

## キャピラリーゾーン電気泳動法による塩中フッ化物イオンの定量

福士 恵一<sup>1</sup>, 乾 秀之<sup>1</sup>, 堀田 弘樹<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 神戸大学バイオシグナル総合研究センター, <sup>2</sup> 神戸大学大学院海事科学研究科

**概要** 【緒言】フッ化物イオン(F<sup>-</sup>)は, 生物にとって不可欠な微量元素であるが, 過剰摂取は様々な疾患をもたらすため, 塩中 F<sup>-</sup>を定量することは重要である。従来, F<sup>-</sup>定量に用いられている吸光光度法は再現性の良い方法であるが, 高塩分試料に適用する場合, 煩雑な前処理操作や塩誤差補正を必要とする。一方, キャピラリーゾーン電気泳動法(CZE)では, 試料中高濃度共存成分を逆に利用して濃度感度を改善できる(一時的等速電気泳動(tTTP))長所がある。本研究では, 塩中 F<sup>-</sup>を簡単かつ正確に定量するために, tTTP-CZE 法について検討した。

**【実験】**キャピラリー: 内径 75  $\mu\text{m}$ , 全長 62.4 cm, 有効長(試料注入端から検出器までの長さ) 50 cm; 泳動液: 5 mM 2,6-ピリジンジカルボン酸(pH 3.5) + 0.03% m/v ヒドロキシプロピルメチルセルロース; 試料注入法: 真空吸引法(50 kPa で 1.5 秒, 107 nL); 泳動電圧: 16 kV(試料注入側を陰極); 検出波長: 200 nm。標準溶液: 0 - 0.20 mg/L F<sup>-</sup>を添加した「伯方の塩」水溶液(3.0 g/100 mL); F<sup>-</sup>分析用塩試料: 副産塩 5 種類, 造粒塩 1 種類, 0.30 g を水に溶解し, 100 mL とした。F<sup>-</sup>濃度一定とし, 試料中の Cl<sup>-</sup>濃度を变化させた試料を分析し, F<sup>-</sup>ピークに対する Cl<sup>-</sup>濃度の影響について調べた。試料中 F<sup>-</sup>濃度は, 検量線より求め, 従来法(吸光光度法)による結果と比較した。

**【結果と考察】**F<sup>-</sup>ピーク面積及びピーク高さを用いた場合とも, 直線性の良い検量線が得られた。また, ピーク面積は Cl<sup>-</sup>濃度にかかわらずほぼ一定であった(F<sup>-</sup>濃度一定の場合)。F<sup>-</sup>の検出時間, ピーク面積, ピーク高さの相対標準偏差(0.025 mg/L F<sup>-</sup>,  $n = 4$ )はそれぞれ, 0.12, 5.9, 7.8%であった。また, 本法の検出限界(LOD,  $S/N = 3$ )は 0.022 mg/L, 定量限界(LOQ,  $S/N = 10$ )は 0.072 mg/L であった。本法による塩試料 6 種類中の F<sup>-</sup>含有量(mg/kg)は, 従来法による定量結果とほぼ一致した。今後, 本法の感度を改善するために, 光学系のレンズを新しいものと交換し, その効果を確認するとともに, スリットの大きさや枚数の影響を調べる予定である。また, キャピラリーを長くした場合や内径の大きなキャピラリーを用いた場合の効果についても検討するつもりである。

### 1. 研究目的

フッ化物イオン(F<sup>-</sup>)は, 骨組織や歯のエナメル質の形成, カルシウムやリンの代謝において重要な役割を果たしており, 人間の体にとって不可欠な微量元素である<sup>1)</sup>。そのため, 飲料水中のF<sup>-</sup>濃度が十分でない場合, これを補うために外国ではF<sup>-</sup>添加塩が利用されている<sup>2)</sup>。一方, F<sup>-</sup>の過剰摂取は, う歯だけでなく, 呼吸器疾患, 骨粗しょう症等他の疾患をもたらすことが指摘されている。そのため, 飲料水中のF<sup>-</sup>レベル上昇に起因する疾病負荷(経済的コスト, 死亡率, 疾病率で計算される特定の健康問題の指標のこと)を障害調整生命年(死亡率や疾病率の両方とも

一つの指標に結びつけたもの)という指標で数値化する試みもなされている<sup>3)</sup>。人間だけでなく野生動物に対しても, 工業的に排出されたF<sup>-</sup>が牧草に蓄積され, これを餌とする草食性動物の歯や骨格にフッ素症を引き起こすと言われている<sup>4)</sup>。カナダの州立公園に生息するムース(ヘラジカ)は, 6月頃になると, 冬季に使用された残りの道路用融雪塩を摂取するために, 道路付近に頻繁に現れることが知られており, 融雪塩中にF<sup>-</sup>が含まれていれば, ヘラジカに対してもフッ素症の被害が及ぶ可能性がある。従って, 人間の健康維持だけでなく, 野生動物の保護にとっても食用塩や道路用融雪塩中のF<sup>-</sup>を定量することは重要である。なお, 日本

における道路用融雪塩中F規制値は80 mg/kgと定められている。現在、F定量に用いられる吸光光度法(ランタン-アリザリンコンプレキソン吸光光度法)<sup>5)</sup>は再現性の良い優れた方法であるが、塩試料等の高塩分試料に適用する場合、蒸留等の煩雑な前処理操作や塩誤差補正を必要とする。また、海水や食卓塩中のF等の無機陽イオン及び陰イオンを定量するために、約3.5 gの食卓塩を100 mLの水に溶解した試料を約40倍に希釈し、イオンクロマトグラフィー(IC)により分析した報告<sup>6)</sup>もあるが、食卓塩中のFは検出できていない。さらに、ジルコニウム担持固相抽出-IC<sup>2)</sup>、電位差測定法<sup>7)</sup>が提案されているが、いずれもアルミニウム等の共存成分を除去するための前処理を必要とする。

一方、キャピラリーゾーン電気泳動法(CZE)は分離能が高く、一般的に共存成分の影響を受けにくいだけでなく、逆に試料中高濃度共存成分を利用したオンライン濃縮法(一時的等速電気泳動(tTTP))を利用すれば濃度感度を改善でき、高濃度共存成分試料中の微量成分を定量することが可能である。また、CZEは操作が簡単で分離能力に優れ、環境に優しい分析法である。我々は、最近、キャピラリーゾーン電気泳動法(CZE)による海水中のF定量法<sup>8)</sup>を開発したが、海水は塩の主要原料であり、本法は塩中Fの定量にも適用可能であると考えられる。そこで本研究では、塩中Fを簡単かつ精確に定量するために、上記tTTP-CZE法について検討した。

## 2. 研究方法

### 2.1 装置

装置として、フォトダイオードアレイ検出器を備えた大塚電子製キャピラリー電気泳動装置を用いた(CAPI-3200; Otsuka Electronics, Osaka, Japan)。キャピラリーはジーエルサイエンス製フューズドシリカ管(内径(i.d.) 75  $\mu\text{m}$ , 外径(o.d.) 375  $\mu\text{m}$ , 全長(total length) 62.4 cm, 有効長(effective length, キャピラリーの試料注入端から検出器までの長さ) 50 cm)である(GL Sciences, Tokyo, Japan)。恒温槽温度を25  $^{\circ}\text{C}$ に設定し、検出波長として200 nmを用いた。pH測定には、堀場製カスターニーLAB pHメーターを使用した(F-22; Horiba, Kyoto, Japan)。

従来法であるランタン-アリザリンコンプレキソン吸光光度法においては、日本分光製紫外可視分光光度計を用

いた(V-650; JASCO Corporation, Tokyo, Japan)。

### 2.2 試薬

試薬はすべて特級品を用いた。Fは紫外・可視領域に吸収を持たないため、泳動液(BGE)として、紫外吸収を有する2,6-ピリジンジカルボン酸(PDC; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)を用い、Fを間接的に検出する間接吸光法を採用した。電気浸透流を抑制するためにBGEに添加したヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC)はSigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)より購入した。F保存溶液(1,000 mg/L)は、フッ化ナトリウム(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan)より調製し、適宜希釈して使用した。キャピラリー洗浄及びBGEのpH調整に用いた水酸化ナトリウム(NaOH)はNacalai Tesqueより入手した。Fの検量線を作成するための標準溶液は以下のように調製した。まず、本法ではFを検出されなかった伯方の塩(塩事業センターより入手,  $\text{Cl}^-$ : 57.82 g/100 g) 3.0 gを水に溶解し、100 mLとした(基準塩試料(reference salt sample), 490 mM  $\text{Cl}^-$ )。試料バイアル(700  $\mu\text{L}$ )に基準塩試料60  $\mu\text{L}$ ずつ、1.0 mg/L F標準溶液を0, 15, 30, 60, 90, 120  $\mu\text{L}$ , 純水を540, 525, 510, 480, 450, 420  $\mu\text{L}$ とり良く混合し、0 - 0.20 mg/L Fを含む試料( $\text{Cl}^-$ 濃度は49 mM)を調製した。F分析用塩試料(同センターより入手した副産塩5種類, 造粒塩1種類)0.30 gを水に溶解し、100 mLとした。溶液調製の際に使用した純水は、蒸留水製造装置(WG220; Yamato Kagaku, Tokyo, Japan)及び超純水製造装置(Simpli Lab-UV; Merck Millipore, Tokyo, Japan)により得られたものである。なお、すべての溶液は、使用前に0.45  $\mu\text{m}$ のメンブランフィルター(Advantec Tokyo Kaisha, Tokyo, Japan)で濾過した。

従来法であるランタン-アリザリンコンプレキソン吸光光度法に用いた試薬は、FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporationより入手した。

### 2.3 定量操作法

試料中Fは以下の操作法により定量した。本法は、キャピラリー内において、塩試料溶液中の共存成分である $\text{Cl}^-$ がリーディングイオン(関連するイオンの中で最も電気泳動移動度の大きなイオン)、BGE中に含まれるPDCがターミナルイオン(関連するイオンの中で最も電気泳動移動度の小さなイオン)として作用し、両者に挟まれたFが泳動中に濃縮される現象(tTTP)を利用した分析法である

(tTP-CZE 法)。また、本法は汙過以外の前処理を一切必要としない。新しいキャピラリーについては、水で 5 分、1 M NaOH で 40 分、水で 10 分、BGE (1 M NaOH で pH 3.5 に調整した 5 mM PDC に 0.03% m/v HPMC を加えたもの) で 10 分洗浄した (真空吸引法, 50 kPa)。一日の分析開始前に、水を 5 分、BGE を 10 分流し、キャピラリーを洗浄した。試料分析時、まず、キャピラリー内に BGE を 3 分充填し、試料溶液を 1.5 秒吸引後 (107 nL, 試料長さはキャピラリー全長の 3.9% に相当する)、試料注入側を陰極として電圧 (16 kV) を印加した。試料吸引時間 1 秒は、試料体積で 71 nL, 試料長さはキャピラリー全長の 2.6% に相当する。一日の分析終了時は、純水を 5 分流してキャピラリーを洗浄後、純水を満たしておいた。試料中の F<sup>-</sup>濃度は、標準溶液を分析した際に得られたエレクトロフェログラムの F<sup>-</sup>ピーク面積から作成した検量線より求めた。得られた F<sup>-</sup>濃度を塩 1 kg あたりの含有量に換算した。

本法による結果を従来法であるランタン-アリザリンコンプレキソン吸光光度法<sup>4)</sup>による定量結果 (塩事業センターより提供) と比較した。この操作法は以下の通りである。まず、以下の要領でフッ素化合物を蒸留分離した。試料 1.5 g を水 30 mL に溶解し、フェノールフタレイン溶液 (0.5 g をエタノール 50 mL に溶解し、水を加えて 100 mL とした) を数滴加え、NaOH 溶液 (100 g/L) を 2, 3 滴加え、微アルカリ性とした。蒸留フラスコ中に水約 10 mL で洗い移し、二酸化ケイ素 1 mL, リン酸 1 mL, 過塩素酸 40 mL, 沸石約 10 個を加えた。受け器のメスフラスコ (250 mL) に水 20 mL, NaOH 溶液 (40 g/L) 10 mL, フェノールフタレイン溶液 1

mL を加えた。メスフラスコ (250 mL) に逆流止めの先端を浸し、水面下に保った。蒸留装置の電源を入れて蒸留を始め、受け器の溶液の色 (微紅色) が消えたら NaOH 溶液 (40 g/L) を滴下した。以後、微紅色を保つように、NaOH 溶液 (40 g/L) を滴下し、蒸留フラスコ内の液温が約 140 °C に達してから水蒸気を通した。蒸留温度を 145 ± 5 °C, 留出速度を 3 – 5 mL/分に調節し、受け器の液量が約 220 mL になるまで蒸留を続けた。220 mL に達したら電源を切り、冷却器と逆流止めを取り外し、冷却器の内管及び逆流止めの内外を少量の水で洗い、洗液を受け器に加えた。0.5 M 硫酸で中和し、水を標線まで加えた。

吸光光度法における操作は以下の通りである。留出液 30 mL をメスフラスコ (50 mL) にとり、アルフツソン溶液 (アルフツソン試薬 2.5 g を水に溶かして 50 mL とした) 5 mL, アセトン 10 mL を加えた。水で定容して混合し、約 90 分間放置後、吸光度を測定し (波長 620 nm, セル長 5 cm), 予め作成しておいた検量線 (0 – 0.20 mg/L) より試料中 F<sup>-</sup>濃度を求め、塩 1 kg あたりの含有量に換算した。

## 2. 4 シミュレーション

F<sup>-</sup>ピークの泳動時間、ピーク面積、ピーク高さに対する試料中 NaCl 濃度の影響を調べるために行った実験について、Simul 5<sup>9, 10)</sup> というソフトウェアを用いてシミュレーションを行った。シミュレーションには今回の助成金で購入した Intel 社製 Core i7-7500U 2.7 GHz のパソコンを用いた (Intel Corporation, Santa Clara, CA)。シミュレーションの条件を **Table 1** にまとめた。なお、電気浸透流 (EOF) はゼロとした。

**Table 1.** Simulation conditions

Software	Simul 5 <sup>9, 10)</sup>
Total capillary length	50 mm
Capillary i.d.	50 μm
Space step	12.5 μm
Sample-plug length	0.5 mm
BGE	5 mM PDC ( $pK_a = 6.92, 3.24, \mu_{im} = 55 \times 10^{-9}, 35 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) adjusted to pH 3.5 with NaOH ( $pK_a = 13.7, \mu_{im} = 51.9 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ )
Sample	0.005 mM hydrofluoric acid (0.095 mg/L F <sup>-</sup> , $pK_a = -2, \mu_{im} = 57.4 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) + 37.005 – 53.005 mM NaOH + 37 – 53 mM HCl ( $\mu_{im} = -79.1 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ )
Voltage	200 V with the sample-inlet side as the cathode
EOF	none

### 3. 研究結果と考察

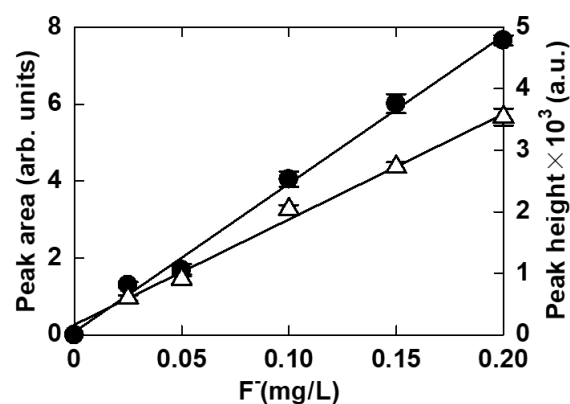
#### 3.1 検量線

BGE の組成及び pH は、海水中 F<sup>-</sup>を定量した場合<sup>7)</sup>と同一である。泳動電圧については、電場の強さ(泳動電圧/キャピラリー全長)が海水分析の場合の電場の強さと同様になるように 16 kV とした。試料注入時間は、得られた F<sup>-</sup>のピーク高さが高く、かつ、Cl<sup>-</sup>との分離が良好であった 1.5 秒とした。これらの分析条件により検量線を作成したところ、F<sup>-</sup> 検量線の回帰式は、ピーク面積を用いた場合、 $y = 38.5x + 0.0817$  ( $x$ : 濃度 (0 – 0.20 mg/L),  $y$ : ピーク面積 (arb. units), 相関係数  $r = 0.9975$ ), ピーク高さをを用いた場合、 $y = 17.1x + 0.167$  ( $x$ : 濃度,  $y$ : ピーク高さ ( $10^{-3}$  a.u.),  $r = 0.9966$ ) であった。ピーク面積及びピーク高さをを用いた場合とも直線性の良い検量線が得られた (Fig. 1)。分析は、各濃度試料について 4 回ずつ行い、平均値と標準偏差を求めた。また、Table 2 に本法の相対標準偏差 (RSD), 検出限界 (LOD, 0.022 mg/L), 定量限界 (LOQ, 0.072 mg/L) を示す。従来法であるランタン-アリザリンコンプレキソン吸光度法<sup>4)</sup>において、試料を 30 mL とした場合、LOQ は 0.13 mg/L となる。従って、本法の LOQ は従来法の LOQ の約 1/2 であり、従来法より高感度であった。しかし、本法の LOD は 0.022 mg/L であり、ジルコニウム担持固相抽出-IC<sup>2)</sup>の LOD (1 µg/L,  $S/N = 3$ ) の約 22 倍であった。また、本法の RSD は、従来法の RSD (3 – 10%) とほぼ同様であった。本法は蒸留操作等の複雑な前処理操作を必要とせず、必要な試料量 (0.3 g) も従来法 (1.5 g) の 1/5 と少量で塩中 F<sup>-</sup>を定量可能である。

#### 3.2 試料溶液中の塩分の影響

本法では、試料溶液中の Cl<sup>-</sup>が tITP におけるリーディングイオンに相当するため、試料溶液中の Cl<sup>-</sup>濃度が異なると F<sup>-</sup>の泳動時間、ピーク高さ、ピーク面積が変化することが予想された。そこで、まず、F<sup>-</sup>濃度一定 (0.10 mg/L) とし、試料中の Cl<sup>-</sup>濃度を 37, 41, 45, 49, 53 mM と変化させた

試料を調製し、本法により分析し、F<sup>-</sup>の泳動時間、ピーク高さ、ピーク面積に対する Cl<sup>-</sup>濃度の影響について調べた。分析は、各 Cl<sup>-</sup>濃度試料について 4 回ずつ行い、平均値と標準偏差を求めた。その結果、Cl<sup>-</sup>濃度の増加とともに、F<sup>-</sup>の泳動時間は徐々に長くなり、ピーク高さは高くなる傾向が見られた (Fig. 2)。ピーク高さが増加したのは、試料溶液中の Cl<sup>-</sup>濃度の増加とともに ITP 状態を保持する時間が長くなり、濃縮された状態が長く保たれたためであり、これらは海水中の F<sup>-</sup>を定量した場合<sup>8)</sup>とほぼ同様であった。一方、ピーク面積は、Cl<sup>-</sup>濃度が 37, 41 mM の場合には多少ばらつきが見られたが、Cl<sup>-</sup>濃度にかかわらずほぼ一定



**Fig. 1.** Calibration graphs for F<sup>-</sup>. Peak height (white up-pointing triangle) and peak area (black circle). Electrophoretic conditions: capillary, 62.4 cm total length (50 cm effective length) and 75 µm i.d. (375µm o.d.); BGE, 5 mM 2,6-pyridinedicarboxylic acid (PDC) adjusted to pH 3.5 with 1 M NaOH containing 0.03% m/v hydroxypropyl methylcellulose (HPMC); voltage, 16 kV with the sample inlet side as the cathode; wavelength for detection, 200 nm; sample, 0 – 0.20 mg/L F<sup>-</sup>/tenfold diluted reference salt sample (Cl<sup>-</sup>, 49 mM); vacuum (50 kPa) injection period, 1.5 s (ca. 107 nL); four determinations for each concentration

**Table 2.** Relative standard deviation (RSD), limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ)

Analyte	RSD (% , $n = 4$ ) <sup>a</sup>			LOD <sup>a</sup> ( $S/N = 3$ ) (mg/L)	LOQ <sup>a</sup> ( $S/N = 10$ ) (mg/L)
	Time	Area	Height		
F <sup>-</sup>	0.12	5.9	7.8	0.022	0.072

Electrophoretic conditions are identical to those in Fig. 1

<sup>a</sup>0.025 mg/L F<sup>-</sup>/tenfold diluted reference salt sample (Cl<sup>-</sup>, 49 mM)

であった(海水中の F を定量した場合には、ピーク面積は  $\text{Cl}^-$  濃度の増加とともに減少する傾向があった)。塩中 F を定量する場合には、含まれる  $\text{Cl}^-$  濃度が異なっても、ピーク面積を用いれば、試料中 F 濃度は検量線を用いて求められることが示された。一試料を分析するのに要する時間の長い標準添加法を用いないで済むことは本法の長所であると考えられる。

F の泳動時間、ピーク高さ、ピーク面積に対する試料溶液中  $\text{Cl}^-$  濃度の影響について得られた上記結果に対してシミュレーションを行った。それらの結果を Fig. 3 に示すが、実験結果とシミュレーション結果とはよく一致した。また、Fig. 4 は得られたシミュレーション結果を基に描かれたエレクトロフェログラムである ( $\text{F}^-$ : 0.005 mM,  $\text{Cl}^-$ : 53 mM)。

### 3.3 塩試料の分析

本法及び従来法による塩試料(副産塩 5 種類(1-5)、造粒塩 1 種類(1))中の F 定量結果を Table 3 に示す。本法による結果は、1 回調製した試料を 4 回分析した平均値より求めた値である。従来法による結果は、2 回調製した試料を 1 回ずつ分析した平均値より求めたものである。Fig. 5 は副産塩 3 を分析した際に得られたエレクトロフェログラムである。F は、大きな  $\text{Cl}^-$  ピークの後ろに鋭いピークとして 10 分以内に検出された。F は UV 吸収を有しないため、本来ならば負のピークとして検出されるはずであるが、装置付属のソフトウェアにより正に反転して表示されている。なお、F ピークの後ろに負のピークが見られるが、何に由来するものかについては今のところ不明である。Table 3 よ

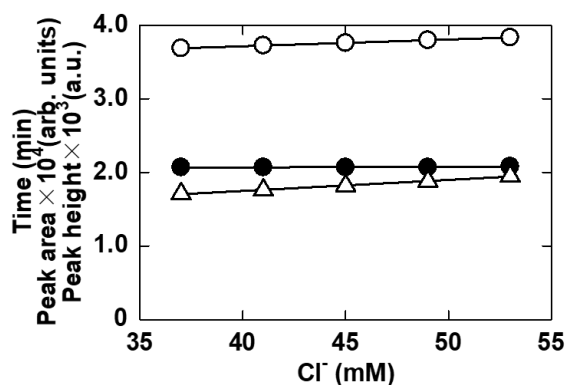


Fig. 3. Simulation results for effects of  $\text{Cl}^-$  concentration in sample solutions on the migration time, peak height, and peak area for  $\text{F}^-$ . Symbols are identical to those in Fig. 2. Simulation conditions are summarized in Table 1

り明らかのように、本法による F 含有量 (mg/kg) は、従来法による定量結果とほぼ一致した ( $t$  検定 (有意水準 5%) により確認)。このことから、共存成分の影響はほとんどないと考えられるが、F と安定な錯体を形成する  $\text{Al}^{3+}$  については今後検討する予定である。副産塩 5 種類の塩試料溶液中の F 濃度は副産塩 5 を除き LOQ 以上であったが、造粒塩 1 については、LOQ 以下 (LOD 以上) であった。従って、より低濃度 F をより正確に定量するためには、本法の感度を改善する必要がある。

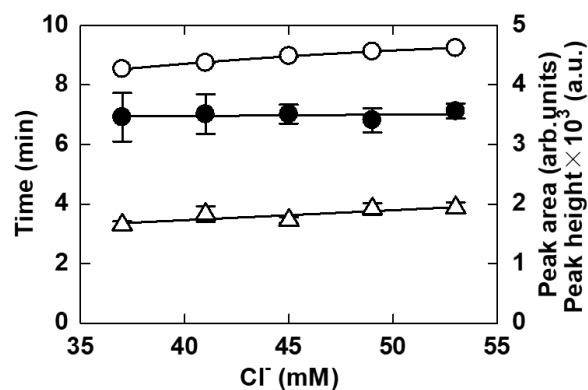


Fig. 2. Effects of  $\text{Cl}^-$  concentration in sample solutions on the migration time, peak height, and peak area for  $\text{F}^-$ . Migration time (white circle), peak height (white up-pointing triangle), and peak area (black circle). Electrophoretic conditions are identical to those in Fig. 1; sample, 0.10 mg/L  $\text{F}^-$ /diluted reference salt sample ( $\text{Cl}^-$ , 37-53 mM); four determinations for each  $\text{Cl}^-$  concentration

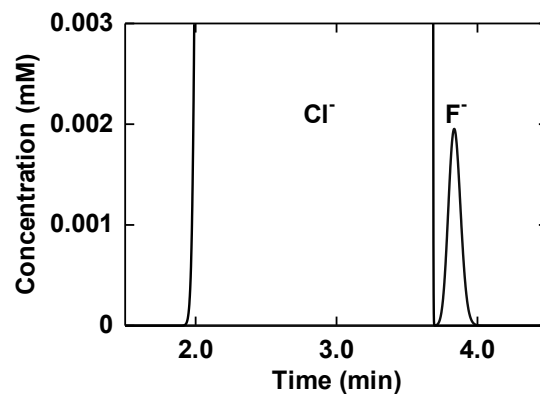


Fig. 4. Electropherogram obtained by processing the simulation results. Simulation conditions are summarized in Table 1.  $\text{F}^-$ : 0.005 mM,  $\text{Cl}^-$ : 53 mM  $\text{Cl}^-$

**Table 3.** Analytical results found for F<sup>-</sup> and Cl<sup>-</sup> in salts

Sample	F <sup>-</sup> (mg/kg)		Cl <sup>-</sup> (mg/100 g)
	CZE <sup>a</sup>	Absorptiometry <sup>b</sup>	
By-product salt 1	48	46	57.9 <sup>c</sup>
By-product salt 2	27	24	59.16 <sup>d</sup>
By-product salt 3	62	64	57.9 <sup>c</sup>
By-product salt 4	21	22	57.23 <sup>d</sup>
By-product salt 5	22	24	59.05 <sup>d</sup>
Granulated salt 1	11	12	60.50 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>Calculated using the average values of four determinations with one sample preparation. Electrophoretic conditions are identical to those in Fig. 1.

<sup>b</sup>Calculated using the average values of two determinations with two sample preparations.

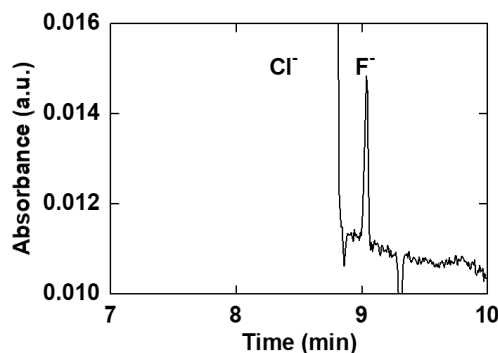
<sup>c</sup>Obtained using the CZE method which is similar one for the determination of F<sup>-</sup>

<sup>d</sup>Obtained using the Methods for Salt Analysis<sup>11)</sup>

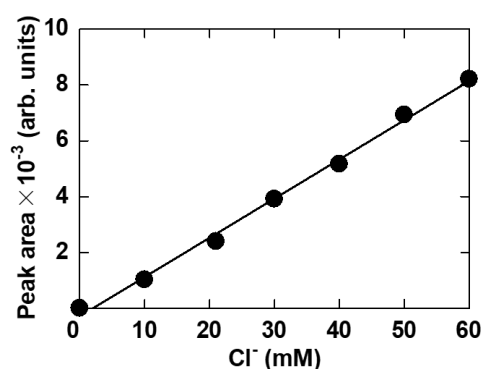
なお、上述したように、塩試料中 Cl<sup>-</sup>濃度は F<sup>-</sup>の濃縮効果に影響を与えるため、塩試料中 Cl<sup>-</sup>含有量も Table 3 に示した。試料 2, 4, 5, 6 については塩事業センターにより定量された値である<sup>11)</sup>。試料 1, 3 については、F<sup>-</sup>定量に用いた本法とほぼ同様にして求められた値である。その際に得られたピーク面積を用いた場合の Cl<sup>-</sup>の検量線の回帰式は、 $y = 0.140x - 0.286$  ( $x$ :濃度 (0 – 60 mM),  $y$ :ピーク面積 (arb. units), 相関係数  $r = 0.9979$ ) であり、直線性の良いものであった (Fig. 6)。

#### 4. 結言と今後の課題

塩中 F<sup>-</sup>を簡単かつ精確に定量するために、dTP-CZE 法について検討した。その結果、本法は分析に必要な塩試料が少なく済み (0.3 g)、前処理を必要としない簡単な定量法であることがわかった。また、塩試料中の Cl<sup>-</sup>濃度が異なる場合でも、エレクトロフェログラム中の F<sup>-</sup>ピーク面積はその影響を受けなため、検量線を用いて F<sup>-</sup>含有量を精確に求めることができた。今後、F<sup>-</sup>含有量の少ない塩試料にも十分対応できるよう、本法の感度を改善するために、以下の項目について検討する予定である。すなわち、光学系のレンズを新しいものと交換し、その効果を確認するとともにスリットの大きさや枚数の影響を調べる。また、キャピラリーを長くした場合や内径の大きなキャピラリーを用いた場合の効果についても検討するつもりである。本法は塩、海水だけでなく、同様に高濃度の Cl<sup>-</sup>を含む尿 1, 12) (0.499–2.210 mg/L F<sup>-</sup>,



**Fig. 5.** Electropherogram of the granulated salt 3 in Table 3. Electrophoretic conditions are identical to those in Fig. 1



**Fig. 6.** Calibration graph for Cl<sup>-</sup> using peak area. Electrophoretic conditions: capillary, 87.4 cm total length (75 cm effective length) and 75 μm i.d. (375 μm o.d.); BGE and wavelength for detection are identical to those in Fig. 1; voltage, 23 kV with the sample inlet side as the cathode; sample, 0 – 60 mM Cl<sup>-</sup>; vacuum (50 kPa) injection period, 1.0 s (ca. 51 nL); one determination for each concentration

140 mM Cl<sup>-</sup>), 血清<sup>1,13)</sup> (0.033 – 0.096 mg/L F<sup>-</sup>, 100 mM Cl<sup>-</sup>)中のF<sup>-</sup>定量にも適用可能であると考ええる。そのためには、これら試料中の共存成分の影響について十分検討することが必要である。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり助成頂きました公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団にお礼申し上げます。また、塩試料とそれらに関するデータをご提供頂いた公益財団法人塩事業センターの野田寧、古賀明洋、麻田拓矢の三氏に感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) C. Lou, D. Guo, N. Wang, S. Wu, P. Zhang, Y. Zhu, “Detection of trace fluoride in serum and urine by online membrane-based distillation coupled with ion chromatography”, *J. Chromatogr. A*, Vol. 1500, pp. 145–152 (2017).
- 2) H. Haruna, T. Asada, Y. Noda, “Determination of fluoride ion in salts by ion chromatography using zirconium-loaded solid phase extraction”, *Bull. Soc. Sea Water Sci., Jpn.*, Vol. 67, pp. 41–46 (2013).
- 3) M. Abtahi, S. Dobaradaran, S. Jorfi, A. Koolivand, S.S. Khaloo, J. Spitz, H. Saeedi, N. Golchinpour, R. Saeedi, “Age-sex specific disability-adjusted life years (DALYs) attributable to elevated levels of fluoride in drinking water: A national and subnational study in Iran, 2017”, *Water Res.*, Vol. 157, pp. 94–105.
- 4) C.E. Death, G. Coulson, J. Hufschmid, W.K. Morris, J. Gould, M. Stevenson, “When less is more: a comparison of models to predict fluoride accumulation in free-ranging kangaroos”, *Sci. Total Environ.*, Vol. 660, pp. 531–540 (2019).
- 5) “Testing methods for industrial wastewater JIS K 0102”, Japanese Standards Association, Tokyo, pp. 106–12 (2013).
- 6) N. Gros, M.F. Camões, C. Oliveira, M.C.R. Silva, “Ionic composition of seawaters and derived saline solutions determined by ion chromatography and its relation to other water quality parameters”, *J. Chromatogr. A*, Vol. 1210, pp. 92–98 (2008).
- 7) V. Esquivel-Peña, N.M. Munguía-Acevedo, E.R. de San Miguel, J.C. Aguilar, J. de Gyves, “On the control of interferences in the potentiometric fluoride analysis of table salt samples”, *J. Food Compos. Anal.*, Vol. 47, pp. 60–68 (2016).
- 8) K. Fukushi, Y. Fujita, J. Nonogaki, J. Tsujimoto, T. Hattori, H. Inui, V. P. Beškoski, H. Hotta, M. Hayashi, T. Nakano, “Capillary zone electrophoresis determination of fluoride in seawater using transient isotachopheresis”, *Anal. Bioanal. Chem.*, Vol. 410, pp. 1825–1831 (2018).
- 9) C. Schwer, B. Gaš, F. Lottspeich, E. Kenndler, “Computer simulation and experimental evaluation of on-column sample preconcentration in capillary zone electrophoresis by discontinuous buffer systems”, *Anal. Chem.*, Vol. 65, pp. 2108–2115 (1993).
- 10) V. Hruška, M. Jaroš, B. Gaš, “Simul 5 – Free dynamic simulator of electrophoresis”, *Electrophoresis*, Vol. 27 pp. 984–991 (2006).
- 11) “Methods for Salt Analysis”, 4th Ed., A8. 2, The Salt Industry Center of Japan, Tokyo (2013).
- 12) K. Endo, I. Miwa, “Guidebook to Biochemistry”, p. 335, Nankodo, Tokyo (2006).
- 13) K. Endo, I. Miwa, “Guidebook to Biochemistry”, p. 322, Nankodo, Tokyo (2006).

## Determination of Fluoride in Salts Using Capillary Zone Electrophoresis

Keiichi Fukushi<sup>1</sup>, Hideyuki Inui<sup>1</sup>, Hiroki Hotta<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kobe University Biosignal Research Center, <sup>2</sup>Kobe University Graduate School of Maritime Sciences

### Summary

We developed capillary zone electrophoresis (CZE) with indirect UV detection for determination of fluoride ( $F^-$ ) in salts using transient isotachopheresis (tITP) as an on-line concentration procedure. The proposed method is simple: it requires no sample pretreatment. The following optimum conditions were established: a polyimide-coated fused-silica capillary (75  $\mu\text{m}$  i.d. and 375  $\mu\text{m}$  o.d.), 62.4 cm total length and 50 cm effective length (the length from the sample inlet side of the capillary to the detector); a background electrolyte (BGE), 5 mM 2,6-pyridinedicarboxylic acid (PDC) adjusted to pH 3.5 containing 0.03% m/v hydroxypropyl methylcellulose (HPMC); detection wavelength, 200 nm; vacuum (50 kPa) injection period of sample, 1.5 s (107 nL); applied voltage, 16 kV with the sample inlet side as the cathode. A regression equation relating area response ( $y$ , peak area (arbitrary units)) to concentrations of  $F^-$  ( $x$ , 0 – 0.20 mg/L) was  $y = 38.5x + 0.0817$  (correlation coefficient, 0.9975); a regression equation relating height response ( $y$ , peak height ( $10^{-3}$  a.u.)) to concentrations was  $y = 17.1x + 0.167$  (0.9966). The respective values of the relative standard deviation (RSD) of the peak area, peak height, and migration time for  $F^-$  were 5.9, 7.8, and 0.12%. The limit of detection (LOD,  $S/N = 3$ ) and limit of quantification (LOQ,  $S/N = 10$ ) for  $F^-$  respectively reached 0.022 and 0.072 mg/L. The proposed method was applied to determination of  $F^-$  in byproduct and granulated salts obtained from the Salt Industry Center of Japan. Results obtained using CZE agreed with those obtained using a conventional spectrophotometric method (lanthanum-alizarin complex absorption spectrophotometry).