報 文

薄層クロマトグラフィー-原子吸光光度法による
玄米中有機水銀の定量法

能 勢 和 夫

農林水産省農業技術研究所病理昆虫部
(昭和 53 年 11 月 2 日受理)Determination of Organic Mercury in Rice by Thin Layer
Chromatography-Atomic Absorption Spectrometry

Kazuo NOSE

National Institute of Agricultural Sciences, Nishigahara, Kita-ku, Tokyo 114, Japan

The sample brown rice was powdered and soaked in 0.1 N hydrochloric acid then extracted with 0.1% dithizone chloroform solution. The organic mercury in the extract was separated by *tlc* with hexane-chloroform (1+1), and then determined by atomic absorption spectrometry. Ninety eight percent as mean recovery was obtained from the brown rice added methylmercury in levels of 43 and 85 ppb. The minimum detectable limit was 5 ppb in the procedure that spent 8 g of brown rice in the final and gave 38 ng of Hg in the blank test. A few percent of inorganic mercury might be erroneously detected as organic mercury. The brown rice that yielded on the soil 12 years after being mixed with phenylmercury at the rate of 150 g Hg/a showed 25 ppb of organic mercury content, which was identified as phenylmercury by gaschromatography.

有機水銀のうちメチル水銀については分析例が多い¹⁾。分析法は主として塩酸性下でのベンゼン抽出、システイン-アセタート溶液への転溶、ベンゼンへの再抽出、ECD-GC から構成されている。抽出のさいの乳化が損失の大きな要因となっているので、試料をパパイで分解したのち連続抽出法によりベンゼンで抽出する方法²⁾や塩酸性下で水蒸気蒸留を行ない、留出液を直接アルカリ還元法で原子吸光光度法に供する方法³⁾なども報告されている。これらは魚肉など動物試料のために構成された方法で、有機水銀含量の低い玄米など植物試料に応用しても、ただちに十分な回収率が得られるとは限らない。また、総水銀は原子吸光光度法により有機水銀は GC 法によるとすれば、二つの装置を常に稼働状態にしておかなければならないので、多数試料を扱う場合に現場分析者の負担が大きい。そこで、ジチゾン溶液で抽出後薄層クロマトグラフィーによって有機水銀を分離し、硫酸-過マンガン酸カリウムにより分解後原子吸

光光度法で測定する方法を試み満足できる結果を得たので報告する。

方 法

1. 試 薬

- 1) 塩化メチル水銀：和光特級
- 2) 酢酸フェニル水銀：農薬用原体(昭和 27 年製)を、ベンゼンにより再結晶したもの。mp 148~149°C
- 3) 塩化メトキシエチル水銀：農薬用原体。mp 70~71°C

- 4) 薄層板：ワコーゲルプレート、

2. 装 置

- 1) 水銀計：ベックマン MV-253 型
- 2) ガスクロマトグラフ：島津 5 A (ECD, ⁶³Ni 線源)。20% DEGS/クロモソルブ W を内径 3 mm, 長さ 500 mm のガラス管に詰めたものを、160°C (メチル水銀) および 180°C (フェニル水銀) で窒素流速 60 ml/min で操

Fig. 1 Pen for *tlc* spotting.

作した。

3) *tlc* 塗布ペン: Fig. 1 に示す器具を試作して用いた。すなわち、抽出液を丸底フラスコに移して濃縮乾固したのち、ジクロロメタン約 0.8 ml を入れて溶かす。フラスコに毛細管部を装置し、水平に傾けて毛細管の先端を塗布位置に当てがい、中央の開口部を指で閉じると液は静かに上昇する。液が先端に達したら注意深く引いて塗布する。

3. 分析操作

1) 塩酸性抽出法

粉碎した玄米 20 g に 0.1 N 塩酸 100 ml を加え 1 夜放置する。0.1% ジチゾンクロロホルム溶液 50 ml を加え 30 分間振とうする。遠心分離し、クロロホルム相 20 ml をホールピペットにより分取し、これを減圧濃縮し最後に空気を送って乾固する。ジクロロメタン 2 ml を加え沈殿を溶解させて *tlc* 塗布ペンの丸底フラスコに移す。このさい、洗浄のためさらにジクロロメタン約 2 ml を使用する。ジクロロメタンを留去したのち、0.1% メチルイエロウジクロロメタン溶液 0.8 ml を加え内容を溶解させる。薄層板 (厚さ 0.25 mm, 200×200 mm) に 2.3) のとおり塗布する。両端にもメチルイエロウジクロロメタン溶液を目印として塗布する。ヘキサン-クロロホルム (1+1) を用いて約 15 cm 展開する。メチルイエロウの黄色を境界として、これを含めその下端から上部へ 30 mm 幅にかき取り、メタノール 50 ml を用いて溶出させる。メタノールを留去したのち、硝酸 5 ml、硫酸 2 ml を加えて加熱し、以下前報⁴⁾ のとおりに分解後還元気化法によりその Hg 含量を測定する。

2) 軟消化法

玄米 20 g に水酸化ナトリウム 12 g、水 100 ml を加えて溶解後 30% 過酸化水素水 5 ml を加え、28°C に 1 週間放置する。2 N 塩酸 15 ml と少量の 0.2 N 塩酸で pH を TB 試験紙で 2.0 付近に調節する。0.1% ジチゾンクロロホルム溶液 50 ml を加え、以下 3.1) と同様に操作する。

3) カラムクロマトグラフィーによる精製

0.1% ジチゾンクロロホルム溶液による抽出液 20 ml を濃縮乾固し、四塩化炭素 5 ml に溶解させる。内径 10 mm のクロマト管にシリカゲル (ワコーゲル S-1, 130°C

で活性化したもの) 0.5 g を湿式法で充填したカラムに四塩化炭素溶液を流し入れる。四塩化炭素 30 ml を流し、この区分は捨てる。つぎにジクロロメタン 50 ml を流して対象物を溶出させる。ジクロロメタン相を濃縮し *tlc* 塗布ペンに移し、以下 3.1) にしたがって操作する。

4) 有機水銀の同定 (GC 法)

検出限界値以上の有機水銀を認めた場合はジチゾン抽出液 20 ml を濃縮乾固し、これにヘキサン 20 ml とアセトニトリル 20 ml を加えよくふりまぜる。アセトニトリル相にはジチゾン錯体が含まれる。アセトニトリル相を取り分け、アセトニトリル 5 ml でヘキサン相を洗い、アセトニトリル相を合せる。アセトニトリル相を濃縮乾固し、ジクロロメタンを用いて *tlc* 塗布ペンに移し、3.1) にしたがって *tlc* にかける。ただし、この場合はメチルイエロウを試料溶液には添加せず両端に塗布するだけにする。両端の目印の下端から上部へ 30 mm 幅に *tlc* 板をかき取り、ジクロロメタン 50 ml を用いて溶出させる。ジクロロメタン相を濃縮乾固し、ヘキサン 1 ml に溶かしその 5 μ l を 2.2) の操作条件でガスクロマトグラフに注入する。

結果と考察

1. 空試験値

塩酸性抽出法 (3.1)) の手順は Fig. 2 のとおりで

- ① Soak 20 g of powdered rice into 100 ml of 0.1 N HCl
- ↓
- ② Allow to stand overnight
- ↓
- ③ Add 50 ml of 0.1% dithizne chloroform
- ↓
- ④ Agitate for 30 min
- ↓
- ⑤ Separate by centrifuge
- ↓
- ⑥ Evaporate to dryness (each 20 ml of chloroform phase)
- ↓
- ⑦ Dissolve into 0.8 ml of 0.1% methyl yellow dichloro-methane
- ↓
- ⑧ Spot on *tlc* plate
- ↓
- ⑨ Develop with hexane-chloroform (1+1)
- ↓
- ⑩ Scratch by 30 mm width from tail of methyl yellow band to upperward
- ↓
- ⑪ Elute with 50 ml of methanol
- ↓
- ⑫ Evapolate to dryness
- ↓
- ⑬ Digest with H₂SO₄-HNO₃ and KMnO₄
- ↓
- ⑭ Determinate Hg under acid condition by atomic absorption spectrometry

Fig. 2 Procedure for determination.

Table 1 Blank value (Hg ng) for the procedure.

	Detected value	mean
A ① through ⑭	45, 31	38
B ① to ⑭ without ⑦ to ⑫	92, 140	116
C ⑬ and ⑭		14
D ⑥ through ⑭		62
E ⑥ to ⑭ without ⑦ to ⑫	170, 193	181

ある。各操作において生じた空試験値は Table 1 のとおりである。消化 ⑬ と測定 ⑭ だけでも 14 ng の Hg が検出されている (Table 1C)。これに関係する試薬は硫酸 2 ml, 硝酸 5 ml, 過マンガン酸カリウム 0.3 g, 塩化第一スズ 0.1 g などであるが、後二者の影響が大きい。

tlc 操作 (⑦~⑫) は有機水銀の分離を目的としているが、これを省略すると 116 ng と高い空試験値を示す。さらに、0.1 N 塩酸との振とう (①~⑤) を省略すると 181 ng のようないっそう高い空試験値を示し、この操作が無機水銀の排除にいくぶん寄与していることがわかる。全操作での空試験値は 38 ng (Table 1A) であり、C との差はジチゾンおよび *tlc* 操作に由来するものと思われる。

2. 標準試薬の検定

tlc 法の信頼性を確かめる目的で標準試薬を *tlc* 操作にかけた。標準試薬中の総水銀と *tlc* により分離される水銀の割合は Table 2 に示すとおりである。溶解直後の新鮮な塩化メチル水銀水溶液 (酢酸に溶かしてから薄めた) では 99.4% が有機水銀として検出された。これは、*tlc* 操作の回収率が十分であるとともに試薬の純度も十分であることを示す。溶解後 (硝酸に溶かしてから薄めた) 4 年を経過した水溶液では、総水銀の 59% が有機水銀として検出されたにすぎず、冷蔵庫内保存中に無機化が進行したことを示している。

本法によれば酢酸フェニル水銀溶液では、その総水銀の 75% だけが有機水銀として検出されている (Table 2)。この原因が標準品の純度にあるのか、本法の回収率

の悪さにあるのかを確かめるために、ベンゼンで展開する *tlc* 法により、標準品の純度を確かめた。標準品を酢酸 1 ml に溶かし水で 50 ml に薄めて 200 ppm (Hg とし) て溶液とする。その 1 ml にベンゼン 10 ml を加えて振とうし、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水後上澄液 40 μ l を *tlc* 板に塗布し、ベンゼンで展開する。別に濃厚液を用い酢酸フェニル水銀の *Rf* 0.85, 酢酸水銀の *Rf* 0.0 (原点) を 0.1% ジチゾン四塩化炭素液の噴霧により確かめた。*Rf* 0.55~0.95 の部分をかきとり、0.1% ジチゾンクロロホルム+ジクロロメタン 10 ml とともに振とうして抽出し、溶媒留去後硫酸分解を行なってから原子吸光光度法により Hg を測定する。その結果、総水銀の 77.8% が有機水銀として検出された。両結果の一致は比較的良好なので、両方法に対する信頼性は高いと考えることができよう。この標準品は製造後の期間が長く、経時変化により生じた不純物が再結晶によっても除去できなかったものと思われる。

3. 回収率

有機水銀を水溶液にして玄米に添加した場合の回収率は Table 3 に示すとおりである。溶かしたばかりのメチル水銀水溶液では 43 ppb および 85 ppb (Hg とし) になるように添加した場合の回収率は塩酸酸性抽出法 3. 1) で平均 98% であった。調製後 4 年を経過した水溶液では添加濃度 70 ppb に対しては低い値となるが、2. に記したようにこの水溶液には保存中の変化により有機水銀が 59% しか含まれていないので、この値により補正した期待値に対しては良好な回収率となっている。また、この水溶液では 41% が無機水銀の形体で存在していると考えられるが、この程度の混入では有機水銀の測定値に影響していない。しかし、多量に無機水銀が存在する場合は影響を免がれず、塩化第二水銀 838 ppb の添加で約 2% が有機水銀として測定されている。通常玄米中の総水銀は 100 ppb 以下であるから、無機水銀の影響は 2 ppb 以下となり空試験値にくらべ無視できる程度とすることができる。

フェニル水銀の回収率は塩酸添加後の放置時間によって差があり、*tlc* 操作による補正值に対して、20 時間で 79%, 48 時間で 64% となっている。山田⁵⁾ は酢酸フェニル水銀が 0.3 N 塩酸中 36 時間で 74% も分解することを報告している。0.1 N 塩酸浸漬中に分解の起こるおそれがあるので長時間の放置は避けるべきであろう。

4. *tlc* とカラムクロマトグラフィー

ヘキサン-クロロホルム (1+1) で展開したメチル水銀、フェニル水銀、メトキシエチル水銀、無機水銀 (II) とジチゾンとの錯体およびメチルイエロウの *tlc* の *Rf*

Table 2 Analysis of standard solution by *tlc*.

	% of organic mercury in total mercury
A methylmercuric chloride solution, immediately after dissolution	99.4
B methylmercuric chloride solution, 1539 days after dissolution	59.0
C phenylmercuric acetate solution, immediately after dissolution	75.0

Table 3 Recovery of organic mercury from rice.

Compound	Added solution	Level (ppb)	Expected value (Hg ng in 8g of rice)	Detected value (Hg ng in 8g of rice)	Mean recovery (%)	Method
Methyl-mercuric chloride	A	42.6	341	321	94.1	3.1
		85.2	682	690	101	3.1
	B	70.0	330	291, 317 340, 323	96.3	3.1
				323, 308	95.6	3.1+3.3
				307, 308 339, 338	97.9	3.2
				308, 309	93.5	3.2+3.3
Phenyl-mercuric acetate	C	124	635	407	64.1	3.1, but standing period ② were 48 hr
				503	79.2	3.1, but standing period ② were 20 hr
mercuric chloride		834	6700	150	2.2	3.1

Meanings of A, B, C are same as in Table 2. Expected values of solutions B and C were calculated on the results of Table 2. Method 3. 1) is shown in Fig. 2. A weak digestion by NaOH-H₂O₂ in advance of the extraction is carried out in 3. 2). The method 3. 3) represents silica gel column chromatography in advance of *tlc*.

Table 4 Silica gel column chromatography of methylmercuric dithizonate.

Water content of silica gel (%)	0	2	5	10	15	20
CCl ₄ (ml)	30	30	30	50	75	25
Eluted Hg (ng)	0	0	1	0	5	0
CH ₂ Cl ₂ (ml)	25	50	25	25		25
Eluted Hg ng	613	727	598	512		83

Expected Hg ng is 423 and 718 for methylmercury and total mercury, respectively. A 0.5 g of silica gel was used. First CCl₄ was eluted, then CH₂Cl₂. In the column packed with the silica gel containing 5% of water, 150 ml of CCl₄ was eluted and then 25 ml of CH₂Cl₂.

値はそれぞれ 0.47, 0.35, 0.48, 0.19 および 0.33 で、無機水銀と有機水銀はメチルイエロウを境界にして分離することができる。

玄米ではカラムクロマトグラフィーを *tlc* の前に行なっても、行なわなくてもほぼ等しい測定値が得られる (Table 3) ので、省略できる。しかし、油分の多い場合や動物試料では必要になることも考えられるのでその条件について検討した (Table 4)。四塩化炭素 30 ml で洗浄後、ジクロロメタン 50 ml で溶出させれば、シリカゲルの水分 5% までは定量的に有機水銀を捕捉できる。

5. 検出限界

空試験値 38 ng を検出限界とすれば、玄米 8 g に対し 5 ppb が検出限界となる。

Table 5 Mercury content in brown rice.

Location	Harvested year	Total Hg ppb	Organic		Method
			Hg ng/8g of rice	Mean ppb	
Shonai	1971	26	55, 70	8	3.1
			42, 42, 97	8	3.2
Kumamoto	1977, n	12	0	<5	3.1
	1977, e	26	39, 32	<5	3.1
Konosu	1977, control	11	64	8	3.1
	1977, 30 g/a	34	212	27	3.1
	1977, 150 g/a	31	203	25	3.1

In Kumamoto n represents the field where any mercury fungicide had never been applied because of the blast-freecast, and e represents ordinary field. In Konosu 30 g/a and 150 g/a are rates in which phenylmercuric acetate was mixed into the soil 12 years ago.

6. 測定例

昭和46年度庄内(山形)産, 昭和52年度熊本産および昭和52年度鴻巣産玄米中の総水銀および有機水銀の実測値は Table 5 に示すとおりである。直接塩酸酸性抽出と強アルカリ-過酸化水素水による軟消化後塩酸酸性抽出とではほぼ同一の値を与えており, また回収率 (Table 4) もほぼ等しいので, 長時間を要する軟消化法を行なう必要はないと思われる。

鴻巣産では昭和40年に酢酸フェニル水銀 30 g/a および 150 g/a を土壌に混入した圃場の52年産玄米から 27 および 25 ppb の有機水銀が検出された。酢酸フェニル水銀の土壌混入とは無関係な鴻巣の土壌産の玄米および46年度庄内産玄米にはほぼ同じ程度の微量の有機水銀が検出された。

7. 有機水銀の同定

有機水銀が検出された鴻巣対照区および酢酸フェニル水銀 150 g/a 区のジチゾン抽出液について 3. 4) および 2. 2) の方法で GC による確認を行なった。

ガスクロマトグラム上メチル水銀のピークに一致するピークは認められなかった。メチル水銀の塩類は, 担体を塩酸で処理した分離カラムを使うかぎり, 塩化メチル水銀に一致する単一のピークをガスクロマトグラム上に与える⁶⁾。メチル水銀のジチゾン錯体の場合は, 溶媒ピークに続いてジチゾンに由来する大きなピークが現われるので定性には問題がある。しかし, ジチゾンの幅広いピークの上に鋭いメチル水銀由来のピークがみられるので定性的な確認なら可能である。ただし, メチル水銀のピークは溶媒ピークの近くに現われるので, 類似のピークを示す夾雑物との見分けが困難であることは注意すべきである。

Fig. 2 操作 ⑫ までの試料をヘキサン 1 ml に溶かしその 5 μ l を 2. 2) の条件の GC に抽入した結果は Fig. 3 の I のとおりでわずかにフェニル水銀の存在が認められる。tlc 操作をもう一度くり返した結果は II のとおりで, 全体のノイズレベルは下がってくるがフェニル水銀の存在はかえって確認できなくなった。有機イオウ化合物の妨害を亜硝酸処理により除去する方法を山田⁷⁾が報告しているので, これに準じて行なった結果は III のとおりで, フェニル水銀の確認は可能であるがノイズのレベルが大きくなっている。一は注入時の基線の高さを示しており, I, II, III ではその高さを揃えて作図した。↓ はフェニル水銀の現われる位置で, 日によって多少異なっている。

IV は 3. 4) にしたがって精製したもので, この場合が最もよいガスクロマトグラムを与えている。すなわ

Fig. 3 Gaschromatogram of rice extract with 0.1% dithizone chloroform.

The rice yielded on the field that phenylmercury had been mixed with the soil in the rate of 150 g/a 12 years ago.

The rice extract was cleaned up by tlc once (I), twice (II), and then treated with HCl-NaNO₂ (III). Both extracts from the rice and the control, (IV) and (V) respectively, were cleaned up by the partition between hexane and acetonitril after tlc.

↓ shows the peak position of phenylmercury and — shows the level of base line at the injection time.

ち, tlc 操作後ヘキサン-アセトニトリルによる精製が最も有効であると思われる。V は対照区の玄米に関するもので, フェニル水銀の相当位置にはピークが認められない。

以上により, 12年前酢酸フェニル水銀を 150 g/a の割合いで土壌に混入した水田から収穫した玄米に検出された有機水銀 (25 ppb) はフェニル水銀と推定される。

8. 種子消毒の影響

種籾をウスブルン消毒後芽出しをした移植時(稚苗)

Table 6 Change of total mercury content in rice plant.

Parts	Stage of growth	Hg in rice plant (ppb)		
Seed				(8)
Leaf	Seedling	7.2×10^2		(6.5×10)
Root	Seedling	2.6×10^4		(2.0×10^2)
	Days after plantation	control	30 g/a	150 g/a
Leaf	40	9.2×10	1.5×10^2	1.8×10^2
Leaf	70	3.6×10	4.5×10	7.6×10
Leaf	110	5.4×10	7.2×10	7.2×10
Chaff	110	4.6×10	3.4×10	4.2×10

Seeds were treated with Uspulun, but numerals in parentheses are on the plant not treated with the disinfectant. The rice was harvested 110 days after plantation. Mercury content of brown rice are shown in Table 5.

苗中および移植後稲体中の総水銀濃度の推移は Table 6 のとおりである。ウスプルン処理をしていない苗等の値を括弧内で示してある。種実(無処理)では 8 ppb にすぎないが、無処理でも茎葉 65 ppb、根 200 ppb が検出されている。これは培土に由来するものであろう。処理苗は茎葉で 11 倍、根で 130 倍も無処理苗より大きい値を示している。移植苗はすべて処理苗であるが、移植後茎葉中の水銀濃度はしだいに減少してゆくが、減少速度は酢酸フェニル水銀混入区で遅く、無混入区で速い傾向を示している。しかし、収穫時の籾がらでは混入区と無混入区でほとんど差はなくなっている。

昭和 46 年庄内産および昭和 52 年鴻巣(フェニル水銀無混入区)産玄米中の有機水銀(8 ppb)の同定は微量なため不可能であった。鴻巣産の場合、処理苗茎葉中 720 ppb および根中 26 ppm の大部分は吸収された有機水銀であるから、これが玄米中に 8 ppb 程度残存する可能性はある。ウスプルンの主成分メトキシエチル水銀は酸により分解しやすく、そのままでは抽出に際し 0.1 N 塩酸によって速かに消失するとするのが常識的であるが、この程度の微量が植物体内に存在する場合はどうであろうか。将来検討を要する問題と思われる。

要 約

1) 粉碎した玄米を 0.1 N 塩酸にけん濁し 0.1% ジチゾンクロロホルム溶液で抽出後、ヘキサン-クロロホルム(1+1)を展開液にしメチルイエロウを内標準とする tlc により分離し、分解後原子吸光光度法で定量する方法を、有機水銀の定量法として検討した。

2) メチル水銀の回収率は Hg として 43, 85 ppb 添加で平均 98% であった。

3) フェニル水銀の回収率は 124 ppb 添加で 79% (0.1 N 塩酸に 20 時間浸漬) であった。塩酸浸漬時間が長いと回収率がさがる傾向が見られ 48 時浸漬では 64% であった。

4) メチル水銀は水溶液中で無機化するようで、4 年間保存した標準水溶液から 59% だけが有機水銀として検出された。

5) 塩化第二水銀を 838 ppb 添加した場合その 2.2% が有機水銀として誤まって検出された。

6) 全操作での空試験値は 38 ng でこれを最小検出量とすれば、玄米 8 g を使用する場合本法の検出限界は、5 ppb となる。

7) 酢酸フェニル水銀を土壌に 150 g/a の割合で混入して 12 年後の水田から収穫した玄米中に 25 ppb (Hg とした) のフェニル水銀が検出された。

1977 年鴻巣産イネ体および玄米、熊本産玄米はそれぞれ農林水産省農事試験場病理第一研究室および熊本県農業試験場化学第二部からいただいたもので、調製にご尽力くださった両機関の皆様に厚くお礼申しあげる。

引 用 文 献

- 1) 近藤雅臣: 衛生化学 **20**, 47 (1974)
- 2) 田中克彦, 島田武憲, 福井昭三, 菅野三郎: 衛生化学 **18**, 256 (1972)
- 3) 三谷一憲: 衛生化学 **22**, 65 (1976)
- 4) 能勢和夫: 日本農薬学会誌 **1**, 87 (1976)
- 5) 山田忠男: 農業技術研究所報告 **C 24**, 180 (1970)
- 6) 千葉盛人・渡部欣愛: “公害分析指針(5) 水・土壌編”, 日本分析化学会関東支部編, 2-b, 29, 1972
- 7) 山田忠男: 農業技術研究所報告 **C 24**, 183 (1970)