

塩中フッ化物イオンの簡便で精確な定量法の確立

福士 恵一¹, 堀田 弘樹²

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

概要

【緒言】我々は2018年度助成研究において、一時的等速電気泳動をオンライン濃縮法とするキャピラリーゾーン電気泳動法は、塩中F⁻定量法としての潜在的有用性を有することを示した。そこで2020年度助成研究では、本法の感度を改善するために、内径の大きなキャピラリーの効果について検討した。また、F⁻と安定な錯体を形成するAl³⁺やFe³⁺等による妨害を改善するために種々のマスキング剤の効果について調べた。確立された方法により、凍結防止剤として利用される塩中のF⁻を定量し、従来法による結果と比較した。

【実験】キャピラリー:内径100 μm, 全長87.4 cm, 有効長75 cm;泳動液:5 mM 2,6-ピリジンジカルボン酸(pH 3.5) + 0.03 w/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 2.2 秒);泳動電圧:-20 kV;検出波長:200 nm。標準溶液:0-0.50 mg/L F⁻を添加した50 mM NaCl 溶液;塩試料調製法:超音波洗浄機を用いて塩1.5 gを水に溶解し、電子レンジで30秒加熱後100 mLとした。標準溶液中Cl⁻, Al³⁺, Fe³⁺, Mg²⁺, Ca²⁺濃度の影響を調べ、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)等による金属成分のマスキング効果を調べた。次いで、最も効果的であったDTPAの濃度及び添加後の静置時間について検討した。最後に、16種類の副産塩あるいは造粒塩中のF⁻を本法により定量し、従来法による結果と比較した。

【結果と考察】キャピラリー内径を100 μmと大きくしたことにより(従来は75 μm)、検出限界および定量限界を約1/2に改善できた。また、標準溶液中F⁻濃度一定の場合、ピーク面積はCl⁻濃度にかかわらずほぼ一定であった。標準溶液中のAl³⁺濃度が増大するにつれ、F⁻ピーク面積は減少した。Mg²⁺については、標準溶液中濃度がNaCl濃度に対して500 mg/kgの場合、F⁻回収率は約93%であった。Fe³⁺, Ca²⁺の場合、回収率はほぼ100%であった。10種類のマスキング剤について検討したところ、DTPAが最も効果的であり、標準溶液にDTPAを0.2 mM添加し、約60分静置すればAl³⁺等の影響を受けず、F⁻をほぼ100%回収できることが判明した。本法による塩試料中F⁻定量結果は、従来法による結果とほぼ一致した。

1. 研究目的

フッ化物イオン(F⁻)は、生物にとって不可欠な微量元素であるが、F⁻の過剰摂取は、歯やその他の組織に対して種々のフッ素症をもたらすことが指摘されている¹⁾。従って、F⁻は近年、日本では劇物に指定された²⁾。人間は、飲料水やフッ素添加塩からF⁻を摂取し、ムース、カンガルー等の野生生物は、地熱水や工業的に排出されたF⁻が蓄積された牧草を通してF⁻を取り込む可能性がある。摂取し

た場合、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^{3,4)}。さらに、野生生物にとっては、凍結防止剤として用いられているF⁻を含む塩も摂取源となり得る。例えば、カナダのオンタリオ州にあるアルゴンキン州立公園に生息するムース(ヘラジカ)は、毎年6月頃になると、冬季に使用され道路上に残った凍結防止用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いる。塩中にF⁻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、野生生物の保護にとっても食用塩や凍結防止用塩中の F を定量することは重要である。従来、これら塩中 F はランタン-アリザリンコンプレキソン吸光光度法により定量されている⁵⁾。従来法は再現性の良い方法であるが、共存成分の影響を避けるために、前処理として、やや面倒な蒸留操作を必要とする。他の方法として食卓塩中 F を定量するために、前処理なしでイオンクロマトグラフィー(IC)が適用されたが、感度不十分のため、定量することはできなかった⁶⁾。さらに、前処理法として固相抽出法を用いた IC 法が開発された⁷⁾。定量結果は従来法の結果とよく一致したが、やや面倒な抽出操作法が必要であった。さらに、塩中にアルミニウム(Al^{3+})が含まれている場合には、試料溶液から Al^{3+} を Al^{3+} -アセチルアセトン錯体として除去する必要があった。最近、前処理法として熱イオン放出を利用したイオン選択電位差測定法が提案され、信頼性のある結果が得られた⁸⁾。一方、キャピラリーゾーン電気泳動法(CZE)⁹⁾は、優れた分離能を有し、共存成分の影響を受けにくく、操作も簡単で、環境にやさしい分析法である。我々は、最近、一時的等速電気泳動(iTP)⁹⁾をオンライン濃縮法とした CZE(iTP-CZE)による海水中の F 定量法を開発した¹⁰⁾。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、2018 年度助成研究において検討したところ、本法は塩中 F 定量法としての潜在的有用性を有することがわかった。しかし、F 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必要があった。そこで本研究では、塩中に含まれる低濃度 F を簡単かつ精確に定量するために、上記方法の感度改善について検討した。すなわち、内径の大きなキャピラリー(より長い光路長)を用い、その効果を調べた。

さらに、上記文献^{7, 8)}にも述べられているように、塩中に含まれている可能性がある金属成分は、F と錯体を形成し、F の回収率を低下させることが考えられる。そのため、F の回収率に対する Al^{3+} 、鉄(Fe^{3+})、マグネシウム(Mg^{2+})、カルシウム(Ca^{2+})の影響について調べた。次いで、これら金属成分による妨害を軽減するために、各種マスキング剤の効果について検討した。最後に、本法により、凍結防止剤として利用されている塩中の F を定量し、従来法による結果と比較した。

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-3300; Otsuka Electronics Co., Ltd., Osaka, Japan)。恒温槽温度を $25^{\circ}C$ に設定し、検出波長として 200 nm を用いた。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.)100 μm , 外径(O.D.)375 μm , 全長(total length)87.4 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)75 cm である(GL Sciences Inc., Tokyo, Japan)。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, Ltd., Kyoto, 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, Inc., Kyoto, Japan)を用い、F を間接的に検出する間接吸収法を採用した。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 Corp. (St. Louis, MO, USA)より購入した。F 保存溶液(1000 mg/L)は、フッ化ナトリウム(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp., Osaka, Japan)より調製し、適宜希釈して使用した。F の検量線作成等に用いた標準溶液(0 - 0.50 mg/L F を含む 50 mM 塩化ナトリウム(NaCl)溶液)は以下のように調製した。すなわち、100 mL メスフラスコに 1 M NaCl を 5.0 mL, 2.0 mg/L F を 0 - 25 mL とり、水で 100 mL とした。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, Inc.より入手した。金属成分標準溶液は、塩化アルミニウム六水和物、原子吸光分析用鉄標準液(1,000 mg/L)、塩化マグネシウム六水和物、塩化カルシウム(Nacalai Tesque, Inc.)を用いて調製した。以下のマスキング剤は、クエン酸二水素ナトリウム(Nacalai Tesque Inc.)とメシル酸デフェロキサミン(DFOM, Sigma-Aldrich Corp.)を除き、FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.より入手した:エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA2Na);エチレンジアミンテトラキス(メチレンホスホン酸, EDTPO);トリエチレントラミン六酢酸(TTHA);グリコールエーテルジアミン四酢酸(GEDTA);ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA);トラ

ンス-シクロヘキサジアン四酢酸(CyDTA);ニトリロ三酢酸(NTA);ヒドロキシエチルエチレンジアミン三酢酸, EDTA-OH)。これらのキレート剤溶液(1 mM)は, DFOM 及び EDTA2Na を除き, 5 mM NaOH を添加した水中で調製した。すべての溶液は, 使用前に 0.45 μm のメンブランフィルター(Advantec Co., Ltd, Osaka, Japan)で濾過した。溶液調製の際に使用した水は, 超純水製造装置(Direct-Q UV; Merck, Darmstadt, Germany)により得られたものである。塩サンプルとして, 塩事業センター海水総合研究所(Kanagawa, Japan)より, 副産塩 15 種類と造粒塩 1 種類を提供して頂いた。

2.3 定量操作法

塩溶液は以下のようにして調製した。十分混合した塩 1.5 g(従来法と同じ量)を 100 mL のガラス製ビーカーに量り取り, 水 50 mL を加え, 超音波洗浄機(36 kHz, 100 W)に入れ溶解した。次いで, 塩中に含まれるすべての F^- を完全に溶出するために, 溶解した試料を家庭用電子レンジ(2450 MHz, 500 W)に 30 秒間入れた⁸⁾。溶液を 0.45 μm のメンブランフィルターで濾過後, 濾液をメスフラスコに移し, 水を加えて 100 mL とした。次いで, 上記試料溶液 120 μL を試料バイアル(700 μL)にとり, 水 480 μL を加えてよく混合した。試料溶液中の F^- は以下の操作法により定量した。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%w/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。まず, キャピラリー内に BGE を 140 秒充填し, 試料溶液を 2.2 秒吸引(50 kPa, 350 nL)した。試料吸引時間 1 秒は, 試料体積で 160 nL に相当する。次いで, 試料注入側を陰極として電圧(20 kV)を印加した。各試料は 3 回ずつ分析し, 平均値を求めた。塩試料中の F^- 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^- ピーク面積から作成した検量線より求めた。塩試料溶液は 2 回ずつ(5 つの塩については 3 或いは 5 回)調製し, 本法により F^- を定量した。得られた F^- 濃度を塩 1 kg あたりの含有量に換算し, 平均値を求めた。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。

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 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(tITP)を利用した分析法である(tITP-CZE 法)。また, 本法は濾過以外の前処理を一切必要としない。

2.4 従来法

塩事業センターでは塩中 F^- は, 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⁵⁾により定量されているが, 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 \pm 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, アルフッソン溶液(アルフッソン試薬 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^- 濃度を求め, 塩 1 kg あたりの含有量に換算した。

3. 研究結果と考察

3.1 本法の最適化と検証

海水中のF⁻定量時の最適化実験¹⁰⁾と同様に、最も高いシグナル対ノイズ比(S/N)が得られるように、試料注入時間、泳動電圧を最適化した。標準溶液として、0.10 mg/L F⁻を含む50 mM NaCl溶液を用いた。この際のNaCl溶液濃度を決めるために、15種類の副産塩と1種類の造粒塩試料溶液中のCl⁻濃度を本法に基づいて求めた。Table 1に示すように、これら塩中のCl⁻含有量は52-61 g / 100 gであり、平均値は56 g / 100 gであった。100 g中56 gのCl⁻を含むような塩を2.3で述べた方法により調製した場合、Cl⁻濃度は約50 mMとなる。従って、試料バイアル中のCl⁻濃度は50 mMとした。各分析条件において、3回ずつ分析を行い、F⁻ピーク高さの平均値を求めた。その結果、最適な試料注入時間及び泳動電圧は、それぞれ、2.2

秒と20 kVであった。これらの分析条件により、各濃度の試料について3回ずつ分析し、平均値と標準偏差を求め、F⁻の検量線を作成した。その結果、回帰式は、ピーク面積を用いた場合、 $y = 100x - 0.154$ (x : 濃度 (0-0.50 mg/L), y : ピーク面積 (arbitrary units), 相関係数 $r = 0.9994$) であり、直線性の良い検量線が得られた (Fig. 1)。また、Table 2に本法の検出限界 (LOD, $S/N = 3$, 0.007 mg/L), 定量限界 (LOQ, $S/N = 10$, 0.023 mg/L), 相対標準偏差 (RSD, $n = 4$) を示す。内径 100 μm のキャピラリーを使用することにより、75 μm の場合と比較して、LOD (0.015 mg/L) 及び LOQ (0.050 mg/L) を 1/2 に低下することができた。また、本法の LOD は、従来法の LOD (0.05 mg/L)⁵⁾ の 1/7 であった。標準溶液 (0.10 mg/L F⁻ / 50 mM Cl⁻) を分析した際の泳動時間、ピーク面積、ピーク高さの RSD はそれぞれ、0.35, 2.7, 2.7% であった。

Table 1 Analytical results (g/100 g) found for Cl⁻, Al³⁺, Fe³⁺, Mg²⁺, and Ca²⁺ in salts

Sample ^a	Cl ^{-b}	Al ^{3+c}	Fe ^{3+c}	Mg ^{2+c}	Ca ^{2+c}
1	52	<0.00067	0.0013	0.00033	0.0057
2	57	<0.00067	0.00040	0.00020	0.0023
3	53	<0.00067	0.0012	0.0010	0.0073
4	56	<0.00067	0.00073	0.0043	0.0054
5	58	<0.00067	0.00060	0.028	0.0065
6	61	<0.00067	0.00073	0.00040	0.016
7	57	<0.00067	<0.00033	0.00027	0.0036
8	54	<0.00067	0.00053	0.0019	0.011
9	55	<0.00067	0.00080	0.0013	0.0055
10	54	<0.00067	0.00040	0.00020	0.0035
11	61	<0.00067	0.00060	0.00080	0.0037
12	55	<0.00067	0.00073	0.0026	0.0080
13	59	<0.00067	0.0015	0.0011	0.0045
14	55	<0.00067	0.0015	0.00060	0.0073
15	57	<0.00067	0.00067	0.00080	0.0067
16	58	<0.00067	<0.00033	0.028	0.0057

^aSample 6, granulated salt; others, by-product salt

^bObtained using the CZE method, which is similar to that for determination of F⁻

^cObtained using ICP-AES¹³⁾

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

Analyte	RSD (% , $n = 4$) ^a			LOD ^a ($S/N = 3$) (mg/L)	LOQ ^a ($S/N = 10$) (mg/L)
	Time	Area	Height		
F ⁻	0.35	2.7	2.7	0.007	0.023

Electrophoretic conditions are identical to those in Fig. 1

^a0.10 mg/L F⁻ / 50 mM Cl⁻

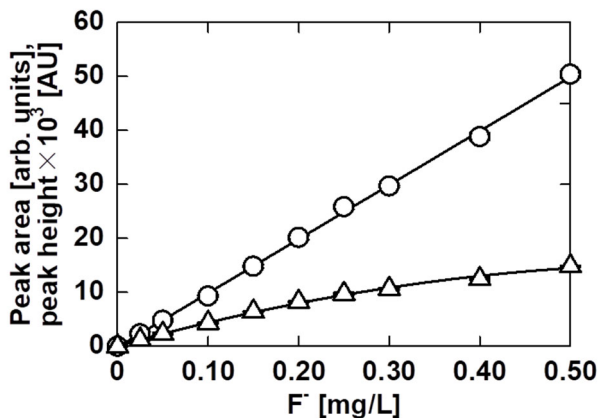


Fig. 1 Calibration graphs for F⁻. Peak area (circle) and peak height (up-pointing triangle). arb. units: arbitrary units; AU: absorbance unit. Electrophoretic conditions: capillary, 87.4 cm total length (75 cm effective length) and 100 μm I.D. (375 μm O.D.); BGE, 5 mM 2,6-pyridinedicarboxylic acid (PDC) adjusted to pH 3.5 with 1 M NaOH containing 0.03 %w/v hydroxypropyl methylcellulose (HPMC); voltage, 20 kV with the sample inlet side as the cathode; wavelength for detection, 200 nm; sample, 0 – 0.50 mg/L F⁻ / 50 mM Cl⁻; vacuum (50 kPa) injection period, 2.2 s (ca. 350 nL); three determinations for each concentration

3. 2 試料中塩化物イオン濃度の影響

塩中の Cl⁻濃度は、塩の製造法により異なる¹¹⁾。本法では、試料溶液中の Cl⁻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⁻濃度が異なると F⁻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¹⁰⁾。そこで、まず、F⁻濃度一定(0.10 mg/L)とし、試料中の Cl⁻濃度を 37 – 53 mM と変化させた試料を調製し、本法により分析し、F⁻の泳動時間、ピーク高さ、ピーク面積に対する Cl⁻濃度の影響について調べた。100 g 中 52 g の Cl⁻を含む塩 1.5 g を水に溶解し、その溶液をさらに 5 倍希釈した場合、Cl⁻濃度は 44 mM となる。また、同様に 61 g の Cl⁻を含む塩の場合には Cl⁻濃度は 52 mM となる。そのため、Cl⁻濃度を 37 – 53 mM と変化させることにした。各 Cl⁻濃度試料について 3 回ずつ分析し、泳動時間、ピーク面積、ピーク高さの平均値と標準偏差を求めた。その結果、Cl⁻濃度の増加とともに、F⁻の泳動時間及びピーク高さは、わずかに増加する傾向が見られた(**Fig. 2**)。ピーク高さが増加したのは、試料溶液中の Cl⁻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⁻を定量した場合¹⁰⁾

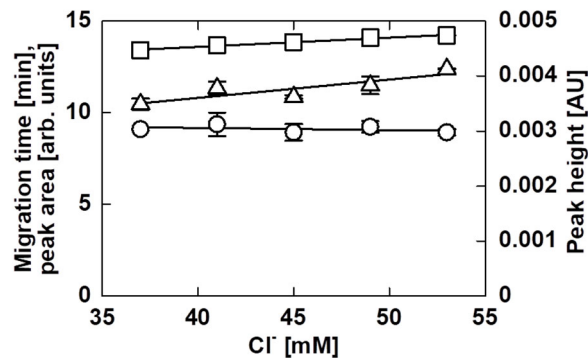


Fig. 2 Effects of sample solution Cl⁻ concentrations on the migration time, peak area, and peak height for F⁻. Migration time (square), peak area (circle), and peak height (up-pointing triangle). Sample, a mixture of 0.10 mg/L F⁻ and 37–53 mM Cl⁻. Electrophoretic conditions are identical to those in Fig. 1

とほぼ同様であった。一方、ピーク面積は、Cl⁻濃度にかかわらずほぼ一定であった(海水中の F⁻を定量した場合には、ピーク面積は 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 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。

3. 3 共存成分の影響

塩試料溶液中 F⁻の回収率は、F⁻と錯形成する金属成分が共存した場合、減少することが報告されている^{7,8)}。従って、回収率を改善するために、IC による分析法では、あらかじめ妨害成分である Al³⁺はアセチルアセトンにより抽出除去された⁷⁾。電位差法では、高濃度キレート剤を含む TISAB II (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, US) が用いられた⁸⁾。金属成分 (Al³⁺, Fe³⁺, Mg²⁺, Ca²⁺) の影響を明らかにするために、0.10 mg/L F⁻及び 0 – 500 mg 金属/kg NaCl を含む 50 mM Cl⁻溶液を本法により分析した⁷⁾。Al³⁺を添加した場合、F⁻のピーク面積は、Al³⁺の添加量が増加するにつれて減少した。添加量 500 mg/kg の場合、F⁻の回収率 (Al³⁺を添加した場合の F⁻ピーク面積/Al³⁺を添加しない場合の F⁻ピーク面積) は 10 %であった(**Fig. 3**)。Mg²⁺を添加した場合、添加量が 200 mg/kg までは回収率は 100 %であり、500 mg/kg では 93 %であった(**Fig. 4**)。

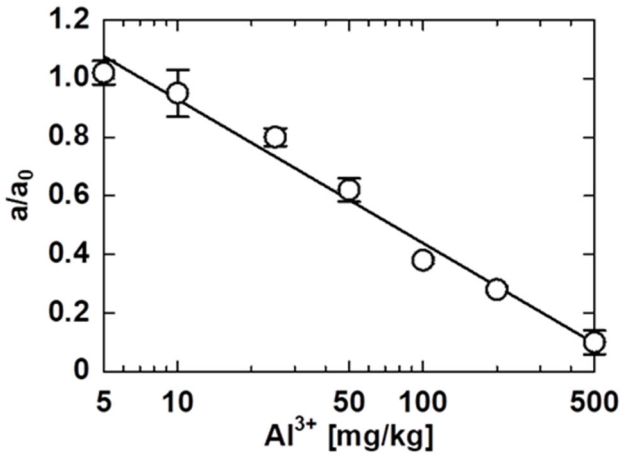


Fig. 3 Effects of Al³⁺ concentration of sample solutions on the F⁻ peak area: a, peak area; a₀, peak area without Al³⁺ (1.0±0.0). Sample, 50 mM Cl⁻ containing 0.10 mg/L F⁻ and 0 – 500 mg Al³⁺ / kg NaCl. Electrophoretic conditions are identical to those in Fig. 1

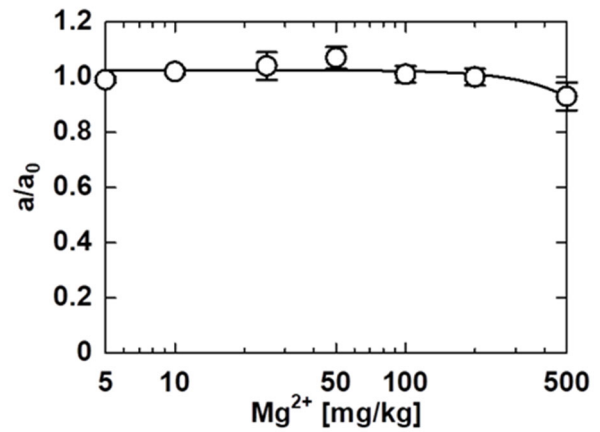


Fig. 4 Effects of Mg²⁺ concentration of sample solutions on the F⁻ peak area: a, peak area; a₀, peak area without Mg²⁺ (1.0 ± 0.0). Sample, 50 mM Cl⁻ containing 0.10 mg/L F⁻ and 0 – 500 mg Mg²⁺ / kg NaCl. Electrophoretic conditions are identical to those in Fig. 1

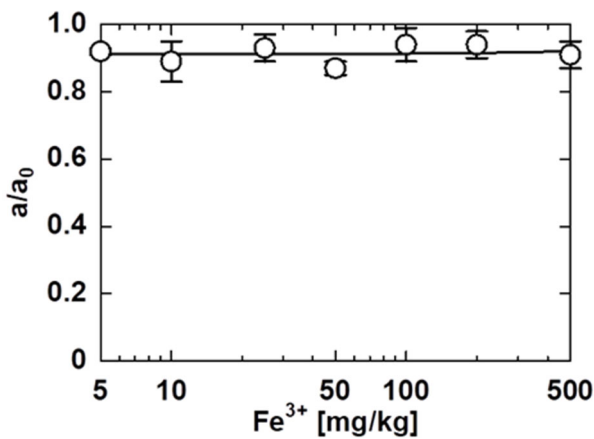


Fig. 5 Effects of Fe³⁺ concentration of sample solutions on the F⁻ peak area: a, peak area; a₀, peak area without Fe³⁺ (1.0 ± 0.0). Sample, 50 mM Cl⁻ containing 0.10 mg/L F⁻ and 0 – 500 mg Fe³⁺ / kg NaCl. Electrophoretic conditions are identical to those in Fig. 1

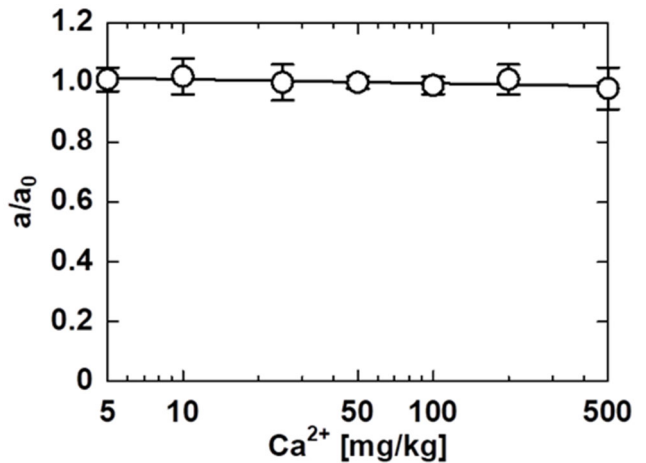


Fig. 6 Effects of Ca²⁺ concentration of sample solutions on the F⁻ peak area: a, peak area; a₀, peak area without Ca²⁺ (1.0±0.0). Sample, 50 mM Cl⁻ containing 0.10 mg/L F⁻ and 0 – 500 mg Ca²⁺ / kg NaCl. Electrophoretic conditions are identical to those in Fig. 1

Fe³⁺と Ca²⁺の場合には、500 mg/kg 添加しても回収率は減少しなかった(**Figs. 5, 6**)。

F⁻回収率に対する金属成分の影響を改善するために、10 種類のマスキング剤の効果について検討した。すなわち、0.10 mg/L F⁻, 500 mg/kg Al³⁺, 0.1 mM 各種キレート剤を含む 50 mM Cl⁻ 溶液を本法により分析した。その結果、DTPA の場合、回収率は 69%と最も高かった(他のキレート剤では 0 – 49%であった)。

DTPA が最も効果的であったのは、Al-DTPA 錯体の安定度定数が最も高いことによると考えられる¹²⁾。次に、DTPA の最適濃度を求めるために、0 – 0.5 mM DTPA を含む同様の溶液を分析した。**Fig. 7** に示すように、回収率は 0.2 mM までは急激に増加したが、その後、一定であった。

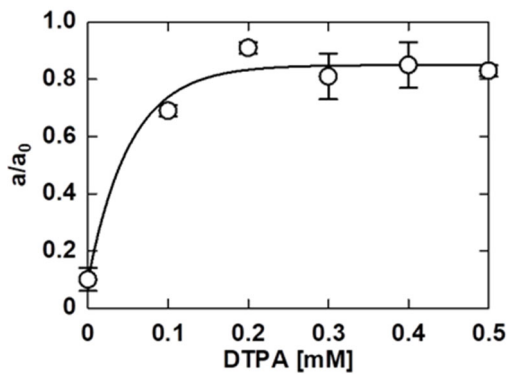


Fig. 7 Effects of DTPA concentration of sample solutions on the F⁻ peak area: a, peak area; a₀, peak area without Al³⁺ and DTPA (1.0±0.0). Sample, 50 mM Cl⁻ containing 0.10 mg/L F⁻, 500 mg Al³⁺ / kg NaCl, and 0 – 0.5 mM DTPA. Electrophoretic conditions are identical to those in Fig. 1

従って、今後の実験では DTPA の最適濃度は 0.2 mM とした。さらに、DTPA 添加後の静置時間を 0 – 140 分と変化させたところ、時間とともに回収率は徐々に増加し、60 分後に約 100% に達し、その後はほぼ一定であった (Fig. 8)。従って、静置時間は 60 分とすることとした。500 mg/kg Mg²⁺ を含む同様の溶液に 0.2 mM DTPA を添加し、60 分静置して分析したところ、回収率は 93% から 100% に回復した。

3. 4 実試料への応用

本法により塩試料中の F⁻ を定量する前に、2.3 で調製した塩試料溶液中の金属成分を高周波誘導結合プラズマ発光分光分析法 (ICP-AES)¹²⁾ により定量した。Table 1 に示すように、試料溶液中には F⁻ の定量を妨害する濃度の金属成分は含まれていなかった: 各金属成分濃度は、Al³⁺ ≤ 0.00067 g/100 g, Fe³⁺ ≤ 0.0015 g/100 g, Mg²⁺ ≤ 0.028 mg/100 g, Ca²⁺ ≤ 0.016 g/100 g であった。従って、今回は、本法により塩中 F⁻ を定量する場合、試料溶液に DTPA を添加しなかった。Table 3 に示すように、本法による塩試料中 F⁻ 定量結果は、従来法による結果とほぼ一致した。なお、これらの結果は t-検定 (有意水準 5%) により実証された。なお、Table 1 のうち 5 つの塩試料について、試料調製も含め 3 – 5 回分析したところ、定量結果の RSD は 4.3 – 11% であった。Fig. 9 に塩試料を分析した際のエレクトロフェログラムを示す。F⁻ の鋭いピーク (装置付属のデータ処理ソフトウェアにより正のピークに変換) が 15 分以内に

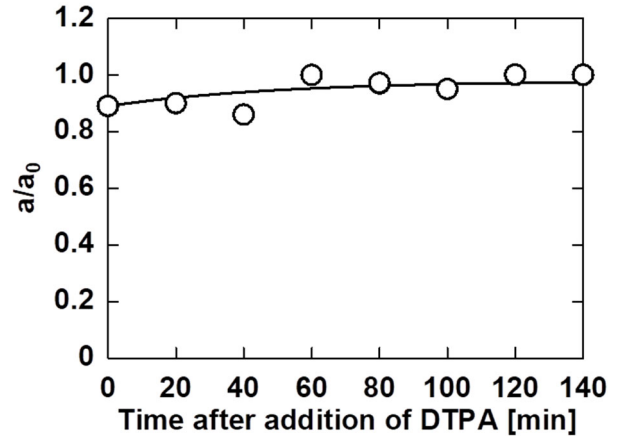


Fig. 8 Effects of standing time after the addition of DTPA to sample solutions on the F⁻ peak area: a, peak area; a₀, peak area without Al³⁺ and DTPA (1.0±0.0). Sample, 50 mM Cl⁻ containing 0.10 mg/L F⁻, 500 mg Al³⁺ / kg NaCl, and 0.2 mM DTPA. Electrophoretic conditions are identical to those in Fig. 1

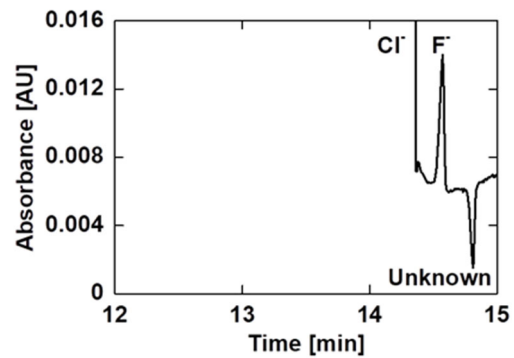


Fig. 9 Electropherogram of a salt sample. Electrophoretic conditions are identical to those in Fig. 1

検出された。F⁻ ピークのすぐ後の負のピーク (14.6 分) はシステムピーク¹⁴⁾ ではないかと推察された。本法は、前処理を必要とせず、検量線を用いて塩中 F⁻ を定量できる簡単な方法であると言える。さらに、重要な点は、十分な感度と精確さを有していることである。今後、DTPA による金属成分マスキングの有効性を実証するために、F⁻ の定量を妨害する程度の金属成分を含む塩を用い、試料調製法も含めて、詳細に検討することが望まれる。

4. 結論と今後の課題

本研究において、簡便で精確な塩試料中の F⁻ 定量法をほぼ確立することができた。今後、今回提案したマスキング法について試料調製法も含め、さらに検討したいと考えている。

Table 3 Analytical results^a found for F⁻ (mg/kg) in salts

Sample ^b	CZE ^c	Absorptiometry
1	42	46
2	27	24
3	64	64
4	20	22
5	21	24
6	11	12
7	37	32
8	119	130
9	74	76
10	54	54
11	42	40
12	101	102
13	66	64
14	52	52
15	66	64
16	20	24

^aAverage values of two determinations with two sample preparations

^bSample 6, granulated salt; others, by-product salt

^cElectrophoretic conditions are identical to those in Fig. 1

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[grant number 2020]。また、塩試料及び従来法による F⁻ 定量結果をご提供頂いた公益財団法人塩事業センター海水総合研究所の麻田拓矢、古賀明洋、野田寧博士の三氏に感謝申し上げます。さらに、CE 装置を貸与下さいました大阪大学レーザ科学研究所特任教授北岸恵子氏及び装置修理に関してご協力いただいた元大塚電子(株)の石井公二氏にお礼申し上げます。

5. 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*, 1500, 145-152 (2017)
- 2) National Institute of Health Sciences, Poisonous and Deleterious Substances Control Law, https://www.nihs.go.jp/mhlw/chemical/doku/tuuti/R020624/200624_1_tuuti.pdf (accessed 18 January 2021)
- 3) G. W. Miller, J. L. Shupe, O. T. Vedina, Accumulation of fluoride in plants exposed to geothermal and industrial water, *Fluoride*, 32, 74-83 (1999)
- 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.*, 660, 531-540 (2019)
- 5) Analytical manual for each component: fluoride, The Salt Industry Center of Japan, Kanagawa, 2008
- 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*, 1210, 92-98 (2008)
- 7) H. Fujii, T. Asada, Y. Noda, Determination of fluoride in salt by ion chromatography using zirconium-loaded solid phase extraction, *Bull. Soc. Sea Water Sci., Jpn.*, 67, 41-46 (2013)
- 8) 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.*, 47, 60-68 (2016)
- 9) K. Fukushi, T. Hattori, Y. Hidaka, Determination of inorganic ions in seawater using capillary zone electrophoresis (in Japanese), *Bull. Sea Water Sci., Jpn.*, 67, 19-32 (2013)
- 10) 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.*, 410, 1825-1831 (2018)
- 11) Y. Niino, H. Nishimura, A. Koga, T. Shinohara, H. Ito, Quality of common salt (in Japanese), *J. Cookery Sci. Jpn.*, 32, 133-144 (1999)
- 12) A. Yuchi, N. Hokari, H. Terao, H. Wada, Complexes of hard metal ions with amine-N-polycarboxylates as fluoride receptors, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 69, 3173-3177 (1996)
- 13) The Salt Industry Center of Japan, *Methods for Salt Analysis* (in Japanese), 5th Ed., https://www.shiojigyo.com/study/upload/book_methods_5.pdf (last accessed 2021.1.18)
- 14) B. Gaš, E. Kenndler, System zones in capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 25, 3901-3912 (2004)

Simple and Accurate Method for the Determination of Fluoride in Salts

Keiichi Fukushi^{1,2}, Hiroki Hotta¹

¹Kobe University Graduate School of Maritime Sciences

²Kobe University Biosignal Research Center

Summary

We improved transient isotachopheresis (tITP) – capillary zone electrophoresis (CZE) developed for fluoride (F^-) in seawater to establish a simple method for determination of F^- in salts. The limit of detection (LOD, $S/N = 3$) and limit of quantification (LOQ, $S/N = 10$) for F^- respectively reached 0.007 and 0.023 mg/L using a capillary with larger inner diameter (100 μm). The respective values of the relative standard deviation (RSD, $n = 4$) of the migration time, peak area, and peak height for F^- were 0.35, 2.7, and 2.7%. Effects of coexisting components such as aluminum (Al^{3+}), iron (Fe^{3+}), magnesium (Mg^{2+}), and calcium (Ca^{2+}) were examined. The adverse effects were resolved using metal complexation with diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA). The proposed method was applied to the determination of F^- in salt samples. Results for CZE agreed with those obtained using a conventional spectrophotometry.