毛髪中水銀化合物の酸抽出法による定性定量法¹⁾

西方敦子, 丹沢珪子, 武田 寧, 大沢利昭, 浮田忠之進

東京大学薬学部薬害研究施設²⁾

Identification and Determination of Mercury

Compounds in the Hair by Extraction with Acids¹⁾

ATSUKO NISHIKATA, KEIKO TANZAWA, YASUSHI TAKEDA,

TOSHIAKI OSAWA and TYUNOSHIN UKITA

*Research Institute for Chemical Hazards,**Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo²⁾*

(Received May 14, 1968)

In order to establish a rapid method for the qualitative and quantitative analysis of mercury compounds in the human hair, the extraction of mercury compounds from the human hair with various acid was investigated, and it was revealed that the extraction can be achieved almost quantitatively with 0.5 N HBr at 37°. The dithizone method for the quantitative determination of mercury was successfully applied to the mercury compounds in the 0.5 N HBr extract after neutralization of the extract to pH 6.0. Inorganic and organic mercury compounds were separated by means of alumina column chromatography as their dithizonates and determined spectrophotometrically. The organic mercury dithizonates were then decomposed with silver acetate and the mercury compounds thus released were identified by thin-layer chromatography.

The whole procedures were applied to the identification and the quantitative determination of mercury compounds in the hair of the patients of mercury poisonings.

著者等³⁾はさきに有機水銀剤による亜急性ないし慢性中毒者の毛髪中の水銀量を測定し、対照健康人に比し、きわめて高い含有量を示すことを報告した。しかし従来の分析では放射化分析法によるか、あるいは疎解してすべての水銀化合物を無機水銀として定量するため、毛髪中水銀化合物がいかなる形態で存在するかを明らかにすることはできない。最近喜田村等⁴⁾は水銀中毒患者の毛髪を 0.5N HCl で抽出し、ガスクロマトグラフィーにより有機水銀化合物を定性する方法を報告している。今回

著者等は各種の酸を抽出溶媒として毛髪中水銀化合物の抽出条件、およびその抽出液中の水銀化合物の定性、定量について検討し、実用的に有用な方法を確立したのでこれを応用し、亜急性ないし慢性水銀中毒患者毛髪中の水銀化合物を定性、定量した。

本法によれば毛髪中の無機および有機水銀化合物をきわめて迅速に抽出定性し、さらにそれらの分別定量を行なうことができる。

1) 日本薬学会 第88年会で発表, 東京, 1968年4月.

2) Location: *Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo* (東京都文京区本郷).

3) 浮田忠之進, 星野乙松, 丹沢珪子, 衛生化学, **9**, 138 (1963); 星野乙松, 丹沢珪子, 長谷川嘉成, 浮田忠之進, 衛生化学, **12**, 90 (1966); 星野乙松, 丹沢珪子, 寺尾允男, 浮田忠之進, 大内淳弘, 衛生化学, **12**, 94 (1966).

4) 喜田村正次, 塚本利之, 早川 清, 住野公昭, 柴田孝子, 医学と生物学, **72**, 274 (1966).

実験方法および結果

1. 試料

以下に示す頭髪を中性洗剤（“ディフ”1% (W/V)水溶液，新日本マグナス社製）で洗滌したのち，エタノールアセトン混液（1:1, V/V），および四塩化炭素により室温で脱脂後，1—2 mm に細切して用いた。

- A. 新潟県阿賀野川水銀中毒患者頭髪。
- B. 新潟県阿賀野川水銀中毒患者頭髪。
- C. メチル水銀チオアセタミド中毒患者頭髪。
- D. 12年間にわたり無機水銀を取扱い，発病前2—3ヵ月間有機水銀性農薬を取扱った中毒患者頭髪。
- E. エチル水銀チオサリチル酸中毒患者頭髪。

2. 定量操作

石倉等⁵⁾の方法によった。すなわち検液中水銀化合物をジチゾン—四塩化炭素溶液により水銀ジチゾネートとして抽出し，それを Brockmann 活性度Ⅲのアルミナカラムクロマトグラフィーによって無機水銀ジチゾネートと有機水銀ジチゾネートとに分画し，各分画中の水銀量につき490mμ（無機水銀ジチゾネート）または470mμ（有機水銀ジチゾネート）の吸光度を測定して定量した。

3. 有機水銀化合物の定性操作

- a) 有機水銀ジチゾネート分画からの薄層クロマトグラフィー用試料の調製

浮田，武田⁶⁾の方法によった。すなわち2で得られた有機水銀ジチゾネート分画から溶媒を留去したのち，残渣を四塩化炭素20mlに溶解し，0.1% AgOAc—0.5N AcOHと振盪した（10mlで1回，5mlで3回）。水層を合し，濃塩酸0.5mlを加え，クロロホルム15mlで3回抽出した。クロロホルム層は乾燥綿栓を通過後減圧濃縮し，薄層クロマトグラフィーの検液とした。

- b) 薄層クロマトグラフィー

薄層：セルロース（アビセル，旭化成）より常法により作った。

展開溶媒：BuOH—EtOH—NH₄OH（8:1:2）

発色試薬：0.005% ジチゾンクロロホルム溶液。

4. 各種の酸による毛髪への抽出

試料A（湿式分解法による水銀含有量300μg/g）0.1gずつをとり，それぞれ25mlの1N HCl，1N H₂SO₄，1N HNO₃あるいは1N H₃PO₄を加え，37°で3hr振盪した。この操作後毛髪中に残留する水銀量を湿式分解³⁾により無機水銀として定量した。結果をTABLE Iに示す。

TABLE I. Extraction of Mercury Compounds with Various Acidic Solvents from Sample A

Solvents	Hg remained in hair (μg/g)	Hg extracted (%)
1 N HCl	29.4	90.7
1 N H ₂ SO ₄	292.8	6.7
1 N HNO ₃	257.3	18.6
1 N H ₃ PO ₄	313.6	0

TABLE I より，毛髪中水銀化合物はこの条件下1N HClにより90%以上抽出されるが，使用した他の酸によつてはほとんど抽出されないことが判明した。

なお以上の実験で得られた1N HClによる毛髪抽出液をジチゾン—四塩化炭素溶液で抽出し，毛髪抽出液中水銀化合物の定量を行なってみると，無機および有機合計水銀量として62.5μg/gなる値を与え，これはTABLE Iに示した1N HClによつて毛髪から抽出された水銀量の約24%である。このように低い定量値が得られた原因は塩酸による抽出液からジチゾン—四塩化炭素溶液への水銀化合物の移行率が低いとためと考えられたので，移行率に影響をあたえる種々の要因について検討を加えた。

5. 酸溶液からジチゾン—四塩化炭素溶液への水銀化合物の移行率に影響する諸因子

- a) 酸の種類による影響

塩化メチル水銀含有（1μg/ml）各種酸溶液50mlをジチゾン—四塩化炭素溶液で抽出し，各ジチゾン溶液に移行した水銀を定量するとFig. 1のようである。

Fig. 1. Extraction of Mercury Compound from Various Acids with Dithizone-CCl₄

- H₂SO₄, HNO₃ or H₃PO₄
- HCl
- x-x- HBr

Fig. 1 より，少なくとも酸濃度1NまではHNO₃，

5) S. Ishikura, K. Yokota, *Chem. Pharm. Bull.*, (Tokyo), 11, 939 (1963).

6) 浮田忠之進，武田 寧，日本薬学会第88年会，東京，1968年4月。

H₂SO₄ あるいは H₃PO₄ 溶液からジチゾン溶液への水銀化合物の移行はほぼ定量的であるが、ハロゲン化水素酸溶液からの移行率は酸濃度が高くなるにしたがい急激に低下することが認められた。

b) ハロゲンイオン濃度による影響

KCl あるいは KBr を各種の濃度に溶かした塩化メチル水銀含有 (1 μg/ml) 1 N H₂SO₄ 50ml をジチゾン-四塩化炭素溶液で抽出し、ジチゾン溶液に移行した水銀を定量して、Fig. 2 に示す結果を得た。

Fig. 2. Extraction of Mercury Compound from 1 N H₂SO₄ with Dithizone-CCl₄ in the Presence of Various Concentration of Halogen Ion

... x ... x ... Cl⁻ —●—●— Br⁻

c) 酸性度による影響

ハロゲンイオン濃度 0.5 N になるように KCl あるいは KBr を溶かした塩化メチル水銀含有 (1 μg/ml) 稀硫酸 (pH 0—3) および酢酸緩衝液 (pH 4—6) 50ml を

ジチゾン-四塩化炭素溶液で抽出し、ジチゾン溶液に移行した水銀を定量すると Fig. 3 のようである。

Fig. 3 で見られるように、1 N H₂SO₄ 中では水銀化

Fig. 3. Extraction of Mercury Compound from Aqueous Solution with Dithizone-CCl₄ in the Presence of Halogen Ion (0.5N)

... x ... x ... Cl⁻ —●—●— Br⁻

合物のジチゾン溶液への移行率に対し著明な影響を与えたハロゲンイオン濃度 0.5 N (Fig. 2) の場合も、溶液の pH が 4 以上であれば移行率はほぼ 100% であることが判明した。

d) 他の重金属による影響

これまでの実験から、水銀化合物のハロゲン化水素酸溶液を水銀定量の試料とする場合は、溶液を pH 4.0 以

TABLE II. Effect of Other Metal Ions on the Determination of Mercury Compounds

Inorganic ion (μg)	Added (μgHg)		Recovered (μgHg)		Recovery (average %)	
	HgCl ₂	CH ₃ HgCl	HgCl ₂	CH ₃ HgCl	HgCl ₂	CH ₃ HgCl
Ag ⁺	15	21	13.0	20.6	100	100.4
	15	21	15.5	20.6		
	15	21	16.5	21.0		
	25	15	16.2	20.6	102.6	100.4
	25	15	16.2	20.6		
	25	15	13.8	22.1		
Cu ⁺⁺	25	15	19.4	21.2	112.0	100.5
	25	15	19.4	21.7		
	25	15	15.7	21.6		
Pb ⁺⁺	25	15	18.1	21.2	100.6	100.5
	25	15	16.2	21.2		
	25	15	11.2	22.2		
Zn ⁺⁺	25	15	17.5	22.0	104.0	100.5
	25	15	13.8	21.2		
	25	15	15.4	22.2		

上に中和したのち、定量操作を行えばよいことが判った。この条件下、他の重金属による水銀定量値への影響の有無を検討するため、塩化第二水銀あるいは塩化メチル水銀含有 0.5N HBr に AgNO_3 , $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ あるいは ZnSO_4 を添加し、この溶液 50ml をとり、メチルレッドを指示薬とし 5N NaOH で中和したのちジチゾン-四塩化炭素溶液で抽出し、ジチゾン溶液に移行した水銀の定量を行なった。結果を TABLE II に示す。

この結果から、いずれの重金属の存在下でも、水銀化合物のジチゾン溶液への移行率は定量的である。なお、これら重金属のジチゾネートは Brockman 活性度 III のアルミナカラムクロマトグラフィーで、無機水銀ジチゾネートおよび有機水銀ジチゾネートの溶出条件下では、いずれも溶出されないことを確めた。

6. 毛髪中水銀化合物のハロゲン化水素酸による抽出条件の検討

4 および 5 における実験から毛髪中水銀化合物の抽出にはハロゲン化水素酸が最も効果的であること、かつハロゲン化水素酸溶液中の水銀化合物定量の最適条件が明らかとなったので、次に毛髪中水銀化合物のハロゲン化水素酸による抽出条件の検討を行なった。

a) 酸濃度

試料 A 0.1g ずつをとり、0.1N より 1.0N にわたる各種濃度の HCl あるいは HBr 25ml と 37° で 1hr 振盪し、濾過後濾液 20ml をとり、メチルレッドを指示薬として 5N NaOH で中和し、さらに 0.5M リン酸緩衝液 (pH 6.0) 3ml を加えたのち、ジチゾン-四塩化炭素溶

Fig. 4. Extraction of Mercury Compound from the Hair

—x—x— HBr ...●...●... HCl

液で抽出し、ジチゾン溶液中の水銀の定量を行なった。試料 A の湿式分解法による水銀定量値 (300 $\mu\text{g/g}$) を 100% とし、毛髪中水銀化合物の抽出率と酸濃度との関係をあらわすと Fig. 4 のようである。

Fig. 4 より酸濃度 0.5N 以上では 37°, 1 hr の振盪により毛髪中水銀化合物はほぼ 100% 抽出されることが判明した。

b) 経時変化

抽出溶媒として 0.5N HBr あるいは 0.5N HCl を用い、(a) と同条件下試料 A から抽出される水銀化合物の経時的な定量を行なった。結果を Fig. 5 に示す。

Fig. 5. Extraction of Mercury Compound from the Hair

—x—x— 0.5N HBr ...●...●... 0.5N HCl

この結果から 0.5N HBr を抽出溶媒とした場合は 0.5N HCl を用いた場合に比し、やや抽出が速やかであることが認められるが、いずれの場合にも 100% の抽出には少なくとも 40 分間の操作が必要であることが判る。

7. 4 種の水銀中毒患者毛髪からの水銀化合物の抽出と定量

6 における実験から毛髪中水銀化合物の抽出条件としては 0.5N HBr を抽出溶媒として、37°, 1 hr 振盪する条件が最適であることが判明したので、この抽出条件を試料 B, C, D および E に応用してこれら毛髪中水銀化合物の定量を行なった。結果を TABLE III に示す。

本法により抽出され定量された有機水銀量および無機水銀量の合計値は湿式分解法による水銀定量値とほぼ同じ値を示しているが、抽出後の毛髪につき湿式分解法により水銀の定量を行なうと、全水銀量の約 5% 内外の水銀が残留しているという結果を得た。⁷⁾ この残留水銀は

7) 本法による定量値および残留水銀量の合計値と湿式分解法による定量値との差は湿式分解操作に伴う誤差に起因すると考えられる。

さらに同条件下 0.5N HBr で再抽出するとその約 60% が抽出された。⁷⁾

8. 薄層クロマトグラフィーによる水銀化合物の定性

試料 B, C, D および E について, それらが含有する有

機水銀化合物の形態を定性するため, 0.5N HBr による抽出法で得られた有機水銀ジチゾネートを酢酸銀溶液で分解して得た検液についてセルロースによる薄層クロマトグラフィーを行なった. 結果を Fig. 6 に示す.

TABLE III. Extraction and Determination of Mercury Compounds from the Hair of the Patients of Mercurial Poisonings

Sample	0.5N HBr extraction for 1 hr at 37°		Hg remained in Hair (μg/g)	Hg determined by wet-ashing method (μg/g)
	Hg extracted (μg/g)			
	Organic	Inorganic		
B	600	2	24.5	600
C	1st 305	1	12.9	300
	2nd 8.2	—	5.2	
D	303	70.4	23.5	369
E	287	3	24.5	280

Fig. 6. Thin-Layer Chromatogram on Cellulose Plate of Alkyl Mercury Compounds

Me : CH_3HgCl B : mercury compound from sample B
 Et : $\text{C}_2\text{H}_5\text{HgCl}$ C : mercury compound from sample C
 D : mercury compound from sample D
 E : mercury compound from sample E

試料 B および C からは塩化メチル水銀が, 試料 D および E からは塩化エチル水銀が同定された.

総 括

1 毛髪中水銀化合物の抽出条件, さらに抽出された水銀化合物の定性, 定量法について検討し, Fig. 7 に示す方法により毛髪中水銀化合物を極めて迅速に定性, 定量し得ることを見出した.

2 本法を応用して水銀中毒患者毛髪中の水銀化合物を定性定量した.

Fig. 7. Procedure of Extraction, Identification and Determination of Mercury Compounds from the Hair