

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（ダイアフラムポンプ）、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。

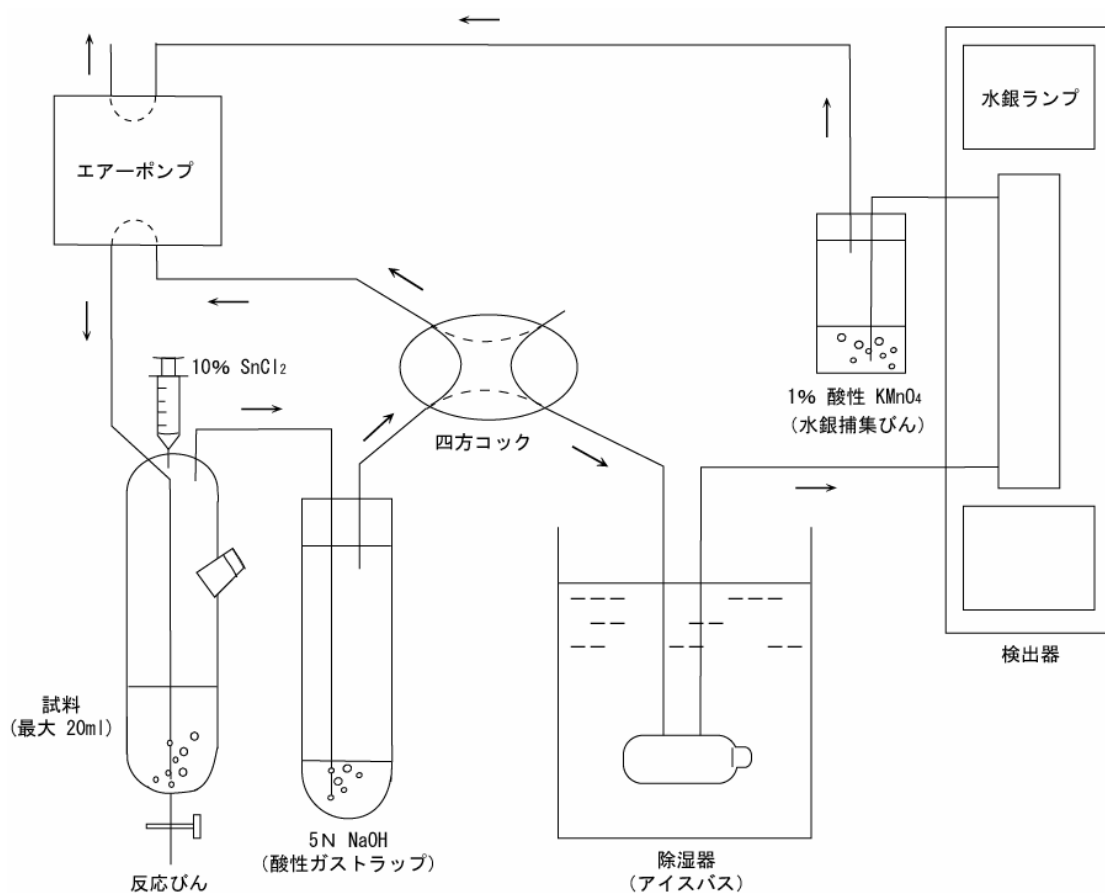


図1 . 還元酸化 - 冷原子吸光光度法 (循環 - 開放送気方式) の構造^{注1)}

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% 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（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、 $\text{HNO}_3 - \text{HClO}_4 (1+1)$ 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。

尿試料の場合は、予め試料分解フラスコに $\text{HNO}_3 - \text{HClO}_4 (1+1)$ 2 ml および H_2SO_4 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 $\mu\text{g Hg/ml}$ ）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、 $\text{HNO}_3 - \text{HClO}_4 (1+1)$ 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% 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 >

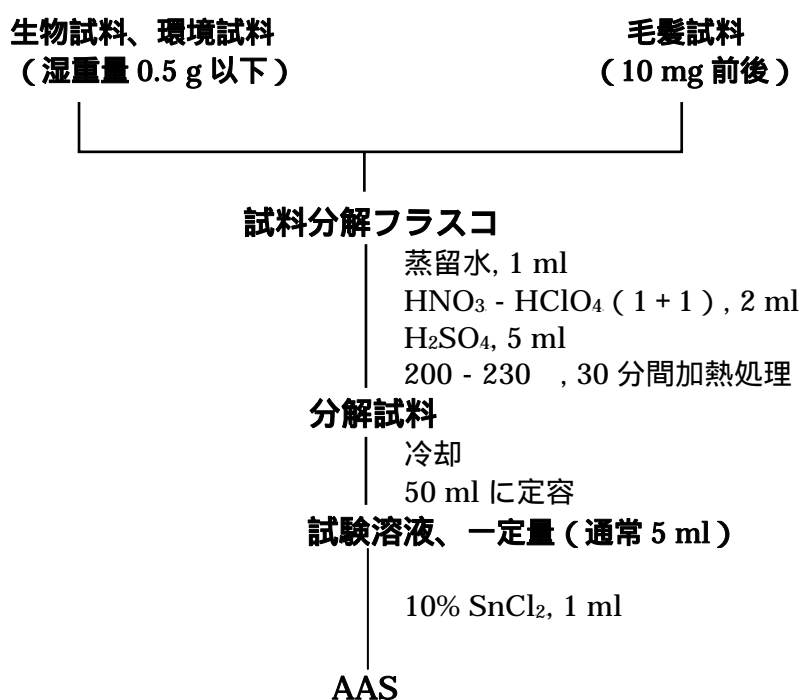
試料中総水銀濃度 (ng/g or ml) = $100 \text{ ng} \times (\text{Ps}-\text{Pbl})/(\text{Pstd}-\text{Pbl}) \times \text{希釈倍数} \times 1/\text{試料量}(\text{g or ml})$

【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 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 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】

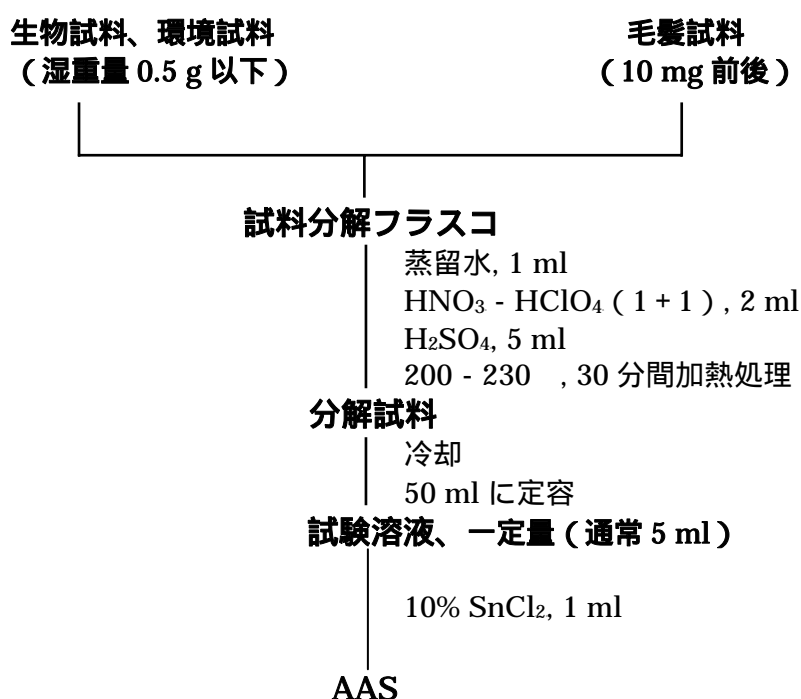
空試験溶液、総水銀測定用標準試験溶液および試験溶液の一定量 V ml（通常 5 ml、最大 20 ml）を水銀分析装置の反応びん内に静かに加えて栓を付す。次いで、装置付属のディスプレイペンサーを用いて 10% SnCl₂ 溶液 1 ml を加え、スタートボタンを押す。この時、ダイヤフラムポンプが作動し生成水銀蒸気が四方コックを介して反応びん - 酸性ガストラップ内を 30 秒間循環してその気相内濃度が均質化され、この間に試験溶液から発生する酸性ガスはアルカリ溶液中に捕集される。30 秒後、四方コックが自動的に 90° 回転し、水銀蒸気がアイスバスを経由して検出器内に導入され、その吸光度が計測さ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

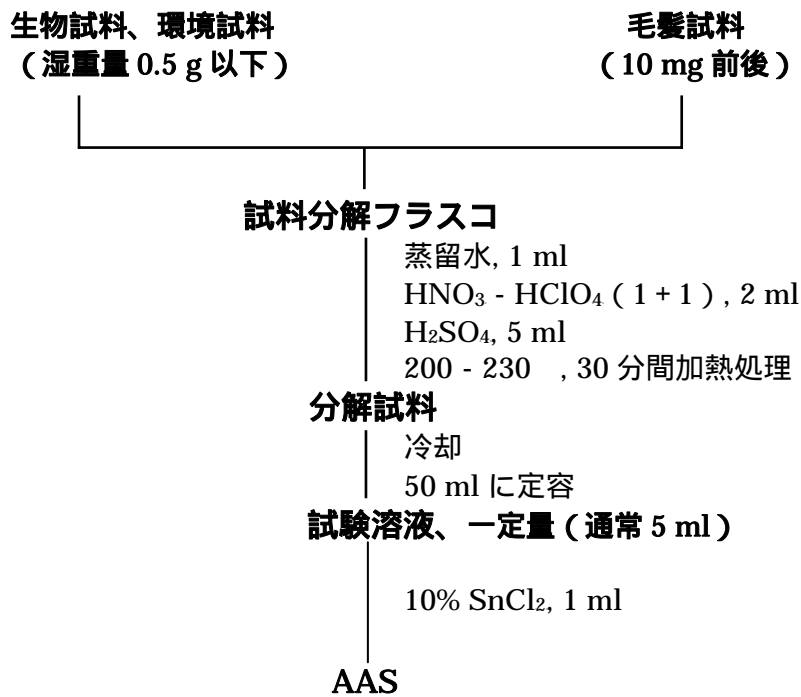
空試験溶液、総水銀測定用標準試験溶液および試験溶液の一定量 V ml（通常 5 ml、最大 20 ml）を水銀分析装置の反応びん内に静かに加えて栓を付す。次いで、装置付属のディスプレイペンサーを用いて 10% SnCl_2 溶液 1 ml を加え、スタートボタンを押す。この時、ダイヤフラムポンプが作動し生成水銀蒸気が四方コックを介して反応びん - 酸性ガストラップ内を 30 秒間循環してその気相内濃度が均質化され、この間に試験溶液から発生する酸性ガスはアルカリ溶液中に捕集される。30 秒後、四方コックが自動的に 90° 回転し、水銀蒸気がアイスバスを経由して検出器内に導入され、その吸光度が計測される。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。

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

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 °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

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、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。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% SnCl₂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