衛生化学
EISEI KAGAKU
27 (3) 179-183 (1981)

原子吸光法による生体中の有機水銀分析における還元装置の改良

寺田 撰雄, 乾 拓雄, 田村久恵

静岡県工業試験場¹⁾

Improvement of a Reducing Instrument for Organic Mercury Determination in Organic Tissue by Atomic Absorption Spectrometry

SETSUO TERADA, TAKUO INUI, and HISAE TAMURA

Shizuoka Prefectural Industrial Research Institute¹⁾

5-9-3, Komagata-Dori, Shizuoka City, Japan

(Received January 26, 1981)

Organic mercury in organic tissue (squid) was analyzed by cold vapor atomic absorption spectrometry. For a reducing procedure, a newly designed simple reducing cell was used instead of conventional reaction vessel apparatus. To assess the simple reducing cell apparatus, recovery experiment was carried out. Certain amounts of organic mercury (such as CH_3HgCl) were added to squid tissue. Then it was analyzed. The recovery was 96—98 % average, and coefficient of variation 2.1—3.3 %. When organic mercury in squid was analyzed, by use of both present method and gas chromatography (ECD-GC) method, it was found that in the liver organic mercury concentration was the highest (0.0292 and 0.0289 ppm wet weight) among several tissue samples of squid. No variance in result was recognized between these two methods.

Keywords — reducing cell ; organic mercury ; atomic absorption spectrometry ; sodium tetrahydroborate ; iron (III)

緒 言

生体中の水銀の含有量を検討する場合、総水銀量のみでなく、毒性の強いメチル水銀が大半をしめている有機水銀の量についても把握する必要がある。これらの見地から、有機水銀の分析法としてガスクロマトグラフィー（電子捕獲型検出器付）（ECD-GC と略す）による分析法¹⁾が公定法として採用され広く用いられている。

しかし、機種によってはECD-GCを設置²⁾、使用する場合、法的規制を受けると共に機器をいつも最適状態に保つことが困難³⁾であると同時に、レコーダー上に現れたピークが水銀に由来するものであることの確認を、別の方法⁴⁾で行う必要がある。これらの繁雑さを解決する方法として水銀 (Hg) の原子吸収スペクトル (2537Å) を直接測定する原子吸光光度計を用いた有機水銀の定量法に関する研究報告⁵⁻⁶⁾も多く、保守管理の面でもECD-GCに比べ簡単に操作も迅速である。また最近還元剤としてテトラヒドロホウ酸ナトリウム (NaBH_4) と第二鉄塩を併用した水銀の原子吸光分析法が水沼ら⁷⁾によ

って報告されている。

著者らは汎用性の高い原子吸光光度計による分析法の研究の一つとして、生体中のヒ素の分析を目的としてテトラヒドロホウ酸ナトリウム錠剤を還元剤とした簡易な還元セルを開発して、アルシン黒鉛炉原子吸光分析法について報告⁸⁾したが、水沼らの報告を検討した結果、本装置を用いて有機水銀の定量が可能であると判断したので、生体中の有機水銀の定量法の改良を目的として、原子吸光光度計に適した試料溶液とするため、衛生試験法による有機水銀の試料調製法を一部改善した方法で試料調製をおこない、本装置を用い、水銀を還元し、冷原子吸光法で測定して、良好な結果を得た。また本法を用いてイカ中の有機水銀の定量を行った結果についても報告する。

実 験 の 部

1. 装置 Fig. 1 に水銀還元セル、Fig. 2 に水銀測定装置の概略を示した。原子吸光光度計は島津製作所製 AA-610 型を用い、光源は浜松テレビ社製水銀中空

Fig. 1. Reducing Cell

A: air, B: sodium borohydride, C: pulp cotton, D: silica wool, E: pipette, F: sample injection port, G: to mercury analyzer.

Fig. 2. Schematic Diagram of Analytical System

A: air, B, F: Hg absorption reagent (KMnO_4), C: reducing cell, D: drying reagent ($\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$), E: absorption cell (optical length 15 cm), G: micro pipette, P: to flow meter and diaphragm pump.

陰極ランプ (2537 Å) を使用した。分析セルはパーキンエルマー社製水銀分析用セル、長さ 150 mm、外径 19 mm のアクリル製のものを用いた。吸引ポンプは AA-610 型付属の水銀分析用ダイアフラムポンプを使用した。水銀還元用セルは、長さ 110 mm、直径 15 mm の円筒型で、空気取入口より 40 mm の所に試料注入口をあけ、直下に NaBH_4 錠剤がパルプ綿上に置けるよう、パイレックスガラスで試作した。

ガスクロマトグラフィーは島津製作所製 GC-4BE 型 (線源 ^{63}Ni 10 mc) を用いた。測定条件は衛生試験法に準じておこなった。

2. 試薬 1) 塩化メチル水銀標準溶液——塩化メチル水銀 (MMC) (和光純薬特級) 0.100 g をベンゼンに溶解し 100 ml とし標準原液とする。この原液をベンゼンで10倍希釈を4回繰返し、塩化メチル水銀標準液とする。

2) システイン・アセテート溶液——L-システイン塩酸塩 0.1 g, 酢酸ナトリウム (無水) 0.1 g, 無水硫酸ナトリウム 13 g を水にとり 100 ml とする (用時調製)。

3) $\text{Fe}(\text{III})$ 溶液——塩化第二鉄 (FeCl_3) (和光純薬

特級) 10 g を 0.1 N 塩酸 (HCl) 100 ml にとり 10 % 溶液を調製。

4) テトラヒドロホウ酸ナトリウム (NaBH_4) 錠剤——アルファ社製の径 0.8 cm, 厚さ 0.6 cm, 重量約 0.3 g のペレットを使用。

5) 抽出用ベンゼン——和光純薬製残留農薬分析用を用いた。

3. 試験操作 1) 試料前処理——イカを胴体、足、肝臓の部分に解体し、それぞれ細断後ウルトラホモジナイザーで、クリーム状化し、50–70 g をシャーレに分取し、 -40° で凍結保存し、用時解凍して用いた。

2) 試験溶液の調製——衛生試験法註解の直接抽出方法を一部改変して前処理した。試料 3 g 前後を正確にポリエチレン製共栓付 50 ml の遠心管にはかりとり、塩酸 (3+1) 4 ml を加え、さらにベンゼン 25 ml を正確に注加したのち密栓して振とう機で10分間振とう抽出をおこなった後、 -40° のフリーザー中に入れて一度凍結させた。ついで常温で融解させ、2000 r.p.m. で5分間遠心し2層に分離した。このベンゼン層より 20 ml をホールピペットで 50 ml の別の共栓付遠心管に分取し、システイン・アセテート溶液 5 ml を添加後振とう機で5分間振とう抽出する。しばらく静置して、ベンゼンの大部分を駒込ピペットで吸引分離し、残りはワットマンろ紙 1 ps で吸着除去したのち、システイン・アセテート液 3 ml をホールピペットで 10 ml サンプルびんに分取、濃塩酸 0.5 ml と 10 % $\text{Fe}(\text{III})$ 溶液 0.5 ml を加えて全量を 4 ml とし試験溶液とする。空試験溶液についても同様に処理し、実試料値より差引いた。

3) 検量線の作成——システイン・アセテート溶液中に MMC として 10–50 ng/5 ml および 100–500 ng/5 ml となる様標準液をとり、2) と同様の処理を行ない検量線を作成する。

4) 定量操作——試験溶液を水銀含有量に応じて 25 μl または 100 μl をマイクロピペットではかりとり、還元セルの注入口よりテトラヒドロホウ酸ナトリウム錠剤上に滴下し、水銀蒸気を発生させ、分析計に導入する。レコーダーのピーク高さを読取り検量線から含有量を算出する。

結果と考察

1. 試験溶液の調製

テトラヒドロホウ酸ナトリウムと $\text{Fe}(\text{III})$ の併用による場合でも、水溶液の場合共存元素の影響はさげられないので、試料中の有機水銀を衛生試験法の直接抽出方法に準じてベンゼンで抽出したものから、再度システイン・アセテート溶液で抽出した。これ以後の濃縮操作は

TABLE I. Extractive Efficiency of Methyl mercury with Cysteine Solution

Exper. time	Volume of cysteine solution		
	10 ml	5 ml	2.5 ml
1	485 ng	470 ng	480 ng
2	478	475	472
3	482	487	492
4	496	500	492
5	502	501	465
6	472	485	490
7	483	494	485
8	479	489	475
9	493	475	479
10	501	479	490
Mean	488	487	481
Std. dev.	10.4	11.5	8.2
Coeff. of var	2.1%	2.3%	1.7%
Extraction	99%	97%	96%

Extracted from MMC 0.5 μ g in 20 ml benzene solution.

行なわないため、出来るだけ少量の抽出液で抽出するほど抽出液中の水銀濃度は高く保たれるので、有機水銀の少ない試料、または分析試料の少ない時は有効である。そのため抽出液の使用量を 10 ml, 5 ml, 2.5 ml とにわけて 0.5 μ g の MMC を含んだ 20 ml のベンゼン溶液から抽出試験を行ない抽出率を調べた結果を Table I に示した。10 回の繰返しの結果、10 ml と 5 ml とではほとんど差はないので、5 ml を用いて抽出することとし、出来るだけ水銀濃度を高く保つことにした。また抽出後のシステイン・アセテート溶液中には、ベンゼンが微量ながら溶解しており、測定時にプラスの誤差を生ずるため、ワットマン汙紙 1 ps を長方形に切り、一端を液中につけて振りまぜ、溶解しているベンゼンを吸着除去することで解決した。

2. 第二鉄塩の影響

MMC の還元助剤として第二鉄塩 (Fe (III)) が有効であるとの報告⁹⁾があり、著者らも (Fe (III)) として塩化第二鉄 (FeCl₃) を併用して還元を行ない、塩化第二鉄の添加量と水銀蒸気の発生量との関係を試料 2 点ずつ調製して 1 点当り 10 回測定した結果を Fig. 3 に示した。この方法で還元する場合、MMC として 0.2 ppm の溶液中に 1 % 以上の Fe (III) を含有している時、一定の値を得たが、三橋ら⁹⁾の場合より高い濃度であった。還元方式も違っているので直接比較は出来ないが、MMC と NaBH₄ と Fe (III) との濃度について各々相関性があるのではないかと推定される。しかし、本法では水銀濃度に比例して鉄濃度を高くすると NaBH₄ 錠剤上に黒色

Fig. 3. Effect of Fe (III) on Absorbance Fe (III) Solution (as FeCl₃): added in 10 ml Methyl Mercury Solution (0.2 ppm MMC)

recorder range : 50 mv.

Fig. 4. Effect of Air Flow Rate

被膜を生じることから MMC の還元を妨害する恐れもあり、MMC の濃度を試料採取量で加減して調製した方がよいと考える。また、NaBH₄ 一錠当りの使用回数は 25 μ l の場合で約 30 回、50 μ l の場合では 10 回、100 μ l では 5 回程度であり、多数回使用では分析値の変動が大きかった。

酸濃度は 1 規定前後で最高値を示し、2 規定以上ではブランク値が高く測定出来なかった。

試料溶液を滴下した時発生する水分が分析計に送られ測定値が変動するため、還元セルの出口に約 20 g の過塩素酸マグネシウム乾燥管をそう入して水分を捕集した。使用限度は注入量によって変わるが 25 μ l 注入の時 100 回程度は充分使用可能であった。

3. 空気流量の影響

発生した水銀蒸気を測定セルに送りこむための空気の流量について検討し 10 回繰返し測定した結果を Fig. 4 に示した。水銀還元時に発生する水素は注入量の増減に

よっても影響はなく、空気流量約 1.0 l/min で一定の吸光度が得られた。流量が多くなると感度の低下が見られた。また、流量が少なくても感度が低くなった。これらは、流量の多い時は水銀蒸気が希釈されるためと考えられるが、少ない時は分析セルに送りこまれる水銀蒸気の量が少なく時間がかかるためと思われる。またベースラインに戻る時間も長くなり、テーリングも見られた。

4. 検量線の作成

Fig. 5 に本法による MMC の測定時の水銀のピークを示した。濃度に比例しており、マイクロピペットによる注入量の誤差も少なかった。標準溶液より各濃度に希釈したものを調製し、10 回ずつ測定して検量線を作成し、Fig. 6 に示した。2—10 ng/ml までは 100 μ l、20—100 ng/ml までは 25 μ l を注入した。各検量線共 0.2—1.0 ng/100 μ l および 0.5—2.5 ng/25 μ l で直線性が得られた。MMC 40 ng/ml における 10 回繰返し実験による変動係数 (C.V.%) は 2.1% であった。

5. 回収率

生体試料としてイカ(頭足類)の胴部を用いて、MMC の一定量を添加して回収率を求めた結果を Table II に示した。本法による回収率は 95—98% で、変動係数は 2.1—3.3% であった。

6. 本法と ECD-GC 法による比較定量

駿河湾産のイカについて部位別(胴, 足, 肝臓)に分けたものを 2 種類の分析法で同時分析し比較した結果を Table III に示した。両分析法ともよく一致した結果が得られた。また有機水銀濃度は胴部分で 0.0192 ppm, 足部で 0.0204 ppm と両方とも差はほとんどなく、肝臓中では 0.0292 ppm と、他の魚類と同様肝臓が高い値を示した。

Fig. 5. Variation in Absorbance of MMC in 1 N HCl Solution with 1% Fe (III)
Sampling volume 100 μ l (recorder range 10 mv).

Fig. 6. Calibration Curve for Methyl Mercury
(1): sampling volume 25 μ l (recorder range 20 mv).
(2): sampling volume 100 μ l (recorder range 10 mv).

TABLE II. Recovery of Organic Mercury added to Squid Tissue

Sample	Alkyl mercury ^{a)} added (μ g Hg)	Determination found (μ g/Hg)	Mean	Recovery (%)	CV (%)
Squid (Ika) 1 g	0	0.0180	0.0183		3.3
	0	0.0190			
	0	0.0175			
	0	0.0188			
	0.0200	0.0379	0.0375	95	2.1
	0.0200	0.0362			
	0.0200	0.0383			
	0.0200	0.0374			
	0.0500	0.0659	0.0675	98	2.7
	0.0500	0.0704			
	0.0500	0.0659			
	0.0500	0.0681			

a) Methyl mercuric chloride was a representative of organic mercury.

TABLE III. Comparison of the Determination Values with Two Quantitative Methods

Sample (Squid)	Reducing cell-atomic absorption method MMC (ppm)	Gas chromatography (ECD-GC) method MMC (ppm)
Body	0.0185	0.0185
	0.0190	0.0193
	0.0205	0.0199
	0.0183	0.0189
	$\bar{X}=0.0190$	$\bar{X}=0.0192$
Foot	0.0210	0.0206
	0.0199	0.0189
	0.0208	0.0199
	0.0200	0.0190
	$\bar{X}=0.0204$	$\bar{X}=0.0196$
Liver	0.0279	0.0285
	0.0298	0.0293
	0.0306	0.0288
	0.0285	0.0291
	$\bar{X}=0.0292$	$\bar{X}=0.0289$

要 約

生体中の有機水銀の定量方法の改良を目的として、 NaBH_4 錠剤上に第二鉄塩を1%含有した、塩酸酸性の有機水銀水溶液を滴下して還元するための簡易な還元装置を開発し、冷原子吸光法で定量する方法について検討をおこなった結果を述べる。

1. 有機水銀 (MMC) 含量 0.2 ppm 溶液を用いた場合、第二鉄塩の濃度は1%以上で一定値を示した。

2. 本法による測定では MMC として 40 ng/ml における10回繰返し実験での精度は変動係数 2.1%で、生体試料からの回収率は95—98%であった。

3. 生体試料としてイカを用い、3部分に別けて有機水銀濃度を本法による原子吸光法とガスクロマトグラフィー (ECD 付) の二つの分析法で定量した結果、両法とも誤差範囲内でよく一致した結果が得られた。また、駿河湾産のイカの水銀濃度は肉部で 0.0192 ppm、肝臓で 0.0292 ppm と肝臓の方が 0.01 ppm 程高い値を示した。

謝辞 終りに臨み、本研究に際して試料 (イカ) の提供を頂いた、かね五水産株式会社社長小林長一氏に深謝いたします。

引用文献および注

- 1) 日本薬学会編, 衛生試験法注解, 金原出版, 1980, p. 59.
- 2) ^{63}Ni を線源とする検出器を有する機種.
- 3) 藤永太郎編, トレースアナリシス超微量分析の新設計, 化学同人, 1978, p. 171.
- 4) ガスクロマトグラフィーによる環境分析, (株)日本環境測定分析協会編, 1976, p. 75.
- 5) 能勢和夫, 日本農薬学会誌, **4**, 137 (1979); 三谷一憲, 衛生化学, **22**, 65 (1976).
- 6) L. Magos, *Analyst*, **96**, 847 (1971).
- 7) 水沼博司, 森田秀芳, 桜井 弘, 下村 滋, 分析化学, **28**, 695 (1980).
- 8) T. Inui, S. Terada, H. Tamura, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **305**, 189 (1981).
- 9) 三橋隆夫, 森田秀芳, 下村 滋, 分析化学, **27**, 666 (1978).