

## 赤外分光法による $^{13}\text{C}$ 安定同位元素の測定

$^{13}\text{C}$  Analysis by Infrared Absorption Spectrophotometry

教養部生物学教室 山口 征 矢

Department of Biology, College of Liberal Arts

Yukuya YAMAGUCHI

A simple infrared absorption spectrometry using the EX-130  $^{13}\text{CO}_2$  analyser(JASCO) for measuring the  $^{13}\text{C}$  abundance(atom %)in the phytoplankton cell was introduced. In laboratory experiments using the cultured marine diatom, *Skeletonema costatum*, the photosynthetic rate obtained by the method showed good agreement with those by the  $^{14}\text{C}$  method, indicating the usefulness of infrared absorption spectrometry. The advantage of the method is its ease of use and effectiveness of saving labour and time for the analysis of  $^{13}\text{C}$  abundance in samples, compared with those by mass spectrometry or by nuclear magnetic resonance.

放射性同位元素(RI)の使用が厳しく規制されているわが国では、特別な例を除いて、野外でRIを使用する事ができない。植物プランクトンの光合成生産の機構や生理的適応の解析のためには、 $^{14}\text{C}$ の利用が不可欠であるにもかかわらず、わが国では思うにまかせないのが現実である。このため次善の策として、著者らは $^{14}\text{C}$ に代えて安定同位元素 $^{13}\text{C}$ をトレーサーとして利用する方法を模索してきた(Hama *et al.*1983, Satoh *et al.*1985)<sup>1)</sup>。ここではその概略を示すとともに、筆者らが $^{13}\text{C}$ 同位体比の測定に利用している赤外分光法を紹介する。

$^{13}\text{C}$ の分析は、質量分析計によることが一般的であるが、試料の前処理の煩雑さ、機器の取扱や管理に熟練を要すること、あるいは必要な経費等の面で、誰にでも簡単に使用できるものではない。加えて、 $^{13}\text{C}$ をトレーサーとして使用する場合は、 $\text{CO}_2$ を含む気体をそのまま測定するか、試料を酸素気流中で燃焼させて $\text{CO}_2$ として測定するなど、 $\text{CO}_2$ 以外の気体との共存状態で測定する必要がある。また、筆者らの従事するような分野では、大量の試料を手早く処理することが要求される。

赤外分光法の最も大きな利点は、試料気体中に大量に存在する酸素や窒素が赤外不活性であるため、その影響を全く受けないこと。また、仮に赤外部を吸収する気体が混在していても、 $\text{CO}_2$ とは吸収波長が異なるため妨害を受けないこと、 $^{12}\text{C}$ および $^{13}\text{C}$ の絶対量が同時に測定できること、などであろう(Hirano 1979)<sup>2)</sup>。

### 赤外分光法の測定原理と測定装置

$^{13}\text{C}$ 同位体比の測定装置として、筆者らは回折

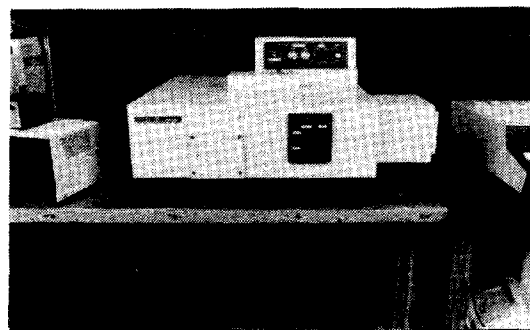


Photo.1. EX-130  $^{13}\text{CO}_2$  Analyser(JASCO)

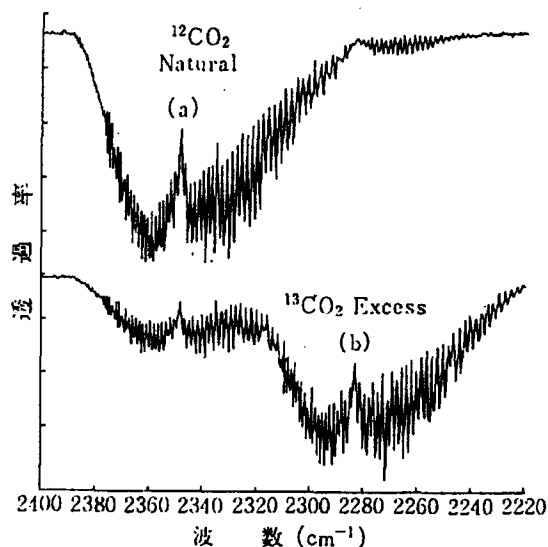


Fig.1. Infrared Absorption Spectra of CO<sub>2</sub>.  
(a) Natural <sup>12</sup>CO<sub>2</sub>, (b) <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> excess. (from Kokubun and Yanagisawa, 1982)

格子分光器を用いた日本分光工業社製の、<sup>13</sup>C分析装置(EX-130型)を用いている(写真)。

CO<sub>2</sub>は2349cm<sup>-1</sup>付近に逆対象伸縮振動に基づく吸収をもっているが、図1(a)(b)からわかるように、<sup>12</sup>CO<sub>2</sub>と<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>では約70cm<sup>-1</sup>の同位体によるシフトがある。したがって、<sup>12</sup>CO<sub>2</sub>と<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>による吸収の強さを測定する事によって、それぞれの濃度を求める事ができる。実際には、2290cm<sup>-1</sup>から2340cm<sup>-1</sup>の波長域では、<sup>12</sup>CO<sub>2</sub>による吸収と<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>の吸収が重なっているため、測定に利用できないし、また自然界での<sup>12</sup>Cに対する<sup>13</sup>Cの存在比は、通常1.1%程度にすぎない(表1)から、正確にこれを測定するためには、吸収セルを長くして光路長を伸ばす必要があるなど、困難な問題も多い。光源からのエネルギー、S/N比、吸収セル長、測定するCO<sub>2</sub>濃度など、さまざまな角度から検討された結果、本装置では<sup>12</sup>CO<sub>2</sub>については2380±10cm<sup>-1</sup>、<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>については2270±10cm<sup>-1</sup>の範囲の吸収帯を測定に用いている。このようにすると、<sup>12</sup>CO<sub>2</sub>の測定波長域では<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>の吸収の重なりはないが、<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>の吸収波長域では<sup>12</sup>CO<sub>2</sub>の吸収の重なりが若干生ずるので、<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>の吸収波長域での重なり分を、あらかじめ既知濃度の<sup>12</sup>CO<sub>2</sub>を

Table 1. Natural Abundance (atom %) of <sup>13</sup>C in Cultured Diatom *Skeletonema costatum*.

Sample No.	<sup>12</sup> C (μg)	<sup>13</sup> C (μg)	atom % of <sup>13</sup> C
1	26.07	0.290	1.100
2	84.89	0.953	1.110
3	89.79	0.986	1.087
4	151.78	1.695	1.104
5	152.03	1.686	1.097
6	240.60	2.683	1.103
7	365.10	4.027	1.091
8	548.22	6.061	1.094
9	557.74	6.169	1.099
10	588.40	6.534	1.098
11	595.46	6.620	1.100
Mean			1.098
S.D.			0.006
C.V. (%)			0.55

用いて作成しておいた補正曲線を用いて計算し、差し引く事によって、<sup>12</sup>CO<sub>2</sub>と<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>の濃度を求める事ができる。

図2に、本装置の光学系と信号系統の概念図を示す。光源からの赤外線は、2枚の集光鏡によって試料側セルと対象側セルに導かれる。セルから出た2つの光束は、セクター鏡によって同一光路を通り、交互に分光器に入り、コリメーティング鏡によって平行光となって回折格子に入射する。ここで分光された光のうち、2380±10cm<sup>-1</sup>(<sup>12</sup>CO<sub>2</sub>)および2270±10cm<sup>-1</sup>(<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>)の光のみがそれぞれの出口スリットに結像する。2つの出口スリットから出た光はチョッパーによって交互に検地器に入射して電気信号に変換され、増幅器を経由した後、サンプルホールド回路で<sup>12</sup>CO<sub>2</sub>と<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>の信号に区分され、それぞれの吸収強度としてレコーダーに記録される。現実には、<sup>12</sup>CO<sub>2</sub>の濃度換算や<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>の吸収への重なり分の計算、<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>の濃度換算および<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>の存在比の計算などは、データプロセッサーへ送られた信号によって、自動的に行なわれる。植物プランクトン試料などの分析の場合は、付設した燃焼装置によって試料を燃焼し、生じたCO<sub>2</sub>ガスを本装置に導入して測定を行

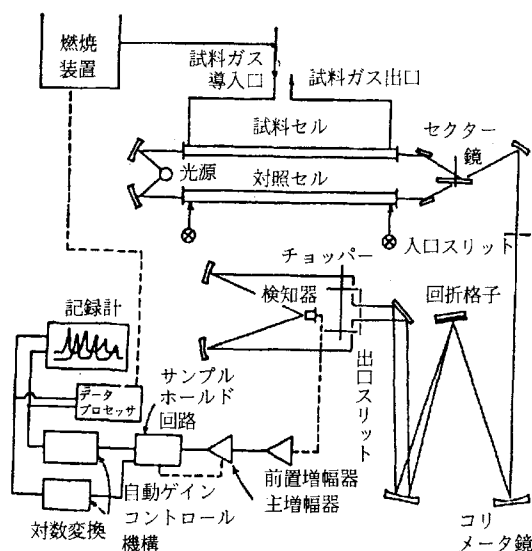


Fig.2. Optical and Signal Systems for EX-130  $^{13}\text{CO}_2$  Analyser (from Kokubun and Yanagisawa, 1982).

う、この場合、燃焼間隔のコントロールも、データプロセッサによって行なう事ができる。

先に述べたように、本装置では $^{12}\text{C}$ と $^{13}\text{C}$ の絶対濃度を直接測定できるので、 $^{13}\text{C}$ 存在比は次式によって求められる

$$^{13}\text{C} \text{ atom}\% = \frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C} + ^{13}\text{C}} \times 100 \quad (1)$$

実際に、 $^{13}\text{C}$  atom%既知のグリシン水溶液や、粉末植物試料を用いて本装置で得られた測定値と同じ試料について、質量分析法によって得られた測定結果を比較した結果はよく一致する（相関計数 $r=0.999$ ）という結果が得られている（国分・柳沢 1982）<sup>3)</sup>。

#### $^{13}\text{C}$ トレーサー法による光合成速度の測定

$^{13}\text{C}$ トレーサー法は、安定同位体 $^{13}\text{C}$ で標識した物質（通常 $\text{NaH}^{13}\text{CO}_2$ ）を試水に加えて、一定時間培養し、この間に植物プランクトンが取り込んだ $^{13}\text{C}$ 量を測定して、光合成により同化された炭素量を算出しようとする方法である。この場合、実際には試料中の粒子状の全炭素量（以下POCと記す）と、 $^{12}\text{C}$ と $^{13}\text{C}$ の同位体比を測定し、培養前後の $^{13}\text{C}$ の収支を考える。

すなわち、培養前の試料中のPOCの同位体比 ( $A_{ns}$ :  $^{13}\text{C}$  atom % )と $^{13}\text{C}$ をトレーサーとして加え、培養した後のPOCの同位体比 ( $A_{is}$ :  $^{13}\text{C}$  atom % )、およびPOC量 ( $\mu\text{gC}/\ell$ )の間には

$$A_{is} \cdot \text{POC} = A_{ns} \cdot (\text{POC} - \Delta\text{C}) + A_{ic} \cdot \Delta\text{C} \quad (2)$$

の関係が成立する。ただし、式中の $\Delta\text{C}$ は培養中に増加したPOC ( $\mu\text{gC}/\ell$ )を、 $A_{ic}$  ( $^{13}\text{C}$  atom %)はトレーサー添加後の試水中の全炭酸中の同位体比である。(2)式を変形すれば

$$\Delta\text{C} = \text{POC} \cdot \frac{(A_{is} - A_{ns})}{(A_{ic} - A_{ns})} \quad (3)$$

となり、培養時間( $T$ : hr)で除すれば、1時間当たりの光合成速度( $\mu\text{gC}/\text{hr}$ )を求める事ができる。また、そのようにして求めた値を、試水容量( $\ell$ )で除すれば、試水の単位体積当りの光合成速度( $P$ :  $\mu\text{gC}/\ell/\text{hr}$ )が求められる。すなわち

$$P (\mu\text{gC}/\ell/\text{hr}) = \frac{\text{POC} \cdot (A_{is} - A_{ns})}{T \cdot (A_{ic} - A_{ns})} \cdot f \quad (4)$$

ただし  $f$  は $^{13}\text{C}$ の同位体効果( $f=1.025$ )である。

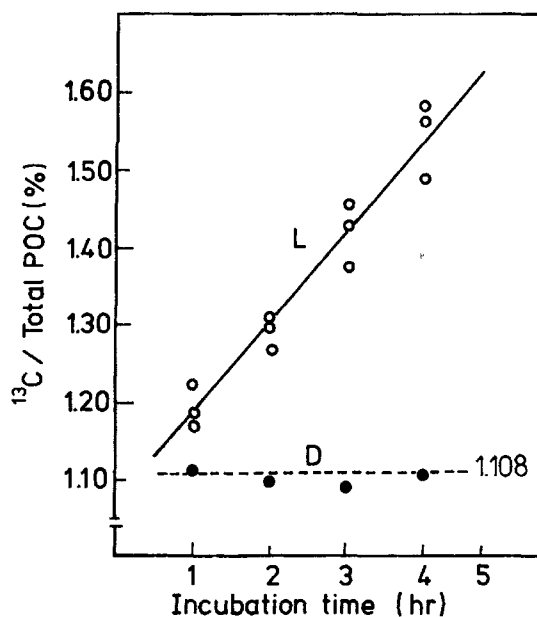


Fig.3. Relationship between the Incubation Time and the  $^{13}\text{C}$  Abundance in *Skeletonema costatum* ( $A_{ic}=6.78\%$ ). Open circle,  $A_{is}$  of the light bottle. Solid circle,  $A_{is}$  of the dark bottle.

さらにこの値を、単位試水量当りの植物プランクトン量(通常は光合成色素クロロフィル $a$ 量:  $\mu\text{g}/\ell$ )で除すれば、植物プランクトンの光合成活性を求める事ができる。

図3は海産珪藻 *Skeletonema costatum* の培養群を用いて、 $20^{\circ}\text{C}$ 、 $100\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$ の光条件下と暗条件下で、試水中の $^{13}\text{C}$ の濃度が6.78atom %となるように $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ を添加した場合の、培養時間と藻体内の $^{13}\text{C}$  atom %の関係を示している(Satoh *et al.*1985)<sup>4)</sup>。光条件下では時間の経過に比例して、藻体内の $^{13}\text{C}$  atom %が増加する(すなわち光合成による炭素の取り込みが生じる)が、暗条件下では炭素の取り込みが生じない事が明らかに示されている。

筆者らは紹介した方法を用いて、太平洋域を中心に、内湾から外洋域までの基礎生産機構の解析を試みているが、RIと異なり、通常の実験室・設備で利用できる $^{13}\text{C}$ 安定同位元素の利用によって、かなりの成果を挙げることができた。

#### 赤外分光法の課題

安定同位元素を用いる事は、実験操作上安全であり、通常の実験装置があれば十分であるから、狭い船舶上の作業などでは便利な方法である。しかしながら、 $^{13}\text{C}$ 法は $^{14}\text{C}$ 法に対して感度の面で著しく劣ることは自明の事であるし、同様に $^{13}\text{C}$ 同位体比分析法としての赤外分光法の感度が質量分析法に劣る事は否定できない。また赤外分光法で正確な測定を行うためには、現時点では試料中のPOC濃度として $25\mu\text{gC}/\ell$ 以上を必要とする事も難点である。近い将来これらの欠点が克服されれば、赤外分光法は水界生態系の炭素循環の研究の強力な武器となりうるだろう。

#### 文 献

- 1) T. Hama., T. Miyazaki, Y. Ogawa, T. Iwakuma, M. Takahashi, A. Otsuki and S. Ichimura(1983): *Mar. Biol.*, 73, 31-36.
- 2) S. Hirano., T. Kanamatsu, Y. Takagi and T. Abei(1979): *Analytical Biochem.*, 96, 64-69.
- 3) 国分信彦・柳沢 啓 (1982): *Radioisotopes*, 31, 268-277.
- 4) H. Satoh., Y. Yamaguchi, N. Kokubun and Y. Aruga(1985): *La mer*, 23, 171-176.