水銀中毒に関する研究

1. 生物材料中の微量水銀の測定法紫外吸収法の改良法について

山口 誠 哉*

EXPERIMENTAL STUDIES OF MERCURY POISONING

1. MICRODETERMINATION OF MERCURY IN BIOLOGICAL MATERIALS BY MODIFIED ULTRAVIOLET ABSORPTION METHOD.

Seiya YAMAGUCHI

A method for the microdetermination of mercury in biological materials is presented.

The original method reported by the author was modified at the final step of the measurement. Organic substances in urine, blood and feces were destroyed by adding nitric acid, sulfuric acid and potassium permanganate and by heating at 70°C for a short time, and mercury there in was extracted by a dithizon chloroform solution. Mercury dithizonate evaporated at the bottom of a test tube at 60 to 70°C was destructively heated

in a gas chamber, and then mercury vapor being carried by 2l/min air flow was measured in Beckman Kruger mercury vapor meter at 2437 Å extinction of pure ultraviolet light. Electrical potential obtained by mercury Vapor meter was amplified and registered by a galvarecorder giving the mercury curve automatically. The area of the curve of a known mercury amount measured by a planimeter was used for the calibration of readings.

The method was found to be suitable for assessing 0.02 to 2.0 µg of mercury.

水銀は、現在でも主なる職業性毒物の一つであり、水銀作業に従事している作業員も少なくない。生体内における水銀代謝の研究は、従って水銀中毒の本態解明や、その予防及び治療に大きい寄与をなすものであり、ひいては環境内水銀量、水銀摂取量についての限界や許容量を、さらに確実に知るのに役立つものである。

著者は、そのための手段としての生物材料中の微量水銀の測定法を発表し、1,2) さらにこの方法は Jacobsら^{3,4)}によって発展的に研究され、これらは現在、最も信頼性の高い方法であると思われる。

その原理は、水銀を Dithizon にて捕集したのち、

加熱、蒸気化し、それを一定の流速にて紫外吸収測定器の中を流し、その時の紫外吸収によって、水銀蒸気濃度を測定しようとするもので、山口^{1,2)}は、水銀蒸気測定器のメーターのピークの読みをとり、Jacobs³⁾は、ピークの読みと時間により、面積として算出せんとした。

この方法の利点は、つぎの如く考えられる。

1. 比色法、分光測定法の欠点である銅をはじめとする種々の妨害金属の存在があっても、この方法にては特定紫外外部吸収がおこらないかぎり、測定精度には無関係である。

2. 検体が少量で足りるので、測定感度があまり鋭敏でない方法において生ずる如き、多量の試薬処理に際して混入する汚染を防止することができる。

3. 紫外吸収法にては、測定手技が簡単であるので、ことさらの熟練を要しない。

*九州大学医学部衛生学教室(主任:猿田南海雄教授)昭和38年5月23日受付、普通掲載

* From the Department of Hygiene (Director: Dr. Namio Saruta), Faculty of Medicine, Kyushu University, Fukuoka. Received for publication, May 23, 1963

4. 比色分光法に際して、往々見られる Dithizon の酸化による色調の変化も、この方法においては無関係である。

5. 検体が少量でよいので、灰化が簡単、かつ短時間に行えるし、他の物質による汚染の心配も少ない。

図1 水銀検量線(Jacobs, Yamaguchi) Standard curve

しかし、山口及び Jacobs の原法は、以上の如き利点を有し、従来の比色法にくらべ、はるかに優れていると思われるが、図1の如く、標準線を画く場合、直線にならず、また加熱、気化する場合に、加熱法及び試験管内燃焼の仕方によって、メーターのふれが正規のカーブをとらない場合があり、図2の如き場合には、原法による読み取り式では目的を達せられない場合がある。

図2 水銀の紫外吸収カーブ
Ultraviolet absorption
of mercury vapor

そこで、それらの欠点をあらため、さらに正確な測定を行うために改良を加え、良好な結果を得たので、ここに発表する次第である。

この改良法においては、とくに測定の最終段階において、新しい方法がとられており、紫外吸収測定器における電位差を、自記ポラログラフ附属の増幅器にて増幅し、それをグラフに自記させるもので、これにより、紫外吸収電位差が詳細にカーブとして画かれ、前図2の如きカーブの乱れがあったとしても、これをプラニメーターに面積を実測し、それによって標準線を直線として作製することができるものである。

試薬及び器具

1. 特級過マンガン酸カリ水溶液 6%
2. 特級硫酸
3. 特級硝酸

これらの酸は盲検を行い、もし汚染を見ている場合は、初溜を捨てて蒸溜したものを使用した方がよい。

4. 塩酸ヒドロキシルアミン水溶液 20%
Sandell の法に基づいて精製する。

5. デチゾンクロロホルム溶液 10mg/L
特級デチゾン試薬を蒸溜クロロホルムにて溶解する。

6. Beckman Kruger Mercurg Vapor Meter

7. Yanagimoto Galvarecorder No.108
8. 流量計
9. 吸引ポンプ

吸引ポンプは、空気を一定流速に保つようなものでなければならない。良好なカーブを

図3 水銀測定装置図
Diagrammatic sketch of the apparatus

写真1 Beckman mercury meter

写真2 上 Galvarecorder 下 Gas chamber Gas 燃焼室

画くためには、約 2 L/min の速度が望ましい。測定装置は図3及び写真1、2に示す。

測定手技

まず原法^{1,2)}に従って、標準水銀溶液を作製し、これをデチゾンクロホルム溶液にて抽出し、法に従って標準線を作製する。この方法による水銀濃度の測定可能範囲は、第1段測定で0.02 μ gから0.2 μ g、第2段測定で0.4 μ gから2.0 μ gである。

1. 生物材料の灰化

尿は比重を測定した後に、25ml から50ml をとり、50ml の場合は、4 ml の H_2SO_4 、 HNO_3 の等量混酸と6% KMnO_4 5 ml 溶液を加え、よく振って、室温に放置する。もし急ぐ時は、60~70°Cにて、ごく短時間加熱し、灰化を促進する。6% KMnO_4

溶液が消失する場合は、黒褐色の沈澱が残るようになるまで追加せねばならない。上澄が澄明かつ微紅色になり、黒色沈澱が消失しないようになったら、灰化は完了したと見てよい。しかる後に、塩酸ヒドロキシアルミンを滴下し、検液を無色透明にする。

血液は1 ml をとり、約30mlの蒸溜水に溶かし、まず2 ml の硝酸を加えてよく振り、ついで2 mlの硫酸及び5 mlの6% KMnO_4 溶液を加え、60~70°Cにてごく短時間数回加熱する。もし6% KMnO_4 溶液が消失する場合は、さらに追加し、上澄が微紅色透明になるのを待つ。ついで塩酸ヒドロキシアルミンを滴下脱色し、微細な浮遊物がある場合は、濾過し、稀硫酸(約0.25N)にて濾紙を洗い、検液にあわせ測定に用いる。加熱がながびくと、水銀の損失がおこるので注意を要する。

尿は、よく混和したのち、約1 g をとり、正確に秤量したのち、まず2mlの硝酸を加え、液化させる。もし液化しない場合は、さらに硝酸を加え液化させるが、時に繊維類が最後まで残ることがある。ついで、これを30ml の蒸溜水にて稀釈し、2ml の硫酸と5 mlの6% 過マンガン酸カリ溶液を加え、灰化完了した場合は、塩酸ヒドロキシアルミンにて脱色し濾過する。

2. 水銀の抽出

200~300ml の分液ロートに、灰化完了した液体を入れ、さらに蒸溜水にてよく洗って合し、全量を約150ml にする。そのまま、よく振って空気を抜き、(よく振らないと、デチゾンが酸化しやすい) デチゾンクロホルム液を5 ml 加える。これを振盪器にかけ2~3分間振り、分層した後、0.25N硫酸水30ml を入れた別の分液ロートに移し、さらにもう一度デチゾンクロホルム液5 ml を加えて振り、その分液ロートにあわせる。さら

図4 既知濃度水銀の紫外吸収
Mercury curve

図5 第一段水銀検量線
First range calibration curve

(30)

図6 第二段水銀検量線
Second range calibration curve

に1～2 mlの蒸溜クロロホルムで、もとの分離ロート
を洗い、分離液にあわせる。そして、これを全部硬質ガ
ラス製試験管に移し、さらに2 mlのクロロホルムにて
残った液を洗い出して、試験管にあわせる。

3. 測定

Mercury dithizonate を含むデチゾンクロロホルム
液を入れた試験管に、少量のよく洗った沸石を入れ、
70°Cの温浴にてクロロホルムを揮発させ、試験管の外
側の水滴をよく拭って測定に用いる。

一定ガス圧にて燃焼するガス室に入れ、試験管底を急
激に、まんべんなく熱する。2 L/minの流速で流れる
空気は、試験管よりの蒸気を伴い、脱脂綿管をとおり、
Mercury Vapor Meter に導かれ、ここで紫外吸収を
おこし、記録計は、図4の如き吸収カーブを自記する。

4. 水銀量の計算

水銀吸収カーブを Planimeter にて測定し、面積を
算出する。ついで、あらかじめ既知濃度の水銀にて測定

した表1、2の如き面積と図5、6の如き標準線にあて
はめて、水銀の量を見出す。この際、試薬中の水銀汚染
はあらかじめ測定しておいて、実測値よりさし引かねば
ならないことはもちろんである。

尿50mlを用いた場合は、1 L尿中の水銀は、計算値
をAとすれば、 $A \times 20$ であるが、比重を計算に入れねば
ならない時は

$$A \times 20 \times \frac{24}{G} \quad (G \text{ は尿比重の最後の2桁})$$

として計算する。

血液、尿の場合は、水銀量を、それぞれ100倍すれば、
100ml、100g 中の水銀量を見出すことができる。

考 察

生物材料中の水銀の測定手技は、一般的に三つの段階
に分けることができる。第一は、有機物の灰化であり、
第二は、その中からの水銀の抽出法、第三は、抽出され
た水銀の測定である。

表1 First Range による水銀各濃度の面積
Area of Mercury Curve by First Range

N	Hg	0.025	0.050	0.075	0.100	0.125	0.150	μg 0.175
								cm^2
1	1.3	3.0	4.9	6.2	7.8	10.2	11.4	
2	1.2	3.1	5.3	6.5	9.0	9.4	12.5	
3	1.3	2.3	3.5	5.8	0.6	10.2	11.0	
4	1.2	3.4	5.0	6.1	8.0	9.8	11.9	
5	1.4	3.2	4.8	6.0	8.2	9.3	11.6	
Mean	1.2 ^s	3.0 ⁰	4.7 ⁰	6.9 ²	8.5 ²	9.7 ^s	11.6 ^s	

表2 Second Range による水銀各濃度の面積
Area of Mercury Curve by Second Range

N	Hg	0.5	0.7	0.9	1.3	1.5	1.9	μg 2.1
								cm^2
1	1.7	2.0	3.9	4.7	6.3	8.3	9.6	
2	1.4	2.6	3.2	5.5	6.8	8.9	9.9	
3	1.3	2.8	3.5	5.7	6.7	8.5	9.4	
4	1.3	2.5	3.5	5.3	6.5	8.5	9.6	
5	1.5	2.3	3.4	5.3	6.7	8.6	9.7	
Mean	1.4 ⁴	2.4 ⁴	3.5 ⁰	5.3 ⁰	6.6 ⁰	8.5 ⁶	9.6 ⁴	

まず、有機物の灰化とその程度が、水銀の回収率とどんな関係にあるか、我々の関心をそそるのであるが、Cholack, Hubbard⁵⁾及び Barrett^{6,7)}は、強酸による加熱と過マンガン酸カリによる灰化促進をはかっている。Laug, Nelson⁸⁾は、加熱による水銀の損失を防ぐために、還流冷却管を用いたけれども、Simonsen⁹⁾は、これらの加熱処理による水銀の損失を強調し、冷却管を用いても、2時間の沸騰加熱によって25%の損失が見られたといっている。

一方、Monkman, Maffet¹⁰⁾及び Dohertyは、過マンガン酸カリと硫酸を混合して、一夜放置し、室温による尿の湿式灰化をはかり、Miller と Swanberg¹¹⁾も、室温による湿式灰化をはかり、加える薬品としては、過酸化水素水、塩化鉄及び硫酸クロームカリを用いている。そして、Campbell 及び Head¹²⁾は、これらの室温湿式灰化法を検討し、尿の灰化には、過マンガン酸カリと硫酸による湿式灰化を推奨している。

著者及び Jacobs の方法にては、いずれも過マンガン酸カリと硫酸による湿式灰化が行われているのであるが、改良法においては、血液、尿の灰化に際し、あらか

じめ硫酸によって有機物を液化し、しかる後に、過マンガン酸カリ及び硫酸にて灰化を促進しており、このことは、最初に硫酸を加えることによっておこる蛋白質の凝固、炭化を防いで、その後の灰化をすすめる上に甚だ有効であると思われる。もちろん、この方法による灰化の程度及びそれによる水銀の回収率の検討もなされねばならない。そして前報においては、正常尿に水銀を加えた場合の、灰化後の回収率の非常に良好なことを見ており、また今回は、有機物の灰化過程における、上澄液微紅色澄明、黒褐色の沈澱という指標が灰化完了の目安として正しいか否かについて、二、三の実験を行ってみている。そして表3に示す如く、かかる指標以後の水銀の回収量は一定であり、これ以上の灰化は、必要ではないことを示している。Jacobs¹³⁾は、ミルク中の砒素を測定する場合、完全に灰化する必要はないといい、Nobel¹⁴⁾もまた、尿中水銀測定に際し、有機物の完全灰化は必要ではないといっている。上記の指標によって、まだどの程度の有機物が分解されないで残っているか不明ではあるが、水銀回収に関しては、その程度の灰化で充分であると考えらる。

表3 Recovery of Mercury in Urine at Each Time after Cold Digestion
(microgram of Hg) (Room Temperature 18~23°C)

Time Passed Sample	immediatly after	End of First day	Second day	Fourth day	Sixth day
normal urine 50mI	impossible due to organic sub.	0.15	0.18	0.28	0.24
normal urine 50mI+0.57Hg	do	0.40	0.52	0.82	0.75
urine findings	turbid	slight turbid yellowish	almost clear slight yellowish	clear supernatant pinky	clear supernatant pinky

つぎに、第二段の測定手技として、水銀の抽出法が問題になって来る。まず、一般に行われる手段は、デチゾンによる分離であり、強い酸性で、他の金属との分離をはかっているものが多い。Hubbard や Cholak は、di- β -Naphthyl thiocarbazon を用いて水銀を分離して、好成績を得ているが、試薬の精製が困難である。Ballard, Thornton¹⁵⁾ は、硫化カドミウムによるアスベスト板を用いての捕集を試みているが、捕集能力に多少難点があり、2~3回くりかえして捕集しなければならないことが繁雑である。Barrett, Laug 及び Nelson は、ブロムカリを用いて水銀を捕集し、最後はデチゾンにて分光測定しているが、デチゾンが酸化分解しやすいのが欠点である。

最後の第三段階の測定手技においては、水銀そのものの定量が行われねばならない。この方法としては、Dithizon 及び di- β -Naphthyl thiocarbazon の比色分光測定が行われ、Barrett, Campbell 及び Johansson¹⁶⁾ らの方法が推奨されている。そして最近にいたって、Monkman, Lindström¹⁷⁾、山口、Jacobs らによって、紫外吸収法が応用されるに至った。この段階における紫外吸収法の利点は、すでに前報においてのべられている如く、非常に簡単であり、妨害物質や Dithizon の変質による誤差をさけることができ、しかも、きわめて鋭敏であるので、今後、ますます活用されるのではないと思われる。

結 論

この方法は、著者がさきに発表した紫外吸収法による微量水銀測定法の改良法であり、かなり前法の欠点があ

らためられている。微量の水銀は、デチゾンにて抽出されたのち紫外吸収をおこし、その時の電位差を増幅して、自記式にカーブをえがき、その面積によって求める水銀量を測定せんとするもので、その精度は高く、しかも測定可能範囲は0.02 μ gから2.0 μ gまでで、かなり広いということができる。

猿田教授の御校閲を感謝する。

本研究研究費の一部として、昭和37年度文部省科学研究費（各個研究）が使用されたことを記して、謝意を表する。

本論文の要旨は、昭和36年10月、日本公衆衛生学会総会にて発表した。

文 献

1. 山口誠哉, 産業医学, 2, 3, 昭和35年
2. Yamaguchi, S. : M. D. J. (Philippines) 8, 558, 1959
3. Jacobs, M. B. et al. : Am. Ind. Hyg. Ass. J. 21, 6, 1960
4. Jacobs, M. B. et al. : Am. Ind. Hyg. Ass. J. 21, 276, 1961
5. Cholak, J. et al. : Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 18, 149, 1942
6. Barrett, F. R. : Med. J. Aust. 42, 411, 1955
7. Barrett, F. R. et al. : Analyst. 81, 294, 1956
8. Laug, E. P. et al. : J. Ass. Offic. Agr. Chem. 25, 399, 1956
9. Simonsen, D. G. : Am. J. Clin. Pathol. 23, 789, 1953
10. Monkman, J. L. et al. : Am. Ind. Hyg. Ass. Quart. 17, 418, 1953
11. Miller, V. L. et al. : Anal. Chem. 29, 391, 1957
12. Campbell, E. E. et al. : Am. Ind. Hyg. Ass. Quart. 16, 275, 1943
13. Jacobs, M. B. : Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 14, 442, 1943

第5巻 第6号の訂正

第5巻第6号（前月号）の記事中、つぎの箇所に誤植があったので、訂正するとともにおわび致します。

○ 43ページ 別表 わが国の許容濃度（33種）の（註）は、下記のごとく訂正します。

（註） *：経皮的に侵入し、全身的影響を起こしうる物質

**：本年度許容濃度値が変更された物質

***：本年度あらたに許容濃度値が定められた物質

○ 35ページ 勝沼晴雄・他による論文中、Fig. 2 と Fig. 4は、左右とりちがえて順序不同に掲載したのでおわび致します。