

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

誌名	中央水産研究所研究報告
ISSN	09158014
著者	豊川, 雅哉
巻/号	16号
掲載ページ	p. 27-37
発行年月	2001年3月

## 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

豊川 雅哉

### Investigation of the Measurable Range of Sample Amount and Bias of the Carbon and Nitrogen Stable Isotope Ratio Analyzed by Elemental Analyzer-Isotope Ratio Mass Spectrometer System

Toyokawa Masaya\*

**Abstract:** The elemental analyzer-Isotope ratio mass spectrometer (EA-IRMS) system at the National Research Institute of Fisheries Science was tested for the measurable range of sample amount, the dependence of the isotope ratio on sample amount, and bias of the isotope ratio which is introduced by helium (He) dilution of CO<sub>2</sub> gas. The nitrogen and carbon isotope ratio of L-alanine prepared as the working standard was -2.4‰ (s.d.=0.10‰) and -22.06‰ (s.d.=0.011‰), respectively. Signal height of the major isotope (28 for N<sub>2</sub>, 44 for CO<sub>2</sub>) was linearly regressed on sample nitrogen (or carbon) content as long as the signal height was lower than 10 V. Measured delta value was linearly regressed on the signal height (<10 V for δ<sup>15</sup>N measurement, <7 V for δ<sup>13</sup>C measurement), except for δ<sup>13</sup>C measurement at He dilution pressure of 6 psi, where delta value was constant. δ<sup>13</sup>C value at He dilution of 12 psi was highly variable, therefore applicable He dilution pressure was 10 psi or lower. The measurable amount of nitrogen content was 0.021 - 0.265 mg, and carbon content was 0.006 - 4.82 mg.

**Key words:** EA-IRMS, Conflo, weight dependence, reference material, helium dilution, alanine  
キーワード: 超微量ガス同位体比測定装置, オンライン分析, 量依存性, 標準物質,  
ヘリウム希釈, アラニン

2000年10月6日受理 中央水産研究所業績A第95号

\* 中央水産研究所 (National Research Institute of Fisheries Science, Fukuura, Kanazawa, Yokohama 236-8648, Japan)

炭素と窒素の天然安定同位体比の測定は、食物網の解析 (Minagawa and Wada, 1984; Yoshioka *et al.*, 1994; Yoshii *et al.*, 1999) や、落葉有機物の河口堆積物中に占める割合の推定 (Hedges and Parker, 1976; Hayase *et al.*, 1999) など、生態学の様々な局面で有効な手段である。最近までこの測定は時間と熟練を要する作業であったが、元素分析計 (Elemental Analyzer, EA) と質量分析計 (Isotope Ratio Mass Spectrometer, IRMS) を接続したシステム (EA-IRMS) が開発され普及したことにより、分析時間が大幅に短縮され、操作も容易になった (三島, 星加, 1995; 米山, 1996)。それとともに、生態学研究において使用される機会が格段に増加してきている。

窒素および炭素の安定同位体の天然存在比は、一般に下式により、それぞれ空気中の窒素および Pee Dee belemnite (PDB) スタンダードからの千分偏差で表現される:

$$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}} \text{ or } \delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} (\%) = (R_{\text{sample}} - R_{\text{standard}}) / R_{\text{standard}} \times 1000$$

ただし  $R$  は  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  または  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 。一次生産者の炭素安定同位体比は、陸上の C3 型植物では  $-27\%$ 、C4 型植物では  $-14\%$  前後の値を示し、中低緯度海域の植物プランクトンでは  $-20\%$  前後の値を示すことが知られており (和田, 1988; 小川他, 1997 等を参照), 生態系研究への応用においては  $1\%$  オーダーの違いが問題になる。従って分析の際には  $0.1\%$  オーダーの精度が求められる。導入する試料の量によって同位体比の測定値が変化する、いわゆる量依存性や、元素分析計から質量分析計に導入する際に、二酸化炭素をヘリウムガスで希釈することにより生じる測定値の偏りがあることは知られているが (陀安, 1997; 浜中ら, 1998), こうした偏りにはシステムによる固有の特性があって、システムごとに測定されねばならない。本研究では、中央水産研究所の Fisons EA 1108 と Finnigan MAT 252 を接続した EA-IRMS システムについて、正確な同位体比測定を可能にするために、作業標準物質の同位体比を決定し、測定可能な試料の量を検討し、正確な同位体比に換算するための補正の必要性について検討した。

## 試料と方法

**作業標準物質の同位体比の決定** 和光純薬製の L-アラニン  $25\text{ g}$  を乳鉢でよく破碎攪拌して均一化し、作業標準物質 (NRIFS-1) とした。これを Duma 法で封管燃焼し、得られた燃焼ガスを低温法で精製し  $\text{N}_2$  ガスと  $\text{CO}_2$  ガスを分取した (Minagawa *et al.*, 1984)。得られた試料ガスを質量分析計 (Finnigan MAT 252) に導入し、Oztech 社のリファレンスガス ( $\text{N}_2$  ガスは  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}} = -0.49 \pm 0.01$ ,  $\text{CO}_2$  ガスは  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = -10.97\%$ ,  $\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}} = 31.31\%$ ) をリファレンスとして用い、メジャーピーク ( $\text{N}_2$  では質量数 28,  $\text{CO}_2$  では質量数 44) の出力が  $3\text{ V}$  になるよう設定して同位体比を計測した。Oztech 社のリファレンスガスの値を検証するために、National Institute of Standards & Technology (NIST) より購入した標準物質 (N: Reference Material (RM) 8547: IAEA-N1 (ammonium sulfate)  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}} = 0.4 \pm 0.2\%$ , C: RM8541: USGS24 (graphite)  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = -15.9 \pm 0.25\%$ ) と、従来より中央水産研究所で作業標準物質として用いて来たアラニン (Alanine-1:  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}} = -5.3\%$ ,  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = -21.5\%$ ) を同様の手順で分析し、比較した。ただしグラファイトは通常の  $850^\circ\text{C}$  で 4 時間の燃焼では燃え残りがあったので、 $900^\circ\text{C}$  で 48

時間燃焼し、肉眼で燃え残りが無いことを確認した。

**測定可能な試料量と補正の必要性の検討** 同位体比を決定した L-アラニン を秤量してスズカプセルに包み、EA-IRMS システムで窒素および炭素の同位体比の同時分析を行なった。EA-IRMS システムの制御は Finnigan MAT のソフトウェア ISODAT Release 7.2 で行なった。元素分析計のキャリアガスの圧力は 88 kPa、流量は 80 ml sec<sup>-1</sup>、燃焼管、還元管、ガスクロマトカラム (2 m) の温度はそれぞれ 1020 °C、650 °C、50 °C に設定した。燃焼用酸素の注入ループの容量は 10 ml のものを用いた。リファレンスガスとして 1.5 立方メートルのボンベで購入した N<sub>2</sub> ガスと CO<sub>2</sub> ガスを、それぞれ 25 psi、21 psi のガス圧 (出力ピーク約 3 V) で用いた。Oztech 社のリファレンスガスとの比較から、N<sub>2</sub> ボンベガスの  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$  は -4.22‰、CO<sub>2</sub> ボンベガスの  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  は -31.88‰、 $\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}$  は 10.86‰ に設定した。通常、有機物質中では炭素は窒素の数倍存在するため、N<sub>2</sub> ガスと CO<sub>2</sub> ガスを質量分析計の感度を変えずに連続して測定するためには、CO<sub>2</sub> ガスを希釈する必要がある。希釈に用いるヘリウムのガス圧は 0 psi から 12 psi までの範囲で設定した。各希釈値についてのサンプル数、サンプル量の範囲を **Table 1** にまとめた。燃焼精製系である元素分析計の状態を変えないように燃焼管の温度を下げないまま、2 日間のうちに全測定を続けて行なった。2 日間にまたがった測定値の変化をモニターするために、希釈ガス圧 8 psi での測定は両日とも行なった。

**統計分析** 測定した L-アラニンの重量 (mg) から窒素含有量 15.72%、炭素含有量を 40.44% として、試料中の窒素量と炭素量 (mg) を計算し、窒素量に対するメジャーピーク (質量数 28) の出力 (V)、28 の出力に対する  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$  値、炭素量に対するメジャーピーク (質量数 44) の出力 (V)、44 の出力に対する  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  値についてそれぞれ回帰分析を行なった。回帰

**Table 1.** Helium dilution pressure and quantity of L-alanine (NRIFS-1) analysed by EA1108-MAT 252 system

He dilution (psi)	Replicates	L-alanine (mg)	Nitrogen (estimated) (mg)	Carbon (estimated) (mg)
0	8	0.049 - 0.145	0.008 - 0.023	0.020 - 0.058
6	12	0.125 - 0.836	0.020 - 0.131	0.051 - 0.338
8	12	0.282 - 1.286	0.044 - 0.202	0.114 - 0.520
8	9	0.462 - 2.395	0.073 - 0.376	0.187 - 0.969
10	12	0.927 - 5.400	0.146 - 0.849	0.375 - 2.184
12	13	1.347 - 9.815	0.212 - 1.543	0.545 - 3.969

**Table 2.** Results of the isotope ratio analysis of NIST standards (IAEA-N1, USGS24), alanine widely used in Japan (Alanine-1), and L-alanine prepared for this study (NRIFS-1). Known isotope ratio and range of IAEA-N1, USGS24, and Alanine-1 are shown for reference. Although precision range for Alanine-1 was not given, a precision of less than 0.1 is generally acceptable.

Standard	Species	Replicates	Mean	Std.dev.	Min.	Max.	Known value
IAEA-N1	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$	12	0.31	0.035	0.247	0.365	$0.4 \pm 0.2^{*1}$
USGS24	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$	10	-15.96	0.022	-15.986	-15.910	$-15.9 \pm 0.25^{*2}$
Alanine-1	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$	11	-5.34	0.057	-5.417	-5.249	$-5.3^{*3}$
	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$	12	-21.74	0.011	-21.761	-21.729	$-21.5^{*3}$
NRIFS-1	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$	11	-2.4	0.10	-2.589	-2.259	
	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$	9	-22.06	0.011	-22.085	-22.049	

\*1Bohlke, J.K., U.S. Geological Survey, written communication, 1992. Referred to in NIST Report of Investigation, Reference Materials 8547-8552.

\*2Coplen, T.B., unpublished data. Referred to in NIST Report of Investigation, Reference Materials 8538-8542.

\*3Yoshioka et al. (1994)

に関する諸定数の計算は一回帰を仮定して最小二乗法で行ない、有意性検定は、Sokal & Rohlf (1973) の11.5節およびBOX11.4に従って行なった。また、回帰直線同士の比較 (ANCOVA) は Snedecor & Cochran (1967) の14.6節に従って行なった。

## 結 果

**作業標準物質の同位体比** 測定結果を **Table 2**にまとめた。IAEA-N1の $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ の測定値は0.31‰ (s.d.=0.035‰), USGS24の $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ の測定値は-15.96‰ (s.d.=0.022‰)で、ともに公表されている数値の範囲におさまった。Alanine-1の値は、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ が $-5.34\%$  (s.d.=0.057‰),  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ が $-21.74\%$  (s.d.=0.011‰)であった。 $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ は従来から使われている値との差が0.1‰以下であったが、 $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ は従来から使われている値に比べて0.24‰低かった。NRIFS-1の同位体比は、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ が $-2.4\%$  (s.d.=0.10‰),  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ が $-22.06\%$  (s.d.=0.011‰)であった。

**試料量とメジャーピークの出力の関係** 試料中の窒素量と、メジャーピーク (質量数28) の出力の関係は、出力が10.7 V付近に達するまでは直線関係にあり、それ以上では振り切れた (**Fig. 1**)。試料中の炭素量と、メジャーピーク (質量数44) の出力の関係も、希釈ガス圧0から12 psiのいずれの条件でも直線関係にあった (**Fig. 2**)。窒素量および炭素量  $W$  (mg) からメジャーピークの出力  $H$  (V) への回帰直線

$$H = a + b \times W$$

の諸定数を **Table 3**に示した。ただし、メジャーピークの出力が10 V以下の測定についてのみ回帰の計算に含めた。窒素の測定では2日にまたがった測定で回帰係数が有意に異なった (ANCOVA,  $P < 0.01$ )。2日目には試料量の著しく小さい測定が複数含まれていたため、2日目の測定の内、出力が0.7 V以下であった7回の測定を除いてから比較すると、回帰直線

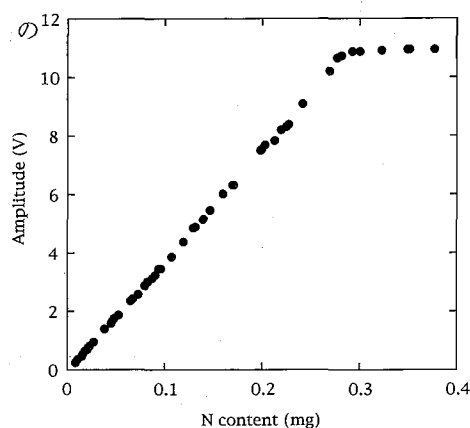


Fig. 1. Relationship between the nitrogen content of sample L-alanine (NRIFS-1) and the signal height of the major isotope  $^{28}\text{N}_2$ .

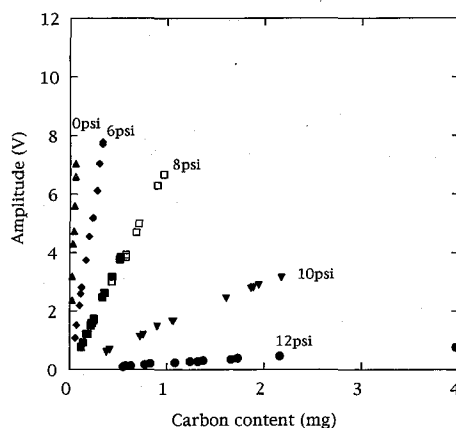


Fig. 2. Relationships between the carbon content of sample L-alanine (NRIFS-1) and the signal height of the major isotope  $^{44}\text{CO}_2$  for various helium dilution pressures. Closed circles (12 psi) and closed squares (8 psi) are the results from the first day, and open squares (8 psi), closed diamonds (6 psi), closed triangles (0 psi) and closed reverse-triangles (10 psi) are the results from the second day.

**Table 3.** Regression coefficients between nitrogen (carbon) content and signal height of isotope 28 (44). Regression coefficients were calculated for the signal height of 0.7–10 V for nitrogen and 0–7 V for carbon. Measurable range of sample amount (mg) was calculated by assuming the measurable range of signal height is 0.7–10 V for nitrogen and 0.7–7 V for carbon. Two sets of values for 8 psi are the results from the first (upper) and the second (lower) day. Measurable range for carbon at 12 psi was not determined, as delta value was highly variable.

Species	He dilution (psi)	Replicates	Range of sample amount (mg)	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>r</i> <sup>2</sup>	Measurable range (mg)
Nitrogen	0	35	0.021–0.241	–0.079	38.0	0.9995	0.021–0.265
Carbon	0	8	0.020–0.058	–0.027	121	0.9997	0.006–0.058
	6	12	0.051–0.338	–0.107	23.2	0.9993	0.035–0.306
	8	12	0.114–0.512	–0.084	7.58	0.9998	0.103–0.935
	8	9	0.171–0.969	–0.088	7.01	0.9967	0.112–1.01
	10	12	0.375–2.184	0.117	1.43	0.9977	0.409–4.82
	12	13	0.545–3.969	0.053	0.192	0.9856	not determined

違いは有意ではなかった (ANCOVA,  $P > 0.05$ )。従って窒素については、0.7 V 以上の測定について両日の測定をまとめて計算した結果を示した。希釈ガス圧 8 psi での 2 日にまたがった炭素の測定では、試料量の範囲が大きく異ならないにもかかわらず、回帰係数が両日の測定で有意に異なったので (ANCOVA,  $P < 0.01$ ) 両方の回帰係数を示した。

メジャーピークの出力と同位体比の関係 窒素におけるメジャーピークの出力と  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$  の

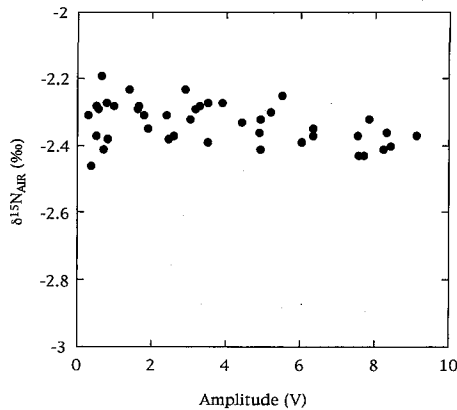


Fig. 3. Relationship between the signal height of the major isotope  $^{28}\text{N}_2$  and the  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$  value.

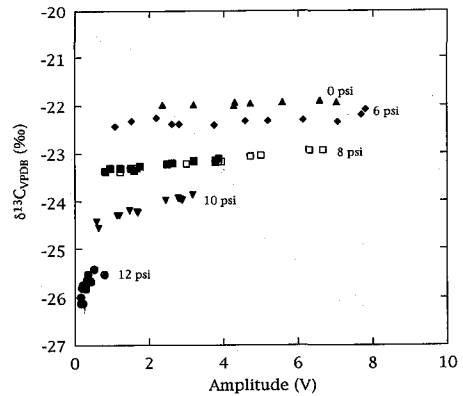


Fig. 4. Relationships between the signal height of the major isotope  $^{44}\text{CO}_2$  and the  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  value for various helium dilution pressures. Symbols as in Fig. 2.

Table 4. Regression coefficients of  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$  ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ ) on the signal height of isotope 28 (44). Regression coefficients were calculated for the signal height of 0–10 V for nitrogen and 0–7 V for carbon. Two sets of values for 8 psi are the results from the first (upper) and the second (lower) day. Though the regression coefficient for He dilution 6 psi was not significant, the calculated value is shown for comparison. n.s. : not significant.

Species	He dilution (psi)	Replicates	Range of signal height (V)	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>r</i> <sup>2</sup>
$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$	0	42	0.273–9.124	–2.30	–0.00897	0.158
$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$	0	7	2.369–6.593	–22.04	0.0188	0.573
	6	9	1.087–6.129	–22.40	0.0131	0.162 <sup>n.s.</sup>
	8	12	0.797–3.861	–23.40	0.0708	0.902
	8	9	1.227–6.674	–23.47	0.0821	0.984
	10	12	0.595–3.162	–24.60	0.235	0.950
	12	13	0.130–0.777	–26.03	0.924	0.531

関係を Fig. 3に、炭素におけるメジャーピークの出力と  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  の関係を Fig. 4に示した。また、メジャーピークの出力  $H$  (V) から同位体比測定値  $R$  (‰)への回帰直線

$$R = a + b \times H$$

の諸定数を Table 4に示した。ただし、メジャーピークの出力が10 V以下の測定についてのみ回帰の計算に含めた。2日にまたがった窒素の測定を比較したところ、両日の回帰直線に有意な違いはなかった (ANCOVA,  $P > 0.05$ )。この結果はメジャーピークの出力が0.7 V以下の測定を含めた場合も含めなかった場合も同様であった。従って、両日の出力10 V以下の測定を全てまとめて計算した結果を示した。希釈ガス圧 8 psi での2日にまたがった炭素

の測定では、両日の測定で回帰係数の差は有意ではなかったが (ANCOVA,  $P > 0.05$ ), 回帰直線の高さが有意に異なったので (ANCOVA,  $P < 0.01$ ), 両方の回帰直線を示した。ただし、回帰直線の傾きを揃えた時の高さの差は0.02%で、実用上はほとんど同じとみなしても差し支えない程度のずれであった。

$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$  はメジャーピークの出力が高くなるとともに低くなった (回帰係数と0の差についての  $t$  検定,  $P < 0.01$ )。回帰式による予測値からの  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$  実測値のずれは、メジャーピークの出力が0.7 V以下で7回の測定中3回0.1を上回ったが、その差は最大でも0.16%であった。

一方、 $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  では希釈ガス圧6 psiでのメジャーピークの出力に対する  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  の回帰の傾きは得られず (回帰係数と0の差についての  $t$  検定,  $P > 0.05$ ), 出力にかかわらず同位体比の測定値は一定であったが、それ以外の希釈ガス圧では  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  は出力が増すに従って大きくなった。希釈ガス圧が高くなるほど  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  の測定値は有意に低くなった (回帰係数と0の差についての  $t$  検定,  $P < 0.05$ , 回帰と残差についての  $F$  検定,  $P < 0.05$ )。回帰直線の傾きも希釈ガス圧が高くなるほど大きくなるように見えたが、回帰分析では有意ではなかった。回帰による予測値からの  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  実測値のずれは、希釈ガス圧12 psiでは測定した範囲の全体にわたって13回の測定中8回0.1を上回った。他の希釈ガス圧では、希釈ガス圧10 psiの時に、メジャーピークの出力0.654 Vの測定で0.11%の差があっただけであった。但し希釈ガス圧6 psiでは回帰の傾きが得られなかったため、平均値-22.36%を予測値として用いた。

## 考 察

**作業標準物質の同位体比** Table 2 に示したように、NIST の標準物質の測定値が公表値の範囲内であったことから、今回の封管燃焼による試料精製と、Oztech 社のリファレンスガスとの比較測定による測定値の偏りは十分に小さかったと考えられる。測定値の幅は  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$  で0.33%,  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  で0.1%以下と測定精度も高く、本研究で求められた作業標準物質の値は十分信頼に耐えるものであると考えられる。作業標準物質として多くの研究室で用いられている Alanine-1 の  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  値が、従来から使われている値よりも0.2%程度低い (従って、これを作業標準物質とした測定値は0.2%高くなる) ことが、最近指摘されるようになったが (陀安私信; 吉岡私信), 今回の測定でも従来から使われている値よりも0.24%低い値が得られた。封管燃焼による測定法による  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  値の誤差は一般に0.1%未満であるので、値がずれていることは明白である。野外から採集した試料を分析する場合には、試料間のばらつきはもっと大きくなるので、直ちに問題になる差ではないが、Alanine-1 を基準とした従来の測定値を、今後 NRIFS-1 を作業標準物質とした測定値と比較する場合には0.24%の補正をした方がよいと考えられる。

**測定可能な試料量の範囲** 窒素の同位体比測定では、メジャーピークの出力が振り切れない10 V以下の範囲では (Fig. 1), 出力から  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$  値への回帰直線の回帰残差は小さく、正確



でかつ再現性の高い測定が可能であった (Fig. 3)。試料量が少なく出力が小さい場合には、スズカプセルなどへの微量の不純物や大気中窒素の混入、ヘリウムキャリアガスや酸素ガスなどのわずかな不純物、電気的なノイズやゆらぎなどの影響が、サンプルの量や信号値に対して大きくなるので、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$  値のばらつきが大きいことが考えられる。今回測定した0.273 Vまでの範囲では、回帰残差が0.1%を越えたのは出力0.7 V以下で、最大でも0.16%であった。測定可能な試料中の窒素含有量の上限は今回の条件では0.265 mgであった (Fig. 1, Table 3)。また、仮に下限を出力0.7 Vとすると、試料中の窒素含有量の下限は0.021 mgであった (Table 3)。

炭素の同位体比測定においても、試料量とメジャーピークの出力の間 (Fig. 2, Table 3)、出力7 V以下の範囲で出力と  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  値の間には直線関係が成り立ち (Fig. 4, Table 4)、出力7 V以下で正確な測定が可能であった。ISODATの画面上で質量数46の出力を測定中にモニターすると、質量数44の出力の1.4~1.5倍あり、質量数44の出力が7 Vを越えると質量数46の出力が10 Vを越えて振り切れてしまう。このため $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  値、 $^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$  値が過小評価され、 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  値が過大評価されることが、出力7 V以上では正確な  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  値が得られない理由であると考えられた。希釈ガス圧12 psiでは、測定した範囲では全体に  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  値のばらつきが大きく、回帰による予測値との差は最大0.29%に達したことから、正確な測定には適さないと考えられた。他の希釈ガス圧では、回帰残差が0.1%を越えたのは希釈ガス圧6 psiでメジャーピークの出力が2.202 Vの時と、希釈ガス圧10 psiでメジャーピークの出力が0.654 Vの時の2測定だけであった。本研究では出力1 V以下の測定が少なく、出力の下限についての知見は得られなかったが、出力が小さくなることによる測定誤差の要因の多くは窒素の測定の場合と共通であると考えられる。また、他に行なっている測定では、出力が0.7 V程度より小さくなると回帰直線から離れた値が多く見られているので (豊川, 未発表)、測定の下限を0.7 Vとして測定可能範囲を示した (Table 3)。

分析した試料量はアラニンの重量で最大9.815 mgであった。別に元素分析計の測定限界を調べた実験では13.931 mgのアセトアニリドで既に炭素のピークの幅が大きくなりすぎて、窒素のピークと部分的に重なったが (豊川, 未発表)、今回の測定範囲では窒素と炭素のピークが重なることは無かった。13.931 mgのアセトアニリドの含有炭素量は9.90 mg、同じ炭素量になるアラニンに換算すると24.5 mgである。また、アラニンの測定では10 mgまでの範囲ではクロマトグラフの炭素のピークが飽和する傾向は見られなかった (豊川, 未発表)。従って今回の測定範囲では、元素分析計側の測定限界は考慮する必要はないと考えられる。

以上のことを考慮すると、希釈ガス圧10 psiでメジャーピークの出力が7 Vに達する炭素量で4.82 mg、アラニンの量に換算して11.9 mgが  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  を測定可能な試料量の上限であると考えられる。

**測定値の補正の必要性** 質量数28の出力ピークから  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$  値への回帰直線は有意であったが、回帰の傾きは-0.00897と小さく (Table 4)、測定可能な10 Vまでの範囲での変化は0.1%以下であった。また、測定された  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$  値の平均値は2.33% (s.d.=0.062%)で、封管法による測定値2.4%との差は0.1%以下であった。分散に有意差があったために中央値同士の比較を行なったが、異なる方法で測定された値の間に有意差は認められなかった (Wilcoxon

-Mann-Whitney テスト,  $P > 0.05$ )。これらのことから,  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$  値に関しては, 補正を行わなくても大きな問題はないと考えられた。 $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$  値の測定値の95%が含まれると予測される区間の上限または下限と回帰直線との差は, 区間が一番広がる出力ピーク10 Vで0.12, 測定値がメジャーピークの出力と無関係であると仮定した場合, 測定値の95%信頼区間の上限または下限と平均値との差は0.13%で, いずれの方法で計算しても, 測定値の95%以上が予測値の上下0.13%以内におさまると考えられた。

$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  値についても, ヘリウムによる希釈を行わない場合(希釈ガス圧0 psi)の平均値-21.96% (s.d. = 0.035%)は, 封管法による測定値-22.06%に近い値であったが, EA-IRMSによる測定値全てが封管法による測定値全てよりも大きかった。また, 質量数44の出力ピークに対する回帰の傾きは0.0188で (Table 4), 測定可能な7 Vまでの範囲で0.13%の差を生じる。これらのことから, 希釈ガス圧0 psiでも補正は必要であると考えられた。 $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  値の測定値の95%が含まれると予測される区間の幅は, 出力ピーク0.7 V以上7 V以下の範囲では0.7 Vまたは7 Vで最大になり, 区間の上限または下限と回帰直線との最大差は希釈ガス圧0 psiで0.098%, 8 psiの1日目と2日目で0.10%と0.058%, 10 psiでは0.23%であったが, 希釈ガス圧12 psiでは3.9%に達した。希釈率6 psiでは回帰直線ではなく平均値のまわりの測定値のばらつきを予測することになるが, 測定値が正規分布に従うと仮定した場合, 測定値の95%が含まれると予測される区間の上限または下限と平均値の差は0.11%であった。

標準試料の測定において, 測定値が回帰直線の周りにどの程度ばらつくかは把握できたが, 未知試料の同位体比の推定の精度はどの程度になるだろうか。未知試料の測定値からの同位体比の推定は, 標準試料を測定して得られた回帰直線を使って, 値を換算することになる。標準試料の測定により, メジャーピークの出力  $H$  (V) から同位体比測定値  $R$  (%)への回帰直線  $R = a + b \times H$  が得られ, 標準試料の同位体比が  $S$  (%)あるとする。未知試料測定時のメジャーピークの出力が  $X$  (V), 同位体比測定値が  $Y$  (%)であった時, 未知試料の同位体比  $Z$  (%)を推定する式は,

$$Z = Y + (S - a - b \times X)$$

となる。ここでは, 未知試料における測定値と真値のずれの大きさ ( $Z - Y$ ) が, 同じメジャーピーク大きさの時の標準試料における測定値と真値のずれ ( $S - a - b \times X$ ) の推定値と等しいことを仮定している。この仮定が正しいかどうかの確認は行なっていないが, 試料が元素分析計で燃焼, 精製, 分離され, 質量分析計に導入されるまでの条件は, 同じ条件になるよう設計されており, 試料によって異なる同位体分別効果があるとは考えにくい。さて, 未知試料の同位体比推定の精度だが, データセット数が42組と十分にある  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$  の測定値を使って, 以下のような数値実験を行なってみた。 $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$  の測定値について, データセットの中から10回の測定を無作為抽出(繰り返しを含む)して回帰式を作り, さらに3回の測定を無作為抽出(繰り返しを含む)して未知試料として上の換算式により同位体比を推定し, 3回の測定から得られた同位体比推定値の平均と標準偏差を計算した。この操作を40回繰り返して平均値と標準偏差の変動を調べた。アラニンの  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$  値は-2.4%であるが (Table 2), 得られた平均値は-2.5~-2.32%, 標準偏差は0~0.32%であった。標準偏差の大きさは測定の組合せによって大きく変動したが, 測定から得られた推定値の平均値に関

しては、安定して真値から0.1%以内におさまった。このことから直ちに未知試料の同位体比推定の精度が0.1%以下であるとは言えないが、今回の $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ の測定のように標準試料の測定値が回帰直線のまわりに大きくばらつかないような測定結果が得られた場合には、同位体比推定の精度は高く、1%のオーダーでの比較を行なう上では十分であろうと考えられた。

## 謝 辞

東京大学大学院の今井基文氏には、測定方法に関する既往の資料の入手、測定方法や測定条件についてのアドバイスなど、大変お世話になった。深く感謝する。中央水産研究所の市川忠史氏には、封管法による測定の指導、真空ラインと質量分析計の立ち上げからメンテナンスなど、多方面で大変にお世話になった。深甚の謝意を表する。安定同位体比測定をめぐる種々の情報提供について、陀安一郎氏を始め京都大学生態学研究センターの安定同位体研究グループの諸氏に感謝する。本稿の改善のために助言をいただいた、査読者の方々に感謝する。

## 文 献

- 浜中純子, 木平英一, 吉岡崇仁, 1998: 元素分析同位体比質量分析計基礎データ - よりよい分析のために - 名古屋大学大気水圏科学研究所, 名古屋, 11pp.
- Hayase S., Ichikawa T. and, Tanaka K., 1999: Preliminary report on stable isotope ratio analysis for samples from Matang mangrove brackish water ecosystems. *Japan Agricultural Research Quarterly*, **33**, 215 - 221.
- Hedges J. and Parker P. L., 1976: Land-derived organic matter in surface sediments from the Gulf of Mexico. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **40**, 1019 - 1029.
- Minagawa M. and Wada E., 1984: Stepwise enrichment of  $^{15}\text{N}$  along food chains: further evidence and the relation between  $\delta^{15}\text{N}$  and animal age. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **48**, 1135 - 1140.
- Minagawa M., Winter D. A., and Kaplan I. R., 1984: Comparison of Kjeldahl and combustion methods for measurement of nitrogen isotope ratios in organic matter. *Anal. Chem.*, **56**, 1859 - 1861.
- 三島康史, 星加章, 1995: 海洋堆積物中の炭素・窒素安定同位体比のオンライン分析法について. 中国工業技術研究所報告, **45**, 17 - 22.
- 小川奈々子, 木庭啓介, 高津文人, 和田英太郎, 1997: 自然生態系における炭素・窒素安定同位体存在比. *Radioisotopes*, **46**, 632 - 644.
- Snedecor G. W. and Cochran W. G., 1967: 統計的方法 原書第6版 (畑村又好, 奥野忠一, 津村善郎共訳), 岩波書店, 東京, pp. 405 - 408.
- Sokal R. R. and Rohlf F. J., 1973: 生物統計学 (藤井宏一訳), 共立出版, 東京, pp. 299 - 307.
- 陀安一郎, 1997: Conflo (EA1108-Conflo II-delta-S システム) 使用マニュアル C, N (含有量・同位体比) 分析, 京都大学生態学研究センター, 大津, 23pp.

- 和田英太郎, 1988: 化学構造よりみた食物連鎖 -窒素・炭素同位体分別を中心として-, 「河口・沿岸域の生態学とエコテクノロジー」(栗原康編著), 東海大学出版会, 東京, pp.77-84.
- 米山忠克, 1996: 5分のできる炭素・窒素の同位体自然存在比の分析. 化学と生物, **34**, 261-262.
- Yoshii K., Melnik N. G., Timoshkin O. A., Bondarenko N. A., Anoshko P. N., Yoshioka T., and Wada E., 1999: Stable isotope analyses of the pelagic food web in Lake Baikal. *Limnol. Oceanogr.*, **44**, 502-511.
- Yoshioka T., Wada E., and Hayashi H., 1994: A stable isotope study on seasonal food web dynamics in a eutrophic lake. *Ecology*, **75**, 835-846.