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*

力石嘉人**・大場康弘*** (2008年6月2日受付,2008年9月1日受理)

Abstract

One of the most powerful techniques in the molecular isotope studies is compound-specific isotope analysis (CSIA) by gas chromatograph/isotope ratio mass spectrometer (GC/IRMS), which allows a rapid and precise determination of stable carbon, nitrogen, and hydrogen (and oxygen) isotopic compositions of individual compounds even in complex mixture of components. After commercial production of GC/IRMS in the 1990s, CSIA has explosively been used for many fields of studies, particularly among the organic geochemical community as a powerful tool for tracing sources and delivery of organic compounds in geological and geographical samples and for reconstructing paleoenvironments. However, it is also true that fundamental analytical parameters of GC/IRMS has not been known extensively, which often leads to unreliable determination of the isotopic compositions. Unfortunately, based on such unreliable determination, several studies have unconsciously reported essentially inaccurate data and associated discussion. Therefore, in this paper, we review a brief outline of GC/IRMS and associated methodologies, and summarize the instrumental factors influencing accuracy and precision of the isotope measurements. We hope that this paper is useful for applying CSIA to future studies.

1. はじめに

"分子レベル安定同位体比分析"とは、生物試料 や環境試料に含まれる多種多様な有機化合物の安 定同位体比(水素:D/H,炭素:¹³C/¹²C,窒素:¹⁵N /¹⁴N,酸素:¹⁸O/¹⁶Oなど)を化合物レベルで測定 するという意味である(化合物レベル安定同位体 比分析と記述することもある)。安定同位体比は、 自然界の様々な物理的・化学的・生物的過程におい て僅かに変化する(その質量差により同位体分別 を起こす)ため、現在の地球環境科学において重 要かつ強力な研究ツールになっている。そして有 機化合物の安定同位体比は、分子構造(機能)や その化合物に特有の生物化学的プロセス(合成・ 代謝・分解など)と密接にリンクした情報が得ら れるという特徴がある。

分子レベル安定同位体比分析は,1960年代には 既にいくつかの論文で用いられている(例えば, Abelson and Hoering, 1961; Gaebler et al., 1963)。し かし当時は,(1)試料に含まれる有機化合物を抽

*Compound-specific isotope analysis (CSIA) by gas chromatograph/isotope ratio mass spectrometer (GC/IRMS)

**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

***北海道大学低温科学研究所 〒060-0819 北海道札幌市北区北 19 条西 8 丁目 Yasuhiro Oba: Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University Sapporo, 060-0819, Japan e-mail: oba@neko.lowtem.hokudai.ac.jp, Tel: 011-706-5486, Fax: 011-706-7142 出する、(2) クロマトグラフィーなどにより目的 の有機化合物を単離・精製する、(3)精製した有機 化合物を真空下で酸化剤や還元剤と反応させる. (4) 生成した CO₂・N₂・H₂ ガスなどを真空ライン で精製する。(5)精製したガスの安定同位体比を 同位体比質量分析計で測定する. という手法が用 いられており、 有機化合物の単離やガスの精製に 多くの労力と時間を費やさねばならず、また多量 の試料が必要であることから、汎用的な研究ツー ルにはなりえなかった。分子レベル安定同位体比 分析が今日のように汎用的な研究ツールになった のは、1990年代に、Hayes らによりガスクロマト グラフ/同位体比質量分析計 (gas chromatograph/ isotope ratio mass spectrometer, GC/IRMS) が開発 されたことによる (Haves et al., 1990; Merritt and Hayes, 1994; Burgoyne and Hayes, 1998; Hilkert et al., 1999)。これにより揮発性の有機化合物であれば 試料に含まれる一つ一つの有機化合物を単離する ことなく、個々の化合物の安定同位体比を一度の 分析で連続的に測定することができるようになっ た。測定に必要な試料量は1化合物・1元素あたり 数ナノモルであり、測定に要する時間は1 試料・ 1元素あたり数十分から1時間程度である。GC/ IRMS の登場により、有機化合物の分子レベル安 定同位体比分析は世界中に爆発的に広がり,今日 ではとくに有機地球化学を中心として. 自然科 学・医療・食品など様々な分野で重要なツールの 一つとして用いられている。

しかし, 試料に含まれる個々の有機化合物の安 定同位体比がオンラインで測定できるということ を過信し, 信頼性・再現性を検証せずに適切でな い測定法(ときには誤った測定法)により得られ た同位体比を報告している研究(論文)も少なく ない(例えば, クロマトグラム上でピークのベー スライン分離をしないで測定している, 誘導体化 に伴う補正計算が間違っている, 同位体比のキャ リブレーション法が間違っているなど)。また, 信頼性・再現性のある測定を行う上での必要事項 (手順等)を記載した手引き書がほとんどないの も事実である。そこで本稿では, GC/IRMSによ る分子レベル安定同位体分析法(有機化合物の安 定炭素・窒素・水素同位体比分析法)の概要, お よび確度・精度の良い同位体比を得るために検討 すべき測定条件等をまとめた。

なお本稿の大部分は、著者らのサーモフィッ シャーサイエンティフィック社製 GC/IRMS (主 に、拡張型安定同位体比質量分析計:DELTA^{plus}XP にガスクロ型前処理装置:GC-C/TC IIIを用いたも の)でのこれまでの使用経験をもとにしたもので あることをあらかじめ了承していただきたい。酸 素同位体比については、著者らに分析経験が無い ので本稿では記載しない。詳細な分析法を記した 論文や総説等の報告はまだ無いが、いくつかの研 究がなされているのでそれらの論文を参照してい ただきたい (例えば、Gremaud et al., 2001; Aguilar-Cisneros et al., 2002; Calderone et al., 2006; Yamada et al., 2007)。

また,同位体分別の原理や装置の詳細,本法の 応用例などについては,数編の論文・総説・本な どがすでに発表されているのでそれらも是非参照 していただきたい (例えば, Brand et al., 1994; 酒 井 and 松久, 1996; Brand, 1996; Meier-Augenstein, 1999; Lichtfouse, 2000; Hayes, 2001; 力石 and 奈良 岡, 2004; Fry, 2006; Sessions, 2006; Dawson and Siegwolf, 2007; Michener and Lajtha, 2007; 力石, 2007; 力石ら, 2007)。

2.GC/IRMS の概要

2.1. 安定同位体比の定義

試料中の安定同位体比は,国際標準物質のそれ に対する千分偏差 (δ値,単位:‰,パーミル)で 定義される (式 1)。

 δ 値=[(R_{武料}/R_{国際標準物質})-1]×1000(‰)式1 R は同位体存在比率 (D/H, ¹³C/¹²C, ¹⁵N/¹⁴N)を 示す。標準物質として水素では標準平均海 水 (Standard Mean Ocean Water, SMOW, D/H = 0.00015576),炭素では白亜紀 Peedee 層ベル ムナイト炭酸塩 (Peedee Belemnite, PDB, ¹³C/ ¹²C=0.011180),窒素では大気中の窒素ガス (Atmospheric Nitrogen, AIR, ¹⁵N/¹⁴N=0.0036765)を 用い,δ値はそれぞれ,δD値,δ¹³C値,δ¹⁵N値と 表記する。例えば,D/H=0.00015732の試料の場 合,SMOW とのD/Hの差(+0.0000156)は,δD =+10‰と表される。試料のδ値が正であれば, 国際標準物質と比較して重い同位体(D, ¹³C, ¹⁵N) に富む(同位体的に重い)ことを示し,負であれ



Fig. 1. Schematic illustration of a typical GC/IRMS system

ば軽い同位体 (H, ¹²C, ¹⁴N) に富む (同位体的に軽い) ことを示す。

2.2. GC/IRMS

2.2.1. 装置の概要

GC/IRMS は,(1) 試料の導入と個々の有機化 合物の分離を行う GC 部,(2) 有機化合物を CO₂, N₂ または H₂ ガスへ変換する反応炉,(3) 加圧 系 (GC) と真空系 (IRMS) の機器を接続するスプ リットシステム,(4) 導入されたガスの安定同位 体比を測定する IRMS 部,で構成される (Fig. 1ad)。試料(複数の揮発性有機化合物の混合物)は, 一般的に n-ヘキサンやジクロロメタン溶液とし 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 オーブン内で カラムと直結したセラミック製マイクロボリュー ム反応炉(内径:0.5~0.6 mm,長さ:30~34 cm) に連続的に導入される。このとき溶媒のn-ヘキサ ンやジクロロメタンはバックフラッシュシステム (2.2.3 章参照)により除去され,反応炉には導入 されない。測定対象の有機化合物の種類と元素に より,反応炉の種類やその後に配置されるトラッ プなどの構成が異なる。最終的に,キャリアーガ スと共に CO₂,N₂ または H₂ ガスが IRMS に送ら れ,イオン化の後,それぞれの同位体のイオン強 度(例えば水素では,H⁺: m/z 2 と HD⁺: m/z 3) が 測定される。実際の測定では,PC ソフトウェア上



Fig. 2. A GC/IRMS chromatogram on nitrogen isotope analysis of amino acid standards (Ala: alanine, Gly: glycine, Asp: aspartic acid, Glu: glutamic acid) as their *N*-pivaloyl/isopropyl ester derivatives

で Fig. 2 に示すようなクロマトグラムが得られ, それぞれのピーク (有機化合物)の同位体比が出 力される (同位体のイオン強度から δ 値を求める 計算法は, Santrock et al. (1985) などを参照して いただきたい)。その際,水素同位体比測定の場 合には,水素ガスのイオン化時に生じる H₃⁺イオ ン (H₃ ファクター)の補正も行われる (2.2.5 章参 照)。反応炉の種類やその後に配置されるトラッ プなどの一般的な構成は以下の通りである。

1) 窒素を含まない有機化合物の炭素同位体比を 測定する場合 (Fig. 1a)

GC で分離された有機化合物は、燃焼炉(酸化 剤:NiO, CuO, 触媒:Pt, 温度:800~950°C)に 連続的に導入され、CO₂・H₂O に酸化分解される。 その後、透水フィルターで H₂O を除去し(CO₂ と H₂O は共にイオン化されると HCO₂⁺ (m/z 45)を 生成するため、IRMS 導入前に H₂O を除去する必 要がある、Leckrone and Hayes, 1997, 1998)、キャ リアーガスと共に CO₂ が IRMS に導入され、CO₂ の同位体比が測定される。

 2) 窒素を含む有機化合物の炭素同位体比を測定 する場合 (Fig. 1b)

GC で分離された有機化合物は, 燃焼炉 (酸化 剤:NiO, CuO, 触媒:Pt, 温度: $800 \sim 1150$)に 連続的に導入され, CO₂·H₂O·N₂·種々の窒素酸 化物 (N_xO_y) に酸化分解される。その後, 還元炉 (還元剤:Cu, 温度: $550 \sim 650$ C)で窒素酸化物 を N₂に還元し (N₂O, NO₂ は CO₂ の同位体と同じ 質量数を持つため N₂ に還元する必要がある),透 水フィルターで H_2O を除去した後, キャリアーガ スと共に CO_2 と N_2 が IRMS に導入され, CO_2 の 同位体比が測定される。

3) 窒素同位体比を測定する場合 (Fig. 1c)

GC で分離された有機化合物は, 燃焼炉 (酸化 剤:NiO, CuO, 触媒:Pt, 温度:800~1150°C) に 連続的に導入され, CO₂・H₂O・N₂・種々の窒素酸 化物 (N_xO_y) に酸化分解される。その後, 還元炉 (還元剤:Cu, 温度:550~650°C) で窒素酸化物を N₂ に還元し, 透水フィルターで H₂O を除去し,液 体窒素トラップで CO₂ を除去した後 (CO₂ はイオ ン化されると CO⁺ (m/z 28) を生成するため IRMS 導入前に除去する必要がある), キャリアーガス と共に N₂ が IRMS に導入され, N₂ の同位体比が 測定される。

4) 水素同位体比を測定する場合 (Fig. 1d)

GC で分離された有機化合物は,熱分解炉(触 媒:グラファイト,温度:1400~1500℃,2.2.4 章参 照)に連続的に導入され,H₂·C(グラファイト)・ CO (有機化合物に酸素が含まれる場合)に熱分解 される。その後,生成したガスがキャリアーガス と共に IRMS に導入され,H₂の同位体比が測定さ れる。

なお、GC/IRMSを示す表記として、論文等では 様々な表記・略記が使われている。例えば、炭素・ 窒素同位体比を測定する設定(Fig. 1a-c)をガス クロマトグラフ/燃焼/同位体比質量分析計(GC/ combustion/IRMS) と表記し、GC/C/IRMS, isotope ratio monitoring-GC/MS (irm-GC/MS) と表記する こともある。また、水素同位体比を測定する設定 (Fig. 1d) をガスクロマトグラフ/熱分解/同位体比 質量分析計 (GC/pyrolysis/IRMS) と表記し, GC /P/IRMS, GC/thermal conversion/IRMS (GC/TC/ IRMS)と表記することもある。一般的に、論文中 では使用した機器の詳細が実験項に記載されてい るので、分子レベル安定同位体比分析を用いてい る論文を読むときは、実験項を注意して読んでい ただきたい。本稿では、両者を区別せずに「GC/ IRMS」と記載した。

2.2.2. GCキャピラリーカラムとマイクロボリューム反応炉の接続

GC 内部でのキャピラリーカラムとマイクロボ

(a) Standard



Fig. 3. Optimization on the connection between GC capillary column and ceramic reactor

リューム反応炉の連結部では, Fig. 3b のように, キャピラリーカラムをセラミック反応炉の中まで 挿入させると得られる同位体比の精度が良くなる ことが経験的に知られている。その際,挿入する キャピラリーカラムの先端のポリイミドコーティ ングを 1~2 cm 程度あらかじめバーナーなどで焼 いて除去しておくと良い。

2.2.3. 反応炉 (燃焼炉・還元炉・熱分解炉)

炭素同位体比や窒素同位体比の測定に用いる燃 焼炉には、一般的に、酸化剤として NiO と CuO の ワイヤーが. 触媒として Pt のワイヤーが入れられ ているものを用いる。通常は、市販の反応炉をそ のまま装置にセットし、すぐに測定に使用するこ とができるが、水素同位体比測定に用いる熱分解 炉では、 試料の測定前にユーザー自身が、 マイク ロボリューム内部にグラファイト(触媒)のコー ティングを作らなければない。例えば、著者ら は、スプリットシステムを "open" にするなどし て反応炉と IRMS の接続を切った状態で、バック フラッシュを "close" にし (2.2.4 章参照), 1450°C の熱分解炉に. GC から n-ヘキサンを 1~3µl を 0.5 ~1µl ずつ数回に分けて導入することでグラファ イト(触媒)のコーティングを作製している。ま た、グラファイトのコーティングを良好な状態に 保つために、約30~50 試料ごとに、同様の方法 で n-ヘキサン 0.5~1µl 程度を再導入している (再 グラファイト化)。

試料の分析数が増えると反応剤や触媒が劣化・ 消耗し、有機化合物のCO2, N2 またはH2 ガスへ の変換効率の低下や、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)の原因になる。 酸化剤の再酸化(2.2.4 章参照)や再グラファイト 化により、ある程度の再活性化が期待できるが、 最終的には新品の反応炉と交換しなければならな い。例えば、著者らの研究室では、炭素同位体比 を測定する場合には約1000分析。窒素同位体比を 測定する場合には約100分析、水素同位体比を測 定する場合には約200分析で反応炉を交換してい る。なお、炭素同位体比測定において、酸化剤が 劣化した状態で分析を続けると、燃焼炉内で有機 化合物のグラファイト化反応が起こり(一度生じ たグラファイトは、それ自身が触媒となり連鎖的 なグラファイト化反応を引き起こす). 正しい同 位体比が得られなくなる。燃焼炉を交換しない限 り改善されることはないので、とくに注意が必要 である。

2.2.4. バックフラッシュシステム

GC/IRMS を使用するうえで、理解しておきた い重要な装置上の仕組みの一つは、"バックフラッ シュシステム"である。これは、溶媒や反応炉に 導入したくない特定の有機化合物を反応炉に導入 せずに外部に排出する仕組みである (多量の溶媒 を反応炉に導入してしまうと、反応剤を著しく 消耗してしまう)。また、測定によって消耗した 燃焼炉の酸化剤を、酸素ガス(または空気)を導 入することで再酸化する際にも使用される。Fig. 4a に示すように、バックフラッシュが"open"の 時には GC からのフローはそのまま外部に排出さ れる。その際に酸素ガス(または空気)を導入す れば、燃焼炉の酸化剤を再酸化することができる (再酸化する場合の燃焼炉の温度は一般的に550 ~650℃.GCオーブンの温度は50℃以下)。-方で、Fig. 4b に示すように、バックフラッシュが "close"の時にはGCからのフローは反応炉に送ら れる。この開閉は PC ソフトウェア上のタイムプ ログラムで制御され、溶媒や試料に含まれる特定 の有機化合物を自動的・選択的に排出することが できる。なお, バックフラッシュを用いず, PTV

(a) Hydrogen







Fig. 4. Back-flush system on GC/IRMS

(programmed temperature vaporaization, 温度プログラム気化) 法により, GC カラムへの溶媒の導入 を行わない方法もある (Flenker et al., 2007)。

2.2.5. H3 ファクター

水素同位体比を測定するうえで特筆すべき重要 な問題の一つに. "H₃ファクター"の補正がある。 水素ガスのイオン化では、H₂⁺ (m/z 2) ·HD⁺ (m/z 3) の他に副産物として H₃⁺ (*m*/z 3) が発生し、そ の発生量は、イオン化室に導入された水素ガスの 圧力と有機化合物の同位体比に依存する。そのた め、正確な同位体比を求めるためには、このH₃+ の発生量を補正しなければならない。通常、前者 (圧力依存)は標準水素ガスを断続的に異なる圧 力で IRMS へ導入し、得られた同位体比の変化か らPCソフトウェアによりH3ファクターという 形で計算される(試料の測定では PC ソフトウェ アにより自動的に補正される)。一方.後者(同 位体比依存)は、イオンソースのフォーカスを H₃ ファクターが充分小さく(10以下)なるように調 整し、且つ正しい数値を PC ソフトウェアに認識 させることで影響を最小にすることができる。厳 密に補正を行うためには、PC ソフトウェアによ る自動補正に加え、同位体比の異なる複数の標準



Fig. 5. Accuracy and precision of (a) hydrogen, (b) carbon, and (c) nitrogen isotope analysis in our laboratory

有機化合物を用意し、正しい値(本稿では、以下 「真値」と記す)と得られた測定値の隔たりから、 再度同位体スケールを補正する必要がある (3.9.2 章参照)。なお、H₃ファクターについての詳細は Sessions et al. (2001a, 2001b)に記載されているの で、是非参照していただきたい。

2.3. 測定精度

測定精度は、一般的に炭素同位体比で±0.2~ 0.5‰,窒素同位体比で±0.5~1.0‰,水素同位体 比で±3~10‰程度であり、有機化合物の種類や GC等の条件、導入する試料量などに依存する(3 章参照)。例えば著者の研究室では、n-ドコサン の水素同位体比の測定精度は、水素量で5~80 ng (元素量換算で5~80 nmol)では±4‰以下であり (Fig. 5a)、炭素同位体比の測定精度は、炭素量で5~100ng (0.4~8 nmol)で±0.3‰以下である (Fig.



Fig. 6. Schematic chromatograms of four types of compound-peak separation

5b)。L-アスパラギン酸の窒素同位体比の測定精 度は,窒素量が30~110 ng (2~8 nmol)で±0.5‰ 以下である (Fig. 5c)。

3. 測定に必要な条件

3.1. はじめに

安定同位体は自然界の様々な物理的・化学的・ 生物的過程において同位体分別を起こす。これは 試料の前処理操作,及び GC/IRMS 装置内部にお いても例外ではない。とくに,前処理操作におい て測定対象の有機化合物の回収率が低い場合や誘 導体化反応は,同位体分別の原因になることが多 く,また GC/IRMS 装置内部における有機化合物 およびガスのキャピラリーカラム内での移動や, 有機化合物のガス化(燃焼・還元,または熱分解 反応)に伴う同位体分別も無視できない。そのた め,GC/IRMS を用いて有機化合物の安定同位体 比を確度・精度良く測定するためには,測定対象 の化合物の種類や構造に応じて測定条件の最適化 を行う必要がある。

3.2. 測定可能な有機化合物

GC/IRMS では、前処理装置にGC を用いるた め、測定可能な有機化合物はGC で分析が可能な 揮発性化合物(または誘導体化などにより揮発性 を獲得することのできる有機化合物)に限定され る。一般的に、沸点が 300°C 以下の有機化合物が 対象になる。また、メタノールや酢酸などの高揮 発性の低分子化合物や、熱や光に不安定な有機化 合物は、操作中の揮発や分解に伴う同位体分別が あるので、注意して扱う必要がある(例えば、Oba and Naraoka, 2008)。

3.3. ベースライン分離

GC/IRMS で同位体比を測定する上で非常に重



Fig. 7. Schematic illustration of the time displacement between isotopically different gasses: (a) H₂, (b) CO₂, and (c) N₂ (after Ricci et al., 1994)

要な注意点は, Fig. 6a のようにクロマトグラム上 で個々の有機化合物を必ずベースライン分離しな ければならないことである。Fig. 6b, 6c のように ピークが重なっている場合や. Fig. 6d のように ピークのバックグラウンドに unresolved complex 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、Fig.7に示すように、キャピラ リーカラム内での同位体効果により、単一のガス でも、異なる同位体の溶出時間が僅かに異なるた めである。例えば炭素 (CO₂) では. m/z 45 のもの がm/z44のものよりも先に溶出するために、クロ マトグラム上のピーク前半部が同位体的に重く. 後半部が同位体的に軽くなる。一方で,窒素(N₂) では. m/z 28 のものが m/z 29 のものよりも先に 溶出するために. ピーク前半部が同位体的に軽 く、後半部が同位体的に重くなる。すなわち、同 位体比を正確に得るためには、必ずピーク全体を 積分しなければならず, Fig. 6b, 6c のように複数 の有機化合物のピークが少しでも重なっている場 合は,両者の同位体比が干渉してしまう。例えば 炭素では、先に溶出するピークの同位体比が真値 よりも大きくなり、後に溶出するピークの同位体 比が真値よりも小さくなる傾向がある。そのため 導入試料は、目的の有機化合物がGC クロマトグ ラム上で完全にベースライン分離するものを準備 する必要がある。

一般的に,液-液分配や種々のクロマトグラフィーなどにより,試料をいくつかの画分に分けることでベースライン分離を達成する。例えば,



Fig. 8. An analytical protocol for extraction and separation of Δ^5 sterols (e.g. cholesterol) from sample matrix

土壌試料に含まれるコレステロールなどのΔ5ス テロールの同位体比を測定するためには、(1)有 機溶媒による脂質成分の抽出。(2)液-液分配に よる中性脂質成分の分画.(3)シリカゲルカラム クロマトグラフィーによるモノアルコール成分 の分画。(4) 尿素アダクト処理による分岐・環状 アルコールの分画. (5) 硝酸銀シリカゲルカラム クロマトグラフィーによる Δ⁵ ステロールの分画. という手順により GC クロマトグラム上で △⁵ス テロールのピークが完全にベースライン分離する 試料を用意する (Fig. 8,9)。シリカゲルカラムク ロマトグラフィーは有機化合物の極性による分面 に、尿素アダクト処理やモレキュラーシーブ処理 は直鎖状有機化合物と分岐・環状有機化合物の分 画(例えば、駒津ら, 1999; 山田ら, 1994; Grice et al., 2008) に、硝酸銀シリカゲルカラムクロマトグ ラフィーは有機化合物の不飽和度による分画(例 えば、Chikaraishi et al., 2004b; Chikaraishi, 2006) に よく使われる手法である。

3.4. 交換性水素の扱い

水酸基 (-OH)・カルボキシル基 (-COOH)・ア ミノ基 (-NH₂) などに含まれる水素は,実験室中 の水蒸気やカラムの固定相などと容易に交換す る。また,芳香族化合物の水素は,低 pH・高温 条件では容易に交換してしまい (例えば, Oba and



Fig. 9. GC/MS chromatograms of mono-alcohol and ∆⁵ sterol fractions from soil samples (Chikaraishi and Naraoka, 2006)



Naraoka, 2003), ケトンは, エノール体が異性体と して存在し, それらが容易に変化しあう異性現象 を持つ (ケト-エノール互変異性, Fig. 10)。実際 に, ジカルボン酸の α 水素 (二重結合の隣の水素) は, 抽出などに用いる水の水素と容易に交換して しまう (Fuller and Huang, 2003)。そのため, これ らの官能基を含む有機化合物の水素同位体比を測 定する場合は, 誘導体化 (3.5 章) などによりこれ らの交換性水素を除去する, または交換した水素 の同位体比を較正する必要がある。

3.5. 誘導体化

有機化合物に極性官能基(水酸基:-OH・カルボ キシル基:-COOH・アミノ基:-NH₂など)が含ま れる場合,官能基を化学的に修飾することで,GC クロマトグラム上での分離能の向上・交換性水素 の除去・化合物の安定化などが期待できる。Table 1によく使われる誘導体化法をまとめた。誘導体

Procedure	Functional group	Mechanisms	Reagent	Product
Silylation	-OH/-COOH/-NH2	Trimethylsilylation (TMS)	<i>N</i> , <i>O</i> -bis(trimethylsilyl) trifluoro acetamide (BSTFA)	-O-TMS/-COO-TMS/-NH-TMS
		<i>tert</i> -butyldimethylsilylation (<i>t</i> BDMS)	<i>N</i> -tert-buthyldimethylsilyl- <i>N</i> -methyl- trifluoro acetamide (MTBSTFA)	-O-tBDMS/-COO-tBDMS/-NH-tBDMS
Estrification	-COOH	Methylation	BF ₃ /Methanol, acethyl chloride/ methanol, or HCl/Methanol	-CO-OCH ₃
Acylation	-OH/-NH2	Acetylation	Acetic anhydride	-O-OCOCH3/-NH-OCOCH3
		Pivaloylation	Pivaloyl chloride	-O-OCOC(CH3)3/-NH-OCOC(CH3)3
		Trifluoroacetylation	Trifluoroacetic anhydride	-O-OCOCF ₃ /-NH-OCOCF ₃





Fig. 11. Uncertainty in (a) hydrogen and (b) carbon isotopic compositions of derivatives: the uncertainty is calculated by eq. (3) with determined standard deviation of 3‰ for hydrogen and 0.2‰ for carbon, and N is the number of original hydrogen or carbon atoms

化試薬から新に加わる元素の同位体的な影響は, 式2を用いて補正される。

 $n_{2 \pm k} \delta_{2 \pm k} = n_{4 \pm 3 \oplus \delta} \delta_{4 \pm k} + n_{4 \equiv 3 \pm 4 \& \delta} \delta_{4 \equiv 3 \oplus k}$ 式2 n は測定対象元素の数を、下付文字の"全体"・ "化合物"・"誘導体"は、それぞれ誘導体化後の有 機化合物・誘導体化前の有機化合物・誘導体基を 示す。 $\delta_{2 \pm k}$ が測定で得られるので、 $\delta_{4 \pm 3 \oplus k}$ を求める には、あらかじめ $\delta_{4 \equiv 3 \oplus k}$ を知っておく必要がある。 一般的に、同位体比既知の標準有機化合物を用い て $\delta_{3 \equiv 3 \oplus 4 \oplus k}$ を誘導体化し、得られた測定 値($\delta_{2 \pm k}$)から $\delta_{4 \pm 3 \oplus k}$ を計算するという方法が使わ れることが多い。

誘導体化を用いる上で注意しなければならない ことは、(1)得られる同位体比の精度、(2)誘導 体化に伴う同位体分別,(3)誘導体基に含まれる 元素の3点である。得られる同位体比の精度(σ_化 _{合物})は式3で計算される。

$$\sigma_{\mathrm{\elleh}}^{2} = \sigma_{\mathrm{2}}^{2} \times (n_{\mathrm{2}}^{4}/n_{\mathrm{\elleh}})^{2} + \sigma_{\mathrm{s}}^{2}$$

× $(n_{ 誘導体}/n_{ \ellchw})^2$ 式3

すなわち、得られる同位体比の精度は、目的の有 機化合物に含まれる測定対象の元素の数が少な く、誘導体基に含まれるそれが多いときに、非常 に悪くなる (Fig. 11)。例えば、酢酸 (C₂) をデカ ノール (C₁₀) でエステル化し炭素同位体比を測定 した場合には、測定精度 (σ_{44}) 及び誘導体基の同 位体比の見積もり精度 ($\sigma_{58\%}$) がともに ±0.2‰で あったとしても、得られる酢酸の同位体比の精度 ($\sigma_{11,6\%}$) は ± 1.6‰にもなってしまう。

また誘導体化の反応に同位体分別がある場合 は、補正計算が複雑(ときには困難)になる。例 えば、ヒドロキシル基 (-OH) とカルボキシル基 (-COOH)の反応では、ヒドロキシル基の酸素と カルボキシル基の炭素の結合形成時に同位体効果 があり、一般的に軽い同位体である¹²C・¹⁶Oが優 先的に反応する(Fig. 12)。誘導体化剤が試料に対 して過剰量あり、試料が100%反応すると仮定す ると、カルボン酸をエステル化する場合では、ア ルコールのヒドロキシル基の酸素に同位体分別が 生じ(カルボキシル基の炭素は100%反応するの で、炭素に同位体分別は無い)、アルコールのアセ チル化では、カルボキシル基の炭素に同位体分別 が生じる (アルコールのヒドロキシル基の酸素は 100%反応するので、酸素に同位体分別は無い)。 そのため、炭素同位体比を測定する場合に、カル ボン酸のエステル誘導体化では、式2のδ_{誘導}が定



*Isotope effect is on the carbon of the acid and the oxygen of the alcohol Fig. 12. Isotope effects during ester formation

数として与えられ、アルコールのアセチル誘導体 化では、 $\delta_{istream}$ が変数(反応のフラックスにより変 化する)として与えられる。すなわち後者では、 $\delta_{istream}$ を得るためには、個々の試料におけるアセチ ル化反応のフラックス(誘導体化剤の消費率)を 把握しなければならない。

しかし、例えばアミノ酸のアシル化などでは、 アミノ酸の種類により同位体効果の大きさが異な るうえ、それらは試料中のアミノ酸組成にも依存 する。このような場合に正確なδ_{誘導体}を求めるこ とはもはや困難である(これまで、アミノ酸をア シル化し、GC/IRMSを用いて分子レベル炭素同 位体比分析を行った論文が多数報告されている が、その全てが正確な補正を行っていない)。なお 誘導体化と同位体分別の有無については、Rieley (1994)に良くまとめられているので是非参照し ていただきたい。

誘導体基に水素・炭素・窒素・酸素以外の元素 (例えば, F, S, Si, Cl) が含まれる場合には, GC/ IRMS のトラブルの原因になることが多い。例え ば, フッ素 (F) は燃焼炉の酸化剤 (CuO や NiO) と不可逆的に反応しCuF2 や NiF2 を形成するため, これらの酸化剤の劣化の原因になる。またフッ素 を含む化合物が燃焼すると HF などの腐蝕性の副 生成物が生じ, 燃焼炉の先のキャピラリーを著し く劣化させる。硫黄 (S) は燃焼効率を著しく低下 させ, また燃焼により硫酸を生じる。珪素 (Si) は 燃焼炉内で固体として蓄積するため, 燃焼炉をつ まらせる原因になる。

3.6. GC の条件

3.6.1. 導入法

導入法は,測定対象の有機化合物に応じて様々 なものを用いられており,一般的に,オンカラム 法や PTV 法がよく用いられている。スプリット 法やスプリットレス法は, 沸点の高い高分子化合物を定量的に GC へ導入することが難しいため, 微量試料の高分子化合物の同位体比測定には不向きである。また導入時の同位体分別も否定できない。なお導入法と同位体分別の有無については, Zwank et al. (2003) に良くまとめられているので 是非参照していただきたい。

3.6.2. カラム

分離カラムは、測定対象の有機化合物に応じて 様々なものが用いられており、一般的に、無極性 や微極性の内径 0.32 mm×長さ 30 m もしくは 60 m の低ブリードカラム (例えば、アジレント社製 の HP-1MS や HP-5MS など)で固定相の膜厚が薄 いタイプ (0.1~0.320 m)が用いられる。膜厚の厚 いカラムは、GC オーブ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、反応剤の 著しい劣化の原因になる。また窒素同位体比を測 定する場合には、いくつかのタイプのカラム (例 えば、アジレント社製の HP-FFAP など)では、試 料中の有機化合物と固定相の反応に伴う同位体分 別の可能性があるため注意が必要である。

3.6.3. キャリアーガスの流速

GC/IRMS におけるキャリアーガスの流速は, GC/FID や GC/MS のそれに比べ遅く設定される。 炭素・窒素同位体比を測定する場合には,定流量 設定 (constant flow モード) で $1.0 \sim 1.4$ ml/分 (反 応炉の通過時間で 2,3 秒) 程度,水素同位体比を 測定する場合には, $0.8 \sim 1.0$ ml/分程度に設定され ることが多い。これは燃焼炉や還元炉,または熱 分解炉において十分な反応時間を確保するためで あり,流速が速い場合には(例えば, 2.0ml/分), 有機化合物の CO₂, N₂ または H₂ ガスへの変換効



Fig. 13. Determined δ^{15} N values of amino acid standards (as *N*-pivaloyl/isopropyl ester derivatives) with respect to varying carrier gas flow: dashed lines represent the actual δ^{15} N values and bars represent standard deviations (1 σ) for triplicate analyses

率が著しく低下し,正確な同位体比が得られない (例えば,Fig.13)。一方で,極端に流速を遅くし た場合には(例えば,0.5 ml/分)GC/IRMS装置内 部における様々な接続部やスプリットシステムに おける大気の侵入(リーク)の原因になる。

3.6.4. 昇温プログラム

GC オーブンの昇温プログラムは、測定対象の 有機化合物に応じて様々な設定が用いられ、一般 的に GC/FID や GC/MS のそれと同条件に設定さ れることが多い。しかし、クロマトグラム上での 有機化合物のピーク形状は、急激な昇温プログラ ムで鋭く、緩やかな昇温プログラムで鈍くなる (Fig. 14)。そのため前者では、反応炉への単位時 間あたりの導入量が多くなり、酸化・還元・熱分 解などの反応率が低下する。一方後者では、シグ ナル強度や S/N 比が小さくなり、両者とも測定確 度・精度の低下要因になる。最適な昇温プログラ ムは、測定対象の有機化合物・元素の種類、導入 量により異なり、キャリアーガスの流速にも左右 される。

3.7. 反応炉の温度

反応炉の温度は、有機化合物の CO₂, N₂ また は H₂ ガスへの変換効率を左右する重要なファク



Fig. 14. Relationship between peak form and temperature program on GC

ターである。一般的に、燃焼炉は800~1150℃、 還元炉は550~650℃. 熱分解炉は1400~1500℃ で用いられるが、最適な温度域は測定対象の元 素・有機化合物の種類・キャリアーガスの流速な どにより異なる。例えば、炭素同位体比を測定す る場合は、n-アルカンなどの飽和炭化水素では燃 焼炉を 800~900℃,多環芳香族炭化水素 (PAHs) や炭素数10以下の低分子モノカルボン酸では燃 焼炉を900~1000℃.アミノ酸では燃焼炉を950 ~1050℃・還元炉を550~650℃の範囲に設定さ れることが多い。窒素同位体比を測定する場合 には、不十分な酸化は N2 ガスと同質量の CO ガ スの発生原因となり、過酸化は N2 以外の窒素酸 化物 (NxOy)の発生率を上げ、還元炉におけるこ れらの窒素酸化物の不完全還元の原因となるの で、反応炉の温度設定にとくに注意が必要であ る。Fig. 15 に示すように燃焼炉の温度が低い場合 (<950℃)には、確度・精度の良い同位体比を得 ることはできない。

これらの反応において, CO₂, N₂ または H₂ ガス への変換が定量的であるか (100%進行している か,反応に伴い同位体分別があるか) どうかはよ く議論され,根拠もなく定量的であるとされてい ることが多い。しかし,これらのガス化反応は残 念ながら定量的でない。例えば,水素同位体比の 測定において,メタンやエタンのような熱分解副 産物が観測され,またその生成率は有機化合物の 種類により異なる (Fig. 16)。すなわち,正しい同





位体比を得るためには、これらのガス化反応に伴う同位体分別を適切に補正する必要がある(3.9.2 章参照)。

3.8. 試料量

最適な試料量は、一般的に1化合物・1元素あたり数~数+ナノモルであり、GC/FIDやGC/MSと比較してダイナミックレンジは極端に狭い。とくに、最適試料量域を超えて試料を導入した場合

には、反応炉でのガス化反応が不完全になり、得 られる同位体比の確度・精度が著しく低下する。 また試料導入量とシグナル強度(または、積分値) の関係は、装置の様々な条件や測定対象の元素・ 有機化合物の種類にも左右される。例えば、著者 の研究室では、導入量とシグナル強度の関係は測 定日ごとに変化する (Fig. 17)。GC/IRMS による 分子レベル安定同位体比分析では、 試料に含まれ る有機化合物の量が化合物ごとに異なることが多 いため、測定値の量依存性は、非常に大きな問題 になる。すなわち、正しい同位体比を得るために は、ダイナミックレンジを正確に把握し、最適な 試料量の範囲内で測定する必要がある。ただし、 Fig. 18 のように、測定精度がほとんど変化せず. 得られる同位体比の確度が試料量に依存する場 合(とくに試料の導入量が少ない、または多い場 合など)には、近似式を求めて補正することもで きる (例えば, Schmitt et al., 2003; Zech and Glaser, $2008)_{\circ}$

なお, IRMS 本体の問題として, ガスのイオン 化に伴い得られる同位体比が量依存性を示すこと がある。一般的に最近の装置では, これはフォー カスの調整で解決されるが, イオン源が汚れてき たりするとこの問題が顕著に現れる場合があるの で注意する必要がある。



Fig. 16. Ion currents of (a) hydrogen and (b-e) typical pyrolysis by-products on the hydrogen isotope analysis of *n*-octadecane, *n*-hexadecanoic acid methyl ester, *n*-hexadecanoi acetate, and *n*-heneicosane (furnace temperature of 1440° C)



Fig. 17. Temporal variation of the sensitivity on the hydrogen isotope analysis of *n*-alkane standards in our laboratory

3.9. データの取得とキャリブレーション 3.9.1. データの取得

クロマトグラム上でのピーク(有機化合物)の 検出・積分値の取得・同位体比の計算は、一般的 に、最低強度や単位時間あたりのイオン強度の 変化率(ピークの始まりと終わり)等を指定する ことで、PC ソフトウェアのプログラムにより自 動的に行われる。通常はこのプログラムにより Fig.19a のようにピークが検出され、ピーク全体 の積分が行われる(正確な同位体比を得るために は、必ずピーク全体を積分しなければならない、 3.3 章)。しかし希に、プログラムに頼ると Fig.19b のようにピークの積分が不十分なことや Fig.19c のようにピークの行うウンドが適切でない こともある。それらの際は、マニュアルでピーク の再検出を行う必要がある。

なお、炭素同位体比を測定する場合には、測定 結果として炭素同位体比の他に酸素同位体比も出 力される。この酸素同位体比は、酸化剤由来のも のであり有機化合物の同位体比とはほとんど無関 係であるが、Fig.19aのように化合物ピークの検 出が適切である場合には、同一クロマトグラフ上 にある全ての有機化合物のピークがほとんど同 じ値を持つ(±2‰以内)。酸素同位体比が、他の ピークと大きく異なる値を示す場合は、Fig.19bや



Fig. 18. Schematic illustration of the amount dependence of determined δ values



Fig. 19. Three examples of auto ion peak detections by software programs

Fig.19c のようにピークが不適切に検出されてい ることが多い。言い換えれば、出力された酸素同 位体比の値は、化合物ピークの検出が適切に行わ れているかどうかを知る手がかりになる。

3.9.2 同位体比のキャリブレーション

試料有機化合物の同位体比は,一般的に,同位 体比既知の標準有機化合物を用意し,(1)それら を内部標準として試料と同時に測定する,(2)そ れらの同位体比から標準ガスの同位体比を求め, 標準ガスの同位体比を基に試料有機化合物の同位 体比を測定する,(3)標準ガスの同位体比を測定 し,標準有機化合物の真値と測定値の相関関係 (式)から,試料有機化合物の同位体比を計算す る,のいずれかの手法により決定される。標準有 機化合物は,測定対象の有機化合物と同じのも, またはできるだけ構造が酷似しているものを用い る。これは,GC/IRMS 装置内部での同位体分別

Cn	$\delta^{13}{ m CDual Inlet}^*$ –	Calibration method (1)		Calibration method (2) (Ref. gas = -33.38%)		Calibration method (3) (Ref. gas = 0% with Correlation line)		
		δ^{13} C	Δ^{**}	δ^{13} C	Δ^{**}	$\delta^{13} C_{\text{Ref.gas}=0\%}$	$\delta^{13}C_{Correct}***$	Δ^{**}
15	-27.46	- 27.2	0.2	- 28.1	-0.6	6.4	-27.4	0.1
17	n.d.	-28.7	-	- 29.2	_	5.1	-28.7	_
18	-29.40	-	-	- 29.2	0.2	4.3	- 29.5	-0.1
19	-30.62	- 30.4	0.2	- 30.3	0.4	3.2	- 30.5	0.1
20	-33.30	- 33.1	0.2	- 32.9	0.4	0.5	- 33.2	0.1
21	-28.53	-28.6	-0.0	-28.4	0.1	5.2	- 28.6	-0.1
22	-30.52	- 30.5	0.1	- 30.3	0.2	3.2	- 30.6	-0.0
23	- 29.46	- 29.5	-0.0	- 29.4	0.1	4.2	- 29.6	-0.1
24	- 31.38	-31.1	0.2	- 31.0	0.4	2.6	- 31.2	0.2
25	-28.11	-28.0	0.1	-27.9	0.3	5.8	-28.0	0.1
26	-32.87	- 32.7	0.1	- 32.6	0.3	0.9	- 32.9	-0.0
28	-31.14	-30.8	0.3	- 30.7	0.4	2.8	- 31.0	0.2
30	- 29.61	- 29.6	0.0	- 29.5	0.1	4.1	- 29.7	-0.1
32	- 29.72	- 29.7	-0.3	- 29.6	0.1	4.0	- 29.8	-0.1
33	- 31.25	_	_	- 31.2	0.1	2.4	- 31.4	-0.1
36	-26.16	-26.1	0.1	-26.0	0.2	7.7	- 26.1	0.1

Table 2. δ^{13} C values (‰) of *n*-alkane standards calibrated by different three methods

*: δ^{13} C values of *n*-alkane standards were independently determined by Dual Inlet method with $\sigma < 0.05\%$

** : $\Delta = \delta^{13} C_{GC/IRMS} - \delta^{13} C_{Dual Inlet}$

***: δ^{13} CCorrect=0.99394× δ^{13} CRef.gas=0% - 33.76 (R²=0.997)

が否定できないためである。試料有機化合物と構 造が大きく異なるものを標準有機化合物として用 いる場合には,両者の同位体分別の程度(大きさ) が大きく異なる可能性が高い。

実例として Table 2 に、同位体比既知の *n*-アル カン(炭素数15~36, それぞれ約40 ng/µlの標準 溶液)を測定し、上記の3種のキャリブレーショ ン法により求めた結果を示す。測定元素は炭素, PTV 法で1山を導入. GC カラムはアジレント社製 のHP-1MSを用い、キャリアーガスの流速を1.4ml /分, GC オーブンの昇温条件を 50℃で2 分間保持 後6℃/分で310℃に昇温し10分間保持。燃焼炉 の温度を850℃に設定した。CO2の標準ガスはFig. 20a のように n-アルカンのピークの前後にそれぞ れ3回20秒間ずつ導入した。キャリブレーショ ン (1) については、n-オクタデカン (C_{18}) · n-トリ トリアコンタン (C₃₆) を内部標準として用い、そ の他の*n*-アルカンの同位体比を求めた。キャリブ レーション (2) については、キャリブレーション (1) で得られた標準ガスの同位体比を基に. n-ア ルカンの同位体比を再度計算した。またキャリブ レーション(3)については、標準ガスの同位体比 を0%としてn-アルカンの同位体比を測定し、真 値 (δ¹³C_{Dual Inlet}, Dual Inlet 法により測定) と測定値 (δ¹³C_{Ref gas=0‰})の相関直線 (Fig. 20b) から,再度 n-アルカンの同位体比 (δ^{13} Ccorrect) を計算した。Table 2に示すように、僅かな差ではあるが、得られる 同位体比の確度は、キャリブレーション (3) が最 も高く、キャリブレーション (1)、キャリブレー ション (2) の順に低くなる。

これは同位体比既知の標準有機化合物を測定し ても、真値と得られる同位体比の関係が、必ずし も一対一対応しないこと (Fig. 19bの相関直線の 傾きが 1.0 にならない),及び内部標準の有機化合 物の測定誤差が試料有機化合物の同位体比に加算 されるためである。前者は、IRMSの装置固有の 特性であり、異なる装置は異なる傾きを持つ。ま たこの傾きの大きさは、測定対象の元素・有機化 合物の種類や GC 等の条件などにも依存する。と くに水素同位体比を測定する場合には、有機化合 物の同位体比に依存して H3+の発生率が異なるこ とが、真値と測定値の僅かなズレに大きく寄与し ている (2.2.5 章参照)。すなわち、キャリブレー ション(3)は、前者を補正し、後者(測定誤差)も 複数の標準有機化合物を測定することで平均化し ているため、得られる同位体比の確度が最も高く なる。

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有機化合物の同位体比を測 定する手法も良く用いられているが、これは前述 した有機化合物の GC/IRMS 装置内部での同位体 分別が否定できないため、適切でない。著者らの



Fig. 20. A typical method of isotopic calibration: (a) m/z 44 chromatogram and (b) correlation between δ^{13} C values determined by Dual inlet (vs. PDB) and GC/IRMS (vs. Ref. gas = 0‰) approaches.

経験では、真値と測定値の隔たりは、炭素・窒素 同位体比で5%、水素同位体比で50%にもなるこ とがある。この手法を用いる場合には、同位体比 既知の標準物質(測定対象の有機化合物と同じも の)を用いて、測定される同位体比の確度・精度 を必ず確認し、適切な較正を行う必要がある。

3.9.3. 測定値の経時変化と補正

連続的に長時間の分析を行う場合には、測定値 が経時変化を示すことがある。これは、注入口や GC カラム内部に汚れが蓄積し、また反応剤の消 耗や様々な接続部での微少なリークの発生など、 試料の連続測定に伴い GC/IRMS 装置内部の状態 が変化することに起因する。通常、10~20 試料程 度の連続分析では、得られる同位体比に有意な差 は見られないが、導入する有機化合物の量が多い 場合や. とくに GC オーブンを高温(300 度~350 度)にして使用する場合には、数試料の分析でも 注意が必要である。そのため、数試料毎に同位体 比既知の標準有機化合物を測定し、得られる同位 体比が適切であるかを確認する必要がある。例え ば、著者らの研究室では、おおむね5~8 試料毎に 標準有機化合物を測定し、得られた同位体比の妥 当性を確認するとともに、一つのシークエンス内 で測定した全ての標準有機化合物を用いて、3.9.2 章のキャリブレーション (3) の真値 - 測定値の相 関直線を作り、 試料の同位体比を求めている (こ れにより、シークエンス分析中の僅かな経時変化 を平均化することができる)。また、標準有機化合 物の同位体比が有意に変化した場合には、最後に 正しい値が得られた標準有機化合物以降の測定結 果は全て破棄し、GC/IRMS をメンテナンスした

後(4章参照),再度測定を行っている。

3.10. 測定に必要な条件のまとめ

誰でも比較的簡単に扱える GC/FID や GC/MS での定量・定性分析とは異なり,GC/IRMS での 分子レベル安定同位体比分析には、本稿で記載し たように様々な最適化が必要である。しかし、最 適化されていない条件で分析しても、測定は行わ れ、同位体比として妥当そうな数値が出力されて しまう。そのため、誤ったデータやそれに基づく 誤った解釈が行われ、それらの結果が国際論文に 掲載されていることも少なくない。正しい考察・ 結論を導くためには、適切な測定法で、確度・精 度の高いデータを出す必要がある。

GC/IRMS を用いて有機化合物の安定同位体比 を精度・確度良く測定する最も確実な方法は、同 位体比既知の標準有機化合物(測定対象の化合物 と同じもの)を用いて、GC カラム・キャリアーガ スの流速・昇温プログラム、反応炉の温度、試料 導入量を最適化し、その後、最適化した測定条件 を用いて試料を測定することである。その際も、 数試料毎に標準有機化合物を測定し、GC カラム や酸化剤や還元剤の劣化を常にモニターする必要 がある。試料は、測定対象の有機化合物がクロマ トグラム上で完全にベースライン分離するものを 準備しなければならない。また、誘導体化を用い る場合には、得られる同位体比の精度や同位体分 別にも充分な注意を払わなければならない。

4. トラブルの発見と対処

全ての測定機器で起こりうる問題であるが, GC/IRMSにおいても使用に伴い様々なトラブル が起こる。著者らの経験では、日常のトラブルの 多くは、接続部でのリークやGCカラム・反応炉 の劣化に起因することが多く、最適な条件で測定 を行っていても、ピーク強度の低下や正しい同位 体比が得られないなどの問題を生じる。しかし、 日常の測定において、装置の状態やスタンダード などの分析結果を記録し、それらの経時変化を捉 えていれば、多くの場合において、トラブルの兆 候を早期に発見し適切な対処を行うことができ る。以下に著者らの研究室で用いている代表的な チェック項目を列挙したので、参考にして頂きたい。

- 1.装置の状態を把握する
 - (a) IRMS の真空度
 - (b) 各接続部でのリーク
 - (c) バックフラッシュが"open"または "close"時でのm/z 18 (H₂O), 28 (N₂), 32 (O₂), 40 (Ar), 44 (CO₂)のバックグ ラウンド強度
 - (d) バックフラッシュ出口での流量
 - (e) H₃ファクターの値
 - (f) GC 注入口の状態(セプタムの劣化,ガ ラスライナーの汚れ)
 - (g) 各接続部での流量(リークの部位が特定 できない場合に,各接続部を一つずつ開 けて適切な流量であるかを確認する)
- 2. クロマトグラム上のピーク形状・強度を確認 する
 - (a) リテンションタイムの遅れ (GC 注入口 でのリーク)
 - (b) 低分子側の強度の低下(GC 注入口・注入 口と GC カラムの接続部でのリーク)
 - (c) 高分子側の強度の低下(バックフラッシュ装置・GCカラム後半部での分岐部・GCカラムと反応炉の接続部でのリーク)
 - (d) 低分子・高分子の中間域での強度の低下(燃焼炉内でのグラファイト化)
 - (d) 低分子から高分子までの全体的な強度の 低下(GC 注入口・GC 出口~スプリッ トシステム間でのリーク,酸化剤・グラ ファイトコーティングの劣化)
 - (e) テーリング (GC カラム・酸化剤・グラ ファイトコーティングの劣化)
 - (f) 水素同位体比測定において、ピーク形状が Fig. 21 のようになる (グラファイト コーティングの劣化)
 - (g) 定期的なスパイク信号の出現(イオン ソースの汚れ)
- 3. 同位体比を確認する
 - (a)標準ガス断続導入時(ON/OFFテスト時)の値のバラツキ(ボンベ開栓後十分に時間が経った状態で,水素同位体比で±1‰,炭素同位体比で±0.1‰,窒素同位体比で±0.1‰値以上の変動が見られ





る場合には、ボンベ~ IRMS 導入口間で のリーク、イオンソースの汚れ)

- (b) 炭素同位体比のプラス側へのシフト(イ オンソースへの水の付着,透水フィル ターの劣化)
- (c)炭素同位体比のマイナス側へのシフト
 (含窒素化合物の場合には、還元剤の劣化)
- (d) 窒素同位体比測定時に m/z 30 (NO)の
 ピーク強度の増加(還元剤の劣化)

5.あとがき:

分子レベル安定同位体分析の現状と今後

有機化合物の安定同位体比は、分子構造(機能) やその化合物に特有の生物化学的プロセス(合 成・代謝・分解など)と密接にリンクした情報が 得られる。例えば、分子構造が全く同じ有機化合 物であっても、異なる材料や合成系により作られ たものの同位体比は、材料の同位体比や合成系を 反映して異なる値を持つ。陸上植物には光合成時 の炭素固定メカニズムの異なる C3 植物や C4 植 物などが存在し、それらの炭素同位体比は炭素固 定メカニズムの違いを反映して異なる値を持つ (Fig. 22)。そのため、海洋・湖沼堆積物や土壌な どに含まれている陸上植物バイオマーカー (炭素 数25~33の長鎖 n-アルカンなど)の炭素同位体比 を測定すれば、それらがC3植物に由来するかC4 植物に由来するか(またはその混合率)を容易に 知ることができる(例えば, Bird et al., 1995; Huang et al., 2000; Schefuß et al., 2003; Makou et al., 2007). 海洋に住むバクテリアやアーキアは二酸化炭素 (または藻類の光合成により作られた有機物)や



Fig. 22. Carbon isotopic composition of plant lipids and pigments (after Deines, 1980: Collister et al., 1994: Ballentine et al., 1994; Conte et al., 2003: Chikaraishi et al., 2004a, 2005a; Bi et al., 2005; Chikaraishi and Naraoka, 2007)



Fig. 23. Carbon isotopic composition of bacterial and archaea lipids (after Schoell et al., 1994; Hinrichs et al., 2000; Pancost and Sinninghe Damsté 2003: Werne and Sinninghe Damsté, 2005)

メタンなどの様々な炭素源を利用して生きてお り、その炭素同位体比は炭素源の同位体比を強く 反映する (Fig. 23)。そのため、海洋堆積物中に 見つかる彼らのバイオマーカー (ホパン化合物や エーテル脂質など)の炭素同位体比は、彼らがど のような環境で生きていたか (そこにどのような 環境があったか)を知るうえで優れた指標になる (例えば, Hinrichs et al., 2000; Pancost and Sinninghe Damsté 2003; Werne and Sinninghe Damsté, 2005; Bouloubassi et al., 2006)。一つの化合物について複 数の元素の安定同位体比を測定することで、より 詳細な起源解析も可能になる。例えば、植物や藻 類に含まれているシトステロールの炭素・水素同 位体比は、C3 植物・C4 植物・藻類の3 者間で明 確に異なる (Fig. 24)。そのため、海洋・湖沼堆積 物中に見つかるシトステロールの炭素・水素同位 体比を測定することで、 三者間の混合率を見積も ることができる (Chikaraishi et al. 2005b)。

また、異なる生物化学的プロセスを受けている



 δ^{13} C (‰ vs PDB)

Fig. 24. Carbon and hydrogen isotopic compositions of sitosterol in C3 and C4 plants, and algae: (a) Northwestern Pacific Ocean (Chikaraishi et al., 2005b) and Lake Haruna, Japan (Chikaraishi and Naraoka, 2005; Chikaraishi et al., 2007a)

複数の有機化合物の安定同位体比を比較すること で、あらたな情報を得ることもできる。例えば、 動物のアミノ酸代謝において、非必須(可欠)ア ミノ酸の一つであるグルタミン酸の最初の代謝プ ロセスは、アミノ基転移反応(脱アミノ化)であ り、一方、必須(不可欠)アミノ酸の一つである フェニルアラニンのそれは、水酸基付加反応 (チ ロシンの合成) である。そのため、動物に含まれ るグルタミン酸・フェニルアラニンの窒素同位体 比は、餌の同位体比にそれぞれの代謝プロセスの 同位体分別(グルタミン酸が+8.0%。フェニルア ラニンが+0.4‰)を加えた値になる。すなわち. 動物に含まれるこれら二つのアミノ酸の窒素同位 体比を比較することで、動物の栄養段階 (Trophic Level)や、その動物が属する生態系の一次生産 者の窒素同位体比を知ることができる (Fig. 25, McClelland and Montoya, 2002; Chikaraishi et al., 2007b; 力石ら 2007)。

このように、有機化合物の分子レベル安定同位 体比分析は、試料に含まれる様々な情報から、特 定の情報を選択的に精度良く抽出することができ る優れた手法である。しかし、全ての有機化合 物についての最適条件が明らかになっているわけ ではなく、信頼性・再現性の得られる測定法が確 立していない有機化合物も多い。例えば、アミ ノ酸の炭素同位体比を GC/IRMS で正しく(0.5~





1.0‰以内の誤差で)測定する方法は,誘導体化に おける同位体分別を適切に補正することができな いため,現時点ではまだ確立していない。そのた め,一方で,分析技術の新規開発や改良も世界 中で積極的に行われており,誘導体化に伴う諸問 題(3.5章)の改善や,従来は測定が困難であった 有機化合物の同位体比も測定されるようになりつ つある。例えば,酢酸やプロピオン酸などの低分 子カルボン酸の分子レベル安定同位体比分析にお いて,炭素数の大きなアルコールによる誘導体化



Fig. 26. A GC/FID chromatogram of carboxylic acids (as underivatized free form) extracted from the Murchson meteorite (HP-FFAP GC column, Oba and Naraoka, 2006a)

は、得られる同位体比の精度を著しく低下させる 主因であった。しかし、極性カラム (アジレント 社製の HP-FFAP やスペルコ社製の Nikol などの ポリエチレングリコール系極性カラム)を用いる ことで、これらの低分子カルボン酸を誘導体化せ ずに GC に導入し、同位体比を測定することが可 能になった (Fig. 26, Huang et al., 2005, 2007; Oba and Naraoka, 2006a)。クロロフィルやポルフィリ ンなどのテトラピロール化合物は、その高分子構 造および強い芳香属性によりこれまで GC/IRMS での同位体比測定ができなかった。しかし、同位 体比測定前の前処理にテトラピロール骨格のモ ノピロール化 (マレイミド化) を行うことで、GC /IRMS による窒素同位体比測定が可能になった (Fig. 27, Chikaraishi et al., 2008)。アミノ酸の炭素 同位体比測定においても、誘導体により加わる炭 素数を最小限にとどめ、かつ誘導体化に伴う同位





Fig. 27. (1) Chemical degradation of chlorophyll *a* (tetrapyrrol) into maleimides (monopyrroles) and (b) its *m*/z 28 chromatogram on GC/IRMS analysis (Chikaraishi et al., 2008): abbreviation, dihydrohematic acid methylester (DHAM), 2-ethyl-3-methylmaleimide (EMM), hematic acid methylester (HAM), 2-methyl-3-oxycarbonyl maleimide (MOM) and 2-methyl-3-vinyl maleimide (MVM)

体分別を補正する試みがなされている (Corr et al., 2007a, b)

また、とくにこの数年間においては、GC/IRMS またはその改良機器を用いた有機化合物の分子 内安定同位体比分析 (site-specific または positionspecific isotope analysis, Corso and Brenna, 1997; Dias et al., 2002a, 2002b; Yamada et al., 2002; Wolyniak, et al., 2005, 2006; Oba and Naraoka, 2006a) や. 前処 理装置に高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用 いた HPLC/IRMS による有機化合物の分子レベ ル安定同位体比分析 (Heuer et al., 2006; McCllagh et al., 2006, 2008) も行われている。例えば、熱分 解によるカルボニル基の脱炭酸反応を利用するこ とで、カルボン酸のカルボキシル基のみの炭素同 位体比を測定することができる (Oba and Naraoka, 2006b)。酢酸の場合には、あらかじめ酢酸全体の 炭素同位体比(δ¹³C 酢酸)を測定しておき、次にカ ルボキシル基の炭素同位体比(δ¹³C_{カルボキシル基})を 測定すれば、式4より、

今後,有機化合物の分子レベル安定同位体比分 析法は,様々な分野で重要な研究ツールの一つと して,ますます積極的に使われていくであろう。 著者らは,それらの研究において,有機化合物の 同位体比が適切な測定法により確度・精度良く測 定される(確度や精度がしっかりと把握・管理さ れた状態で測定される)こと,そしてそれにより 正しい考察・結論が導かれることを切望している。 それらの研究に本稿が少しでも貢献出来れば幸い である。

謝 辞

著者らが分子レベル安定同位体比分析法を習得 するにあたり,奈良岡浩教授(九州大学)・Simon R. Poulson 助教授(ネバダ州立大学)・大河内直彦 博士(海洋研究開発機構)には,非常に熱心なご 指導をいただきました。心より厚く御礼申し上げ ます。本稿の執筆において,サーモフィッシャー サイエンティフィック株式会社の大堀基己氏には GC/IRMSのメーカーエンジニアとしての立場か ら,九州大学大学院の金子雅紀氏にはGC/IRMS のユーザーとしての立場から,森永製菓株式会社 の岡田英樹氏には一般的な科学分析機器のユー ザーとしての立場から様々なアドバイス・助言を 頂きました。記して厚く感謝致します。

引用文献

- Abelson P. H. and Hoering T. C. (1961) Carbon isotopic fractionation in formation of amino acids by photosynthetic organisms. *Proc. Nat. Acd. Sci. USA* 47, 623-632.
- Aguilar-Cisneros B. O., López M. G., Richling E., Heckel, F. and Schreier P. (2002). Tequila authenticity assessment by headspace SPME-HRGC-IRMS analysis of ¹³C/¹²C and ¹⁸O/¹⁶O ratios of thanol. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 7520-7523.
- Ballentine D. C., Macko S. A. and Turekian V. C. (1998)
 Variability of stable carbon isotopic compositions in individual fatty acids from combustion of C4 and C3 plants: implications for biomass burning. *Chem. Geol.* 152, 151-161.
- 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.
- Bird M. I., Summons R. E., Gagan M. K., Roksandic Z., Dowling L., Head J., Fifield L. K., Cresswell R. G. and Johnson D. P. (1995) Terrestrial vegetation change inferred from *n*-alkane δ^{13} C analysis in the marine environment. *Geochim. Cosmochim. Acta* **59**, 2853-2857.
- Bouloubassi I., Aloisi G., Pancost R. D., Hopmans E., Pierre C. and Sinninghe Damsté J. P. (2006) Archaeal

and bacterial lipids in authigenic carbonate crusts from eastern Mediterranean mud volcanoes. *Org. Geochem.* **37**, 484-500.

- Brand W. A. (1996) High precision isotope ratio monitoring techniques in mass spectrometry. J. Mass Spectrom. 31, 225-235.
- Brand, W. A, Tegtmeter A. and Hilkert A. (1994) Compound-specific isotope analysis: extending toward ¹⁵N/¹⁴N and ¹⁸O/¹⁶O. Org. Geochem. 21, 585-594.
- Burgoyne T. W. and Hayes J. M. (1998) Quantitative production of H₂ by pyrolysis of gas chromatographic effluents. *Anal. Chem.* **70**, 5136-5141.
- Calderone G., Reniero F. and Guillou C. (2006) Isotopic analysis of ethanol: study on ¹⁸O/¹⁶O measurement using a high-temperature pyrolysis system coupled to an isotope ratio mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20**, 937-940.
- Chikaraishi Y. (2006) Carbon and hydrogen isotopic composition of sterols in natural
- marine brown and red macroalgae and associated shellfish. *Org. Geochem.* **37**, 428-436.
- 力石嘉人 (2007) 脂質・色素分子の安定水素同位体 組成 Res. Org. geochem. 21, 1-18.
- 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) δ^{13} C and δ D 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) δ^{13} C and δ D 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) 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. (2004b)

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. (2007a) Sources and transformation processes of pheopigments: Carbon and hydrogen isotopic evidence from Lake Haruna, Japan. Org. Geochem. 38, 985-1001.
- Chikaraishi Y., Kashiyama Y., Ogawa N.O., Kitazato H. and Ohkouchi N. (2007b) 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.
- カ石嘉人・柏山祐一郎・小川奈々子・大河内直 彦(2007) 生態学指標としての安定同位体: アミノ酸の窒素同位体比分析による新展開 *Radioisotopes* 56, 436-477.
- Chikaraishi Y., Kashiyama Y., Ogawa N.O., Kitazato H., Satoh M, Nomoto S. and Ohkouchi N. (2008). A compound-specific isotope method for measuring the stable nitrogen isotopic composition of tetrapyrroles. *Org. Geochem.* **39**, 510-520.
- Collister J. W., Rieley G., Stern B., Eglinton G. and Fry B. (1994) Compound-specific δ^{13} C analyses of leaf lipids from plants with differing carbon dioxide metabolisms. *Org. Geochem.* **21**, 619-627.
- Conte M. H., Weber J. C., Carlson P. J. and Flanagan L. B. (2003) Molecular and carbon isotopic composition of leaf wax in vegetation and aerosols in a northern prairie ecosystem. *Oecologia* 135, 67-77.
- Corr L. T., Berstan R. and Evershed R. P. (2007a) Optimisation of derivatisation procedures for the

determination of δ^{13} C values of amino acids by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21**, 3759–3771.

- Corr L. T., Berstan R. and Evershed R. P. (2007b) Development of *N*-acetyl methyl ester derivatives for the determination of δ^{13} C values of amino acids using gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry. *Anal. Chem.* **79**, 9082-9090.
- Corso T. N. and Brenna J. T. (1997) High-precision position-specific isotope analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 1049-1053.
- Dawson T.E. and Siegwolf R. T. W. (2007) *Stable Isotopes as Indicators of Ecological Change. Elsevier.*
- Deines P. (1980) The isotope composition of reduced organic carbon. *Handbook of Environmental Isotope Geochemistry, The Terrestrial Environment, A*, pp 329-406, Elsevier.
- Dias R. F., Freeman K. H. and Franks S. G. (2002a) Gas chromatography–pyrolysis–isotope ratio mass spectrometry: a new method for investigating intramolecular isotopic variation in low molecular weight organic acids. Org. Geochem. 33, 161-168.
- Dias R. F., Freeman K. H., Lewan M. D. and Franks S. G. (2002b) δ^{13} C of low-molecular-weight organic acids generated by the hydrous pyrolysis of oil-prone source rocks. *Geochim. Cosmochim. Acta* **66**, 2755-2769.
- Flenker U., Hebestreit M., Piper T., Hülsemann F. and Schänzer W. (2007) Improved performance and maintenance in gas chromatography/isotope ratio mass spectrometry by precolumn solvent removal. *Anal. Chem.* **79**, 4162-4168.
- Fry B (2006) Stable isotope ecology. Springer.
- Fuller M. and Huang Y. (2003) Uuantifying hydrogendeuterium exchange of meteoritic dicarboxylic acids during aqueous extraction. *Meteor. Planet. Sci.* 38, 357-363.
- Gaebler O. H., Choitz, H. C., Vitti, T. G. and Vukmirovich R. (1963) Significance of N¹⁵ excess in nitrogenous compounds of biological origin. Can. J. Biochem. Physiol. 41, 1089-1097.

- Gremaud G., Piguet C., Baumgartner M., Pouteau E., Decarli B., Berger A. and Fay L. B (2001) Simultanous assessment of cholesterol absorption and synthesis in humans using online gas chromatography/combustion and gas chromatography/pyrolysis/isotope-ratio mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **15**, 1207-1213.
- Grice K., de Mesmay R., Glucina A. and Wang S. (2008) An improved and rapid 5A molecular sieve method for gas chromatography isotope ratio mass spectrometry of *n*-alkanes (C8–C30+). Org. Geochem. **39**, 284-288.
- Hayes J. M. (2001) Fractionation of carbon and hydrogen isotopes in biosynthetic processes. *Rev. Mineral. Geochem.* 43, 225-277.
- Hayes J. M., Freeman K. H., Popp B. N. and Hoham C. H. (1990) Compound-specific isotopic analyses: A novel tool reconstruction of ancient biogeochemical processes. *Org, Geochem.* 16, 115-1128.
- Heuer V., Elvert M., Tille S., Krummen M., Prieto Mollar X., Hmelo L. R. and Hinrichs K.-U. (2006) Online δ^{13} C analysis of volatile fatty acids in sediment/porewater systems by liquid chromatography–isotope ratio mass spectrometry. *Limnol. Oceanogr.: Methods* **4**, 346-357.
- Hilkert A. W., Doutitt 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. Spectrum.* 13, 1226-1230.
- Hinrichs K.-U., Summons R. E., Orphan V., Sylva S. P. and Hayes J. M. (2000) Molecular and isotopic analysis of anaerobic methane-oxidizing communities in marine sediments. *Org. Geochem.* **31**, 1685-1701.
- Huang Y., Dupont L., Sarnthein M., Hayes J. M. and Eglinton, G. (2000) Mapping of C4 plant input from North West Africa into North East Atlantic sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* 64, 3505-3513.
- HuangY., WangY., 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.

- 駒津美都紀・奈良岡浩・石渡良志 (1999) 堆積物 中の直鎖および環状脂肪酸の尿素アダクトによ る分離と炭素同位体比測定への応用 Res. Org. Geochem. 14, 27-32.
- Leckrone K. J. and Hayes J M. (1997) Efficiency and temperature dependence of water removal by membrane dryers. *Anal. Chem* **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.
- Lichtfouse E. (2000) Compound-specific isotope analysis. Application to archaelogy, biomedical sciences, biosynthesis, environment, extraterrestrial chemistry, food science, forensic science, humic substances, microbiology, organic geochemistry, soil science and sport. *Rapid Commun. Mass. Spectrum.* 14, 1337-1344.
- Makou M. C., Hughen K. A., Xu L., Sylva S. P. and Eglinton T. (2007) Isotopic records of tropical vegetation and climate change from terrestrial vascular plant biomarkers preserved in Cariaco Basin sediments. Org. Geochem. 38, 1680-1691.
- McClelland J. W. and Montoya J. P. (2002) Trophic relationships and the nitrogen isotopic composition of amino acids in plankton. *Ecology* **83**: 2173-2180
- McCullagh J. S. O., Juchelka D. and Hedges R. E. M. (2006) Analysis of amino acid ¹³C abundance from human and faunal bone collagen using liquid chromatography/isotope ratio mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20, 2761–2768.
- McCullagh J. S. O., Gaye-Siessegger J. and Focken U. (2008) Determination of underivatized amino acid δ^{13} C by liquid chromatography/isotope ratio mass spectrometry for nutritional studies: the effect of dietary non-essential amino acid profile on the isotopic signature of individual amino acids in fish. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22, 1817–1822.
- Meier-Augenstein W. (1999) Applied gas chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **842**, 351-371.
- Merritt D. A. and Hayes J. M. (1994) Nitrogen

isotopic analyses by isotope-ratio-monitoring gas chromatography/mass spectrometry. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 5, 387-397.

- Michener R. and Lajtha K. (2007) *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science*. Backwell Publishing
- 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. (2006a) Carbon isotopic composition of acetic acid generated by hydrous pyrolysis of macromolecular organic matter from the Murchison meteorite. *Meteor. Planet. Sci.* **41**, 1175-1181.
- Oba Y. and Naraoka H. (2006b) Site-specific carbon isotope analysis of aromatic carboxylic acids by elemental analysis/pyrolysis/isotope ratio mass spectrometry *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20**, 3649-3653.
- Oba Y. and Naraoka H. (2008) Carbon and hydrogen isotopic fractionation of low molecular weight organic compounds during ultraviolet degradation. *Org. Geochem.* **39**, 501-509.
- Pancost R. D. and Sinninghe Damsté J. P. (2003) Carbon isotopic compositions of prokaryotic lipids as tracers of carbon cycling in diverse settings. *Chem Geol.*, 195, 29-58.
- 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* **199**, 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
- Santrock J., Studley S. A. and Hayes J. M. (1985) Isotopic analysis based on the mass spectrum of carbon dioxide. *Anal. Chem.* **57**, 1444-1448.
- Schefuß E., Schouten S, Fred Jansen J. H. and

Sinninghe Damsté J. S. (2003) African vegetation controlled by tropical sea surface temperatures in the mid-Pleistocene period. *Nature* **422**, 418-421.

- Schmitt J., Glaser B. and Zech W. (2003) Amountdependent isotopic fractionation during compoundspecific isotope analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17, 970-977.
- Schoell M., Hwang, R. J., Carlson R. M. K. and Welton J. E. (1994) Carbon isotopic composition of individual biomarkers in gilsonites (Utah). *Org. Geochem.***21**, 673-683.
- Sessions A. L. (2006) Isotope-ratio detection for gas chromatography. J. Sep. Sci. 29, 1946-1961.
- Sessions A. L., Burgoyne T. W. and Hayes J. M. (2001a) Correction of H₃⁺ contributions in hydrogen isotope ratio monitoring mass spectrometry. *Anal. Chem.* 73, 192-199.
- Sessions A. L., Burgoyne T. W. and Hayes J. M. (2001b) Determination of the H₃ factor in hydrogen isotope ratio monitoring mass spectrometry. *Anal. Chem.* 73, 200-207.
- Werne J. P. and Sinninghe Damsté J. S. (2005) Mixed sources contribute to the molecular isotopic signature of methane-rich mud breccia sediments of Kazan mud volcano (eastern Mediterranean). Org. Geochem. 36, 13-27.
- Wolyniak C. J., Sacks G. L., Pan B. S. and Brenna J. T. (2005) Carbon position-specific isotope analysis of alanine and phenylalanine analogues exhibiting nonideal pyrolytic fragmentation. *Anal. Chem.* 77,

1746-1752.

- Wolyniak C. J., Sacks G. L., Metzger S. K. and Brenna J. T. (2006) Determination of intramolecular δ^{13} C from incomplete pyrolysis fragments. evaluation of pyrolysis-induced isotopic fractionation in fragments from the lactic acid analogue propylene glycol. *AnalChem.* **78**, 2752-2757.
- 山田桂太・鵜崎実・今亮人・奈良岡浩・石渡良志 (1994) 原油中の個別長鎖 n-アルカンの安定炭 素同位体分析のためのモレキュラーシーブ分離 法の検討 J. Mass Spectorm. Soc. Jpn. 42, 237-246.
- Yamada K. Tanaka, M., Nakagawa F. and Yoshida N. (2002) On-line measurement of intramolecular carbon isotope distribution of acetic acid by continuous-flow isotope ratio mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16, 1059-1064.
- Yamada K., Yoshida N., Calderone G. and Guillou C. (2007) Determination of hydrogen, carbon and oxygen isotope ratios of ethanol in aqueous solution at millimole levels. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21, 1431-1437.
- Zech M. and Glaser B. (2008) Improved compoundspecific δ^{13} C analysis of n-alkanes for application in palaeoenvironmental studies. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **22**, 135-142.
- Zwank L., Berg M., Schmidt T. C. and Haderlein S. B. (2003) Compound-specific carbon isotope analysis of volatile organic compounds in the low-microgram per liter range. *Anal. Chem.* **75**, 5575-5583.