

【5RF-1303】
**水銀汚染土壌および底質中のメチル水銀の
簡易・迅速・高感度な分析システムの開発**

児玉谷 仁
鹿児島大学大学院理工学研究科

研究期間	平成25年度～平成26年度
研究体制	児玉谷 仁（1名）
累積予算額	17,601千円

研究開発目的

なぜ土壌・底質のメチル水銀測定法が必要か？

- 土壌・底質はメチル水銀の主生成場のひとつ（水，生体，大気へ）
- 農作物（特に米）へのメチル水銀取り込みが問題視（土壌汚染対策）

⇒ しかし，**土壌・底質中のメチル水銀測定は現在でも統一された手法が確立されていない**

- ・マトリックスが複雑かつ高濃度無機水銀中に微量のメチル水銀が存在
 - ⇒ メチル水銀の分解や生成を起こさずに測定できているか検証することが困難
 - ⇒ 認証標準物質も現在一種類しかなく，様々な組成を有する土壌・底質を正確に測定できていない可能
- ←土壌・底質が測定可能な分析法は，生体や水の測定も容易

HPLC-CL(化学発光検出法)によるメチル水銀・エチル水銀の分析法を独自に開発し，既存法（3研究所3種）と17種の土壌・底質試料のクロスチェックを実施（参考IV）

⇒ 試料によっては測定値が数倍異なる
（それぞれの分析法が多様な土壌組成に対応できていない可能性を示唆）

研究成果概要

研究成果 3

土壌・底質中のメチル水銀に関する知見を集積

- 様々な由来で水銀濃度が高い地域の土壌底質試料を200種以上測定しデータ蓄積
- 水田土壌や大気輸送により水銀が拡散したと考えられる腐植土でメチル水銀濃度が高いことを確認

メチル水銀存在濃度

測定値

クロスチェック

測定

開発HPLC-CL法 発展

試料溶液

前処理

＜前処理法の検討＞
・無機水銀の分離法
・配位性夾雑物対策

溶出液

溶出

＜溶出法の検討＞
・溶出液の組成
・溶出法, 溶出時間

粉末試料

土壌・底質

化学組成

対応できる溶出法は？

存在環境

植生
温度
水分量etc

水銀濃度の
高い地域

＜既存分析法との比較＞

⇒ 研究代表者自らが分析を実施し、分析法について理解（エチレーション法、水銀分析マニュアル法）

【研究協力者】

- ・松山明人 博士（国立水俣病総合研究センター）
- ・Steven Balogh 博士（Metropolitan Council, USA）

新規HPLC-CL法の確立

- ・開発法のブラッシュアップ
- ・新たな配位子を利用したHPLC法の検討

+

簡易で迅速な試料前処理法の確立

↓

研究成果 1

既存の分析法に比べ簡易で迅速な分析法を確立

- ・HPLCベースの実用的(sub- $\mu\text{g}/\text{kg}$ の測定が可能)な分析法
- ・既存法に比べ簡易で迅速（1日あたりの測定可能試料数が2倍に）

＜試料採取地域＞

- ・水俣湾 ・鹿児島湾
- ・イトムカ旧水銀鉱山, 妙高山
- ・小規模金精錬地区（インドネシア）
- ・イドリア水銀鉱山（スロベニア） など

【研究協力者】

- ・富安卓滋 教授（環境化学, 鹿児島大学）
- ・井村隆介 准教授（地質学, 鹿児島大学）ら

研究成果 2

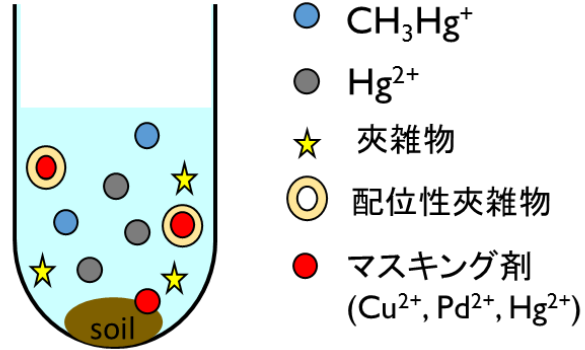
採取試料の取扱い法の検討

- ・保存や乾燥処理によりメチル水銀濃度の変化が起こることを確認（微生物活動を起こさせない処理を行う必要がある）
- ・試料採取後ただちに凍結保存し、凍結乾燥後、粉末化処理することで再現性良く安定的に測定に利用することが可能

1. 開発分析法の原理と手順(改良後)

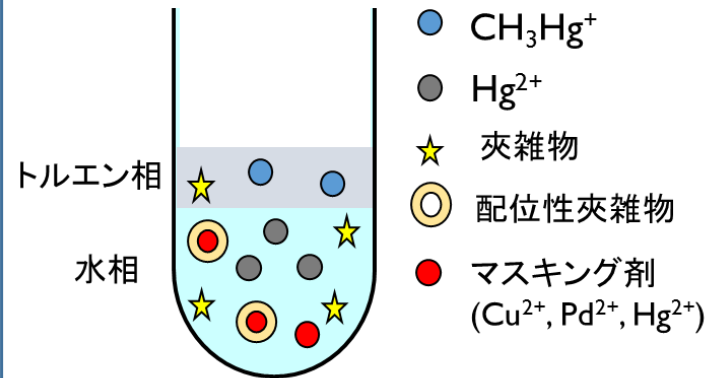
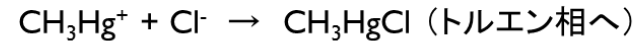
① 土壌・底質試料からの溶出操作

5M 塩酸によりメチル水銀を試料中から溶出させ
配位性夾雑物は大過剰の Cu^{2+} , Pd^{2+} , Hg^{2+} でマスクング



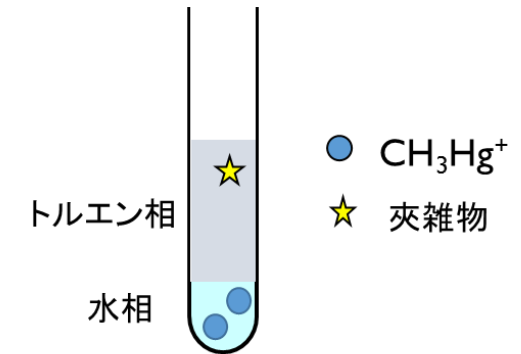
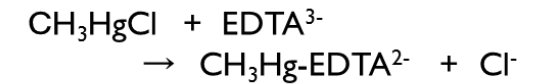
② 有機水銀の選択的抽出

メチル水銀を塩化物の形でトルエンへ抽出



③ 逆抽出操作

トルエン相の塩化メチル水銀をEDTA水溶液で水相へ
(疎水性の大きい夾雑物はトルエン相に残存)



① 土壌・底質試料 0.1~1 g (dry weight)

20mL 溶出液添加

(溶出液組成: 5M HCl, 0.1M CuSO_4 , 5 mM PdCl_2 , 0.05 mM HgCl_2)

振とう (30 min) 後, 遠心分離 (3000 rpm × 10 min)

② 上澄み (20 mL) に 5 mL トルエン 添加

振とう (10 min) 後, 遠心分離 (3000 rpm × 5 min)

水相を吸引除去, 硫酸ナトリウム 3g を加え

再度, 遠心分離 (3000 rpm × 5 min)

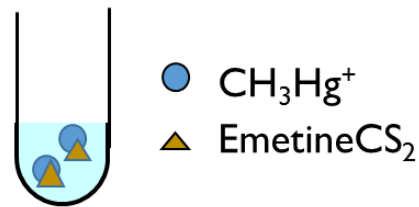
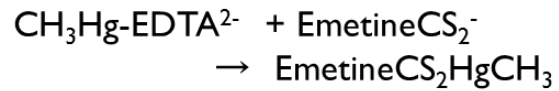
③ トルエン相 (4 mL) に

1mL 2 mM EDTA (pH 9.1, 40mM ホウ酸緩衝液) 水溶液 添加

振とう (30 s) 後, 遠心分離 (1200 rpm × 5 min)

④ EmetineCS₂錯体化

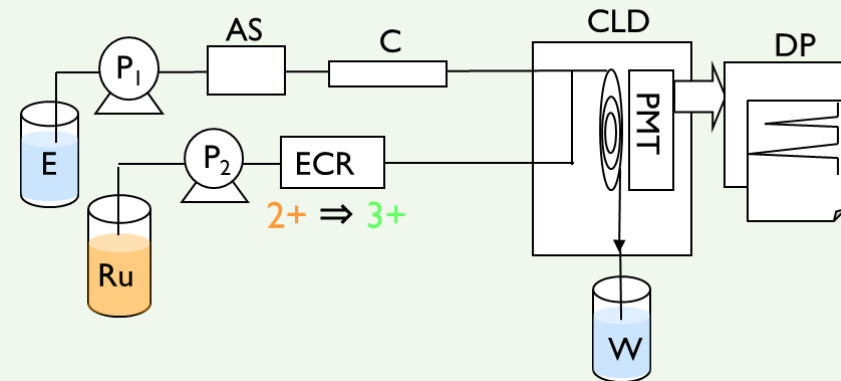
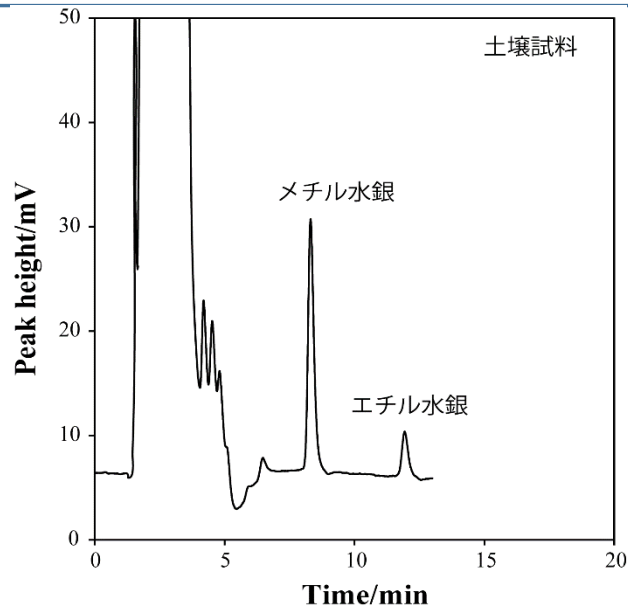
EmetineCS₂溶液添加により
直ちにEmetineCS₂-メチル水銀錯体が生成



④ 水相500 μLに4μM EmetineCS₂ (アセトニトリル溶液) 500 μL添加

⑤ HPLC-CL装置に注入

疎水性錯体として逆相カラムで高分離
配位子をターゲットに化学発光検出



E: eluent; P₁: pump; AS: Auto-Sampler; C: column; Ru: Ru reagent solution;
P₂: pump; CLD: Chemiluminescence detector; ECR: electrochemical reactor;
PMT: photomultiplier tube; W: waste; DP: data processor.

HPLC-CL装置概略図

20 mM citrate buffer (pH 3.1)-Acetonitrile (1:1, v/v).

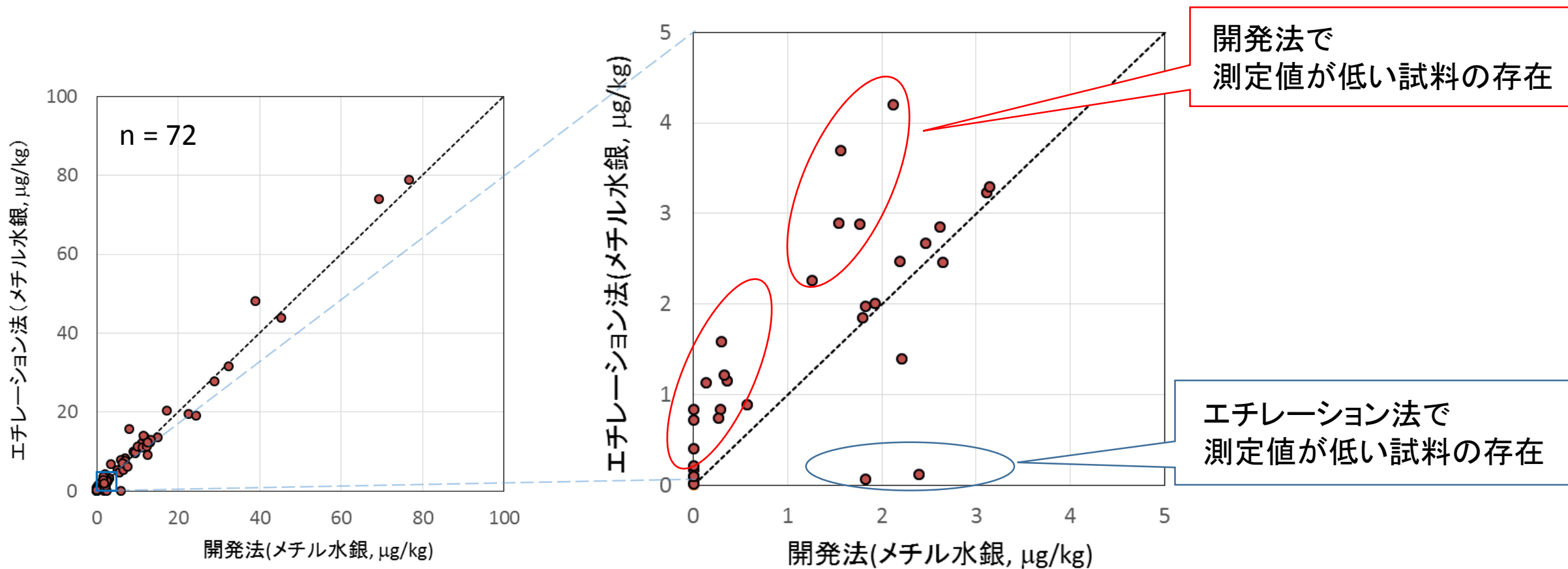
Ru錯体溶液: 0.1 mM Ru(bpy)₃²⁺ (0.1 M H₂SO₄); 流量0.3ml/min.

改良点

- マスキング剤の変更
- HPLC分離条件再検討 (1試料7分以内にメチル水銀・エチル水銀の測定も可能)
- 発光検出試薬消費量の低減 (感度低下なしに1/3に) など操作・使用溶液を精査 (参考III)

エチレーション法との比較

様々な試料（n=72）について世界的に最も多用されているエチレーション法とクロスチェックを実施

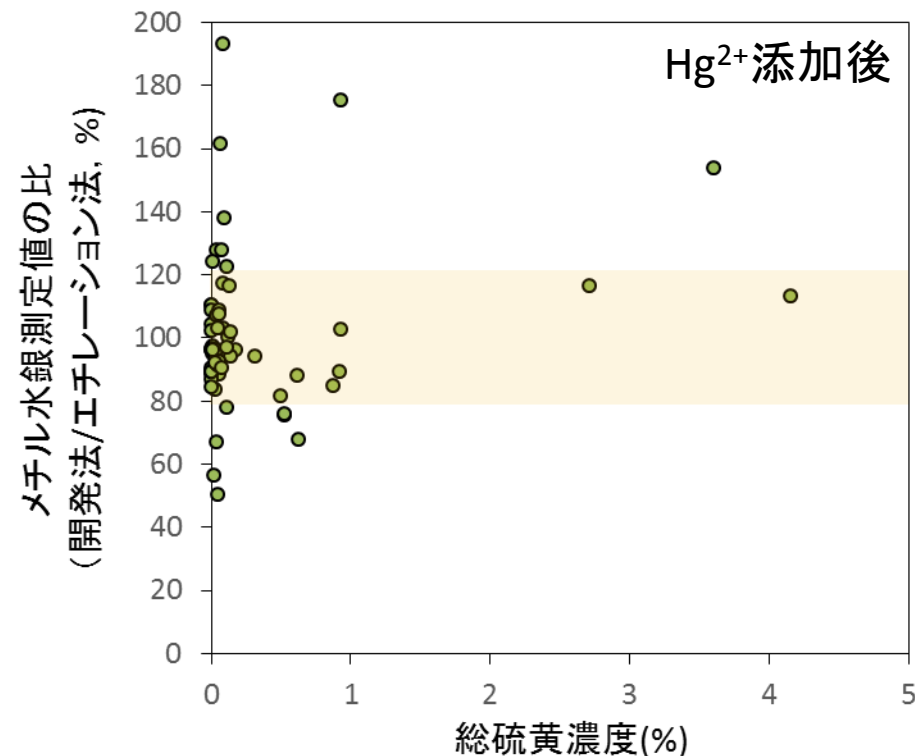
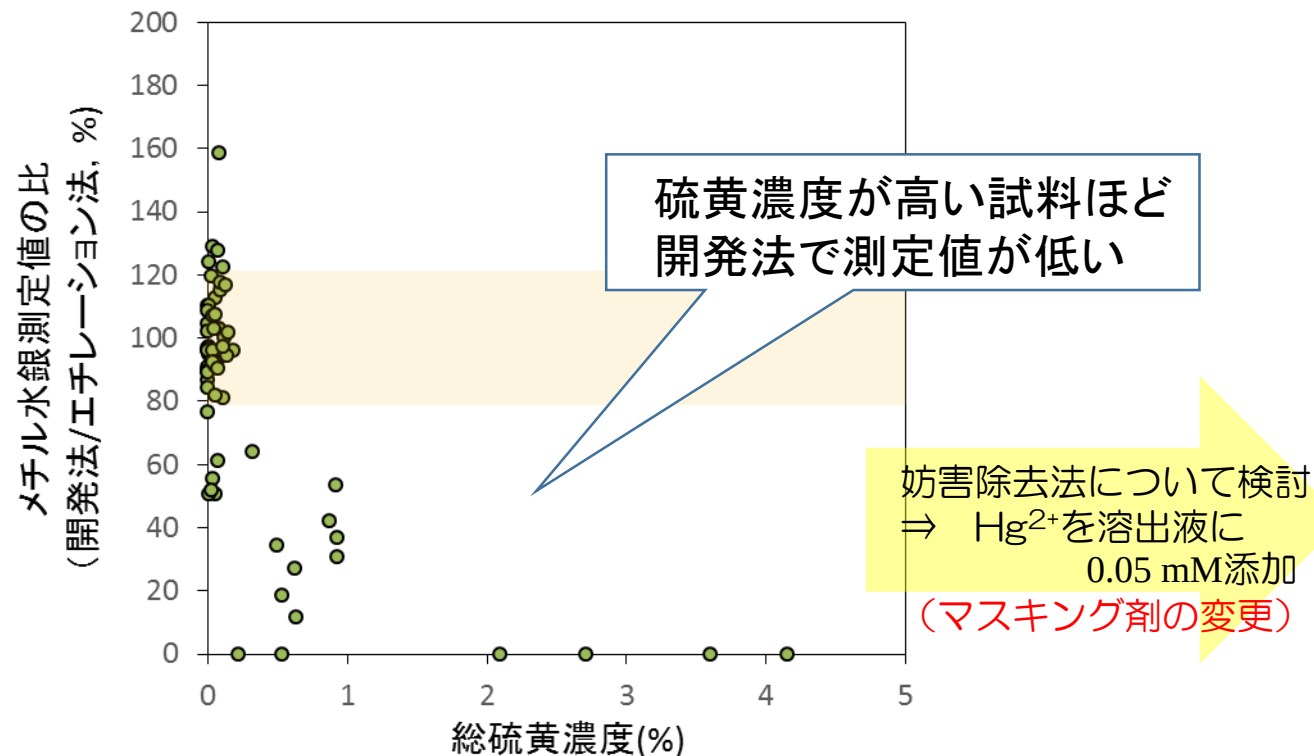


⇒ 開発法で測定値が低い試料について土壌・底質の化学組成から原因を検証

エチレーション法で測定できない？試料の存在確認

⇒ GC-ECD法（水銀分析マニュアル, 環境省）で確認中

硫黄による妨害確認と対処法の検討



⇒ 高濃度に硫黄を含む試料でも高い回収率で測定可能に
(硫黄濃度が低い試料であれば Hg^{2+} は必要ない)

表 高濃度硫黄含有試料をもちいたメチル水銀の添加回収実験

試料名	硫黄濃度 (%)	メチル水銀濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	s.d. (n = 2)	添加回収率 (%)
河川底質 (噴気活動地帯)	3.4	0.23	0.04	82
海底質 (海底熱水噴気地帯)	3.6	0.62	0.03	81
海底質 (海底熱水噴気地帯)	4.0	0.55	0.03	95
海底質 (海底熱水噴気地帯)	20.5	5.03	0.20	100
海底質 (海底熱水噴気地帯)	25.7	3.06	0.11	87

試料1g使用, メチル水銀スパイク量 1ng

他測定法との比較

	測定法と感度	前処理	試薬	道具	測定装置	試料測定可能数/日
開発法	○	◎	○	○	HPLC-CL	20
エチレーション法	◎	○	△	△	GC-AFS	12
水銀分析マニュアル法	○	△	○	○	GC-ECD	10

- 測定法と感度**
- ・使用試料量等により変化するため単純比較はできないが、いずれの方法もsub-μg/kgレベルのメチル水銀を測定可能
 - ・エチレーション法はパージトラップ操作により他と比べ多量の試料を測定装置に導入可できるため高感度測定が可能
 - ・エチレーション法では水銀を直接検出するのに対し、開発法および水銀マニュアル法は間接検出
 - ・開発法では非常に選択性の高い化学発光検出法を採用しており試薬汚染等に強い
 - ・いずれの方法も1試料の測定は10分以内
 - ・開発法ではメチル水銀のみならずエチル水銀も同時に測定可能

前処理

	開発法	エチレーション法	水銀分析マニュアル法
作業ステップ数	15ステップ	15ステップ	37ステップ
待機時間	66分	237分	83分

待機時間…振とうや遠心分離などの待ち時間（参考Ⅱ参照）

試薬

- ・開発法ではルテニウム錯体、塩化パラジウムという高価な試薬が必要（ただしどちらも少量かつ再利用可能）
- ・GCベースのエチレーション法や水銀マニュアル法では高純度ガスが必要
- ・水銀マニュアル法では抽出試薬であるジチゾンの純度に気を使う必要があるが、現場精製法が確立されている
- ・エチレーション法ではエチル化試薬が容易に分解するため取扱いが困難。メーカー、ロットによってはメチル水銀を人工生成させる可能性がある

道具

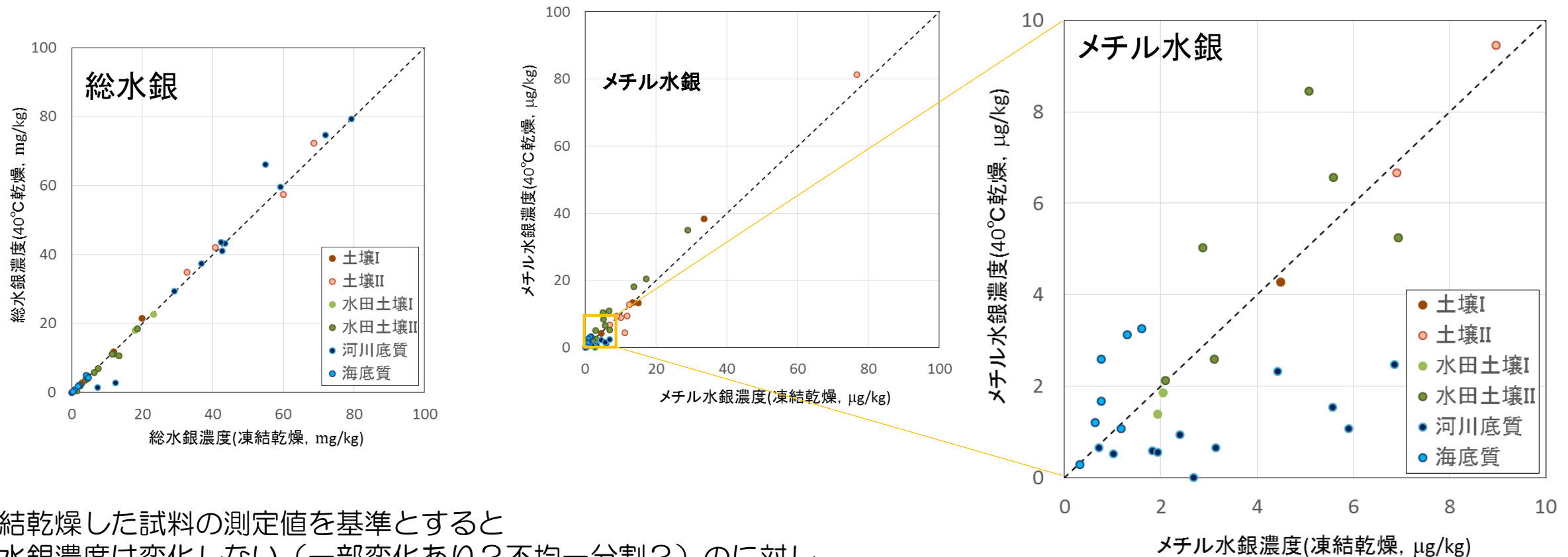
- ・エチレーション法ではほとんどの実験器具にテフロン製が求められ、使用器具も特注品が必要

⇒ 既存法と比べ簡易・迅速なHPLCベースの測定法

2. 採取試料の取り扱い法の検討

土壌・底質試料は不均一でかつ水分を含むため、再現の良い測定には乾燥・粉末化処理が必要

⇒ 採取した様々な土壌・底質試料(n=43)を2分割し、40℃乾燥と凍結乾燥処理をしたのち化学成分を比較



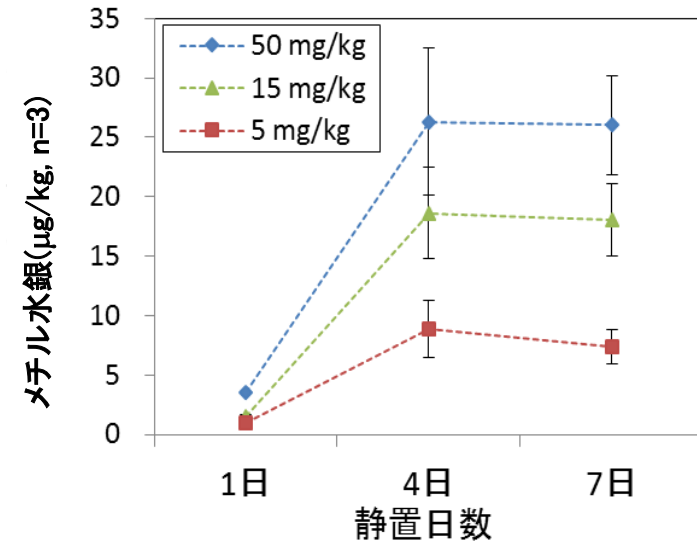
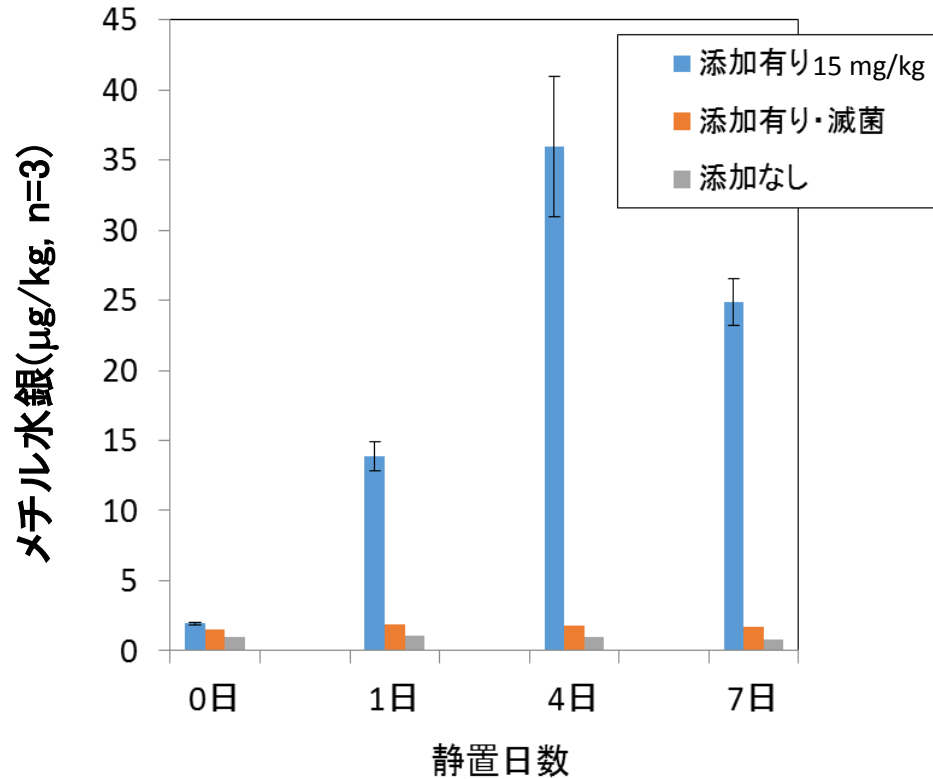
凍結乾燥した試料の測定値を基準とすると
総水銀濃度は変化しない（一部変化あり？不均一分割？）のに対し、
メチル水銀濃度は河川底質では減少、海底質では上昇する一定の傾向

⇒ 乾燥処理によりメチル水銀濃度は変化する
試料種ごとに増減の傾向は変化、特に水分量の多い試料で変化が顕著

メチル水銀の生成実験

メチル水銀が数日の乾燥期間のうちに生成しうるのか？

⇒ 水田土壌に水銀イオン (Hg^{2+}) を添加し、 30°C で一定期間静置したのちメチル水銀濃度を測定



Hg^{2+} 添加により数日でメチル水銀濃度が大きく上昇し、その後一定に滅菌 (121°C , 30分) したものではメチル水銀濃度は増加しない

⇒ 微生物活動により数日の間にメチル水銀の濃度変化が起こる
微生物活動を起こさせない処理（凍結乾燥など）を行う必要がある

採取試料の保存について

採取した試料は一般的に冷暗所保存とされている

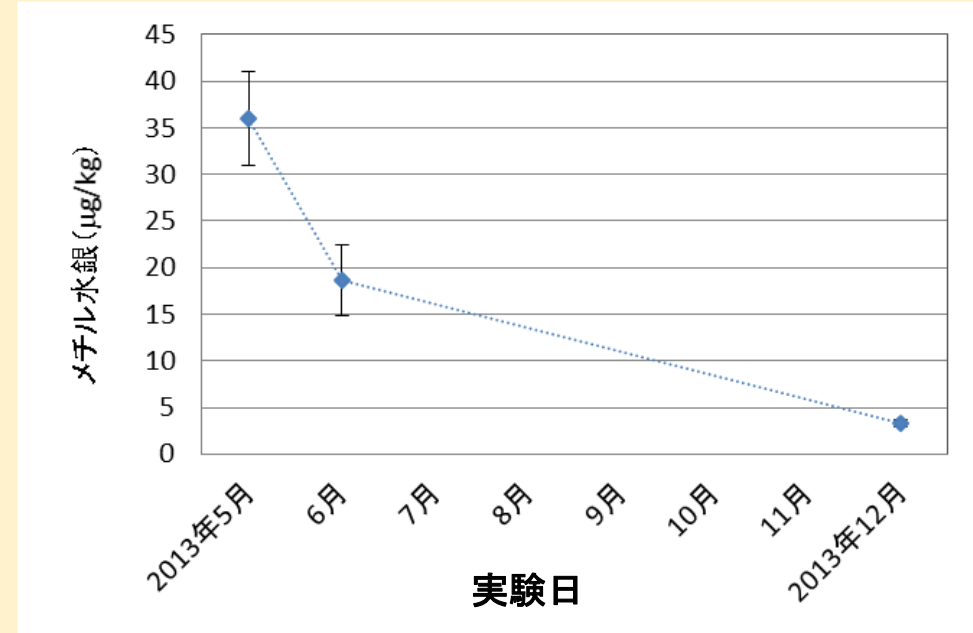
採取直後に凍結乾燥したものと
長期冷蔵(4℃)保存したのち凍結乾燥したもので比較

表 長期冷蔵保存によるメチル水銀濃度変化

試料名	メチル水銀濃度				冷蔵 保存期間 (月)	変化率 (%)
	採取直後凍結乾燥		冷蔵保管後凍結乾燥			
	μg/kg	s.d.	μg/kg	s.d.		
土壌①	5.60	0.19	4.81	0.10	17	-14
土壌②	12.44	0.85	10.88	0.20	17	-13
河川底質	6.59	0.28	3.19	0.10	10	-52
水田土壌①	15.35	0.33	3.87	0.86	6	-75
水田土壌②	1.83	0.01	2.47	0.04	6	35
土壌③	13.46	0.28	12.60	0.23	3	-6

河川底質や水田土壌などで大きな変化
⇒ 水分量の多い試料ほど変化は顕著

冷蔵保存によってもメチル水銀濃度の変化は起こる
⇒ 採取後できるだけ迅速に冷凍する必要がある



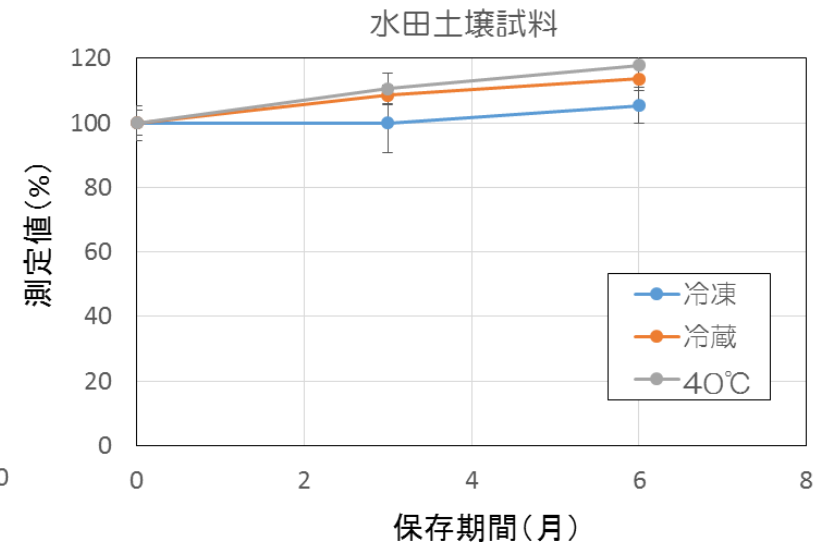
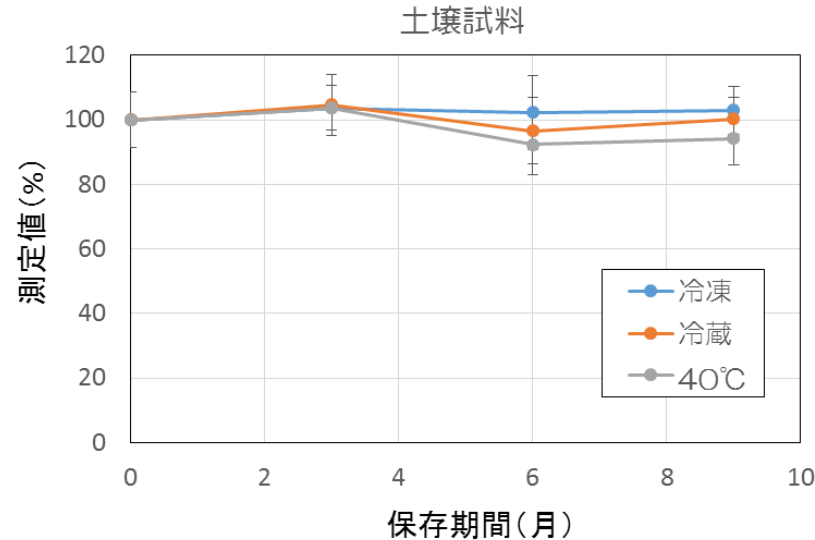
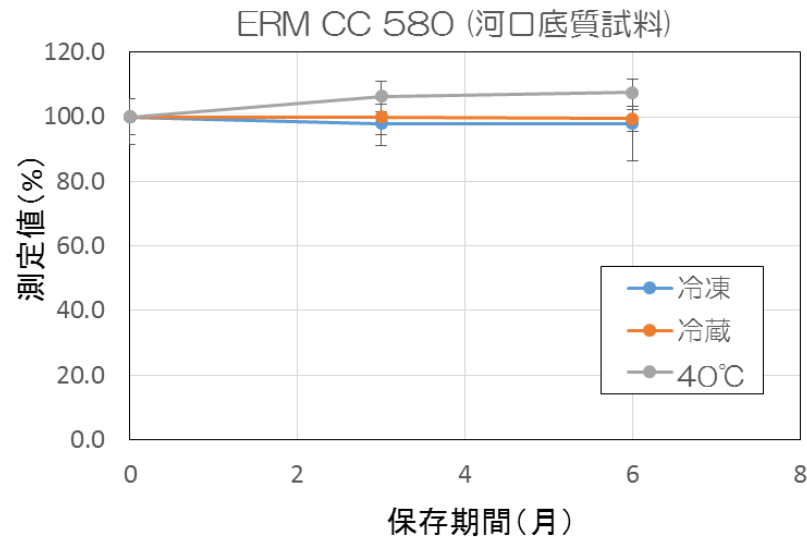
冷蔵保存(4℃)試料によるメチル水銀生成能力変化
(水田土壌, 15 ppm Hg²⁺添加, 30℃で4日間静置)

同一試料を用いた生成実験でも生成能力は変化
⇒ 微生物環境の変化によるもの？

乾燥粉末化試料の安定性

乾燥粉末化した試料中のメチル水銀の安定性について検討

⇒ 試料を3分割し、40℃、冷蔵（4℃）、冷凍（-28℃）で保管し、3か月ごとにメチル水銀濃度を測定



測定値 (%) = 保存後の測定値 / 実験開始時の測定値 × 100
*認証標準物質 (ERM CC 580) が4℃保存を推奨しているため
冷蔵保存したERM CC580の測定値で全体を補正

乾燥後は40℃で長期間保管しても大きな濃度変化はない

⇒ 採取した試料は速やかに凍結保存することが重要
その後、凍結乾燥し粉末化すれば安定的に再現性良く測定可能

3. 調査研究による成果

様々な由来で水銀濃度が高い地域の試料（200以上）の測定を実施

水銀の由来

水銀鉱山活動，アマルガム法による金精錬，工場排水
熱水噴気活動，火山活動，不明など

試料種

海底質，河川底質，土壌，水田土壌

試料の採取法

コアサンプラーにより円柱状(長さ30～50 cm)に採取し，
土色もしくは一定の長さで分割して試料とした
(多様な化学組成の試料が得られ，水銀汚染の鉛直分布の確認も可能なため)



全試料の測定結果から得られた傾向

- ・ 総水銀濃度が同レベルでも底質に比べ土壌でメチル水銀濃度が高い
- ・ 水田土壌および有機炭素濃度の高い土壌で特にメチル水銀濃度が高い

※ 地域別の測定結果については成果報告書にて

表 採取試料の主要化学成分の範囲

	最小値	最大値
総水銀濃度 (mg/kg)	0.10	682.16
メチル水銀濃度 (μg/kg)	nd	118.56
エチル水銀濃度 (μg/kg)	nd	11.90
総有機炭素濃度(%)	nd	42.56
総N濃度(%)	0.01	2.49
総C濃度(%)	0.09	44.32
総S濃度(%)	nd	25.71
Al ₂ O ₃ (%)	2.6	36.4
SiO ₂ (%)	5.1	80.8
CaO (%)	0.4	72.0
Fe ₂ O ₃ (%)	1.2	21.9

nd: 未検出 (n = 202)

総水銀に対するメチル水銀の割合
海底質，河川底質・・・0.1%以下
水田土壌・・・0.01～0.3%
腐植土・・・最大3.3%

本研究により得られた主な成果

既存のメチル水銀測定法と比べ簡易で迅速な測定法を確立

- 実用的でこれまでにないHPLCベースの測定法（sub-ppbレベルの測定が可能）
 - 様々な組成を有する土壌・底質（および生体）試料に適用可能で迅速な前処理法を確立
- ⇒ 確立した前処理法を既存法に組み込んでいくことも可能
- ⇒ 実験操作が簡易で測定原理・装置も単純なことから途上国への技術移転も容易

土壌・底質のメチル水銀濃度を正確に評価するための試料取扱い法を検討

- 乾燥操作や保存環境が土壌・底質中のメチル水銀濃度を変化させることを確認
 - メチル水銀濃度は微生物活動により容易に変化しうることを確認
- ⇒ 採取後できるだけ早く凍結し、凍結乾燥処理することで正確な評価が可能
（土壌汚染対策法の土壌溶出量調査法では試料の風乾を採用している）

土壌・底質中のメチル水銀濃度と化学成分に関するデータを蓄積（200試料以上）

- 底質に比べ土壌（特に水田土壌や腐植土）のメチル水銀濃度が高い
 - 有機炭素濃度の高い土壌でメチル水銀濃度が高い（大気より植物が水銀吸収、腐植の過程でメチル化？）
- ⇒ 土壌中のメチル水銀の挙動に関する知見の集積が必要（生成能が高いのか？移動しないのか？）