

重質炭化水素の炭素同位体分析のための GC/C/MS の測定条件と性能

坂田 将* 金子信行** 古宮正利** 前川竜男*

Susumu SAKATA, Nobuyuki KANEKO, Masatoshi KOMIYA and Tatsuo MAEKAWA (1999) Conditions and performance of GC/C/MS for carbon isotopic analyses of high molecular-weight hydrocarbons. *Bull. Geol. Surv. Japan*, vol. 50 (5/6), p. 395-404, 6 figs., 4 tables.

Abstract: Conditions and performance of GC/C/MS for compound-specific carbon isotopic analyses of high molecular-weight hydrocarbons were examined using the pure reagents of C₁₆ to C₃₄ *n*-alkanes whose values of δ had been determined by conventional techniques. By the method of calibration assigning the δ value of carbon dioxide from the mixing volume (external standard), a systematic error ($\Delta \sim -1.0\%$) was observed for those of the *n*-alkanes. When assigning the δ value of regular C₁₈ *n*-alkane (internal standard), accuracy of the isotopic analyses was greatly improved, although there remained a trend of drift in which values of Δ became more negative with the increasing number of carbon in the *n*-alkanes. When assigning the δ value of two (or more) *n*-alkanes whose retention times were widely apart, the drift disappeared, and high accuracy was obtained from the measurements. Precision for the isotopic analyses was found to improve with the increasing height of peaks in *m/z* 44 signal traces, and high precision was observed for the analyses in which peaks were higher than 2 V. Under the conditions in this study (with the emission current at 1.00 mA, and the VISC completely opened), the contents of *n*-alkanes giving a 2 V-peak were 7 to 14 nmol in carbon, with higher contents required for *n*-alkanes with larger numbers of carbon. By closing the VISC during the measurement, sensitivity for the analysis may increase approximately 2-fold with no deterioration in its accuracy.

要 旨

炭素同位体比が既知の *n*-アルカン試薬(炭素数16-34)を用いて, 重質炭化水素の分子ごとの炭素同位体比を GC/C/MS で分析するための測定条件と性能について検討した。ミキシングボリュームから導入する二酸化炭素を外部標準として *n*-アルカンの炭素同位体比を測定すると, Δ 値が-1%前後の系統的な誤差を伴う。内部標準法で *n*-アルカンを1成分だけ標準として他の *n*-アルカンの炭素同位体比を測定した場合, 外部標準法に比べて測定精度が大幅に改善されるが, *n*-アルカンの炭素数の増加とともに Δ 値がマイナス方向に変化するドリフト傾向は解消されない。リテンションタイムが離れた2つ(以上)の *n*-アルカンを標準とした場合, ドリフト傾向が解消され, 高い精度の測定が可能となる。同位体比の測定精度は, 質量数44のトレース上のピークの高さとともに向上し, 高さ2 V 以上の場合, 高い測定精度が得られる。本研究の測定条件(エミッション電流1.00mA, VISC 開放)で高さ2 V のピークを得るために必要な *n*-アルカンの量は, 炭素量換算で7-14nmol であり, 炭素数の多い成分ほど多くを要する。VISC を閉じた状態で

測定すれば, 測定精度を損なうことなく, 感度を約2倍に高められる可能性がある。

1. 緒 言

バイオマーカーの炭素同位体比(¹³C/¹²C)は, そのバイオマーカーをもたらした生物の種類を特定する際, 重要な情報を提供する。例えば, 代表的なバイオマーカーであるホパンの起源生物は, 分子構造に基づく従来の解釈では, バクテリア起源であること以上の情報を得ることができなかったが, その炭素同位体比を測定することによって, 藍藻, メタン酸化細菌, 化学合成細菌のいずれかに限定することが可能になってきた(Freeman *et al.*, 1990; Collister *et al.*, 1992; Schoell *et al.*, 1992, 1994; Santos Neto *et al.*, 1998)。ホパンやステランなどの重質炭化水素に属するバイオマーカーの炭素同位体比の測定は, 1990年代初期のガスクロマトグラフ燃焼同位体質量分析計(GC/C/MS)の開発(Freeman *et al.*, 1990; Hayes *et al.*, 1990)によって, 初めて可能になった。地質調査所においても1994年にフィニガンマツト(現サーモクレスト)社製の GC/C/MS が導入され, 工業技

*地殻化学部(Geochemistry Department, GSJ)

**資源エネルギー地質部(Mineral and Fuel Resources Department, GSJ)

Keywords: carbon isotopic composition, *n*-alkane, GC/C/MS, analytical chemistry

術院特別研究「島弧型炭化水素資源ポテンシャルの形成機構と予測手法に関する研究」の中で、重質炭化水素やガス状炭化水素の分子ごとの炭素同位体比を測定する技術に関する検討が行われてきた。本稿では、炭素同位体比が既知の試薬炭化水素を用いて、GC/C/MSによる重質炭化水素の分子ごとの炭素同位体比の測定法を検討した結果について報告する。

2. 試料と方法

2.1 試料成分の選択

GC/C/MSによる重質炭化水素の分子ごとの炭素同位体比の測定法を検討する場合、試料成分としては、純度が高く炭素数の異なる一連の成分が入手可能なことから、*n*-アルカンを用いることが一般的であり、本研究でも、第1表の12成分を用いた。このうち通常体の*n*-アルカンはシグマ製、重水素体(*n*-アルカンの水素がすべて重水素に置換されたもの)はケンブリッジアイソトープラボラトリー製である。通常体の炭素数32の*n*-アルカンについては純度の記載がなく、ガスクロマトグラフによって、純度が約99%であることを確認した。そのほかの*n*-アルカンについては、いずれも純度約98%または99%と記載されている。

2.2 標準値の決定

n-アルカン試薬の炭素同位体比(標準値)を第1表に示した。これらは*n*-アルカン試薬を個々に石英管中で酸

第1表 本研究に使用した*n*-アルカン試薬の供給元、純度と炭素同位体比(標準値)。

Table 1 Suppliers, purities and carbon isotopic compositions (standard values) of *n*-alkane reagents used for this study.

Compound	Supplier ^a	Purity ^b (%)	Conventional ^c δ vs. PDB (‰)
<i>n</i> -C ₁₆ D ₃₄	CIL	98	-30.59 ± 0.00
<i>n</i> -C ₁₈ H ₃₈	SIGMA	99	-29.75 ± 0.00
<i>n</i> -C ₂₀ H ₄₂	SIGMA	99	-33.53 ± 0.00
<i>n</i> -C ₂₂ H ₄₆	SIGMA	99	-33.32 ± 0.00
<i>n</i> -C ₂₄ D ₅₀	CIL	98	-31.29 ± 0.00
<i>n</i> -C ₂₄ H ₅₀	SIGMA	99	-32.42 ± 0.00
<i>n</i> -C ₂₆ H ₅₄	SIGMA	99	-32.62 ± 0.00
<i>n</i> -C ₂₈ H ₅₈	SIGMA	99	-33.15 ± 0.01
<i>n</i> -C ₃₀ H ₆₂	SIGMA	99	-29.68 ± 0.01
<i>n</i> -C ₃₂ D ₆₆	CIL	98	-29.72 ± 0.00
<i>n</i> -C ₃₂ H ₆₆	SIGMA	99	-29.41 ± 0.02
<i>n</i> -C ₃₄ H ₇₀	SIGMA	99	-28.48 ± 0.01

^a SIGMA, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO; CIL, Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA.

^b Purity of *n*-C₃₂H₆₆ was checked in this study, while the others were those certified by the suppliers.

^c Mean value and standard deviation of three replicates obtained by the conventional techniques as described in the text.

化銅とともに加熱(850°C, 3時間)して生成する二酸化炭素を真空ラインで精製後、デュアルインレットによる質量分析法で、炭素同位体比が既知の二酸化炭素(NBS-21を同様に燃焼, 精製して得られるもの)とともに同位体測定をすることによって決定した。試料を石英管中に分取する際、常温で固体の*n*-アルカン(炭素数18以上のもの)は、粉末(結晶)状態で同位体比が不均質の可能性がある、この問題を回避するために、大過剰の試薬をバイアル中で加熱して液体とし、その一部を石英製キャピラリーチューブに吸い取る方法を用いた。

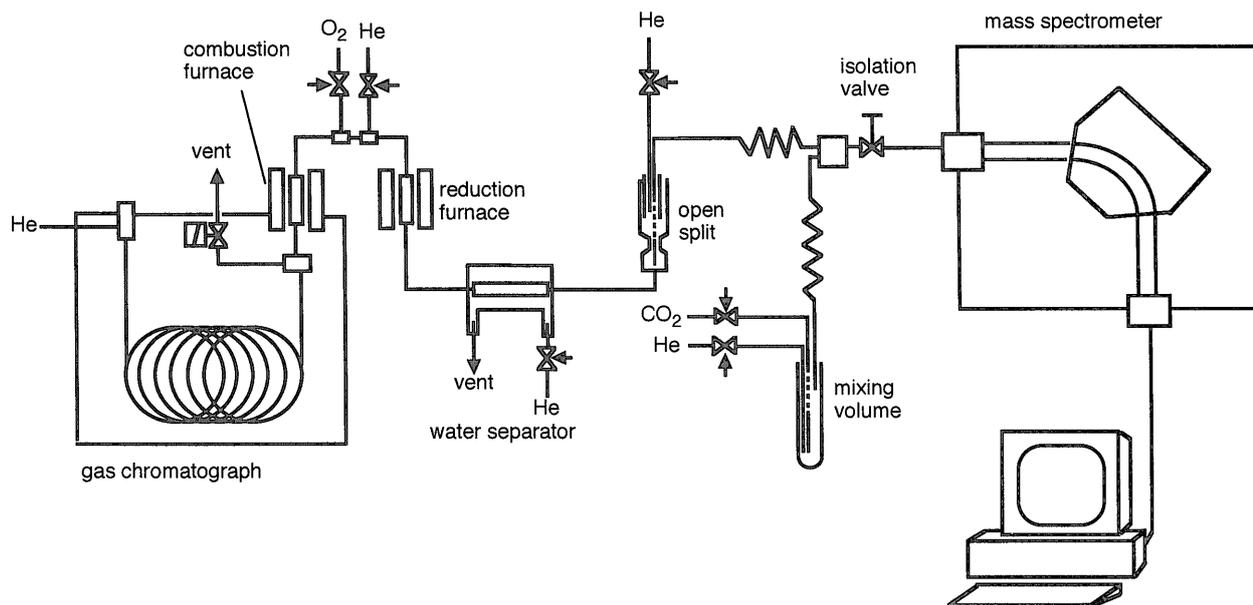
2.3 測定用混合試料の調製

各*n*-アルカン試薬をバイアル中で再度加熱溶解して、2本の細いガラス直管(パスツールピペットの先端部1.5 cmを切ったもの)に吸い取り、秤量後、2 mlのアンブル中に落とした。これに*n*-ヘキサンを2 ml加え、超音波を与えて溶解させ、成分ごとの濃厚な標準溶液(約500 nmolC/ μ l)を調製した。次に各標準溶液を、シリンジで適量(40 μ l前後)ずつ測り採って1 mlのアンブル中に移し、*n*-ヘキサンで1 ml定容とすることにより、通常の*n*-アルカン(炭素数18から34までの偶数のもの9成分)の混合試料 N-ALKS と、重水素化した*n*-アルカン(炭素数16, 24, 32のもの)の混合試料 DEUTS(いずれも各成分の濃度は約20nmolC/ μ l)を調製した。

2.4 装置の概要

GC/C/MSはガスクロマトグラフのカラムから流出する試料成分を順次燃焼炉において二酸化炭素と水に変換し、水を除去した後、二酸化炭素をヘリウム(キャリアガス)とともに質量分析計に導入して炭素同位体比を測定するものである。地質調査所に導入された装置の概念図を第1図に示した。ガスクロマトグラフはヒューレットパッカード製5890シリーズIIで、キャピラリーカラム仕様であり、試料注入口としては、スプリット・スプリットレス注入口とオンカラム注入口がある。いずれの注入口も電子圧力調整器(Electronic Pressure Regulator)によってカラムのヘッド圧が制御されており、タイムプログラムにしたがって測定中にカラムヘッド圧を変えたり、カラムの温度上昇とともにカラムヘッド圧を上げてキャリアガス流量を一定に保つことができる。

燃焼炉付きインターフェイスは、燃焼炉(長さ26cm, 内径1.6mm)のアルミナチューブ中に酸化銅, 酸化ニッケル, 白金のワイヤが各1本内蔵され、999°Cまで加熱可能)、還元炉(同アルミナチューブ中に還元銅のワイヤが3本束ねた状態で内蔵され、通常600°Cに設定)、ウォーターセパレーター(長さ20cm, 内径0.6mmの管状ナフィオンチューブを内蔵)、オープンスプリット[ウォーターセパレーターから流入するガスのうち、定流量(約0.5 ml/min)を質量分析計に送り、残りを大気開放する]が



第1図 GC/C/MS(ガスクロマトグラフ燃焼同位体質量分析計)の概念図。
Fig.1 Schematic diagram of the GC/C/MS (gaschromatograph/combustion/mass spectrometer).

キャピラリーチューブで直列に配管されたものである。試料中に含窒素有機物が含まれている場合、炭素同位体測定の際の原因となる窒素酸化物が燃焼炉で生成するため、これを窒素ガスに変換するために還元炉が必要とされる。燃焼炉の上流側に電磁バルブを介して排気口に通じる分岐点が1つ、下流側に電磁バルブを介して酸素ポンペとヘリウムポンペに通じる分岐点が1つずつある。このバルブ操作によって、測定前に燃焼炉に酸素を流して酸化銅を再生することと、測定中にカラムから流出する試料を燃焼炉に導入するか大気放出(バックフラッシュ)することの切り替えができる。オープンスプリットと質量分析計をつなぐキャピラリーチューブは、手動のアイソレーションバルブを介して、質量分析計のチェンジオーバーバルブシステムに接続され、他の導入系(パリアブルボリューム、元素分析計/コンフロー)との切り替えが可能となっている。またミキシングボリュームにつながるキャピラリーチューブが共通のアイソレーションバルブに接続されており、ポンペからの二酸化炭素(標準ガス)を随時、オープンスプリットからのガス流とともに、イオンソースに導入できるようになっている。

本装置に使用されている質量分析計はフィニガン MAT252型で、軽元素(炭素、酸素、水素、硫黄等)の安定同位体比を測定するための一般的な質量分析計である。イオン化は電子衝撃(70eV)で行われ、加速電圧は10 kVである。感度の異なる複式コレクターで質量数44, 45, 46のイオンを同時に検出し、各質量数のイオン電流は、これに比例する電圧信号として検出される。イオンソースと分析管は差動排気され、イオンソースの排気速度は VISC(Variable Ion Source Conductance)の開閉

によって調節することが可能になっている。またイオン化室で生じたイオンをレンズ系に引き出す条件によって、センシティブティ(感度を優先する)モードとレシオリニアリティ(出力に対する同位体比の安定性を優先する)モードの選択が可能である。GC/C/MSの測定の際は、レシオリニアリティモードを選択することが不可欠であり、VISCを全開(排気速度最大)にして測定することが推奨されている。

2.5 分析条件

測定の際は最初に DEUTS を、次に N-ALKS を同じマイクロシリンジにほぼ等量ずつ吸い取り、GC/C/MS のガスクロマトグラフに同時注入した。注入量を0.3から1.0 μ lの間で変えて11回測定を行った。注入口はオンカラム注入口を用い、その温度は常にオープンよりも5 $^{\circ}$ C高くなるオープントラック方式を選択した。ガスクロマトグラフのカラムは、クロムパック社製キャピラリーカラム CP-SIL 5CB MS(長さ60m, 内径0.32mm, 膜厚0.25 μ m)を使用し、オープンの温度条件は、60 $^{\circ}$ Cから120 $^{\circ}$ Cまで毎分20 $^{\circ}$ C、次に120 $^{\circ}$ Cから300 $^{\circ}$ Cまで毎分4 $^{\circ}$ Cで昇温後、300 $^{\circ}$ Cで12分保持した。キャリアガス(ヘリウム)のカラム流量は毎分2.2mlで、測定中一定とした。

燃焼炉つきインターフェイスの条件は、燃焼炉の温度を840 $^{\circ}$ C、還元炉の温度を600 $^{\circ}$ Cとした。測定開始後の10分間をバックフラッシュとして、燃焼炉の手前で溶媒その他の低沸点成分を排出させ、そののちバックフラッシュを解除して、目的成分がインターフェイスを通過するように設定した。また一連の目的成分が流出する前後に2回ずつ(1回につき25秒間)ミキシングボリュームか

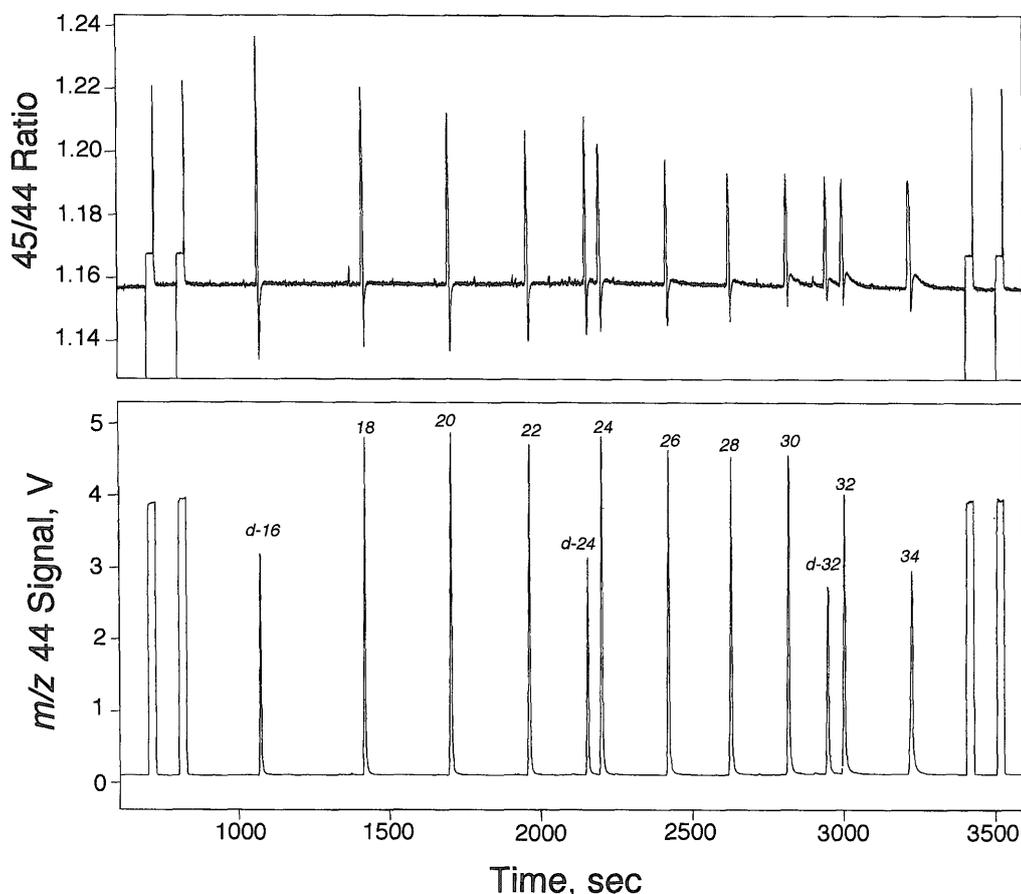
らの二酸化炭素が質量分析計のイオンソースに導入されるように設定した。

質量分析計は、テストケースを除いて VISC を全開にしてイオンソースの排気速度を最大とし、エミッション電流は1.00mA とした。またイオンソースのレンズ系は、レシオリニアリティモードの中で、感度が最大となるように調整した。

3. 結果と考察

n-アルカンの混合試料 DEUTS と N-ALKS を各々 1.0 μ l ずつ GC/C/MS に注入して得られた分析例を第2図に示した。下と上のチャートはそれぞれ質量数44のイオン電流の信号(電圧)と45/44の信号比のトレース(時間変化)を示したものである。質量数44のトレース上には12本の *n*-アルカンに対応するガウシアンピークと、その前後に2本ずつミキシングボリュームからの二酸化炭素に対応するスクエアピークが現れている。同じ炭素数の

n-アルカンの場合、重水素体のものは通常体のものに比べてカラムからはやく流出し、質量数44のトレース上で完全に分離されたピークとして検出される。45/44比のトレース上では、質量数44のトレース上のピークに呼応して、最初プラスに、その後マイナスに振れるスイング形状のシグナルが認められる。これは *n*-アルカンがガスクロマトグラフのカラムを通過する際、質量数の大きい分子が相対的に速く通過するという同位体効果に帰因するものである。このため各成分の同位体比は、45/44比の時間平均を計算するのではなく、質量数44、45、46の信号トレース上のピークを個々に積分し、ピーク面積の比をもとに計算される。すなわち、試料成分(*n*-アルカン)のピーク面積比を、同位体比が既知の標準物質のピーク面積比と比較する事によって、試料の同位体比(PDBスケールでの値)が計算される。標準物質としては、ミキシングボリュームからの二酸化炭素を用いる方法と、*n*-アルカンの一部を内部標準として用いる方法がある。標準物質の選択の仕方によって異なる計算結果が得られる可能



第2図 N-ALKS と DEUTS を1.0 μ l(各 *n*-アルカン成分は炭素量20nmol に相当)ずつ GC/C/MS に同時注入したときの信号記録例。下は質量数44の信号(ボルト単位でモニターされるイオン電流)、上は45/44の信号比をトレースしたものの。ピーク上の(d-)数値は(重水素化)*n*-アルカンの炭素数を示す。

Fig. 2 Recordings of the signals when 1.0 μ l of N-ALKS and DEUTS (each *n*-alkane containing 20 nmol of carbon) were coinjected onto the GC/C/MS. The lower trace displays the *m/z* 44 signal (ion-current monitored in voltage), and the upper trace displays the instantaneous 45/44 signal ratio. (d-) numbers above the peaks indicate carbon numbers of the (perdeuterated) *n*-alkanes.

性があり、この点について以下に議論する。

3.1 ミキシングボリュームからの二酸化炭素を標準とする場合(外部標準法)

ミキシングボリュームから4回導入した二酸化炭素のうち2回目(*n*-アルカン溶出前)のものを外部標準として δ 値(-30.36‰)を帰属し、*n*-アルカン成分の δ 値を計算した結果を第2表(External standard)に示した。この表の σ_d は11回測定される*n*-アルカンの δ 値(δ_{GCC})の標準偏差を意味しており、mean Δ は11回の測定ごとに計算される*n*-アルカンの Δ 値(= $\delta_{GCC} - \delta_{CONV}$, ただし δ_{CONV} は従来法による炭素同位体比の標準値)の平均(%単位)を意味している。各成分の δ 値の標準偏差は0.11‰から0.29‰の範囲(平均0.18‰)であり、測定精度は悪くない。しかしながら Δ 値の平均は-0.7‰から-1.2‰の範囲(平均-1.0‰)で、測定される δ 値が標準値よりも系統的に低いことを表している。またこの Δ 値の平均を*n*-アルカンの炭素数に対してプロットした場合、炭素数とともに Δ 値の平均がマイナス方向に変化するドリフト傾向が認められる(第3図の菱形シンボル)。

同位体比のドリフト傾向は質量分析計の安定性の問題と関連している可能性がある。Merritt and Hayes (1994)は、質量分析計のイオンソースにヘリウムの気流が導入されている状態で二酸化炭素をバリアブルボリュームから繰り返し導入した場合、見かけ上同位体比が変化(1時間で約0.3‰)することを指摘している。本研究において、上記のキャリブレーション(2回目の二酸化炭素の同位体比の帰属)で、ミキシングボリュームから導入した4回目の二酸化炭素(*n*-アルカン溶出後で、2回目の二酸化炭素から45分経過後に導入)の炭素同位体比を計算したところ、標準値と殆ど変わらない値(-30.42±

0.07‰)が得られた。したがって本研究の質量分析計の安定性は、Merritt and Hayes(1994)の事例よりも優れているものと判断された。また、4回目の二酸化炭素はカラムブリードによってベースラインが高くなった時点で導入されており、カラムブリードが誤差の原因にならないということも同時に検証された。

本キャリブレーションで得られる同位体比に系統的な誤差が生じたのは、燃焼炉付インターフェイスに原因がある可能性も考えられる。Merritt *et al.*(1994)は、インターフェイスの燃焼炉における燃焼が不完全の場合、炭素同位体比は標準値に対して正(¹³Cが多い)方向にシフトすると報告している。今回の結果は、測定値が標準値よりも低く、これと逆の傾向である。また不完全燃焼に起因する場合、試料の負荷量が Δ 値と相関すること(Merritt *et al.*, 1995)が予想されるが、炭素数24の*n*-アルカン(通常体と重水素体)について、ピーク面積と Δ 値の関係を調べると、そのような傾向は見いだされない(第4図)。したがって、試料の不完全燃焼が測定値の誤差の原因となっているとは考えにくい。

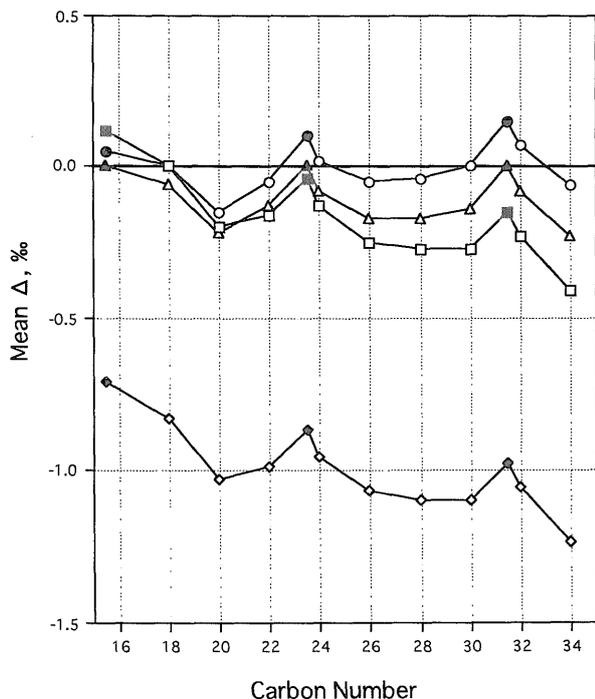
インターフェイスのウォーターセパレーターの水の除去が不完全な場合も、系統的な誤差がもたらされることが最近指摘されており、その原因は、イオンソースにおいて水(H₂O)と二酸化炭素が部分的に反応して質量数45のイオン(HCO₂⁺)が生じることによるものと考えられている(Leckrone and Hayes, 1997)。もしこの問題が生じているならば、通常の*n*-アルカンは標準値よりも高い炭素同位体比が得られることが予想され、また重水素体は質量数46のイオン(DCO₂⁺)が生じることから、標準値より僅かに低い値が得られることが予想される。本研究の測定値は、通常体と重水素体の*n*-アルカンがどちらも同じようにも標準値より低い値が得られていることか

第2表 異なるキャリブレーションの方法に基づく同位体測定の精確度。

Table 2 Accuracy and precision of the isotopic analyses based on different methods of calibration.

Compound	External Standard (2nd CO ₂)		1 Internal Standard (<i>n</i> -C ₁₈ H ₃₈)		2 Internal Standards (<i>n</i> -C ₁₈ H ₃₈ , C ₃₀ H ₆₂)		3 Internal Standards (<i>n</i> -C ₁₆ D ₃₄ , C ₂₄ D ₅₀ , C ₃₂ D ₆₆)	
	mean Δ^a (‰)	σ_d (‰)	mean Δ^a (‰)	σ_d (‰)	mean Δ^a (‰)	σ_d (‰)	mean Δ^a (‰)	σ_d (‰)
<i>n</i> -C ₁₆ D ₃₄	-0.71	0.29	0.12	0.32	0.05	0.35	—	—
<i>n</i> -C ₁₈ H ₃₈	-0.83	0.24	—	—	—	—	-0.06	0.26
<i>n</i> -C ₂₀ H ₄₂	-1.03	0.15	-0.20	0.18	-0.15	0.16	-0.22	0.12
<i>n</i> -C ₂₂ H ₄₆	-0.99	0.16	-0.16	0.18	-0.05	0.13	-0.13	0.19
<i>n</i> -C ₂₄ D ₅₀	-0.87	0.24	-0.04	0.22	0.10	0.20	—	—
<i>n</i> -C ₂₄ H ₅₀	-0.96	0.18	-0.13	0.27	0.02	0.18	-0.08	0.18
<i>n</i> -C ₂₆ H ₅₄	-1.07	0.11	-0.25	0.22	-0.05	0.13	-0.17	0.16
<i>n</i> -C ₂₈ H ₅₈	-1.10	0.13	-0.27	0.18	-0.04	0.08	-0.17	0.12
<i>n</i> -C ₃₀ H ₆₂	-1.10	0.11	-0.27	0.23	—	—	-0.14	0.17
<i>n</i> -C ₃₂ D ₆₆	-0.98	0.22	-0.15	0.19	0.15	0.22	—	—
<i>n</i> -C ₃₂ H ₆₆	-1.06	0.20	-0.23	0.15	0.07	0.20	-0.08	0.17
<i>n</i> -C ₃₄ H ₇₀	-1.24	0.16	-0.41	0.25	-0.06	0.16	-0.23	0.21
mean	-1.00	0.18	-0.18	0.22	0.00	0.18	-0.14	0.18

^a Mean value of Δ (= $\delta_{GCC} - \delta_{CONV}$) for eleven replicate analyses.

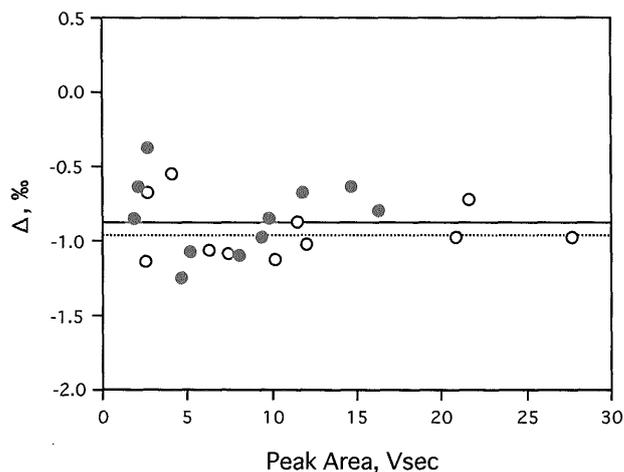


第3図 n -アルカンの Δ 値の平均を炭素数に対してプロットした図。同位体比のキャリブレーションは次の δ 値を帰属することによった：ミキシングボリュームからの2番目の二酸化炭素(シンボル：菱形), 炭素数18の通常 n -アルカン(四角), 炭素数18, 30の通常 n -アルカン(丸), 炭素数16, 24, 32の重水素化 n -アルカン(三角)。黒シンボルは重水素化 n -アルカンのプロットを示す。

Fig. 3 Values of mean Δ for n -alkanes are plotted against their carbon numbers. Isotopic calibration was based on the assignment of δ values of the followings: second carbon dioxide from the mixing volume (symbols: diamonds), regular C_{18} n -alkane (squares), regular C_{18} and C_{30} n -alkanes (circles), and perdeuterated C_{16} , C_{24} , and C_{32} n -alkanes (triangles). Solid symbols indicate the data points of perdeuterated n -alkanes.

らウォーターセパレーターの水の除去が不完全であるとしても合理的に説明できない。

ミキシングボリュームからイオンソース入る二酸化炭素の同位体比(標準値)は、ボンベのレギュレーターからガラス容器中にパージする方法で二酸化炭素を採取し、デュアルインレット法で測定されている。このようにして得られた同位体比がミキシングボリュームを経由してイオンソースに送り込まれている二酸化炭素の同位体比と必ずしも一致するとは限らない。もしボンベからミキシングボリュームを経由してイオンソースに至るまでの経路で同位体分別があるならば、イオンソースに導入される二酸化炭素の同位体比は、上記の方法では正しく測定されない。Merritt *et al.*(1994)によれば、ボンベに残



第4図 特定 n -アルカンの Δ 値を質量数44の信号トレース上のピーク面積に対してプロットした図。白丸と黒丸はそれぞれ通常体と重水素体の炭素数24の n -アルカンのデータを示す。同位体比のキャリブレーションは、ミキシングボリュームから導入した2番目の二酸化炭素の δ 値を帰属することによった。水平の点線と実線はそれぞれ通常体と重水素体の n -アルカンの Δ 値の平均の位置を示す。

Fig. 4 Values of Δ for specific n -alkanes are plotted as a function of the area of peaks in the m/z 44 signal traces. Open and solid circles indicate the data points of regular and perdeuterated C_{24} n -alkanes, respectively. Isotopic calibration was based on the assignment of δ value of the second carbon dioxide admitted from the mixing volume. Dotted and solid lines indicate where are the values of mean Δ of the regular and perdeuterated n -alkanes, respectively.

存する二酸化炭素の同位体比は、GC/C/MSのスタンダードとして消費される過程で変動し、ボンベ圧が500 psi から 0 psi に近い状態に至る間に約0.4%高くなると報じている。このことは、二酸化炭素がボンベからミキシングボリュームに至る過程で、同位体比が変化することを意味している。ミキシングボリュームからイオンソースに至る過程や、オープンスプリットからイオンソースに至る過程でも、二酸化炭素が部分的にキャピラリーに吸い込まれるため、同位体分別が起きるチャンスがある。以上の点を考慮すると、ミキシングボリュームから導入した二酸化炭素を標準とした場合の同位体比の計算値が標準値と一致しないのはむしろ当然であり、その差は、ボンベの二酸化炭素がイオンソースに至るまでの過程で生じる同位体分別と、燃焼炉で生成した n -アルカン由来の二酸化炭素がオープンスプリットからイオンソースに至るまでの過程で生じる同位体分別の差を反映している可能性がある。ところがこの場合、測定値と標準値の同位体比の差は、すべての成分について一定となることが予想され、リテンションタイムとともに Δ 値が

マイナス方向にドリフトする傾向(第3図)までは説明することができない。

以上のように、本研究の実験結果から、測定値と標準値の違いをもたらす要因を解明することは困難である。結論として、ミキシングボリュームから導入する二酸化炭素を標準として重質炭化水素の炭素同位体比を測定する方法は、本装置について検討した限りまだ実用上問題ありと判断された。

3.2 一部の n -アルカンを標準とする場合(内部標準法)

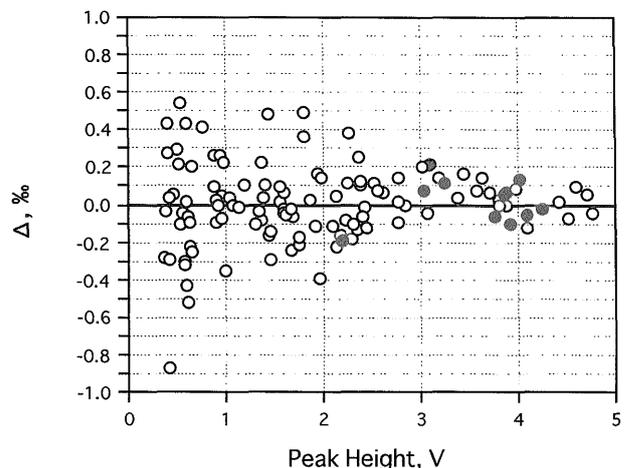
n -アルカンの混合試料に含まれる成分の内、炭素数18の n -アルカン(通常体)を内部標準としてその δ 値を帰属し、他の n -アルカンの δ 値を計算した結果を第2表(1 Internal Standard)に示した。各成分の δ 値の標準偏差は0.15%から0.32%の範囲(平均0.22%)で、測定精度は前述の外部標準法の場合と殆ど変わらない。一方、各成分の Δ 値の平均は+0.12%から-0.41%の範囲(平均-0.17%)で、外部標準法の場合に比べて測定の確度は大きく向上している。ただし、 Δ 値の平均を n -アルカンの炭素数に対してプロットした場合、外部標準の場合と同様、炭素数とともに Δ 値の平均がマイナス方向に変化するドリフト傾向が認められる(第3図の四角シンボル)。

標準とする n -アルカンとして、炭素数18の n -アルカン(通常体)とともに、リテンションタイムが離れた成分として、炭素数30の n -アルカン(通常体)を標準に加え、他の n -アルカンの δ 値を計算した結果を第2表(2 Internal Standard)に示した。この場合、2つの標準 n -アルカンに対して、その δ 値から導き出される真のイオン電流比(45/44、及び46/44比)(Santrock *et al.*, 1985)と実測されるイオン電流比の相違を補正するための係数が個々に評価されるため、それらをリテンションタイムに対して直線的に内挿または外挿する方法で、他の n -アルカンのリテンションタイムにおける補正係数が導き出され、これとイオン電流比(実測値)をもとに同位体比が計算される(Ricci *et al.*, 1994)。各成分の δ 値の標準偏差は0.08%から0.35%の範囲(平均0.18%)で、測定精度は外部標準法や1成分だけの内部標準法の場合と変わらない。しかし各成分の Δ 値の平均は-0.15%から+0.15%の範囲(平均0.00%)で、測定の確度が更に向上し、 n -アルカンの同位体比(測定値)の標準値に対する偏りが認められなくなる。また炭素数とともに Δ 値の平均が変化するドリフト傾向も解消される(第3図の丸シンボル)。すなわち、内部標準法においてリテンションタイムの離れた複数の成分の δ 値を帰属することによって、高い測定確度を得られることが明らかになった。

内部標準法で同位体比を測定する際、標準成分の選択の仕方によって、測定成分の Δ 値の平均に若干の偏りが生じる可能性がある。例えば、同じ測定について、炭素

数16, 24, 32の n -アルカン(重水素体)を標準とした場合、各成分の Δ 値の平均は-0.06%から-0.23%(平均-0.14%)で、 n -アルカンの同位体比(測定値)の標準値に対する僅かな偏りが現れる(第3表の3 Internal Standard)。この理由を考える際に考慮すべきことは、 n -アルカンの標準値にも若干の誤差が見込まれるという点である。試薬 n -アルカンには不純物(1ないし2%)が含まれているため、従来法で求めた標準値が n -アルカンの真の同位体比と完全に一致するとは限らない。もし n -アルカン中の不純物が2%含まれていて、その炭素同位体比が n -アルカンと5%の差があるならば、標準値は n -アルカンの真の同位体比と $\pm 0.1\%$ のずれを生じる。このため、内部標準法で計算される炭素同位体比は、標準とする n -アルカンの標準値の誤差と測定対象とする n -アルカンの標準値の誤差の関係で、0.2%のずれが生じるケースも考えられる。今回、 n -アルカン(重水素体)を標準とした場合の計算結果に偏りが生じた原因として、同 n -アルカンの標準値が真の炭素同位体比よりも低い(不純物の同位体比が低い)という可能性が考えられる。

炭素数18と30の n -アルカン(通常体)を標準として、他の n -アルカンの同位体比を測定した場合の個々の Δ 値を、ピークの高さに対してプロットしたのが第5図(白丸シンボル)である。ピークが高くなるにつれて、 Δ 値の分散が小さくなる傾向が明瞭に認められる。ピークの高さが1 V以上及び2 V以上のすべての点がそれぞれ Δ 値 $\pm 0.5\%$ 及び $\pm 0.4\%$ 範囲内に収まっている。より定量的な議論を行うため、ピークの高さを3段階に分けて、



第5図 n -アルカンの Δ 値を質量数44の信号トレース上のピーク高に対してプロットした図。同位体比のキャリブレーションは、炭素数18と30の通常 n -アルカンの δ 値を帰属することによった。

Fig. 5 Values of Δ for n -alkanes are plotted as a function of the height of peaks in the m/z 44 signal traces. Isotopic calibration was based on the assignment of δ values of the regular C_{18} and C_{30} n -alkanes.

第3表 質量数44の信号トレース上のピークの高さが異なる場合の同位体測定精度。キャリブレーションは炭素数18と30の通常 *n*-アルカンの δ 値を帰属することによった。

Table 3 Accuracy and precision for the isotopic analyses in the different ranges of the height of peaks in the *m/z* 44 signal traces. Calibration was made by the assignment of the δ values of regular C_{18} and C_{30} *n*-alkanes.

Compound	2 Internal Standards Height<1V			2 Internal Standards 1V<Height<2V			2 Internal Standards Height>2V		
	<i>n</i> ^a	mean Δ ^b (‰)	σ ^d (‰)	<i>n</i> ^a	mean Δ ^b (‰)	σ ^d (‰)	<i>n</i> ^a	mean Δ ^b (‰)	σ ^d (‰)
<i>n</i> -C ₁₆ D ₃₄	4	-0.01	0.53	4	0.13	0.21	3	0.03	0.06
<i>n</i> -C ₂₀ H ₄₂	3	-0.28	0.18	2	-0.27	0.03	6	-0.04	0.06
<i>n</i> -C ₂₂ H ₄₆	3	-0.14	0.13	2	0.03	0.07	6	-0.03	0.12
<i>n</i> -C ₂₄ D ₅₀	3	0.17	0.18	5	-0.02	0.18	3	0.24	0.10
<i>n</i> -C ₂₄ H ₅₀	3	0.01	0.31	2	-0.09	0.07	6	0.06	0.07
<i>n</i> -C ₂₆ H ₅₄	3	-0.17	0.14	2	-0.01	0.04	6	-0.01	0.10
<i>n</i> -C ₂₈ H ₅₈	3	0.00	0.07	2	-0.05	0.03	6	-0.05	0.09
<i>n</i> -C ₃₂ D ₆₆	5	0.17	0.24	4	0.11	0.23	2	0.16	0.10
<i>n</i> -C ₃₂ H ₆₆	3	0.20	0.22	5	0.02	0.20	3	0.04	0.10
<i>n</i> -C ₃₄ H ₇₀	4	-0.10	0.12	5	-0.08	0.20	2	0.05	0.05
mean		-0.01	0.21		-0.02	0.13		0.04	0.08

^a Numbers of replicate analyses.

^b As in Table 2.

同位体比の測定精度と確度を計算した結果が第3表である。各成分の標準偏差の平均は、ピークの高さ1 V未満、1 V以上2 V未満、2 V以上で、それぞれ0.21‰, 0.13‰, 0.08‰である。この結果から、GC/C/MSを用いて内部標準法で重質炭化水素の炭素同位体比を測定する場合、ピークの高さが高いほど(ただし5 V以下)高い測定精度が得られることが示された。ピークの高さ2 V以上のデータの標準偏差の平均は、Merritt *et al.*(1995)が同様の測定条件(MAT252のGC/C/MSを使用、燃焼炉は酸化銅で850°Cに設定、キャリブレーションは内部標準法)で炭素数17から35の *n*-アルカンの同位体比を測定したときの標準偏差の平均(0.07‰)と同等であり、期待されるGC/C/MSの測定精度が達成されていることが確認された。

各成分の Δ 値の平均は、ピークの高さ1 V未満(平均-0.01‰), 1 V以上2 V未満(平均-0.02‰), 2 V以上(平均0.04‰)の間で差が小さく、測定確度に関してはピークの高さの依存性が小さいことが確認された。

3.3 感度

本研究の測定条件における *n*-アルカン(通常体)の感度 *S*(質量数44のトレース上でのピーク面積を、注入した試料中の該当成分の炭素量で割った値, Vsec/nmolC)の平均と標準偏差の計算結果を第4表に示した。全測定(*n*=11)について計算される感度の標準偏差は各成分とも0.3Vsec/nmolCで、測定間の分散が非常に大きい。試料注入量を3段階に分けて同様の計算をすると、測定間の分散が小さくなり、試料注入量とともに感度が高くなる傾向が見いだされる。このことは、試料をシリンジからガスクロマトグラフに注入する際、少量がシリンジ中

に残ることを反映していると考えられる。注入量が多い(0.80-1.00 μ l)ときの感度は平均1.24 \pm 0.15Vsec/nmolCで、成分間の感度の差は小さい。

同位体比の測定精度はピークの高さに依存する(前述)一方、ピーク面積とピークの高さの関係は、成分ごとに異なり(第6図)、1 Vの高さを有するピークの面積は、炭素数18, 30, 32, 34の *n*-アルカン(通常体)でそれぞれ4.1, 4.4, 5.2, 7.1Vsecで、炭素数とともに大きくなる。このことと上記の感度から、高さ1 Vのピークを得るために必要な成分の量(炭素量換算)は3 nmol(炭素数18の *n*-アルカン)から6 nmol(炭素数34の *n*-アルカン)と計算される。同様に、高さ2 Vのピークを得るために必要な成分の量は7 nmol(炭素数18の *n*-アルカン)から14 nmol(炭素数34の *n*-アルカン)となる。

実際の堆積物等の試料中のバイオマーカーの炭素同位体比を測定する場合、もっと少ない試料注入量で炭素同位体比を測定することが要求されるケースも想定される。炭素数の大きい成分の場合、ガスクロマトグラフのオープンの昇温速度や到達最高温度を高めて、ピークの形状をシャープにすることによって、最小の試料分量を低くすることが考えられる。しかしながら、オープンの温度条件を変えると、試料によっては、ピークの分離条件が悪くなることや、相対的に炭素数の小さい成分のピークが高くなりすぎる(7 V以上になる)ことが問題となるケースも起こりうる。

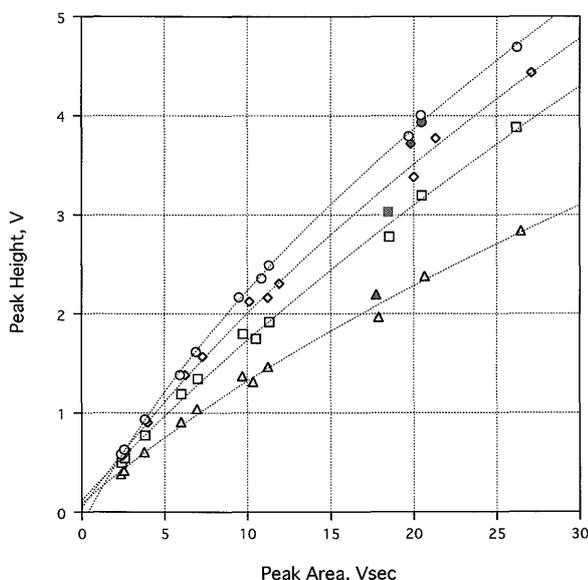
すべての成分について共通に感度を高くする方法として、質量分析計のエミッション電流を高くする方法と、VISCを閉じる方法が考えられる。本研究では、エミッション電流を1.00mAとして測定を行ったが、これを1.50mAまで高くすることが可能であり、これに伴って

第4表 異なる試料注入量における GC/C/MS の *n*-アルカンに対する感度。
Table 4 Sensitivity of GC/C/MS to *n*-alkanes in the different ranges of injection volume.

Compound	Injection Volume 0.30 - 1.00 μ l		Injection Volume 0.30 - 0.45 μ l		Injection Volume 0.50 - 0.75 μ l		Injection Volume 0.80 - 1.00 μ l	
	$(n^a = 11)$		$(n^a = 4)$		$(n^a = 4)$		$(n^a = 3)$	
	mean S^b (Vsec/nmol C)	σ d (Vsec/nmol C)						
<i>n</i> -C ₁₈ H ₃₈	0.82	0.30	0.53	0.12	0.80	0.07	1.22	0.15
<i>n</i> -C ₂₀ H ₄₂	0.83	0.30	0.54	0.12	0.81	0.07	1.23	0.15
<i>n</i> -C ₂₂ H ₄₆	0.84	0.31	0.55	0.13	0.83	0.07	1.26	0.15
<i>n</i> -C ₂₄ H ₅₀	0.84	0.30	0.55	0.12	0.83	0.07	1.25	0.15
<i>n</i> -C ₂₆ H ₅₄	0.84	0.30	0.55	0.12	0.83	0.07	1.25	0.15
<i>n</i> -C ₂₈ H ₅₈	0.83	0.30	0.54	0.12	0.82	0.07	1.23	0.15
<i>n</i> -C ₃₀ H ₆₂	0.85	0.30	0.56	0.13	0.84	0.07	1.25	0.15
<i>n</i> -C ₃₂ H ₆₆	0.83	0.29	0.55	0.12	0.82	0.06	1.22	0.15
<i>n</i> -C ₃₄ H ₇₀	0.81	0.28	0.53	0.12	0.79	0.06	1.19	0.15
mean	0.83	0.30	0.54	0.12	0.82	0.07	1.24	0.15

^a Numbers of replicate analyses.

^b Mean value of S (sensitivity, i.e., ratio of the peak area to the content of carbon) for replicate analyses.



第6図 質量数44の信号トレース上のピークの面積と高さの関係。丸、菱形、四角、三角のシンボルはそれぞれ炭素数18, 30, 32, 34の *n*-アルカン(通常体)のプロットを示す。白と黒のシンボルはそれぞれ VISC を開いたときと閉じたときのものである。点線は前者に対する2次回帰曲線で、VISC を開いたときの各 *n*-アルカンのピークの面積と高さの関係を表す。

Fig. 6 Relationship between the area and height of peaks in the m/z 44 signal traces. Circles, diamonds, squares, and triangles indicate the data points for regular C₁₈, C₃₀, C₃₂, and C₃₄ *n*-alkanes, respectively. Open and solid symbols indicate the data points for those obtained with the VISC opened and closed during the analyses, respectively. Dotted lines indicate the regression curves of the second order for the former, representing the relationship between the area and height of peaks of each *n*-alkane.

質量分析計の感度(ミキシングボリュームからの二酸化炭素のピーク高)は約20%高くなる。ただし、エミッション電流を高くすると、フィラメントの寿命が短くなることが予想されるため、常に高い電流値とすることは好ましくないであろう。VISC を閉じる方法は、質量分析計のメンテナンス上問題なく、感度は約2倍になる。ただし、VISC を閉じるとピークのテーリングが顕著になる恐れもあり、実用性については検証が必要と考えられる。そこで、VISC を閉じること以外はすべて同じ分析条件で、同じ *n*-アルカン混合試料の同位体比を測定したところ、ピークの高さと Δ 値の関係に於いて、VISC を開いて測定した場合と同等の結果が得られた(第5図の黒丸)。また炭素数18, 30, 32, 34の *n*-アルカンのピーク高とピーク面積の関係を、VISC を閉じた場合と比較したところ、炭素数34の *n*-アルカンでは殆ど差がなく、炭素数18, 30, 32の *n*-アルカンでは同じピーク面積に対するピークの高さがむしろ高くなっている(第6図の黒シンボル)。これは、VISC を閉じることによってピークがブロードになる効果と、同じ高さのピークを得るために必要な成分量が減少して、ガスクロマトグラフにおけるピークがシャープになる効果の相殺結果を反映したものと考えられる。この結果から、VISC を閉じて測定することは、GC/C/MS で重質炭化水素の同位体比を測定する際、感度を高める方法として有効である可能性が明らかになった。

4. まとめ

炭素同位体比が既知の *n*-アルカン試薬(炭素数16-34)を用いて、重質炭化水素の分子ごとの炭素同位体比を GC/C/MS で分析するための測定条件と性能について検討した。ミキシングボリュームから導入する二酸化炭素を外部標準として *n*-アルカンの炭素同位体比を測定

した場合、 Δ 値の平均は-0.7‰から-1.2‰の範囲で、大きな系統的誤差を伴う。内部標準法で炭素数18の *n*-アルカンを標準として他の *n*-アルカンの炭素同位体比を測定した場合、 Δ 値の平均は+0.12‰から-0.41‰の範囲で、測定の確度が改善されるものの、*n*-アルカンの炭素数とともに Δ 値の平均がマイナス方向に変化するドリフト傾向が認められる。内部標準法で炭素数18と30の2つの *n*-アルカンを標準とした場合、 Δ 値の平均は-0.15‰から+0.15‰の範囲(平均0.00‰)で、ドリフト傾向も解消される。同位体比の測定精度は、質量数44のトレース上のピークの高さとともに向上し、高さ2 V 以上の場合、高い測定精度(δ 値の標準偏差が平均0.1‰未満)が得られる。本研究の測定条件(エミッション電流1.00mA, VISC開放)で高さ2 V のピークを得るために必要な *n*-アルカンの量は、炭素量換算で7 nmol から14nmol であり、炭素数の多い成分ほど多くを要する。VISC を閉じた状態で測定すれば、測定の精確度を損なうことなく、感度を約2倍に高められる可能性がある。

謝辞 本研究を行うにあたり、東京都立大学理学部石渡良志教授、奈良岡浩助教授、山田桂太博士、地質調査所科学技術特別研究員有信哲哉博士にはGC/C/MSの性能やデータ処理に関する助言、情報をいただいた。シェブロン社 Martin Schoell 博士には試薬 *n*-アルカンの炭素同位体比(標準値)を決める際の試料分取法について、地質調査所地殻化学部長松久幸敬博士にはGC/C/MSの装置内で起こりうる二酸化炭素の同位体分別に関して貴重なコメントをいただいた。サーモクレスト(株)大堀基己氏にはGC/C/MSのメンテナンスに協力していただいた。工業技術院特別研究「島弧型炭化水素資源ポテンシャルの形成機構と予測手法に関する研究」グループ長である地質調査所燃料鉱床研究室長徳橋秀一博士には、本研究を進めるにあたって、多大なるご支援、ご協力をいただいた。地質調査所地殻化学部地球化学研究室主任研究官猪狩俊一郎氏には、本稿を査読していただき有益な御助言をいただいた。ここに各位への深甚なる謝意を表します。

文 献

- Collister, J. W., Summons, R. E., Lichtfouse, E. and Hayes, J. M. (1992) An isotopic biogeochemical study of the Green River Oil Shale. *Org. Geochem.* **19**, 265-276.
- Freeman, K.H., Hayes, J.M., Trendel, J.M. and Albrecht, P. (1990) Evidence from carbon isotope measurements for diverse origins of sedimentary hydrocarbons. *Nature*, **343**, 254-256.
- Hayes, J.M., Freeman, K.H., Popp, B.N. and Hoham, C.H. (1990) Compound-specific isotopic analyses: A novel tool for reconstruction of ancient biogeochemical processes. *Org. Geochem.*, **16**, 735-747.
- Leckrone, K.J. and Hayes, J.M. (1997) Efficiency and temperature dependence of water removal by membrane dryer. *Anal. Chem.*, **69**, 911-918.
- Merritt, D.A. and Hayes, J.M. (1994) Factors controlling precision and accuracy in isotope-ratio-monitoring mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **66**, 2336-2347.
- Merritt, D.A., Brand W.A. and Hayes, J.M. (1994) Isotope-ratio-monitoring gas chromatography-mass spectrometry: methods for isotope calibration. *Org. Geochem.*, **21**, 573-583.
- Merritt, D.A., Freeman, K.H., Ricci, M.P., Studley, S.A. and Hayes, J.M. (1995) Performance and optimization of a combustion interface for isotope ratio monitoring gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **67**, 2461-2473.
- Ricci M.P., Merritt D.A., Freeman K.H. and Hayes J.M. (1994) Acquisition and processing of data for isotope-ratio-monitoring mass spectrometry. *Org. Geochem.*, **21**, 561-571.
- Santos Neto, E.V.D., Hayes, J.M. and Takaki, T. (1998) Isotopic biogeochemistry of the Neocomian lacustrine and Upper Aptain marine-evaporitic sediments of the Potguar Basin, Northeastern Brazil. *Org. Geochem.*, **28**, 361-381.
- Santrock J., Studley S.A. and Hayes J.M. (1985) Isotopic analyses based on the mass spectrum of carbon dioxide. *Anal. Chem.*, **57**, 1444-1448.
- Schoell, M., McCaffrey, M.A., Fago, F.J. and Moldowan, J.M. (1992) Carbon isotopic compositions of 28,30-bisnorhopane and other biomarkers in a Monterey crude oil. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **56**, 1391-1399.
- Schoell, M., Hwang, R.J., Carlson, R.M.K. and Welton, J.E. (1994) Carbon isotopic composition of individual biomarkers in gillstones (Utah). *Org. Geochem.*, **21**, 673-683.

(受付:1998年10月14日;受理:1999年2月18日)