

総説

元素分析 / 同位体比質量分析計 (EA/IRMS) を用いた 炭素・窒素安定同位体比の測定方法とその応用*

佐藤里恵**・鈴木彌生子***

(2010 年 6 月 16 日受付, 2010 年 8 月 2 日受理)

Abstract

Continuous-flow (on-line) system has revolutionized the study of natural stable isotope variations in organic matter and organic compounds. In particular, carbon and nitrogen isotope analysis of bulk samples using elemental analyzer/isotope ratio mass spectrometer (EA/IRMS) has been widely used in various field of studies, which allows a simple and rapid analysis of the isotope ratios for all types of organic and a wide range of inorganic samples, with a small amount of sample materials compared to the traditional off-line Dual-Inlet method. However, stability, accuracy, and precision on the observed isotope ratios strongly reflect various factors associated with continuous-flow system, such as peak intensity (*i.e.*, sample weight), memory effect, and He dilution ratio. Unfortunately, the complete removal of such uncertainties should not be realistic, particularly in routine isotope measurements of a great number of samples. Here, we review the principles of stable isotope analysis on the traditional off-line Dual-Inlet and continuous-flow EA/IRMS methods, and also show an applicable calibration and standardization sequence. We hope that this paper is useful for routine application of EA/IRMS technique to various studies in geochemistry, ecology, biology, food science, and other area of sciences.

1. はじめに

かつて有機物の安定同位体比 (水素: D/H, 炭素: $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, 窒素: $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ など) 分析は, ごく一部の科学者だけが扱える特殊な技術であった。1990 年代中頃までは, 試料をケルダール法・封緘燃焼法・低温精製法など, 高度な技術を要する複数の前処理を組み合わせ, CO_2 や N_2 などのガスとして精製したのち, Dual Inlet タイプの同位体比質量分析計 (IRMS) で同位体比を測定するという方法 (例えば, Wada and Hattori, 1976; DeNiro and

Epstein, 1978, 1980; Minagawa et al., 1984) が主流であり, 装置にかけるまでの前処理に多くの手間と時間を要し, 非常に取り扱いにくかった。そのため, 得られる測定結果の数も極めて少なかった (例えば, 著者らのラボでは一週間で 10 ~ 20 試料程度)。

しかし近年の技術発展, とくに元素分析 / 同位体比質量分析計 (EA/IRMS) に代表される, 前処理装置と IRMS をオンラインでつなぐ連続フロー (continuous-flow) タイプの測定機器 (例えば, Preston and Owens, 1983; Fry et al., 1992; Brenna et

*Carbon and Nitrogen stable isotope analysis by EA/IRMS

**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 Hongo, Sugito-Machi, Kitakatsushika-Gun, Saitama, 345-0023, Japan

***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

Corresponding author. Rie Sato

e-mail: r-sato@shoko.co.jp Tel: +81-480-35-2915; Fax: +81-480-35-2930

al., 1997; Brand, 1998) の開発の発展・普及により、多くの研究者が比較的簡単に、短時間でたくさんの測定値を得られるようになった（例えば、著者らのラボでは一日で 100 試料程度）。

しかしながら、安定同位体比の測定は相対測定であり、得られた結果が正しいのかどうかを、常に注意深く吟味する必要がある。実際に、連続フローにまつわる様々な問題（例えば、メモリー効果や、レファレンスガスと試料のピークの大きさの相違、He による希釈率）が、測定値の安定性・確度・精度に大きな影響を及ぼす（例えば、Bong and Lee, 1997; Olsen et al., 2006）。また、EA/IRMS 測定では同一の燃焼系で連続して測定するため、燃焼炉内に燃えかすが蓄積することによって燃焼位置が上昇し、不完全燃焼を引き起こすという問題もある。そのため、EA/IRMS を用いて、安定同位体比を正確に精度良く測定するためには、同位体比既知の標準試料を用いて EA/IRMS のコンディションを常にモニタリングすることや、適切なキャリブレーション法を用いる必要がある（例えば、Ohlsson and Wallmark, 1999; Schmitt et al., 2003; 力石, 2008; Ogawa et al., 2010）。一方で、これらの問題の解決に多くの時間と手間をかけすぎしまうと、決められた費用と時間内で、分析できるサンプル数が減ってしまうという問題もあり、とくに多数量の試料をルーチンで測定するような研究室では、大きな問題になる。

本報では、Dual Inlet 法と EA/IRMS 法の原理をレビューし、また、著者らが通常行っている EA/IRMS による安定同位体比の測定方法（比較的簡単に、効率よくキャリブレーションできる分析方法）を紹介する。

2. 安定同位体比の表し方

安定同位体の天然存在比は標準物質による千分偏差 (δ 値, 単位 ‰) で表される (式 1)。標準物質は測定対象元素ごと国際的に定められている (Table.1)。 δ 値が正であれば、標準物質よりも重い同位体比に富み (同位体的に重い)、負であれば標準物質よりも軽い同位体比に富む (同位体的に軽い) ことを示す。

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

$$R = H/L$$

H と L はそれぞれ重い (heavy) と軽い (light) 同位体を表す (例えば, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$)。

3. Dual Inlet による炭素、窒素安定同位体比の測定方法

Dual Inlet システムとは、質量分析計分析部へのガス導入部分に 2 つのガスだめを装備し、一方に比較ガス (レファレンスガス)、もう一方にガス化精製した試料ガスを入れ、交互に分析部へ導入して測定するシステムである。純粋なガスを複数回繰り返して測定して値を得るため、一測定の精度は continuous-flow システムに比べ、およそ一桁良いが、測定に要する試料が充分確保できる必要がある (Table 2)。

炭素、窒素の安定同位体比を測定するには、何らかの方法で試料をガス化し、真空ライン等を使って純粋な CO_2 ガスもしくは N_2 ガスの形にしなければならない。一般的な有機物の封緘燃焼

Table 1. Isotope compositions of international standards.

	Ratio, H/L*	Value, H/L*	H %	L %
Vienna Standard Mean Ocean Water (VSMOW)	$^2\text{H}/^1\text{H}$	0.00015576	0.015574	99.984426
	$^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$	0.0003799	0.0379	99.76206
	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$	0.0020052	0.20004	99.76206
Vienna PeeDee Belemnite (VPDB)	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	0.01118	1.1056	98.8944
	$^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$	0.0003859	0.0385	99.7553
	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$	0.0020672	0.2062	99.7553
Air (AIR)	$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$	0.0036765	0.3663	99.63370

*H and L indicate heavy and light isotope components, respectively.
Ratio Values are taken from Fry (2006).

Table 2. Comparison of Dual Inlet and EA/IRMS

Target	Element	Size	Precision (%)	Capacity	
				Preparation	Measurement
Dual Inlet	Gas	C	0.05-0.1	3 day	15 min
		N			
		H	0.5-3.0	1 week	20 min
EA/IRMS	Bulk	C	0.1-0.5	1 day	10 min
		N			
		O	1-10 μmol		15 min
		H	5-50 μmol		

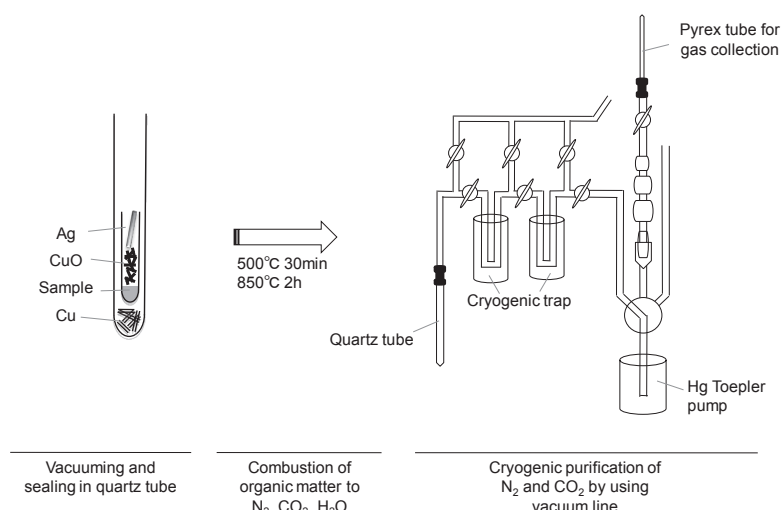


Fig. 1. Schematic of Dual Inlet method for carbon and nitrogen isotope analysis.

の方法を Fig. 1 に示す。有機物を、酸化銅・還元銅・銀と共に石英管に真空封入後加熱し (500℃で 30min, 850℃で 2h), CO_2 , N_2 , H_2O に分解する。これらのガスを真空ラインと寒剤を使って分離精製し、安定同位体比質量分析計 Dual Inlet システムに導入して測定する。一般的に、 CO_2 のトラップとして、液体窒素 (−196℃), H_2O のトラップとして、ドライアイス / エタノール (−72℃) などを用いる。また、 N_2 は、寒剤でトラップすることが難しいため、水銀ポンプで回収する。

レファレンスガスには、PDB などの標準物質から精製したガスを使用するのが理想的である。しかし実際には PDB などはずでに入手不可能であるため、代替として同位体比の明らかな別の物質 (標準試料) から精製したガスを使用する。一般には IAEA が管理・販売している国際標準試料 (Table 3) か、これらの国際標準試料を用いて値を決めた孫世代の標準試料 (二次標準) から精製したガスを用いる。これらは測定用標準試料 (ワーキングスタンダード), 測定用標準ガス (ワーキングレファレンスガス) などと呼ばれ、自作する研究室も多い。また、現在では値付けされたガスが Oztech 社から販売されている。いずれの場合においても、国際標準試料を用いて、レファレンスガスの同位体比の定期的な検証を行っておくことが望ましい。

Table 3. International references and their $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values.

Name	Abbreviation	Isotope ratio (‰)			
		δD VSMOW	$\delta^{18}\text{O}$ VSMOW	$\delta^{13}\text{C}$ VPDB	$\delta^{15}\text{N}$ AIR
International standard (from IAEA and NIST)					
VSMOW Water		0	0		
SLAP2 Water		-428	-55.5		
GISP Water		-189.5	-14.8		
Benzoic Acid	IAEA-601		23.3		
Benzoic Acid	IAEA-602		71.4		
Polyethylene	IAEA-CH-7	-100.3		-32.2	
Cellulose	IAEA-CH-3			-24.7	
Sucrose (ANU)	IAEA-CH-6			-10.4	
TS-Limestone	NBS 19		28.7	1.95	
Ammonium Sulfate	IAEA-N-1				0.4
Ammonium Sulfate	IAEA-N-2				20.3
Porassium Nitrate	IAEA-NO-3		25.6		4.7
Other reference materials (from Indiana Univ.)					
Acetanilide #1				-29.5	1.18
Acetanilide #2				-29.5	19.6
Acetanilide #3				-29.5	40.6
Urea #1				-34.1	0.26
Urea #2				-8.02	20.2
Urea #3				11.7	40.6
Benzoic acid #A			23.1	-28.8	
Benzoic acid #B			71.3	-28.9	
Other reference materials (from SI science)					
L-Alanine				-19.6	1.54
Histidine				-11.4	-7.6
Glycine				-33.8	1.3
L-Alanine N enriched				-19.6	20.0

4. EA/IRMS による安定同位体比の測定方法

4.1. 原理

EA/IRMS の概略を Fig. 2 に、得られるクロマトグラムを Fig. 3 に示す。

EA/IRMS は EA 部で試料の導入、燃焼、ガス分離を、ConFlo 部で流量調整とレファレンスガスの導入を、IRMS 部で同位体比の測定を行う。

EA/IRMS を制御するための PC からスタート信号を送ると EA 部のオートサンプラーが動き、サンプルは 1000 ~ 1050℃ の酸化炉 (Ox 側) に超高純度 (99.9999%) の He キャリアガスと共に導入される。導入と同時に超高純度酸素ガス (99.9999%) が導入され、サンプルを包んだスズの酸化熱でサンプルは 1800℃ に達し瞬間的に燃焼され、充填された酸化剤 (Cr_2O_3) で CO_2 , NO_x , H_2O に変換される。サンプル中のハロゲンは酸化炉後部に充填された $\text{Co}_3\text{O}_4/\text{Ag}$ で除去される。 NO_x は還元炉 (Red 側) で N_2 に変換され、 H_2O は水トラップ: $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ で除去される。 CO_2 と N_2 の混合ガスは GC カラムで分離され、ConFlo 部で流量を調整した後 IRMS 部へと送られる。

ConFlo 部にはレファレンスガス (超高純度, 99.999% 以上の CO_2 と N_2 ボンベガス) が接続されており、IRMS 部へ N_2 や CO_2 ガスが He キャリアーガスと共に流れ、同位体比を測定するタイミングに合わせてレファレンスガスを導入する。また、炭素・窒素同位体比を同時に測定する場合、一般的にサンプル中の炭素含有量は窒素の含有量よりも多いことから、 CO_2 を測定するタイミングに合わせて希

釈をするための He ガスの導入も ConFlo 部で行う。

IRMS へ導入されたガスは Ion Source でイオン化され、マグネット部で質量分離された後、3 つの検出器で同時に検出される。 N_2 測定モードでは、 m/z 28, 29, 30 が測定され、 m/z 28, 29 の強度 (ピーク面積) は、それぞれ式 2, 3 に対応し、

$$28 = {}^{14}\text{N}{}^{14}\text{N} \quad (\text{式 } 2)$$

$$29 = {}^{14}\text{N}{}^{15}\text{N} + {}^{15}\text{N}{}^{14}\text{N} \quad (\text{式 } 3)$$

これらの式から式 4 が導かれ、 ${}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N}$ が得られる。

$$29/28 = 2 \times ({}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N}) \quad (\text{式 } 4)$$

また、 m/z 30 で NO などの還元不足による生成物をモニターする。

一方、 CO_2 測定モードで測定される m/z 44, 45, 46 の強度は、式 5, 6, 7 に対応し、

$$44 = {}^{12}\text{C}{}^{16}\text{O}{}^{16}\text{O} \quad (\text{式 } 5)$$

$$45 = {}^{13}\text{C}{}^{16}\text{O}{}^{16}\text{O} + {}^{12}\text{C}{}^{17}\text{O}{}^{16}\text{O} + {}^{12}\text{C}{}^{16}\text{O}{}^{17}\text{O} \quad (\text{式 } 6)$$

$$46 = {}^{13}\text{C}{}^{17}\text{O}{}^{16}\text{O} + {}^{13}\text{C}{}^{16}\text{O}{}^{17}\text{O} + {}^{12}\text{C}{}^{17}\text{O}{}^{17}\text{O} + {}^{12}\text{C}{}^{18}\text{O}{}^{16}\text{O} + {}^{12}\text{C}{}^{16}\text{O}{}^{18}\text{O} \quad (\text{式 } 7)$$

これらの式から式 8, 9 が導かれる。

$$45/44 = {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C} + 2 \times ({}^{17}\text{O}/{}^{16}\text{O}) \quad (\text{式 } 8)$$

$$46/44 = 2 \times ({}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C})({}^{17}\text{O}/{}^{16}\text{O}) + ({}^{17}\text{O}/{}^{16}\text{O})^2 + 2 \times ({}^{18}\text{O}/{}^{16}\text{O}) \quad (\text{式 } 9)$$

式 8, 9 の連立方程式は変数が 3 つあるので、このままでは解くことができない。そこで、地球上での ${}^{17}\text{O}/{}^{16}\text{O}$ と ${}^{18}\text{O}/{}^{16}\text{O}$ の関係式 (式 10) (Craig, 1957; Santrock et al., 1985)

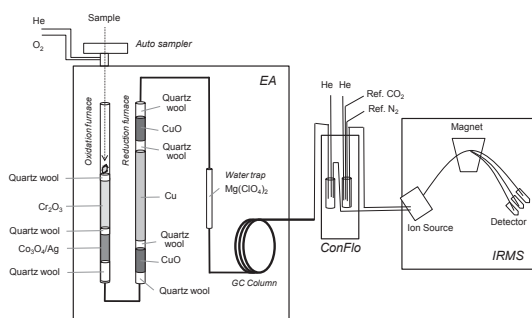


Fig 2. Schematic of EA/IRMS system.

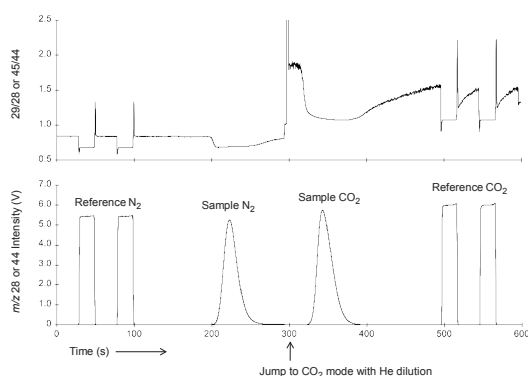


Fig 3. Representative chromatogram of EA/IRMS.

$$^{17}\text{O}/^{16}\text{O} = 0.0099235 \times (^{18}\text{O}/^{16}\text{O})^{0.516} \quad (\text{式 } 10)$$

を用いて、 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ と $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ を得る。通常、これらの計算は全て、EA/IRMS 付属の PC ソフトウェアで自動的に行われ、レファレンスガスに対する試料の δ 値が出力される。ここで得られる同位体比は、あくまでも暫定値であり、国際スタンダードに対する試料の δ 値ではないことに注意して頂きたい (国際スタンダードスケールへのキャリブレーション法は、4.3 章を参照)。

なお、得られる酸素同位体比 ($\delta^{18}\text{O}$) は、主に試料と同時に導入した酸素ガスや酸化剤由来の酸素の同位体比である。この値から酸化の状態 (不完全燃焼になっていないか) をモニターすることができる。

4.2. 試料の調整

EA/IRMS で 1 回の測定に使用する試料の量は、一般的な有機物では炭素測定で 0.1 mg (炭素の量で約 30 μg)、窒素測定で 1.0 mg (窒素の量で約 80 μg) 程度である。これ以下の導入量では、得られる出力が充分ではなく、きちんとした同位体比が測定できない場合がある (量依存性がある)。Fig. 4 にサンプル導入量による測定値の変動を示す。例えば、 m/z 44 の出力で 1000 mV 以上、 m/z 28 の出力で 3000 mV 以上では、得られる炭素・窒素同位体比は安定しているが、 m/z 44 の出力で 1000 mV 以下、 m/z 28 の出力で 3000 mV 以下では、得られ

る炭素・窒素同位体比は、実際の値よりも重くなる傾向がある。そのため、正しく同位体比を測定するためには、適切なサンプル量を導入することが必要である。

サンプリング誤差を少なくするために、試料は測定前にできるだけ均一に (微粉末状に) しておく必要がある。次に、粉末試料を 5 × 9 mm (直径 × 高さ) のスズコンテナに秤取る。スズコンテナは元々炭素のブランクをもっており (スズの製作過程でコークスを使用しているため)、それらの影響に係わる物質をできるだけ取り除くために、また、ブランク値を一定にするためにも、あらかじめメタノール・ジクロロメタン混合溶媒で洗浄、乾燥したものを使用する。試料を秤取ったスズコンテナは、空気中の窒素分のコンタミネーションを防ぐため、空気を押し出すようにしてピンセットで丸める。

4.3. 補正とキャリブレーション

PC から出力された同位体比は、レファレンスガスに対する試料の δ 値 (暫定値) であり、国際スタンダードに対する δ 値へキャリブレーションする必要がある。また、EA/IRMS での測定は、Dual Inlet の測定と異なり He キャリアガスにのせて、同一の燃焼炉内で試料を順次燃焼し、ConFlo で一部のガスを細いキャピラリーを通して IRMS に送り込むため、装置各部における同位体分別 (どちらか一方の同位体の優先的導入) や、IRMS 固有

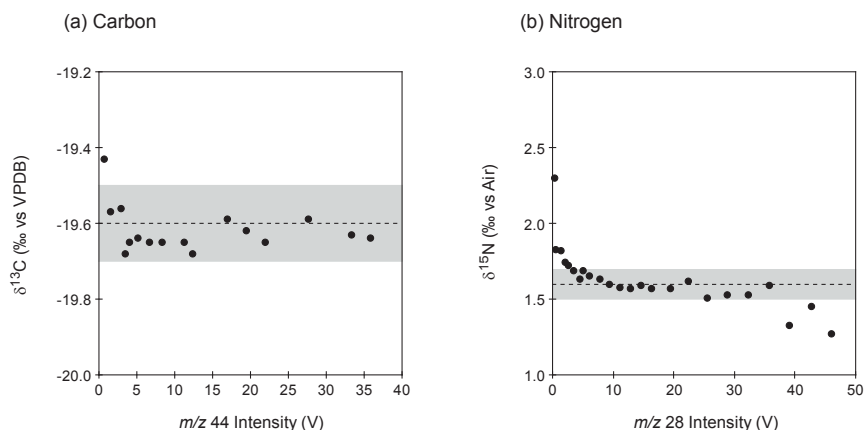


Fig. 4. Relationship between sample amount and determined d values: (a) carbon and (b) nitrogen. The marked area indicates the actual value with an error of 0.1‰.

の特性によって、測定 δ 値／本来の δ 値 = 1.0 に
ならず一定の傾きを持つ場合があるという問題
がある。また、1つの燃焼炉で連続して試料を酸
化するため、燃焼炉内に燃えかすが蓄積すること
によって燃焼位置が上昇し、不完全燃焼を引き起
こすという問題もある。

そのため、EA/IRMS を用いて安定同位体比を
正確に精度良く測定するためには、同位体既知の
標準試料（国際標準試料が理想的であるが、大量
入手ができないため一般的にはワーキングスタン
ダード）を用いてこれらの補正と国際スタンダー
ドスケール（窒素では Air，炭素では VPDB）への
キャリブレーションを行う必要がある。一般的に
は、Table 4 に示す Sequence-1 のように、 δ 値の異な
るワーキングスタンダード（できれば3種類以上）
をサンプル十試料毎に測定し、ワーキングスタン
ダードの測定で得られた暫定値（レファレンスガ
スに対する δ 値）と本来の δ 値（国際スタンダード
に対する δ 値）から、1次直線（検量線）を作製し、
その検量線を用いて試料の δ 値を計算する。また、
EA/IRMS のコンディションを常にモニタリングす
るためにも、ワーキングスタンダードを使用する。

しかし一方で、これら補正とキャリブレーション
に多くの時間と手間をかけすぎしまうと、決
められた費用と時間内で、分析できるサンプル数
が減ってしまうという問題もあり、とくに多数量
の試料をルーチンで測定するような研究室では、
大きな問題になる。そこで、著者らは、Table 4 に
示す Sequence-2 のようなキャリブレーション・モ
ニタリング法を採用している。まず、 δ 値の異な
るワーキングスタンダード3種類を用意する。実
試料を測定する前に1つのワーキングスタンダー
ドを用いて装置・得られる δ 値の安定性・再現性
を確認し、また同時に、ワーキングスタンダード
の本来の δ 値＝出力値となるように、PC ソフトウ
ェア上で、レファレンスガスの見かけの δ 値を設
定する。その後3種類のワーキングスタンダード
を測定して、既知の δ 値と得られた測定値（出力
値）との関係式（検量線）を作成する。ここで、3
種類のワーキングスタンダードの出力値が既知の
 δ 値（測定 δ 値／本来の δ 値 = 1.0）を示せば、実試
料に対するキャリブレーションは行わずに、出力
値をそのまま国際スタンダードスケールの結果と

することができる。そして実試料の測定時に、測
定するサンプルの δ 値にあわせて、10～15 試料
ごとに1～3つのワーキングスタンダードを測定
し、その測定値がずれていないことを確認する。
このようなキャリブレーション・モニタリング法
を用いると、比較的簡単に正しい同位体比を測定
することができる。

4.4. 炭素、窒素同時測定による He 希釈の影響

炭素と窒素を同時に測定しようとするとき、一般
的な試料では、窒素の含有量が炭素のそれに比べ
て著しく小さいため、導入する試料の量は、窒素
測定に合わせた量になる。しかし、そのまま炭素
の同位体比を測定しようとするとき、炭素の出力が
測定できる出力範囲を超えてピークが振り切れて
しまうため、炭素のピークの出現前に分析ライン
に He を入れて、CO₂ の希釈を行う。しかし、こ
の場合、導入される炭素の量と He の量のバラン
スによって測定値が変動する (Fig. 5)。

そこで一般的には、測定するサンプルの炭素含
有量が異なる場合は、できるだけ同一の出力が得

Table 4. Sequences for $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ analysis

	Sequence-1	Sequence-2
Working standard for stability check	A ⋮ A	A ⋮ A
Working standard for calibration	A B C	A B C
Sample	1 2 3 ⋮ 9 10	1 2 3 ⋮ 9 10
Working standard	A B C	A
Sample	11 12 ⋮ ⋮	11 12 ⋮ ⋮

られるサンプルごとに測定し、導入される炭素の量が大きく異なると予想される場合は、炭素の導入量をサンプルと同様の出力となるようにワーキングスタンダードを測定し、補正をする。また、十分なサンプル量を確保できない場合を除いては、炭素・窒素を同時に測定しないという方法もよく使われている。著者らのラボでは、後者を採用している。

4.5. メモリー効果

EA/IRMS ではオートサンプラーから連続でサンプルを測定するため、サンプルの性質や装置の特性、測定するサンプルの同位体比の幅によっては前のサンプルの影響を受ける (メモリー効果)。この影響を調べるために、同位体比の離れているワーキングスタンダードを数点ずつ交互に測定

し、その影響の有無を調査する必要がある。Fig.6 に著者らのラボの装置のメモリー効果を調査した結果を示す。調査には同位体比が軽い試料と重い試料、それらの中間の試料の3種類を用意し、その最大差が20‰程度のもを使用した。メモリー効果が認められる場合、軽い試料を測定した後の重い試料の測定結果は、直後では真値より軽い方へシフトし、2点目・3点目から真値を示す。重い試料を測定した後の軽い試料の測定結果では逆の現象が起きる。著者らのラボではこの影響は許容範囲内に収まっているが、大きな影響がある場合は測定 Method の検討やサンプルを反復測定するなどの対処をしなければならない。

5. 産地判別への応用

安定同位体比を用いた研究は、地球化学分野 (とくに有機地球化学) を中心に発展してきたが、近年の食品の産地偽装などの社会問題で、食の起源や安全性に注目が集まり、その判別・判定の一つのツールとして安定同位体比が使われるようになってきた (例えば、Suzuki et al., 2008; Nakashita et al., 2008)。本稿の最後にその一例を紹介する。

産地判別には膨大なデータベースと、野菜などについては季節変動などを考慮する必要がある (例えば、中野・上原, 2006; Anderson and Smith, 2006) が、特色のある食材 (餌に特徴がある等) に関しては、徐々に解析が進み始めている (例えば、伊永, 2009)。Fig. 7 に、著者らのラボで得られた牛

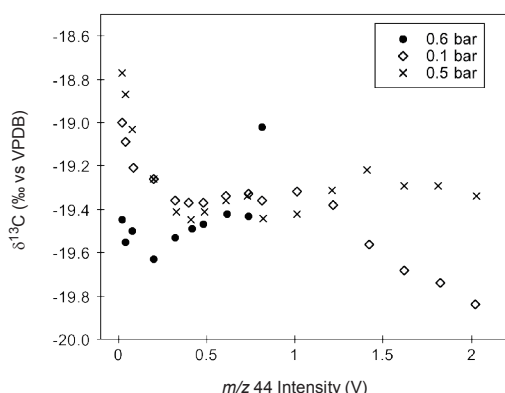


Fig 5. Relationship between He dilution pressure and determined $\delta^{13}\text{C}$ value.

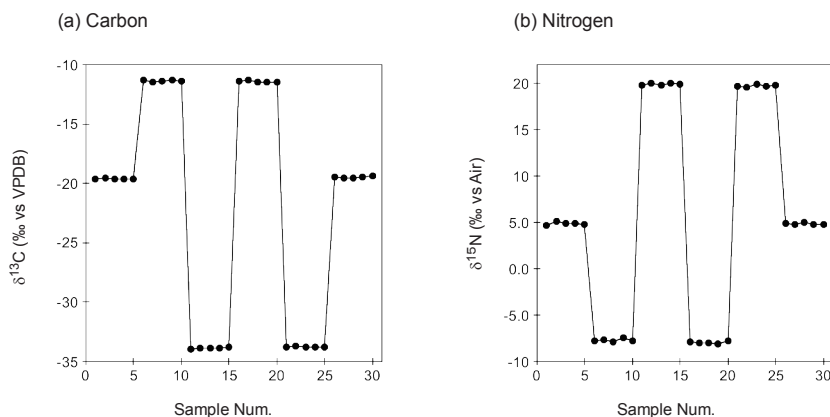


Fig. 6. Precision and memory effects on the replicate analyses for (a) $\delta^{13}\text{C}$ and (b) $\delta^{15}\text{N}$.

肉の炭素・窒素安定同位体比を示す。試料採取時にアメリカ産牛肉の輸入規制があり、アメリカ産牛肉の入手が困難だったため、ニュージーランド産、オーストラリア産、日本各地の「国産」と表示されていた牛肉を比較した。その結果、ニュージーランド産とオーストラリア産の同位体比の分布は国産のものとは異なる位置にプロットされた。動物組織の炭素・窒素同位体比は、主に摂取した食べ物の影響を受ける（例えば、和田，1997）。各国における牛肉の炭素・窒素同位体比の変動は、給餌内容（穀物肥育・牧草肥育など）が反映されたものと考えられる。もちろん、今後、検体数を増やすなどの必要性があるが、この結果は、安定同位体比が、産地判別のツールになる1つの可能性を示唆している。

また、炭素安定同位体比の測定でハチミツへの異性化糖の添加を判定する方法がアメリカ分析化学会（AOAC）オフィシャル法として規定されている。判定はハチミツ全体の炭素安定同位体比と、ハチミツから抽出されたタンパク質の炭素安定同位体比を測定し、式11で算出した $C4_{sugar}$ 値が7%以上で異性化糖を添加したハチミツであると判定される。

$$C4_{sugar} = (\delta^{13}C_P - \delta^{13}C_H) / (\delta^{13}C_P - (-9.7)) \times 100 \quad (\text{式 11})$$

$\delta^{13}C_P$ = ハチミツから抽出されたタンパク質の炭素安定同位体比

$\delta^{13}C_H$ = ハチミツ全体の炭素安定同位体比

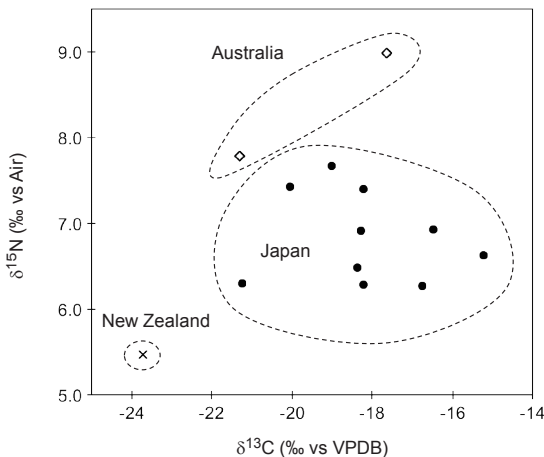


Fig 7. $\delta^{13}C$ - $\delta^{15}N$ plot of beef samples.

著者らのラボで、ハチミツに異性化糖の添加量を変えて混合したときのハチミツ全体と抽出タンパク質の炭素安定同位体比、その結果から算出されたAOAC法による数値の変化の結果をFig. 8に示す。ハチミツのたんぱく質は、10～12gのハチミツに4mLの蒸留水と、2mLの $Na_2WO_4 \cdot H_2O$ と2mLの0.335 mol/L 硫酸の混合液を加えて、80℃のウォーターバスで反応後、沈殿物を1500 rpmで遠心分離し抽出した（たとえば、Jonathan W. White, 1989）。ハチミツから抽出されたタンパク質の炭素安定同位体比は変化しないが、ハチミツ全体の炭素安定同位体比と $C4_{sugar}$ 植物由来糖分の割合（ $C4_{sugar}$ 値）は異性化糖添加により上昇し、異性化糖の添加割合が12%を超えたところで $C4_{sugar}$ 値は7%を超える。

謝 辞

スズの洗浄方法、分析方法について、力石嘉人博士、小川奈々子博士（海洋技術研究開発機構）にたくさんのアドバイスをいただきました。装置の原理について、大堀基己氏（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社）にご教授いただきました。心より厚くお礼申し上げます。

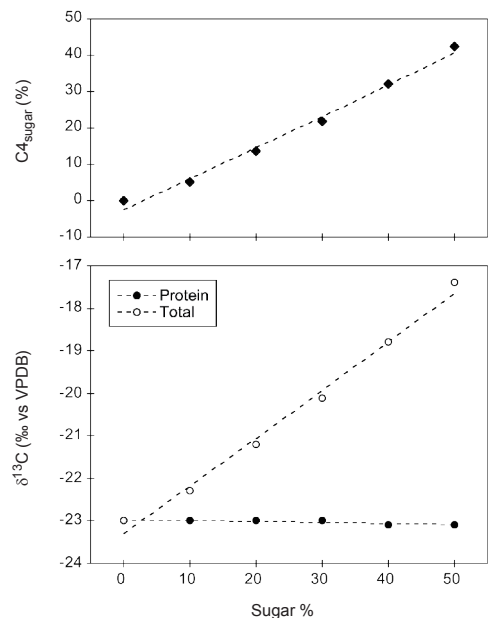


Fig 8. $\delta^{13}C$ of $C4_{sugar}$ -contaminated honey.

引用文献

- Anderson K. A. and Smith B. W. (2006) Effect of season and variety on the differentiation of geographic growing origin of pistachios by stable isotope profiling. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 1747-1752.
- Bong Y. and Lee. K. (2007) A fast, simple calibration method for organic carbon isotope analysis using continuous-flow elemental analyzer interfaced with an isotope ratio mass spectrometer. *Anal. Sci.* **23**, 1447-1449.
- Brand W. A. (1998) Isotope ratio mass spectrometry: Precision from transient signals. In: Karjalainen E. J., Hesso A. E. and Karjalainen U. P. (Eds.), *Advance in Mass Spectrometry* **14**, Elsevier Science Publishers B.V., pp. 655-679.
- Brenna J. T., Corso T.N., Tobias H. J. and Caimi R. J. (1997) High-precision continuous-flow isotope ratio mass spectrometry. *Mass Spectrum. Rev.* **16**, 227-58.
- 力石嘉人 (2008) 炭素・窒素同位体比測定法・環境中の腐食物質, 167-173.
- DeNiro M. J. and Epstein S. (1978) Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochim. Cosmochim. Acta* **42**, 495-506.
- DeNiro M. J. and Epstein S. (1980) Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochim. Cosmochim. Acta* **45**, 341-351.
- Fry B. (2006) *Stable Isotope Ecology*, Springer Science+Business Media, LLC.
- Fry B, Brand W., Mersch F. J., Tholke K. and Garritt R. (1992) Automated analysis system for coupled $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ measurements. *Anal. Chem.* **64**, 288-291.
- 伊永隆史 (2009) 安定同位体の動態解析研究と食の安全における産地識別応用. *臨床科学* **38**, 257-265.
- Minagawa M., Winter D. A. and Kaplan I. R. (1984). Comparison of kjeldahl and combustion method for measurement of nitrogen isotope ratio in organic matter. *Anal. Chem.* **56**, 1859-1861.
- Matthias S., Iain R., Rolf S. and Markus L. (1998) Oxygen isotope analysis of cellulose: An interlaboratory comparison. *Anal. Chem.* **70**, 2074-2080.
- Nakashita R., Suzuki Y., Akamatsu F., Iizumi Y., Korenaga T. and Chikaraishi Y. (2008) Stable carbon, nitrogen, and oxygen isotope analysis as a potential tool for verifying geographical origin of beef. *Anal. Chim. Acta* **617**, 148-152.
- 中野明正・上原洋一 (2006) 葉菜類の $\delta^{15}\text{N}$ 値に及ぼす肥料の影響, 野菜茶業研究所研究報告 No.5
- Ogawa N. O., Nagata T., Kitazato H. and Ohkouchi N. (2010) Ultra sensitive elemental analyzer/isotope ratio mass spectrometer for stable nitrogen and carbon isotope analyses. In: Ohkouchi N., Tayasu I. and Koba K. (Eds.), *Earth, Life and Isotopes*, Kyoto University Press, in press.
- Ohlsson K. E. A. and Wallmark P. H. (1999) Novel calibration with correction for drift and non-linear response for continuous flow isotope ratio mass spectrometry applied to the determination of $\delta^{15}\text{N}$, total nitrogen, $\delta^{13}\text{C}$ and total carbon in biological material. *Analyst* **124**, 571-577.
- Olsen J. Seierstad I., Vinther B., Johnsen S. and Heinemeier J. (2006) Memory effect in deuterium analysis by continuous flow isotope ratio measurement. *Int. J. Mass. Spectrom.* **245**, 44-52.
- Preston T. and Owens N. J. P. (1983) Interfacing an automatic elemental analyser with an isotope ratio mass spectrometer: the potential for fully automated total nitrogen and nitrogen-15 analysis. *Analyst* **108**, 971-977.
- Schmitt J., Glaser B. and Zech W. (2003) Amount-dependent isotopic fractionation during compound-specific isotope analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**, 970-977.
- 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.
- 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 (*Japanese Journal of Ecology*) **47**, 333-336.
- Wada E. and Hattori A. (1976) Natural abundance of ^{15}N in paniculate organic matter in the North Pacific Ocean. *Geochim. Cosmochim. Acta* **40**, 249-251.
- White J. W. (1989) Honey protein as internal standard for stable carbon Isotope ratio detection of adulteration of honey. *J. ASSOC. Off. Anal. Chem.* **72**, 907-911.