

水銀分析マニュアル

平成 16 年 3 月

環境省

発刊にあたって

2003年2月に開催された第22回国連環境プログラム（UNEP）管理理事会には、「グローバル水銀アセスメント(Global Mercury Assessment)」が報告され、水銀の排出抑制に向けて今後国際的に採るべき行動に関する決議が採択された。

現在、先進諸国においては、水銀の低濃度曝露の影響に関心が集まっている。わが国にとって、魚介類は貴重な蛋白源であるのみならず、食文化の中心のひとつであり、魚介類摂取による水銀曝露の危険については科学的知見に基づいて慎重かつ迅速に対応することが求められている。低濃度曝露による胎児・乳幼児の発達への影響に関しては、南デンマーク大学が行っているフェロー諸島でのコホート研究や米国ロチェスター大学が行っているセーシェル共和国でのコホート研究につづき、わが国でも2002年からコホート研究が開始されている。

一方で、いまもなお世界各国で石炭火力発電所からの大気汚染、塩素・アルカリ工業プラントにおける水質汚染がつづいている。さらに、金鉱山を有する開発途上国においては、金精錬での水銀使用による汚染が深刻であり、汚染の状況の監視は急務となっている。

こうした状況のもと、国内外において、的確なリスク評価のために、総水銀のみならずメチル水銀をもより高精度に分析できる技術が求められるようになってきている。

「水銀分析マニュアル」は、これまでいろいろな場で示され、国際的にも高く評価されている分析法が、さらに広く実用に供されるよう、このたび、環境省として取りまとめられたものである。

策定会議の座長として、会議にご参加いただいたメンバーに謝意を表すると共に、本冊子が実用的な水銀分析マニュアルとして、日本はもとより世界中で広く利用されることを希望するものである。

平成16年3月

「水銀分析マニュアル」策定会議
座長 鈴木継美

「水銀分析マニュアル」策定会議メンバー

鈴木	継美	東京大学名誉教授（座長）
赤木	洋勝	国立水俣病総合研究センター特別研究員 （前国立水俣病総合研究センター国際・総合研究部長）
有村	公良	鹿児島大学医学部助教授
安藤	哲夫	鹿児島大学医学部助手
坂本	峰至	国立水俣病総合研究センター疫学研究部室長
佐藤	洋	東北大学医学部教授
永沼	章	東北大学薬学部教授
二塚	信	熊本大学医学部教授
松山	明人	国立水俣病総合研究センター主任研究員

目次

1 . はじめに.....	(4)
2 . サンプルング.....	(5)
2 - 1 環境試料	
2 - 1 - 1 生物試料 (魚介類)	
2 - 1 - 2 水試料	
2 - 1 - 3 底質・土壌試料	
2 - 1 - 4 植物試料	
2 - 1 - 5 大気・空気試料	
2 - 2 人体試料	
2 - 2 - 1 毛髪試料	
2 - 2 - 2 血液試料	
2 - 2 - 3 尿試料	
2 - 2 - 4 臍帯試料	
3 . 総水銀の分析法.....	(10)
3 - 1 湿式灰化 - 還元気化原子吸光光度法 (循環 - 開放送気方式) による定量	
3 - 1 - 1 生物試料 (魚介類、血液、尿、臍帯などの人体組織等)	
3 - 1 - 2 毛髪試料	
3 - 1 - 3 底質・土壌試料	
3 - 1 - 4 水試料	
4 . メチル水銀の分析法.....	(28)
4 - 1 ジチゾン抽出 - ECD - ガスクロマトグラフィー法による定量	
4 - 1 - 1 生物試料 (魚介類、血液、臍帯などの人体組織等)	
4 - 1 - 2 比較的高濃度の水銀を含む魚介類試料 (簡便法)	
4 - 1 - 3 尿試料	
4 - 1 - 4 底質・土壌試料	
4 - 1 - 5 水試料	
4 - 2 塩酸溶出 - トルエン抽出 - ECD - ガスクロマトグラフィー法による定量	
4 - 2 - 1 毛髪試料	

1 . はじめに

信頼性のある水銀分析データを得るためには、適切な試料採取、分析のための前処理はもとより、試料に適合した測定方法と試験溶液調製法を選び、それらについて十分に習熟し、自らの分析データの信頼性を確認しておく必要がある。また、分析を実施するに当たっては日常から実験室の清掃、換気、使用する器具、容器等の洗浄に努めるなど外部からの汚染防止に細心の注意が必要である。

水銀の影響評価や生体内および環境中における動態等の解明のためには、総水銀のみでなくメチル水銀を無機水銀と区別して定量分析する必要がある。本マニュアルでは、まずサンプリングについて述べたのち、総水銀及びメチル水銀の分析法について対象試料別に述べる。

なお、魚介類、水、大気、土壌（含有量、溶出量）等の水銀分析については公定法が、「魚介類の水銀の暫定的規制値について」（昭和 48 年 7 月 23 日付け環乳第 99 号厚生省環境衛生局長通知）、昭和 46 年 12 月環境庁告示第 59 号（水質汚濁に係る環境基準について）付表 1 に掲げる方法、「有害大気汚染物質測定方法マニュアル」（平成 11 年 3 月 31 日環大規第 88 号）、平成 15 年 3 月 6 日環境省告示第 19 号等によって定められている。公定法による分析が必要な場面ではそれぞれに適応した公定法を用いられたい。さらにそのほかにも水銀分析手法が報告されているが、いずれの分析方法を用いる場合でも、得られたデータについては標準試料を同時に測定するなど入念なデータの品質管理・品質保証が必要であることはいうまでもない。

現在、環境試料・人体試料などの分析値の品質管理・品質保証のために調製された標準試料が幾つかの機関、例えば NIST(Office of Standard Reference Materials, National Institute of Standard and Technology), IAEA (International Atomic Energy Agency, Analytical Quality Control Services), NRCC (National Research Council of Canada), NIES (National Institute for Environmental Studies)等から市販されているので必要に応じて利用されたい。

2. サンプリング

2-1 環境試料

2-1-1 生物試料（魚介類）

人体へのメチル水銀曝露の殆んどが魚介類の摂取を介してのものであるので、その地域の人がよく食べる魚介類によるモニタリングは人間集団の曝露の評価に適している。また、魚肉中水銀の殆んどがメチル水銀の形態で含まれているため、人体へのメチル水銀取り込み量の推定を総水銀の測定値を用いて行っても差し支えない。但し、非常に高い値が出た場合や、肉質中の総水銀中に占めるメチル水銀の割合が必ずしも一定していない鯨肉や内臓等ではメチル水銀の測定も必要となる。

採取した魚介類は、採取日時、場所、種、雌雄、年齢等を記録し、体重、体長等を測定しておく。魚類は可食部 10 - 20 g を採取しポリエチレン袋に入れ冷凍保存する。貝類は、筋肉、消化管内容物、貝柱（巻き貝には貝柱が無いので可食部）に分けてポリエチレン袋に入れ凍結保存する。貝類の消化管には底質が含まれていることが多いので、保存する前にそれらを取り除いておく。

わが国の食品衛生法に基づく魚介類の水銀の暫定基準は、総水銀として 0.4 mg/kg（湿重量）である。魚介類の総水銀濃度で 0.01 - 0.1 mg/kg（湿重量）程度が通常のバックグラウンド値と考えられる。

2-1-2 水試料

水試料の採取には、バンドン採水器等を用い、表層水は水面下 20 - 30 cm から採取することが望ましい。底質面の近くの水層からの採取は、底質が混入しないよう注意深く行なう。海水の採取は、風や雨の日を出来るだけ避け、原則として満潮時におこなう。湖沼・海域どちらの場合も、採水日時、採水場所、水質の一般性状および污染源との位置関係等の情報を明確にしておく。

試料水は、塩酸等で良く洗浄したガラスもしくはテフロン製でかつ密閉できる容器に満たして移送する。わが国の水質汚濁防止法に基づく基準では、総水銀については環境庁告示第 64 号（1974 年 9 月）によって、排水基準および環境基準をそれぞれ 0.005 mg/L、0.0005 mg/L と定め、またアルキル水銀については、排水基準、環境基準ともその公定法の定量限界 0.0005 mg/L をもって検出されないこととなっている。高濃度に水銀を含む廃水の突発的流出のような汚染事故の場合はこのような基準を目安にし、総水銀およびアルキル水銀の測定値を評価する。一般に総水銀の代表的な値は、大洋で 0.5 - 3 ng/L、沿岸水で 2 - 15 ng/L、川や湖で 1 - 3 ng/L である。

2-1-3 底質・土壌試料

土壤試料を採取する場合、汚染源の平面的位置およびこれと関連する予想汚染範囲の大小により、土壤採取頻度が異なる。土壤を調査現地から採取するための方法は、これまでに各種提案されている。現在、我が国では土壤汚染対策法が昨年度（環境省、平成 15 年）より施行されており、その中に土壤試料の採取方法について詳細に述べられているので、基本的にその方法にここでも準拠する。その汚染概況調査方法について概要を述べると、当該汚染の危険性が容易に判断される箇所については、100 m²（10 m × 10 m 格子）につき 1 試料を採取する。汚染履歴調査等の結果よりそれほど危険性が大きくないと判断される箇所については、900 m²（30 m × 30 m 格子）につき 5 地点混合法により 1 試料を採取する。5 地点混合法は、各格子中心点およびその回りに設定した 4 箇所のサブ採取ポイントを含めた計 5 ヶ所から個別に試料採取を行い、最後にまとめて一つの試料とする。これにより、各格子で得られた土壤試料の代表性を高めることができる。格子中心以外 4 ポイントの場所の選定は、ある程度大まかでもかまわないが、中心の周り東西南北の 4 方位で採取することが望ましい。

各採取ポイントにおける深度方向の土壤試料の採取は、採取部位として土壤表面から下 50 cm までの土壤とする。具体的には、土壤表面から 5 cm 迄と、5 cm から下 50 cm 迄の二つに分けて個別に採取する。土壤採取後、各土壤試料中の夾雑物（小石、根等）をできるだけ取り除き、四分法によって各土壤を十分に攪拌均一化する。均一化後、同重量ずつ混合し試料とする。5 地点混合法の場合も同様で、上述の処理を行って均一化された 5 土壤試料/地点を、同量ずつ混合して 1 試料とし、各種分析に供する。

河川の場合、調査対象水域の規模や予想される汚染の程度にもよるが、産業排水または都市下水などの放流口から下流に向かって 50 - 200 m 間隔で底泥の採取しやすい地点を選び、対照としてその上流部に二箇所程度の底泥採取地点を設けることが望ましい。採取点では通常河川の両岸および中央部で採泥されるが、河川幅が大きい場合は、採取地点を増やす。また、湖沼、海域の場合には、放流口或いは河口を中心に放射状に採取地点を設定、必要に応じてメッシュ調査を行う。試料の採取方法としては、河川、湖沼、浅海等の表層部の採泥にはエクマン・パージ型採泥器を用い、堆積状況や過去の汚染履歴、堆積量の推定等のためにはコア採泥器を用いて柱状試料を採取する。

採取された底質の場合も、試料中の木片、小石、貝殻、ゴミを除いた後、2 mm のふるいを通したものを試料とする。水分含量の多い場合には遠心分離して上澄液を除き、よく混合し均質化して分析に供する。採取日時、場所、一般性状（外観、色相、臭気、夾雑物等）等の情報を記録しておく。採取されたサンプルの容器はガラス製が望ましいが、密閉できるものであればその限りではない。容器は予め塩酸等で良く洗浄しておく。冷暗所保存とし、金属水銀または二価の水銀を含有する試料の場合では凍結保存する。

一般に土壤中の水銀含量は乾重量で 0.2 mg/kg 以下である。土壤の総水銀濃度で数 mg/kg を超える測定値が検出された場合は、土壤から更に他の環境への流出が危惧されるので、近辺水系の水銀汚染調査が必要となる。

2-1-4 植物試料

植物の中でも、地衣類は大気汚染物質の生物指標として適した様々な特質を有し、他の根のない着生植物と同様に空気中の栄養素を直接取込み、効率よく金属類を蓄積し、高い組織中金属濃度にも耐性を示す。地衣類は地理的にも広く分布しているため、国内はもとより国際間の大気汚染評価を実施する場合にも適している。事実、地衣類（*Parmelia* 種および *Usunera* 種等）はこれまで水銀をはじめ種々の重金属汚染物質による大気汚染評価のための研究に盛んに用いられ、これに関連した総説も Garty（2001）によって報告されている。地衣類は、通常樹木や枝に着生しているので、それを採取する。水でよく洗い、木片や粉塵等を探り除き、風乾して試料とする。測定時にバイアル瓶に数 g とり、解剖用鋏で細切後試料とする。

2-1-5 大気・空気試料

大気および室内環境が水銀で汚染されていることが予想される場合には空気試料を採取する。大気中の水銀濃度は大きく変動するため、特に汚染源との距離や日頃の風向きを考慮し、水銀分布が明らかになるようなサンプリング地点を決める必要がある。一般室内環境、作業室内環境等の空気試料については、室内を 3 m 四方のメッシュ（作業環境の規模によりメッシュ幅を増減する）に分割し、メッシュの交点で試料を採取する。人への曝露を考慮すると、地上 1 - 2 m 程度をサンプリング点として設定することが望ましい。大気または室内空気中の水銀を捕集するには、0.1% 過マンガン酸カリウム - 1N 硫酸溶液を吸収液とし、その 20 ml をインピンジャーまたはこれに類する吸収びんに入れ、吸引ポンプを用いて測定地点の空気を 1 L/min の流速で一定時間吸引して濃縮する。一般に市販の過マンガン酸カリウムは水銀を含有している場合が多いので、1N 硫酸に溶解後煮沸して MnO_2 の沈殿を生成させ、冷却後ろ過したものを吸収液として使用する。この操作により含有水銀の大部分が除かれる。また、こうして得られた吸収液は水銀蒸気を効率よく捕集し、通常吸収びんは一本で充分である。吸引終了後、吸収液が蒸発し減量した場合は吸収液を加えて一定量とし、これを試験溶液とする。この試料とは別に、通気しない吸収液を同量とり、吸収液のみのものおよびこれに水銀標準溶液を一定量加えたものを用意し、それぞれ空試験溶液および標準試験溶液とする。測定時、10% ヒドロキシルアミン塩酸塩溶液を滴加して過マンガン酸カリウムの色を脱色後、他の試料と同様に還元気化原子吸光光度法により試験溶液中水銀濃度を定量し、採取した空気量から試料空気中水銀濃度を算出する。本法は、環境大気、作業環境内空気、発生源排ガス等の試験に広く適用することができる。大気中の水銀については環境、発生源ともわが国での基準値は設定されていないが、作業環境における水銀蒸気の許容濃度として 0.025 mg/m^3 が日本産業衛生学会によって勧告されている。

2 - 2 人体試料

2 - 2 - 1 毛髪試料

毛髪中水銀濃度は、毛髪が形成される時の血液中のメチル水銀濃度を反映し、サンプリングの簡便性及び非侵襲性、サンプル保存性の良さ等の理由から、メチル水銀曝露の指標としてよく用いられる。一般に、毛髪中の水銀濃度は血中濃度に比して 250 - 300 倍を示す。毛髪は 1 ヶ月に約 1 cm 伸びるので、過去に遡っての曝露評価も可能である。しかし、毛髪中水銀濃度に関しては外部からの水銀蒸気や無機水銀の付着による汚染、パーマなどの毛髪処理による減少あるいは採取部位等の影響が指摘されている。

外部からの無機や水銀蒸気の曝露が無い場合、毛髪中水銀のほとんどがメチル水銀の形態であるため、総水銀を測定することによってメチル水銀の曝露評価が可能である。ただし、金採掘者や金精錬に携る人々では金属水銀や水銀蒸気による汚染を受けている可能性が高いため、毛髪中総水銀と同時にメチル水銀を測定することによって真のメチル水銀曝露評価が可能となる。試料としては後頭部の頭髪を少なくとも 20 本（長さ 1 cm で約 10 mg）以上をまとめて毛根部から鋏で切り取り、根元が確認できるように綿糸で縛るか、粘着テープに付けるなどしてポリエチレン製袋に入れ、常温で保存する。わが国における一般正常人の毛髪水銀濃度の大部分は 1 - 5 $\mu\text{g/g}$ の範囲内にあり、10 $\mu\text{g/g}$ を超えることは稀である。

2 - 2 - 2 血液試料

血液の水銀は魚介類を多食している人々では、赤血球：血漿（血清）の水銀濃度比は 10 : 1 に近く、赤血球中水銀のほとんどがメチル水銀であるため、総水銀を測定することによってメチル水銀の曝露評価が可能である。一方、血漿中の無機水銀濃度は約 50%とされており、血漿中総水銀濃度は無機水銀・水銀蒸気の曝露評価の指標となり得る。血液試料は通常の採血のように静脈血を抗凝固剤（ヘパリン）を入れた注射筒に数 ml 採取し密閉容器に移し、3000 rpm で 10 分間遠心分離し、赤血球と血漿に分ける。保存する場合は凍結する。一般正常人における血中水銀濃度は 40 ng/g 以下と考えられるが、魚介類の多食者ではこの値を超える場合もある。

2 - 2 - 3 尿試料

尿中水銀の多くは無機水銀の形態である。腎臓に蓄積された無機水銀の量に応じて尿中水銀濃度が増加する。したがって、尿中総水銀値は無機水銀・水銀蒸気の曝露評価指標として重要である。一方、腎疾患等の場合メチル水銀の尿中への漏出も起こりうる。尿中水銀濃度は排泄速度によっても変化するので、尿中クレアチニン濃度で補正するか、時間を

指定した尿の採取が必要となる。一般に、早朝尿が試料として採取される。通常の尿検査の場合と同様に紙コップで 50 - 100 ml 採取し、ポリエチレン容器等に入れて冷蔵保存する。1 ヶ月以上保存する場合には冷凍保存する。尿は無機塩類を多く含んでいるため、新鮮尿でも沈殿が生じる場合がある。測定に当っては試料の均一化が必要である。塩酸を少量加えて尿試料の pH を下げ、塩類の溶解を高める方法もある。微生物が繁殖すると、無機水銀が水銀蒸気になって散逸する可能性があるので留意する。特に水銀曝露のない地域の一般健康人の尿中水銀濃度は 10 ng/ml 以下と考えられている。

2 - 2 - 4 臍帯試料

臍帯試料は分娩時に胎児側の数 cm を採取し、生理食塩水で洗浄して血液を除いたものを試料とし、分析時まで凍結保存する。臍帯試料は採取後風乾することにより、乾燥試料として長期に保存することもできる。また、わが国では古くから各家庭でこの臍帯を大切に保存する習慣があるので、それらの水銀量を測定することにより、個々の出生当時の児の水銀曝露評価が可能である。ただし、1970 年代以前の臍帯については、当時外用薬として汎用されていた赤チン（マーキュロクロム）の塗布により多量の無機化された水銀を含んでいる場合が多く、曝露評価のためにはメチル水銀の測定が不可欠である。この場合、保存臍帯を水に浸して膨潤させ、血液その他の付着物を除いて水洗後、風乾し分析用試料とする。

わが国の一般健康人における臍帯中メチル水銀値は、0.1 $\mu\text{g/g}$ （乾重量）前後と考えられている。水俣病発生当時出生した児では、臍帯中メチル水銀値が数 $\mu\text{g/g}$ （乾重量）にも達したことが報告されている。

（参考：単位換算表）

1 ppm = 1 mg/kg (L) = 1 $\mu\text{g/g}$ (ml) = 1 ng/mg (μl)

1 ppb = 1 $\mu\text{g/kg}$ (L) = 1 ng/g (ml)

1 ppt = 1 ng/kg (L)

3 . 総水銀の分析法

総水銀の測定法としては、従来より吸光光度法（ジチゾン比色法）、放射化分析法、冷原子吸光光度法などが用いられてきた。吸光光度法はジチゾンが金属イオンとキレートを生成し一定の色調を呈することから、これを比色定量する方法である。この方法は操作が簡便なため古くは主流を占めていたが、1960年代末に高感度の原子吸光光度法が導入され、以来あまり使われなくなった。放射化分析法は原子炉の熱中性子を照射し、生成した¹⁹⁷Hgの線を測定し標準試料と比較定量する方法である。濃縮操作など前処理もなく、試料をそのまま分析する非破壊分析が可能であり、精度、感度とも高いが、原子炉という特殊な装置と高レベルの放射性物質の取り扱いなど特殊なテクニックを要し、測定機器も高価であるため、分析法としては一般的ではない。冷原子吸光光度法は、水銀を原子状の水銀蒸気にして光吸収セルに導入し 253.7 nmの吸光度を測定して定量する方法である。従来のフレーム中に直接試験溶液を噴霧して水銀を測定する原子吸光光度法に比べて極めて感度が高く、簡易な水銀ランプを装着したUV分光光度計を用いても測定できるなどの利点がある。原子状水銀の生成様式により、試料に湿式灰化後還元剤を添加して水銀蒸気（Hg⁰）を発生させる還元気化法と試料を直接燃焼して水銀蒸気を得る加熱気化法に大別されるが、前者の湿式灰化 - 原子吸光光度法が現在の主流となっている。ここでは、高感度の湿式灰化 - 還元気化原子吸光光度法による分析法の中で従来の方法を改良した湿式灰化 - 還元気化原子吸光光度法（循環 - 開放送気方式）による定量法について記載する。

3 - 1 湿式灰化 - 還元気化原子吸光光度法（循環 - 開放送気方式）による定量

<原理>

本法での還元気化原子吸光光度法は、試験溶液中のイオン型Hg²⁺を塩化第一スズにより還元して金属水銀を生成させ、これに通気して発生する水銀蒸気を吸光セルに導き 253.7 nmの吸光度を測定する点では原理的に従来の循環方式と同様である。しかしながら、エアープンプ、試験溶液びん、乾燥用U字管、吸収セル内を密閉系とし、エアープンプを作動させて試験溶液びん内で発生する水銀蒸気を循環させる従来の方式と異なり、本法では、図1に示すようにエアープンプ（ダイヤフラムポンプ）、反応びん、酸性ガストラップ、除湿器（アイスパス）を四方コックを介して密閉系とし、還元剤添加により発生する水銀蒸気を 1 - 1.5 L/分の流量で 30 秒間循環させることによって気相中濃度を均一化後、四方コックを 90°回転させ、その気相を一気に光吸収セルに導入する循環 - 開放送気方式を採用している。この装置による 1 検体当りの測定は 1 分以内で完了し、0.1 ng程度の水銀をも精度よく測定することができる。一方、本法での試験溶液調製法は、従来の硫酸 - 硝酸系による湿式分解法を改良し、試料の分解容器として 50 ml 共栓付肉厚メスフラスコ等の首長の

もの(10 cm以上)を用い、予め過塩素酸を共存させ、さらに混酸中の硫酸の占める割合を増大させた $\text{HNO}_3 - \text{HClO}_4 - \text{H}_2\text{SO}_4 (1 + 1 + 5)$ の混酸系を用いて加熱処理することにより、水銀損失なく、比較的短時間に試料の分解を完了させるよう工夫されたものである。即ち、200 - 230 のホットプレート上で30分間湿式分解し、冷後、水を加えて定容とするという簡便な方法で、本法は毛髪、血液、魚介類等の生物試料はもとより、底質、土壌等、多種多様の固形試料の分解にそのまま適用できる。加熱時の還流冷却器は不要である。

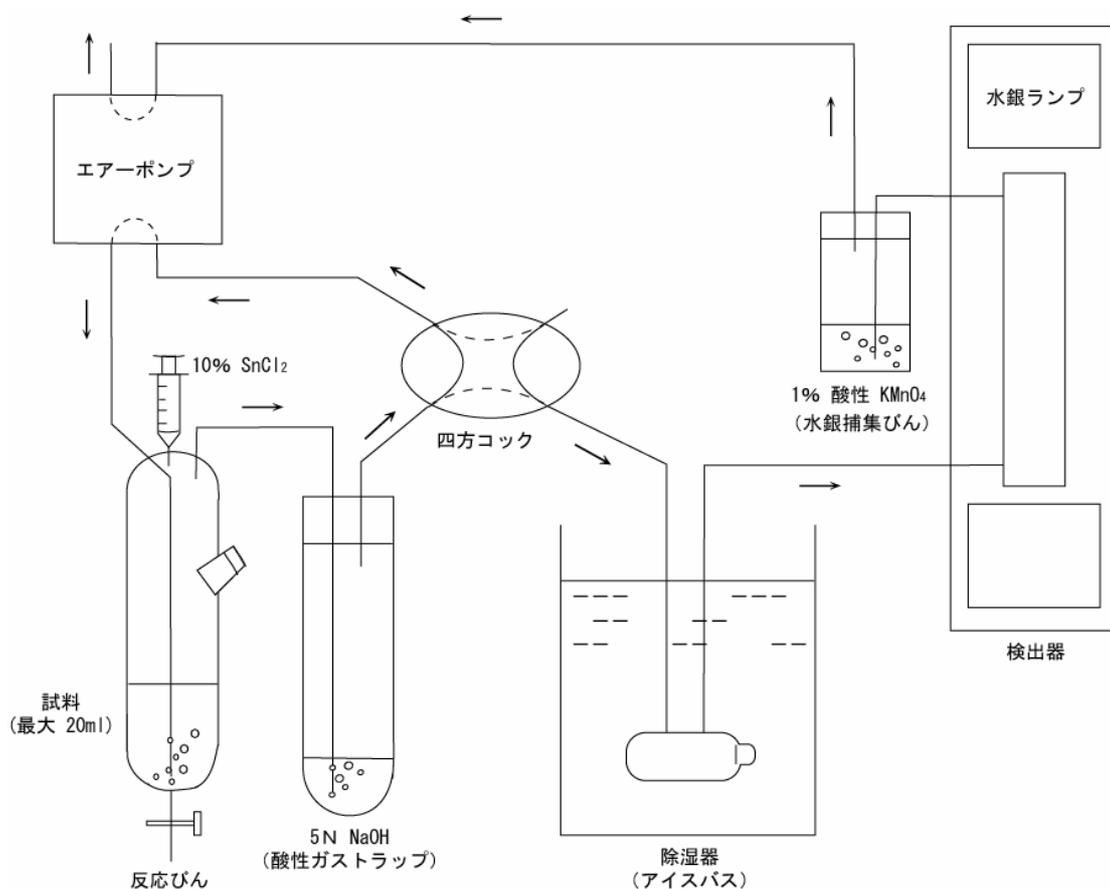


図1 . 還元酸化 - 冷原子吸光光度法 (循環 - 開放送気方式) の構造^{注1)}

3 - 1 - 1 生物試料 (魚介類、血液、尿、臍帯などの人体組織等)

本法は魚介類、血液、尿、人体組織等の生物試料に適用される。重量測定前にバイアル瓶にサンプルを入れ、解剖用鉏で細断し、糊状に近い状態に均質化して分析用試料とする。血液等の液状試料にあっては、ゴム球付の先端を細くしたガラス管 (パスツールピペット等) を用いてよく混合し分析に供する。

a 試薬

HNO₃ - HClO₄ (1 + 1) : 硝酸 (有害金属測定用) 100 mlに、過塩素酸 (有害金属測定用) 100 mlを加え混和する (冷暗所保存)。

H₂SO₄ : 硫酸 (有害金属測定用)

蒸留水 : イオン交換水を蒸留し、清浄なガラス容器中に保存する。

HCl : 塩酸 (特級)

10% SnCl₂溶液 : 塩化スズ () 二水和物 (特級) 10 gをHCl 9 mlに溶かし、蒸留水を加えて全量 100 mlとする。調製後、N₂ガスを通気し (100 ml/min、20 - 30分) 溶液中の水銀を追い出す。

5N NaOH : 水酸化ナトリウム (特級) 20 gを蒸留水に溶かし、全量を 100 mlとする。

0.1N NaOH : 5N NaOHを蒸留水で 50倍に希釈する。

0.1% L - システイン溶液 : L - システイン - 塩酸塩HSCH₂CH(NH₂)COOH · HCl · H₂O 10 mgを 0.1N NaOH 10 mlに溶解する (用時調製)。

メチル水銀標準溶液^{注2)} : CH₃HgCl (標準品) 12.5 mgをトルエンに溶解し、全量 100 mlとする。更に、これをトルエンで 100倍に希釈し、メチル水銀標準溶液とする。この溶液は 1 ml中 1.0 μg のHgを含む。

メチル水銀・システイン溶液 : メチル水銀標準溶液 0.5 mlおよび 0.1% L - システイン溶液 5 mlを 10 ml容共栓付円錐型遠沈管にとり、振とう器を用いて 3分間振り混ぜメチル水銀を水相へ移行させる。1200 rpmで 3分間遠心分離後、有機相 (上層) を吸引除去し密閉して冷暗所に保存する (1ヶ月ごとに調製)。この溶液は 1 ml中 0.1 μg のHgを含む。

1N H₂SO₄ : 硫酸 (有害金属測定用) 30 mlを蒸留水に徐々に加え全量 1000 mlとする。

水銀捕集用 1% KMnO₄溶液 : 過マンガン酸カリウム (特級) 1 gを 1N H₂SO₄ 100 mlに溶かす。

0.5% KMnO₄溶液 : 過マンガン酸カリウム (特級) 0.5 gを蒸留水に溶かし、全量 100 mlとする。

トルエン : 残留農薬試験用C₆H₅CH₃

b 装置および器具

水銀分析装置 : 半自動型水銀分析計 Hg - 201 型 (三双製作所製)

ホットプレート : 表面温度 250 まで調節可能なもの。

試料分解フラスコ^{注3)} : 50 ml容パイレックス製肉厚メスフラスコ (全高 150 mm、口内径 13 mm)

メスフラスコ : 10, 100 および 1000 ml

メスピペット : 0.2, 0.5, 1, 5 および 10 ml

バイアル瓶：20 ml 容シンチレーションバイアル

10 ml 容共栓付円錐型遠沈管

解剖用鋏

マルチフローメーター：フローメートマルチキット V4 型（コフロック社製）

水平往復振とう器（レシプロシェーカー）

遠心分離器

* ガラス器具は、使用前にすべて 0.5% KMnO₄溶液で洗浄し、KMnO₄溶液の色が無くなるまで水洗する。

c 試験溶液の調製法

均質化した試料（湿重量として 0.5 g 以下）を試料分解フラスコ底部にとり精秤する（臍帯等の乾燥試料の場合は 0.1 g 以下を精秤し、予め蒸留水 0.5 ml を加えて浸潤させておく）。次いで、蒸留水 1 ml、HNO₃ - HClO₄ (1 + 1) 2 ml および H₂SO₄ 5 ml を順次加え、200 - 230 のホットプレート上で 30 分間加熱処理する。放冷後、水を加えて定容とし、試験溶液とする。

尿試料の場合は、予め試料分解フラスコに HNO₃ - HClO₄ (1 + 1) 2 ml および H₂SO₄ 5 ml を入れ、分解フラスコを緩やかに攪拌しながら尿試料の一定量（通常 1 - 2 ml）を徐々に加え、以下、上記と同様に加熱処理し、試験溶液を調製する^{注4)}。

別に、試料分解フラスコ中にメチル水銀・システイン溶液（0.10 µg Hg/ml）0 および 1.0 ml（Hg として 0.10 µg に相当）をとり、前者のブランクにのみ蒸留水 1 ml 加える。次いで、HNO₃ - HClO₄ (1 + 1) 2 ml および H₂SO₄ 5 ml を順次加え、以下試験溶液の調製法に従って操作し、それぞれ空試験溶液および総水銀測定用標準試験溶液とする。

d 試験操作および計算

【試験操作】

空試験溶液、総水銀測定用標準試験溶液および試験溶液の一定量 V ml（通常 5 ml、最大 20 ml）を水銀分析装置の反応びん内に静かに加えて栓を付す。次いで、装置付属のディスペンサーを用いて 10% SnCl₂ 溶液 1 ml を加え、スタートボタンを押す。この時、ダイヤフラムポンプが作動し生成水銀蒸気が四方コックを介して反応びん - 酸性ガストラップ内を 30 秒間循環してその気相内濃度が均質化され、この間に試験溶液から発生する酸性ガスはアルカリ溶液中に捕集される。30 秒後、四方コックが自動的に 90° 回転し、水銀蒸気がアイスバスを經由して検出器内に導入され、その吸光度が計測される。記録計の読みは急激に上昇し、シャープなピークを描いて下降する。記録計の示度が下降し始めたら試験溶液びん下部のコックを開き、内部の溶液を排出させて再び閉じ、ベースラインに戻るまで通気する。リセットボタンを押し、次の測定に移る^{注5)}。

【計算】

空試験溶液、総水銀測定用標準試験溶液および試験溶液（またはその希釈溶液）の各一定量V ml(通常 5 ml、最大 20 ml)^{注6)}を測定して得られるピーク高(mm)をそれぞれPbl, Pstd およびPsとすると、試料中総水銀濃度は次式により算出される^{注7)}。

試料中総水銀濃度 ($\mu\text{g/g}$) = $0.10 \mu\text{g} \times (\text{Ps}-\text{Pbl})/(\text{Pstd}-\text{Pbl}) \times \text{希釈倍数} \times 1/\text{試料量}(\text{g})$

< 血液、尿試料の場合 >

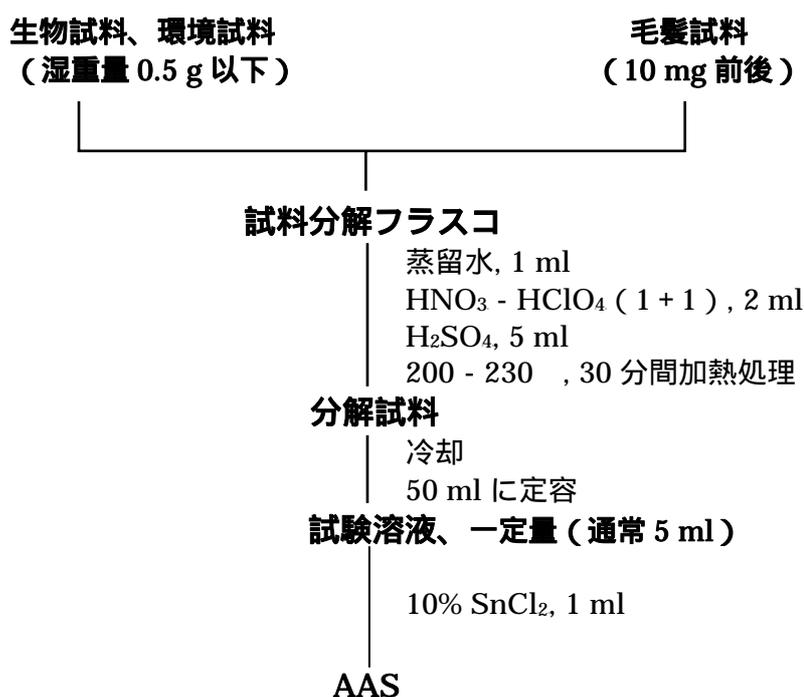
試料中総水銀濃度 (ng/g or ml) = $100 \text{ ng} \times (\text{Ps}-\text{Pbl})/(\text{Pstd}-\text{Pbl}) \times \text{希釈倍数} \times 1/\text{試料量}(\text{g or ml})$

【注解】

- 1) この原理に従って自動化された装置が Hg - 201 型水銀分析装置として市販されている。
- 2) 試料中総水銀の分析においては、標準溶液として無機水銀 (II) 標準品の溶液を用いるのが一般的であるが、本法では、魚介類に含まれる水銀の大部分がメチル水銀であること、また通常、試料中総水銀だけでなくメチル水銀も同時に測定することを考慮し、異なる標準溶液による測定誤差をなくすため、メチル水銀測定用と同じ標準溶液のメチル水銀・システイン溶液を用いて試料と同様に湿式分解し、総水銀測定用標準溶液とする方法を採用している。有機溶媒中のメチル水銀は極めて安定で、1 ppm のトルエン溶液であっても冷凍保存して溶媒の揮散を防げば、少なくとも数年間は使用できる。やむを得ず無機水銀 (II) の標準品を用いて本法での総水銀測定用標準溶液を調製する場合には、その安定性、保存性等の観点から、以下の方法が推奨される。
水銀標準溶液：塩化第二水銀(標準品)13.5 mgを 100 ml容メスフラスコにとり、 HNO_3 - HClO_4 (1 + 1) 4 ml、 H_2SO_4 10 mlを順次加えて溶解後、標線まで蒸留水を加えて水銀標準原液とする (標準原液 1 ml = 100 μg Hg)。このようにして得られた標準原液は密閉して冷暗所に保存すれば、少なくとも数年間は安定である。用時、この原液を上記の空試験溶液で 1000 倍に希釈し水銀標準溶液とする (本溶液 1 ml = 0.10 μg Hg)。また、市販の標準溶液を使用する場合でも、同様に空試験溶液を用いて適宜希釈する。
- 3) 安全性の点でパイレックス製肉厚メスフラスコが推奨されるが、それが入手できない場合は、市販のパイレックス製メスフラスコを用いてもよい。また、メスフラスコの代わりにパイレックス製試験管 (内径 21 mm、高さ 200 mm) を使用し、ホットプレートの代わりにアルミブロックバスを用いて本文と同様の操作で試料の湿式分解を行ってもよい。
- 4) 尿試料の場合、他の生物試料と同様に分解フラスコ中に試料をとり、これに HNO_3 - HClO_4 (1 + 1) および硫酸を順次加えていくと、一気に激しい反応が起こり、試料が容器から溢れ出るなど危険を伴うことが多い。これを防止し安全に操作するためには、予め分解フラスコに酸類をいれておき、分解フラスコを振り混ぜながら、尿試料を除々に加える必要がある。
- 5) 試料を測定した後のパーキング時間を充分に取らないと (少なくとも 15 秒間) 前の試

験溶液の影響が残る場合がある。特に、高濃度の試料測定後に低濃度の試料を測定する場合には、両者の間で蒸留水を用いて測定し、バックグラウンドまで値が下がったことを確認することが望ましい。

- 6) 試験溶液の酸濃度および測定時の試験溶液量により還元気化した水銀蒸気の水相 - 気相間の平衡濃度に差異が生ずる。このため、試験溶液の稀釈には空試験溶液を用い、試験溶液、標準試験溶液ともにすべて同一の条件下（酸濃度、容量）で測定する。
- 7) 原子吸光光度法では、検量線の直線範囲が広いため、必ずしも多点検量線法による必要はなく、一点検量線法も多点検量線法とともによく用いられる。実際には、ブランクのほか、例えば 0.02、0.05 および 0.10 $\mu\text{g Hg}/50\text{ ml}$ の総水銀測定用標準試験溶液の中から試験溶液のピーク高に応じて最適なもの 1 点を選び、試験溶液と同量を測定し、計算によって水銀濃度が算出される。



流れ図 1. 生物・環境試料中総水銀量の定量法
(魚介類、血液、臍帯などの人体組織、毛髪、底質・土壌等)

試料分解フラスコ

HNO₃ - HClO₄ (1 + 1) , 2 ml

H₂SO₄, 5 ml

尿試料

2 ml を緩やかに攪拌しながら滴加

200 - 230 ℃ , 30 分間加熱処理

分解試料

冷却

50 ml に定容

試験溶液, 一定量 (通常 5 ml)

10% SnCl₂, 1 ml

AAS

流れ図 2 . 尿試料中総水銀の定量法

3-1-2 毛髪試料

試料数十 mg をビーカーにとり、中性洗剤（100 倍希釈）および蒸留水で洗浄し、更に少量のアセトンを加えて水分をとり、減圧下にアセトンを除く。次いで、試料を 20 ml 容バイアル瓶に移し、解剖用鋏で細切し、粉末状に近い状態に均一化して分析試料とする。

a 試薬

アセトン：特級 CH_3COCH_3

エタノール：特級 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$

$\text{HNO}_3 - \text{HClO}_4$ (1 + 1)：硝酸（有害金属測定用）100 mlに、過塩素酸（有害金属測定用）100 mlを加え混和する（冷暗所保存）。

H_2SO_4 ：硫酸（有害金属測定用）

蒸留水：イオン交換水を蒸留し、清浄なガラス容器中に保存する。

HCl：塩酸（特級）

10% SnCl_2 溶液：塩化スズ（ ）二水和物（特級）10 gをHCl 9 mlに溶かし、蒸留水を加えて全量 100 mlとする。調製後、 N_2 ガスを通気し（100 ml/min、20 - 30 分）溶液中の水銀を追い出す。

5N NaOH：水酸化ナトリウム（特級）20 gを蒸留水に溶かし、全量を 100 mlとする。

0.1N NaOH：5N NaOHを蒸留水で 50 倍に希釈する。

0.1% L - システイン溶液：L - システイン - 塩酸塩 $\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH} \cdot \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 10 mgを 0.1N NaOH 10 mlに溶解する（用時調製）。

メチル水銀標準溶液： CH_3HgCl （標準品）12.5 mgをトルエンに溶解し、全量 100 mlとする。更に、これをトルエンで 100 倍に希釈し、メチル水銀標準溶液とする。この溶液は 1 ml中 1.0 μg のHgを含む。

メチル水銀・システイン溶液：メチル水銀標準溶液 0.5 mlおよび 0.1% L - システイン溶液 5 mlを 10 ml 容共栓付円錐型遠沈管にとり、振とう器を用いて 3 分間振り混ぜメチル水銀を水相へ移行させる。1200 rpm で 3 分間遠心分離後、有機相（上層）を吸引除去し密閉して冷暗所に保存する（1 ヶ月ごとに調製）。この溶液は 1 ml 中 0.1 μg の Hg を含む。

1N H_2SO_4 ：硫酸（有害金属測定用）30 mlを蒸留水に徐々に加え全量 1000 mlとする。

水銀捕集用 1% KMnO_4 溶液：過マンガン酸カリウム（特級）1 gを 1N H_2SO_4 100 mlに溶かす。

0.5% KMnO_4 溶液：過マンガン酸カリウム（特級）0.5 gを蒸留水に溶かし、全量 100 mlとする。

トルエン：残留農薬試験用 $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$

b 装置および器具

水銀分析装置：半自動型水銀分析計 Hg - 201 型（三双製作所製）

ホットプレート：表面温度 250 °C まで調節可能なもの。

試料分解フラスコ：50 ml 容パイレックス製肉厚メスフラスコ（全高 150 mm、口内径 13 mm）

メスフラスコ：10, 100 および 1000 ml

メスピペット：0.2, 0.5, 1, 5 および 10 ml

バイアル瓶：20 ml 容シンチレーションバイアル

10 ml 容共栓付円錐型遠沈管

解剖用鋏

マルチフローメーター：フローメートマルチキット V4 型（コフロック社製）

水平往復振とう器（レシプロシェーカー）

遠心分離器

ビーカー

* ガラス器具は、使用前にすべて 0.5% KMnO₄ 溶液で洗浄し、KMnO₄ 溶液の色が無くなるまで水洗する。

c 試験溶液の調製法

細切した試料（通常 10 mg 前後）を試料分解フラスコ中に精秤し、蒸留水 1 ml、HNO₃ - HClO₄（1 + 1）2 ml および H₂SO₄ 5 ml を順次加え、200 - 230 °C のホットプレート上で 30 分間加熱処理する。放冷後、水を加えて定容とし、試験溶液とする。別に、試料分解フラスコ中にメチル水銀・システイン溶液（100 ng Hg/ml）0 および 1.0 ml（Hg として 100 ng に相当）をとり、前者のブランクにのみ蒸留水 1 ml を加える。次いで、HNO₃ - HClO₄（1 + 1）2 ml および H₂SO₄ 5 ml を順次加え、以下試験溶液調製法に従って操作し、それぞれ空試験溶液および総水銀測定用標準試験溶液とする。

d 試験操作および計算

【試験操作】

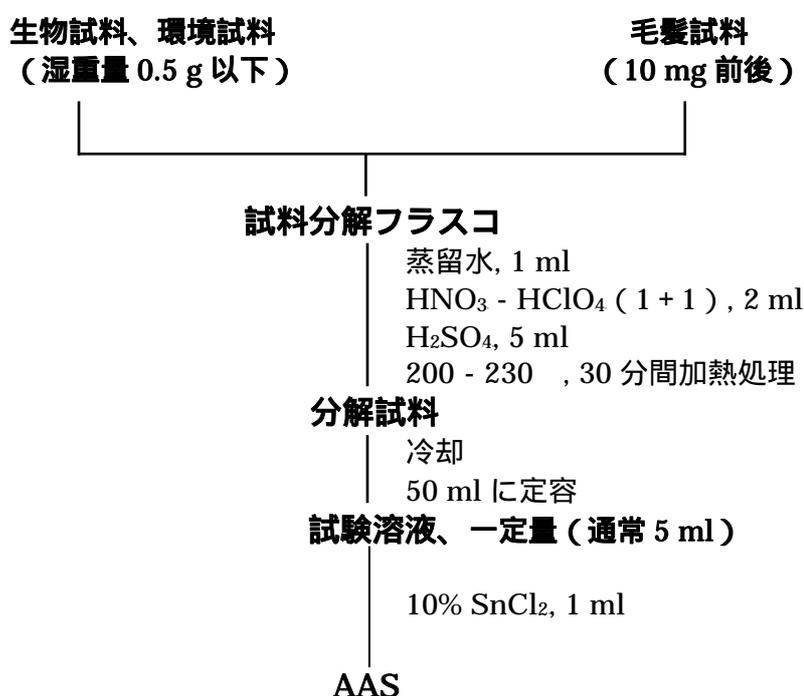
空試験溶液、総水銀測定用標準試験溶液および試験溶液の一定量 V ml（通常 5 ml、最大 20 ml）を水銀分析装置の反応びん内に静かに加えて栓を付す。次いで、装置付属のディスプレイペンサーを用いて 10% SnCl₂ 溶液 1 ml を加え、スタートボタンを押す。この時、ダイヤフラムポンプが作動し生成水銀蒸気が四方コックを介して反応びん - 酸性ガストラップ内を 30 秒間循環してその気相内濃度が均質化され、この間に試験溶液から発生する酸性ガスはアルカリ溶液中に捕集される。30 秒後、四方コックが自動的に 90° 回転し、水銀蒸気がアイスバスを経由して検出器内に導入され、その吸光度が計測される。記録計の読みは急激に上昇し、シャープなピークを描いて下降する。記録計の示度が下降し始めたなら試験溶液

びん下部のコックを開き、内部の溶液を排出させて再び閉じ、ベースラインに戻るまで通気する。リセットボタンを押し、次の測定に移る。

【計算】

空試験溶液、総水銀測定用標準試験溶液および試験溶液（またはその希釈溶液）の各一定量 V ml（通常 5 ml、最大 20 ml）を測定して得られるピーク高（mm）をそれぞれ Pbl, Pstd および Ps とすると、試料中総水銀濃度は次式により算出される。

$$\text{試料中総水銀濃度 (ng/mg)} = 100 \text{ ng} \times (\text{Ps}-\text{Pbl})/(\text{Pstd}-\text{Pbl}) \times \text{希釈倍数} \times 1/\text{試料(mg)}$$



流れ図 1 . 生物・環境試料中総水銀量の定量法 (再掲)
(魚介類、血液、臍帯などの人体組織、毛髪、底質・土壌等)

3-1-3 底質・土壌試料

採取された底質・土壌試料中の木片、小石、貝殻、ゴミを除いた後、四分法によって均一化し、2.0 mm のふるいを通したものを分析用試料とする。水分含量の多い場合には遠心分離して上澄液を除き、よく混合し均質化して分析に供する。

a 試薬

HNO₃ - HClO₄ (1 + 1) : 硝酸 (有害金属測定用) 100 ml に、過塩素酸 (有害金属測定用) 100 ml を加え混和する (冷暗所保存)。

H₂SO₄ : 硫酸 (有害金属測定用)

蒸留水 : イオン交換水を蒸留し、清浄なガラス容器中に保存する。

HCl : 塩酸 (特級)

10% SnCl₂ 溶液 : 塩化スズ () 二水和物 (特級) 10 g を HCl 9 ml に溶かし、蒸留水を加えて全量 100 ml とする。調製後、N₂ ガスを通気し (100 ml/min、20 - 30 分) 溶液中の水銀を追い出す。

5N NaOH : 水酸化ナトリウム (特級) 20 g を蒸留水に溶かし、全量 100 ml とする。

0.1N NaOH : 5N NaOH を蒸留水で 50 倍に希釈する。

0.1% L - システイン溶液 : L - システイン - 塩酸塩 HSCH₂CH(NH₂)COOH · HCl · H₂O 10 mg を 0.1N NaOH 10 ml に溶解する (用時調製)。

メチル水銀標準溶液 : CH₃HgCl (標準品) 12.5 mg をトルエンに溶解し、全量 100 ml とする。更に、これをトルエンで 100 倍に希釈し、メチル水銀標準溶液とする。この溶液は 1 ml 中 1.0 μg の Hg を含む。

メチル水銀・システイン溶液 : メチル水銀標準溶液 0.5 ml および 0.1% L - システイン溶液 5 ml を 10 ml 容共栓付円錐型遠沈管にとり、振とう器を用いて 3 分間振り混ぜメチル水銀を水相へ移行させる。1200 rpm で 3 分間遠心分離後、有機相 (上層) を吸引除去し密閉して冷暗所に保存する (1 ヶ月ごとに調製)。この溶液は 1 ml 中 0.1 μg の Hg を含む。

1N H₂SO₄ : 硫酸 (有害金属測定用) 30 ml を蒸留水に徐々に加え全量 1000 ml とする。

水銀捕集用 1% KMnO₄ 溶液 : 過マンガン酸カリウム (特級) 1 g を 1N H₂SO₄ 100 ml に溶かす。

0.5% KMnO₄ 溶液 : 過マンガン酸カリウム (特級) 0.5 g を蒸留水に溶かし、全量 100 ml とする。

トルエン : 残留農薬試験用 C₆H₅CH₃

b 装置および器具

水銀分析装置 : 半自動型水銀分析計 Hg - 201 型 (三双製作所製)

ホットプレート : 表面温度 250 °C まで調節可能なもの。

試料分解フラスコ：50 ml 容パイレックス製肉厚メスフラスコ（全高 150 mm、口内径 13 mm）

メスフラスコ：10, 100 および 1000 ml

メスピペット：0.2, 0.5, 1, 5 および 10 ml

10 ml 容共栓付円錐型遠沈管

マルチフローメーター：フローメートマルチキット V4 型（コフロック社製）

水平往復振とう器（レシプロシェーカー）

遠心分離器

磁性るつぼ

* ガラス器具は、使用前にすべて 0.5% KMnO_4 溶液で洗浄し、 KMnO_4 溶液の色が無くなるまで水洗する。

c 試験溶液の調製法

均質化した試料（湿重量として 0.5 g 以下）を試料分解フラスコ底部にとり精秤する。次いで、蒸留水 1 ml、 $\text{HNO}_3 - \text{HClO}_4 (1 + 1)$ 2 ml および H_2SO_4 5 ml を順次加え、200 - 230 のホットプレート上で 30 分間加熱処理する。放冷後、水を加えて定容とし、試験溶液とする。別に、試料分解フラスコ中にメチル水銀・システイン溶液（0.10 μg Hg/ml）0 および 1.0 ml（Hg として 0.10 μg に相当）をと、前者のブランクにのみ蒸留水 1 ml 加える。次いで、 $\text{HNO}_3 - \text{HClO}_4 (1 + 1)$ 2 ml および H_2SO_4 5 ml を順次加え、以下試験溶液調製法に従って操作し、それぞれ空試験溶液および総水銀測定用標準試験溶液とする。

また、湿試料の場合、分析用試料採取時に、重量既知の磁性るつぼに試料約 10 - 20 g を精秤し、105 の乾燥器に入れて 4 時間以上乾燥する。デシケーター中で放冷後、秤量して湿重量/乾重量の比（WW/DW）を求めておく。

d 試験操作および計算

【試験操作】

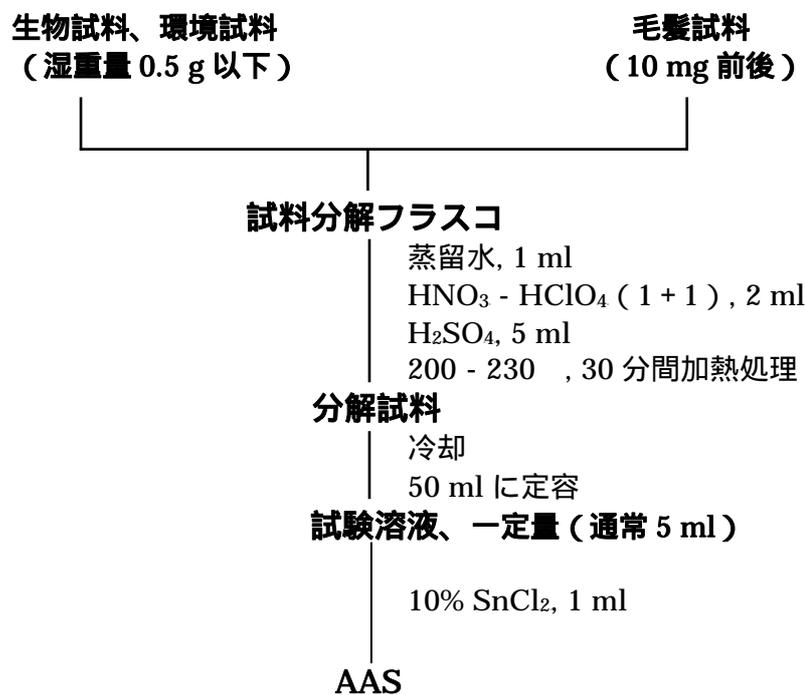
空試験溶液、総水銀測定用標準試験溶液および試験溶液の一定量 V ml（通常 5 ml、最大 20 ml）を水銀分析装置の反応びん内に静かに加えて栓を付す。次いで、装置付属のディスプレイペンサーを用いて 10% SnCl_2 溶液 1 ml を加え、スタートボタンを押す。この時、ダイヤフラムポンプが作動し生成水銀蒸気が四方コックを介して反応びん - 酸性ガストラップ内を 30 秒間循環してその気相内濃度が均質化され、この間に試験溶液から発生する酸性ガスはアルカリ溶液中に捕集される。30 秒後、四方コックが自動的に 90° 回転し、水銀蒸気がアイスバスを経由して検出器内に導入され、その吸光度が計測される。記録計の読みは急激に上昇し、シャープなピークを描いて下降する。記録計の示度が下降し始めたなら試験溶液びん下部のコックを開き、内部の溶液を排出させて再び閉じ、ベースラインに戻るまで通気する。リセットボタンを押し、次の測定に移る。

【計算】

空試験溶液、総水銀測定用標準試験溶液および試験溶液（またはその希釈溶液）の各一定量 V ml（通常 5 ml、最大 20 ml）を測定して得られるピーク高（mm）をそれぞれ Pbl, Pstd および Ps とすると、乾重量当りの試料中総水銀濃度（ $\mu\text{g/g}$ 乾重量）は次式により算出される。

試料中総水銀濃度($\mu\text{g/g}$)= $0.10 \mu\text{g} \times (\text{Ps}-\text{Pbl})/(\text{Pstd}-\text{Pbl}) \times \text{希釈倍数} \times 1/\text{試料量}(\text{g}) \times \text{WW/DW}$

WW/DW：湿重量/乾重量の比



流れ図 1. 生物・環境試料中総水銀量の定量法（再掲）
（魚介類、血液、臍帯などの人体組織、毛髪、底質・土壌等）

3-1-4 水試料^{注1)}

採水後実験室に持ち帰った水試料は、通常、0.45 μm メンブランフィルターでろ過し、分析用試料とする。水銀の分析は出来るだけ早く着手するのが望ましい。また、簡便法として全水を試料とする場合もある。

a 試薬

HNO₃ - HClO₄ (1 + 1) : 硝酸 (有害金属測定用) 100 ml に、過塩素酸 (有害金属測定用) 100 ml を加え混和する (冷暗所保存)。

H₂SO₄ : 硫酸 (有害金属測定用)

蒸留水 : イオン交換水を蒸留し、清浄なガラス容器中に保存する。

HCl : 塩酸 (特級)

10% SnCl₂ 溶液 : 塩化スズ () 二水和物 (特級) 10 g を HCl 9 ml に溶かし、蒸留水を加えて全量 100 ml とする。調製後、N₂ ガスを通気し (100 ml/min、20 - 30 分) 溶液中の水銀を追い出す。

5N NaOH : 水酸化ナトリウム (特級) 20 g を蒸留水に溶かし、全量を 100 ml とする。

0.1N NaOH : 5N NaOH を蒸留水で 50 倍に希釈する。

0.01% ジチゾン 溶液^{注2)} : 200 ml 容分液ロートにジフェニルチオカルバゾン C₆H₅N:NCSNHNC₆H₅ 0.011 g をとり、トルエン 100 ml に溶解する。これに暫時 0.1N NaOH 50 ml を加えて振り混ぜ、ジチゾン を水相 (下層) へ移行させる。静置後、下相を共栓ガラス容器に分取し、1N HCl を滴加して微酸性 (黒緑色結晶析出) とし、トルエン 100 ml を加えて振とうし精製 0.01% ジチゾン 溶液を得る。静置後、下相を吸引除去し密閉して冷暗所に保存する (用時調製)。

0.1% L - システイン 溶液 : L - システイン - 塩酸塩 HSCH₂CH(NH₂)COOH · HCl · H₂O 10 mg を 0.1N NaOH 10 ml に溶解する (用時調製)。

メチル水銀標準溶液 : CH₃HgCl (標準品) 12.5 mg をトルエンに溶解し、全量 100 ml とする。更に、これをトルエンで 100 倍に希釈し、メチル水銀標準溶液とする。この溶液は 1 ml 中 1.0 μg の Hg を含む。

メチル水銀・システイン 溶液 : メチル水銀標準溶液 0.5 ml および 0.1% L - システイン 溶液 5 ml を 10 ml 容共栓付円錐型遠沈管にとり、振とう器を用いて 3 分間振り混ぜメチル水銀を水相へ移行させる。1200 rpm で 3 分間遠心分離後、有機相 (上層) を吸引除去し密閉して冷暗所に保存する (1 ヶ月毎に調製)。この溶液は 1 ml 中 0.1 μg の Hg を含む。

1N H₂SO₄ : 硫酸 (有害金属測定用) 30 ml を蒸留水に徐々に加えて全量 1000 ml とする。

水銀捕集用 1% KMnO₄ 溶液 : 過マンガン酸カリウム (特級) 1 g を 1N H₂SO₄ 100 ml に溶かす。

0.5% KMnO₄ 溶液 : 過マンガン酸カリウム (特級) 0.5 g を蒸留水に溶かし、全量 100 ml

とする。

20N H₂SO₄ : 1L容メスフラスコに約 350 mlの蒸留水を取り、氷水中で攪拌しながら硫酸(有害金属測定用) 600 mlを徐々に加え、常温に戻した後、蒸留水で全量 1000 mlとする。

10N NaOH : 水酸化ナトリウム(特級) 400 gを蒸留水に溶かし、全量 1000 mlとする。

10% NH₂OH·HCl溶液 : 塩酸ヒドロキシルアミン(特級) 10 gを蒸留水にとかし、全量 100 mlとする。

10% EDTA溶液 : エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム塩(特級) C₁₀H₁₂N₂O₈Na₄·4H₂O 10 gを蒸留水に溶かし、全量 100 mlとする。

トルエン : 残留農薬試験用 C₆H₅CH₃

b 装置および器具

水銀分析装置 : 半自動型水銀分析計 Hg - 201 型 (三双製作所製)

ホットプレート : 表面温度 250 まで調節可能なもの。

試料分解フラスコ : 50 ml 容パイレックス製肉厚メスフラスコ (全高 150 mm、口内径 13 mm)

メスフラスコ : 10, 100 および 1000 ml

メスピペット : 0.2, 0.5, 1, 5 および 10 ml

2L 容分液ロート

10 ml 容共栓付円錐型遠沈管

ロータリーエバポレーター

マグネチックスターラー

マルチフローメーター : フローメートマルチキット V4 型 (コフロック社製)

水平往復振とう器 (レシプロシェーカー)

遠心分離器

* ガラス器具は、使用前にすべて 0.5% KMnO₄溶液で洗浄し、KMnO₄溶液の色が無くなるまで水洗する。

c 試験溶液の調製法

2L容分液ロートに水試料 2Lを取り、20N H₂SO₄ 10 mlおよび 0.5% KMnO₄溶液 5 mlを加えて混和し 5 分間放置する。10N NaOH 20 mlで中和後、10% NH₂OH·HCl溶液 5 mlを加えて振とうし 20 分間放置する^{注3)}。次いで、10% EDTA溶液 5 mlを加えて混和後、精製 0.01%ジチゾン溶液 10 mlを正確に加えて 1 分間激しく振とう抽出する。直射日光を避け、少なくとも 1 時間以上静置後、コックを開いて水相(下相)を捨てる。トルエン相は可及的に 10 ml容共栓付円錐型遠沈管に移し、共栓を付して 1200 rpmで 3 分間遠心分離する(エマルジョンが形成されている場合は、無水硫酸ナトリウムを 0.5 g程度加えて振とう後、遠

心分離し下相を除く)。トルエン相の一定量(通常 7 ml)を試料分解フラスコ中にとり、ロータリーエバポレーターを用いて、60 の水浴上で蒸発乾固する。これに蒸留水 1 ml、 $\text{HNO}_3 - \text{HClO}_4 (1+1)$ 2 mlおよび H_2SO_4 5 mlを順次加え、200 - 230 のホットプレート上で 30 分間加熱処理する。放冷後、水を加えて定容とし、試験溶液とする。別に水試料の種類に応じて、水試料の中から水銀含量の少ないものを選び、その各 2Lにメチル水銀・システイン溶液(100 ng Hg/ml) 0 および 0.2 ml (Hgとして 20 ngに相当)を加えたものについて、上記の試験溶液調製法に従って同様に操作し、それぞれ空試験溶液および総水銀測定用標準試験溶液とする。

d 試験操作および計算

【試験操作】

空試験溶液、総水銀測定用標準試験溶液および試験溶液の一定量V ml(通常 10 ml、最大 20 ml)を水銀分析装置の反応びん内に静かに加えて栓を付す。次いで、装置付属のディスプレイペンサーを用いて 10% SnCl_2 溶液 1 mlを加え、スタートボタンを押す。この時、ダイアフラムポンプが作動し生成水銀蒸気が四方コックを介して反応びん - 酸性ガストラップ内を 30 秒間循環してその気相内濃度が均質化され、この間に試験溶液から発生する酸性ガスはアルカリ溶液中に捕集される。30 秒後、四方コックが自動的に 90° 回転し、水銀蒸気がアイスバスを經由して検出器内に導入され、その吸光度が計測される。記録計の読みは急激に上昇し、シャープなピークを描いて下降する。記録計の示度が下降し始めたら試験溶液びん下部のコックを開き、内部の溶液を排出させて再び閉じ、ベースラインに戻るまで通気する。リセットボタンを押す、次の測定に移る。

【計算】

空試験溶液、総水銀測定用標準試験溶液および試験溶液(またはその希釈溶液)の各一定量V ml(通常 10 ml、最大 20 ml)を測定して得られるピーク高(mm)をそれぞれPbl、PstdおよびPsとすると、試料水中総水銀濃度は次式により算出される。

$$\text{試料水中総 Hg 濃度 (ng/L)} = 20 \text{ ng} \times (\text{Ps} - \text{Pbl}) / (\text{Pstd} - \text{Pbl}) \times \text{希釈倍数} \times 1 / \text{試料水量(L)}$$

【注解】

1) 水試料中の水銀濃度は通常 ng/L レベルで極めて低く、その水銀測定のためには試料中水銀の濃縮が必要である。このため、本法では、ジチゾンが水銀やその化合物イオンと容易に結合し、水に不溶で、有機溶剤に易溶な錯塩を形成するという化学的性質を利用して、硫酸酸性下に過マンガン酸カリウムを用いて試料中のすべての水銀をイオン化後、これを少量のジチゾン - トルエン溶液で抽出することにより定量的に効率よく濃縮する。次いで、抽出液中のトルエンを留去し、その残渣について、以下生物その他の試料の場合と同様に、硝酸 - 過塩素酸 - 硫酸系の混酸で湿式分解して試験溶液を調製し、還元気化 - 冷原子吸光度法により総水銀の分析を行う。

2) ジチゾン (ジフェニルチオカルバゾン) は酸化を受けやすく、通常その酸化体であるジフェニルチオカルバジアゾンが不純物として存在し、また微量ながら水銀などが金属キレート形で含まれている場合がある。これらの不純物は有機溶剤によく溶け、アルカリ溶液に不溶であるが、純粋のジチゾンは有機溶剤に易溶で、アルカリ性溶液にも塩を作って溶解するという化学的性質を有する。これを利用して不純物を除き、ジチゾンを精製して使用する。

3) 海水などCl⁻イオンを多く含む試料の場合、硫酸酸性下に過マンガン酸カリウム処理の過程で、その処理時間が長くなると時間と共にCl⁻イオンのCl₂への酸化が進み、一旦生成したCl₂はヒドロキシルアミン塩酸塩溶液処理によっても容易に還元されず、ジチゾン - トルエン抽出時に、ジチゾンの酸化を引き起こし妨害要因となる。したがって、特に海水試料の場合には、過マンガン酸カリウム処理時間を5分間と遵守し、さらにヒドロキシルアミン塩酸塩溶液を添加し混合後、少なくとも20分間の反応時間をおいてから、次のEDTAによる処理およびジチゾン - トルエン抽出操作を進めることが重要である。

その他総水銀分析の基本的事項については、3-1-1 生物試料 (魚介類、血液、尿、臍帯などの人体組織) の注解 (P 14-15) を参照のこと。

試料 2L (2L 容分液漏斗)

20N H₂SO₄ 10 ml で酸性化
0.5% KMnO₄ 5 ml を加えて混和後、5 分間放置
10N NaOH 20 ml で中和
10% NH₂OH・HCl 5 ml を加えて混和後、20 分間放置
10% EDTA 5 ml を加えて混和
0.01% ジチゾン - トルエン抽出, 10 ml
1 時間以上静置

有機相 (10 ml 容共栓付円錐型遠沈管)

水相

(エマルジョンが形成されている場合、
無水Na₂SO₄ 0.5 g を加えて振とう)
1200 rpm, 3 分間遠心分離

有機相 7 ml (試料分解フラスコ)

蒸発乾固

残留物

蒸留水, 1 ml
HNO₃ - HClO₄ (1 + 1), 2 ml
H₂SO₄, 5 ml
200 - 230 °C, 30 分間加熱処理

分解溶液

冷却
50 ml に定容

試験溶液, 一定量 (通常 10 ml)

10% SnCl₂, 1 ml

AAS

流れ図 3 . 水試料中総水銀の定量法

4 . メチル水銀の分析法

有機水銀の測定にはメチル水銀その他の有機水銀化合物を選択的に分析する ECD (電子捕捉型検出器) - ガスクロマトグラフィー法が主流を占め、その優れた分離性と迅速性もさることながら、有機水銀のハロゲン化合物に対して卓越した感度を示すことから、各種生物・環境試料中のメチル水銀の定量法として広く用いられている。即ち、試料中のメチル水銀をハロゲン化合物として有機溶媒で抽出し、システインまたはグルタチオン溶液に転溶後有機溶媒に再抽出し、ECD (電子捕捉型検出器) - ガスクロマトグラフィーにより測定する方法である。また、変法として同様なメチル水銀分離法により得られた試験溶液を加熱して水銀蒸気を生成させ、冷原子吸光光度法により測定しメチル水銀として定量する方法もある。しかしながら、このベンゼン直接抽出法は特に魚介類などの生物試料では抽出時に堅固なエマルジョンが形成され、その後の操作が煩雑になるばかりでなく、試料の種類によってメチル水銀の抽出効率が変動することがしばしば指摘されている。これらの欠点を改良するために、幾つかの前処理法が提案されているが、ここではその中でジチゾン抽出 - ECD - ガスクロマトグラフィー法による定量法および塩酸溶出 - トルエン抽出 - ECD - ガスクロマトグラフィー法による定量法について記載する。

4 - 1 ジチゾン抽出 - ECD - ガスクロマトグラフィー法による定量

<原理>

本法は、従来よりアルキル水銀の比色定量に繁用されてきたジチゾン抽出法による直接溶媒抽出法に比べて抽出効率が高く、少量の溶液でも微量水銀を容易に抽出分離できる利点があること、またアルキル水銀のジチゾネートがガスクロマトグラフ装置に注入と同時にカラム中の Cl^- と反応し、塩化アルキル水銀として定量的に検出されるという事実に基づき、各種生物・環境試料を対象としたジチゾン抽出 - ECD ガスクロマトグラフィー法によるメチル水銀分析法として確立されたものである。すなわち、試料の前処理 - ジチゾン抽出 - アルカリ性硫化ソーダ転溶 - ジチゾン再抽出 - ガスクロマトグラフィー分析からなり、各試料の組成特性に応じて適切な前処理を施すことにより、少量のジチゾン - トルエン溶液で効率よくメチル水銀を抽出し、ジチゾン - トルエン抽出後は全て共通した操作により試験溶液を調製し、ECD - ガスクロマトグラフィーにより定量するものである。

本法の原理から、ガスクロマトグラフ用充填剤としては、充填剤を充填したカラムの注入口側に数 cm 程度塩化ナトリウムを積層させたものを用いる。

4-1-1 生物試料（魚介類、血液、臍帯などの人体組織等）

本法は魚介類、人体組織等（血液、臍帯など）の蛋白性生物試料に適用される^{注1)}。採取された試料のうち、固形試料についてはバイアル瓶に入れて解剖用鉗を用いて細切し、糊状に近い状態に均質化して分析用試料とする。血液等の液状の試料はゴム球付の先端を細くしたガラス管等を用いてよく混合し均質化して分析に供する。

a 試薬

トルエン：残留農薬試験用 $C_6H_5CH_3$

ヘキサン：残留農薬試験用 $CH_3(CH_2)_4CH_3$

エタノール：特級 C_2H_5OH

蒸留水：イオン交換水を蒸留し、清浄なガラス容器中に保存する。

1N KOH - エタノール溶液：水酸化カリウム（特級）56.11 g をエタノールに溶解し、全量 1000 ml とする（冷暗所保存）。

1 N HCl：塩酸（特級）90 ml に蒸留水を加え、全量 1000 ml とする。

20% EDTA溶液：エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム塩（特級） $C_{10}H_{12}N_2O_8Na_4 \cdot 4H_2O$ 20 g を蒸留水に溶かし、全量 100 ml とする。

1N NaOH：水酸化ナトリウム（特級）40 g を蒸留水に溶解し、全量 1000 ml にする。

0.1N NaOH：1N NaOH を蒸留水で 10 倍に希釈する。

0.01%ジチゾン溶液：ジフェニルチオカルバゾン $C_6H_5N:NCSNHHC_6H_5$ 0.011 g を 200 ml 容分液ロートにとり、トルエン 100 ml に溶解する。これに 0.1N NaOH 50 ml を加えて振り混ぜ、ジチゾンの水相（下相）に移行させる。暫時静置後、下相を共栓付ガラス容器に分取し、1N HCl を滴加して微酸性（黒緑色結晶析出）とした後、トルエン 100 ml を加えて振とうし、精製 0.01%ジチゾン溶液を得る。暫時静置後、下相を吸引除去し、密閉して冷暗所に保存する（用時調製）^{注2)}。

アルカリ性硫化ナトリウム溶液：特級 $Na_2S \cdot 9H_2O$ 0.15 g を 10 ml 容共栓付円錐型遠沈管にとり、蒸留水 10 ml に溶解し硫化ナトリウム原液とする（1 ヶ月毎調製、冷暗所保存）。用時、その 0.1 ml を共栓付ガラス容器にとり、0.1N NaOH 50 ml およびエタノール 50 ml を加えて混和し、アルカリ性硫化ナトリウム溶液とする。この溶液は 1 ml 中 Na_2S 5 μ g を含む。

Walpoleの緩衝液：蒸留水 600 ml に 1M CH_3COONa 200 ml および 1N HCl 約 200 ml を混和し、pH 3.0 に調整する。

0.1% L - システイン溶液：L - システイン - 塩酸塩 $HSCH_2CH(NH_2)COOH \cdot HCl \cdot H_2O$ 10 mg を 0.1N NaOH 10 ml に溶解する（用時調製）。

メチル水銀標準溶液：塩化メチル水銀 CH_3HgCl 12.5 mg をトルエンに溶解し、全量 100 ml とする。更に、これをトルエンで 100 倍に希釈し、メチル水銀標準液とする（密閉して冷暗所保存）。この溶液は 1 ml 中 1000 ng の Hg を含む。

メチル水銀・システイン溶液：10 ml 容共栓付円錐型遠沈管に 0.1% L - システイン溶液 5 ml およびメチル水銀標準溶液 0.5 ml をとり、振とう器を用いて 3 分間振り混ぜ、メチル水銀を水相（下相）に移行させる。1200 rpm で 3 分間遠心分離後、有機相（上相）を吸引除去し、密閉して冷暗所に保存する（1 ヶ月毎調製）。この溶液は 1 ml 中 100 ng の Hg を含む。

無水硫酸ナトリウム：無水硫酸ナトリウム（残留農薬試験用）を 500 で 2 - 3 時間焼いたもの（デシケーター内保存）。

N₂ガス

* 以上の試液のうち、 - 、 、 は使用前に必要量を取り、半量のトルエンを加えて振とう洗浄し、予めガスクロマトグラフィー測定上妨害となるピークが現れないことを確認しておく。

b 装置および器具

ECD - ガスクロマトグラフ

マルチフローメーター：フローメートマルチキット V4 型（コフロック社製）

遠心分離器

水平往復振とう器（レシプロシェーカー）

恒温槽：ポリエチレングリコール 400 を使用

マグネチックスターラー

アスピレーター

試験管ミキサー

メスフラスコ：10, 100 および 1000 ml

メスピペット：0.2, 0.5, 1, 5 および 10 ml

パスツールピペット

分液ロート：100, 200 および 1000 ml

共栓付ガラス容器：100, 200 および 500 ml

ネジ蓋式ガラス容器：1000 ml

40 ml 容ネジ蓋式円錐型遠沈管

10 ml 容共栓付円錐型遠沈管：胴径×全長（16.5 mm×100 mm）

バイアル瓶：20 ml 容シンチレーションバイアル

解剖用鋏

* ガラス器具類は、すべて使用前にトルエンで洗浄し、測定上妨害となるピークが出現しないことを確認しておく。出現した際には、300 で 30 分加熱処理を行う。

【ガスクロマトグラフィー条件】

カラム： 固定相液体：Hg - 20A、固定相担体：Uniport HP（60 - 80 mesh、ジーエルサイエンス社製）、ガラスカラム：3.0 mm×0.75 - 1.0 m、 固定相液体：

10%KOCL、固定相担体：Hg - Chromosorb W (AW - DMCS、60 - 80 mesh、ジェイ・サイエンス社製)、ガラスカラム：3.0 mm × 0.75 - 1.0 m または 固定相液体：5%ポリジエチレングリコールサクシネート (DEGS)、固定相担体：Chromosorb W (AW - DMCS)、ガラスカラム：3.0 mm × 2.0 m。カラム充填後、充填剤上部 (注入口側) に、500 で 2 - 3 時間焼いた NaCl を 2 - 3 cm 程度の高さに充填する。

温度：カラム槽 140 - 160 、注入口 180 、検出器槽 200

キャリアーガス：N₂、30 - 40 ml/min

c 試験溶液の調製法

《メチル水銀の抽出》

均質化した試料 (通常湿重量として 0.2 - 0.5 g、乾燥試料の場合 0.1 g前後) を 40 ml 容ネジ蓋式円錐型遠沈管の底部に精秤し (乾燥試料の場合、精秤後蒸留水 0.5 ml を加えて浸潤させておく) 1N KOH - エタノール溶液 10 ml を加えて密閉し、100 の恒温槽中で時々振り混ぜながら 1 時間加熱する^{注3)}。冷後、1N HCl 10 ml およびヘキサン 5 ml を順次加え、振とう器を用いて 3 分間振とうし、2500 rpm で 3 分間遠心分離後、ヘキサン相 (上相) を吸引除去する (脂肪分の分離除去)^{注4)}。次いで、20% EDTA 溶液 2 ml を加えてよく混和し^{注5)}、精製 0.01% ジチゾン溶液 5 ml を加えて 3 分間振とうし、メチル水銀をジチゾネート (錯体) としてトルエン相に抽出する。暫時静置後、水相 (下相) を吸引除去し、2500 rpm で 3 分間遠心分離後、更に可及的に水相 (下相) を吸引除去する。

《クリーンアップ》

トルエン相に 1N NaOH 3 ml を加えて振とうし、過剰のジチゾン除去する (血液試料の場合には、この操作に先立って無水硫酸ナトリウム 0.5 g を加えて振とうし、1N NaOH 3 ml で洗浄する)^{注6)}。暫時静置して二相に分離後、水相 (下相) を吸引除去し、更に 2500 rpm で 3 分間遠心分離して澄明なトルエン相を得る。トルエン相の一定量 (通常 3 ml) を 10 ml 容共栓付円錐型遠沈管に移し、アルカリ性硫化ナトリウム溶液 2 ml を加えて 3 分間振とうし、メチル水銀を水相に逆抽出する^{注7)}。共栓を付し、1200 rpm で 3 分間遠心分離後、トルエン相 (上相) のみを注意して吸引除去する。更に水相にトルエン 2 ml を加えて 3 分間振とうし、再び 1200 rpm で 3 分間遠心分離後、トルエン相 (上相) を吸引除去する。これに 1N HCl (3 - 5 滴) を添加して微酸性とし^{注8)}、液中にパスツールピペットを差し込み、マルチフローメーターを用いて N₂ ガスを 3 分間通気し (50 ml/min)、溶液中の過剰の硫化物イオンを硫化水素ガスとして追い出す。次いで Walpole の緩衝液 2 ml を順次パスツールピペットの先端部分を洗いながら加え、試験管ミキサーで充分混和後、精製 0.01% ジチゾン溶液の一定量 (0.2 - 1.0 ml、通常 0.5 ml) を加えて振とうし、メチル水銀を抽出する。1200 rpm で 3 分間遠心分離後、水相 (下相) を吸引除去し、トルエン相に 1N NaOH 3 ml を加えて振とうし洗浄する (過剰のジチゾン除去)。暫時静置後、水相 (下相) を吸引除去し、1200

rpmで3分間遠心分離後、更に水相（下相）を可及的に吸引除去する。次いで、トルエン相に1N HCl 2滴を加え、試験管ミキサーで攪拌して酸性化し、1200 rpmで3分間遠心分離する。塩酸相（下相）を吸引除去し、試験溶液とする。

別に、試料中の水銀濃度に応じてメチル水銀・システイン溶液 0 - 0.20 ml (Hgとして0 - 0.020 µgに相当)を段階的にとり、試験溶液調製法に従って操作し、それぞれ検量線用メチル水銀標準試験溶液とする。いずれも試験溶液調製後は遮光しておく。

d 試験操作および計算

試験溶液（またはそのトルエン希釈液）および検量線用メチル水銀標準試験溶液の各一定量（通常 2 - 5 µl）を、マイクロシリンジを用いてガスクロマトグラフに注入し、試験溶液のピーク高を標準試験溶液から得られる検量線に照らして試料中メチル水銀濃度（µg/g）を算出する^{注9)}。

【注解】

- 1) 本法は、試料中の蛋白質を KOH - エタノール溶液で加熱処理して分解・可溶化後、微酸性下に遊離する脂肪分をヘキサンで洗浄・除去することにより、エマルジョンを形成することなく試料中のメチル水銀をジチゾネートとして定量的にトルエン相に抽出・分離し、アルカリ性硫化ナトリウム溶液によるクリーンアップを経て、少量のジチゾン - トルエンで再抽出するという方法である。
- 2) ジチゾン（ジフェニルチオカルバゾン）は酸化を受けやすく、通常その酸化体（ジフェニルチオカルバジアゾン）が不純物として含まれガスクロマトグラム上に妨害ピークを与えるため、純粋なジチゾンのみがアルカリ溶液に水溶性の塩を作って溶ける性質を利用し、これを用時精製して使用する。
- 3) 密閉性が悪いと加熱処理中内容液の沸騰が起こる。この場合、容器を取り出し水道水で十分冷却後、ガス漏れのないようにネジ蓋を閉め直し、加熱処理を続ける。もし沸騰に気づかず液量が減少していた場合は、最初からやり直す。
- 4) 試験管内の上相または下相を除去するには、柔軟性のあるチューブを付属させたパスツールピペット、廃液溜およびアスピレーターをやや肉厚のシリコンチューブで連結した、図2に示すような液相分離用吸引除去装置を用いると便利である。即ち、上相（有機相）を除去する場合には、アスピレーターで吸引しながら、パスツールピペットの先端部を上相の表層部に位置させながら試験管の内壁に沿って吸引し、その大部分を除去する。上相が残り僅かになった時点で、パスツールピペットの先端部を有機相の表面から数 mm 程度離して吸引を続けると、下相（水相）に比べて比重が小さく、揮散性の高い有機相のみが空気と共に吸い上げられ、ほぼ完全に有機相を分離することができる。一方、二相に分離した試験管内の下相を除去する場合には、柔軟性のあるチューブを指で押えてパスツールピペットからの吸引を止めた状態で、その先端部を試験管の底部に位置させ、指による

チューブの押えを加減しながら、下相を緩やかに吸い上げる。それがほぼ完全になくなった時点で、指で押えて吸引を止めパスツールピペットを取り出すと、下相のみを除去することができる。この一連の操作はある程度の熟練と正確性が要求されるので、実際に適用するに当たっては、個々の操作について予め十分に習熟しておくこと。

5) ジチゾン抽出に先立って EDTA 溶液を加えて振とう混合するのは、特に血液試料等に含まれる鉄イオンなどを隠蔽するためである。

6) この操作によって、水銀 ジチゾン錯塩（水銀ジチゾネート）はトルエン相に残り、トルエン相中の過剰のジチゾンはアルカリと水溶性塩を形成して水相に移行する。この操作によって水銀 - ジチゾン錯塩が損失することはない。このアルカリ洗浄によるトルエン相中のジチゾン除去操作は、通常 1 回洗浄で十分であるが、澄明なトルエン相が得られない場合にはこの操作をもう一度繰り返す。

血液試料では、ジチゾン - トルエン抽出時に黒色浮遊物が生成され、これにより最終的に試験溶液が着色し、ガスクロマトグラム上に妨害ピークが現れる場合が多い。これを防止するため、無水硫酸ナトリウム 0.5 g を添加して振とう後、アルカリ洗浄する。

7) トルエン相中のメチル水銀ジチゾネートは過剰の硫化物イオンと反応して水溶性の錯塩を形成し水相に移行するが、一回の操作で効率よく抽出するためには、硫化ナトリウムのアルカリ性エタノール溶液でなければならない。

8) 溶液の微酸性化に必要な 1N HCl 添加量を確認するには、予め別の 10 ml 容試験管にアルカリ性硫化ナトリウム溶液 2 ml をとり、pH 指示薬として 0.01% ジチゾン溶液数滴を加えて混和したものを調製し、これに 1N HCl を滴下して液相の色調が黄色から青色に変化するに要した滴数を 1N HCl の添加量とすればよい。

9) 一般に、ECD ガスクロマトグラフィー法では検量線の直線範囲が狭いので、測定に当たっては特にこの点に留意し、試験溶液のピーク高がその直線範囲に入るよう適宜希釈する必要がある。検量線作成用メチル水銀標準試験溶液の測定によって直線性が確認されれば、その範囲内の点、例えば 0.020 $\mu\text{g Hg}$ の標準試験溶液のピーク高 (Pstd) を用い、次式により試料中メチル水銀濃度を算出してもよい。

試料中メチル水銀濃度 ($\mu\text{g/g}$) = $0.020 \mu\text{g} \times (\text{Ps}-\text{Pbl})/(\text{Pstd}-\text{Pbl}) \times \text{希釈倍数} \times 1/\text{試料量}(\text{g})$

Ps : 試験溶液のピーク高 (mm) , Pbl : 空試験溶液のピーク高 (mm)

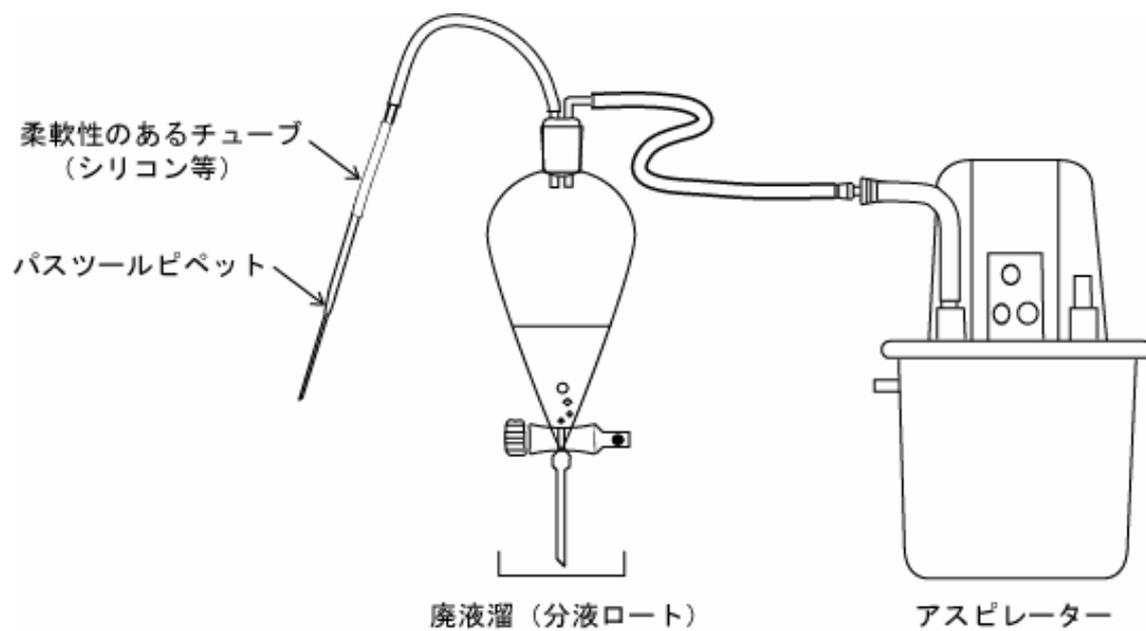
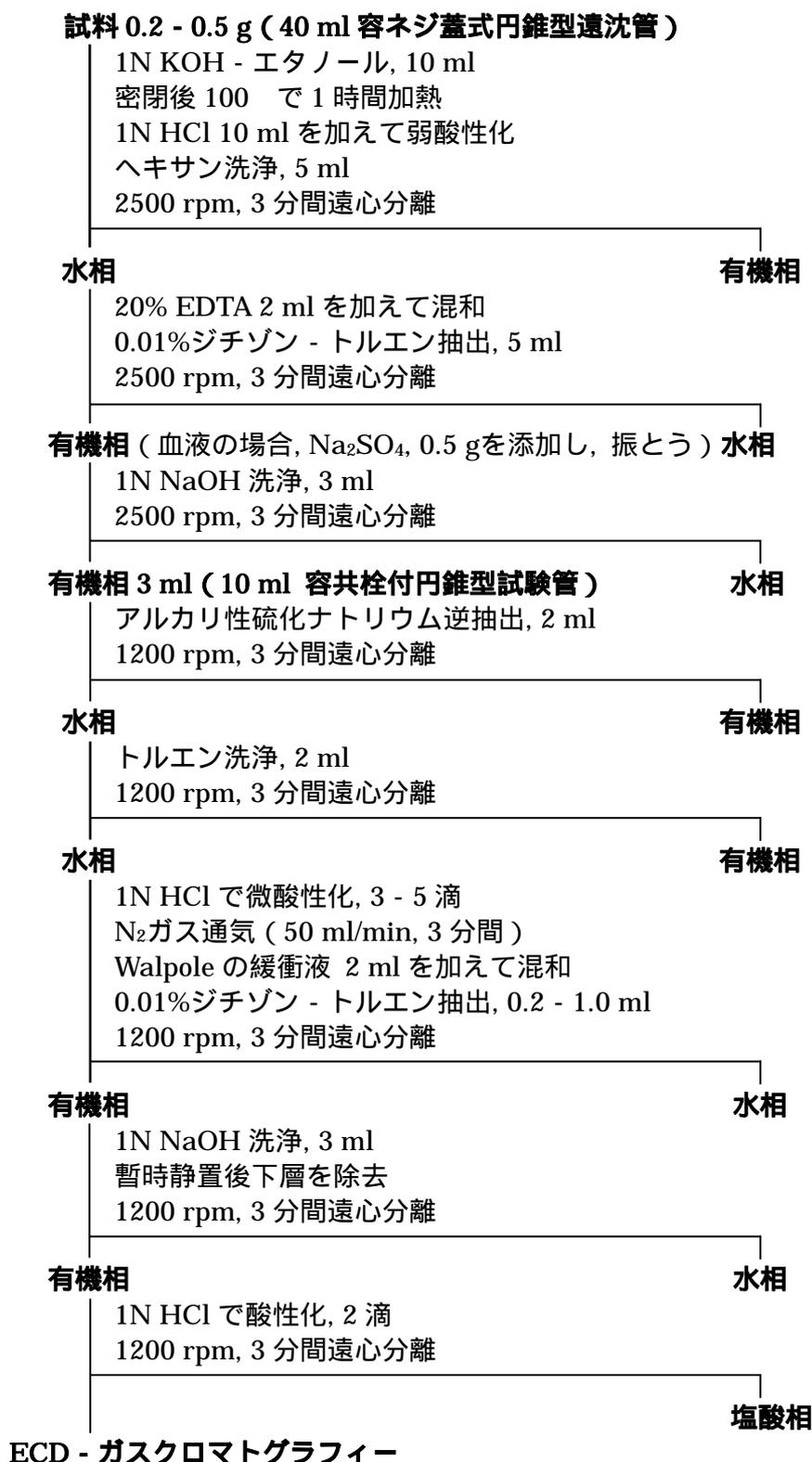


図 2 . 液相分離用吸引除去装置



流れ図 4 . 生物試料中メチル水銀の定量法
(魚介類、血液、臍帯などの人体組織等)

4-1-2 比較的高濃度の水銀を含む魚介類試料（簡便法）^{注1)}

前述のように、上記のジチゾン抽出 - ECD ガスクロマトグラフィーによる生物試料中のメチル水銀分析法は魚介類、血液、人体組織等蛋白性試料中の微量メチル水銀の定量分析に広く適用される。しかしながら、特に魚肉試料等の比較的水銀濃度の高い試料について本法にしたがって試験溶液を調製すると、多くの場合、測定時に試験溶液の大幅な希釈を余儀なくされる。こうした試料では、アルカリ性硫化ナトリウム溶液によるクリーンアップの段階で転溶に用いるトルエン相の採取量を少なくするのも一法であるが、総水銀の測定値から明らかに水銀濃度が高いと予測される場合には、上記の分析操作を幾分簡略化した、以下の方法を適用してもよい。

a 試薬

トルエン：残留農薬試験用 $C_6H_5CH_3$

ヘキサン：残留農薬試験用 $CH_3(CH_2)_4CH_3$

エタノール：特級 C_2H_5OH

蒸留水：イオン交換水を蒸留し、清浄なガラス容器中に保存する。

1N KOH - エタノール溶液：水酸化カリウム（特級）56.11 g をエタノールに溶解し、全量 1000 ml とする（冷暗所保存）。

1N HCl：塩酸（特級）90 ml に蒸留水を加え、全量 1000 ml とする。

20% EDTA溶液：エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム塩（特級） $C_{10}H_{12}N_2O_8Na_4 \cdot 4H_2O$ 20 g を蒸留水に溶かし、全量 100 ml とする。

1N NaOH：水酸化ナトリウム（特級）40 g を蒸留水に溶解し、全量 1000 ml にする。

0.1N NaOH：1N NaOH を蒸留水で 10 倍に希釈する。

0.01%ジチゾン溶液：ジフェニルチオカルバゾン $C_6H_5N:NCSNHHC_6H_5$ 0.011 g を 200 ml 容分液ロートにとり、トルエン 100 ml に溶解する。これに 0.1N NaOH 50 ml を加えて振り混ぜ、ジチゾンを水相（下相）に移行させる。暫時静置後、下相を共栓付ガラス容器に分取し、1N HCl を滴加して微酸性（黒緑色結晶析出）とした後、トルエン 100 ml を加えて振とうし、精製 0.01%ジチゾン溶液を得る。暫時静置後、下相を吸引除去し、密閉して冷暗所に保存する（用時調製）。

アルカリ性硫化ナトリウム溶液：特級 $Na_2S \cdot 9H_2O$ 0.15 g を 10 ml 容共栓付円錐型遠沈管にとり、蒸留水 10 ml に溶解し硫化ナトリウム原液とする（1 ヶ月毎調製、冷暗所保存）。用時、その 0.1 ml を共栓付ガラス容器にとり、0.1N NaOH 50 ml およびエタノール 50 ml を加えて混和し、アルカリ性硫化ナトリウム溶液とする。この溶液は 1 ml 中 Na_2S 5 μ g を含む。

Walpoleの緩衝液：蒸留水 600 ml に 1M CH_3COONa 200 ml および 1N HCl 約 200 ml を混和し、pH 3.0 に調整する。

0.1% L - システイン溶液：L - システイン - 塩酸塩 $HSCH_2CH(NH_2)COOH \cdot HCl \cdot H_2O$

10 mgを 0.1N NaOH 10 mlに溶解する（用時調製）。

メチル水銀標準溶液：塩化メチル水銀 CH_3HgCl 12.5 mgをトルエンに溶解し、全量 100 mlとする。更に、これをトルエンで 100 倍に希釈し、メチル水銀標準液とする（密閉して冷暗所保存）。この溶液は 1 ml中 1000 ngのHgを含む。

メチル水銀・システイン溶液：10 ml 容共栓付円錐型遠沈管に 0.1% L - システイン溶液 5 ml およびメチル水銀標準溶液 0.5 ml をとり、振とう器を用いて 3 分間振り混ぜ、メチル水銀を水相（下相）に移行させる。1200 rpm で 3 分間遠心分離後、有機相（上相）を吸引除去し、密閉して冷暗所に保存する（1 ヶ月毎調製）。この溶液は 1 ml 中 100 ng の Hg を含む。

N_2 ガス

* 以上の試液のうち、
、
は使用前に必要量を取り、半量のトルエンを加えて振とう洗浄し、予めガスクロマトグラフィー測定上妨害となるピークが現れないことを確認しておく。

b 装置および器具

ECD - ガスクロマトグラフ

マルチフローメーター：フローメートマルチキット V4 型（コフロック社製）

遠心分離器

水平往復振とう器（レシプロシェーカー）

恒温槽：ポリエチレングリコール 400 を使用

マグネチックスターラー

アスピレーター

試験管ミキサー

メスフラスコ：10, 100 および 1000 ml

メスピペット：0.2, 0.5, 1, 5 および 10 ml

パスツールピペット

分液ロート：100, 200 および 1000 ml

共栓付ガラス容器：100, 200 および 500 ml

ネジ蓋式ガラス容器：1000 ml

40 ml 容ネジ蓋式円錐型遠沈管

10 ml 容共栓付円錐型遠沈管：胴径×全長（16.5 mm×100 mm）

バイアル瓶：20 ml 容シンチレーションバイアル

解剖用鋏

* ガラス器具類は、すべて使用前にトルエンで洗浄し、測定上妨害となるピークが出現しないことを確認しておく。出現した際には、300 で 30 分加熱処理を行う。

【ガスクロマトグラフィー条件】

カラム： 固定相液体：Hg - 20A、固定相担体：Uniport HP (60 - 80 mesh、ジーエルサイエンス社製)、ガラスカラム：3.0 mm×0.75 - 1.0 m、 固定相液体：10% KOCL、固定相担体：Hg - Chromosorb W (AW - DMCS、60 - 80 mesh、ジェイ・サイエンス社製)、ガラスカラム：3.0 mm×0.75 - 1.0 mまたは 固定相液体：5%ポリジエチレングリコールサクシネート (DEGS)、固定相担体：Chromosorb W (AW - DMCS)、ガラスカラム：3.0 mm×2.0 m。カラム充填後、充填剤上部 (注入口側) に、500 で 2 - 3 時間焼いた NaCl を 2 - 3 cm 程度の高さに充填する。

温度：カラム槽 140 - 160 、注入口 180 、検出器槽 200

キャリアーガス：N₂、30 - 40 ml/min

c 試験溶液の調製法

《メチル水銀の抽出》

均質化した試料 (通常湿重量として 0.2 - 0.5 g、乾燥試料の場合 0.1 g前後) を 40 ml 容ネジ蓋式円錐型遠沈管の底部に精秤し (乾燥試料の場合、精秤後蒸留水 0.5 ml を加えて浸潤させておく) 1N KOH - エタノール溶液 10 ml を加えて密閉し、100 の恒温槽中で時々振り混ぜながら 1 時間加熱する。冷後、1N HCl 10 ml およびヘキサン 5 ml を順次加え、振とう器を用いて 3 分間振とうし、2500 rpm で 3 分間遠心分離後、ヘキサン相 (上相) を吸引除去する^{注2)} (脂肪分の分離除去)。次いで 20% EDTA 溶液 2 ml を加えてよく混和し、精製 0.01% ジチゾン溶液 5 ml を加えて 3 分間振とうし、メチル水銀をジチゾネート (錯体) としてトルエン相に抽出する。暫時静置後、水相 (下相) を吸引除去し、2500 rpm で 3 分間遠心分離して澄明なトルエン相を得る。

《クリーンアップ》

トルエン相 1.0 ml^{注3)} を 10 ml 容共栓付円錐型遠沈管に移し、アルカリ性硫化ナトリウム溶液 2 ml を加えて 3 分間振とうし、メチル水銀を水相に逆抽出する。共栓を付し、1200 rpm で 3 分間遠心分離後、トルエン相 (上相) のみを注意して吸引除去する。更に水相にトルエン 2 ml を加えて振とう洗浄し、再び 1200 rpm で 3 分間遠心分離後、トルエン相 (上相) を吸引除去する。これに 1N HCl (3 - 5 滴) を滴下して微酸性とし、液中にパスツールピペットを差し込み、マルチフローメーターを用いて N₂ ガスを 3 分間通気し (50 ml/min) 溶液中の過剰の硫化物イオンを硫化水素ガスとして追い出す。次いで、Walpole の緩衝液 2 ml を順次パスツールピペットの先端部分を洗いながら加え、試験管ミキサーで充分混和後、トルエン 1.0 ml を加え、共栓を付して 3 分間振とうする (過剰のジチゾンと共にメチル水銀の再抽出)^{注4)}。1200 rpm で 3 分間遠心分離後、水相 (下相) を吸引除去し、トルエン相に 1N NaOH 3 ml を加えて振とう洗浄する (過剰のジチゾン除去)。暫時静置後、水相 (下相) を吸引除去し、1200 rpm で 3 分間遠心分離後、更に水相 (下相) を可及的に抜き取る。次いで、トルエン相に 1N HCl 2 滴を加え、試験管ミキサーで攪拌して酸性化し、1200 rpm

で3分間遠心分離する。塩酸相（下相）を吸引除去し、試験溶液とする。

別に、試料中の水銀濃度に応じてメチル水銀・システイン溶液 0 - 1.0 ml（Hgとして 0 - 0.10 µg に相当）を段階的にとり、試験溶液調製法に従って操作し、それぞれ検量線用メチル水銀標準試験溶液とする。いずれも試験溶液調製後は冷暗所に保存する。

d 試験操作および計算

試験溶液（またはそのトルエン希釈液）および検量線用メチル水銀標準試験溶液の各一定量（通常 2 - 5 µl）を、マイクロシリンジを用いてガスクロマトグラフに注入し、試験溶液のピーク高を標準試験溶液から得られる検量線に照らして試料中メチル水銀濃度（µg/g）を算出する^{注5}）。

【注解】

- 1) 本法は、0.1 ppm 以上の比較的高濃度の水銀を含む生物試料、特に魚介類中メチル水銀の定量に適用される。本法と 5 - 1 - 1 に記した方法との違いは、0.01%ジチゾン - トルエン抽出後の 1N NaOH 洗浄およびその後の遠心分離の操作が省略され、メチル水銀の再抽出の段階で 0.01%ジチゾン - トルエンを用いる代わりにトルエンのみで抽出できる点であるが、アルカリ性硫化ナトリウム溶液による逆抽出時にはジチゾンも水相に移行して着色しているため、その後の過剰の硫化物イオンを追い出すのに微酸性にする段階でも変色が判然として見やすいなどの利点もある。
- 2) 試験管内の上相または下相を除去するには、柔軟性のあるチューブを付属させたパストゥールピペット、廃液溜およびアスピレーターをやや肉厚のシリコンチューブで連結した、図 2 に示すような液相分離用吸引除去装置を用いると便利である。即ち、上相（有機相）を除去する場合には、アスピレーターで吸引しながら、パストゥールピペットの先端部を上相の表層部に位置させながら試験管の内壁に沿って吸引し、その大部分を除去する。上相が残り僅かになった時点で、パストゥールピペットの先端部を有機相の表面から数 mm 程度離して吸引を続けると、下相（水相）に比べて比重が小さく、揮散性の高い有機相のみが空気と共に吸い上げられ、ほぼ定量的に有機相を分離することができる。一方、二相に分離した試験管内の下相を除去する場合には、柔軟性のあるチューブを指で押えてパストゥールピペットからの吸引を止めた状態で、その先端部を試験管の底部に位置させ、指によるチューブの押えを加減しながら、下相を緩やかに吸い上げる。それがほぼ完全になくなった時点で、指で押えて吸引を止めパストゥールピペットを取り出すと、下相のみを除去することができる。この一連の操作はある程度の熟練と正確性が要求されるので、実際に適用するに当たっては、個々の操作について予め十分に習熟しておくこと。
- 3) このプロセスにおいて、0.01%ジチゾン - トルエン中のメチル水銀ジチゾネートのみならず遊離のジチゾンも同時にアルカリ性硫化ナトリウム溶液中に転溶されるため、アルカリ性硫化ナトリウム転溶に用いる 0.01%ジチゾン - トルエン抽出液の採取量は 1 ml を限

度とする。

- 4) この操作で、メチル水銀は水相中で遊離したジチゾンと共にトルエンに再抽出される。このため、本法での再抽出はアルカリ性硫化ナトリウム溶液への転溶時に採取された0.01%ジチゾン - トルエン抽出液量と同量の1 mlのトルエンのみを用いて行う。
- 5) ECD ガスクロマトグラフィー法では検量線の直線範囲が狭いので、この場合も測定に当っては直線範囲を確認した上で、試験溶液のピーク高がその範囲に入るよう適宜希釈する必要がある。検量線作成用メチル水銀標準試験溶液の測定によって直線性が確認されれば、その範囲内の点、例えば0.050 µg Hgの標準試験溶液のピーク高(Pstd)を用い、次式により試料中メチル水銀濃度を算出してもよい。

試料中メチル水銀濃度 (µg/g) = $0.050 \mu\text{g} \times (\text{Ps}-\text{Pbl})/(\text{Pstd}-\text{Pbl}) \times \text{希釈倍数} \times 1/\text{試料量}(\text{g})$

Ps : 試験溶液のピーク高 (mm) 、 Pbl : 空試験溶液のピーク高 (mm)

試料 0.2 - 0.5 g (40 ml 容ネジ蓋式円錐型遠沈管)

1N KOH - エタノール, 10 ml
密閉後、100 で 1 時間加熱
1N HCl 10 ml を加えて弱酸性化
ヘキサン洗淨, 5 ml
2500 rpm, 3 分間遠心分離

水相

有機相

20% EDTA 2 ml を加えて混和
0.01%ジチゾン - トルエン抽出, 5 ml
2500 rpm, 3 分間遠心分離

有機相 1 ml (10 ml 容共栓付円錐型試験管)

水相

アルカリ性硫化ナトリウム逆抽出, 2 ml
1200 rpm, 3 分間遠心分離

水相

有機相

トルエン洗淨, 2 ml
1200 rpm, 3 分間遠心分離

水相

有機相

1N HCl で微酸性化, 3 - 5 滴
N₂ガス通気 (50 ml/min, 3 分間)
Walpole の緩衝液 2 ml を加えて混和
トルエン抽出, 1.0 ml
1200 rpm, 3 分間遠心分離

有機相

水相

1N NaOH 洗淨, 3 ml
暫時静置後下層を除去
1200 rpm, 3 分間遠心分離

有機相

水相

1N HCl で酸性化, 2 滴
1200 rpm, 3 分間遠心分離

塩酸相

ECD - ガスクロマトグラフィー

流れ図 5 . 比較的高濃度の水銀を含む生物試料、特に魚介類中メチル水銀の定量法 (簡便法)

4 - 1 - 3 尿試料

a 試薬

トルエン：残留農薬試験用 $C_6H_5CH_3$

エタノール：特級 C_2H_5OH

蒸留水：イオン交換水を蒸留し、清浄なガラス容器中に保存する。

1N KOH - エタノール溶液：水酸化カリウム 56.11 g をエタノールに溶解し、全量 1000 ml とする（冷暗所保存）。

1N HCl：特級塩酸 90 ml に蒸留水を加え、全量 1000 ml とする。

20% EDTA溶液：特級エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム塩 $C_{10}H_{12}N_2O_8Na_4 \cdot 4H_2O$ 20 g を蒸留水に溶かし、全量 100 ml とする。

1N NaOH：特級水酸化ナトリウム 40 g を蒸留水に溶解し、全量 1000 ml にする。

0.1N NaOH：1N NaOH を蒸留水で 10 倍に希釈する。

0.01%ジチゾン溶液：ジフェニルチオカルバゾン $C_6H_5N:NCSNHNHC_6H_5$ 0.011 g を 200 ml 容分液ロートにとり、トルエン 100 ml に溶解する。これに 0.1N NaOH 50 ml を加えて振り混ぜ、ジチゾンの水相（下相）に移行させる。暫時静置後、下相を共栓付ガラス容器に分取し、1N HCl を滴加して微酸性（黒緑色結晶析出）とした後、トルエン 100 ml を加えて振とうし、精製 0.01%ジチゾン溶液を得る。暫時静置後、下相を吸引除去し、密閉して冷暗所に保存する（用時調製）^{注1}）。

アルカリ性硫化ナトリウム溶液：特級 $Na_2S \cdot 9H_2O$ 0.15 g を 10 ml 容共栓付円錐型遠沈管にとり、蒸留水 10 ml に溶解し硫化ナトリウム原液とする（1 ヶ月毎調製、冷暗所保存）。用時、その 0.1 ml を共栓付ガラス容器にとり、0.1N NaOH 50 ml およびエタノール 50 ml を加えて混和し、アルカリ性硫化ナトリウム溶液とする。この溶液は 1 ml 中 Na_2S 5 μ g を含む。

Walpoleの緩衝液：蒸留水 600 ml に 1M CH_3COONa 200 ml および 1N HCl 約 200 ml を混和し、pH 3.0 に調整する。

0.1% L - システイン溶液：L - システイン - 塩酸塩 $HSCH_2CH(NH_2)COOH \cdot HCl \cdot H_2O$ 10 mg を 0.1N NaOH 10 ml に溶解する（用時調製）。

メチル水銀標準溶液：塩化メチル水銀 CH_3HgCl 12.5 mg をトルエンに溶解し、全量 100 ml とする。更に、これをトルエンで 100 倍に希釈し、メチル水銀標準液とする（密閉して冷暗所保存）。この溶液は 1 ml 中 1000 ng の Hg を含む。

メチル水銀・システイン溶液：10 ml 容共栓付円錐型遠沈管に 0.1% L - システイン溶液 5 ml およびメチル水銀標準溶液 0.5 ml をとり、振とう器を用いて 3 分間振り混ぜ、メチル水銀を水相（下相）に移行させる。1200 rpm で 3 分間遠心分離後、有機相（上相）を吸引除去し、密閉して冷暗所に保存する（1 ヶ月毎調製）。この溶液は 1 ml 中 100 ng の Hg を含む。

無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用無水硫酸ナトリウムを 500 で 2 - 3 時間焼いたもの（デシケーター内保存）

N₂ガス

* 以上の試液のうち、 - 、 、 は使用前に必要な量を取り、半量のトルエンを加えて振とう洗浄し、予めガスクロマトグラフィー測定上妨害となるピークが現れないことを確認しておく。

b 装置および器具

ECD - ガスクロマトグラフ

マルチフローメーター：フローメートマルチキット V4 型（コフロック社製）

遠心分離器

水平往復振とう器（レシプロシェーカー）

マグネチックスターラー

アスピレーター

試験管ミキサー

メスフラスコ：10, 100 および 1000 ml

メスピペット：0.2, 0.5, 1, 5 および 10 ml

パスツールピペット

分液ロート：100, 200 および 1000 ml

共栓付ガラス容器：100, 200 および 500 ml

ネジ蓋式ガラス容器：1000 ml

50 ml 容共栓付丸底遠沈管

10 ml 容共栓付円錐型遠沈管：胴径×全長（16.5 mm×100 mm）

* ガラス器具類は、すべて使用前にトルエンで洗浄し、測定上妨害となるピークが出現しないことを確認しておく。出現した際は 300 で 30 分加熱処理を行う。

【ガスクロマトグラフィー条件】

カラム： 固定相液体：Hg - 20A、固定相担体：Uniport HP（60 - 80 mesh、ジーエルサイエンス社製）、ガラスカラム：3.0 mm×0.75 - 1.0 m、 固定相液体：10% KOCL、固定相担体：Hg - Chromosorb W（AW - DMCS、60 - 80 mesh、ジェイ・サイエンス社製）、ガラスカラム：3.0 mm×0.75 - 1.0 m または 固定相液体：5%ポリジエチレングリコールサクシネート（DEGS）、固定相担体：Chromosorb W（AW - DMCS）、ガラスカラム：3.0 mm×2.0 m。カラム充填後、充填剤上部（注入口側）に、500 で 2 - 3 時間焼いた NaCl を 2 - 3 cm 程度の高さに充填する。

温度：カラム槽 140 - 160 、注入口 180 、検出器槽 200

キャリアーガス：N₂、30 - 40 ml/min

c 試験溶液の調製法

《メチル水銀の抽出》

尿試料(通常 20 ml)を 50 ml容共栓付丸底遠沈管にとり、1N KOH - エタノール溶液 10 mlを加えて 5 分間振とうする。1N HCl 10 mlを加えて酸性化し、更に 20% EDTA溶液 2 mlを加えて混和後^{注2)}、精製 0.01%ジチゾン溶液 5 mlを加えて 3 分間振とう抽出する。1200 rpmで 3 分間遠心分離後、水相(下相)を吸引除去する^{注3)}。トルエン相に無水硫酸ナトリウム 0.5 gを加えて 5 分間振とう後、再び 1200 rpmで 3 分間遠心分離し、水相(下相)を吸引除去する。

《クリーンアップ》

トルエン相に 1N NaOH 3 mlを加えて振とうし、過剰のジチゾン除去する。共栓を付し、1200 rpmで 3 分間遠心分離後、水相(下相)を吸引除去し、更に 1N NaOH 3 mlを加えて 3 分間振とう洗浄する。暫時静置して水相(下相)を吸引除去し、1200 rpmで 3 分間遠心分離して、透明なトルエン相を得る。(トルエン層にエマルジョンが残っている場合には、下相の水相を除去し、無水硫酸ナトリウム約 0.5 gを加えて振とう後、再び遠心分離し下相を除く。)トルエン相の一定量(通常 3 ml)を 10 ml容共栓付円錐型遠沈管に移し、アルカリ性硫化ナトリウム溶液 2 mlを加えて 3 分間振とうし、メチル水銀を水相に逆抽出する^{注4)}。共栓を付し、1200 rpmで 3 分間遠心分離後、トルエン相(上部)のみを注意して吸引除去する。更に水相にトルエン 2 mlを加えて 3 分間振とう洗浄し、再び 1200 rpmで 3 分間遠心分離後、トルエン相(上部)を吸引除去する。これに 1N HCl (3 - 5 滴)を添加して微酸性とし^{注5)}、液中にパスツールピペットを差し込み、マルチフローメーターを用いてN₂ガスを 3 分間通気し(50 ml/min)、溶液中の過剰の硫化物イオンを硫化水素ガスとして追い出す。次いで、Walpoleの緩衝液 2 mlを順次パスツールピペットの先端部分を洗いながら加え、試験管ミキサーで充分混和後、精製 0.01%ジチゾン溶液の一定量(0.2 - 1.0 ml、通常 0.5 ml)を加えて振とうし、メチル水銀を抽出する。1200 rpmで 3 分間遠心分離後、水相(下相)を吸引除去し、トルエン相に 1N NaOH 3 mlを加えて 3 分間振とう洗浄する(過剰のジチゾン除去)。暫時静置後、水相(下相)を吸引除去し、1200 rpmで 3 分間遠心分離後、更に水相(下相)を可及的に吸引除去する。次いで、トルエン相に 1N HCl 2 滴を加え、試験管ミキサーで攪拌して酸性化し、1200 rpmで 3 分間遠心分離する。塩酸相(下相)を吸引除去し、試験溶液とする。

別に、メチル水銀・システイン溶液 0 および 0.10 ml (Hg として 10 ng に相当) について試験溶液調製法に従って操作し、それぞれ空試験溶液およびメチル水銀標準試験溶液とする。いずれも試験溶液調製後は冷暗所に保存する。

d 試験操作および計算

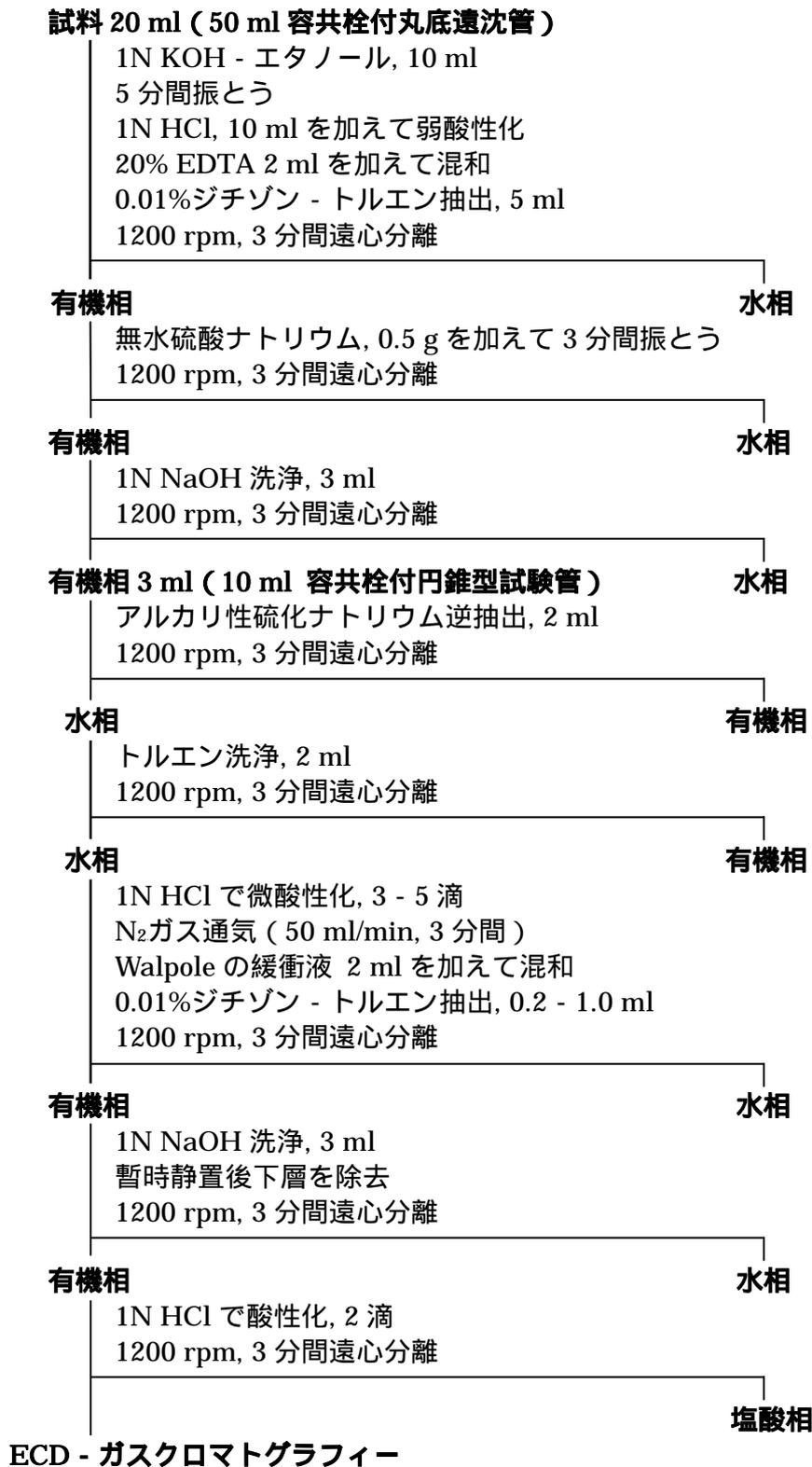
空試験溶液、メチル水銀標準試験溶液および試験溶液の各一定量(通常 5 μl)を、マイク

ロシリンジを用いてガスクロマトグラフに注入し、得られたピーク高をそれぞれ Pbl, Pstd および Ps とすると、尿試料中メチル水銀濃度 (ng/ml) は次式により算出される。

$$\text{尿試料中メチル水銀濃度 (ng/ml)} = 10 \text{ ng} \times (\text{Ps-Pbl}) / (\text{Pstd-Pbl}) \times 1 / \text{試料量(ml)}$$

【注解】

- 1) ジチゾン (ジフェニルチオカルバゾン) は酸化を受けやすく、通常その酸化体 (ジフェニルチオカルバジアゾン) が不純物として含まれガスクロマトグラム上に妨害ピークを与えるため、純粋なジチゾンのみがアルカリ溶液に水溶性の塩を作って溶ける性質を利用し、これを用時精製して使用する。
- 2) ジチゾン抽出に先立って EDTA 溶液を加えて振とう混合するのは、金属イオンなどを隠蔽するためである。
- 3) 試験管内の上相または下相を除去するには、柔軟性のあるチューブを付属させたパストゥールピペット、廃液溜およびアスピレーターをやや肉厚のシリコンチューブで連結した、図 2 に示すような液相分離用吸引除去装置を用いると便利である。即ち、上相 (有機相) を除去する場合には、アスピレーターで吸引しながら、パストゥールピペットの先端部を上相の表層部に位置させながら試験管の内壁に沿って吸引し、その大部分を除去する。上相が残り僅かになった時点で、パストゥールピペットの先端部を有機相の表面から数 mm 程度離して吸引を続けると、下相 (水相) に比べて比重が小さく、揮散性の高い有機相のみが空気と共に吸い上げられ、ほぼ定量的に有機相を分離することができる。一方、二相に分離した試験管内の下相を除去する場合には、柔軟性のあるチューブを指で押えてパストゥールピペットからの吸引を止めた状態で、その先端部を試験管の底部に位置させ、指によるチューブの押えを加減しながら、下相を緩やかに吸い上げる。それがほぼ完全になくなった時点で、指で押えて吸引を止めパストゥールピペットを取り出すと、下相のみを除去することができる。この一連の操作はある程度の熟練と正確性が要求されるので、実際に適用するに当たっては、個々の操作について予め十分に習熟しておくこと。
- 4) トルエン相中のメチル水銀ジチゾネートは過剰の硫化物イオンと反応して水溶性の錯塩を形成し水相に移行するが、一回の操作で定量的に効率よく抽出するためには、硫化ナトリウムのアルカリ性エタノール溶液でなければならない。
- 5) 溶液の微酸性化に必要な 1N HCl 添加量を確認するには、予め別の 10 ml 容試験管にアルカリ性硫化ナトリウム溶液 2 ml をとり、pH 指示薬として 0.01% ジチゾン溶液数滴を加えて混和したものを調製し、これに 1N HCl を滴下して液相の色調が黄色から青色に変化するに要した滴数を 1N HCl の添加量とすればよい。



流れ図 6 . 尿試料中メチル水銀の定量法

4-1-4 底質・土壌試料

a 試薬

トルエン：残留農薬試験用 $C_6H_5CH_3$

エタノール：特級 C_2H_5OH

蒸留水：イオン交換水を蒸留し、清浄なガラス容器中に保存する。

1N KOH - エタノール溶液：水酸化カリウム 56.11 g をエタノールに溶解し、全量 1000 ml とする（冷暗所保存）。

1N HCl：特級塩酸 90 ml に蒸留水を加え、全量 1000 ml とする。

20% $NH_2OH \cdot HCl$ 溶液：塩酸ヒドロキシルアミン 20 g を蒸留水に溶かし、全量 100 ml とする。

20% EDTA 溶液：特級エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム塩 $C_{10}H_{12}N_2O_8Na_4 \cdot 4H_2O$ 20 g を蒸留水に溶かし、全量 100 ml とする。

1N NaOH：特級水酸化ナトリウム 40 g を蒸留水に溶解し、全量 1000 ml にする。

0.1N NaOH：1N NaOH を蒸留水で 10 倍に希釈する。

0.01% ジチゾン溶液：ジフェニルチオカルバゾン $C_6H_5N:NCSNHHC_6H_5$ 0.011 g を 200 ml 容分液ロートにとり、トルエン 100 ml に溶解する。これに 0.1N NaOH 50 ml を加えて振り混ぜ、ジチゾンを経相（下相）に移行させる。暫時静置後、下相を共栓付ガラス容器に分取し、1N HCl を滴加して微酸性（黒緑色結晶析出）とした後、トルエン 100 ml を加えて振とうし、精製 0.01% ジチゾン溶液を得る。暫時静置後、下相を吸引除去し、密閉して冷暗所に保存する（用時調製）^{注1)}。

アルカリ性硫化ナトリウム溶液：特級 $Na_2S \cdot 9H_2O$ 0.15 g を 10 ml 容共栓付円錐型遠沈管にとり、蒸留水 10 ml に溶解し硫化ナトリウム原液とする（1 ヶ月毎調製、冷暗所保存）。用時、その 0.1 ml を共栓付ガラス容器にとり、0.1N NaOH 50 ml およびエタノール 50 ml を加えて混和し、アルカリ性硫化ナトリウム溶液とする。この溶液は 1 ml 中 Na_2S 5 μg を含む。

Walpole の緩衝液：蒸留水 600 ml に 1M CH_3COONa 200 ml および 1N HCl 約 200 ml を混和し、pH 3.0 に調整する。

無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用無水硫酸ナトリウムを 500 で 2 - 3 時間焼いたもの（デシケーター内保存）。

0.1% L - システイン溶液：L - システイン - 塩酸塩 $HSCH_2CH(NH_2)COOH \cdot HCl \cdot H_2O$ 10 mg を 0.1N NaOH 10 ml に溶解する（用時調製）。

メチル水銀標準溶液：塩化メチル水銀 CH_3HgCl 12.5 mg をトルエンに溶解し、全量 100 ml とする。更に、これをトルエンで 100 倍に希釈し、メチル水銀標準液とする（密閉して冷暗所保存）。この溶液は 1 ml 中 1000 ng の Hg を含む。

メチル水銀・システイン溶液：10 ml 容共栓付円錐型遠沈管に 0.1% L - システイン溶液

5 ml およびメチル水銀標準溶液 0.5 ml をとり、振とう器を用いて 3 分間振り混ぜ、メチル水銀を水相（下相）に移行させる。1200 rpm で 3 分間遠心分離後、有機相（上相）を吸引除去し、密閉して冷暗所に保存する（1 ヶ月毎調製）。この溶液は 1 ml 中 100 ng の Hg を含む。

フロリジル：カラムクロマトグラフィー用フロリジル（60 - 100 mesh）を 130 で 2 - 3 時間焼いたもの（デシケーター内保存）

フロリジルカラム：フロリジル（60 - 100 mesh）0.5 g および無水硫酸ナトリウム 0.5 g を順次充填したガラスカラム（内径 8 mm × 高さ 150 mm）

N₂ガス

* 以上の試液のうち、
、
は使用前に必要な量を取り、半量のトルエンを加えて振とう洗浄し、予めガスクロマトグラフィー測定上妨害となるピークが現れないことを確認しておく。

b 装置および器具

ECD - ガスクロマトグラフ

マルチフローメーター：フローメートマルチキット V4 型（コフロック社製）

遠心分離器

水平往復振とう器（レシプロシェーカー）

超音波装置

マグネチックスターラー

アスピレーター

試験管ミキサー

メスフラスコ：10, 100 および 1000 ml

メスピペット：0.2, 0.5, 1, 5 および 10 ml

パスツールピペット

分液ロート：100, 200 および 1000 ml

共栓付ガラス容器：100, 200 および 500 ml

ネジ蓋式ガラス容器：1000 ml

50 ml 容ネジ蓋式丸底遠沈管

10 ml 容共栓付円錐型遠沈管：胴径 × 全長（16.5 mm × 100 mm）

脱脂綿

磁性るつぼ

ガラスカラム（内径 8 mm × 高さ 150 mm）

* ガラス器具類は、すべて使用前にトルエンで洗浄し、測定上妨害となるピークが出現しないことを確認しておく。出現した際には、300 で 30 分加熱処理を行う。

【ガスクロマトグラフィー条件】

カラム： 固定相液体：Hg - 20A、固定相担体：Uniport HP（60 - 80 mesh、ジーエルサイエンス社製）、ガラスカラム：3.0 mm×0.75 - 1.0 m、 固定相液体：10% KOCL、固定相担体：Hg - Chromosorb W（AW - DMCS、60 - 80 mesh、ジェイ・サイエンス社製）、ガラスカラム：3.0 mm×0.75 - 1.0 mまたは 固定相液体：5%ポリジエチレングリコールサクシネート（DEGS）、固定相担体：Chromosorb W（AW - DMCS）、ガラスカラム：3.0 mm×2.0 m。カラム充填後、充填剤上部（注入口側）に、500 で2 - 3時間焼いたNaClを2 - 3 cm程度の高さに充填する。

温度：カラム槽 140 - 160 、注入口 180 、検出器槽 200

キャリアーガス：N₂、30 - 40 ml/min

c 試験溶液の調製法

《メチル水銀の抽出》

均質化した試料（通常湿重量として0.2 - 0.5 g、乾燥試料の場合0.2 g前後）を50 ml容ネジ蓋式丸底遠沈管の底部に精秤する（乾燥試料の場合、精秤後蒸留水0.5 mlを加えて浸潤させておく）。1N KOH - エタノール溶液10 mlを加えてガラス棒で充分攪拌粉碎後、更に20分間超音波による底質・土壌粒子の破碎を行う。振とう器を用いて10分間振とう後、1N HCl 10 mlを加えてマグネチックスターラーで攪拌しながら、N₂ガス（100 ml/min）を5分間通気する。次いで、20% NH₂OH・HCl溶液2 mlおよび20% EDTA溶液2 mlを順次加えて振とう混和し^{注2)}、精製0.01%ジチゾン溶液5 mlを加えて3分間振とう抽出する。2500 rpmで3分間遠心分離後、先端に少量の脱脂綿を巻きつけた5 mlメスピペットを用いて下相を混入させないように注意してトルエン相を4 ml以上分取し、フロリジルカラムを通して、流出液を10 ml容共栓付円錐型遠沈管に受ける。

《クリーンアップ》

トルエン相に1N NaOH 3 mlを加えて3分間振とうし、過剰のジチゾンを水相に移行させる。1200 rpmで3分間遠心分離後、下相を可及的に吸引除去し^{注3)}、再びトルエン相に1N NaOH 3 mlを加えて同様に振とう洗浄する。暫時静置して下相を吸引除去し、1200 rpmで3分間遠心分離した後、トルエン相の一定量（通常3 ml）を別に用意した10 ml容共栓付円錐型遠沈管に移し、アルカリ性硫化ナトリウム溶液2 mlを加えて3分間振とうし、メチル水銀を水相に逆抽出する^{注4)}。共栓を付し、1200 rpmで3分間遠心分離後、トルエン相（上相）のみを注意して吸引除去する。更に水相にトルエン2 mlを加えて3分間振とう洗浄し、同様に遠心分離後トルエン相（上相）を吸引除去する。これに1N HCl（3 - 5滴）を添加して微酸性とし^{注5)}、液中にパスツールピペットを差し込み、マルチフローメーターを用いてN₂ガスを3分間通気し（50 ml/min）、溶液中の過剰の硫化物イオンを硫化水素ガスとして追い出す。次いで、Walpoleの緩衝液2 mlを順次パスツールピペットの先端部分を洗いながら加え、試験管ミキサーで充分混和後、精製0.01%ジチゾン溶液の一定量（0.2 -

1.0 ml、通常 0.5 ml) を加えて振とうし、メチル水銀を抽出する。1200 rpmで 3 分間遠心分離後、水相(下相)を吸引除去し、トルエン相に 1N NaOH 3 mlを加えて振とうし洗浄する(過剰のジチゾン除去)。暫時静置後、水相(下相)を吸引除去し、1200 rpmで 3 分間遠心分離後、さらに水相(下相)を可及的に吸引除去する。次いで、トルエン相に 1N HCl 2 滴を加え、試験管ミキサーで攪拌して酸性化し、1200 rpmで 3 分間遠心分離する。塩酸相(下相)を吸引除去し、試験溶液とする。

別に、試料中の水銀濃度に応じてメチル水銀・システイン溶液 0 - 0.20 ml (Hg として 0 - 0.020 μg に相当)を段階的にとり、試験溶液調製法に従って操作し、それぞれ検量線用メチル水銀標準試験溶液とする。いずれも試験溶液調製後は冷暗所に保存する。

また、湿試料の場合、分析用試料採取時に、重量既知の磁性るつぼに試料約 10 - 20 g を精秤し、105 の乾燥器に入れて 2 - 3 時間乾燥する。デシケーター中で放冷後、秤量して湿重量/乾重量の比(WW/DW)を求めておく。

d 試験操作および計算

試験溶液(またはそのトルエン希釈液)および検量線用メチル水銀標準試験溶液の各一定量(通常 2 - 5 μl)を、マイクロシリンジを用いてガスクロマトグラフに注入し、試験溶液のピーク高を標準試験溶液から得られる検量線に照らして試料中湿重量当りのメチル水銀濃度($\mu\text{g/g}$)を算出し、これを湿重量/乾重量の比から試料中乾重量当りのメチル水銀濃度($\mu\text{g/g}$)に換算する^{注6)}。

【注解】

- 1) ジチゾン(ジフェニルチオカルバゾン)は酸化を受けやすく、通常その酸化体(ジフェニルチオカルバジアゾン)が不純物として含まれガスクロマトグラム上に妨害ピークを与えるため、純粋なジチゾンのみがアルカリに溶ける性質を利用し、これを用時精製して使用する。
- 2) ジチゾン抽出に先立って塩酸ヒドロキシルアミンおよび EDTA 溶液を加え振とう混合するのは、試料中に含まれる酸化性物質、他の金属イオン等を隠蔽し、抽出時におけるジチゾンの不必要な消費・分解を防ぐためである。
- 3) 試験管内の上相または下相を除去するには、柔軟性のあるチューブを付属させたパスツールピペット、廃液溜およびアスピレーターをやや肉厚のシリコンチューブで連結した、図 2 に示すような液相分離用吸引除去装置を用いると便利である。即ち、上相(有機相)を除去する場合には、アスピレーターで吸引しながら、パスツールピペットの先端部を上相の表層部に位置させながら試験管の内壁に沿って吸引し、その大部分を除去する。上相が残り僅かになった時点で、パスツールピペットの先端部を有機相の表面から数 mm 程度離して吸引を続けると、下相(水相)に比べて比重が小さく、揮散性の高い有機相のみが空気と共に吸い上げられ、ほぼ定量的に有機相を分離することができる。一方、二相に

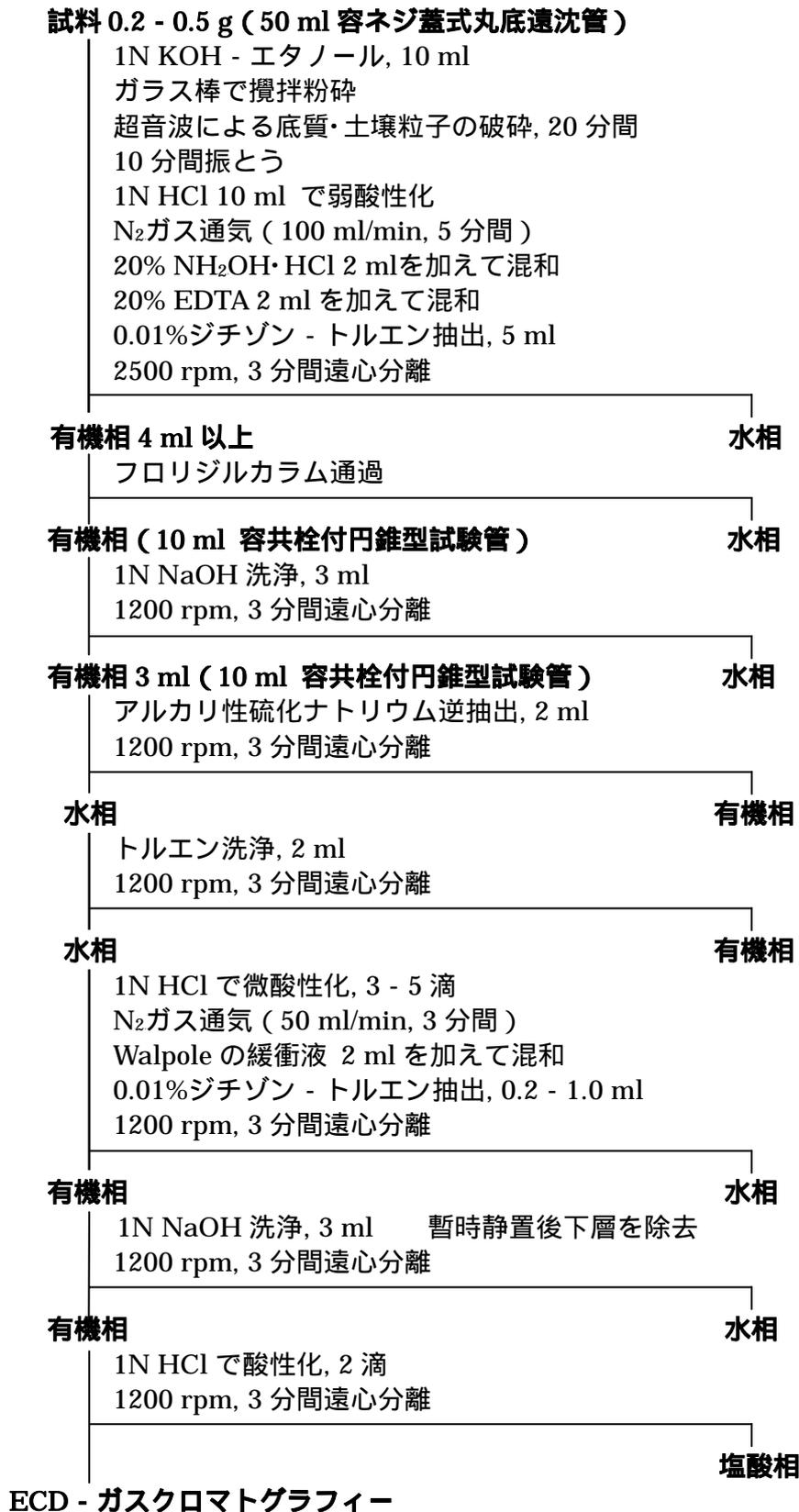
分離した試験管内の下相を除去する場合には、柔軟性のあるチューブを指で押えてパスツールピペットからの吸引を止めた状態で、その先端部を試験管の底部に位置させ、指によるチューブの押えを加減しながら、下相を緩やかに吸い上げる。それがほぼ完全になくなった時点で、指で押えて吸引を止めパスツールピペットを取り出すと、下相のみを除去することができる。この一連の操作はある程度の熟練と正確性が要求されるので、実際に適用するに当たっては、個々の操作について予め十分に習熟しておくこと。

- 4) トルエン相中のメチル水銀ジチゾネートは過剰の硫化物イオンと反応して水溶性の錯塩を形成し水相に移行するが、一回の操作で定量的に効率よく抽出するためには、硫化ナトリウムのアルカリ性エタノール溶液でなければならない。
- 5) 溶液の微酸性化に必要な 1N HCl 添加量を確認するには、予め別の 10 ml 容試験管にアルカリ性硫化ナトリウム溶液 2 ml をとり、pH 指示薬として 0.01% ジチゾン溶液数滴を加えて混和したものを調製し、これに 1N HCl を滴下して液相の色調が黄色から青色に変化するに要した滴数を 1N HCl の添加量とすればよい。
- 6) 検量線作成用メチル水銀標準試験溶液の測定によって直線性が確認されれば、その範囲内の点、例えば 0.02 $\mu\text{g Hg}$ の標準試験溶液のピーク高 (Pstd) を用い、次式により試料中乾重量当たりのメチル水銀濃度 ($\mu\text{g/g}$) を算出してもよい。

試料中メチル水銀濃度 ($\mu\text{g/g}$) = $0.020 \mu\text{g} \times (\text{Ps}-\text{Pbl})/(\text{Pstd}-\text{Pbl}) \times 1/\text{試料量}(\text{g}) \times \text{WW}/\text{DW}$

Ps : 試験溶液のピーク高 (mm) 、 Pbl : 空試験溶液のピーク高 (mm)

WW/DW : 湿重量/乾重量の比



流れ図 7 . 底質・土壌試料中メチル水銀の定量法

4-1-5 水試料

本法は、水試料中の総水銀分析の場合と同様に、硫酸酸性下で過マンガン酸カリウム処理によりイオン化された水銀化合物をジチゾン - トルエンで抽出して濃縮後、抽出物中のメチル水銀を一旦アルカリ性硫化ナトリウム溶液に転溶し、ジチゾン - トルエンで再抽出することによってクリーンアップして最終的に ECD - ガスクロマトグラフィーにより定量するものである。

a 試薬

トルエン：残留農薬試験用 $C_6H_5CH_3$

エタノール：特級 C_2H_5OH

蒸留水：イオン交換水を蒸留し、清浄なガラス容器中に保存する。

20N H_2SO_4 ：1L 容メスフラスコに約 350 ml の蒸留水を取り、氷水中で攪拌しながら濃硫酸（有害金属測定用）600 ml を除々に加え、蒸留水で全量 1000 ml とする。

10N NaOH：特級水酸化ナトリウム 400 g を蒸留水に溶解し、全量 1000 ml とする。

0.5% $KMnO_4$ 溶液：過マンガン酸カリウム 0.5 g を蒸留水にとかし、全量 100 ml とする。

10% $NH_2OH \cdot HCl$ 溶液：塩酸ヒドロキシルアミン 10 g を蒸留水に溶かし、全量 100 ml とする。

10% EDTA 溶液：特級エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム塩 $C_{10}H_{12}N_2O_8Na_4 \cdot 4H_2O$ 10 g を蒸留水に溶かし、全量 100 ml とする。

1N HCl：特級塩酸 90 ml に蒸留水を加え、全量 1000 ml とする。

1N NaOH：特級水酸化ナトリウム 40 g を蒸留水に溶解し、全量 1000 ml にする。

0.1N NaOH：1N NaOH を蒸留水で 10 倍に希釈する。

0.01% ジチゾン溶液：ジフェニルチオカルバゾン $C_6H_5N:NCSNH(NHC_6H_5)$ 0.011 g を 200 ml 容分液ロートにとり、トルエン 100 ml に溶解する。これに 0.1N NaOH 50 ml を加えて振り混ぜ、ジチゾンを水相（下相）に移行させる。暫時静置後、下相を共栓付ガラス容器に分取し、1N HCl を滴加して微酸性（黒緑色結晶析出）とした後、トルエン 100 ml を加えて振とうし、精製 0.01% ジチゾン溶液を得る。暫時静置後、下相を吸引除去し、密閉して冷暗所に保存する（用時調製）^{注1)}。

アルカリ性硫化ナトリウム溶液：特級 $Na_2S \cdot 9H_2O$ 0.15 g を 10 ml 容共栓付円錐型遠沈管にとり、蒸留水 10 ml に溶解し硫化ナトリウム原液とする（1 ヶ月毎調製、冷暗所保存）。用時、その 0.1 ml を共栓付ガラス容器にとり、0.1N NaOH 50 ml およびエタノール 50 ml を加えて混和し、アルカリ性硫化ナトリウム溶液とする。この溶液は 1 ml 中 Na_2S 5 μg を含む。

Walpole の緩衝液：蒸留水 600 ml に 1M CH_3COONa 200 ml および 1N HCl 約 200 ml を混和し、pH 3.0 に調整する。

0.1% L - システイン溶液：L - システイン - 塩酸塩 $HSCH_2CH(NH_2)COOH \cdot HCl \cdot H_2O$

10 mgを 0.1N NaOH 10 mlに溶解する（用時調製）。

メチル水銀標準溶液：塩化メチル水銀 CH_3HgCl 12.5 mgをトルエンに溶解し、全量 100 mlとする。更に、これをトルエンで 100 倍に希釈し、メチル水銀標準液とする（密閉して冷暗所保存）。この溶液は 1 ml中 1000 ngのHgを含む。

メチル水銀・システイン溶液：10 ml 容共栓付円錐型遠沈管に 0.1% L - システイン溶液 5 ml およびメチル水銀標準溶液 0.5 ml をとり、振とう器を用いて 3 分間振り混ぜ、メチル水銀を水相（下相）に移行させる。1200 rpm で 3 分間遠心分離後、有機相（上相）を吸引除去し、密閉して冷暗所に保存する（1 ヶ月毎調製）。この溶液は 1 ml 中 100 ng の Hg を含む。

無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用無水硫酸ナトリウムを 500 で 2 - 3 時間焼いたもの（デシケーター内保存）。

N_2 ガス

* 以上の試液のうち、
、
は使用前に必要量を取り、半量のトルエンを加えて振とう洗浄し、予めガスクロマトグラフィー測定上妨害となるピークが現れないことを確認しておく。

b 装置および器具

ECD - ガスクロマトグラフ

マルチフローメーター：フローメートマルチキット V4 型（コフロック社製）

遠心分離器

水平往復振とう器（レシプロシェーカー）

マグネチックスターラー

アスピレーター

試験管ミキサー

メスフラスコ：10, 100 および 1000 ml

メスピペット：0.2, 0.5, 5 および 10 ml

パスツールピペット

分液ロート：100, 200, 1000 および 2000 ml

共栓付ガラス容器：100, 200 および 500 ml

ネジ蓋式ガラス容器：1000 ml

35 ml 容共栓付円錐型遠沈管

10 ml 容共栓付円錐型遠沈管：胴径×全長（16.5 mm×100 mm）

* ガラス器具類は、すべて使用前にトルエンで洗浄し、測定上妨害となるピークが出現しないことを確認しておく。出現した際には、300 で 30 分加熱処理を行う。

【ガスクロマトグラフィー条件】

カラム： 固定相液体：Hg - 20A、固定相担体：Uniport HP（60 - 80 mesh、ジーエル

サイエンス社製)、ガラスカラム：3.0 mm×0.75 - 1.0 m、固定相液体：10% KOCL、固定相担体：Hg - Chromosorb W (AW - DMCS、60 - 80 mesh、ジェイ・サイエンス社製)、ガラスカラム：3.0 mm×0.75 - 1.0 m または 固定相液体：5%ポリジエチレングリコールサクシネート (DEGS)、固定相担体：Chromosorb W (AW - DMCS)、ガラスカラム：3.0 mm×2.0 m。カラム充填後、充填剤上部 (注入口側) に、500 で 2 - 3 時間焼いた NaCl を 2 - 3 cm 程度の高さに充填する。

温度：カラム槽 140 - 160 、注入口 180 、検出器槽 200

キャリアーガス：N₂、30 - 40 ml/min

c 試験溶液の調製法

《メチル水銀の抽出》

2L容分液ロートに水試料 2Lをとり、20N H₂SO₄ 10 mlおよび 0.5% KMnO₄溶液 5 mlを順次加えて混和し、5 分間放置する。10N NaOH 20 mlで中和後、10% NH₂OH・HCl溶液 5 mlを加えて数秒間振とう混和し、20 分間放置する。次いで、10% EDTA溶液 5 mlを加えて混和後^{注2)}、精製 0.01%ジチゾン溶液 10 mlを加えて 1 分間激しく振とう抽出する。直射日光を避け、少なくとも 1 時間以上静置後、コックを開いて水相 (下相) を捨てる。

《クリーンアップ》

トルエン相を 35 ml容共栓付円錐型遠沈管に可及的に移し、共栓を付して 1200 rpm で 3 分間遠心分離し、水相 (下相) を吸引除去する^{注3)} (ろ過しない全水を用いての分析で、エマルジョンが残っている場合には、下相の水相を除去し、無水硫酸ナトリウム約 0.5 gを加えて振とう後、再び遠心分離し下相を除く)。次いで、1N NaOH 5 mlを加えて 3 分間振とう洗浄し、過剰のジチゾンを除去する。1200 rpmで 3 分間遠心分離後、水相 (下相) を吸引除去し、再度 1N NaOH 5 mlを加えてこの洗浄操作を繰り返し、遠心分離後下相を吸引除去する。トルエン相の一定量 (通常 7 ml) を 10 ml容共栓付円錐型遠沈管に移し、アルカリ性硫化ナトリウム溶液 2 mlを加えて 3 分間振とうし、メチル水銀を水相に逆抽出する^{注4)}。共栓を付し 1200 rpmで 3 分間遠心分離後、トルエン相 (上相) のみを注意して吸引除去する。更に水相にトルエン 2 mlを加えて 3 分間振とう洗浄し、再び 1200 rpmで 3 分間遠心分離してトルエン相 (上相) を吸引除去する。これに 1N HCl (3 - 5 滴) を添加して微酸性とし^{注5)}、液中にパスツールピペットを差し込み、マルチフローメーターを用いてN₂ガスを 3 分間通気し (50 ml/min)、溶液中の過剰の硫化物イオンを硫化水素ガスとして追い出す。次いで、Walpoleの緩衝液 2 mlを順次パスツールピペットの先端部分を洗いながら加え、試験管ミキサーで充分混和後、精製 0.01%ジチゾン溶液の一定量 (通常 0.2 ml) を加えて振とうし、メチル水銀を抽出する。1200 rpmで 3 分間遠心分離後、水相 (下相) を吸引除去し、トルエン相に 1N NaOH 3 mlを加えて振とう洗浄する (過剰のジチゾン除去)。暫時静置して二相に分離するのを待って水相 (下相) を吸引除去し、1200 rpmで 3 分間遠

心分離後、更に水相を可及的に吸引除去する。次いでトルエン相に 1N HCl 2 滴を加え、試験管ミキサーで攪拌して酸性化し、1200 rpm で 3 分間遠心分離する。塩酸相（下相）を吸引除去し、試験溶液とする。

別に、水試料の中から水銀含有量の低いものを選び、3 本の 2L 容分液ロートに 2L ずつ分取する。各々にメチル水銀・システイン溶液 0、0.01 および 0.02 ml（それぞれ Hg として 0、1.0 および 2.0 ng に相当）を加え、以下試験溶液調製法に従って操作し、それぞれ空試験溶液およびメチル水銀標準試験溶液とする。いずれも試験溶液調製後は冷暗所に保存する。

d 試験操作および計算

試験溶液（またはその希釈液）およびメチル水銀標準試験溶液の各一定量（通常 2 - 5 μ l）を、マイクロシリンジを用いてガスクロマトグラフに注入し、試験溶液のピーク高を標準試験溶液から得られる検量線に照らして水試料中メチル水銀濃度（ng Hg/L）を算出する。或いは、検量線作成用メチル水銀標準試験溶液の測定によって直線性が確認されれば、その範囲内の点、例えば 2 ng Hg の標準試験溶液のピーク高（Pstd）を用い、次式により試料中メチル水銀濃度を算出してもよい。

$$\text{試料水中メチル水銀濃度 (ng/L)} = 2 \text{ ng} \times P_s / (P_{\text{std}} - P_{\text{bl}}) \times \text{希釈倍数} \times 1 / \text{試料水量(L)}$$

P_s : 試験溶液のピーク高 (mm) P_{bl} : 空試験溶液のピーク高 (mm)

【注解】

- 1) ジチゾン（ジフェニルチオカルバゾン）は酸化を受けやすく、通常その酸化体（ジフェニルチオカルバジアゾン）が不純物として含まれガスクロマトグラム上に妨害ピークを与えるため、純粋なジチゾンのみがアルカリ溶液に水溶性の塩を作って溶ける性質を利用し、これを用時精製して使用する。
- 2) 水試料についての試験溶液調製法において、塩酸ヒドロキシルアミンを加えるのは過マンガン酸カリウムの酸化力を中和し、EDTA 溶液の添加は試料中に存在する他の金属イオンを隠蔽するためである。いずれも、ジチゾン溶液を用いて水試料から水銀を抽出する際の妨害を防ぐ目的で添加される。
- 3) 試験管内の上相または下相を除去するには、柔軟性のあるチューブを付属させたパスツールピペット、廃液溜およびアスピレーターをやや肉厚のシリコンチューブで連結した、図 2 に示すような液相分離用吸引除去装置を用いると便利である。即ち、上相（有機相）を除去する場合には、アスピレーターで吸引しながら、パスツールピペットの先端部を上相の表層部に位置させながら試験管の内壁に沿って吸引し、その大部分を除去する。上相が残り僅かになった時点で、パスツールピペットの先端部を有機相の表面から数 mm 程度離して吸引を続けると、下相（水相）に比べて比重が小さく、揮散性の高い有機相のみが空気と共に吸い上げられ、ほぼ定量的に有機相を分離することができる。一方、二相に

分離した試験管内の下相を除去する場合には、柔軟性のあるチューブを指で押えてパスツールピペットからの吸引を止めた状態で、その先端部を試験管の底部に位置させ、指によるチューブの押えを加減しながら、下相を緩やかに吸い上げる。それがほぼ完全になくなった時点で、指で押えて吸引を止めパスツールピペットを取り出すと、下相のみを除去することができる。この一連の操作はある程度の熟練と正確性が要求されるので、実際に適用するに当たっては、個々の操作について予め十分に習熟しておくこと。

- 4) トルエン相中のメチル水銀ジチゾネートは過剰の硫化物イオンと反応して水溶性の錯塩を形成し水相に移行するが、一回の操作で効率よく抽出するためには、硫化ナトリウムのアルカリ性エタノール溶液でなければならない。
- 5) 溶液の微酸性化に必要な 1N HCl 添加量を確認するには、予め別の 10 ml 容試験管にアルカリ性硫化ナトリウム溶液 2 ml をとり、pH 指示薬として 0.01%ジチゾン溶液数滴を加えて混和したものを調製し、これに 1N HCl を滴下して液相の色調が黄色から青色に変化するに要した滴数を 1N HCl の添加量とすればよい。

試料 2L (2L 分液ポート)

20N H₂SO₄ 10 mlで酸性化
0.5% KMnO₄ 5 mlを加えて混和後、5 分間放置
10N NaOH 20 ml で中和
10% NH₂OH・HCl 5 mlを加えて混和後、20 分間放置
10% EDTA 5 ml を加えて混和
0.01%ジチゾン - トルエン抽出, 10 ml
1 時間以上静置

有機相 (35 ml 容共栓付円錐型遠沈管)

水相

(エマルジョンが形成されている場合、
無水Na₂SO₄ 0.5 gを加えて振とう)
1200 rpm, 3 分間遠心分離

有機相

水相

1N NaOH 洗浄, 5 ml
1200 rpm, 3 分間遠心分離

有機相 7 ml (10 ml 容共栓付円錐型試験管)

水相

アルカリ性硫化ナトリウム逆抽出, 2 ml
1200 rpm, 3 分間遠心分離

水相

有機相

トルエン洗浄, 2 ml
1200 rpm, 3 分間遠心分離

水相

有機相

1N HCl で微酸性化, 3 - 5 滴
N₂ガス通気 (50 ml/min, 3 分間)
Walpole の緩衝液 2 ml を加えて混和
0.01%ジチゾン - トルエン抽出, 0.2 ml
1200 rpm, 3 分間遠心分離

有機相

水相

1N NaOH 洗浄, 3 ml
暫時静置後下層を除去
1200 rpm, 3 分間遠心分離

有機相

水相

1N HCl で酸性化, 2 滴
1200 rpm, 3 分間遠心分離

塩酸相

ECD - ガスクロマトグラフィー

流れ図 8 . 水試料中メチル水銀の定量法

4 - 2 塩酸溶出 - トルエン抽出 - ECD - ガスクロマトグラフィー法による定量

毛髪試料については既述の方法と異なり、より簡便にメチル水銀分析を行うことができる。すなわち、本法は試料を 2N 塩酸に浸漬し、100℃ で 5 分間加熱処理して試料中メチル水銀を溶出させ、これをトルエンで抽出し ECD - ガスクロマトグラフィーにより定量するものである。

4 - 2 - 1 毛髪試料

試料数十 mg をビーカーにとり、中性洗剤 (100 倍希釈) および蒸留水で洗浄し、更に少量のアセトンを加えて水分をとり、減圧下にアセトンを除く。次いで、試料を 20 ml 容バイアル瓶に移し、解剖用鉏で細切する。

a 試薬

トルエン：残留農薬試験用 $C_6H_5CH_3$

エタノール：特級 C_2H_5OH

蒸留水：イオン交換水を蒸留し、清浄なガラス容器中に保存する。

2N HCl：特級塩酸 180 ml に蒸留水を加え、全量 1000 ml とする。

1N NaOH：特級水酸化ナトリウム 40 g を蒸留水に溶解し、全量 1000 ml にする。

0.1N NaOH：1N NaOH を蒸留水で 10 倍に希釈する。

0.1% L - システイン溶液：L - システイン - 塩酸塩 $HSCH_2CH(NH_2)COOH \cdot HCl \cdot H_2O$ 10 mg を 0.1N NaOH 10 ml に溶解する (用時調製) 。

メチル水銀標準溶液：塩化メチル水銀 CH_3HgCl 12.5 mg をトルエンに溶解し、全量 100 ml とする。更に、これをトルエンで 100 倍に希釈し、メチル水銀標準液とする (密閉して冷暗所保存) 。この溶液は 1 ml 中 1000 ng の Hg を含む。

メチル水銀・システイン溶液：10 ml 容共栓付円錐型遠沈管に 0.1% L - システイン溶液 2 ml およびメチル水銀標準溶液 2 ml をとり、振とう器を用いて 3 分間振り混ぜ、メチル水銀を水相 (下相) に移行させる。1200 rpm で 3 分間遠心分離後、有機相 (上相) を吸引除去し、密閉して冷暗所に保存する (1 ヶ月毎調製) 。この溶液は 1 ml 中 1000 ng の Hg を含む。

* 以上の試液のうち、
、
は使用前に必要量を取り、半量のトルエンを加えて振とう洗浄し、予めガスクロマトグラフィー測定上妨害となるピークが現れないことを確認しておく。

b 装置および器具

ECD - ガスクロマトグラフ

遠心分離器

水平往復振とう器（レシプロシェーカー）

恒温槽：ポリエチレングリコール 400 を使用

アスピレーター

メスフラスコ：10, 100 および 1000 ml

メスピペット：0.2, 1, 5 および 10 ml

パスツールピペット

分液ロート：1000 ml

共栓付ガラス容器：500 ml

ビーカー：100 ml

10 ml 容ネジ蓋式丸底遠沈管：胴径×全長×口内径（16.5 mm×105 mm×10 mm）

10 ml 容共栓付円錐型遠沈管：胴径×全長（16.5 mm×100 mm）

バイアル瓶：20 ml 容シンチレーションバイアル

ガラスウールまたは脱脂綿

解剖鉗

* ガラス器具類は、すべて使用前にトルエンで洗浄し、測定上妨害となるピークが出現しないことを確認しておく。出現した際には、300 ℃ で 30 分加熱処理を行う。

【ガスクロマトグラフィー条件】

カラム： 固定相液体：Hg - 20A、固定相担体：Uniport HP（60 - 80 mesh、ジーエルサイエンス社製） ガラスカラム：3.0 mm×0.75 - 1.0 m、 固定相液体：10% KOCL、固定相担体：Hg - Chromosorb W（AW - DMCS、60 - 80 mesh、ジェイ・サイエンス社製） ガラスカラム：3.0 mm×0.75 - 1.0 m または 固定相液体：5%ジエチレングリコールサクシネート（DEGS） 固定相担体：Chromosorb W（AW - DMCS） ガラスカラム：3.0 mm×2.0 m。カラム充填後、充填剤上部（注入口側）に、500 ℃ で 2 - 3 時間焼いた NaCl を 2 - 3 cm 程度の高さに充填する。

温度：カラム槽 140 - 160 ℃、注入口 180 ℃、検出器槽 200 ℃

キャリアーガス：N₂、30 - 40 ml/min

c 試験溶液の調製法

細切した毛髪試料（通常 10 mg前後）を精秤し、10 ml容ネジ蓋式丸底遠沈管に移す。これにエタノール 2 滴を加えて試料を浸潤させた後、少量のガラスウールまたは脱脂綿をガラス棒を用いて挿入し軽く押さえる。次いで試料が浮上しないように注意して綿上に 2N HCl 3 mlを静かに加え、密閉して 100 ℃ の恒温槽内で 5 分間加熱し、試料中のメチル水銀を溶出させる^{注1}）。冷後転倒混和し、1200 rpmで 3 分間遠心分離する。上澄液の 1 mlを 10 ml容共栓付円錐型遠沈管に移し、これにトルエン 2 mlを加えて 3 分間振とうし、HCl相中のメチル水銀をトルエン相に抽出する^{注2}）。1200 rpmで 3 分間遠心分離して下相を吸引除

去し^{注3)}、試験溶液とする。

別に、10 ml 容ネジ蓋式遠沈管にメチル水銀・システイン溶液 0 および 0.10 ml (Hg として 100 ng に相当) をとり、2N HCl を加えて 3 ml としたものについて、試験溶液調製法に従って操作し、それぞれ空試験溶液およびメチル水銀標準試験溶液とする。

d 試験操作および計算

空試験溶液、メチル水銀標準試験溶液および試験溶液(またはその希釈溶液)の一定量(通常 5 μ l) をガスクロマトグラフに注入し、得られたピーク高 (mm) をそれぞれ Pbl, Pstd および Ps (mm) とすると、毛髪試料中メチル水銀濃度 (ng Hg/mg) は次式により算出される。

試料中メチル水銀濃度 (ng/mg) = $100 \text{ ng} \times (\text{Ps}-\text{Pbl})/(\text{Pstd}-\text{Pbl}) \times \text{希釈倍数} \times 1/\text{試料量}(\text{mg})$

【注】

- 1) 希 HCl による毛髪中メチル水銀の溶出は常温でも徐々に進行するが、これは加温によって促進される。2 N HCl を用い、100 °C で加熱すると数分以内にほぼ完全に溶出し、10 分以上になると他の有機物まで溶出してくるようになり、ガスクロマトグラム上に妨害ピークを与える。本法の条件下では加熱時間は 5 分間で十分であり、長くても 10 分以上にならないよう留意する。
- 2) この抽出操作において、HCl 溶出物からトルエン相中に定量的に移行させるためには、容積比で HCl 溶出物に対して少なくとも 2 倍以上のトルエンを用いて抽出する必要がある。
- 3) 試験管内の上相または下相を除去するには、柔軟性のあるチューブを付属させたパストールピペット、廃液溜およびアスピレーターをやや肉厚のシリコンチューブで連結した、図 2 に示すような液相分離用吸引除去装置を用いると便利である。即ち、上相(有機相)を除去する場合には、アスピレーターで吸引しながら、パストールピペットの先端部を上相の表層部に位置させながら試験管の内壁に沿って吸引し、その大部分を除去する。上相が残りに僅かになった時点で、パストールピペットの先端部を有機相の表面から数 mm 程度離して吸引を続けると、下相(水相)に比べて比重が小さく、揮散性の高い有機相のみが空気と共に吸い上げられ、ほぼ定量的に有機相を分離することができる。一方、二相に分離した試験管内の下相を除去する場合には、柔軟性のあるチューブを指で押えてパストールピペットからの吸引を止めた状態で、その先端部を試験管の底部に位置させ、指によるチューブの押えを加減しながら、下相を緩やかに吸い上げる。それがほぼ完全になくなった時点で、指で押えて吸引を止めパストールピペットを取り出すと、下相のみを除去することができる。この一連の操作はある程度の熟練と正確性が要求されるので、実際に適用するに当たっては、個々の操作について予め十分に習熟しておくこと。

試料 10 mg 前後 (10 ml 容ネジ蓋式丸底遠沈管)

エタノール, 2 滴

少量のガラスウールまたは脱脂綿被覆

2N HCl, 3 ml

密閉後 100 で 5 分間加熱

冷却後、混和

1200 rpm, 3 分間遠心分離

塩酸相 1 ml (10 ml 容共栓付円錐型遠沈管)

トルエン抽出, 2 ml

1200 rpm, 3 分間遠心分離

有機相

塩酸相

ECD - ガスクロマトグラフィー

流れ図 9 . 毛髪試料中メチル水銀の定量法

【参考文献】

- 1) 菅野 淳、赤木洋勝、高畠英伍：環境試料、特に底質中メチル水銀の定量法、衛生化学、**31**、260-268(1985)
- 2) 赤木洋勝：ジチゾン抽出 - ガスクロマトグラフィーによる魚介類中メチル水銀の分析、日衛誌、**40**、293(1985)
- 3) Matsuo, N., Suzuki, T., Akagi, H.: Mercury concentration in organs of contemporary Japanese, *Archives of Environmental Health*, **44**(3), 298-303(1989).
- 4) 日本薬学会編：衛生試験法・注解 p 627 (1990)、金原出版
- 5) Akagi, H., Nishimura, H.: Speciation of mercury in the environment. In: Suzuki T., Imura, N., Clarkson, T.W. (eds.) *Advances in mercury toxicology*. Prentice Hall Press, USA, pp.53-76(1991).
- 6) 厚生省生活衛生局監修：食品衛生検査指針 理化学編、1991、p 190-192 (社) 日本食品衛生協会
- 7) Akagi, H., Malm, O., Branches, F.J.P., Kinjo, Y., Kashima, Y., Guimaraes, J.R.D., Oliveira, R.B., Haraguchi, K., Pfeiffer, W.C., Takizawa, Kato, H.: Human exposure to mercury due to gold mining in the Tapajos river basin, Amazon, Brazil: Speciation of mercury in human hair, blood and urine, *Water, Air and Soil Pollution*, **80**, 85-94 (1995).
- 8) Ikingura, J.R., Akagi, H.: Monitoring of fish and human exposure to mercury due to gold mining in the Lake Victoria goldfields, Tanzania, *Sci. Total Environ.* **191**, 59-68(1996).
- 9) Kehrig, H.A., Malm, O., Akagi, H., Guimaraes, J.R.D., Torres, J.P.M.: Methylmercury in fish and hair from Balbina Reservoir, Brazilian Amazon, *Environ. Research*, **77** 84-90(1998).
- 10) Akagi, H., Grandjean, P., Takizawa, Y., Weihe, P.: Methylmercury dose estimation from umbilical cord concentrations in patients with Minamata disease, *Environmental Research, Section A* **77**, 98-103(1998).
- 11) Logar, M., Horvat, M., Akagi, H., Ando, T., Tomiyasu, T., Fajon, V.: Determination of total mercury and monomethylmercury compounds in water samples from Minamata Bay, Japan: an interlaboratory comparative study of different analytical techniques, *Appl. Organometal. Chem.*, **15**, 515-526(2001).
- 12) Garty, J.: Biomonitoring Atmospheric heavy metals with Lichens: Theory and Application, *Critical Reviews in Plant Sciences*, **20**(4), 309-371(2001).
- 13) Ikingura, J.R., Akagi, H.: Lichens as a good bioindicator of air pollution by mercury in small-scale gold mining areas, Tanzania, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **68**, 699-704(2002).