

総説

熱分解型元素分析 / 同位体比質量分析計 (TCEA/IRMS) を用いた
有機物の水素・酸素安定同位体比の測定方法における留意点とその応用*

鈴木彌生子 **** * · 佐藤里恵 ***
(2010年7月20日受付, 2010年10月8日受理)

Abstract

Hydrogen and oxygen isotope analysis has become increasingly important as a potential powerful tool for the reconstruction of climatic conditions, the wildlife forensics and food authenticity. The development of thermal conversion elemental analyzer/isotope ratio mass spectrometer (TCEA/IRMS) facilitates a rapid and routine analysis of hydrogen and oxygen isotope ratios for a great number of samples. Despite a rapidly growing literature on applications of hydrogen and oxygen isotope ratios in geochemistry, ecology and food sciences, the lack of reliable technique to measure hydrogen and oxygen isotope ratios at organic materials is regrettable. In this paper, we review the technical fundamentals (e.g. calibration and standardization) in measurement of hydrogen and oxygen isotope ratios of organic materials. We also address an application to the authenticity of food and chemical materials.

はじめに

生物を主に構成する炭素・窒素・酸素・水素といった軽元素の安定同位体比は、生命活動によって変動するため、起源生物や生合成過程、生育環境などの情報を保存することが報告されている。これらの特徴は、物質循環の解明や食物網の構造解析、動物の食性解析といった地球化学・生態学・環境化学・考古学などの分野において活発に利用されている (和田, 1997)。

軽元素の安定同位体比は、各元素によって反映する要因が異なる。例えば、植物においては、炭素同位体比は、光合成経路の異なる C₃ 植物・C₄ 植物ではその同位体比が大きく異なる (Smith and Epstein, 1971)。また、動物の炭素・窒素同位体比は、餌の値を反映することが経験則として知られており、窒素同位体比は食物連鎖に沿って上昇することから、栄養段階の上位に位置する動物ほど重い値を示すことが明らかとなっている (和田, 1997)。

*Stable hydrogen and oxygen isotope analysis of organic materials by thermal conversion elemental analyzer / isotope mass spectrometer (TCEA)

**日本認証サービス株式会社, 〒 224-0033 神奈川県横浜市都筑区茅ヶ崎東4丁目5番17号
Yaeko Suzuki: Japan Certification Services, Inc.

4-5-17 Chigasaki-higashi, Tsuzuki, Yokohama, Kanagawa, 224-0033, Japan

***SIサイエンス株式会社, 〒 345-0023 埼玉県北葛飾郡杉戸町本郷473番地3

Rie Sato: SI Science CO., LTD. 473-3 Hongou, Sugito-cho, Kitakatsushika-gun, Saitama, 345-0023, Japan

****(現所属) 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 食品分析研究領域 分析ユニット
〒 305-8642 茨城県つくば市観音台2丁目1番12号

(Present address) Food Analysis Laboratory, Analytical Science Division, National Food Research Institute
2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8642, Japan

Corresponding author. Yaeko Suzuki

e-mail: yaekos@affrc.go.jp Tel: +81-29-838-8059; Fax: +81-29-838-7996

さらに、近年注目を集めているのが、生物の酸素・水素同位体比である。生物の酸素・水素同位体比は、生育環境中の水や気候条件（温度・湿度など）を反映することが報告されている（Bricout, 1978）。雨水や地下水、河川水等における水の酸素・水素同位体比は、緯度効果・高度効果・内陸効果といった地理的な要因で変化する。よって、古環境復元（Bowen et al., 2005）や動物（とくに鳥）の移動を追跡する研究（Bowen et al., 2005）、食品の産地判別（Kelly et al., 2005）など、さまざまな分野において有用な手段となりうる。

しかし、酸素・水素同位体比を測定する際には、考慮すべき点が多い。これまで、とくにセルロースの水素・酸素同位体比について、多くの論文が報告されているが、正しい測定法で正しい結果を報告しているとは言い難いものも少なくない。そこで、本稿では、測定における留意点を挙げるとともに、食品・化成品への応用を例として、酸素・水素同位体比の可能性を示す。

1. 安定同位体比の表記について

安定同位体比は、標準物質に対する試料の同位体比の差で表記し、千分率（パーミル：‰）が単位となる。定義は以下となる。

$$\delta X = (R_{\text{試料}}/R_{\text{標準}} - 1) \times 1000$$

ここで、X は、酸素、水素に対して、それぞれ、 ^{18}O 、D を表し、R はそれぞれの元素の同位体比、 $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ 、D/H となる。標準試料は、酸素・水素は SMOW（標準平均海水）である。また、 $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ については、PDB（白亜紀 PeeDee 層のヤイシ類の化石）を標準として用いて表記することもあり、とくに、炭酸塩の酸素同位体比を表記する際に用いられる。酸素同位体比を 2 つの標準試料で表したときの両者の関係式は以下のとおりである。

$$\delta^{18}\text{O} (\text{SMOW}) = 1.03086 \times \delta^{18}\text{O} (\text{PDB}) + 30.86$$

千分率表記で試料の測定値が正であれば、標準物質よりも重い同位体に富み、負であれば、標準物質よりも軽い同位体に富むこととなる。

2. 測定装置について

酸素・水素の安定同位体比を測定するには、熱分解型元素分析計 / 同位体比質量分析計（TCEA/IRMS）を用いる（Fig.1）。試料は、熱分解型元素分析計（TCEA）を用いて、高温（例えば、Thermo Fisher Scientific 社製では、 1450°C ）での熱分解によって有機物中の酸素分を一酸化炭素（CO）ガス、水素分を水素（ H_2 ）ガスに変換する。



Fig.1 に熱分解炉の構造を示す。熱分解炉には、高温に耐えることができるセラミックス管が使用され、グラッシーカーボンが触媒として充填されている。

熱分解炉で発生した各気体は、GC カラムを用いて分離を行った後、インターフェイスである Conflo 部を経由し、同位体比質量分析計（IRMS）へ導入される。イオン源にてイオン化された気体について、水素同位体比は、 m/z 2, 3、酸素同位体比は、 m/z 28, 29, 30 のイオン強度を検出する。

1 回の測定にかかる時間は、10 分～20 分程度と比較的短時間であるが、機械に導入するまでの粉碎や脱脂といった前処理、銀カプセルへの秤量、熱分解炉の設定・清掃、リファレンスガスのチェック、標準試料による補正式の作成などの時

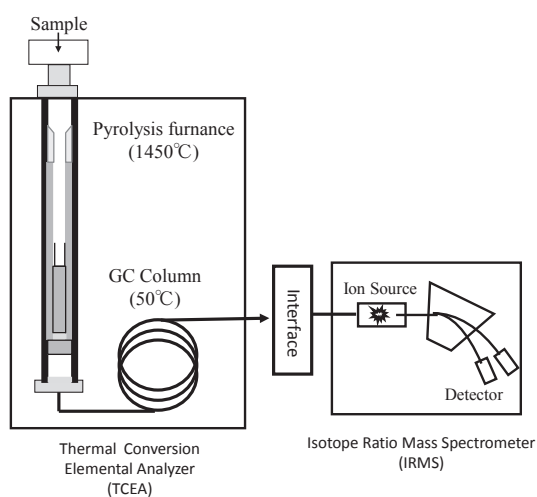


Fig. 1. Schematic of the thermal conversion elemental analyzer/isotope ratio mass spectrometer (TCEA/IRMS).

間を含めた実際の処理能力は 100 試料 / 1 週間程度である。比較的簡易かつ測定時間も短いことから、数多くの試料を分析することが可能である。

3. 試料の前処理について

試料の前処理としては、基本的には乾燥させた試料を粉碎し、均質化する。試料中の水分の混入は測定結果に大きな影響を示すことから、凍結乾燥器などを用いて完全に除去する必要がある。また、脂質の多い試料（とくに肉などの動物試料）を扱う際には、脱脂を行う。動物試料において、筋肉部分に比べると、脂質の炭素同位体比は軽く、酸素同位体比は重い値を示すことから、肉などの試料を扱う際は、脂質の入り具合やサンプル採取箇所による変化が生じる可能性がある (Logan, Lutcavage, 2008, Schmidt et al., 2001)。Fig.2 に脱脂前および脱脂後のウナギの炭素・酸素同位体比を示す。脱脂前はサンプル中の脂質の影響から変動幅が大きいですが、脱脂を行うことにより、データは収束することがわかる。

均質化した試料は、銀箔に適量はかりとる。酸素同位体比の測定においては、錫箔を用いても測定値に大きな影響はないことが報告されているが、銀の融点が 961℃ と非常に高く、熱分解時の温度に近いことから、銀箔を使用することが推奨されている (Werner et al., 1996)。

試料量については、スタンダードおよび試料の CO や H₂ のピーク強度が同程度になるように、銀箔に秤量する必要がある。Fig.3a に Octacosane のピー

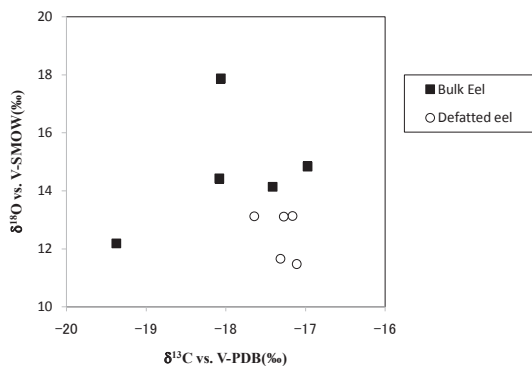


Fig. 2. $\delta^{13}\text{C}$ and δD values of bulk and defatted eels.

ク強度に対する水素同位体比の変動, Fig.3b にアセチル化スクロースのピーク強度に対する酸素同位体比の変動を示す。酸素同位体比では、 m/z 28 の出力で 5000 mV 以上、水素同位体比では、 m/z 2 の出力で 10000 mV 以上では、得られる酸素・水素同位体比は安定しているが、それ以下では、実際のよりも値が重くなる傾向がある。なお、非常に軽い水素同位体比を持つ物質を測定する際には、極端に m/z 3 の出力が低くなるため、測定する試料の同位体比によっては m/z 3 の強度についても留意する必要がある。測定の際に用いるリファレンスガスについても同様の理由で同位体的に重いものが好まれるが、日本国内で流通している水素ボンベは -400 ~ -700‰ と比較的到低い値を持つものが多く、得られる同位体比の精度が低下する可能性が

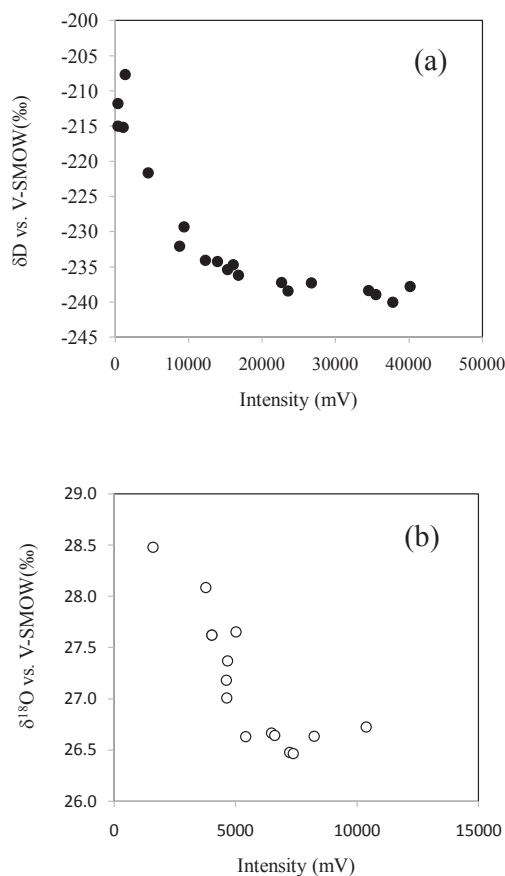


Fig. 3. Relationship between sample amount and determined δ values: (a) hydrogen and (b) oxygen.

ある。よって、これらの点にも注意しながら、標準物質や測定試料が安定して測定できる十分なピーク強度の範囲を把握し、適切な試料量で測定を行わなければならない。

4. 標準物質による補正式の作成

安定同位体比を測定するには、測定したい元素の同位体比が決められた標準物質を用いて補正を行う。IAEA, NIST, Indiana 大学から一次・二次標準物質が販売されており、さまざまな構造や、数値のワーキングスタンダードを購入することが可能である。標準物質を選択する際には、測定したい物質に近い構造の試料を選択することが望ましい。例えば、有機物を測定する際に、無機物のスタンダードを用いると、熱分解効率などが異なる可能性がある。

一次標準物質は、少量で高価であることや、IAEA の場合は購入制限があることから、一次標準物質を日々の測定に使用することは難しい。そこで、一次あるいは二次標準物質からワーキングスタンダードを作成する必要がある。補正式に用いるワーキングスタンダードの値は、測定したい試料の値がその範囲内にあることが重要となる。

著者のラボでは、酸素・水素同位体比測定において、上記の点を考慮した各々4種類の有機物（水素：Docosane (-48%), 7-Ethoxy-4-methylcoumarin (-93%), β -D-Ribofuranose 1,2,3,5-tetraacetate (-116%) Octacosane (-238%), 酸素：Dibenzo-24-crown-8 (-15.5%), Dibenzo-18-crown-6 (-0.1%), β -D-Galactose pentaacetate (+12.9%), D- (+) -Sucrose octaacetate (+26.8%)) をワーキングスタンダードとして用いる。測定の際に基準とするリファレンスガスの同位体比を0%として仮定し、得られた測定値 (δ vs ref.gas) に対して真値 (δ vs V-SMOW) をとり、補正式を作成する。これにより、熱分解効率など装置内部での同位体分別やIRMS 固有の特徴として真値/測定値の傾きが1にならない問題などを相殺することとなり、安定した測定が可能となる。また、補正式の相関係数を確認することにより、その日の機械の状態を確認することへもつながる。実試料の測定を行う際は、10~12 試料ごとにワーキングスタンダード

を組み込み、測定値のチェックや補正式の更新を行うことで、試料の測定を積み重ねることによる熱分解効率の変動など機器の条件の変化に対応した精度管理を行う必要がある。著者らのラボにおける一般的な測定誤差については、上記のワーキングスタンダードについての標準偏差として、酸素同位体比で $\pm 0.3 \sim 0.5\%$ 、水素同位体比で $\pm 1 \sim 5\%$ である。

5. 窒素含有有機物の酸素同位体比について

窒素を含む有機物の酸素同位体比を測定する際には、窒素 (N_2) ピークと CO ピークの分離に気を付けなければならない。生物試料中には窒素が含まれるため、熱分解過程において窒素分が N_2 ガスに変換される。 N_2 ガスは m/z が 28 であり、CO ガスも m/z が 28 であるため、CO ガスと N_2 ガスの分離には十分な注意が必要である。Fig.4 に酸素同位体比測定時のクロマトグラムの1例を示す。150 sec 付近に検出されるピークが N_2 、350 sec 付近に検出されるピークが CO ピークである。 N_2 ピークと CO ピークの分離が十分でないと、CO の酸素同位体比が実際よりも軽くなる。実際に、窒素を含まず酸素を含むアセチル化スクロースと、窒素を含み酸素を含まないアゾベンゼンを用いて、アセチル化スクロースへアゾベンゼンの量を変化させて添加し、Fig.4 と同条件で試料中の窒素・酸素比 (N/O) に対する酸素同位体比の変動を検証した (Fig.5)。試料中の窒素の含有量が多くなるほど、 N_2 ピークが大きくなり、クロマトグラ

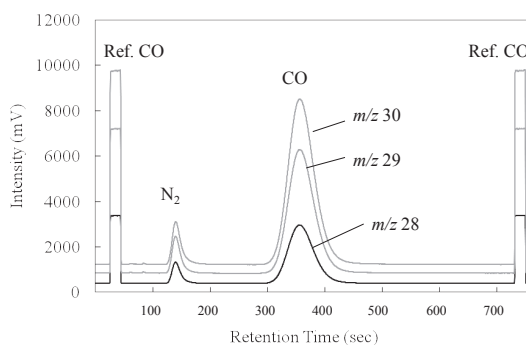


Fig. 4. Representative mass traces of m/z 28, 29 and 30 during TCEA/IRMS analysis.

ム上では N_2 ピークと CO ピークが分かれていても、得られる酸素同位体比は実際の値よりも軽くなる。よって、酸素同位体比の測定時は、 N_2 ピークからの同位体的な干渉が無いことを、あらかじめ適当な試薬等を用いて確認することが必要である。一般的には、炉の温度を高くし、GC カラムの温度を低くすると N_2 ピークからの同位体的な干渉が小さくなる (測定誤差以内になる)。そのような条件を満たすために、酸素同位体比の測定では、水素・酸素同位体比の同時測定は行わず、酸素同位体比のみの測定が行われることが多い。

6. 有機物中の交換性水素の影響について

水素同位体比は、試料全体で測定を行うと、測定誤差が非常に大きい。これは、生物試料中にはヒドロキシル基 (-OH) やカルボキシル基 (-COOH)、アミノ基 (-NH₂) が存在し、交換性に富む水素を持つため、周辺環境の水素と交換がおき、値が安定しないためと考えられる。実際に、コメの試料について、水素同位体比を測定し、測定値の平均値を比較すると、試料間の変化があるように見られるが、測定値の標準偏差が $\pm 5 \sim \pm 57\%$ と安定せず、試料間の差が有意であるとは言えない (Fig.6)。また、交換性水素の値が、試料の保管時に影響を得ている可能性も大いに考えられ、得られた数値について、試料そのものの水素同位体比をどれだけ保持しているのかは分からない。

交換性に富む水素を除去する方法の一つとし

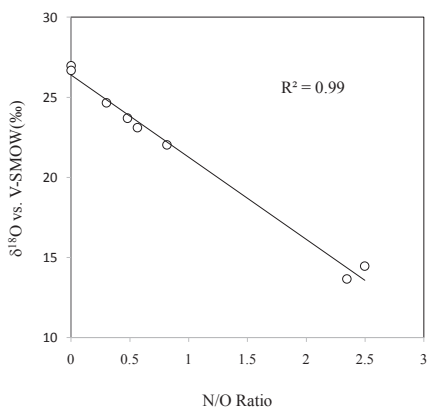


Fig. 5. Relationship between N/O ratio and determined $\delta^{18}O$ values.

て、分子を抽出し、誘導体化した後、TCEA/IRMS または、GC/IRMS で非交換性水素のみの同位体比を測定する方法が考えられる。たとえば、脂肪酸の場合は、カルボキシル基の水素をメチルエステル化して補正を行うと、交換性水素の影響を除去できる (Fig.7a)。実際にコメ試料についてメチルエステル化脂肪酸を測定すると、バルク分析で測定値の標準偏差が $\pm 5 \sim \pm 57\%$ であった検体が、 $\pm 1 \sim \pm 3\%$ と改善される (Fig.6)。また、セルロースの場合は、ヒドロキシル基の水素を発煙硝酸でニトロ化することにより、交換性水素の影響を除去できる (ニトロ基上の窒素原子は正電荷を帯び、プロトン付加が起こらない) (Fig.7b)。以上のように、化合物によって交換性水素の適切な処理を行うことにより、試料間の水素同位体比の差が有意となり、保管中や前処理の影響も除去されるため、数値に対する議論を行うことが可能となる。一方で、アミノ基などにおいては、交換性水素の適切な処理法がないため、それらを含む試料の水素同位体比測定は事実上困難である。よって、水素同位体比を測定する際は、測定したい物質の構造式をしっかりと考慮し、交換性水素を含む際はその処理を行う必要がある。

7. 酸素・水素同位体比の応用

7-1. 酸素同位体比を用いた食品の産地判別

生元素の安定同位体比分析は、1970年代から、食品試料へ応用されるようになり、食肉・乳製品・飲料・穀物などの表示偽装問題に対する判別手法として報告されている (鈴木・中下, 2010)。す

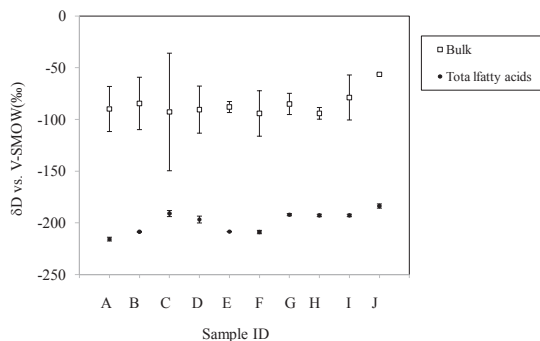
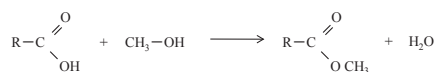


Fig. 6. δD values of bulk and total fatty acids for rice samples.

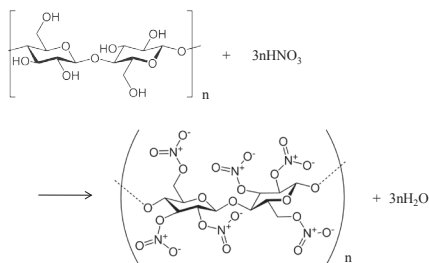
にヨーロッパでは盛んに研究が進められており、有名産地のワインやオリーブオイル、チーズなどの産地偽装を牽制する技術として注目されている (Kelly et al., 2005)。とくに、酸素同位体比は、緯度や標高などの地理的な要因を反映していることから、産地判別の有用なツールとなっている。例えば、コメへの応用では、アメリカ・ヨーロッパ・インド・パキスタンの長粒米の産地判別において、酸素同位体比を分析すると、インド・パキスタン産のコメが最も軽く、ヨーロッパ産、アメリカ産の順に高い。インド・パキスタン産のコメの酸素同位体比が軽い点については、ヒマラヤ山の水の酸素同位体比が軽いことに起因すると考えられる (Kelly et al., 2002)。また、アメリカ・オーストラリア・日本のコシヒカリの産地判別においては、酸素安定同位体比は、オーストラリア産、アメリカ産、日本産の順に重く、産地判別の可能性が示されている (Suzuki et al., 2008)。

7-2. 水素同位体比の化成品への応用

水素同位体比については、6で述べた交換性水素の影響が懸念されることから、現時点では、応用範囲が限られてしまう。しかし、構造式の中に交換性水素を持たない分子で構成されている試料であれば、現在の分析手法で適応可能となる。例



a) Methylation of fatty acid



b) Nitration of cellulose

Fig. 7. Derivatization for hydrogen isotope analysis of organic materials including with exchangeable-hydrogen; a) methylation of fatty acids and b) nitration of cellulose.

えば、プラスチックの場合、構造式を考えると、交換性水素の影響がないため、安定して水素同位体比を測定することが可能である。

近年、化石燃料からのみ生産可能であったプラスチックが、技術向上に伴い、植物などのバイオマス資源を用いて生産することが可能となり、「カーボンニュートラル」の観点から、近年急激に需要が高まっている。一方で、プラスチック自体はバイオマス由来か化石燃料由来か見分けがつかないことから、科学的根拠に基づく判別方法が求められる。

バイオマスプラスチックの炭素同位体比については、原料の炭素同位体比を反映しており、光合成経路の異なるトウモロコシやサトウキビといったC₄植物由来のバイオマスプラスチックは、石油由来のプラスチックよりも炭素同位体比が重く、判別の可能性が報告されている (Suzuki et al., 2010)。

水素同位体比について測定を行った結果、炭素だけでは判別が困難であったコメ由来のバイオマスプラスチックについても石油由来プラスチックとの判別の可能性が見出された (Fig.8)。原料や製造工程が影響を及ぼしている可能性が考えられるが、現状として検体数が少なく、検証課題は多い。しかし、化成品への応用も可能であることから、さまざまな分野への発展性が期待される。

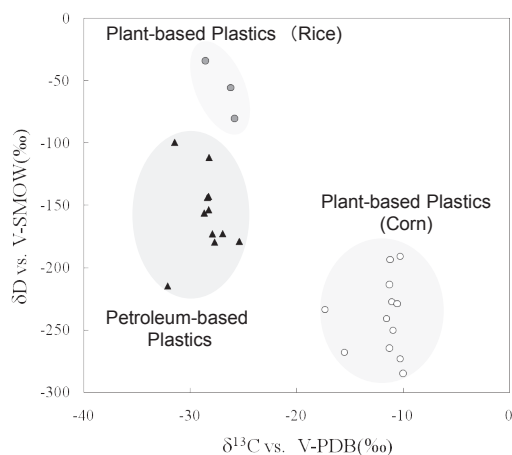


Fig. 8. Distribution of $\delta^{13}\text{C}$ and δD values of bio-based and petroleum-based plastics.

謝 辞

本稿をまとめるにあたり、貴重なご意見を頂いた力石嘉人博士 (独立行政法人 海洋研究開発機構)・小川奈々子博士 (独立行政法人 海洋研究開発機構)・大堀基樹氏 (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社)・後藤晶子博士 (首都大学東京) に感謝する。

引用文献

- Bowen G. J., Wassenaar L. I. and Hobson K. A. (2005) Global application of stable hydrogen and oxygen isotopes to wildlife forensics. *Oecologia*, **143**, 337-348.
- Bricout J. (1978) Fractionation of the stable isotope of hydrogen and oxygen in some plants. *Rev. Cytol. végét.-Bot*, **1**, 133-209.
- Gray J. and Thompson P. (1977) Climatic information from $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ analysis of cellulose, lignin and whole wood from tree rings. *Nature*, **270**, 708-709.
- Kelly S., Baxter M., Chapman S., Rhodes C., Dennis J. and Brereton P. (2002) The application of isotopic and elemental analysis to determine the geographical origin of premium long grain rice. *Eur Food Res Technol*, **214**, 72-78.
- Kelly S., Heaton K. and Hoogewerf J. (2005) Tracing the geographical origin of food: The application of multi-element and multi-isotope analysis. *Trends Food Sci. Technol.*, **16**, 555-567.
- Logan J. M. and Lutcavage M. E. (2008) A comparison of carbon and nitrogen stable isotope ratios of fish tissues following lipid extractions with non-polar and traditional chloroform/methanol solvent systems. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **22**, 1081-1086.
- Schmidt H. L., Werner R. A., Kornexl B. E. and Robmann A. (2001) ^{18}O Pattern and biosynthesis of natural plant products. *Phytochem.*, **58**, 9-32.
- Smith, B. N. and Epstein, S. (1971) Two categories of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios for higher plants, *Plant Physiol.*, **47**, 1239-1244.
- Suzuki Y., Chikaraishi Y., Ogawa N. O., Ohkouchi N. and Korenaga T. (2008) Geographical origin of polished rice based on multiple element and stable isotope analyses. *Food Chem.* **109**, 470-475.
- 鈴木彌生子・中下留美子・伊永隆史 (2009) 安定同位体比分析によるウナギ加工品の産地判別の可能性. *分析化学*, **58**, 1067-1070.
- 鈴木彌生子・中下留美子 (2010) 多元素安定同位体比分析による食品の表示偽装問題へのアプローチ. *化学と生物*, **48**, 121-128.
- 和田英太郎 (1997) 安定同位体比精密測定法による陸上生態系の解析. *日本生態学会誌*, **47**, 333-336.
- Werner R. A., Kornexl B. E., RoBmann A. and Schmidt H. L. (1996) On-line determination of $\delta^{18}\text{O}$ values organic substances. *Analytica Chimica Acta*, **319**, 159-164.