

# イオン電極を用いた骨中のフッ素の定量

松 浦 秀 治

- 
- |            |                 |
|------------|-----------------|
| はじめに       | (4) 電極電位測定操作    |
| 1. 分析方法    | (5) 検量線法による算出   |
| (1) 試料調製   | (6) 既知量添加法による算出 |
| (2) 主な使用機器 | 2. 測定値の再現精度     |
| (3) 試 薬    | おわりに            |
- 

## はじめに

フッ素年代判定法 (Oakley 1951) は、人類学・考古学・古生物学的資料の編年に利用されてきた (田辺 1962, Oakley 1980, Matsu'ura 1982, 松浦 1984, 河村・松浦 1989, ほか)。骨のフッ素含量は、表面採集された標本の出土層準の判定、様々な古さのものが混在する骨資料の相対的時代分類、大まかな年代推定、地層や遺残の堆積状態・攪乱状態の考察、各層準間あるいは各層準から出土した骨の新旧関係や年代差の査定、などの目的にしばしば有効な指標となる (松浦 1983, ほか参照)。

骨遺残中のフッ素は、標準列法 (田辺 1962)、分光光度分析法 (Glover & Phillips 1965)、硝酸トリウム滴定法 (下田・北村 1978)、などによって定量されてきたが、いずれも蒸留操作を行ないフッ素を分離する煩雑な前処理が施されている。近年、Frant & Ross (1966) によりフッ素イオン電極が開発され、水溶液中のフッ素の活量を直接かつ選択的に測定することが可能となった。フッ素電極法では試料母体からフッ素を分離する過程を経なくてよいが、一方で試料溶液におけるイオン強度、pH、温度、フッ素イオンと金属イオンとの錯体形成を厳密に制御し調整する必要がある。これらの問題を解決した初期の頃の成功例として、水溶液中のフッ素含量測定における全イオン強度調整用緩衝剤 (Total Ionic Strength Adjustment Buffer) の使用 (Frant & Ross 1968) が挙げられる。

筆者は (Matsu'ura 1981) 骨遺残のフッ素分析に適する緩衝剤の検討と選択を試みたが、以下、それに基づいて、その後改良した部分も含め、筆者が行なっている定量操作を紹介する。また、本分析法の精密度についても述べる。

## 1. 分析方法

### (1) 試料調製

一般的には、骨体（幹）緻密質の外表面から内表面にいたる小横断片を採取し、ステンレス製スパーテル、ナイロンブラシなどにより付着する異物を除去した後、メノウの乳鉢を用いて均一な細粉にする。骨資料から横断片を切り出すには、化石化の程度・保存状態に応じて様々なこぎり（なるべく刃の薄いもの）やダイヤモンドカッター等を使用する。例えば、縄文貝塚出土の骨遺残の場合、冷凍食品切断・各種工作用のこぎりが適しているようである。

既に清浄にしてある骨資料あるいは付着する異物の無い資料部位では、歯科用ドリルにて外表面から内表面にいたる粉末試料を採取し、メノウ乳鉢でさらに細粉化してもよい。

分析用骨試料の採取箇所の選定には、一骨破片内における部位によるフッ素含量の変動を考慮する必要があるが、これに関しては Matsu'ura (1982) を参照されたい。また、海绵質、歯の取り扱いについても同上論文に詳しい。

### (2) 主な使用機器

(i) フッ素イオン選択性電極、比較電極、pH/mVメーター pH/mVメーターは、様々な性能のものが各社から入手できる。ただし、1 mV の電位差が約 4 % の濃度変化に相当するから、精密な測定には 0.1 mV まで読める感度を持つ機種が必要となる。電極も各社で作られているが、メーカーにより電極コネクターの形式に違いがあるので、メーターと適合するものを選ぶ（電極アダプタも販売されている）。例えば、次のような組み合わせが考えられる。

コーニング M-250型デジタル pH イオンアナライザ (0.1 mV 目盛)

オリオン 94-09型フッ素イオン電極

岩城硝子 IW109型カロメル比較電極

比較電極と一体化した複合型フッ素電極もあり、微量の試料溶液の測定には適しているが、保守操作がやや煩雑である。骨の分析には特に必要ない。

(ii) 天秤 試薬調製の 0.1 g 読み取り限度の上皿天秤。および、骨粉末試料の秤量に使用する、少なくとも 0.1 mg まで読み取ることのできる分析天秤。

(iii) マグネティック・スターラー 攪拌台の温度上昇のないもの。小型でよい。

(iv) 分注用ピペット 100~500  $\mu$ l 容量のマイクロピペット 1~2 種 (ex. エッペンドルフ 3130)。5 ml および 10 ml 容量のマクロ (ミリリッター) ピペットまたは分注器。機種によっては予めメスフラスコや化学天秤を用いて正確度 (accuracy) と精密度 (precision) を試験する

必要がある。

### (3) 試 薬

化学薬品は JIS 特級，できれば精密分析用を使用する。

(i) 1 M (モル/リットル) HCl 20%塩酸 (定沸点，無鉄) を 6 倍希釈する。定量分析用の 1 mol/l 塩酸をそのまま利用してもよい。

(ii) 緩衝剤 骨試料の持つ諸条件や実験設備の状態に応じて以下の 1 つを採用する。(Matsu'ura 1981, および下記第 5 節参照)。一般には，緩衝剤 A が簡便であり，殆どの骨遺残・化石骨の分析に有効である。

緩衝剤 A. 1 l ビーカーに 1 M KOH (容量分析用でよい) 250 ml をとり，蒸留水約 350 ml を加える。これにクエン酸ナトリウム 2 水和物 147 g と酢酸ナトリウム 3 水和物 10.2 g を溶かし (溶けにくいときは蒸留水を適宜加える)，室温に戻した後，1 l メスフラスコに移し，標線まで蒸留水を加えて定容とする。

緩衝剤 B. 上と同様に，クエン酸ナトリウム 2 水和物 98.0 g，酢酸ナトリウム 3 水和物 6.8 g，KNO<sub>3</sub> 16.9 g を約 600 ml の蒸留水に溶解し，さらに蒸留水を加えて 1 l 定容とする。

緩衝剤 C. 1 M HCl 500 ml にトリス (ヒドロキソメチル) アミノメタン [TRIS] 161.5 g と酒石酸ナトリウム 2 水和物 153.4 g を溶解し，室温に温めた後，蒸留水を加えて 1 l 定容とする。この緩衝剤は Orion 社が開発した全イオン強度調整用緩衝剤 (TISAB) IV を，骨の分析用に調整したものである (Matsu'ura 1981)。

(iii) NaF 標準液 フッ化ナトリウムを溶解した市販のフッ素イオン標準液 (ex. 東亜電波工業 1,000 ppm 標準液，Orion 社 100 ppm 標準液) を原液のまま，またはメスフラスコにて適宜希釈して用いる。下記の検量線法には，少なくとも 2 種類 (10 倍程度濃度差のあるもの) の標準液を用意する。筆者は通常，100，40，10 ppm F (イオン電極法の場合，ppm は mg/l の意) の 3 液を，必要に応じては更に低い濃度のものを調製している。NaF 標準液はポリエチレン製試薬びんに保存しておくが (次節参照)，3 カ月程度で新しく交換する。

### (4) 電極電位測定操作

① 10~20 mg 程度の骨粉末試料を 30 ml ビーカー (緩衝剤 B，緩衝剤 C を採用する場合は 50 ml ビーカー) に分析天秤を用いて精密に ( $\pm 0.05$  mg) 量りとり，1 M HCl 5 ml を加えて溶かす。歴史時代の骨遺残のように予想されるフッ素含量が低いときは粉末試料量を増やすが，いずれにしても 30 mg 以上を要しない。

② 蒸留水 5 ml を加える。

③ 緩衝剤 A 10 ml (緩衝剤 B または C では 30 ml) を混合する。電極測定用の標準溶液は，

#### イオン電極を用いた骨中のフッ素の定量

上記①の骨粉末試料と②の蒸留水を、それぞれ、ヒドロキシアパタイト（生化学工業製；Matsu'ura 1981参照）と NaF 標準液に代え、①～③の操作を同様に行なうことによって得られる。ヒドロキシアパタイトの量は、複数の骨粉末試料を連続して分析する場合、それらの試料量の中央値に近似させる。以下、標準溶液とはこの様に調製された溶液を指すこととする。

緩衝剤を添加することによって、全ての試料溶液と標準溶液のイオン強度と pH は実質的に同一となる。それぞれの緩衝剤を選択したときの測定溶液における緩衝系と pH は次のとおりである。

緩衝剤A： 0.125MHCl—0.125MKCl—0.0375M NaAcetate—0.25mNaCitrate（約pH5.5）

緩衝剤B： 0.125MHCl—0.125MKNO<sub>3</sub>—0.0375MNaAcetate—0.25mNaCitrate（約pH5.5）

緩衝剤C： 0.5MHCl—1 mTRIS—0.5mNaTartrate（約pH 8.3）

なお、一連の測定における試料溶液と標準溶液の作製には、同一ロットの試薬を用いるよう留意する。

④ シール用フィルムでビーカーを密封後、1時間ほど放置し、各測定溶液の温度を室温に揃える。この間などを利用して、電極のコンディショニングを済ませておく（各電極取扱説明書参照）。また、1～20ppm F 程度の溶液に接触させ、フッ素電極の応答を確かめておく。

⑤ 洗浄し水滴を拭った2本の電極を溶液に浸漬し、テフロン攪拌子とマグネティック・スターラーで静かに攪拌しながら、平衡状態の電位 (mV) を記録する。平衡状態に達する時間は、溶液のフッ素濃度や緩衝系によるが（緩衝剤Cを用いると長くなる）、およそ2～10分を要する。後述の検量線法による測定値を既知量添加法によって照合・検定する場合は、試料溶液の推定F濃度のおよそ100倍濃度のNaF標準液を既知小量（試料溶液の約100分の1の体積）添加し、充分攪拌した後、再び電位を測定する。

⑥ 溶液の温度を測る（0.1℃単位）。フッ素はガラスに対して腐食性・吸着性があり、電極電位の測定に際しては、一般に被検液をプラスチック製容器に入れることを指定されるが、ここで扱うフッ素溶液の濃度範囲ではガラス（パイレックス及び相当品）製ビーカーでさしつかえない（Matsu'ura 1981参照）。ただし、NaF標準液などの保存にはポリエチレン・ボトルを使用する。

#### （5） 検量線法による算出

フッ素イオン選択性電極の指示電位 ( $E$ ) は、溶液中のフッ素イオンが、ある濃度範囲内で次に示すネルンストの関係式に従う。

$$E = \text{constant} - (2.303RT/F) \log r C_{\text{free}}$$

ここで  $r$  : 活量係数

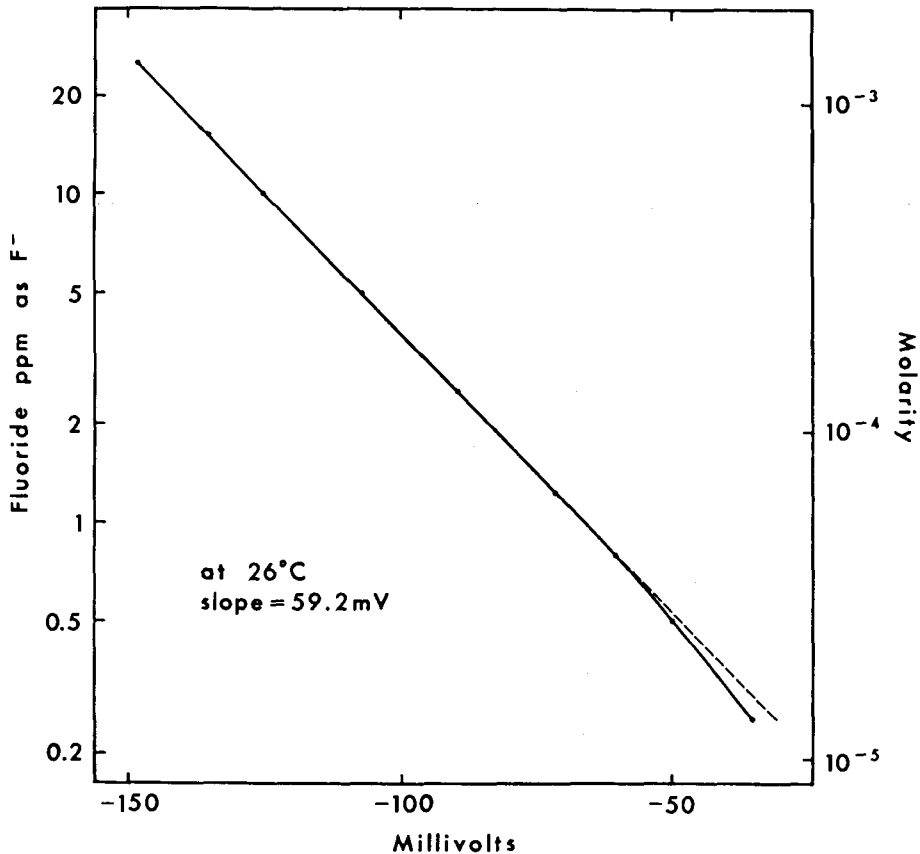


図1 0.5M HCl—1 M TRIS—0.5M Na Tartrate (約pH 8.3) バックグラウンドにおけるフッ素濃度と電極電位の関係。この媒質中では0.8 ppm F以下で電位応答が曲がってくる。0.25M Citrate (約pH 5.5) 媒質 (緩衝剤A又はBを使用した場合) では、すくなくとも0.45 ppm Fまで直線応答領域に入る。

$C_{\text{free}}$ : 遊離フッ素イオン濃度

constantは測定系によって決まる定数で、電極内部液のフッ素イオン活量や使用する比較電極に関係する。ネルンスト係数  $2.303RT/F$  は、気体定数 ( $R$ )、絶対温度 ( $T$ )、ファラデー定数 ( $F$ ) から求められ、25°Cでは59.16 mVと算出される。活量係数  $\gamma$  は溶液の全イオン強度による変数である (Moody & Thomas 1971) が、測定するフッ素イオン濃度の変動と比べてはるかに高いイオン強度を持つ緩衝剤を添加し、共通のバックグラウンドを与えることによって、 $\gamma$  を実質的に一定とみなすことができる。

片対数グラフ用紙の等分軸に測定電位をとり、対数軸に標準溶液のフッ素濃度をとると、直接測定の検量線が描ける。この標準溶液においてはフッ素はすべて遊離イオンとして存在していると考えられる。すなわち  $C_{\text{total}}$  (全フッ素濃度) =  $C_{\text{free}}$  である。これは、溶液中にアルミニウムや鉄のような錯体生成性イオン種が含まれていないことと、緩衝剤を加えることで、解

離していない HF や HF<sub>2</sub><sup>-</sup> が形成されない範囲の pH に調整されているからである (Frant & Ross 1966, Srinivasan & Rechnitz 1968, 参照)。

多価金属イオンの多くはフッ素と錯体を形成し、溶液中の遊離フッ素イオンを減少させる (Duff & Stuart 1972, Orion Inc. 1977, ほか)。骨遺残には多かれ少なかれフッ素と錯塩を生成する金属元素が含まれ、電極法によるフッ素分析の妨害となるが、この影響は試料溶液に錯化剤を含有させることによって排除できる。ここでは緩衝剤 A・B を構成するクエン酸と緩衝剤 C の酒石酸がそれに相当する。これらの錯化剤は金属陽イオンと優先的に結合し、フッ素イオンを遊離させる。妨害金属イオンのマスキングにおいて、緩衝剤 C は A・B よりはるかに高い能力を有するが (Orion Inc. 1977, Matsu'ura 1981), 0.8ppm F 以下では検量線が直線領域から外れ(図 1), フッ素含量 0.2% 未満の骨試料の分析には効率が悪い。殆どの考古学的骨遺残や化石骨の場合、緩衝剤 A 又は B の使用で十分なマスキング効果が得られる。0.25M Citrate (約 pH 5.5) 系では、電極は少なくとも 0.45ppm F まで直線応答を示すから、緩衝剤 A を採用し 30mg の粉末試料を供すれば、F 含量 0.03% 以上の (骨のリン灰石には最大 3.77% までフッ素が入る) 骨の分析が精度よく行なえる。

検量線の直線応答領域での実際の算出操作は以下のようである (表 1 参照)。

溶液中フッ素濃度 C の対数の、電極電位 E に対する回帰式

$$\log C = -\frac{E}{S} + a$$

における S と a を、複数の標準溶液のデータから求める。試料溶液のフッ素濃度を得られた回帰式から算出する。骨のフッ素含量 (%) は次の計算で与えられる (表 1)。

試料溶液の F 濃度 (ppm = mg/ℓ) × 調製した試料溶液量 (ℓ) ÷ 粉末試料量 (mg) × 100

なお、電極電位は温度によって変化し、また長期間の使用中には徐々にドリフトするので、試

表 1 フッ素含量算出の例

フッ素濃度 C (ppm)	log C	電極電位 E (mV)
〈標準溶液〉		
25	1.3979	-23.2
10	1.0000	0.4
2.5	0.39794	36.0
これより次の算出式が求められる		
$\log C = -\frac{E}{59.20} + 1.00628$		$r = -0.9999997$
〈試料溶液〉		
4.329 ←	0.63635 ←	21.9
仮に骨粉末試料 12.4mg が、総量 20ml の試料溶液に溶解しているとすれば		
$4.329 \times \frac{20}{1000} \div 12.4 \times 100 = 0.6982$		
骨のフッ素含量 = 0.698%		

料溶液のフッ素濃度の算出には、一連の測定ごとに試料溶液とはほぼ同一温度（±0.2℃）の標準溶液によって新たに作成された検量線を用いる。

### (6) 既知量添加法による算出

測定された試料溶液の電極電位を  $E_1$  とし、これにフッ素イオン標準液の既知小量（試料体積の約100分の1）を添加し、充分攪拌した後の電位を  $E_2$  とする。この場合、活量係数は実質的に一定と見做してよいので、電位の変化  $\Delta E (= E_2 - E_1)$  は次の式で表わされる。

$$\Delta E = -S \log \left[ \frac{\alpha_1}{\alpha_2} \cdot \frac{V_1 C_1 + V_0 C_0}{(V_1 + V_0) C_1} \right]$$

ただし

$S$  : 電極スロープ (mV/decade), 理論的には  $2.303RT/F$

$\alpha_1$  : 標準液添加前の遊離フッ素イオン種の割合

$\alpha_2$  : 標準液添加後の遊離フッ素イオン種の割合

$C_1$  : 試料溶液の全フッ素濃度

$C_0$  : 添加した標準液の全フッ素濃度

$V_1$  : 試料溶液の体積

$V_0$  : 添加した標準液の体積

溶液中における陽イオンとの錯生成が無視できる程度であるか、あるいは少なくとも  $\alpha_1 = \alpha_2$  であるならば、試料溶液の全フッ素濃度は次の式から計算される ( $\rho = V_0/V_1$  とおく)。

$$C_1 = \frac{\rho C_0}{(1 + \rho) 10^{-\Delta E/S} - 1}$$

添加法は臨時試料の分析や検量線法による値を照合するのに適している (Orion Inc. 1977, Matsu'ura 1981, ほか参照)。

## 2. 測定値の再現精度

骨粉末試料のフッ素含量測定の再現精度は、C. V. (標準偏差/平均) にして 0.010～0.013 であり、精密さにおける本法の高い信頼性を示している。表 2, 3, 4 にその例を示すが、これらは各々 1～3 年にわたる時折の実験によるデータであり、粉末試料の秤量、試料・標準溶液調製操作、使用電極の違い、などに係るバラツキを含んでいる。

表 2 骨のフッ素含量測定の再現性  
緩衝剤 A 使用 (本文参照)

実験 No.	分析値(%)
1	1.59
2	1.56
3	1.57
4	1.55
5	1.56
6	1.54
Mean	1.56
S. D.	0.017
C. V.	0.011

**表 3** 骨のフッ素含量測定再現性  
緩衝剤B使用 (本文参照)  
試料は表2のものと同一ロットの粉末

実験 No.	分析値(%)
1	1.53
2	1.55
3	1.60
4	1.58
5	1.57
6	1.59
7	1.57
8	1.57
9	1.57
10	1.57
11	1.59
12	1.55
13	1.56
Mean	1.57
S. D.	0.019
C. V.	0.012

**表 4** 骨のフッ素含量測定再現性  
緩衝剤C使用 (本文参照)  
骨試料は表2, 3のものと異なる

実験 No.	分析値(%)
1	1.34
2	1.34
3	1.33
4	1.35
5	1.33
6	1.37
7	1.33
8	1.36
Mean	1.34
S. D.	0.015
C. V.	0.011

採用する緩衝系による分析値の系統的な差は筆者の経験では見あたらなく、測定誤差の範囲内で一致するようである。ただし、前述

のように低フッ素含量の骨の分析には緩衝剤Cは適さない。また、緩衝剤A・Bを用いた場合でも、試料溶液のフッ素濃度が約0.5ppmを下回り、電極の直線応答領域から外れると(先史的骨遺残分析では極めて稀なケース)、C. V. がやや大きくなるので注意を要する(例えば、松浦 1985など参照)。

照合用粉末試料を調製しておき、一連の実験に際して同様に測定し、分析値を管理すれば不測の誤差を避けることができる。

## おわりに

イオン電極を用いたフッ素の定量は、入手が難しい機器・薬品や特殊な化学実験技能を要求しないが、試料形態に応じた調整が必要である。筆者の知る限りでは、本法に関して人類・考古学的骨資料の分析操作に焦点をあてて詳しく書かれたものが無いので、国立歴史民俗博物館共同研究「動物考古学の基礎的研究」に参画したのを機にまとめておくこととした。

このほかX線回折像から骨のフッ素含量を推定する手法もある。この方法はイオン電極法などと比べて繰り返し精度・再現性に欠けるものの、試料の重量を測る必要のないこと、試料を溶解しないので他元素の分析に供試できることなどの利点を持つ。一連の複数の化石資料にフッ素年代判定法を適用するときには、X線回折法も有効な手段となる(Oakley & Howells 1961, 他)。本分析法についてはTanabe & Watanabe (1968), Matsu'ura (1983)を参照され



たい。

### 引用文献

- Duff, E. J. & J. L. Stuart 1972 The use of triethanolamine in a buffer for the determination of fluoride in calcium and transition metal orthophosphates, using a fluoride-selective electrode. *Talanta*, 19, 76~80.
- Frant, M. S. & J. W. Ross, Jr. 1966 Electrode for sensing fluoride ion activity in solution. *Science*, 154, 1553~1555.
- Frant, M. S. & J. W. Ross, Jr. 1968 Use of a total ionic strength adjustment buffer for electrode determination of fluoride in water supplies. *Analytical Chemistry*, 40, 1169~1171.
- Glover, M. J. & G. F. Phillips 1965 Chemical methods for the dating of fossils. *Journal of Applied Chemistry, London*, 15, 570~576.
- 河村善也・松浦秀治 1989 「日本の第四紀洞窟・裂罅堆積物の層準と年代」『日本第四紀学会講演要旨集』19, 112~113.
- Matsu'ura, S. 1981 Determination of fluorine in fossil bone with an ion-selective electrode. *Bulletin of the National Science Museum, Tokyo, Ser. D (Anthropology)*, 7, 7~16.
- Matsu'ura, S. 1982 A chronological framing for the Sangiran hominids; Fundamental study by the fluorine dating method. *Bulletin of the National Science Museum, Tokyo, Ser. D (Anthropology)*, 8, 1~53.
- Matsu'ura, S. 1983 Calibration of diffractometer measurement for fluorine determination of fossil bones from Sangiran; A reappraisal of X-ray diffractometric application to the fluorine dating. *Bulletin of the National Science Museum, Tokyo, Ser. D (Anthropology)*, 9, 13~22.
- 松浦秀治 1983 「堆積層における骨遺残の共時性を調べる一骨の年代決定・時代判定法」『考古学ジャーナル』223, 20~24。
- 松浦秀治 1984 「フッ素年代判定法と古人骨の編年」日本人類学会編『人類学—その多様な発展』46~50, 日経サイエンス。
- 松浦秀治 1985 「富山県氷見市泊洞穴から出土した人骨のフッ素含量」『国立科学博物館専報』18, 219~223。
- Moody, G. J. & J. D. R. Thomas 1971 Selective Ion Sensitive Electrode. Watford, Merrow Publishing Co. Ltd. (宗森信・日色和夫共訳 1977 「イオン選択性電極」1~148, 共立出版。)
- Oakley, K. P. 1951 The fluorine-dating method. *Yearbook of Physical Anthropology*, 5, 44~52.
- Oakley, K. P. 1980 Relative dating of the fossil hominids of Europe. *Bulletin of the British Museum (Natural History), Geology*, 34, 1~63.
- Oakley, K. P. & W. W. Howells 1961 Age of the skeleton from the Lagow sand pit, Texas. *American Antiquity*, 26, 543~545.
- Orion Inc. 1977 Instruction Manual for Fluoride Electrodes. 1~33, Massachusetts, Orion Research Incorporated.
- 下田信男・北村泰子 1978 「外国の遺跡から出土した骨のフッ素含量と年代との関係」『北海道考古学』14, 1~10。
- Srinivasan, K. & G. A. Rechnitz 1968 Activity measurements with a fluoride-selective membrane electrode. *Analytical Chemistry*, 40, 509~512.
- 田辺義一 1962 「三ヶ日遺跡出土人骨の弗素含有量」『人類学雑誌』70, 41~45。
- Tanabe, G. & N. Watanabe 1968 Dating fossil bones from Japan by means of X-ray diffraction pattern. *Journal of the Faculty of Science, University of Tokyo, Sec. V*, 3, 199~216.

(お茶の水女子大学 家政学部)

## Fluorine Determination in Bone Using an Ion-Selective Electrode

MATSUURA Shūji

Fluorine analysis may assist the relative dating of bone remains of archaeological, anthropological or palaeontological interest. This paper describes a technique for determining fluorine in bone with the specific ion-sensitive electrode, and shows a high degree of reproducibility of the method.