

## 微量有機化合物の水素同位体比測定法\*

力石嘉人\*\*

(2009年4月7日受付, 2009年8月31日受理)

### Abstract

After the development of compound-specific isotope analysis (CSIA) by gas chromatograph/pyrolysis/isotope ratio mass spectrometer (GC/pyrolysis/IRMS) in the end of the 1990s, stable hydrogen isotopic composition of organic compounds has been employed 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 as a potential proxy for reconstructing paleoclimatic, paleohydrological, and paleosalinity changes. However, sample amount required for accurate and precise determination of the isotopic composition is generally 10-50 nmol H for each compound, which is much larger than that of stable carbon (0.1-5 nmol C) and nitrogen (1-10 nmol N) on the isotope analysis by gas chromatograph/combustion/isotope ratio mass spectrometer (GC/combustion/IRMS). Here, I demonstrate the performance of GC/pyrolysis/IRMS on the small amount of samples, and suggest a mathematical correction for preventing systematic errors in the measured isotopic composition due to different sample amounts. By using this correction, the hydrogen isotopic composition of organic compounds can be determined with a standard deviation ( $1\sigma$ ) of better than 7‰ on the sample amount of 4 nmol H and even 13‰ on the sample amount of 2 nmol H. This correction thus allows us easy access to the hydrogen isotopic composition of organic compounds containing with small concentration in samples.

### 1. はじめに

かつて有機物の分子レベル安定水素同位体比(D/H)分析は、高度な技術と経験を持つごく一部の科学者だけが扱える特殊な手法であった。しかし近年の技術発展、すなわち、ガスクロマトグラフ/熱分解/同位体比質量分析計(gas chromatograph/pyrolysis/isotope ratio mass spectrometer, GC/pyrolysis/IRMS) (Burgoyne and Hayes, 1998; Hilkert et al., 1999) の開発・普及により、現在では誰にでも扱える一般的な手法になった。この手法は、揮発性の有機化合物(または誘導体化などにより

揮発性を獲得できる有機化合物)であれば、試料(溶媒抽出液)中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水素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。一般的に、測定に必要な試料量は1化合物あたり水素量で10~50 nmolであり、 $1\sigma$ で4~7‰の精度で測定される(Sessions, 2006)。測定に要する時間は1試料あたり数十分~1時間程度である。GC/pyrolysis/IRMSの登場により、有機化合物の分子レベル安定水素同位体比分析は世界中に爆発的に広がり、今日では有機地球化学をはじめとする様々な研究分野の研究に広く用いられるよ

\*Compound-specific stable hydrogen isotope analysis of small amount of organic compounds

\*\*独立行政法人海洋研究開発機構, 海洋・極限環境生物圏領域, 〒237-0061 神奈川県横須賀市夏島町2-15  
Yoshito Chikaraishi: Institute of Biogeosciences, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology 2-15  
Natsushima-cho, Yokosuka, 237-0061, Japan  
e-mail: ychikaraishi@jamstec.go.jp, Tel: 046-867-9778, Fax: 046-867-9775

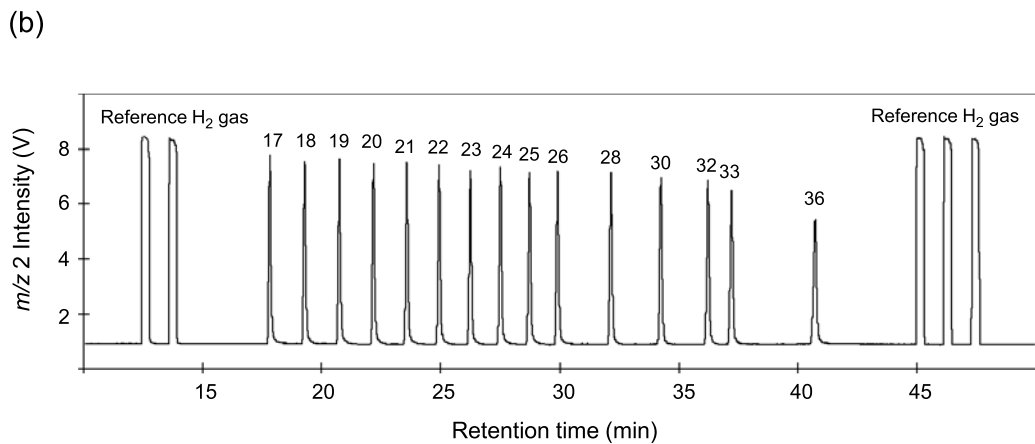
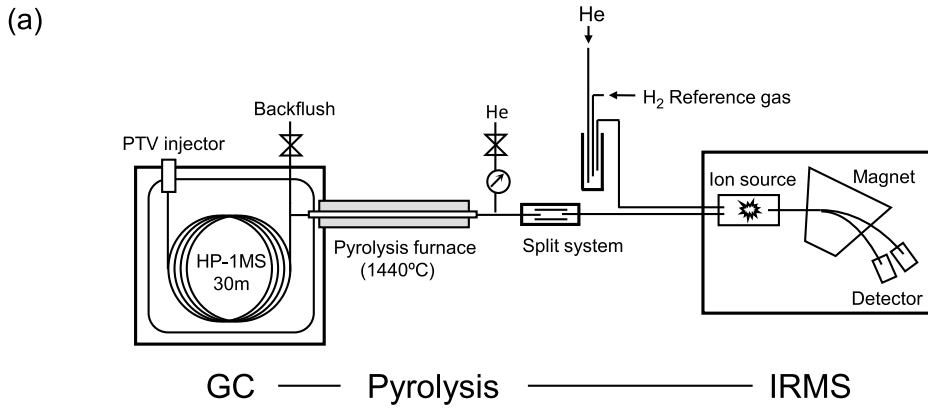


Fig. 1. Schematic of (a) GC/pyrolysis/IRMS used in the present study and (b) its  $m/z$  2 chromatogram of  $n$ -alkane standards.

うになった (例えば, 力石, 2007)。

しかし, この GC/pyrolysis/IRMS による分子レベル水素同位体比分析法は, ガスクロマトグラフ/燃焼/同位体比質量分析計 (gas chromatograph/combustion/isotope ratio mass spectrometer, GC/combustion/IRMS) を用いた分子レベル安定炭素・窒素同位体比分析法 (Hayes et al., 1990; Merritt and Hayes, 1994) と比較して, 測定に必要な試料量が多い (例えば, 力石 and 大場, 2008)。これはとくに, 土壌や堆積物などの地球環境試料や炭素質隕石などの地球外試料に含まれているごく微量の有機化合物を分析する上で, 非常に大きな障害になる。一般的に GC/combustion/IRMS では, 炭素同位体比については, 炭素量で 0.1 ~ 5 nmol あれば  $1\sigma$  で 0.1 ~ 0.3‰ の精度で測定され, また窒素同位体

比については, 窒素量で 1 ~ 10 nmol あれば  $1\sigma$  で 0.3 ~ 1.0‰ の精度で測定される (Sessions, 2006)。例えば, 著者の研究室では, 直鎖脂肪酸 (炭素数 14 から 34 程度) の同位体比を測定する場合に, 炭素同位体比では 1 化合物あたり 5ng (炭素量で, 約 0.3 nmol) 程度あれば  $1\sigma$  で 0.3‰ の精度で測定できるが, 水素同位体比では (本稿で述べる補正法を使わない場合には)  $1\sigma$  で 5‰ 程度の精度を得るためには, 1 化合物あたり 120ng (水素量で, 約 15 ~ 16 nmol) 程度が必要になる。

そこで本稿では, GC/pyrolysis/IRMS を用いた水素同位体比測定において, 微量の有機化合物を分析する際の同位体比の変動を示し, 少量の試料でも精度・確度の良い同位体比を得るための補正法を提案する。

## 2. 測定機器と試料

### 2.1. 安定同位体比の定義

安定水素同位体比は、国際標準物質である標準平均海水 (Standard Mean Ocean Water, SMOW, D/H=0.0001576) のそれに対する千分偏差 ( $\delta D$  値, 単位: ‰, パーミル) で定義される (式 1)。

$$\delta D \text{ 値} = \left[ \frac{R_{\text{試料}}}{R_{\text{SMOW}}} - 1 \right] \times 1000 \text{ (‰, vs SMOW)} \text{ (式 1)}$$

R は同位体存在比率 (D/H) を示し、例えば、D/H=0.00015732 の試料の場合には、SMOW との D/H の差 (+0.00000156) は、 $\delta D=+10\text{‰}$  と表される。試料の  $\delta D$  値が正であれば、SMOW と比較して重水素 (D) に富む (同位体的に重い) ことを示し、負であれば軽水素 (H) に富む (同位体的に軽い) ことを示す。

### 2.2. GC/pyrolysis/IRMS

GC/pyrolysis/IRMS は、Agilent Technologies 社製の 6890N GC に Thermo Fisher Scientific 社製の GC-C/TC III interface と DELTAplusXP IRMS がオンラインで接続されたもので、GC の導入口に Gerstel 社製の PTV (programmed temperature vaporization, 温度プログラム気化) 導入法を、GC カラムに、Agilent Technologies 社製の HP-1MS (長さ 30m×外径 0.32mm×膜厚 0.1 $\mu$ m) を使用した (概略図を Fig. 1a に示す)。GC オープンの昇温条件は、50℃で 2 分間保持後 6℃/分で 310℃に昇温し 10 分間保持に、PTV の昇温条件は、60℃で 0.2 分間保持後 600℃/分で 350℃に昇温し 10 分間保持に、熱分解炉 (内径 0.5mm, 長さ 32cm のセラミックチューブ) の温度は 1440℃に設定した。

キャリアガス (He) の流速は、有機化合物の H<sub>2</sub> ガスへの熱分解効率に関わる重要ファクターの一つである (Fig. 2)。流速が速い場合には (例えば、2.0ml/分)、有機化合物の熱分解効率が著しく低下し、正確な同位体比が得られない。一方で、極端に流速を遅くした場合には (例えば、0.5ml/分)、正確な同位体比が得られても、クロマトグラム上での有機化合物の分離能の低下や GC/pyrolysis/IRMS 内部における様々な接続部における大気への侵入 (リーク) の原因になる。本稿では、クロマトグラム上で十分な分離能が得られ、且

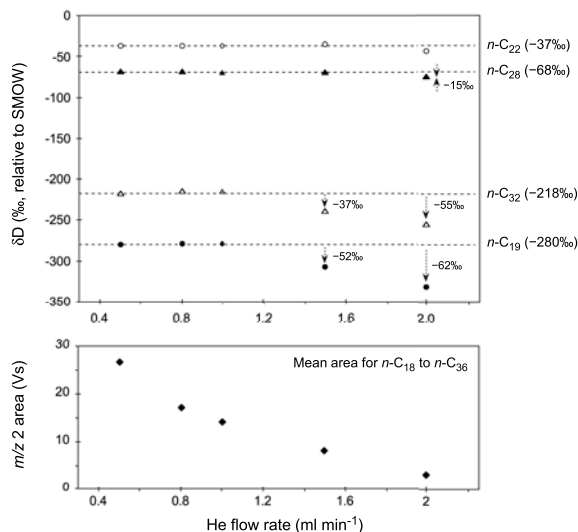


Fig. 2. (a) Determined  $\delta D$  values and (b) peak area of *n*-alkane standards with respect to varying carrier gas flow rate. Dashed lines represent the actual  $\delta D$  values.

つ正確な同位体比が得られる、0.8ml/分の定流量 (constant flow) モードに設定した。

### 2.3. 測定前の準備

試料測定前の準備として、(1) 熱分解炉内部へのグラファイト (触媒) コーティングの作製、(2) 標準 H<sub>2</sub> ガスを用いて IRMS での検出感度等の調整 (ピークセンターとオートフォーカス)、(3) H<sub>3</sub> ファクターの測定を行った。(1) は、1440℃の熱分解炉に GC の導入口から *n*-ヘキサンを 1 $\mu$ l ずつ続けて 3 回導入することで作製した。(2) は、標準 H<sub>2</sub> ガスを 1.1bar の圧力で GC-C/TC III interface を通して導入し、PC ソフトウェア (isodat 2.0) により行った。なお、オートフォーカスはこの測定前の準備時のみに行い、得られた設定値を全ての試料に適用した。一方で、ピークセンターは各試料の測定前に毎回行った。(3) は、標準 H<sub>2</sub> ガスの圧力を 0.4 ~ 1.2bar (*m/z* 2 のシグナル強度でおよそ 1 ~ 4V) まで 0.1bar の間隔で、一定時間 (50 秒) おきにそれぞれ 20 秒間導入し、PC ソフトウェア (isodat 2.0) により計算した。H<sub>3</sub> ファクターの測定は試料測定前の準備時と最終試料の測定後 (11 試料の測定後) に行い、その変動は +0.02 (同位体比で約 0.3‰の誤差) であった。これは本研究



の全期間を通して  $H_3$  ファクターの変動が測定値に与える影響は、実質的にほとんどないことを意味する。本研究では、試料の試料測定前の準備時に得られた  $H_3$  ファクターの値 (4.12) をすべての試料に適用した。

## 2.4. 試料と測定

量依存性や補正法を検討する試料として、同位体比既知 (封管燃焼法により決定) の炭素数 18 ~ 36 の直鎖飽和炭化水素 (*n*-alkane) を 1 化合物あたりの水素量で 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16, 40 nmol/ $\mu$ l になるように混合した標準溶液 (*n*-hexane 溶液) を調製した (Table 1)。なおこの標準溶液には、炭素数 17 のもの (*n*-heptadecane) も含まれているが、同位体比を決めていないため本研究では評価していない。オートサンプラーを用いてそれぞれの溶液を 1  $\mu$ l ずつ GC/pyrolysis/IRMS に導入した (各試料の測定回数は 1 回)。 $H_2$  の標準ガスは PC ソフトウェア (isodat 2.0) のプログラムにより、Fig. 1b のように *n*-alkane のピークの前後に 2 回、3 回、それぞれ 20 秒間ずつ導入した。検出される  $m/z$  2 のシグナル強度は、低炭素数のもので高く高炭素数のもので低くなる傾向があるが、その積分値 (ピークエリア) は炭素数に関係なくほとんど一定であった (ばらつきは 5% 以内である)。

また、本稿で提案する補正法の検証用の試料として、同位体比既知 (封管燃焼法により決定) の炭素数 16 の直鎖飽和脂肪酸のメチルエステル化体 (*n*-palmitic acid methylester), 炭素数 22 の直鎖飽和アルカノールのアセチル化体 (*n*-behenyl acetate), ステイグマステロールのアセチル化体 (stigmasteryl acetate) を 1 化合物あたりの水素量で 2.5, 5, 10 nmol/ $\mu$ l になるように混合した標準溶液 (*n*-hexane 溶液) を調製し、上記と同条件で測定を行った。

## 2.5. データの取得とキャリブレーション

クロマトグラム上での各化合物ピークの検出・積分値の取得・同位体比の計算は、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) をそれぞれ 0.2mV/s, 0.4mV/s, 最低検出強度を 200mV に指定することで、PC ソフトウェア (isodat 2.0) の自動処理により行った (なお  $m/z$  2 のシグナル強度は、水素量 2 nmol の標準溶液で、約 250mV である)。

試料の同位体比は、標準  $H_2$  ガスの同位体比を 0‰ として得られた測定値 ( $\delta D_{ref.gas=0\text{‰}}$ ) と、封管燃焼法で得られている同位体比 ( $\delta D_{dual\ inlet}$ ) との相関直線 (Fig. 3) から計算した。水素量が 12 nmol の標準溶液を測定したときに得られた相関直線が

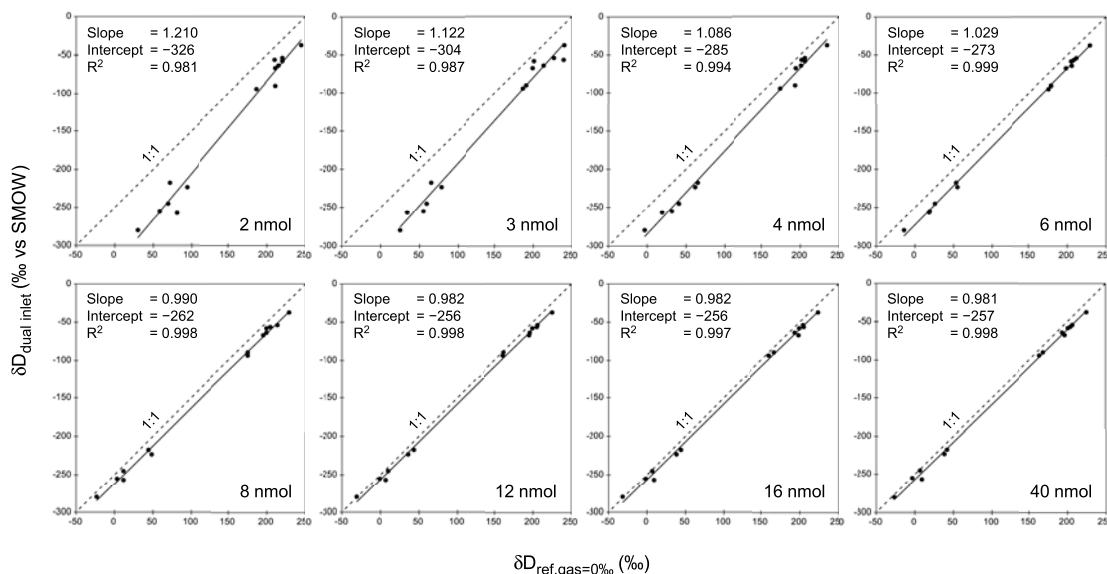


Fig. 3. Correlation between  $\delta D$  values determined by Dual inlet (vs. SMOW) and GC/pyrolysis/IRMS (vs. Ref. gas=0‰) with respect to varying sample amounts.

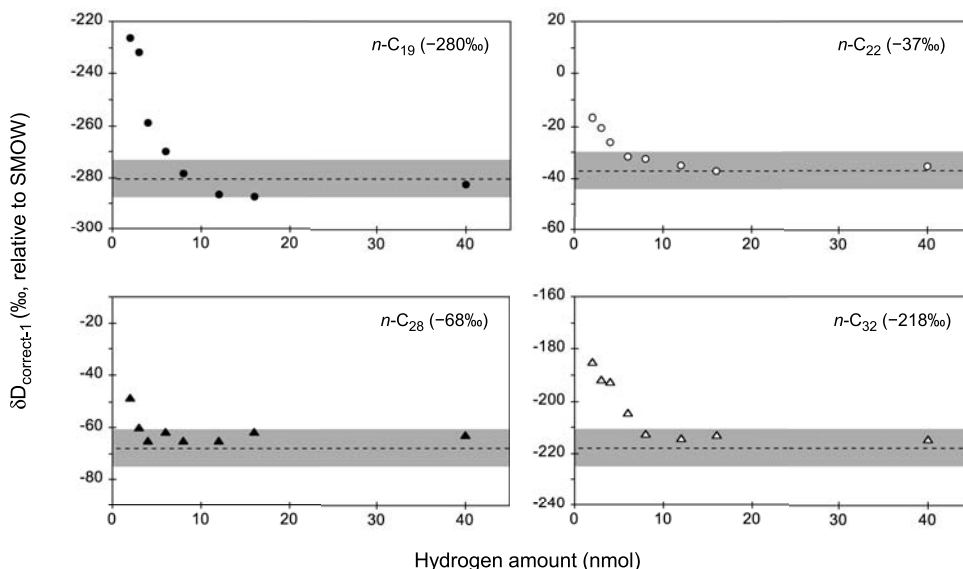


Fig. 4.  $\delta D_{\text{correct-1}}$  values of typical *n*-alkane standards with respect to varying sample amounts. The marked area indicates an error of  $\pm 7\%$ .

ら計算したものを  $\delta D_{\text{correct-1}}$  値 (式 2) とし、それぞれの濃度で別々に得られた相関直線を用いて計算したものを  $\delta D_{\text{correct-2}}$  値 (式 3) とした。各試料における  $\delta D_{\text{ref.gas=0\%}}$  値、 $\delta D_{\text{correct-1}}$  値、 $\delta D_{\text{correct-2}}$  値を Table 1 にまとめた。

$$\delta D_{\text{correct}} = 0.982 \times \delta D_{\text{ref.gas=0\%}} - 256 \quad (\text{式 2})$$

$$\delta D_{\text{correct}} = \text{Slope} \times \delta D_{\text{ref.gas=0\%}} + \text{Intercept} \quad (\text{式 3})$$

### 3. 結果と考察

#### 3.1. $\delta D_{\text{correct-1}}$ 値

$\delta D_{\text{correct-1}}$  値は、ある一つの濃度の標準試料で得られた相関直線を様々な濃度の試料にそのまま適用して得られた値であり、すなわち少量の試料を分析する際の同位体比の変動を無視したキャリブレーション法で計算された値である。このような場合には、 $\delta D_{\text{correct-1}}$  値と  $\delta D_{\text{dual inlet}}$  値の差は、水素量が 8 nmol 以上の場合には一般的な測定誤差以内 ( $1\sigma$  で 7%) であるが、8 nmol 未満の場合には、有意に (10% 以上) 大きくなる (Table 1)。例えば、炭素数 19 の飽和炭化水素 (*n*-nonadecane) では、水素量が 8 nmol 以上の場合には  $\delta D_{\text{dual inlet}}$  値との差は  $\pm 7\%$  以内であるが、水素量が、6, 4, 3, 2 nmol と小さくなるにつれ、 $\delta D_{\text{dual inlet}}$  値との差はそ

れぞれ、10, 21, 48, 54% と顕著に大きくなる (Fig. 4)。このように、 $\delta D_{\text{correct-1}}$  値を用いた場合には、一般的な測定精度 ( $1\sigma$  で 7% 以内) で測定できる最低試料量は、化合物あたり水素量で 8 nmol である。そして、2 nmol では  $\delta D_{\text{dual inlet}}$  値との差は平均で 36% にもなり、そのばらつきも  $1\sigma$  で 22% になる (Table 1)。

#### 3.2. $\delta D_{\text{correct-2}}$ 値

一方で上記 (3-1 章) の問題は、それぞれの濃度で別々に得られた相関直線を用いて計算した  $\delta D_{\text{correct-2}}$  値にはほとんど見られない (Table 1)。例えば、炭素数 19 の飽和炭化水素 (*n*-nonadecane) では、2 ~ 40 nmol のすべての濃度において  $\delta D_{\text{correct-2}}$  値と  $\delta D_{\text{dual inlet}}$  値の差は  $\pm 10\%$  以内である (Fig. 5)。他の炭素数の *n*-alkane についても、水素量が 8 nmol 未満になっても、 $\delta D_{\text{correct-2}}$  値と  $\delta D_{\text{dual inlet}}$  値の差は、常に平均で 0% であり、そのばらつきは 4 nmol 以上では  $1\sigma$  で 7%、また 2 nmol であっても  $1\sigma$  で 13% である。このように  $\delta D_{\text{correct-2}}$  値を用いれば、一般的な測定精度 ( $1\sigma$  で 7% 以内) で測定できる最低試料量は、化合物あたり水素量で 4 nmol になり、これは  $\delta D_{\text{correct-1}}$  値を用いた場合の約半分である。

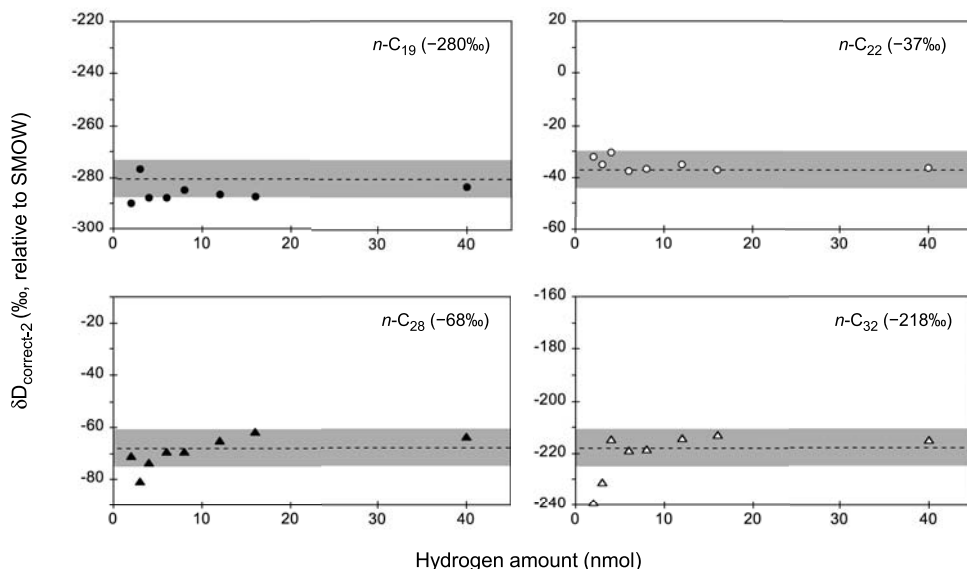


Fig. 5.  $\delta D_{\text{correct-2}}$  values of typical *n*-alkane standards with respect to varying sample amounts. The marked area indicates an error of  $\pm 7\text{‰}$ .

### 3.3. 実試料の測定比における補正法

Fig. 3 に示すように、標準  $\text{H}_2$  ガスの同位体比を 0‰ として得られた測定値 ( $\delta D_{\text{ref.gas=0‰}}$ ) と封管燃焼法で得られている同位体比 ( $\delta D_{\text{dual inlet}}$ ) の間には、正の相関関係がある。そして相関係数 ( $R^2$ ) は、試料量が 4 nmol 以上では 0.994 以上であり、2, 3 nmol であっても、それぞれ 0.987, 0.981 と、非常に強い相関関係を示す。しかし、相関直線の傾きは、40 ~ 12 nmol では 0.981 ~ 0.982 とほぼ一定であるのに対し、8, 6, 4, 3, 2 nmol と試料量が少なくなると 0.990 から 1.210 へと増加する。またその切片は、40 ~ 12 nmol では  $-257\text{‰}$  ~  $-256\text{‰}$  とほぼ一定であるのに対し、8, 6, 4, 3, 2 nmol と試料量が少なくなると  $-262\text{‰}$  から  $-326\text{‰}$  へと減少する。なぜこのような変化が観察されるのかについての明確な原因は、残念ながら現在のところ不明であり、メモリー効果 (5 章参照) や熱分解効率の変化、 $m/z$  2 の強度が 1V 以下での  $\text{H}_3$  ファクターの変動、GC クロマトグラムのバックグラウンドの影響の増大などの可能性が考えられる。

GC/pyrolysis/IRMS による分子レベル安定水素同位体比分析では、一般的に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く、実際の測定では、化合物ごとに積分値 (area, 単位: Vs) や  $\delta D_{\text{ref.gas=0‰}}$  値が得られる。そこで本稿では、

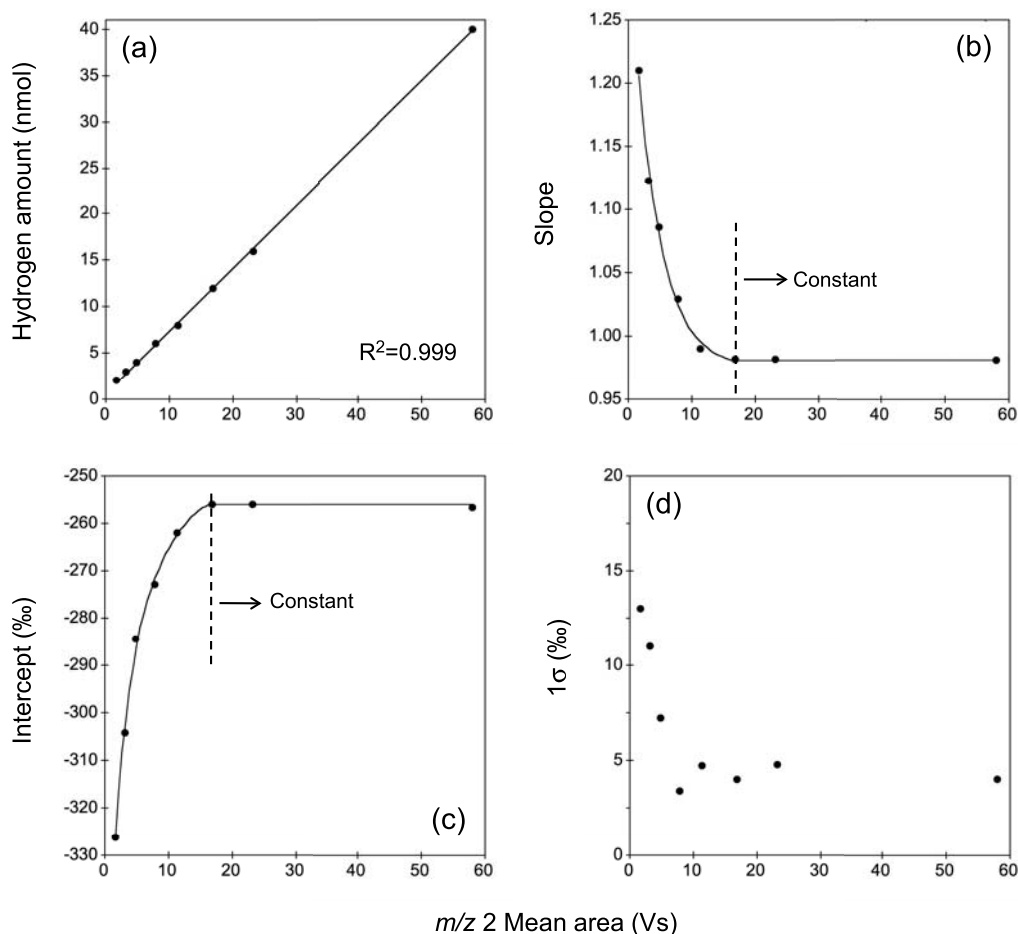
積分値、 $\delta D_{\text{ref.gas=0‰}}$  値、Fig. 3 の相関直線の傾きと切片を用いた補正法を提案する。

Fig. 6a に示すように、化合物の水素量と GC/pyrolysis/IRMS での測定で得られた積分値の間には、明確な正の相関関係 ( $R^2=0.999$ ) がある。そして、その積分値と Fig. 3 の相関直線の傾きと切片の間には、それぞれ Fig. 6b, 6c に示すような関係がある。積分値が 16.9Vs ( $m/z$  2 の強度で、約 2.5V) 以上では、傾きも切片も一定であるので、同位体比のキャリブレーションは、12 nmol の試料で得られた値 (傾き = 0.982, 切片 =  $-256\text{‰}$ ) を用いる (式 2)。一方で、積分値が 1.6Vs 以上 16.9Vs 未満では、式 3 に Fig. 6b, 6c の近似式 (それぞれ、式 4, 5) より得られた傾き (Slope) と切片 (Intercept) を用いる。

$$\begin{aligned} \text{Slope} = & -5.81 \times 10^{-8} \times \text{Area}^5 + 7.13 \times 10^{-6} \\ & \times \text{Area}^4 - 3.13 \times 10^{-4} \times \text{Area}^3 \\ & + 6.65 \times 10^{-3} \times \text{Area}^2 - 7.19 \times 10^{-2} \\ & \times \text{Area} + 1.305 \end{aligned} \quad (\text{式 4})$$

$$\begin{aligned} \text{Intercept} = & -2.34 \times 10^{-6} \times \text{Area}^6 + 2.99 \times 10^{-4} \\ & \times \text{Area}^5 - 1.39 \times 10^{-2} \times \text{Area}^4 \\ & + 3.19 \times 10^{-1} \times \text{Area}^3 - 4.03 \times \text{Area}^2 \\ & + 29.5 \times \text{Area} - 364.8 \end{aligned} \quad (\text{式 5})$$

なお、これらの近似式は、表計算・グラフ PC ソフトウェア (Hulinks 社製、カレイダグラフ) に



**Fig. 6.** (a) Hydrogen amount injected into GC, (b) slope and (c) intercept on the correlation line of the  $\delta D_{\text{ref.gas=0\%}}$  and  $\delta D_{\text{dual inlet}}$  values, and (d) standard deviation on the  $\delta D_{\text{correct-2}}$  value, with respect to varying  $m/z$  2 mean area on the chromatogram.

より求めた (5 次式まで与えて補正を行う重要性があるかどうかには疑問が残るが、近年の PC の発達により非常に簡易に多次元の近似式が得られるので、本稿ではその近似式をそのまま用いた)。このキャリブレーション法を用いると、一般的な測定精度 ( $1\sigma$  で 7% 以内) が得られる最低試料量は、化合物あたり水素量で 4 nmol であり、また 2 nmol であっても  $1\sigma$  で 13% の精度である。

### 3.4. 検証

*n*-palmitic acid methylester, *n*-behenyl acetate, stigmasteryl acetate の標準溶液を測定し、得られた積分値、 $\delta D_{\text{ref.gas=0\%}}$  値を Table 2 に示す。得られた積分値は 2.5 ~ 14.1Vs の範囲にあるので、式 4, 5

により傾きと切片を求め、式 3 を用いて同位体比 ( $\delta D_{\text{correct-2}}$  値) を求めた。

Table 2 に示すように、 $\delta D_{\text{ref.gas=0\%}}$  値は化合物の導入量により大きく異なる。例えば、*n*-palmitic acid methylester では、2.5, 5, 10 nmol のときに、それぞれ 88, 54, 42% である。しかし、式 3, 4, 5 を用いて得られた  $\delta D_{\text{correct-2}}$  値は、2.5 nmol では、 $\delta D_{\text{dual inlet}}$  値との差が  $\pm 9\%$  以内、5, 10 nmol ではその差が  $\pm 4\%$  以内と、3 種の化合物・3 種の導入量すべてで  $\delta D_{\text{dual inlet}}$  値と良い一致を示した。このように、式 3, 4, 5 を用いたキャリブレーションは、少量の有機化合物の水素同位体比を精度・確度よく測定するうえで有効な手法である。



**Table 2.**  $\delta D$  values of typical lipid standards (*n*-palmitic acid methylester, *n*-behenyl acetate, and stigmasterol) determined by traditional off-line ( $\delta D_{\text{dual inlet}}$ ) and GC/pyrolysis/IRMS method ( $\delta D_{\text{correct-2}}$ ) with respect to varying sample amounts.

| Compounds                           | $\delta D_{\text{dual inlet}}$ | GC/pyrolysis/IRMS |                                       |       |               |                                   |              |
|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------|---------------------------------------|-------|---------------|-----------------------------------|--------------|
|                                     |                                | Area (Vs)         | $\delta D_{\text{ref.gas=0}\text{‰}}$ | Slope | Intercept (‰) | $\delta D_{\text{correct-2}}$ (‰) | $\Delta$ (‰) |
| <b>2.5 nmol</b>                     |                                |                   |                                       |       |               |                                   |              |
| <i>n</i> -Palmitic acid methylester | -218                           | 2.5               | 88                                    | 1.17  | -312          | -210                              | 8            |
| <i>n</i> -Behenyl acetate           | -295                           | 2.5               | 22                                    | 1.17  | -312          | -287                              | 9            |
| Stigmasterol acetate                | -245                           | 2.5               | 52                                    | 1.17  | -312          | -251                              | -6           |
| <b>5 nmol</b>                       |                                |                   |                                       |       |               |                                   |              |
| <i>n</i> -Palmitic acid methylester | -218                           | 6.5               | 54                                    | 1.05  | -277          | -220                              | -2           |
| <i>n</i> -Behenyl acetate           | -295                           | 6.3               | -13                                   | 1.05  | -278          | -292                              | 4            |
| Stigmasterol acetate                | -245                           | 6.6               | 35                                    | 1.05  | -277          | -240                              | 4            |
| <b>10 nmol</b>                      |                                |                   |                                       |       |               |                                   |              |
| <i>n</i> -Palmitic acid methylester | -218                           | 14.0              | 42                                    | 0.99  | -257          | -216                              | 2            |
| <i>n</i> -Behenyl acetate           | -295                           | 13.8              | -38                                   | 0.99  | -257          | -295                              | 0            |
| Stigmasterol acetate                | -245                           | 14.1              | 11                                    | 0.99  | -257          | -246                              | -1           |

#### 4. まとめ

GC/pyrolysis/IRMS による分子レベル水素同位体比分析法は、測定に必要な試料量が1化合物あたり水素量で10～50 nmolと比較的多く、これは試料に含まれているごく微量の有機化合物を分析する上で大きな障害になっている。そこで本稿では、GC/pyrolysis/IRMS による分子レベル水素同位体分析法における試料量と得られる同位体比の関係を示し、また少量の試料でも精度・確度の良い同位体比を得るための補正法を提案した。本補正法を用いると、一般的な測定精度 ( $1\sigma$  で7%以内) で測定できる最低試料量は、化合物あたり水素量で4 nmolになり、また2 nmolであっても  $1\sigma$  で13%の精度で測定することができる。

なお、GC/pyrolysis/IRMS による分子レベル安定水素同位体比測定では、試料導入量と得られる積分値の関係は、装置の様々な条件や測定対象の有機化合物の種類で左右される(カ石 and 大場, 2008)。著者の経験では、一つの装置を同条件で使っている場合には、30～40試料の連続分析(1試料1時間の分析で、約2日)の中では、 $H_3$ ファクターも含めこれらの項はほとんど変化しないが、イオンソースのフォーカスを再設定したり、測定待機時に熱分解の温度を一時的に下げたり、熱分解炉やGCカラムを交換した場合には、これらの項は大きく変化することが多い。また、クロマトグラム上の前の化合物ピークの同位体的な干渉、いわゆる“メモリー効果”(5-1章参照)の影響も懸念されるため、有機化合物の安定水素同位体

比を精度・確度良く確実に測定するには、必ず同位体比既知の標準試料を用いて、 $\delta D_{\text{ref.gas=0}\text{‰}}$ 値と $\delta D_{\text{dual inlet}}$ 値の相関直線の傾き・切片や、式2～5の各項を個々の装置や測定シークエンスごとに調整し、また、数試料毎に様々な濃度の標準有機化合物を測定し、装置の状態が一定に保たれているのかを常にモニターする必要がある。

#### 5. コメント

##### 5.1. メモリー効果について

2008年の終わりに、Wang and SessionsはGC/pyrolysis/IRMSを用いた分子レベル同位体比測定法におけるメモリー効果についての論文を発表した(Wang and Sessions, 2008)。メモリー効果とは、クロマトグラム上で前に検出される有機化合物の同位体比が、後に検出される有機化合物の同位体に干渉することであり、彼らの報告によれば、2つの有機化合物のピークがクロマトグラム上で約100秒離れていても、後に検出される有機化合物は、前に検出される有機化合物の同位体比から、おおむね2～4%の影響を受ける。そしてこのメモリー効果は、2つの化合物ピークの間隔が狭くなり、後に検出される有機化合物のピークエリアが小さくなり、熱分解炉の累積測定数が多くなると、顕著(5%程度)になる。

本稿で用いた*n*-alkane標準溶液は、同位体比の範囲が-37‰～-280‰であり、クロマトグラム上で隣接するピークの間隔は狭いところで80秒程度である。メモリー効果を2～4%と仮定すると、得られる同位体比は5～13%程度の誤差を生じるこ

とになる。実際に Table 1 の  $\delta D_{\text{correct-1}}$  値の  $\Delta$  値を注意深く見ると、前に検出される *n*-alkane の同位体比が低い場合は小さい値に、高い場合は大きい値になる傾向がある。しかしこの *n*-alkane 標準溶液で得られた補正式 (式 2 ~ 5) を、*n*-palmitic acid methylester, *n*-behenyl acetate, stigmasteryl acetate の標準溶液の測定に用いても (クロマトグラム上でこれらの有機化合物ピークの間隔は 300 秒以上である)、得られた  $\delta D_{\text{correct-2}}$  値は、3 種の化合物・3 種の導入量すべてで  $\delta D_{\text{dual inlet}}$  値と良い一致を示していることから、間接的証拠ではあるが、本測定におけるメモリー効果は測定誤差以内と考えられる。メモリー効果の評価には本原稿で議論する量依存性を考慮する必要もあり、また、装置の様々な条件や測定対象の有機化合物の種類で左右されると考えられる。Wang and Sessions (2008) の結果がすべての測定機、測定条件、すべての有機化合物に当てはまる事象であるのか、またその影響が有意であるのかは、今後注意深く調べる必要がある。

## 5.2. 化合物の種類と同位体比

一般的に、GC/pyrolysis/IRMS や GC/combustion/IRMS を用いた有機化合物の分子レベル安定同位体比測定法では、同位体比既知の標準有機化合物には、できるだけ測定対象の化合物と同じものを用いることが望ましい (力石 and 大場, 2008)。これは、GC カラムや熱分解炉などの測定装置内部での同位体分別が否定できないため、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あるためである (力石 and 大場, 2008)。

本稿では、補正式を直鎖飽和炭化水素の測定で作製し、その検証を *n*-palmitic acid methylester, *n*-behenyl acetate, stigmasteryl acetate で行ったが、力石 and 大場 (2008) で指摘されるような懸念は見られなかった。しかし、実際に GC/pyrolysis/IRMS を用いて水素同位体比を測定する場合には、標準有機化合物としてどのような有機化合物が適切であるか (どのくらい構造が異なった有機化合物でも使用できるのか) を、それぞれの測定機、測定条件について必ず検討して頂きたい。

## 謝 辞

著者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メーカーエンジニアとしての立場から、当研究室研究生の山口保彦氏 (東京大学・修士課程学生) には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。また、奈良岡浩教授 (九州大学)、大場康弘博士 (北海道大学) には、本稿の査読を通じて、大変貴重なアドバイス・コメントを頂きました。記して厚く感謝致します。

## 引用文献

- Burgoyne T. W. and Hayes J. M. (1998) Quantitative production of  $H_2$  by pyrolysis of gas chromatographic effluents. *Anal. Chem.* **70**, 5136-5141.
- 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 and 大場 (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. Org. geochem.* **23/24**, 99-122.
- 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.
- Hilkert A. W., Douthitt 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.
- 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.
- Sessions A. L. (2006) Isotope-ratio detection for gas chromatography. *J. Sep. Sci.* **29**, 1946-1961.
- Wang Y. and Sessions A. L. (2008) Memory effects in compound-specific D/H analysis by gas chromatography/pyrolysis/isotope-ratio mass spectrometry. *Anal. Chem.* **80**, 9162-9170.