原 著

低温酸素プラズマ灰化応用による生物 試料中フッ素の測定*

富田 美佐子** 鈴木 衆一** 黒 岩 茂**
金子 芳洋**

概要：低温酸素プラズマ灰化法を有機質中フッ素測定の前処理に応用することを試み、その灰化条件、固定剤添加の必要性およびその選択などを血清・血漿を用いて検討するとともに、その他の生物試料への応用の可能性も検討した。

灰化装置は Branson/IPC 1005型を用い、市販の牛血清に NaF を添加してフッ素回収試験を行い、フッ素イオン電極法およびガスクロマトグラフィーによりフッ素定量をし基礎的検討を行った。

血清については固定剤を添加しなくても、両測定法において再現性（変動係数0.08）、回収率（85～90%）ともに良好な結果が得られた。しかし NBS 標準試料（orchard leaves, oyster tissue）のフッ素測定結果は、NBS 参考値に対して好成績を示したが、固体試料については、低温灰化時にも、固定剤添加の必要性が判明した。

さらにラットを用いてフッ素の飲用実験を行い、その血漿中フッ素を ionizable F と total F に分け前記と同様な方法で測定したところ、両者は高い相関（ $r > 0.95$ ）を示した。また ionizable F と total F の比はフッ素イオン電極法で0.73～0.89、GC 法で0.59～0.73となったが、フッ素投与群では対照群に比べ ionizable F の割合が増加していることが認められた（ $P < 0.05$ ）。

しかし同時に低温灰化したラット血漿中 total F 濃度の平均値が、フッ素イオン電極法とガスクロマトグラフィーの間に僅かずつ有意差（ $P < 0.01$ ）が認められたので、その原因追究および organic F については測定法を確立し、さらにその形態および量的関係を動物およびひとの場合について検討する必要がある。

索引用語：フッ素，生物試料，血液，低温灰化，ガスクロマトグラフィー

はじめに

近年、血液（血清および血漿）中フッ素（以下Fとする）濃度は、尿中F濃度とともに、歯学の分野においても生物学的指標の一つとしてその重要性の認識が高まり、飲料水中および歯牙中のF濃度、加齢との関係などについて検討され、微量測定が行われている¹⁻⁸⁾。

また、1968年に Taves^{9,10)}が血清中Fには遊離型

（free, exchangeable）と結合型（bound, non-exchangeable）の2種が存在することを発表して以来、Ophaug と Singer¹¹⁻¹⁴⁾、Venkateswarlu¹⁵⁻¹⁷⁾、Patterson ら¹⁸⁾、Belisle と Hagen¹⁹⁾、Chiba ら²⁰⁾が血清または血漿中Fを ionizable F と total F に分けて測定し、その存在様式および濃度について報告している。

しかし、血液中Fの様態については、Taves^{9,10)}の血漿中アルブミンへの結合説、Ekstrand ら²¹⁾のそれに対

* 本論文の要旨は第31回日本口腔衛生学会総会（昭和57年9月）および第53回日本衛生学会総会（昭和58年4月）において発表した。

** 昭和大学歯学部口腔衛生学教室（主任：金子芳洋教授）

* Department of Hygiene and Oral Health, School of Dentistry, Showa University (Chief: Prof. Yoshihiro KANEKO)

昭和58年5月17日受付

する反論に代表されるごとく、いまだ十分に解明されていないのが現状である。この様な領域においては、とくに低濃度レベルでのより精度が高く再現性のよい定量法の確立が不可欠である。

多有機質中微量Fの測定は、(1) 前処理としてその妨害物質からの分離法、(2) 精度および感度の高い測定法、の両面から検討がなされている。(1) については、従来からの水蒸気蒸留法またはマッフル炉による乾性灰化が一般的で、微量拡散法が併用される場合が多い。さらに、近年では白金内張り酸素ポンプ法^{14,17,19)}、化学的抽出法^{15,16)}などの報告もみられる。(2) については、キレートによる比色法に代り、フッ素選択性イオン電極 (fluoride ion-specific electrode, 以下イオン電極とする) 法¹⁻⁹⁾が一般に使用されているが、ガスクロマトグラフ法^{22,23)} (以下 GC 法と略す)、前処理を必要としないフッ化アルミニウムによる分子吸光法^{20,24,25)} (以下 AIF 法と略す) などが検討されつつある。

今回著者らは、前処理法として低温酸素プラズマ灰化の応用を試みた。これは従来のマッフル炉による乾性灰化が、灰化時におこるFの減失や汚染のため、または固定剤からのFのため良好な回収率が得られていないなどの問題点があるからである^{26,27)}。

低温酸素プラズマ灰化 (以下低温灰化法、または単に灰化法と略す) は高周波エネルギーで原子状酸素を生成させて、試料を酸化する方法であり、比較的低温 (200°C 以下) での灰化が可能である²⁸⁾。また、この灰化法は分解試薬を必要としないことから、Chester ら²⁹⁾ が血液に As, Cr, Pb, Se, Sb など添加して行った回収試験結果は良好であったと報告している。

そこでこの低温灰化法をF分析の前処理に応用し、まず灰化条件および固定剤の有無との関係を牛血清を用いて検討しその有用性を確認した。なお、Fの測定はイオン電極法とともに、Munksgaard ら²²⁾ および三枝ら²³⁾ の GC 法を改良して実施した。

さらにラットを用いて短期F投与 (飲用) 実験を行い、その血漿中Fを測定し、ionizable F と total F について若干の知見を得たので合わせて報告する。

方 法

2.1 装置、器具、試薬および実験動物

2.1.1 装置

- ① 低温酸素プラズマ灰化装置
(Branson/IPC 1005-248AN low temperature asher)

Fig. 1 Branson/IPC 1005-248AN low temperature asher

- ② ガスクロマトグラフ (島津 GC-7AG, FID 付)
- ③ イオンメータ (Orion research, microprocessor ionalyzer Model 901)
- ④ F 選択性イオン電極 (Orion research, Model 96-09 combination fluoride electrode)
- ⑤ 遠心分離機 (久保田, KN-70)

2.1.2 器具

- ① マイクロシリンジ (10 μ l)
- ② マイクロピペット (0.1~1 ml 用各種)
- ③ ポリプロピレン製共栓試験管 (10ml 容量)
- ④ プラスチック製共栓スピッツ管 (2 ml 容量)
- ⑤ パイレックスガラス製灰化ポート (直径40mm, 深さ10mm)
- ⑥ プラスチック製小型容器 (1~2 ml 容量)

2.1.3 試薬

- ① 塩酸 (HCl) (有害金属測定用, 和光純薬)
- ② n-ヘキササン (C₆H₁₄) (残留農薬測定用, 和光純薬)
- ③ Trimethyl chlorosilane [(CH₃)₃SiCl, 以下 TMCS と略す] (東京化成)
- ④ Total ionic strength adjustor (TISAB III, Orion research Cat. No. 94-09-11)
- ⑤ F 標準液
100 ppm のF標準液 (Orion research Cat. No. 94-09-07) を用時, 1 および 0.1ppm に希釈調製した。
- ⑥ 固定剤: 水酸化マグネシウム [Mg(OH)₂], 水酸化カルシウム [Ca(OH)₂], 水酸化ストロンチウム [Sr(OH)₂] (いずれも試薬特級, 和光純薬)

2.1.4 標準試料と血清・血漿試料

- ① NBS* standard reference material
Orchard leaves (No. 1571)
Oyster tissue (No. 1566)
- ② 血清: New born calf serum (Irvine scientific)
- ③ 血漿: NaF 溶液飲用 SD ラットより採血したもの。
- * NBS: National Bureau of Standards

2.1.5 実験動物

SD シラット (雄, 10週齢) を各群 12 匹, 合計 48 匹を使用した。飼料はオリエンタル社製の MF (F を約 35ppm 含む) を自由摂取させた。

2.2 前処理および測定法

2.2.1 固定剤の精製

本実験で使用した固定剤 $MgCl_2$, $CaCl_2$ および $SrCl_2$ はまず各々の水酸化物約 50g に 20% HCl 溶液を加えて pH を 1 以下とした後, 20% TMCS n-hexane 溶液 5ml を加えて 40 分間振とうした。静置後 n-hexane 層を捨て, 同様な操作をさらに 5 回繰返して行い脱 F した。ついで, 残りの水層に過剰の水酸化ナトリウム (NaOH) を加え各金属の水酸化物を沈澱させ, 遠心分離後水層を除去した。沈澱物を乾燥後, $Mg(OH)_2$ 5.8g, $Ca(OH)_2$ 7.4g, $Sr(OH)_2$ 12.2g を HCl で中和し, 約 pH 6 に調製した。この溶液に蒸留水を加えて 100ml とし, 低温灰化用固定剤溶液とした。

2.2.2 GC 条件

カラム: 15%OV-101, Chromosorb W. AW.

DMCS, 3.0mm×1.5m ガラス

温度: カラム—70°C (2分)~230°C (1分)* 検出器—130°C

ガス流量: He, 35ml/min

H₂, 0.5kg/cm²

Air, 0.5kg/cm²

検出器: Flame ionization detector (以下 FID と略す)

感度: Attenuation, 1, Range, 1

*: 溶媒の流出を早め, 次の試料注入を早くするため昇温する。

2.2.3 GC 法による血清・血漿中 F 測定

血清および血漿中 F 濃度測定は, 前処理として低温灰化を行い, その後三枝ら²⁸⁾の GC 法を改良して実施した。前処理の概要は Fig. 2 に示した。

血清または血漿 2ml をパイレックスガラス製灰化ボートにとり, 蒸留水 1ml を加えて凍結乾燥 (所要時間は約 2 時間) した後, 出力 100W, 酸素流量 100ml/min,

Fig. 2 The analytical procedure for measurement of total F in serum and plasma

4~5 時間で灰化した。灰化物を 4% HCl 水溶液 5ml で溶解し, 容量 10ml のプラスチック製共栓試験管に移した。4°C の低温下で, これに 2% TMCS n-hexane 溶液 1.0ml を加えて 10 分間振とうし, F を trimethyl fluorosilane $[(CH_3)_3SiF]$, 以下 TMFS と略す) に誘導した。この試験管を 3000rpm で 10 分間遠心分離し, n-hexane 層を容量 2ml のプラスチック製共栓小型スピッツ管にとり, その 2~3 μ l を GC に注入して F を測定した。

定量は 4% HCl 水溶液 4ml に F 標準液 (0.05, 0.25, 0.5, 1.0ppm) を 1ml 加え, 試料と同様 TMFS 化後に検量線を作成し, 絶対検量線法により行った。

2.2.4 イオン電極法による血清・血漿中 F 測定

a) 無灰化試料

血清または血漿 1ml をプラスチック製小型容器にとり, 蒸留水 1ml と TISAB III 0.2ml を添加し, 10 分間攪拌後常法によりイオン電極で F 濃度を測定した。F 標準液は 0.1 および 1ppm を使用した。

b) 灰化試料

低温灰化した血清または血漿試料が入っている灰化ボートに, 蒸留水 2ml と TISAB III 0.2ml を直接添加して灰化物を完全に溶解させた。この溶液をイオン電極測定用のプラスチック製小型容器に移し, 10 分間攪拌後, 無灰化試料と同様に常法によりイオン電極で F 濃度

を測定した。

2.3 測定法の検討

2.3.1 灰化条件

a) 固定剤の選択

固定剤として脱Fした $MgCl_2$, $CaCl_2$, $SrCl_2$ を用いて、低温灰化時におけるF固定効果を検討した。

牛血清 2 ml に F 標準液 (1 ppm) 1 ml (F として 1 μg) と固定剤溶液 (1 mol/l) 0.8 ml を添加して凍結乾燥を行い、出力 200W, 酸素流量 200 ml/min で 12 時間灰化した。固定剤として $MgCl_2$, $CaCl_2$, $SrCl_2$ を用いた場合について、それぞれのF回収率を比較し固定剤の効果を判定した。

b) 灰化条件の選択

低温灰化装置の条件設定においては、出力、酸素流量、灰化時間を灰化試料量およびその性状にあわせて選択することが必要である。

F 1 μg 添加牛血清を用い、出力および酸素流量はつぎの3種の組合せ—50W・50 ml/min, 100W・100 ml/min, 200W・200 ml/min—、灰化時間はそれぞれ 3, 6, 12 時間に設定した。その灰化物を GC 法でF測定し、回収率を求め最適条件を検討した。

2.3.2 測定法の比較

牛血清 1.5 ml に NaF 水溶液を F として 1.0 μg 添加して、無灰化—イオン電極法、灰化—イオン電極法、灰化—GC 法、固定剤添加による灰化—GC 法の4種の測定法によるF回収試験を行った。測定は各6回繰返しを行い、回収率の平均値と標準偏差 (以下 SD と略す) を求めて測定法を比較した。

なお固定剤は $SrCl_2$ 水溶液 (1 mol/l) 0.4 ml を添加し、その灰化時間は12~15時間とした。

2.3.3 NBS 標準試料の灰化およびF測定

NBS 標準試料のうち、植物性試料として orchard leaves, 動物性試料として oyster tissue を固定剤添加お

よび無添加で低温灰化し、ついで GC 法によるF測定を行い NBS の分析参考値 (non-certified value) と比較した。試料量はそれぞれ 0.5 g, 固定剤として 1 mol/l の $MgCl_2$, $CaCl_2$, $SrCl_2$ 水溶液 0.8 ml を添加し、さらに蒸留水 3 ml を加え、凍結乾燥した後、出力 200W, 酸素流量 200 ml/min で 15 時間灰化した。

2.4 ラットによる F 飲用実験

2.4.1 F 飲用実験

SD 系ラットを 1 群 12 匹で、対照 (水道水飲用, F : 0.1~0.2 ppm), 50, 100, 200 ppm F 飲用の 4 群に分け、10 日間 F 溶液 (NaF 溶液) を自由摂取させ、その後エーテル麻酔下で腹部下行大動脈より採血した。直ちにヘパリン処理し血漿を分離した。

2.4.2 ラットの血漿中F測定

分離した血漿をイオン電極測定用試料 (1 ml) と灰化用試料 (GC 用, イオン電極用各 2 ml) に分け、直ちにイオン電極測定を行い、まず ionizable F を求めた。灰化用試料は冷凍保存し、順次灰化を行い、GC とイオン電極で測定し血漿中の total F 濃度を求めた。

つぎにその測定値から各群の血漿中F濃度の平均値と SD, ionizable F と total F の相関およびその比率を検討した。

結 果

3.1 灰化条件の検討

3.1.1 固定剤添加の場合

F 添加牛血清に固定剤を加え低温灰化を行い、F 回収率を求めた成績を Table 1 に示した。

$MgCl_2$ および $CaCl_2$ の添加は灰化不良をもたらし、良好な回収率が得られなかった。しかし $SrCl_2$ 添加の場合は良好に灰化され、平均 94% の回収率が得られた。比較のために行った同灰化条件における固定剤無添加の場合の回収率は 78% であった。このことから血清の低温灰

Table 1 Effectiveness of fixative addition*

Fixatives	F added (as NaF) (μg)	Recovery rate (%)		
		Found	Mean	$\pm$ SD
$MgCl_2$	1.0	**		
$CaCl_2$	1.0	**		
$SrCl_2$	1.0	95, 96, 92, 92	94	1.8
None	1.0	79, 79, 76, 77	78	1.3

* Two milliliters of calf serum were used for each experiment. Electric power 200W, oxygen 200 ml/min, ashing for 12 hrs.

** Enough ashing for the determination of F was not obtained.

Table 2 Recovery of F under various ashing conditions*

Electric power (w)	O ₂ flow (ml/min)	Ashing time (hr)	F added (as NaF) (μ g)	Recovery rate (%)		
				Found	Mean	$\pm$ SD
50	50	3	1.0	72, 81, 82, 78	78	4.5
		6	1.0	92, 89, 81, 81	86	5.6
		12	1.0	105, 102, 104, 96	102	4.0
100	100	3	1.0	93, 94, 87, 88	91	3.5
		6	1.0	91, 92, 90, 89	91	1.3
		12	1.0	88, 91, 96, 97	93	4.2
200	200	3	1.0	81, 87, 82, 78	82	3.7
		6	1.0	97, 98, 87, 90	93	5.4
		12	1.0	79, 79, 76, 77	78	1.5

* Two milliliters of calf serum were used for each experiment, and no fixatives were added for ashing.

化では固定剤を添加しなくても相当な回収率が得られることが示唆され、以後主として固定剤無添加の条件について検討を進めた。

3.1.2 固定剤無添加の場合

固定剤無添加で行った各種の低温灰化条件におけるF添加牛血清の回収試験成績を Table 2 に示した。

NaF (Fとして1 μ g) 添加牛血清では、50, 100,

Fig. 3 Gas chromatograms of trimethyl fluorosilane (TMFS)

Fig. 4 A standard curve for F determination from trimethyl fluorosilane

200W いずれの灰化出力でも適切な灰化時間を選択することにより、高い回収率が得られた。とくに100W では3~12時間の灰化でいずれも90%以上の安定した回収率が得られたので、本実験では100W・100ml/min, 4~6時間で血清および血漿の灰化を行った。

3.2 GC法の検討

3.2.1 ガスクロマトグラム

前記(2.2.2項)の条件で測定した TMFS 誘導化後のF標準液と牛血清試料の実際のクロマトグラムを Fig. 3 に示した。

3.2.2 検量線

F標準液 0.05, 0.25, 0.5, 1.0ppm を試料と同様 TMFS に誘導化後、GC に注入し作成した検量線を Fig. 4 に示した。

Table 3 Detection limits of F contents in calf serum and orchard leaves in different analytical methods

Sample (ml)	Analytical method	GC injection volume (μ l)	Detection limit (μ g/ml)
Calf serum 0.5~1	No ashing—ion electrode	—	0.02
Calf serum 2	Ashing—ion electrode	—	0.02
Calf serum 2	Ashing—GC	3	0.015
Orchard leaves 0.5*	Ashing—GC	3	0.06**

* (g)

** (μ g/g)** Table 4** Recovery in four different analytical methods

Method	F (μ g/ml serum)				
	Added	Found		Recovery	
	(μ g)	Mean (μ g)	$\pm$ SD (n=6)	Mean (%)	$\pm$ SD
Ion electrode	—	0.192	0.007	98.4	0.6
	1.0	1.176	0.006		
Ashing—ion electrode	—	0.224	0.009	90.8	2.3
	1.0	1.132	0.023		
Ashing—GC	—	0.235	0.015	84.5	6.7
	1.0	1.080	0.067		
SrCl ₂ *ashing—GC	—	0.220	0.023	83.8	6.8
	1.0	1.041	0.052		

* Ashing with a fixative, SrCl₂**Table 5** F content found in animal and vegetable matters with the non-certified values by NBS in cases of ashing with or without fixatives

Sample	Fixative (0.8 mmol)	F Content (ppm)				Mean	±SD
		Found					
Oyster tissue	MgCl ₂	6.6,	5.9,	5.2,	5.5	5.8	0.60
	CaCl ₂	4.4,	5.0,	5.0,	4.7	4.8	0.29
	SrCl ₂	5.0,	4.2,	4.2,	4.7	4.6	0.39
	None	0.4,	0.4,	0.4,	0.3	0.4	—
	Non-certified value given by NBS					5.2	—
Orchard leaves	MgCl ₂	3.6,	3.7,	3.6,	3.9	3.7	0.12
	CaCl ₂	3.4,	3.4,	3.3,	3.7	3.5	0.17
	SrCl ₂	4.0,	3.9,	3.8,	4.4	4.0	0.26
	None	4.2,	4.2,	4.3,	4.3	4.3	0.06
	Non-certified value given by NBS					4	—

Sample weight for each experiment: 0.5g

3.2.3 検出限界

GC 法における最小検出量は、クロマトグラム上 5mm を最小検出ピーク高とすると、F として 0.1ng

に相当した。なお固定剤中の F は最小検出量の $1/10$ 以下に脱 F され、ブランク値はほとんど零となった。

液体試料および固体試料の F 検出限界を、イオン電極

Fig. 5 F content in rat plasma determined by different analytical methods
IE: F ion electrode measurement. GC: Gas chromatography analysis.

法の場合と合せて Table 3 に示した。GC 法は試料量 2 ml の血清では F として $0.015\mu\text{g/ml}$ となり、イオン電極法の $0.02\mu\text{g/ml}$ と殆ど同レベルであった。しかし GC 法は TMFS へのシリル化時に、TMCS n-hexane 溶液量を減ずると、F が濃縮され、また GC への注入量も増量 ($6 \sim 8\mu\text{l}$) できる余裕があり、これ以上の感度向上も可能である。

3.3 測定法の比較

F 添加牛血清を用いて行った異なる 4 測定法による F 回収試験成績を Table 4 に示した。

無灰化—イオン電極法は F 標準液を血清に添加しただけであるが、有機質への新たな結合、マトリックスの相違などにより回収率の低下も推定された。しかし結果は回収率 98.4%、変動係数 (以下 CV と略す) も 0.01 以内となった。

灰化操作を行った他の 3 方法では、回収率はいずれも

Table 6 F content in plasma of rats given drinking water with different F concentrations determined by different analytic methods

Animal group	Method	F in plasma ($\mu\text{g}/\text{ml}$)					
		Mean	$\pm\text{SD}(\text{n}=12)$				
Control	IE ^{a)}	0.035	0.007	] * b)	] ** c)	] ** c)	] ** c)
	Ashing-IE ^{a)}	0.047	0.005				
	Ashing-GC	0.059	0.008				
50 ppm ^{d)}	IE ^{a)}	0.062	0.016	] * b)	] * c)	] * c)	] * c)
	Ashing-IE ^{a)}	0.073	0.014				
	Ashing-GC	0.088	0.016				
100 ppm ^{d)}	IE ^{a)}	0.097	0.028	] * b)	] * c)	] * c)	] * c)
	Ashing-IE ^{a)}	0.107	0.022				
	Ashing-GC	0.133	0.026				
200 ppm ^{d)}	IE ^{a)}	0.132	0.050	] * b)	] * c)	] * c)	] * c)
	Ashing-IE ^{a)}	0.155	0.050				
	Ashing-GC	0.177	0.046				

a) : F ion electrode

b) : The difference between the two means is significant at the level of $P < 0.01$ (*) in Wilcoxon's signed rank test.³⁰⁾

c) : The difference between the two means is significant at the level of $P < 0.01$ (*) or $P < 0.001$ (**) in the Mann-Whitney U test.³⁰⁾

d) : F concentration in drinking water in each experimental group.

84~90%, CV は0.08前後であり, ここでもとくに固定剤添加の有効性は認められなかった。

3.4 NBS 標準試料の F 測定

NBS の標準試料を灰化し GC 測定した成績を Table 5 に示した。

Orchard leaves と oyster tissue のいずれにおいても固定剤を添加して行った灰化では, NBS の参考値に対して 86~105 % の測定値が得られた。しかし oyster tissue では固定剤の有無が成績に大きく作用し, 無添加のものは $1/10$ 以下の測定値となった。

3.5 F 飲用ラットの血漿中 F 濃度

3.5.1 対照群と各 F 投与群の平均 F 濃度

無灰化-イオン電極法, 灰化-イオン電極法, 灰化-GC 法で測定した F 飲用ラットの血漿中 F 濃度を各試料について測定法別の対応をとり, その変動を Fig. 5 に示した。またその平均値について Mann-Whitney U test³⁰⁾ で有意差検定した結果を Table 6 に示した。

無灰化-イオン電極法の場合も TISAB III (約 pH 5) を添加しているので必ずしも生体中の free の F と一致していないかもしれないが, ionizable F (以下本法における無灰化-イオン電極による F 測定値を ionizable F とする) と考えられ, 灰化を行った後の測定値は

total F (以下灰化法による F 測定値を total F とする) に相当する。

Table 6 に示したごとく, 対照群と 50ppm 群, 50ppm 群と 100ppm 群の血漿中平均 F 濃度は, Mann-Whitney U test³⁰⁾ の結果, 3 種の測定法のほとんどすべてにおいて, $P < 0.01$ の危険率で有意差が認められた。しかし 100ppm 群と 200ppm 群の間には有意差は認められなかった。

Total F 濃度については, イオン電極法および GC 法で測定した値は, 4 群すべてにおいて GC 法が高い平均値を示し, Wilcoxon's signed rank test³⁰⁾ の結果 $P < 0.01$ で有意差が認められた。

3.5.2 Ionizable F と total F の相関

Ionizable F とイオン電極法で測定した total F および ionizable F と GC 法で測定した total F との相関係数と回帰直線をそれぞれ Fig. 6 (1)~(2) に示した。GC 法, イオン電極法とも高い相関 ($r=0.95\sim0.97$) が確認され, total F は ionizable F に比例していると云える。

また total F についてイオン電極法で測定した値と GC 法で測定した値との相関係数と回帰直線を Fig. 7 に示した。 r は 0.97 となり, イオン電極法と GC 法は

Fig. 6 Correlation of F values from the direct electrode method with those from two other methods

- a): The value measured by F ion electrode without pretreatment by ashing (direct method).
 b): The value measured by F ion electrode after pretreatment by ashing.
 c): The value measured by GC after pretreatment by ashing.

Table 7 The ratio of ionizable F to total F in rat plasma

Animal group	n	Ionizable F/Total F			
		F electrode		GC	
		Mean	±SD	Mean	±SD
Control	12	0.73	0.11	0.59	0.13
F in drinking water					
50 ppm	12	0.84	0.10	0.71	0.19
100 ppm	12	0.89	0.12	0.72	0.15
200 ppm	12	0.84	0.09	0.73	0.11

Asterisks indicate significant differences from t-test at the level of $P < 0.05$ (*) and $P < 0.01$ (**).

高い相関があることが判明した。

3.5.3 Ionizable F と total F の比率

対照群およびF飲用ラットの3群について ionizable F と total F の比を求めて、その平均値とSDをTable 7に示した。

イオン電極法では ionizable F/total F の平均値は0.73~0.89, GC法では0.59~0.73となった。対照群の ionizable F/total F の比はイオン電極法, GC法とも投与群のそれらに比べて小さい値を示し, t検定の結果 $p < 0.05$ で有意差が認められた。

考 察

4.1 前処理および測定法について

低温酸素プラズマが分析化学の領域で最初に有効に利用されたのは、有機性試料を緩徐に酸化してその中の無機成分を定量しようとする試みであり、以後生体試料中微量金属元素定量への応用検討がなされている^{28,29)}。

しかし現在までF分析にこの低温灰化法を適用した報告はみられない。そのため低温灰化時における固定剤の必要性の有無、その選択と添加量、および低温灰化装置の設定条件など数多くの検討項目があったので、本実験に先立ち、Fを添加した無灰濾紙で基礎的検討を行っ

Fig. 7 Relationship between total F values obtained from GC analysis and F ion electrode measurement

た。その結果、無灰濾紙にFを添加した場合、検討したいかなる灰化条件においてもF回収率は0～4%であった。

そこでFの固定剤を検討したところ、アルカリ土類金属の添加により回収率が90%に向上することが判明した。アルカリ土類金属の中でも原子(Mg, Ca, Sr)によって固定効果に差が認められたので、さらに牛血清を用いて固定剤の効果判定と選択を行ったがTable 1に示したようにMgCl₂, CaCl₂では灰化不良をもたらした良好な結果は得られなかった。しかしSrCl₂では灰化が良好に行われ94%の回収率が得られた。しかし同時に行った固定剤無添加の場合の回収率は78%であり、血清においては適切な灰化条件を設定すれば、固定剤無添加でも回収率を向上させられると考えられた。本法では固定剤を添加しないことは、固定剤からのF汚染を除くばかりでなく、灰化時間の短縮につながるので大きな利点となる。

固定剤無添加で灰化条件を検討したTable 2, 4種の測定法によるF回収率を検討したTable 4の結果からも、血清においては固定剤無添加でも再現性の高い回収率が得られると考える。

しかし固体試料などには、一般的に固定剤添加の必要性があったので(Table 5), 固定剤の精製法を検討した。

従来の灰化法においても、固定剤の添加およびその精製については、Taves⁹⁾がMgCl₂を、OphaugとSin-

ger¹¹⁻¹⁸⁾が低Fリン酸カルシウム[Ca₃(PO₄)₂]を用いて検討している。また原ら^{26,27)}は各種のMg系, Ca系固定剤の効果について検討を加え、固定剤中のFおよび灰化炉からの汚染などの問題点を指摘しているが、Venkateswarlu¹⁷⁾も酸素ポンプ法とルツボ灰化法との比較を行い、ルツボによる灰化時のF汚染を報告している。

本法に用いた固定剤精製法は、TMCSを用いて固定剤中のFを除去し、ブランク値が殆んど零となるよう精製されているので、固定剤を多量に必要とする従来の灰化に使用しても、低ブランク値が得られ利用価値が高いものと考えられる。

本実験に使用したBranson/IPC 1005型低温灰化装置は2つのパイレックスガラス製灰化チャンバーがあり、合計12コの試料を一度に灰化することができる。この各試料を均一に灰化するためには、灰化出力と酸素流量の比率が重要であると言われている²⁸⁾。

著者らは予備実験において各出力と酸素流量比(0.5, 1.0, 2.0, 3.0)による濾紙の灰化率から、出力/酸素流量比は1が適正であると認めたので、血清の灰化条件検討の際には比率1についてのみ行った(Table 2)。

GC法におけるFは下記に示すようにpH 1以下で定量的にtrimethyl silanolと反応してTMFSに誘導される²²⁾。

このGC法は当教室の三枝ら²³⁾が尿および無灰化血清試料について検討し発表しているが、さらに今回、TMCS抽出時間の短縮、GC充填剤の変更、絶対検量線法の採用などを検討し簡易化した。本法は妨害イオンからの分離が可能であり、測定感度も高いなど利点が多い。

しかしTMFSの保持時間は約40秒であり非常に短い。溶媒(n-hexane)流出後GC装置を安定させ次の試料導入までに15分ぐらい必要であること、およびTMFSの沸点が低いため、常に4°C以下のところで分析操作を行わなければならないことなど本法の今後検討すべき点である。

次に低温灰化法と現在最も多用されているイオン電極法との組合せは、イオンメーターの操作が単純であり、分析法の簡易化を計るために検討を進めた。問題は灰化試料をいかに定量的且つ最小液量に溶解するかということであった。GC法のごとくHClに溶解した後、直接イオン電極で測定を行うことは、測定pHが約5である

オン電極の特性から無理であった。また一度 HCl で溶解した試料をアルカリで中和しても pH 調整がむずかしいため、F 測定値の再現性を損う結果となった。

そこでごく少量の TISAB III を直接灰化ボートに添加したところ、灰化試料は HCl の場合と同様すぐ完全に溶解し、その後10倍量の蒸留水を加えイオン電極測定溶液とすることができた。

灰化-イオン電極法は操作が簡単で検出限界も GC 法とほぼ同じレベルであり、血清・血漿の total F 測定にも有利であると云える。

しかし SrCl₂ を固定剤として添加した試料では、GC 法に比べ約50%以下の低い測定値を示し、多量の共存イオンによる妨害が示唆された。これら固定剤を添加した試料は GC 法で測定を行うか、または hexamethyl disiloxane による微量拡散法⁹¹⁻⁹³⁾を用いることが良策と考える。

低温灰化法を F 分析の前処理に応用する本法の客観的評価には、NaF の添加回収試験成績が一応の目安となるが、organic F に対応するためには不十分であり、世界的に評価の高い NBS 標準試料の測定を行う必要があると考えた。

NBS の orchard leaves と oyster tissue の F 測定値と NBS の参考値とを比較した成績を Table 5 に示したが、これは本法の固体試料への応用成績でもある。固定剤を添加した場合は NBS の参考値に対して両者とも 86~105 % の分析値が得られた。固定剤を添加しない場合は oyster tissue の測定値が低くなり、固定剤添加の必要性が認められた。

このように各試料の組成および形態の違いにより固定剤添加の必要性が生じる理由については、おそらく有機質表面での酸化燃焼機構が異なるためと思われるが、酸素プラズマ灰化の有機質表面における酸化機構についてはあまり検討がなされておらず²⁸⁾、想像の域をでない。

また固定剤添加による F 固定の機構についても解明されていないのが現状であるが、低温灰化法において固定剤の添加は基本的に必須なものと考ええる。

Singer と Armstrong⁹⁴⁾はイオン電極を用いて直接血液中 F 測定を行い、そのタンパク質成分(アルブミン)が妨害するため再現性のよい電位差を得ることができないと報告している。しかし本実験では無灰化-イオン電極法により測定した ionizable F は、牛血清による F 添加回収試験 (Table 4) においても再現性のよい測定値を与え (CV=0.01) また回収率も 98.4% と高く、このことは血清中タンパク質への新たな結合がないことを示

唆している。この結果は Chiba ら²⁰⁾ が 6, 8, 12% のアルブミンを含む人工血清中 F を測定した際、タンパク質により何ら影響を受けなかったと報告していることとよく一致している。

4.2 ラットによる F 飲用実験について

血清または血漿中の inorganic F の値について、Belisle と Hagen¹⁰⁾は ionic F と acid-labile F の両者が含まれることを強調し、強酸を用いない F⁻ 測定の必要性を述べている。本報告では TISAB III を用いてイオン電極で測定した値を ionizable F として表現している。TISAB III は約 pH 5 に調製されており、強酸ではないがしかしこれを添加することにより、どの程度 acid-labile F が含まれているのかははっきりしない。

Inorganic F についてさえ、測定法により異った測定値が得られているのが現状である。まして血清又は血漿中 organic F については、Taves⁹⁾のアルブミンとの結合説、さらに同じく Taves¹⁰⁾のアルブミンに結合しているより小さい分子と F との共有結合説が発表されて以来、多くの研究者達により inorganic-organic, ionic-non-ionic, exchangeable-non-exchangeable, free-bound などの表現で血液成分中の F の存在様態およびその量的関係が論じられている。

Belisle⁹⁵⁾は血液中 organic F の源が自然環境からか、または産業発生源的なものによるものであるかという問題を提起し、Niazi と Chiou⁹⁶⁾は organic F の血液成分への溶解度がひとと動物では大きく異り、また動物種により全血で 4 倍、血漿では 33 倍もの開きがあることを報告している。Belisle と Hagen¹⁰⁾も論じているごとく、血液中に存在する organic F は、その性状によりあるものはアルブミンの部分に結合し、あるものは赤血球の部分に結合しており、血清または血漿中 organic F の割合は一定しているものではないと考えられる。

ラットの F 投与実験は従来から数多く行われているが、血液中 F の存在様式について、Ophaug と Singer¹¹⁾、Patterson ら¹⁸⁾、Singer と Armstrong⁹⁴⁾、Taves⁹⁷⁾らは実験検討を行っている。

著者らのラットによる F 投与実験は、市販の牛血清では F 摂取量も不明であり、長期保存による F 結合様式の変化も推定され、最適な試料とは云い難いので、F をある程度含む新鮮な血液試料を得て、低温灰化法による血液中微量 F 測定の可能性を実証したいと考え行っただけのものである。そのため前述したごとく、血液中 F の存在様式にかかわる多くの因子を考えると動物実験として充分なものではなく、F 代謝にかかわる論述を行うことはむず

かしいと思われる。

しかし低温灰化後 GC およびイオン電極で測定した total F と直接イオン電極で測定した ionizable F の相関係数 (r) は 0.95 および 0.97 と非常に高い値を示した。このことは total F が ionizable F に比例していることを示すばかりでなく、前処理法および両方法の分析精度も高いことを示唆している。

また対照群および F 飲用ラットの 3 群について求めた ionizable F と total F の比の平均値は、イオン電極法および GC 法とも、対照群と投与群の間には有意差が認められている (Table 7)。すなわち対照群では、イオン電極法で 0.73, GC 法で 0.59 となり、投与群ではイオン電極法で 0.84~0.89, GC 法で 0.71~0.73 となり、投与群の血漿中 ionizable F の割合が増加していると云える。

ラットの血清中 organic F について Taves⁸⁷⁾ は高濃度の F を投与した際、動物血液中の inorganic F の増加は認めたが、organic F はほとんど認めなかったと報告している。著者らの実験では F 投与ラットの血液中でも organic F に相当する F が認められ、Taves の結果とは一致しない。一方 Singer と Armstrong⁸⁴⁾ はラットに蒸留水および 75ppm の F 含有飲料水を与えて両群を比較し、高濃度 F 摂取群では血清中 ionized F の割合が高くなったことを報告しており、著者らの実験結果も同様の傾向を示していると云える。

しかし同時に低温灰化したラット血漿中 total F 濃度の平均値がイオン電極法と GC 法の間に僅かずつ有意な差が ($P < 0.01$) あったことの原因追究、および NBS 試料により検討したとは云え、F 含有多有機質試料の灰化は酸素ポンプ法が最もよいとする Belisle と Hagen¹⁰⁾ の報告もあり、今後さらに organic F 測定について検討が必要であると思われる。

また長期 F 摂取の場合の ionizable F と total F の比率の変化、さらにひとへの外挿なども今後の検討すべき課題である。

結 論

多有機質中微量 F 測定の前処理法として、低温酸素プラズマ灰化の応用を試み、その灰化の条件、固定剤添加の必要性およびその選択などを、GC 法とイオン電極法で F 測定を行って検討し、次の結果を得た。

1) Branson/IPC 1005 型低温灰化装置を用いて、牛血清 (2 ml) を次の条件で灰化し好結果を得た (NaF 添加回収率: 85~90%)。固定剤無添加、出力 100W、酸

素流量 100 ml/min、灰化時間 4~5 時間。

2) 低温灰化した血清・血漿試料の GC 法およびイオン電極法による F 定量限界は、それぞれ 0.015 と 0.02 $\mu\text{g/ml}$ であった。定量限界の上からは両分析方法に大きな差はなく、またイオン電極法と GC 法の測定値は高い相関を示した。しかし、分析操作がやや複雑ではあるが、GC 法は妨害イオンからの分離が確実であるなど有利な面が示唆された。

3) NBS 標準試料 (orchard leavess, oyster tissue) を固定剤を添加して灰化し、GC 法で F 測定を行った結果は NBS の参考値に対して 86~105% の測定値が得られ、固体試料への応用の可能性も確認された。

4) F 投与 (飲用) ラットの血漿中 F 濃度に関しては ionizable F と total F が GC 法、イオン電極法とも高い相関 ($r = 0.95 \sim 0.97$) が確認され、total F は ionizable F に比例していると云える。また ionizable F と total F の比率はイオン電極法で 0.73~0.89, GC 法で 0.59~0.73 となったが、F 投与群では対照群 (水道水飲用) に比べ、ionizable F の割合が増加していることが認められた ($P < 0.05$)。

5) イオン電極および GC で測定した低温灰化血漿試料の F 測定値が、両測定方法の間で僅かずつではあるが有意差が認められているので、その原因追究および organic F に対する検討がさらに必要であろう。

文 献

- 1) Parkins, F. M., Tinanoff, N., Moutinho, M., Anstey, M. B. and Waziri, M. H.: Relationships of human plasma fluoride and bone fluoride to age, *Calcif. Tissue. Res.*, **16**; 335-338, 1974.
- 2) Husdan, H., Vogl, R., Oreopoulos, D., Gryfe, C. and Rapoport, A.: Serum ionic fluoride: Normal range and relationship to age and sex, *Clin. Chem.*, **22**; 1884-1888, 1976.
- 3) Ekstrand, J.: A micromethod for the determination of fluoride in blood plasma and saliva, *Calcif. Tissue. Res.*, **23**; 225-228, 1977.
- 4) Ekstrand, J.: Relationship between fluoride in the drinking water and the plasma fluoride concentration in man, *Caries Res.*, **12**; 123-127, 1978.
- 5) Hanhijarvi, H., Penttila, I. and Pekkarinen, A.: Human ionic plasma fluoride concentrations and age in a fluoridated community, *Proc. Finn. Dent. Soc.*, **77**; 211-221, 1981.
- 6) Hanhijarvi, H.: Ionic serum fluoride concentrations and age in a low-fluoride community, *Proc. Finn. Dent. Soc.*, **77**; 222-227,

- 1981.
- 7) Cowell, D. C. and Taylor, W. H.: Ionic fluoride: a study of its physiological variation in man, *Ann. Clin. Biochem.*, **18**; 76-83, 1981.
- 8) Angmar-Mansson, B., Whitford, G. M.: Animal studies: Plasma fluoride levels and enamel fluorosis in the rat, *Caries Res.*, **16**; 334-339, 1982.
- 9) Taves, D. R.: Evidence that there are two forms of fluoride in human serum, *Nature*, **217**; 1051-1051, 1968.
- 10) Taves, D. R.: Electrophoretic mobility of serum fluoride, *Nature*, **220**; 582-583, 1968.
- 11) Ophaug, R. H. and Singer, L.: Influence of variations in fluoride intake on the ionic and bound fractions of plasma and muscle fluoride (39736), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **155**; 23-26, 1977.
- 12) Singer, L. and Ophaug, R. H.: Determination of fluorine in blood plasma, *Anal. Chem.*, **49**; 38-40, 1977.
- 13) Singer, L. and Ophaug, R. H.: Concentrations of ionic, total, and bound fluoride in plasma, *Clin. Chem.*, **25**; 523-525, 1979.
- 14) Ophaug, R. H. and Singer, L.: Metabolic handling of perfluorooctanoic acid in rats (40715), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **163**; 19-23, 1980.
- 15) Venkateswarlu, P.: Reverse extraction technique for the determination of fluoride in biological materials, *Anal. Chem.*, **46**; 878-882, 1974.
- 16) Venkateswarlu, P.: Sodium biphenyl method for determination of covalently bound fluorine in organic compounds and biological materials, *Anal. Chem.*, **54**; 1132-1137, 1982.
- 17) Venkateswarlu, P.: Determination of total fluorine in serum and other biological materials by oxygen bomb and reverse extraction techniques, *Anal. Biochem.*, **68**; 512-521, 1975.
- 18) Patterson, C. M., Kruger, B. J. and Daley, T. J.: Differences in fluoride levels in the blood between sheep, rabbit and rat, *Arch. Oral Biol.*, **22**; 419-423, 1977.
- 19) Belisle, J. and Hagen, D. F.: Method for the determination of the total fluorine content of whole blood, serum/plasma, and other biological samples, *Anal. Biochem.*, **87**; 545-555, 1978.
- 20) Chiba, K., Tsunoda, K., Haraguchi, H. and Fuwa, K.: Determination of fluorine in urine and blood serum by aluminum monofluoride molecular absorption spectrometry and with a fluoride ion selective electrode, *Anal. Chem.*, **52**; 1582-1585, 1980.
- 21) Ekstrand, J., Ericsson, Y. and Rosell, S.: Absence of proteinbound fluoride from human blood plasma, *Arch. Oral Biol.*, **22**; 229-232, 1977.
- 22) Munksgaard, E. C. and Bruun, C.: Determination of fluoride in superficial enamel biopsies from human teeth by means of gas chromatography, *Arch. Oral Biol.*, **18**; 735-774, 1973.
- 23) 三枝博文他: ガスクロマトグラフ法によるフッ素の微量定量法の検討, *日衛誌*, **34**; 171, 1979.
- 24) Tsunoda, K., Fujiwara, K. and Fuwa, K.: Subnanogram fluorine determination by aluminum monofluoride molecular absorption spectrometry, *Anal. Chem.*, **49**; 2035-2039, 1977.
- 25) Tsunoda, K., Chiba, K., Haraguchi, H. and Fuwa, K.: Platinum atomic lines for determination of ultratrace fluoride by aluminum monofluoride molecular absorption spectrometry, *Anal. Chem.*, **51**; 2059-2061, 1979.
- 26) 原 康二他: フッ素の定量法に関する検討—灰化を中心として—, *口腔衛生会誌*, **30**; 208, 1980.
- 27) 原 康二他: フッ素の定量法に関する検討(II)—灰化を中心として—, *口腔衛生会誌*, **31**; 295, 1981.
- 28) 穂積啓一郎: 低温酸素プラズマの化学とその応用, *化学の領域*, **25**; 713-723, 1971.
- 29) Gleit, C. E. and Holland, W. D.: Use of electrically excited oxygen for the low temperature decomposition of organic substances, *Anal. Chem.*, **34**; 1454-1457, 1962.
- 30) Weinberg, R. and Cheuk, S. L.: Introduction to dental statistics, Noyes Medical Publications, New Jersey, 1980, p. 125, p. 128.
- 31) Sara, R. and Wänninen, E.: Separation and determination of fluoride by diffusion with hexamethyldisiloxane and use of a fluoride-sensitive electrode, *Talanta*, **22**; 1033-1036, 1975.
- 32) 上条啓子他: フッ素分離における拡散条件の検討, *松本歯学*, **4**; 150-153, 1978.
- 33) 吉田 稔他: ヘキサメチルジシロキサンを用いるフッ素の微量拡散分析法, *日本化学会誌*, **10**; 1375-1379, 1978.
- 34) Singer, L. and Armstrong, W. D.: Determination of fluoride in ultrafiltrates of sera, *Biochem. Med.*, **8**; 415-422, 1973.
- 35) Belisle, J.: Organic fluorine in human serum: Natural versus industrial sources, *Science*, **212**; 1509-1510, 1981.
- 36) Naizi, S. and Chiou, W. L.: Fluorocarbon

aerosol propellants VI : Interspecies differences in solubilities in blood and plasma and their possible implications in toxicity studies, *J. Pharm. Sci.*, **64** ; 1538-1541, 1975.

37) Taves, D. R. : Comparison of Organic fluoride in human and nonhuman serums, *J. D. Res.*, **50** ; 783, 1971.

Abstract : The application of a low temperature ashing system to pretreatment of biological materials for the determination of their fluorine contents, Misako TOMITA*, Shuichi SUZUKI*, Shigeru KUROIWA* and Yoshihiro KANEKO*. Low temperature oxygen plasma ashing has been an advantageous pretreatment method for the determination of some kinds of trace elements in biological materials, but it has not been reported as a pretreatment procedure for fluorine quantification.

We examined the suitability of a low temperature ashing system (BRANSON/IPC 1005-248 AN Low Temperature Asher) as pretreatment of biological materials(both solid and fluid samples) to assess their fluorine contents. Gas chromatography (GC) and a fluorine ion-selective electrode (F electrode) were used for the analysis of the fluorine content in the materials after they were pretreated by ashing.

Using calf serum and NBS standard reference materials (orchard leaves and oyster tissue), we studied the operating conditions of the ashing apparatus and the necessity for the addition of some fixatives. When a known amount of NaF was added to the calf serum, a good determination reproducibility with a coefficient of variation of 0.08 and recovery rates of 85 to 90 % was obtained in both cases when analysis was done by GC and F electrode without any addition of fixatives. The levels of fluorine content in NBS standard reference materials analyzed by GC after being ashed were almost equal to the NBS's non-certified values but only when fixatives were added.

Walso employed the ashing method for analyzing ionizable F and total F in the blood plasma of rats given drinking water containing 0, 50, 100 and 200 ppm F for 10 days with the combined use of GC and the F electrode. Both ionizable and total F in the plasma were increased by increases of fluoride (NaF) in the drinking water. The ionizable-to-total F ratio was found to be significantly higher in the blood plasma of those rats given drinking water containing over 50 ppm fluorine than in the control group. The total F value obtained from the same plasma sample after being ashed was generally higher in GC analysis than in F electrode measurement. The reason for this difference is unclear for the moment and further elucidation of the problem will be required.

Key words : Fluoride, Biological materials, Blood, Low-temperature ashing, Gas chromatography