

# 安定同位体比質量分析計共同利用へ向けての準備

三重大学生物資源学研究科共生環境学専攻

○野呂明美

noro@bio.mie-u.ac.jp

## 1. はじめに

生物資源学研究科に設置された安定同位体比質量分析計の学部内共同利用へ向け、保守・管理を業務の一部として担うことになり、京都大学生態学研究センターにて2011年8月27日(土)～9月2日(金)に開催された「安定同位体生態学ワークショップ」へ参加し、安定同位体比質量分析計の操作および分析について学ぶ機会を得た。安定同位体比から何が分かるのか、どのような分野で応用されているのか、また、学部内共同利用へ向けてスタンダード値の決定など準備状況を報告する。

## 2. 生物資源学研究科に設置されている安定同位体比質量分析計の現況

写真1は当研究科に設置された Thermo Fisher Scientific 社製 安定同位体比質量分析計 Delta V と前処理装置である。前処理装置として炭素・窒素分析用元素分析計 Flash2000, 酸素・水素分析用元素分析計 TCEA, 液体サンプル用ガスベンチが用意されている。現時点では窒素・炭素の測定に限って学部内共同利用を認めている。安定同位体比質量分析計および元素分析計を維持管理するためにはかなり高額な費用負担が発生する。共同利用へ向けて利用規定の作成, 費用負担については運営状況を見ながらどうするのかその判断が今後の課題となっている。設置場所は他研究分野のご好意により間借りさせていただいている状況にあり、写真の通りかなり手狭である。



写真1 安定同位体比質量分析システム

## 3. 安定同位体比とは

安定同位体比の定義は測定試料の安定同位体の存在比 ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) と各元素について定めた国際標準物質の安定同位体比からのずれとして千分率 (‰, パーミル) で表わされる。炭素安定同位体比は下式で定義される。<sup>1)</sup>

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{測定試料}} = \left\{ \left( \frac{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}}{\text{測定試料}} \right) / \left( \frac{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}}{\text{標準物質}} \right) - 1 \right\} \times 1000 \quad (\text{単位は‰})$$

つまり、 $\delta$  値が正の値を取るときは重い方の同位体がスタンダードより多く含まれている、負の値を取るときは重い方の同位体がスタンダードより少ないということである。

炭素を例にとり、安定同位体比の利用の一例を説明する。自然界には軽い同位体  $^{12}\text{C}$  が約 98.89% 存在するのに対し、重い同位体  $^{13}\text{C}$  は約 1.11% 存在する。この軽い同位体と重い同位体の存在比率は生物間あるいは地球上の場所によりわずかに異なっていることが知られている。表1に試験的に測定したトウモロコシ澱粉, ジャガイモ澱粉, 小麦澱粉の測定結果を示す。C3植物であるジャガイモや小麦とC4植物であるトウモロコシでは、光合成回路が異なるため炭素同位体比が異なる。最近、純米酒と表示されている日本酒にトウモロコシを主原料とする醸造アルコールが添加され販売され問題となった。この問題はC3植物であるコメとC4植物であるトウモロコシの炭素安定同位体比

表1 トウモロコシ・ジャガイモ・小麦の炭素安定同位体比

Sample name	$\delta^{13}\text{C}$		N
	SD	Mean	
Starch corn	0.175	-10.48502	3
Starch potato	0.007	-27.72258	2
Starch wheat	0.165	-23.75996	3

$\delta^{13}\text{C}$  Scaled by NBS19 and L-SVEC

の違いを利用して科学的に証明することができる。

図1で示すように植物を植物食動物が食べ、植物食動物を肉食動物が食べる食物連鎖網の中で、窒素安定同位体比 ( $\delta^{15}\text{N}$ ) は食物連鎖の栄養段階を表し、炭素安定同位体比 ( $\delta^{13}\text{C}$ ) は生息域を表すことが知られている。従って、動植物の窒素・炭素安定同位体比を調べ、プロットすると捕食関係が分かり食物連鎖網の解明が出来る。例えば魚類ではどこに生息する植物プランクトンを餌にしているのかなど魚の行動・生態を解明するために安定同位体比が利用されたりしている。この様に安定同位体比の利用は幅広い分野に及んでいる。

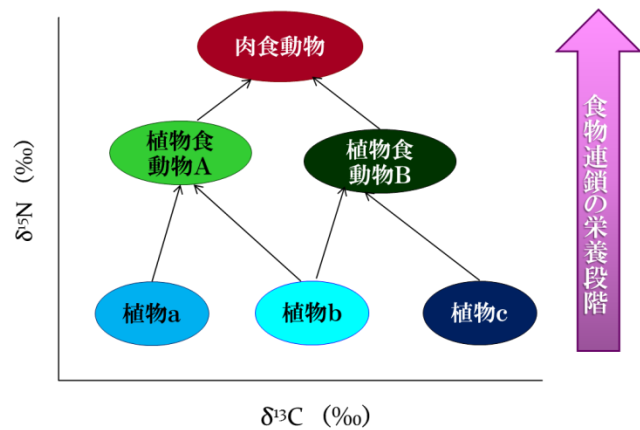


図1 食物連鎖網

#### 4. 共同利用へ向けて

##### 4-1 Moodle サイトの立上げ

写真2に示すMoodleサイト「安定同位体比質量分析計利用者グループ」を立ち上げ、使用予約、消耗品の補充の連絡を行うようにした。Moodleを使うことにより情報共有が容易になった。また、メンテナンスの記録をMoodle上に残せるようにし、ロータリーポンプ、ターボポンプのオイル交換時期、フィラメントの交換時期などをMoodle上で確認できるようにした。使用マニュアル等のファイルについてもこのサイトから



写真2 Moodle サイト 安定同位体比質量分析計利用者グループ

ダウンロードできるようにし、利用者の利便性を図った。ここには注意書きを書き加えた三重大版マニュアルも用意した。スタンダード値の記録については使い勝手が悪いためか利用されておらず紙物が利用されている。この点の改善が今後の課題となっている。

##### 4-2 ワーキングスタンダードの決定

安定同位体比は、前述の通りサンプルと標準物質の安定同位体比のずれから決定される。実際に測定する場合は、国際標準物質は高価なため、測定するサンプルと近い値を持つ試薬をワーキングスタンダードとして選定し使用する。安定同位体比を測定する際は、通常ワーキングスタンダードを数個測定し、装置の状態を確認してからサンプルの測定を開始する。サンプルを数個測定してはその次にワーキングスタンダード、サンプルを数個、ワーキングスタンダードといった具合にオートサンプラーへ試料を配置する。本研究科では元素分析計と安定同位体比質量分析計を接続し、EA-IRMS システムとして使用している。炭素・窒素の測定では錫箔に試料を極微量包みオートサンプラーから元素分析計に導入する。安定同位体比質量分析では導入される試料の量によりイオン化効率が変わるため測定値が変化する量依存の効果や試料の同位体比が幅広く分布する場合はスケール効果を考慮する必要がある。このため安定同位体比質量分析では予め同位体比が分かっている標準物質を何種類か用意する必要がある。今回、三重大学生物資源学研究所と鳥取大学乾燥地技術センターの安定同位体質量分析計で使用する

ためのワーキングスタンダード用試薬を決定し、その値を測定した。まず、2012年5月30日～6月1日、松尾講師の指導の下、鳥取大学乾燥地技術センター技術部の財原氏と野呂の3名で炭素および窒素安定同位体測定のためのワーキングスタンダード値を決定するための測定を行った。次に、2012年7月25日～7月27日に財原氏が鳥取大学乾燥地技術センターのIRMSで測定を行った。表2に一例として2012年9月12日～9月13日に三重大学で松尾講師と野呂で測定を行った結果を示す。これら合計3回の実験データを集め、ワーキングスタンダード値を決定した。

ワーキングスタンダード用試薬はスパチュラで予め攪拌して均一になるようにかき混ぜ、バイアルビンに分け詰めた。正確な値を測定するため、キーポイントとなるのは試料を錫箔に包む量である。リファレンスガスとピークの高さが合うようNについては Amp28= 4600mV、Cについては Amp44= 5300mV になるようにそれぞれの試薬のNおよびCの含有量を求め、錫箔に包む試料の量を計算した。量依存を排除するため試料毎、重量を揃え錫箔に試料を包んだ。極めて重要であるこの作業は松尾講師が行った。得られたデータは期待した精度が得られており、使用に支障がないことを確認した。これにより今後、装置の使用を希望する研究者に対し、測定に必要なワーキングスタンダードを提供できる準備が出来た。

表2 国際標準物質とワーキングスタンダードの安定同位体比

Mie Univ (2012/9/12-9/13)				
Standard name	Literature value	d15N**		
		Mean	SD	N
USGS40	-4.5	-4.650	0.044	7
IAEA-N-1	0.4	0.400	0.057	11
IAEA-N-2	20.3	20.300	0.047	11
DL-Alanine (MIE)		-2.138	0.038	18
Glycine		1.458	0.039	10
L-Threonine		-2.633	0.048	8
L-Tyrosine (ALRC)		6.659	0.055	10
DL-Alanine (CER old)	-1.61*	-1.693	0.060	10
L-Tyrosine (CER old)	5.60*	5.500	0.013	4

Mie Univ (2012/9/12-9/13)				
Standard name	Literature value	d13C***		
		Mean	SD	N
NBS19	1.95	1.950	0.037	10
IAEA-CH-3	-24.724	-24.772	0.077	7
IAEA-CH-6	-10.449	-10.467	0.024	7
L-SVEC	-46.6	-46.600	0.044	10
DL-Alanine (MIE)		-25.530	0.033	18
Glycine		-33.234	0.025	10
L-Threonine		-9.805	0.056	10
DL-Alanine (CER old)	-23.79*	-23.858	0.019	10
L-Tyrosine (CER old)	-26.58*	-26.587	0.019	5

\* Tayasu et al. (2011)

\*\* d15N scaled by IAEA N-1 & N-2

\*\*\* d13C scaled by NBS19 & L-SVEC

### 4-3 安全対策

酸素安定同位体比測定時に、一酸化炭素をレファレンスガスとして用いるため、安全対策が必要である。写真3は廊下に設置されたCOガス警告灯である。警告灯のそばのドアには警告灯が鳴った際の対処方法、および連絡先が書かれた文書を和文と英文で掲示している。室内に入るとドアの横に写真4で示すCOガス濃度センサが設置されている。警告灯が鳴った時に入室するための防毒マスクは学部総務担当が保管している。写真5はCOガスボンベと水素ガスボンベを格納しているガスキャビネットとその上に設置されている安全装置



写真3 COガス警告灯



写真4 COガス濃度センサ



写真5 ガスキャビネットと安全装置

写真6 COガス排気ダクト

である。電磁弁が付いていて停電等があった場合には電磁弁を閉じてCOガスを遮断するよう設計されている。レファレンスガスとして使用されたCOガスは写真6の通りダクトから屋外へ排出されるようになっている。使用するCOガスはごく微量であるため屋外への排出は問題ない。安全対策については学生に周知している。

## 5. おわりに

現時点では利用希望者が少ないため個別に操作方法等を教授しているが、今後、利用希望者が増えてきた場合は年1~2回講習会を開催する予定である。高額なランニングコストがかかる機器を維持していくためには費用負担する人の数がある程度必要である。幅広い分野で利用されている装置である。今後の活用が期待される。

## 謝辞

安定同位体比質量分析計の理論・操作等を指導していただいている松尾先生、一緒にワーキングスタンダード値を測定した鳥取大学乾燥地技術センターの財原氏、ワークショップへの参加を認め職務として安定同位体比質量分析計に関わることを許可していただいた吉岡前研究科長に記して深謝致します。

## 参考文献

- 1) Ichiro Tayasu, Riyo Hirasawa, Nanako O. Ogawa, Naohiko Ohkouchi, Keita Yamada, New Organic reference materials for carbon- and nitrogen-stable isotope ratio measurements provided by Center for Ecological Research, Kyoto University, and Institute of Biogeosciences, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology, Limnology, DOI 10.1007/s10201-011-0345-5.
- 2) 安定同位体生態学ワークショップ2011, 京都大学生態学研究センター.
- 3) 豊川雅哉, 元素分析計-質量分析計システムによる炭素・窒素安定同位体比分析における測定可能な試料量, および測定値の偏りについての検討, 中央水研研報, 16, 27-37 (2001).
- 4) 高津文人, 河口洋一, 布川雅典, 中村太士, 炭素, 窒素安定同位体自然存在比による河川環境の評価, 応用生態工学, 7(2), 201-213 (2005).