南極オキアミ中フッ素の簡易迅速定量法

熊 谷 昌 士

(1984 年 3 月 16 日受理)

Simple and Rapid Method for Determination of Fluoride in Antarctic Krill

Masashi KUMAGAI^{*1}

A simple and rapid analytical procedure was investigated for determination of fluoride in Antarctic Krill *Euphausia superba*. An ionselective electrode method was adopted to simplify and make rapid the procedure. The fluoride content in krill was obtained by measuring the concentration of fluoride of the extracted solution with an ion meter. For extraction of fluoride, 0.05 N HClO₄ solution was the most suitable. The most satisfactory results were obtained by using 100 ml of acid and shaking for 45-60 minutes on 1-2 g of sample. The presence of cations, anions, and protein of ordinary contents did not interfere. Recoveries of fluoride on eighteen samples were 90-100% and coefficient of variation was 3.34%. Fluoride contents in krill were 470-510 ppm and C.V. was 2.12% by this proposed method.

南極オキアミ *Euphausia superba* は重要なたんぱく質資源として古くから注目され、生態、加工利用、栄養学的評価等の研究が行われてきたことは周知のことである。

南極オキアミは一般の海産生物と同様、多種の微量元素を含んでいる¹⁾が、なかでもフッ素は比較的多く含有されており、²⁾ 筋肉部で乾物当り 50~100 ppm、頭胸部を含む甲殻では同じく 200 ppm 以上という報告³⁾もある。

フッ素は地下水などからの長期間の摂取により、斑状歯を発生させることはかなり古くから知られており、日常の摂取量についても気をつけなければならない元素の一つである。オキアミを材料として各種の加工品を製造するにあたっては、原材料および製品中のフッ素含量を何らかの手段でチェックする必要があると思われる。

食品中のフッ素の定量は、試料を灰化後、水蒸気蒸留した留液について吸光度法あるいはイオン電極法を用いるのが普通である。⁴⁾ しかし、灰化や水蒸気蒸留の操作はめんどろなことで長時間を要することから、多数の検体を処理するのにふさわしくない。そこで著者は多数の検体を単純な操作で迅速に処理できることを目的とし、フッ素イオン選択性電極を用い、試料の希酸による抽出液について直接フッ素を測定することを試みたところ、実用できることがわかったので報告する。

実験方法

試料 使用した南極オキアミ (以下オキアミという) は、1981 年南氷洋で漁獲された生凍結品である。約 500 g を 5°C で半解凍状態としたのち、頭胸部を含む全体をホモジナイザーで粉碎混合した。クルマエビ *Penaeus japonicus* は市販品 (熊本県産) を筋肉部と頭胸部を含む甲殻とに分け、それぞれ粉碎混合した。また、アミ塩辛は市販のびん詰の全内容物を粉碎して用いた。

試薬 フッ素標準溶液: フッ化ナトリウム (NaF, 精本化成工業製、容量分析用標準試薬) 0.5 g を白金皿にとり、500°C で 50 分加熱後硫酸デシケーターで放冷し、その 0.221 g を水にとり 100 ml とし標準原液とした。原液を水で希釈して F として 10, 1.0, 0.1 µg/ml の溶液を調製した。緩衝液 (全イオン強度調節液: TISAB): 水 500 ml に酢酸 57 ml, NaCl 58 g, 1,2-シクロヘキサジアン四酢酸 (CyDTA) 4 g を加えてとかし、20% NaOH で pH 5.3 に調節した後、水を加えて 1000 ml とした。ランタン・アリザリンコンプレキソン溶液: ドータイトアルフッソン^{*2} 5 g を水にとり 100 ml とした。その他の試薬は精密分析用または特級品を用いた。

装置および器具 イオンメーターはオリオン社製 407 A 型、フッ素イオン電極はオリオン社製 96-09 複合電極、分光光度計は島津製作所製 UV-730 型、振とう器

^{*1} (財) 日本食品分析センター (Japan Food Research Laboratories, 52-1 Motoyoyogi, Shibuya, Tokyo 151, Japan).

^{*2} (株) 同仁化学研究所 (熊本市) 製の登録商品名。

はトーマス科学製、遠心分離器は国産(株)製 H-200 型、水蒸気蒸留装置は JIS K 0102 に定めたものを使用した。

検液の調製とフッ素の測定 試料 1.0 g を 200 ml 容ポリびんにはかりとり、フッ素 (F) 抽出用希酸を加えて振とうする。抽出液を遠沈管に移し、6000 rpm で 10 分間遠心分離し、その上澄液を検液とする。

検液 10 ml をとり、0.5 N NaOH を用いて中和したのち水を加えて 40 ml とし、さらに、TISAB 10 ml を加え、スターラーでかき混ぜながらイオンメーターを用いて F の濃度を測定した。

結果と考察

抽出用希酸と濃度の選択 F の抽出用希酸として、水蒸気蒸留による F の分離に多く使用されている硫酸 (H_2SO_4)、過塩素酸 (HClO_4) を選び、このほかに塩酸 (HCl) およびトリクロロ酢酸 (TCA) のあわせて 4 種の酸について、F の抽出に及ぼす濃度を検討した。

試料 1.0 g をとり、前記 4 種の酸のそれぞれ 0.05 ~ 1.0 N 溶液 100 ml を加えて 60 分間振とう後、以下前項 F の測定の方法にしたがって F 量を測定した。結果を Fig. 1 に示した。

H_2SO_4 と HCl は HClO_4 および TCA より低い値を示し、0.5 N 以上になると酸濃度が高くなるにしたがって F の検出量が減少する傾向を示した。また、抽出液にはたんぱく質の溶出によると思われる濁りがあり、このことは電極に対し有機物の吸着をおこし、電極の性能劣化の原因となる。 HClO_4 は 0.05 ~ 0.5 N の間でほぼ一定の値を示したが、0.5 N を超えると H_2SO_4 および HCl と同様の傾向を示している。 TCA は 0.05 N では HClO_4 と同じ値であったが、酸濃度が高くなるにした

Fig. 2. Effect of concentration of HClO_4 on extraction of fluoride in Krill at room temperature.

Sample: 1.0 g, HClO_4 : 100 ml, Extracting time: 60 min.

がって F の検出値が増大する傾向であった。また、抽出液は HClO_4 と TCA は共に透明であった。

以上のことから、抽出用希酸には HClO_4 が適当と思われたので、さらに、0.01 ~ 0.05 N の間の酸濃度について検討したところ Fig. 2 に示したように、0.04 N 以上で一定の値を示すこと、抽出液の中和後のイオン強度の点を考慮し、以後の実験は 0.05 N HClO_4 を用いることとした。

抽出の液量と時間 目的物質の抽出にさいし、液量、時間および温度等は抽出効率を左右する大きな要因である。本実験では①多数の検体を同時に処理できること、②操作手順をできるだけ簡略化することを目的としたので、温度条件はすべて室温で行うことを前提とし、液量と時間について検討した。

まず、抽出時間を 60 分とし、試料 1.0 g に 0.05 N HClO_4 を 25 ~ 150 ml を加え前述の方法で F 量を測定したところ、抽出液量は 75 ml 以上でほぼ一定の値を

Fig. 1. Effect of concentration of four kinds of acids on extraction of fluoride in Krill (*Euphausia superba*) at room temperature.

Sample: 1.0 g, Acid solution: 100 ml, Extracting time: 60 min.

x—x: H_2SO_4 , v—v: HClO_4 , ●—●: HCl , ○—○: CCl_3COOH .

Fig. 3. Effect of volume of 0.05 N HClO₄ on extraction of fluoride in Krill at room temperature.

Extracting time: 60 min.

Fig. 4. Effect of time on extraction of fluoride in Krill at room temperature.

Extracting solution: 100 ml/0.05 N HClO₄.

示した (Fig. 3)。つぎに、0.05 N HClO₄ の量を 100 ml とし、抽出時間について検討したところ Fig. 4 に示したように、30 分以上の抽出でほぼ一定の値が得られた。

妨害物質の検討 抽出液を直接イオン電極法により F を測定する関係上、希酸による F の抽出の際、オキアミから溶出してくると思われる Ca²⁺、Mg²⁺、Fe²⁺、Fe³⁺、Cu²⁺、K⁺ および NH₄⁺ の 7 種のカチオンと、PO₄³⁻、NO₃⁻、Br⁻ および I⁻ の 6 種のアニオンの計 13 種とたんばく質として卵白を用いそれぞれの影響を検討した。オキアミに含有しその量も多い Na⁺ および Cl⁻ については TISAB に含まれているので除外した。なお、カチオンについては塩化物を、アニオンについてはナトリウム塩を用いた。

各イオン類の添加量はオキアミ中の含有量等も考慮し、F 1.0 ppm の溶液に対し Ca²⁺、Mg²⁺、SO₄²⁻、SiO₃²⁻ および NO₃⁻ はそれぞれ 10、50、100 および 500 ppm、Cu²⁺、Br⁻ および I⁻ は 10、50 および 100 ppm、Fe²⁺ および Fe³⁺ は 10 および 50 ppm、NH₄⁺、K⁺ および PO₄³⁻ は 50、100、500 および 1000 ppm、卵白は 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0 および 5.0% となるように添加した。それぞれの溶液 40 ml をとり、TISAB 10 ml を加えてスターラーを用いてかき混ぜながら F の濃度を測定したところ、Ca²⁺、Mg²⁺ および Cu²⁺ を除く他のも

Fig. 5. Interference of Mg and effect of volume of total ionic strength adjustor (TISAB) on the measurement of fluoride.

Total volume of the test solution was adjusted to be 50 ml when TISAB was added and the fluoride content of the test solution was 50 μg/50 ml as F. Volume of TISAB was ● 10 ml, × 20 ml, and ○ 30 ml.

のは添加した濃度範囲ではまったくその影響はなかった。Ca²⁺ 500 ppm と Cu²⁺ 100 ppm を含む溶液では若干低い値を示す傾向にあり、Mg²⁺ は 100 ppm のとき F 0.90 ppm, 500 ppm のとき F 0.65 ppm を示し、濃度が高くなるにしたがって F は低い値を示した。このような場合、TISAB の量を増やすことにより、ある程度の妨害を除去できることが多いので、TISAB の量を 10、20 および 30 ml とし、また、Mg²⁺ の濃度を 10、25、50、100、250 および 500 ppm として F の測定値に対する影響をみた。(Fig. 5)

TISAB 量 10 ml では Mg²⁺ 50 ppm 以上で、また、20 ml および 30 ml のときは 100 ppm 以上で低い値を示し、TISAB 量を増やしても Mg²⁺ の妨害を除去することはできなかった。しかしながら、オキアミでは Mg²⁺ が F⁻ に対して 50 倍以上に存在することは考えられないので、¹⁾ 実用上の不都合はないと思われる。

添加回収実験 オキアミ (全体) と F 含有量の少ないクルマエビの筋肉を用いてつぎのように行った。すなわち、オキアミは試料 1.0 g に対し、F 300 μg および 500 μg、クルマエビは試料 2.0 g に対し F 10 μg を添加したのち、0.05 N HClO₄ 100 ml を加えて振とう抽出し、前述の方法にしたがって F 量を測定した。試料中の F 含有量は 2 点併行で 3 回の繰返し、添加回収は 3 点併行で 3 回の繰返しで実験した。オキアミについては F 含有量 470~510 μg (CV: 2.12%)、検出量は F 添加量 300 μg のとき 760~780 μg (CV: 1.12%)、500 μg のとき 960~990 μg (CV: 1.16%) で回収率は前者は 90~97% (CV: 3.26)、後者は 94~100% (CV: 2.33%) であった。クルマエビでは F 含有量 1.4~1.8 μg (CV: 8.84%)、検出量 9.6~12 μg (CV: 7.81%)、回収率 80~104% (CV: 9.16%) であった。Table 1 に平均値による結果を示した。

オキアミの場合は CV 値も低く、十分な精度で分析で

Table 1. Recoveries of fluoride from krill *Euphausia superba* and tiger prawn *Penaeus japonicus*

(wet wt. basis)				
Sample	Fluoride content* ¹ (μg)	Fluoride added (μg)	Fluoride found* ² (μg)	Recovery (%)
Krill	490	300	770	93.3
		500	974	96.9
Tiger prawn	1.6	10	10.8	92.0

*¹ Fluoride content: the means of six values (2 samples × 3 times).

*² Fluoride found: the means of nine values (3 samples × 3 times).

きる。クルマエビはCV値が高いが、これはFの含有量が少なく、低濃度で精度が悪くなるイオン電極法の欠点(検液中のF濃度は0.016および0.11 ppm程度)と、使用したイオンメーターが濃度直読式で細かな点を読みとりにくいことなどに起因すると思われる。しかし、平均で92%の回収率はDOLAN⁹⁾が畜肉および畜肉製品で行った添加回収実験とほぼ同等の結果を示していることから、標準添加法を用いることにより、クルマエビ等のF含有量の少ないエビ類のFの簡易迅速定量法としても十分使えるものと考えられる。

その他の方法との比較 Fの分離には一般に広く用いられている灰化-水蒸気蒸留法を用い、測定法についてはランタン・アリザリンコンプレキソン吸光光度法(La-ALC法)との比較を行った。

試料1.0gを白金ルツボにとり、精製してFを除いたCa(OH)₂ 10% けん濁液 10 mlを加えて混合後、水浴上で乾固する。残留物を約0.5gのCa(OH)₂で被覆し、電気マッフル炉に入れ450°Cで3時間灰化する。灰化残留物を常法⁹⁾により水蒸気蒸留し、イオン電極法とLa-ALC法でFを定量した。結果をTable 2に示す。

水蒸気蒸留した同一溶液でのLa-ALC法とイオン電極法の値はよく一致しており両者の差はないが、抽出液

Table 2. Comparison between the fluoride contents obtained by steam distillation methods and those obtained by the proposed method (wet wt. basis)

Sample	Steam distillation method		Proposed method (ppm)
	La-ALC colorimetric analysis (ppm)	Ion-selective electrode analysis (ppm)	
Krill	482±7*	484±8*	494±5*

* The standard deviations shown after the means were based on six observations.

Fig. 6. Scheme of simple and rapid method for determination of fluoride in Krill, using fluoride ion-selective electrode method.

を直接測定するイオン電極法は前者よりやや高い値を示した。これは前者は灰化によるFの揮散や蒸留時の未回収部分があり、後者にはその恐れがないためと思われる。

分析方法の確立 以上から、オキアミ中のFの定量方法をFig. 6に示すようにした。この方法により、多数の検体を従来法より数倍の早さで精度よく測定することができた。測定に要する時間は10検体同時に処理して2時間30分から3時間である。また、この方法を用いた市販のアミ塩辛とクルマエビの筋肉および殻のF含有量は、それぞれ1.4, 0.83および50 ppmであった。

要 約

食品中のFの定量は、従来、灰化-水蒸気蒸留による妨害イオンからの分離など煩雑な操作を必要とした。南極オキアミに存在するFはその含有量が多く、かつ、希酸で容易に抽出されることから、灰化や水蒸気蒸留することなく、希酸抽出液を直接イオン電極法により定量することを検討し、以下のような結論を得た。

- 1) F抽出用希酸は0.05 N HClO₄ 100 mlが適している。
- 2) 抽出時間は0.05 N HClO₄ 100 mlのとき30分以上で、抽出液量は60分間の抽出で75 ml以上で一定の値を示す。
- 3) Ca²⁺は500倍、Cu²⁺は100倍、Mg²⁺は50倍量以上共存すると負の妨害を与えるが、本実験の対象サンプルでは妨害イオンの除去はとくに考える必要がない。
- 4) 本法により測定した南極オキアミ中のF含有量は

470-510 ppm, 平均 490 ppm でこのときの CV は 2.12% ($n=6$) と満足しうる精度である。

5) 本法による回収率は F 300 μg の添加のとき 90-97%, 平均 93.3%, CV は 3.26% ($n=9$), F 500 μg の添加のとき 94-100%, 平均 96.9%, CV は 2.33% ($n=9$) であった。

6) しかしながら, クルマエビのように, F 含有量の低いものは分析精度がやや落ちる。

7) 本法は従来の方法に比較して短時間で多数の検体を同時に処理できる。

8) 本法の操作概要をフローシートにして Fig. 6 に示した。

終りに, 本稿をまとめるにあたり, 数々の御教示をい

ただいた当食品分析センターの山下太郎博士に厚く謝意を表します。

文 献

- 1) 渡辺 武彦・杉井 麒三郎・湧口 浩也・衣巻 豊輔: 東海水研報, 第 85 号, 13-30 (1976).
- 2) T. SOEVİK and O. R. BRAEKKAN: *J. Fish. Res. Board Can.*, **36**, 1414-1416 (1979).
- 3) A. SZEWIEPOW: *Meeresforschung, Reports on Marine Research*, **28**, 544-546 (1981).
- 4) 日本薬学会編: 衛生試験法注解, 金原出版, 東京, 1980, pp. 59-61.
- 5) T. DOLAN, L. LEGETTE, J. MCNEAL, and A. J. MALANOSKI: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **61**, 982-985 (1978).