

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、過剰のジチゾンを除去する (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)

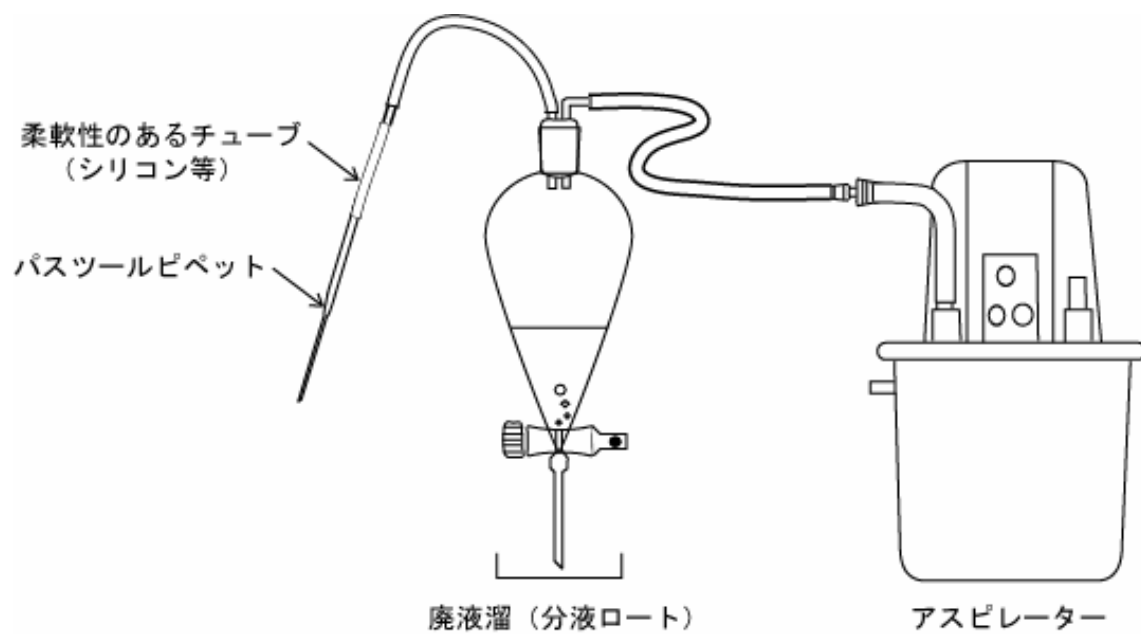
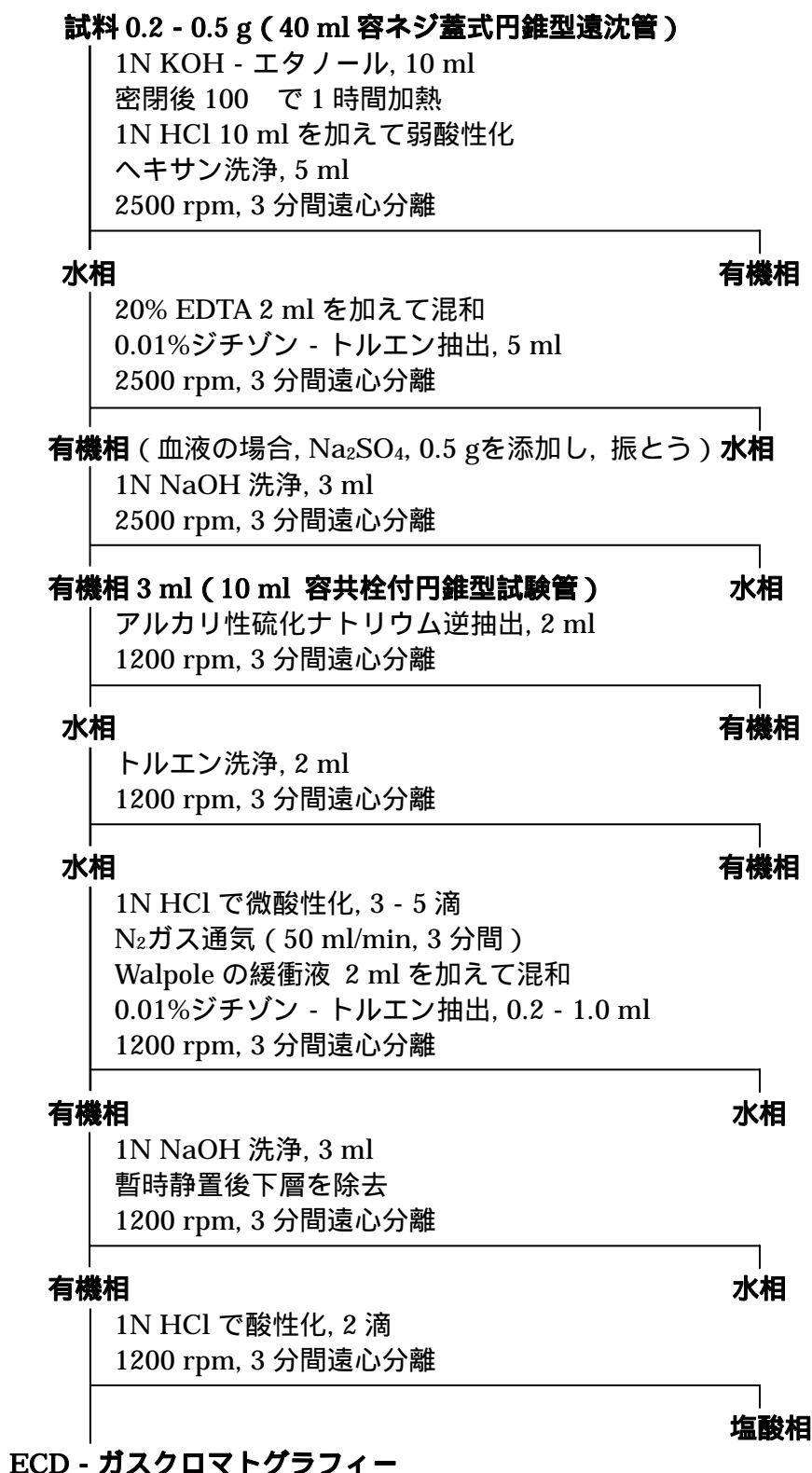


図 2 . 液相分離用吸引除去装置



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、ジチゾンを経水相（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、メチル水銀を経水相（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

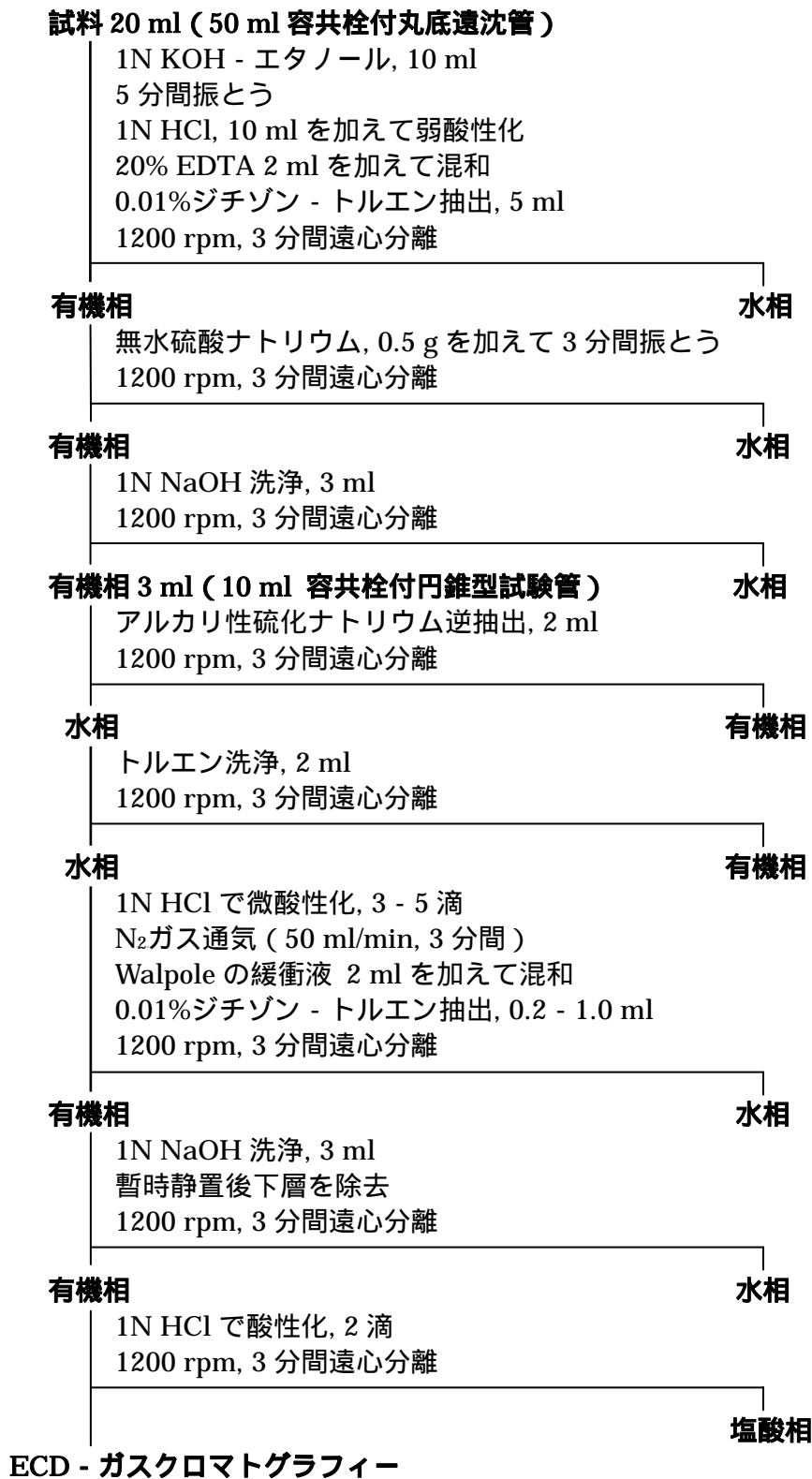
空試験溶液、メチル水銀標準試験溶液および試験溶液の各一定量(通常 5 μl)を、マイク

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ばに試料約 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

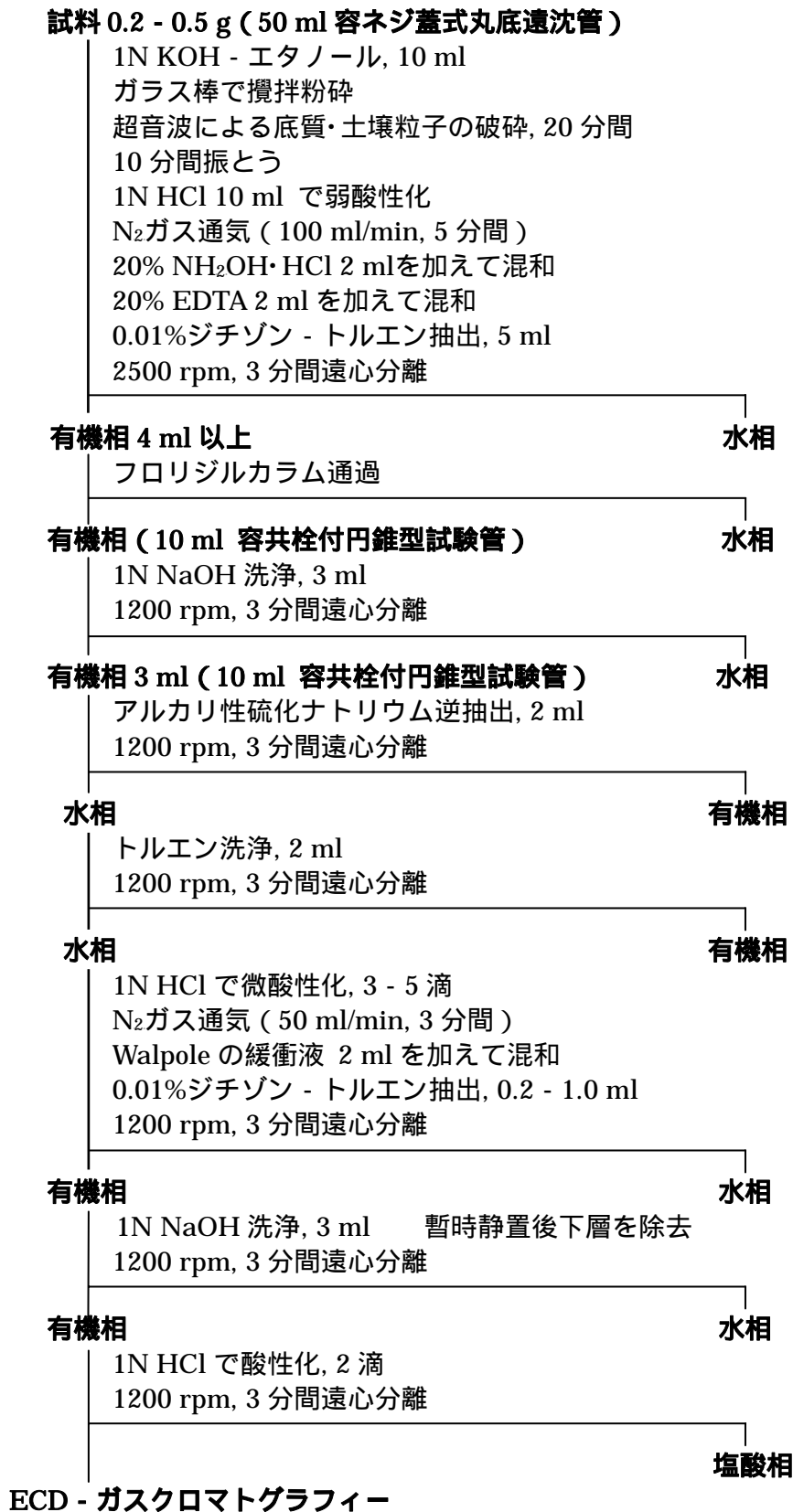
分離した試験管内の下相を除去する場合には、柔軟性のあるチューブを指で押えてパスツールピペットからの吸引を止めた状態で、その先端部を試験管の底部に位置させ、指によるチューブの押えを加減しながら、下相を緩やかに吸い上げる。それがほぼ完全になくなった時点で、指で押えて吸引を止めパスツールピペットを取り出すと、下相のみを除去することができる。この一連の操作はある程度の熟練と正確性が要求されるので、実際に適用するに当たっては、個々の操作について予め十分に習熟しておくこと。

- 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 分液ロート)

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、解剖用鉋で細切する。

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 $^{\circ}$ 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).