、生物を介する反応における同位体分別は、後者によって決定されることが多い。同位体分別は生物体内で起こるあらゆる代謝 (生合成や分解) の反応プロセスにおいて起こっているが、実際に私たちがその同位体比の変化を、観測したり評価したりすることが可能な「有機化合物」と「元素」の組み合わせは、ごく一部に限られている。その組み合わせの中で、近年頻繁に用いられるようになったもののひとつに「アミノ酸」の「安定窒素同位体比」で分解量を評価するという手法がある。この方法論が成立する理由は、生物体内におけるグルタミン酸 (アミノ酸) の分解 (異化) プロセスの最初の反応である「脱アミノ酵素反応」における速度論的同位体分別が、式 4 に示すレイリーモデルに従うためである。

$$\Delta \delta^{15}\text{N} \approx 1000[F^{(\alpha-1)} - 1] \quad (\text{式 4})$$

$\Delta \delta^{15}\text{N}$  は、反応前後での同位体比の変化 ( $\delta^{15}\text{N}_{t=x} - \delta^{15}\text{N}_{t=0}$ ) を、 $F$  は、反応のフラックス (反応前を 1 として、全て反応すると 0) 示す。また、 $\alpha$  は同位体効果を示し、およそ 0.9938 と見積もられている (図 9, Goto et al,

<sup>\*5</sup> <https://hcnisotopes.earth.indiana.edu/reference-materials/index.html>

<sup>\*6</sup> [https://www.shoko-sc.co.jp/products/stable\\_isotope/reagent/standard/index.html](https://www.shoko-sc.co.jp/products/stable_isotope/reagent/standard/index.html)

2018). この理論に基づくと、例えば、生物同士の捕食—被食関係、すなわち「捕食者がエサを食べて消化し、その養分に含まれているグルタミン酸を分解してエネルギーを獲得する」という過程においては、エサから摂取したグルタミン酸のうち、約70%が分解された時、分解されずに残ったグルタミン酸の $\delta^{15}\text{N}$ 値は約8‰上昇するという関係性が導き出される。

このような知見を応用することによって、生物の生理学的な現象（代謝の状態、エネルギーの獲得・蓄積・消費、それらの効率化や制限要因など）や、生態学的な現象（生態系ピラミッドにおける生物の位置、エネルギーの流れなど）を、定量的に理解することができる。前者の学問分野は「同位体生理学」、後者の学問分野は「同位体生態学」と呼ばれている。また、両者を合わせて、「同位体生理生態学」と呼ばれることもある。以下に、GC-IRMS（正確には、GC-IRMSを用いて得られた有機化合物、特にアミノ酸の同位体比）が理解に貢献した生理・生態学研究について紹介する。

まず、生物を構成するアミノ酸分子の「分解（異化）過程における窒素同位体分別」に着目したことによって発展した同位体生態学研究の原理を紹介する（具体的な応用例は、本誌第2章「アミノ酸の安定同位体比を用いた生態系解析」を参照されたい）。生体を構成するアミノ酸は20種類あり、それぞれのアミノ酸がどのような分解（異化）のプロセスを経るかによって、アミノ酸ごとの同位体分別に差がもたらされる。例えば、分解（異化）の初期反応が「脱アミノ酵素反応」であるアラニン、バリン、イソロイシン、グルタミン酸などは、同位体生態学分野で「Trophic アミノ酸」と呼ばれ、これらのアミノ酸の窒素同位体比は、生物同士の捕食—被食関係の視点で見ると、被食者よりも捕食者の方が高くなる。これは、脱アミノ化がおこなわれる際に、 $^{14}\text{N}$ を持つアミノ酸のアミノ基から優先的に反応することで同位体分別が起こること、その結果として捕食者の内部で $^{15}\text{N}$ が濃縮することによって説明できる。一方で、フェニルアラニンやメチオニンなどの、分解（異化）の初期反応が脱アミノ化ではない（ヒドロキシル化やアデノシル化である）アミノ酸は「Source アミノ酸」と呼ばれ、窒素同位体比に顕著な同位体分別は見られず、その結果として捕食者と被食者とでアミノ酸の窒素同位体比がほとんど変化しない。

これらの「分解（異化）に伴うエネルギーの確保」と、一部のアミノ酸にみられる「分解（脱アミノ化）に伴う窒素同位体分別」は、生産者から高次捕食者に至るまでの食物連鎖の中で連続的に起こっているため、生態系ピ

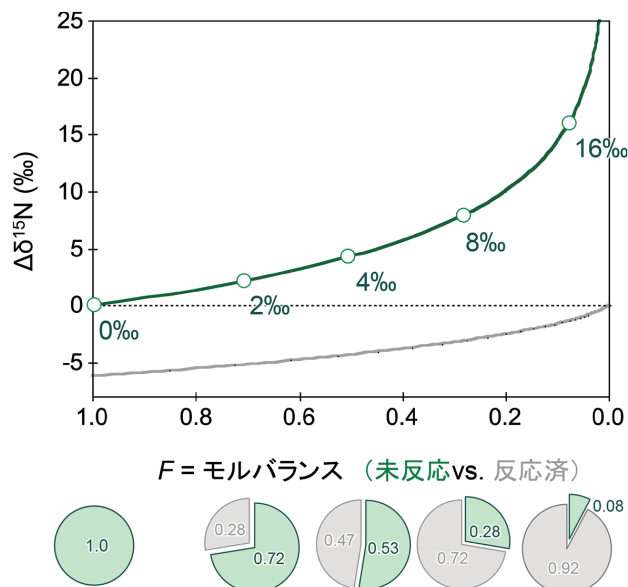


図9：グルタミン酸の脱アミノ化における同位体分別

ラミッドの上位の生物ほど Trophic アミノ酸の $\delta^{15}\text{N}$ 値は高い値となり、一方で Source アミノ酸の $\delta^{15}\text{N}$ 値はピラミッドの中のいずれの栄養段階に位置する生物であっても、一次生産者（植物や植物プランクトン）とほとんど変わらない（Chikaraishi et al., 2007）。これら2種類のアミノ酸の同位体分別の特徴に基づいて作られたのが、以下の一般式（式5）であり、この式を用いることで、生態系ピラミッドにおける生物の位置（栄養段階）を正確に推定することができるようになった（Chikaraishi et al., 2009）。

$$\text{栄養段階} = (\delta^{15}\text{N}_{\text{Tr}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{Src}} + \beta) / (\Delta_{\text{Tr}} - \Delta_{\text{Src}}) + 1 \quad (\text{式5})$$

$\delta^{15}\text{N}_{\text{Tr}}$ ,  $\delta^{15}\text{N}_{\text{Src}}$ は、それぞれ、Trophic アミノ酸と Source アミノ酸の $\delta^{15}\text{N}$ 値（測定により得られる値）を、 $\beta$ は一次生産者における $\delta^{15}\text{N}_{\text{Tr}}$ 値と $\delta^{15}\text{N}_{\text{Src}}$ 値の差を、 $\Delta_{\text{Tr}}$ は捕食—被食に伴う $\delta^{15}\text{N}_{\text{Tr}}$ 値の変化を、 $\Delta_{\text{Src}}$ は捕食—被食に伴う $\delta^{15}\text{N}_{\text{Src}}$ 値の変化を示す。 $\delta^{15}\text{N}_{\text{Tr}}$ 値、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{Src}}$ 値として用いることができるアミノ酸は、原理的にはいくつかの候補があるが、生物間でのアミノ酸組成の多様性や、 $\delta^{15}\text{N}$ 値の測定のしやすさ（例えば、分子ピークのベースライン分離のしやすさなど）を考慮し、Trophic アミノ酸として「グルタミン酸」、Source アミノ酸として「フェニルアラニン」を用いる場合が多い（例えば、Chikaraishi et al., 2014）。グルタミン酸、フェニルアラニンの $\Delta$ 値は、それぞれ8.0‰、0.4‰であり、この値は多くの生物の捕食—被食関係の中でおおよそ共通して見

られる普遍的なものである。 $\beta$ は、植物プランクトンやシアノバクテリアを一次生産者とする生態系で $-3.4\%$ 、陸上の維管束植物を一次生産者とする生態系で $+8.4\%$ と見積もられている (Chikaraishi et al., 2011)。この方法論を実際に応用研究へ用いる際は、これらの値を式(5)に代入して生物の栄養段階を算出する。

続いて、生物を構成するアミノ酸の炭素同位体比に着目して、最近明らかになった同位体生理生態学に関連する研究の原理を紹介する。生物は多種多様な有機化合物によって構成され、その活動は、有機化合物が生体内で様々な反応を伴った代謝（生合成や分解）をすることで維持されている。生体内における代謝プロセスは非常に多様かつ複雑であることから、その中から「同位体分別が生じる反応を特定し、どの分子の何の元素に記録されるかを特定する」ことは、困難であると考えられる研究者も少なくない。それに加えて、従来「有機化合物の同位体分別は、軽い同位体同士の結合（例えば $^{12}\text{C}$ - $^{14}\text{N}$ ）の開裂が、重い同位体を含む結合の開裂（例えば $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ ）よりも優先して起こることによって発生する」（例えば、Chikaraishi 2014）と考えられてきたが、その理論では十分に説明することができない同位体比の変化が多く報告されていた<sup>\*7</sup>。この事実は、それまで同位体を用いて研究してきた多くの研究者の頭を悩ませるのみならず、「有機化合物の安定同位体」という評価手法そのものの信頼性を揺るがす大きな要因のひとつとなっていた。

しかし近年になり、生物の代謝反応における同位体分別は、主に、水素化、脱水素化、炭酸固定、脱炭酸、アミノ化、脱アミノ化などの「元素の付加」や「脱離」を伴う反応や、巨大プール（貯蔵物質）が「分解（酵素分解）される際の初期反応」により生じることがわかってきた。とくに動物（従属栄養生物）は、エサから得た有機物を分解することによってエネルギーを獲得しているため、エネルギーを取り出すための主な代謝機構である中央代謝に関わる生化学的・生理学的な反応が、有機化合物の安定同位体比を決定すると考えることができる。実際に Takizawa et al. (2020) では、これまでも述べてきた「アミノ酸分解における脱アミノ化」に加えて、「中央代謝（解糖系とクエン酸回路）における脱炭酸」との、双方の同位体分別が、アミノ酸の窒素同位体比・炭素同位体比それぞれに色濃く反映されるという仮説を提唱した。この仮説は、生体内で生じる様々な同位体比の

変化を矛盾無く説明できるとして、注目されている。

#### 4. おわりに

GC-IRMS が開発されてから約 30 年が経った。しかしながら、私たちが測定可能な有機化合物や元素は、依然として、一部の脂質の水素・炭素やアミノ酸の窒素に限られている。そこには乗り越えなくてはならない方法的な課題（例えば、良い誘導体化法が見つからない、それを解決するためのアイデアがないなど）もあるが、GC-IRMS を用いた測定では、GC-MS などに比べ、要求される試料量が多く（GC-MS が pmol であるのに対し、GC-IRMS は nmol）、そもそも存在量の少ない試料の同位体比を測定することができないという課題も無視できない。これは、GC-IRMS のオペレーション（確度・精度を維持すること）が他の分析装置に比べて難しいこと、そして、使用する研究者や学生が、複雑な装置の内部構造や機能を十分に理解することができないことなどに原因があると考えられる。これらの課題を一度に全て解決することは容易ではないが、本稿によって、GC-IRMS という装置のポテンシャルが少しでも伝えられたら、これから先、様々な分野で重要な研究手段の一つとして積極的に使われるようになること、そして、優れた研究成果をもたらすことに少しでも貢献出来れば幸いである。

#### 謝辞

本稿の内容は、日本学術振興会科学研究費、若手研究 20K14590（研究代表者 滝沢侑子）、基盤研究 A（一般）20H00185（研究代表者 力石嘉人）、挑戦的研究（萌芽）19H21888（研究代表者 力石嘉人）及び、シリコン工業会（Silicon Industry Association of Japan）からの寄付金で実施した研究成果の一部を取りまとめたものである。

#### 引用文献

- Evershed, R. P., Bull, I. D., Corr, L. T., Crossmann, Z. M., van Donhgen, B. E., Evans, C. J., Jim, S., Mottram, H. R., Mukherjee, A. J. and Pancost R. D. (2007) Compound-specific stable isotope analysis in ecology and paleoecology. In *Stable isotopes in Ecology and Environmental Science* (Michener, R. and Lajtha, K. eds), pp 480-540. Blackwell Publishing.
- 力石嘉人・大場康弘 (2008) ガスクロマトグラフ/同位体比質量分析計による分子レベル安定同位体比分析法. *Res.*

<sup>\*7</sup>呼吸により排出される二酸化炭素の同位体比が基質に比べて低くならないことや、アミノ酸の脱アミノ化において炭素と窒素の同位体分別が同調しないことなど、「結合の開裂」による同位体分別では説明できない現象が多い。

- Org. Geochem.*, **23**, 99–122 (2008)
- Chikaraishi, Y. and Ohkouchi, N. (2010) An improved method for precise determination of carbon isotopic composition of amino acids. In *Earth, Life, and Isotopes* (Ohkouchi, N., Tayasu, I. and Koba, K., eds), Kyoto University Press, pp. 355–366.
- Chikaraishi, Y., Kashiyama, Y., Ogawa, N. O., Kitazato, H., and Ohkouchi, N. (2007) Biosynthetic and metabolic controls of nitrogen isotopic composition of amino acids in marine macroalgae and gastropods: implications for aquatic food web studies. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **342**, 85–90.
- Chikaraishi, Y., Ogawa, N. O., Kashiyama, Y., Takano, Y., Suga, H., Tomitani, A., Miyashita, H., Kitazato, H. and Ohkouchi, N. (2009) Determination of aquatic food-web structure based on compound-specific nitrogen isotopic composition of amino acids. *Limnol. Oceanogr.: Meth.*, **7**, 740–750.
- Chikaraishi, Y., Takano, Y., Ogawa, N. O. and Ohkouchi, N. (2010) Instrumental optimization for compound-specific nitrogen isotope analysis of amino acids by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry. In *Earth, Life, and Isotopes* (Ohkouchi, N., Tayasu, I. and Koba, K., eds), Kyoto University Press, pp. 367–386.
- Chikaraishi, Y., Ogawa, N. O., Doi, H. and Ohkouchi, N. (2011)  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  ratios of amino acids as a tool for studying terrestrial food webs: a case study of terrestrial insects (bees, wasps, and hornets). *Ecol. Res.* **26**, 835–844.
- Chikaraishi, Y., Steffan, S. A., Ogawa, N. O., Ishikawa, F. N., Sasaki, Y., Tsuchiya, M. and Ohkouchi, N. (2014) High-resolution food webs based on nitrogen isotopic composition of amino acids. *Ecol. Evol.*, **4**, 2423–2449.
- Corr, L. T., Berstan, R. and Evershed, R. P. (2007) Development of *N*-acetyl methyl ester derivatives for the determination of  $\delta^{13}\text{C}$  values of amino acids using gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **79**, 9082–9090.
- Goto, A. S., Miura, K., Korenaga, T., Hasegawa, T., Ohkouchi, N. and Chikaraishi, Y. (2018) Fractionation of stable nitrogen isotopes ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) during enzymatic deamination of glutamic acid: implications for mass and energy transfers in the biosphere. *Geochem. J.*, **52**, 273–280.
- Hayes, J. M., Freeman, K. H., Popp, B. N. and Hoham, C. H. (1990) Compound-specific isotopic analyses: A novel tool for reconstruction of ancient biogeochemical processes. *Org. Geochem.*, **16**, 1115–1128.
- Leckrone, K. J. and Hayes, J. M. (1997) Efficiency and temperature dependence of water removal by membrane dryers. *Anal. Chem.*, **1997**, **69**, 911–918.
- Leckrone, K. J. and Hayes, J. M. (1998) Water-Induced Errors in Continuous-Flow Carbon Isotope Ratio Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, **70**, 2737–2744.
- Ricci, M. P., Merritt, D. A., Freeman, K. H. and Hayes, J. M. (1994) Acquisition and processing of data for isotope-ratio-monitoring mass spectrometry. *Org. Geochem.*, **21**, 561–571.
- Rieley G. (1994) Derivatization of organic compounds prior to gas chromatographic-combustion-isotope ratio mass spectrometric analysis: Identification of isotope fractionation processes. *Analyst*, **119**, 915–919.
- 酒井均・松久幸敬 (1996) 安定同位体地球化学. 東京大学出版会
- Saurer, M., Robertson, I., Siegwolf R. and Leuenberger, M., (1998) Oxygen isotope analysis of cellulose: An interlaboratory comparison. *Anal. Chem.*, **1998**, **70**, 2074–2080.
- Schimmelmann, A., Qi, T., Coplen, T. B., Brand, W. A., Fong, J., Meier-Augenstein, W., Kemp, H. F., Toman, B., Ackermann, A., Assonov, S., Aerts-Bijma, A. T., Brejcha, R., Chikaraishi, Y., Darwish, T., Elsner, M., Gehre, M., Geilmann, H., Gröning, M., Hélie, J. -F., Herrero-Martín, S., Meijer, H. A. J., Sauer, P. E., Sessions, A. L., and Werner, R. A. (2016) Organic reference materials for hydrogen, carbon, and nitrogen stable isotope-ratio measurements: caffeines, *n*-alkanes, fatty acid methyl esters, glycines, L-valines, polyethylenes, and oils. *Anal. Chem.*, **88**, 4294–302.
- Sessions, A. L. (2006) Isotope-ratio detection for gas chromatography. *J. Sep. Sci.*, **29**, 1946–1961.
- Takizawa, Y., Takano, Y., Choi, B., Dharampal, P. S., Steffan, S. A., Ogawa, N. O., Ohkouchi, N. and Chikaraishi, Y. (2020) A new insight into isotopic fractionation associated with decarboxylation in organisms: implications for amino acid isotope approaches in biogeoscience. *Prog. Earth Planet. Sci.*, **7**, 1–13.