Pyrohydrolysis とフッ素イオン電極・ フローインジェクション分析法による 生体試料中微量フッ素の測定

板 井 一 好

岩手医科大学医学部衛生学公衆衛生学講座

Micro-Determination of Fluoride in Biological Samples by Pyrohydrolysis
and Flow-Injection Analysis Using a Fluoride Ion-Selective Electrode

Kazuyoshi Itai

Hygiene and Public Health, School of Medicine, Iwate Medical University, Iwate

An apparatus has been developed for the isolation of fluoride in biological samples through pyrohydrolysis. With this apparatus, it is possible to determine both organic and inorganic fluorocompounds with a recovery close to 100% and precision within 5%. The high recovery rate can be expected even for highly heat-resistant compounds such as CaF_2 , without using WO_3 as a catalyst.

For determination of the isolated fluoride, a separate apparatus was developed in which flow-injection analysis was used in conjunction with a fluoride ion-selective electrode as a detector. With this apparatus, fluoride in a sample solution with a volume as small as 0.2 ml, and at a concentration as low as $0.5 \mu\text{g/l}$, can be determined within 3 minutes with a precision of several percent.

Combined use of the two apparatuses makes it possible to determine fluoride in different biological samples within 10-15 minutes with a precision of several percent, free from external contamination. By selecting suitable conditions for analysis and using a 1 g sample, it is possible to determine fluoride at a concentration as low as 5 ng/g. By employing these apparatuses, the fluoride content in different biological samples has been determined and the effectiveness of their use confirmed.

Key words: Fluoride, Fluoride ion-selective electrode, Flow-injection Analysis, Pyrohydrolysis, Biological samples

フッ素, フッ素イオン選択性電極, フローインジェクション分析, パイロハイドロリシス, 生体試料

緒 言

環境中のフッ化物による人の慢性中毒症 (fluorosis) は、飲料水中のフッ素に起因した斑状歯 (mottled enamel, mottled teeth) と労働環境気中のフッ化物に起因した骨硬化症 (osteosclerosis) とが、それぞれ歯牙フッ素症 (dental fluorosis) および骨フッ素症 (skeletal fluorosis) として1930年代に発見されて以来^{1,2)}、今なお世界の各地で多数の発症が報告されている³⁾。例えば、上水道の普及が遅れている中国では、最近の実態調査の結果として歯牙フッ素症4,021万人、骨フッ素症173万人を

認めたと報告されている⁴⁾。

ただ、最近の我が国を含む先進諸国では水質管理の行き届いた上水道の普及によって飲料水由来の fluorosis は激減したが、反面、フッ化物を原料として取り扱う産業の急速な発展により、労働環境由来の industrial fluorosis (工業性フッ素症)⁵⁾ の発症が報告されてきた。また汚染源の工場周辺では、環境のフッ化物汚染による健康影響も大きな環境問題となっている^{6,7)}。さらに近年の日常生活では、フッ化物の利用が多方面にわたることから⁸⁾、この数十年間に人のフッ素負荷量は確実に増加しているものと予想される。

かかる生存環境の様々な変貌によって受ける生体のフッ素負荷量も大きく変化し、その健康影響も多角的に検討し評価する必要があるが公衆衛生の重要課題として生じてきた⁹⁾。これらフッ素問題の研究においては、水、空気、食品などの環境諸相におけるフッ素量の測定が、人間の生存環境を評価するための最も基本的な課題となり、また、血液、尿、毛髪、骨などの生体試料におけるフッ素量の測定が健康影響を評価するための最も重要な課題となる¹⁰⁻¹⁶⁾。

今日まで種々の環境試料および生体試料中のフッ素に関する分析法は数多く報告されてきたが¹⁷⁾、精度、迅速性および簡易性などの面で難点が多く、これらの試料に適した分析法の開発が俟たれてきた。この分析法には大きく二つの未解決課題が上げられる。一つは試料中のフッ素を単離する方法（試料中のフッ素を気化しないように固定する前処理を含む）における問題として、特に試料が固体の場合、外部汚染(contamination)が少なく回収率に優れ、かつ単離に要する時間が短い方法の開発である。もう一つの問題は微量な試料溶液中の超微量フッ素測定法の開発である。ただ、この後者の課題はイオン電極法¹⁸⁾ および AlF 分子吸光法¹⁹⁾ の登場により基本的には解決されたが、その実用面で改善を図らねばならない諸点が残されている。

著者は、試料中のフッ素単離法にパイロハイドロリシス(pyrohydrolysis)²⁰⁻²⁴⁾を採用し、1g以下の微量な試料から直接にフッ素を単離する機構を考案して、外部汚染を防止し、かつ回収効率および単離時間の点でも十分に満足しうる装置を試作した。また、単離したフッ素の測定には、フッ素イオン電極を検出器とするフローインジェクション分析法(flow injection analysis)²⁵⁻²⁹⁾を採用し、0.2 ml程度の微量の供試液中から0.5 µg/lレベルの超微量フッ素を、迅速かつ簡便で正確に測定する機構を考案して装置を試作した。

本報では、著者が試作したこれらフッ素の単離・分析装置について、これらの機構と操作条件を詳述し、かつフッ素の回収・分析精度を検討し、さらに本装置を実用化した事例として、これまで測定が困難とされた生体試料の数種についてフッ素濃度を測定した知見を報告する。

方 法

1. Pyrohydrolysis によるフッ素の単離装置

1) 装置の構造

著者が考案し試作した pyrohydrolysis によるフッ素の単離装置を Fig. 1 に示した。

著者の経験から、市販の酸素ガスは少量ながら有機フ

Fig. 1 Diagram showing the apparatus used for pyrohydrolysis. 1: Heater (600°C), 2: CuO, 3: CaO, 4: Flowmeter, 5: Water flask, 6: Thermometer, 7: Combustion tube, 8: Heater (200°C), 9: Sub-heater, 10: Main heater, 11: Sample boat, 12: Platinum gauze, 13: Condenser, 14: Styrene bottle, 15: Electric scale, A: Aluminum tube, B, C: Quartz tube

ッ素を不純物として含みフッ素の測定に誤差を生じることを知っているため、これを除去するため、Fig. 1 のように酸化銅 (CuO) を充填した石英管(2)を600°Cに加熱し、酸素ガス中の有機フッ素を加熱分解した後、粒状石灰を充填したカラム(3)でフッ素を吸収するようにした。

フッ素を除去した酸素ガスを、ウォーターフラスコ(5)を経て水蒸気とともに燃焼管(7)へ導入する。燃焼管には、長さ約50 cmのアルミナ管(外形20 mm, 内径16 mm)(A)を用い、その前後を石英管(B, C)で連結させた。水蒸気を含む酸素ガスの導入部となる石英管(B)は、水蒸気の結露を防ぐため Fig. 1 に示す如くヒーター(8)を巻いて約200°Cに加熱する。試料を加熱分解させ、気化したフッ素を加水分解させる部位はアルミナ管(A)の部分で、Fig. 1 に示すサブヒーター(9)とメインヒーター(10)で外側から全面的に覆って加熱する構造とした。

アルミナ管(A)の末端部には、試料中の有機フッ素の分解を促進させるため、Fig. 1 の如く白金網(12)を充填した。また、燃焼管(7)と冷却管(13)は直角の石英製曲管(C)にて摺り合わせ接続させた。

2) 操作方法

まず、0.01-1 g 程度の試料（フッ素として10 µg以下、血清試料では0.3 ml）を白金製サンプルポートに精秤し、このポートを Fig. 1 の燃焼管先端の酸素ガス導入部のシリコン栓をはずして燃焼管内に置き、次にポートをマグネット付きステンレス棒（ガイド棒）で燃焼管内のサブヒーター部位まで押し込んで、シリコン栓を取り付ける。

サブヒーターは試料の乾燥および予備加熱の目的に用い、最高500°Cまで温度を任意に設定でき、設定温度には最長でも6分以内の時間に到達する。このサブヒーターの温度と到達時間の設定は、測定に供する試料の物理的・化学的性質によって適宜決定する。本研究に用いた固体の生体試料の場合は300°Cで1分、血清試料の場合には150°Cで1.5分とした。

その後、サンプリングポートは燃焼管の外側よりマグネットを用いて、ガイド棒を移動させてメインヒーター部位まで押し込む。メインヒーターの温度は、最高1,200°Cまで任意に設定できるように設計したが、本研究では1,050°Cに設定した。試料は、酸素ガス雰囲気のもと1,050°Cで加熱分解され、試料中のフッ素が気化する。未分解のまま試料より気化した有機物質も、燃焼管末端に充填した白金網により完全に分解される。

気化したフッ素はただちに水蒸気により加水分解を受けてフッ化水素(HF)となり、水蒸気とともにFig. 1に示した冷却器(13)にて冷却され、凝縮水中に回収される。凝縮水はFig. 1の如くプラスチック容器(14)内に、上皿電子天秤(15)で重量を計測しつつ適量を正確に採取する。この際、凝縮水の比重は1と見なした。凝縮水の留出量は、酸素ガスの流量とウォーターフラスコ(5)の温度により決定される。本研究では酸素ガス流量2 l/min、ウォーターフラスコ温度90°Cとした。この条件下での凝縮水の留出速度は、約1.7 ml/minであった。また、測定時における凝縮水の採取量は原則として5 ml(血清試料の場合には2~3 ml)を一つの単位とし、この5 ml中のフッ素イオン濃度が、試料測定前のブランク値と同レベルに戻った時点でフッ素の単離が完了したと判定した。

2. フッ素イオン濃度の測定装置

1) 装置の構造

凝縮水中に単離したフッ素イオン濃度を測定する装置として、著者が考案して試作したものは、Fig. 2に示すようなフッ素イオン電極を検出器とするフローインジェクション分析装置である。送液にはプランジャーポンプ(P, SR-3000, サヌキ工業, 東京)を用いた。配管はすべて外形1/16 inch、内径0.5 mmのテフロンチューブで行った。キャリア溶液(C)にはフッ素を含まない蒸留水を使用し、緩衝溶液(B)とon-lineで流量比1:1に混合させ、測定用のフッ素イオン電極(Es, 94-09, Orion, USA)を装着したセル内を通過後、廃棄する。試料溶液のキャリア溶液への導入は、6方バルブ(MVM-6U7, サヌキ工業, 東京)を用いて自作したサンプリングユニット(S)で行う。

Fig. 2 Flow diagram for potentiometric fluoride determination. P: Plunger pump, B: Buffer, C: Carrier (D-H₂O), S: Sampling unit, M: Mixing coil (150 cm), Es: Fluoride electrode (measuring), Er: Fluoride electrode (reference), W: Waste, I: Ion meter, R: Recorder, In: Integrater

測定用電極セルは、Wall-Jet 方式²⁶⁾を採用し自作した。また、参照用の電極(Er)も測定用と同じフッ素イオン電極を使用し、測定用の電極(Es)とは塩橋で接続した。測定用および参照用電極間の電位差は、イオンメータ(I, 901, Orion, USA)とインテグレータ(In, 4270, Spectra-Physics, USA)を用いて測定する。同時に、記録計(R, 056, 日立, 東京)により、ピーク形状やベースラインの安定状況をモニターする。

2) 操作方法

プラスチック容器に採取した凝縮水(5 ml)は、試料中に含まれる窒素や硫黄、塩素などのためほとんどの生体試料で酸性を示す。このため、あらかじめ容器内に5N-NaOHを5 μ l添加しておく。一定量の凝縮水を採取した後に、0.1および1.0 N-HCl、または同濃度のNaOHを用いてpHを5.0~7.0に調整する。この際、10 μ l以下のマイクロピペットを使用し、これらの添加量が凝縮水中のフッ素イオン濃度に与える誤差をほとんど無視できる範囲内にとどめた。

pH調整後の凝縮水は、1 mlのディスボーズブルシリンジにて約0.3 mlを分取し、Fig. 2のサンプリングユニット(S)のループ(0.2 ml)内へオーバーフローさせながら注入後、6方バルブを切り替えて測定用電極セルへ導入する。

本法では凝縮水中のフッ素イオン濃度に応じた電位差が、記録紙上にピーク形状で得られる。このピーク時の電位差をインテグレータで読み取り、あらかじめ2.0~100 μ g/lの範囲内の標準液より作成・記憶させておいた検量線より、凝縮水中のフッ素イオン濃度を求める。測定に供した試料量および採取した凝縮水量より、試料中のフッ素濃度を換算した。

3. 試薬

試薬はすべて和光純薬製の特級を使用した。

フッ素標準溶液：フッ化ナトリウム(NaF)2.210 gを

精秤し、これを蒸留水に溶解して1,000 mlとし、使用時に適宜希釈して用いた。

緩衝溶液: 塩化ナトリウム (NaCl) 175 g, ヘキサメチレンテトラミン ($C_6H_{12}N_4$) 70 g, リン酸一ナトリウム・二水和物 ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$) 4.7 g を1,000 mlのビーカーに計り取り、蒸留水約800 mlを加えて溶解させた後、塩酸 (HCl) を加えて pH 5.0~5.2に調整する。その後、孔径0.2 μm のメンブランフィルター (東洋ろ紙) で吸引濾過し、50 μg のフッ素を加えて蒸留水で1,000 mlとする。

試薬の調整およびキャリアー液として使用する蒸留水は、Milli RO 020 および Milli Q (日本ミリポア, 東京) により作成した。

結 果

1. 本単離装置によるフッ素の単離

NaF, フッ化カルシウム (CaF_2) およびフッ化マグネシウム (MgF_2) の3種類の無機フッ素化合物と、1-フルオロナフタレン ($C_{10}H_7F$), 2-フルオロエタノール (FCH_2CH_2OH), および無水ペンタフルオロプロピオン酸 ($(CF_3CF_2CO)_2O$) の3種類の有機フッ素化合物について、Fig. 1のフッ素単離装置によるフッ素の回収率を検討した結果を Table 1 に示す。

まず、易溶性フッ化物である NaF をフッ素として 0.05-10 μg の範囲で供試した結果、回収率は各フッ素量ごとに98.9-102.0%と、ほぼ100%で、その変動係数も1.1-3.8%と高い精度を示した。この場合、供試フッ素量を

100%回収するために必要な凝縮水の採取量は、供試フッ素量を増すと増加し、10 μg のフッ素量では採取量が30 ml 必要であった。本条件下においては、凝縮水の留出速度が約1.7 ml/min であるため、30 ml 採取するためには約18分を要した。

フッ素化合物の中で、最も熱分解しにくい CaF_2 や MgF_2 についても、ほぼ100%の回収率が得られ、その変動係数は0.9-3.9%であった。また、これに要した凝縮水採取量も、10.5 μg のフッ素量を供試した場合、NaF と同様に30 ml で100%回収することができた。

次に、有機フッ素化合物の $C_{10}H_7F$, FCH_2CH_2OH , および $(CF_3CF_2CO)_2O$ についても、実験に供した3種類の化合物の回収率は97.5-101.4%といずれもほぼ100%に近く、これらの変動係数もフッ素量の少なかった FCH_2CH_2OH の4.3%以外は、 $(CF_3CF_2CO)_2O$ の0.9%, $C_{10}H_7F$ の1.5%と極めて高い精度を示した。

2. フッ素イオン分析装置によるフッ素イオン濃度の測定

本装置による試料溶液中フッ素イオン濃度の測定条件について、次の検討を加えた。

1) 緩衝溶液中フッ素イオン濃度

緩衝溶液中のフッ素イオン濃度とピーク時の電位差との関係について、フッ素イオン濃度を10, 50, 100, 500 $\mu g/l$ と変化させると、Fig. 3a の如く濃度の増加にともないピーク時の電位差が減少する。一方、緩衝溶液中のフッ素イオン濃度の増加とともに電極の応答は速やかとなるため、1試料あたりの測定に要する時間が短縮され

Table 1 Recoveries of fluoride from inorganic and organic fluorides.

Compounds	Amounts of F (μgF)	Volume of Condensates (ml)	N	Recovery ($\bar{X} \pm SD$, %)
Sodium fluoride NaF	0.05	10	7	102.0 $\pm$ 3.4
	0.10	10	6	101.7 $\pm$ 3.1
	0.50	15	7	101.8 $\pm$ 2.9
	1.00	20	6	100.7 $\pm$ 2.4
	5.00	25	7	101.8 $\pm$ 2.2
	10.00	30	7	98.9 $\pm$ 1.1
Calcium fluoride CaF_2	1.12	20	7	98.6 $\pm$ 2.9
	10.50	30	7	100.7 $\pm$ 0.9
Magnesium fluoride MgF_2	1.20	20	6	101.7 $\pm$ 4.0
1-Fluoronaphthalene $C_{10}H_7F$	0.50	15	7	97.5 $\pm$ 1.5
2-Fluoroethanol FCH_2CH_2OH	0.27	15	7	100.4 $\pm$ 4.3
Pentafluoropropionic Anhydride $(CF_3CF_2CO)_2O$	0.45	15	7	101.4 $\pm$ 0.9

Fig. 3 Effects of buffer fluoride level, flow rate and loop volume on response. a. Buffer fluoride level ($\mu\text{g/l}$) 1: 10.0, 2: 50.0, 3: 100, 4: 500 b. Flow rate (ml/min) 1: 0.6, 2: 1.2, 3: 1.8, 4: 2.4, 5: 2.9, 6: 3.5, 7: 4.0, 8: 4.6 c. Loop volume (ml) 1: 0.05, 2: 0.1, 3: 0.2, 4: 0.3, 5: 0.4, 6: 0.5

る。したがって、測定試料溶液中のフッ素イオン濃度によって緩衝溶液中フッ素イオン濃度を適切に選択する必要がある。本研究では、数 $\mu\text{g/l}$ レベルの測定が主体となることから、測定感度と単位時間あたりの測定試料数とを考慮し、緩衝溶液中のフッ素イオン濃度は $50 \mu\text{g/l}$ とした。

なお、本法は従来のパッチ法³⁰⁾と異なり、ある一定量の試料溶液を一定の流速で電極面上を通過させることから、得られる電位は試料溶液中のフッ素イオン濃度の平衡電位ではない³¹⁾。このため、 $50 \mu\text{g/l}$ 以下の低濃度レベルでは、ネルンストの式に従った直線性は得られない²⁹⁾。本研究では、従来のパッチ法では測定困難であった、 $20 \mu\text{g/l}$ 以下の極微量なフッ素イオン濃度の測定が目的であるので、ネルンストの式から逸脱する低濃度レベルでの測定が多い。このため、Fig. 3a に示すごとく横軸のフッ素イオン濃度は対数表示ではないが、 2.0 – $100 \mu\text{g/l}$ の間で 2 次曲線によって良好に適合させることができた。したがって、以下の実験ではフッ素イオン濃度は対数変換せずに、インテグレータに記憶させた 2 次曲線より試料中のフッ素濃度を求めた。

2) 流速

流速とピーク時の電位差との関係について、流速を 0.6 – 4.6 ml/min の範囲内で検討した結果、Fig. 3b の如く流速の増大と共に電位差が減少する。 0.6 ml/min における電位差に比べて、 1.8 ml/min で約 80%， 3.0 ml/min では約 68% に減少する。一方、流速の増大と共にピーク値が出現するまでの時間 (RT) は短くなり、 0.6 ml/

min での RT は約 70 秒、 1.8 ml/min では約 20 秒、 3.0 ml/min では約 10 秒に短縮された。流量の増大は試薬の消費量を増大させることを考慮して、以下の実験では $1.2 (0.6 \times 2) \text{ ml/min}$ とした。

3) 試料溶液量

本法では、試料溶液は内径 0.5 mm のテフロンチューブで作成したループにより計量される。ループの容量とピーク時の電位差との関係について Fig. 3c に示した。ループの容量が 0.05 – 0.3 ml と増加するにつれて電位差も増加するが、 0.3 ml を越えるとはほぼ一定の電位差を示す。

RT 値がループ容量 0.1 ml で約 30 秒、 0.2 ml で約 35 秒、 0.3 ml では約 45 秒と、ループの容量が増加するほど 1 測定に要する時間も増える。ピーク時の電位差は、ループ容量 0.1 ml に比して 0.2 ml では約 1.2 倍、 0.3 ml では約 1.5 倍となる。ループ容量は、迅速性と感度の両者を考慮して 0.2 ml とした。

4) 検出限界および精度

Fig. 4 には、検量線作成時における電位差の記録を示した。各フッ素イオン濃度に対応して電位差は鋭いピーク形状で得られる。フッ素イオン濃度とそれに対応するピーク時の電位差は、2 次回帰曲線で表わすことができる。検出限界は測定室内を温度制御していないため、室温によって異なるが、約 20°C の室内では約 $0.5 \mu\text{g/l}$ であった。

Fig. 5 には、標準溶液 $20 \mu\text{g/l}$ (ループ容量 0.2 ml) を連続測定したときの電位差の記録を示したが、変動係数

Fig. 4 Recording obtained in the calibration.
Concentration unit: $\mu\text{g/l}$

は約2%と良好な精度であった。また、 $20 \mu\text{g/l}$ 前後の濃度では、1時間あたり約25検体の試料を測定できる。

3. 本フッ素単離・フッ素イオン分析装置による各種の生体試料におけるフッ素量の測定

1) 標準試料

4種類のNIST標準試料についてフッ素濃度を測定した結果、それぞれの平均濃度はTable 2の如く、SRM 1568 (Rice Flour) が $0.43 \mu\text{g/g}$, SRM 1571 (Orchard Leaves) が $4.5 \mu\text{g/g}$, SRM 1573 (Tomato Leaves) が

Fig. 5 Precision obtained with the $20 \mu\text{g/l}$ standard solution.

$7.1 \mu\text{g/g}$, SRM 1577 (Bovine Liver) が $0.13 \mu\text{g/g}$ であり、Bovine Liverを除き、他は全て変動係数が5%以下であり、フッ素濃度の低いBovine Liverでも、変動係数が7%の精度で測定することができた。

2) 血清

まず、本法に適した血清の供試量について検討した。供試量が $0.1-0.3 \text{ ml}$ のものを繰り返して測定した平均値は、Table 3に示す如く良く一致する。測定精度は供試量の多寡によって異なり、供試量が少ないほど悪く、増加するにつれて改善され、 0.3 ml では変動係数が5.4%と良好であった。

そこで、本法による生体試料への応用例として、人の血清中フッ素濃度について正常レベルと含フッ素麻酔剤吸入時の濃度を検討した。

本法では、血清中フッ素をフッ素イオン (ionic fluoride), 結合型フッ素 (non-ionic または bound fluoride) および総フッ素 (total fluoride) とに分けて、それぞれの濃度を測定できる。すなわち、フッ素イオン濃度は血清を10倍に希釈して本フッ素イオン分析装置によって直接測定したものであり、また血清中総フッ素濃度

Table 2 Determination of fluoride in NIST standard materials.

Sample	Sample amounts (g)	N	Fluoride concentration ($\bar{X} \pm \text{SD}$, $\mu\text{g/g}$)	CV (%)
NIST SRM 1568 Rice Flour	0.116—0.351	20	0.427 ± 0.012	2.8
NIST SRM 1571 Orchard Leaves	0.010—0.072	30	4.46 ± 0.204	4.6
NIST SRM 1573 Tomato Leaves	0.031—0.086	20	7.08 ± 0.173	2.4
NIST SRM 1577 Bovine Liver	0.042—0.077	18	0.128 ± 0.009	7.0

Table 3 Effect of sample volume on the determination of fluoride in serum.

Sample size (ml)	N	Volume of Condensate (ml)	Found ($\bar{X} \pm \text{SD}$, $\mu\text{g/l}$)	CV (%)
0.1	8	5	22.6 ± 6.9	30.5
0.2	8	7	24.4 ± 2.1	8.6
0.3	8	10	24.1 ± 1.3	5.4

は本分離装置で分離した後のフッ素を本フッ素イオン分析装置によって測定したものである。そして、この総フッ素濃度よりフッ素イオン濃度を差し引いた値が結合型フッ素濃度である。フッ素イオンはフッ素イオン電極によって検出されるもので、inorganic または free fluoride と呼ばれる。また結合型フッ素はフッ素イオン電極では検出しないもので、主に水溶性有機フッ素化合物からなると考えられている。

a. 血清中の正常フッ素濃度レベル

フッ素による異常暴露の認められない健康な成人の血清について、フッ素イオン、結合型フッ素および総フッ素濃度を測定した。結果は Table 4 に示す如く、各濃度の平均値はフッ素イオンで男性 $17 \mu\text{g/l}$ 、女性 $13 \mu\text{g/l}$ 、結合型フッ素で男性 $20 \mu\text{g/l}$ 、女性 $14 \mu\text{g/l}$ 、総フッ素で男性 $37 \mu\text{g/l}$ 、女性 $27 \mu\text{g/l}$ であった。各フッ素濃度とも、男性が女性よりも有意に高値を示し、この傾向は結合型フッ素および総フッ素において著しかった。なお、総フッ素濃度に占めるフッ素イオン濃度の割合は、男女ともほぼ等しく約 46% であった。

b. 含フッ素麻酔剤吸入時の血清中フッ素濃度の変動

最近汎用されている含フッ素麻酔剤のセボフルレン ($(\text{CF}_3)_2\text{CHOCH}_2\text{F}$) を吸入した時の血清中フッ素イオンおよび総フッ素濃度について、その経時変動を Fig. 6 に示した。吸入時間は 6 時間である。血清中フッ素イオン濃度は、吸入直前の $9.0 \mu\text{g/l}$ から、吸入開始直後には

Fig. 6 Serum fluoride ions and total fluoride concentrations during and following 6 hours of Sevoflurane anesthesia.

$18 \mu\text{g/l}$ となり、以後急激に上昇して 6 時間の吸入終了時に最高値の $500 \mu\text{g/l}$ に達した。吸入終了とともに低下し始めるが、吸入終了後 3~8 時間の間は $310 \mu\text{g/l}$ 前後の高い濃度レベルで横ばいとなる。吸入終了後 12 時間には $340 \mu\text{g/l}$ とやや上昇し、24 時間後から再び急速に低下して、吸入終了後 4 日目にはほぼ正常レベルに戻った。

一方、総フッ素濃度は吸入開始直前の値である $32 \mu\text{g/l}$ から吸入開始とともに上昇し、フッ素イオン濃度と異なって吸入終了後も上昇し続け、吸入終了後 12 時間には $4,800 \mu\text{g/l}$ の最高値を示した。吸入終了後 24 時間からはフッ素イオン濃度ほどではないものの、明らかな低下を示すが、吸入終了後 7 日間を経てもなお $470 \mu\text{g/l}$ と吸入開始直前の値 $32 \mu\text{g/l}$ よりも 10 倍以上高い濃度レベルにあった。

3) 爪

20 才代の健康な成人 49 名 (男性 41 名、女性 8 名) から手指の爪を採取し、本分析法によってフッ素濃度を測定した。爪は測定に供する前に、アセトンで 10 分間洗浄し、さらに蒸留水で 1 時間洗浄後、 $60 \sim 70^\circ\text{C}$ で乾燥させて測定用試料とした。洗浄済みの試料 $10 \sim 50 \text{ mg}$ を白金ボートに計量して測定に供した。

爪のフッ素濃度は Fig. 7 から明らかなように、その分布は対数正規分布に近似できる。フッ素濃度は $0.60 \sim 4.6$

Table 4 Ionic, organic and total fluoride concentrations in human serum.

Sex	N	Age	Fluoride concentration ($\bar{X} \pm \text{SD}$, $\mu\text{g/l}$)		
			Ionic	Organic	Total
Male (Range)	25	46.0 ± 6.6 (36~55)	16.8 ± 6.1 (9~32)	20.0 ± 6.1 (9~30)	36.8 ± 8.1 (27~53)
Female (Range)	14	50.1 ± 3.5 (45~54)	12.6 ± 4.3 (6~23)	14.3 ± 4.1 (6~22)	26.9 ± 5.4 (21~39)
Total (Range)	39	47.4 ± 6.0 (36~55)	15.3 ± 5.9 (6~32)	17.9 ± 6.1 (6~30)	33.3 ± 8.7 (21~53)

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Fig. 7 Distribution of finger nail fluoride concentration.

µg/g の範囲にあり、その幾何平均 (Mg) と幾何標準偏差 (SDg) はそれぞれ $1.38 \mu\text{g/g}$ と $1.58 \mu\text{g/g}$ であった。また、これら試料の約80%は $2.0 \mu\text{g/g}$ 未満の濃度であり、約90%が $2.5 \mu\text{g/g}$ 未満の濃度にあった。さらに、男女別では Mg と SDg が男性の 1.19 および $1.39 \mu\text{g/g}$ に対し、女性が 2.87 および $1.29 \mu\text{g/g}$ と有意に高値を示した。

4) 毛髪

20才代の日本の健康な成人51名 (男性42名、女性9名、I群)、および中国東北地方において飲料水中フッ素濃度の高い地域 ($0.5\text{--}7.0 \text{ mg/l}$) に居住する中国人36名 (男性21名、女性15名、II群) について、頭髪中のフッ素濃度を測定した。なお、II群の年齢は男性 37.6 ± 13.5 才 (18~56才)、女性 42.1 ± 11.9 才 (21~64才) であった。

毛髪は、アセトンで10分間洗浄し、さらに蒸留水で1時間洗浄後に $50\text{--}70^\circ\text{C}$ で乾燥し、この洗浄済みの試料 $20\text{--}50 \text{ mg}$ を白金ボートに計量して測定に供した。

測定結果は Fig. 8 に示す如く、I群 (フッ素による異常暴露の認められない人) の毛髪中フッ素濃度は $0.43\text{--}3.9 \mu\text{g/g}$ の範囲にあり、その幾何平均 (Mg) と幾何標準偏差 (SDg) はそれぞれ $1.20 \mu\text{g/g}$ と $1.83 \mu\text{g/g}$ であった。これに対し、II群 (高フッ素地帯に居住する人) の毛髪中フッ素濃度は $0.92\text{--}9.1 \mu\text{g/g}$ の濃度範囲内にあり、その Mg と SDg はそれぞれ $2.90 \mu\text{g/g}$ と $1.68 \mu\text{g/g}$ で、I群に比べ有意に高値を示した。毛髪中フッ素濃度が $2.50 \mu\text{g/g}$ 未満のものは、I群で約90%を占めたのに対してII群では約40%を占めるにすぎなかった。

Fig. 8 Distribution of hair fluoride concentration.

また、男女別の毛髪中フッ素濃度は、Mg と SDg で I群では男性が 1.08 と $1.82 \mu\text{g/g}$ 、女性が 1.89 と $1.48 \mu\text{g/g}$ 、II群でも男性が 2.02 と $1.38 \mu\text{g/g}$ 、女性が 4.83 と $1.26 \mu\text{g/g}$ と、両群ともに女性に有意に高値を示した。

以上の如く、性別には血清中のフッ素濃度は男性が女性よりも高く、爪および毛髪中のフッ素濃度は女性が男性よりも高いという興味深い結果を得た。

考 察

一般に、生体試料中のフッ素の分析は、(1)試料の灰化などの前処理、(2)前処理後の試料からのフッ素の単離、そして(3)単離後のフッ素イオン濃度測定の3段階の操作を必要とする¹⁷⁾。これまで主として、(1)の前処理法には乾式灰化法¹⁷⁾や酸素ポンプ法³²⁾などがあり、また(2)の単離法として水蒸気蒸留法³³⁾や微量拡散法³⁴⁾が用いられ、そして(3)単離後のフッ素イオン濃度の測定法にはイオン電極法¹⁸⁾、ガスクロマトグラフ法³⁵⁾、A1F分子吸光法¹⁹⁾などが用いられて来た。

これらの方法のうち、乾式灰化法は外部汚染を惹起しやすく有機フッ素に対する回収率が悪い³⁶⁾ため、生体試料中の微量フッ素の測定に使用するには適さない。また水蒸気蒸留法は留出液量の採取量が約200 ml 前後と多くなることから³³⁾、やはり微量のフッ素の測定には不適当となる。一方、これらの方法の組み合わせのうち、比較的低濃度のフッ素を測定する方法としては、酸素ポンプおよび微量拡散法とイオン電極法またはガスクロマトグラフ法との併用があげられるが¹⁷⁾、これらの方法は操作が極めて煩雑で、測定に要する時間も非常に長い

どの問題を有する。

本研究において著者は、感度および精度に優れ、操作も簡便で、外部汚染のないフッ素の迅速測定法の確立を目的として、前処理を必要としないフッ素の単離法である pyrohydrolysis と、単離後のフッ素イオン濃度の測定法としてフッ素イオン電極を検出器とするフローインジェクション分析法を採用し、これらの機構を考案して装置を試作した。そして、測定上の諸条件について検討を加え、その実用化として種々の生体試料中フッ素濃度測定に応用した。

1. 本単離装置によるフッ素の単離について

この単離方法は、生体試料の前処理を必要とせず、かつ密閉形であるために外部汚染がなく、短時間にフッ素を単離することができる²⁰⁻²⁴⁾。にも拘らず、この単離方法を生体試料中のフッ素単離に本格的に採用した報告は少ない。著者は本単離装置を考案するにあたり、1 g 以下の少量の試料、特に固体試料中に含まれる 1 μg 以下の微量なフッ素を単離することを目的にした。

生体試料は多量のアルカリ金属、特にナトリウム(Na)を多く含むため、燃焼管を石英で作成すると、1,000°C の高温下で石英と Na が反応して、約10回程度の測定で破壊されてしまう。耐久性のある燃焼管を考えて、本研究ではメインヒーターおよびサブヒーターにより加熱される部分にアルミナ管を用いた。また、サンプルポートに市販の磁性ポートを使用したところ、血清試料中のフッ素測定値がしばしば異常な高値を示したり、ばらつきも大きく、磁性ポート中のフッ素による汚染が示唆された。そのため、本装置ではサンプルポートを白金製とすることによりフッ素の汚染を防止できた。

本装置によるフッ素単離の完了は、原則として凝縮水の採取量 5 ml ごとにフッ素量を連続して測定し確認することとした。(血清試料などの極めて微量のフッ素を測定する場合には、凝縮水の採取量は 2-3 ml ごととした)。1.0 μg 以下のフッ素含有量の場合には、20 ml 以下の採取量で100%の回収率が得られ、10 μg のフッ素では 30 ml の凝縮水を採取する必要がある。これらの単離に要した時間は留出速度が約1.7 ml/min なので、1.0 μg の場合に約12分、10 μg の場合には約18分であった。したがって、迅速に単離するためには、フッ素として1.0 μg を越えないように、あらかじめ試料の供試料を調整する必要がある、多くとも10 μg を越えないことが望ましい。

耐熱性に富む CaF_2 から本法によりフッ素を単離する場合、これまでの報告では酸化タングステン (WO_3) な

どの触媒添加無しには100%の単離はできないため^{21,23)}、多種にわたる試料中フッ素濃度の測定において、 WO_3 などを触媒として添加している^{20,24)}。しかし本装置では、触媒を添加すること無しに CaF_2 からほぼ100%のフッ素を回収することができた。この点について、本装置はメインヒーターおよびサブヒーターの温度管理をアルミナ管表面で行っており、従来の装置のようなヒーターそのものの温度管理ではないため、試料が実際に加熱分解される温度が、常時1,050°C前後に保たれるように設計したことによるものと考えられる。著者は A1F 分子吸光法によるフッ素の測定において³⁷⁾、灰化段階でのフッ素の揮散を抑制するためバリウム (Ba) やマグネシウム (Mg) などをフッ素の数千倍添加したが、1,000°C以上ではフッ化バリウム (BaF_2) や MgF_2 が酸化バリウム (BaO) や酸化マグネシウム (MgO) になり、フッ素が気化することを認めている。これらの経験から、 CaF_2 などの耐熱フッ化物中のフッ素を100%単離するには、加熱分解温度が1,000°C以下では困難と考えられたので、本装置では加熱分解温度を1050°Cに設定した。

2. フッ素イオン分析装置によるフッ素イオン濃度の測定について

フッ素イオン電極を検出器とするフローインジェクション分析法によるフッ素イオン濃度の測定に関する報告はいくつかなされているが²⁵⁻²⁹⁾、本装置のように 1 $\mu\text{g/l}$ レベルのフッ素イオン濃度を精度よく測定しえた報告はない。

まず、送液に用いるポンプに関しては Devay ら²⁵⁾、Frenzel ら²⁶⁾、および Cardwell ら²⁹⁾ が用いているペリスタポンプでは静電気と脈流の影響を受けて S/N 比が低値となる欠点を認める。そこで、本装置では脈流の少ないプランジャーポンプを用いた。また、測定用のフッ素イオン電極を装着するセルは、主として気泡の除去が簡単であることから、Frenzel ら²⁶⁾ の Wall-Jet 方式を採用した。さらに、キャリア液中にポンプのプランジャーシールから 1~2 $\mu\text{g/l}$ 程度のフッ素が溶出することを見出し、これが10 $\mu\text{g/l}$ 以下のフッ素濃度レベルの測定の場合に大きな誤差要因となることが考えられたので、キャリア液のポンプヘッドとサンプルインジェクターとの間に、陰イオン交換樹脂 (Bio Rad AG-1) を充填したカラムを設置し、この溶出するフッ素イオンを除去した。

Cardwell ら²⁹⁾ は、緩衝液の種類によってフッ素イオン電極の応答速度が異なることを報告している。著者もこの点を追試した結果、酢酸系緩衝液はややピーク値の

小さいブロードな電位差プロファイルを示すのに比し、ヘキサミン緩衝液はシャープで、酢酸系緩衝液の約1.3倍のピーク値を示すことがわかった。そこで本法でもヘキサミン緩衝液を用いた。

測定感度は、測定溶液と電極膜面との接触時間、拡散および緩衝液中のフッ素イオン濃度により決定される^{25,29)}。膜表面との接触時間は、サンプルループ容量および送液速度に支配されるが、流速が0.6 ml/min から4.6 ml/min と約8倍に増えても、ピーク値は1/2の減少にもならない。サンプルループの容量についても、0.3 ml 以上ではピーク値の増大がほとんどなく、また、0.05 ml に比し0.3 ml でも、そのピーク値の増大は2倍に至らなかった。

これに比し、緩衝液中のフッ素イオン濃度を10 $\mu\text{g/l}$ から500 $\mu\text{g/l}$ へ増加させると、測定感度は約1/7に減少した。したがって、これらの3条件を決定する場合、試薬の使用量や測定溶液の微量化を考慮すると、流速は1.2(0.6 $\times$ 2) ml/min 前後に、またサンプルループの容量は0.3 ml 以下の適当量に固定し、さらに緩衝液中フッ素イオン濃度は測定溶液のフッ素濃度レベルに応じて調整すべきである。

3. 生体試料中のフッ素量測定への応用について

1) 標準試料

NIST の標準試料では、いまだフッ素濃度の保証値が示されているものはない。ただ、Orchard Leaves には参考値として4 $\mu\text{g/g}$ と記されているが、本法での測定結果は4.46 $\mu\text{g/g}$ とこれに非常に近い値を示した。本法による標準試料中のフッ素量測定の結果より、数十～数百 mg の固体試料中から0.5–7.0 $\mu\text{g/g}$ という極微量のフッ素濃度を、変動係数が5%以下の優れた精度で測定できることを確認した。

2) 人の血清中フッ素濃度の正常値

Taves³⁸⁾ は血清中フッ素には、フッ素イオンのほかに、何らかの有機物と結合した結合型フッ素が存在することを報告して注目された。その後、血清中の結合型フッ素濃度についていくつかの報告があり、フッ素による異常暴露が無いと考えられる人の場合には、4–30 $\mu\text{g/l}$ のレベルにあるとされ^{39–41)}、本法での濃度17.9 $\pm$ 6.1 $\mu\text{g/l}$ もこれとほぼ同じレベルにあった。また、血清中のフッ素イオン、結合型フッ素および総フッ素の濃度は、いずれも男性が女性よりも有意な高値を示した。人の血清の濃度に性差を認めた報告は、これまでに無く、さらに例数を増やして確認したい。

3) 含フッ素麻醉剤吸入時の血清中フッ素濃度

近年、有機フッ素化合物の医学・薬学領域における利用は、ますます広範囲に、かつ増大しているが³⁸⁾、その一つに含フッ素吸入麻醉剤がある。含フッ素吸入麻醉剤は揮発性が大きく、不燃性で、毒性も低いなど、吸入麻醉剤としての物理化学的特性に優れていることから多用されている³⁹⁾。しかし、これまで体内で代謝されにくいとされていた含フッ素麻醉剤の中には、代謝されて血清中フッ素イオン濃度が高まり、腎毒性が発現することや^{42,43)}、一部の代謝産物による肝毒性も報告されている⁴⁴⁾。

本研究ではハロゲン吸入麻醉剤の中で、化学的に安定で、代謝を受けにくく、分配係数が低いなどの特性から汎用されているセボフルレン⁴⁵⁾について、吸入時の血清中フッ素濃度の経時変動を追跡してみた。その結果、吸入によって血清中にフッ素イオン濃度の明らかな上昇を認め、吸入後3日間も正常レベルに復さないことを見出した。化学的に安定で、かつ代謝されにくいはずの有機フッ素麻醉剤だが、本分析法によって吸入された有機フッ素化合物の十数%が、無機のフッ素イオンに分解されることを確認出来た。今後、本分析法は汎用される含フッ素麻醉剤の毒性面における吸入管理に有効となろう。

4) 爪および毛髪

爪および毛髪中のフッ素量に関する報告はほとんど見られず、その正常濃度レベルも、暴露指標としての有用性についても不明であった。爪および毛髪中のフッ素濃度がどのような生体暴露指標になりうるのか、今後の研究に俟たねばならないが、毛髪中フッ素濃度は、II群(暴露者群)がI群(正常者群)よりも有意に高いレベルにあることから、フッ化物の生体暴露指標として有用であることが示唆された。また、爪および毛髪のフッ素濃度の通常レベルに有意差を認め、女性が男性よりも有意に高値を示したことは、本研究での血清や尿⁴⁶⁾ および骨組織⁴⁷⁾ の場合とは逆の性差関係にあり、これらの意義と評価については、今後例数を増して検討したい。

結 論

1 g 以下の少量な生体試料、特に固体の試料中に含まれる1 μg 以下の微量なフッ素を測定するため、pyrohydrolysis によるフッ素の単離装置と、単離後のフッ素をイオン電極によるフローインジェクション分析法にて測定する装置とを試作した。これらの装置によるフッ素の測定条件の検討、性能試験、および数種の生体試料への応用について検討した。

1) 試作したフッ素の単離装置は、 CaF_2 のような耐熱性の化合物でも精度良くフッ素を単離出来、かつ有機フ

ッ素化合物も含め生体試料中のフッ素を短時間(十数分)にほぼ100%単離出来ることを確かめた。例えば、0.05-10 μgF の NaF では回収率が98.9-102.0%, その変動係数が1.1-3.8%, また、1.12-10.5 μgF の CaF_2 では回収率が98.6-101.7%, その変動係数が0.9-2.9%であり、さらに0.50 μgF の $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{F}$ の回収率は97.5 $\pm$ 1.5% (M $\pm$ SD), 0.45 μgF の $(\text{CF}_3\text{CF}_2\text{CO})_2\text{O}$ では101.4 $\pm$ 0.9%の回収率であった。

2) フッ素イオン電極を検出器とするフローインジェクション分析法による定量装置は、0.2 ml の試料溶液量で、約0.5 $\mu\text{g/l}$ のフッ素イオンを検出できた。繰り返し測定の精度も変動係数が約2%と良好で、20 $\mu\text{g/l}$ 程度のフッ素濃度の試料ならば1時間に約25検体を測定できる。

3) 本分析装置の生体試料への応用として、NIST の標準試料、血清、爪、毛髪中のフッ素濃度の測定を実施した。

NIST の標準試料について、0.4 $\mu\text{g/g}$ 以上のフッ素を含んだ SRM 1568, 1571, および1573では、変動係数が2.8-4.6%の精度で測定でき、0.13 $\mu\text{g/g}$ と含有濃度の低い SRM 1577では変動係数が7.0%の精度で測定できた。

血清では、フッ素イオン、結合型フッ素および総フッ素に分けて測定ができた。いずれのフッ素濃度も健康者集団に性差(男>女)を認めた。有機フッ素化合物の含フッ素麻醉剤吸入時の血清にフッ素イオン濃度の急増を認め、また、総フッ素濃度は長時間高濃度で推移した。

爪および毛髪中フッ素濃度では、血清と逆の関係の性差(女>男)を認めた。また、毛髪中フッ素濃度がフッ素の生体暴露指標として有用性であることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました岩手医科大学医学部衛生学公衆衛生学講座角田文男教授に深甚なる謝意を捧げます。また、実験に御協力頂きました教職員各位に深謝致します。

本研究は、昭和63年度文部省科学研究費(奨励研究A、課題番号63770333)の助成を受けた。

また、本研究の一部は第59回日本衛生学会(1989年4月秋田)、第60回日本衛生学会(1990年4月福岡)、および第63回日本産業衛生学会(1990年4月熊本)にて発表した。

文 献

1) Churchill, H.V., Lantz, E.M. and Smith, H.V.:

The cause of mottled enamel, J. Dent. Res., **12**, 149-160 (1932).

2) Moller, P.F. and Gudjonsson, S.V.: Massive fluorosis of bones and ligaments, Acta radiologica, **13**, 269-294 (1932).

3) Hodge, H.C.: Fluoride intoxication in humans, In "Fluorides (Effects on Vegetation, Animals and Humans)", (Editor: J.L. Shupe, H.B. Peterson, N.C. Leone), p. 183, Paragon Press, Inc., Salt lake City (1983).

4) Shouren, H. and Changhan, L.: Epidemiology, Prevention and Treatment of Endemic Fluorosis, 4th Asian Congress of Rural Medicine and Primary Health Care, p. 155, Beijing (1988).

5) Hodge, H.C. and Smith, F.A.: Occupational fluoride exposure, J. Occup. Med., **19**, 12-39 (1977).

6) 角田文男: フッ化物による公害-特論, 総合衛生学公衆衛生学(藤原元典, 渡辺巖一編), p. 852, 南江堂, 東京(1978).

7) 角田文男: 空気中のフッ素と健康との問題, 日本歯科評論, **427**, 137-150 (1978).

8) 石川延男, 小林義男: フッ素の化合物, p. 161, 講談社, 東京(1979).

9) 角田文男: 職場と大気汚染物質としてのフッ化物の人間への影響, 労働の科学, **31**, 149-160 (1976).

10) Committee on biologic effects of atmospheric pollutants: Biologic effects of atmospheric pollutants, Fluorides, pl, National Academy of Science, Washington (1971).

11) 角田文男: フッ素化合物, 新小児医学大系25(小林登他編), p. 225, 中山書店, 東京(1981).

12) 石川精子: 生体負荷指標としての尿中フッ素の意義について, 岩手医誌, **28**, 207-222 (1976).

13) 鈴木康洋: 生体負荷指標としての骨組織中のフッ素濃度の意義について, 岩手医誌, **29**, 413-432 (1977).

14) 豊田秀三: フッ酸作業者の健康管理指標としての尿・血清中フッ素量, 産業医学, **21**, 335-348 (1976).

15) Yazaki, K., Sakurai, S., Itai, K., Suzuki, K. and Tsunoda, H.: Health examination of aluminum refinery workers exposed to fluoride, Arch. Hig. Rada Toksikol. (suppl.), **30**, 949-956 (1979).

16) Ehrnebo, M. and Ekstrand, J.: Occupational

- exposure and plasma fluoride levels in man, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **58**, 179-190 (1986).
- 17) Venkateswarlu, P.: Determination of fluorine in biological materials, *Methods of Biological Analysis*, **24**, 93-201 (1977).
- 18) Frant, M.S. and Ross, J.W.: Electrode for sensing fluoride ion activity in solution, *Science*, **154**, 1553-1554 (1966).
- 19) 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).
- 20) Kakabadse, G.J., Manohin, B., Bather, J.M., Weller, E.C. and Woodbridge, P.: Decomposition and the determination of fluorine in biological materials, *Nature*, **229**, 626-627 (1971).
- 21) Berns, E.G. and Van der Zwaan.: The pyrohydrolytic determination of fluoride, *Anal. Chim. Acta*, **59**, 293-297 (1972).
- 22) Mazor, L.: Anwendung des hydropyrolyseverfahrens zur bestimmung des halogengehalts organischer verbindungen, *Acta Chem. (Budapest)*, **89**, p 289-295 (1976).
- 23) Van Leuven, H.C.E., Rotscheid, G.J. and Buis, W. J.: Rapid general microdetermination of fluorine, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **296**, 36-39 (1979).
- 24) Whitehead, D. and Thomas, J.E.: Use of nebulizer in pyrohydrolytic decomposition of silicate materials for determination of fluorine and chlorine, *Anal. Chem.*, **57**, 2421-2423 (1985).
- 25) Devay, D.E., Mulcahy, D.E. and O'Connell, G.R.: Rapid determination of fluoride in potable waters by potentiometric flow injection analysis, *Anal. Lett.*, **19**, 1387-1406 (1986).
- 26) Frenzel, W. and Bratter, P.: The fluoride ion-selective electrode in flow injection analysis. Part 1. General Methodology, *Anal. Chim. Acta*, **185**, 127-136 (1986).
- 27) Frenzel, W. and Bratter, P.: Fluoride ion-selective electrode in flow injection analysis. Part 2. Interference studies, *Anal. Chim. Acta*, **187**, 1-16 (1986).
- 28) Frenzel, W. and Bratter, P.: Fluoride ion-selective electrode in flow injection analysis. Part 3. Applications, *Anal. Chem. Acta*, **188**, 151-164 (1986).
- 29) Cardwell, T.J., Cattrall, R.W. and Hauser, P.C.: Buffer systems for use with the fluoride electrode in flow injection analysis, *Anal. Chem.*, **59**, 206-208 (1987).
- 30) Kissa, E.: Determination of fluoride at low concentrations with the ion-selective electrode, *Anal. Chem.*, **55**, 1445-1448 (1983).
- 31) Trojanowicz, M. and Matuszewski, W.: Limitation of linear response in flow injection systems with ion-selective electrodes, *Anal. Chim. Acta*, **138**, 71-79 (1982).
- 32) 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).
- 33) Jacobson, J.S., Troiano, J.J., Cosentini, C.C. and Evans, J.: Evaluation of agreement among routine methods for determination of fluoride in vegetation: Interlaboratory collaborative study, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **65**, 1150-1154 (1982).
- 34) Taves, D.R.: Separation of fluoride by rapid diffusion using hexamethyldisiloxane, *Talanta*, **15**, 969-974 (1968).
- 35) Glerum, J.H., Dijk, A.V. and Klein, S.W.: A new and improved gas chromatographic method for the determination of fluoride in plasma and faeces, *Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition*, **6**, 75-79 (1984).
- 36) Venkateswarlu, P.: Fallacies in the determination of total fluorine and nonionic fluorine in the diffusates of unashed sera and ultrafiltrates, *Biochemical Medicine*, **14**, 368-377 (1975).
- 37) Itai, K., Tsunoda, H. and Ikeda, M.: Effect of matrix modifier and furnace material on the determination of traces of fluoride by electrothermal molecular absorption spectrometry of aluminum monofluoride, *Anal. Chim. Acta*, **171**, 293-301 (1985).
- 38) Taves, D.R.: Evidence that there are two forms of fluoride in human serum, *Nature*, **217**, 1050-1051 (1968).

- 39) 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).
- 40) Belisle, J.: Organic fluorine in human serum, : natural versus industrial sources, *Science*, **212**, 1509-1510 (1981).
- 41) Guy, W.S., Taves, D.R. and Brey, W.S. Jr.: Organic fluorocompounds in human plasma: Prevalence and characterization, in "Biochemistry Involving Carbon Fluorine Bonds, ACS Symp. Series 28" (Editor: Filler, R.), p. 117 (Chap. 7), American Chemical Society, Washington D.C. (1976).
- 42) Taves, D.R., Fry, B.W., Freeman, R.B. and Gillies, A.J.: Toxicity following methoxyflurane anesthesia. II. Fluoride concentrations in nephrotoxicity, *JAMA*, **214**, 91-95 (1970).
- 43) 阿曾晶子：エンフルレン麻酔時の無機弗素濃度変化と腎機能について，麻酔，XXXII，1212-1219 (1983).
- 44) 酒井資之：含弗素吸入麻酔薬の代謝率に関する研究，麻酔，XXVII，124-131 (1978).
- 45) 池田和之：セボフルレンの基礎，セボフルレン（稲田豊編），p. 1，克誠堂出版，東京（1988）.
- 46) Tsunoda, H., Sakurai, S., Itai, K., Sato, T., Nakaya, S., Mita, M. and Tatsumi, M.: Normal urinary fluoride levels in Japanese subjects: Relationship between urinary fluoride levels and environmental fluoride, *Fluoride*, **17**, 159-167 (1984).
- 47) Suzuki, Y.: The normal levels of fluorine in the bone tissue of Japanese subjects, *Tohoku J. Exp. Med.*, **129**, 327-336 (1979).

（受付 1990年 7月16日 受理 1990年10月19日）