

無炎原子吸光法による魚肉中の微量有機水銀および無機水銀の定量

荘加泰司, 河合 聡, 大野武男
(岐阜薬科大学 薬品分析化学教室)

**Microdetermination of Organic and Inorganic Mercury in Fish Meat by
Flameless Atomic Absorption Spectrophotometry**

YASUSHI SHOKA, SATOSHI KAWAI, TAKEO OHNO

Department of Pharmaceutical Analyses, Gifu College of Pharmacy

(Received September 11, 1978)

A method for the microdetermination of organic and inorganic mercury in fish meat by flameless atomic absorption spectrophotometry is described. Total mercury was determined after decomposition of sample with a mixture of nitric acid and sulfuric acid. Organic mercury was measured after extracting with n butyl acetate in 6N HCl solution. Both determinations were carried out by means of reducing sample solutions by tin (II) in 1N NaOH solution containing trace amounts of cupric ion. Inorganic mercury was calculated by subtracting the value of organic mercury from total mercury. The most suitable conditions for extracting organic mercury from fish meat homogenates were investigated in detail and the following procedure was established. Five ml of fish meat homogenates was taken in 30 ml centrifuge tube, and 3.1 ml of conc. HCl and water were added to 10 ml. The mixture was extracted by shaking for 10 min. with 10 ml of n-butyl acetate and centrifuged. The supernatant (organic phase) was transferred into a 30 ml separating funnel and the aqueous phase was re-extracted in the same way. Subsequently, organic mercury in n-butyl acetate solution was extracted with 10 ml of 2N ammonia solution containing 1 mg of L-cysteine. The aqueous phase was subjected to measurement by flameless atomic absorption spectrometry. This method was applied to analyses of carp kept for 8 days in water containing 0.2 ppm of methyl mercuric chloride and some kinds of commercial fishes.

緒 言

超微量の水銀を簡易に、かつ高感度に定量することは、公害問題と関連して今なお重要な課題である。1960年代においては、ジチゾンによる吸光光度法¹⁾が最もすぐれた微量水銀定量法として広く用いられていた。しかし、この方法は検出限度が μg のオーダーであり、また妨害金属も多く、それらを除去するための前処理操作は煩雑であった。ガスクロマトグラフ法^{1~11)}は、電子捕獲検出器の利用により有機水銀の高感度な分別定量が可能であるという、すぐれた利点を有しており、生活環境における水銀の挙動に関する研究は著しく進歩したが^{12~30)}、装置の調整や測定値の安定性に難点がある。

その後、原子吸光分析法が開発され、無機微量元素分析の分野に革命的な進歩をもたらした。ことに、無炎原子吸光光度法の登場は ppb レベルの水銀分析を可能にしたが^{1, 11, 31~39)}、梅崎らは、還元気化の条件を選定することによって無機水銀と有機水銀の分別定量が可能であることを示し注目された。^{40, 41)}

梅崎らの方法⁴⁰⁾の概要は次の通りである。

還元条件1：アルカリ性溶液で、微量の銅(Ⅱ)の存在でスズ(Ⅱ)で還元する。

還元条件2：塩素イオンを含む酸性溶液でスズ(Ⅱ)で還元する。

まず、無機水銀と有機水銀の含量を還元条件1にしたがって測定する。次に無機水銀のみを還元条件2にしたがって測定し、両者の測定値の差から有機水銀値を求めるという方法である。彼等はこの方法を水溶液中の無機、有機水銀の分析に適用し、良好な結果を得た。

この方法は、有機水銀を直接分別定量することはできないが、著者らはその簡易性と鋭敏性に着目し、溶媒抽出操作を組み合わせることによって、これまで困難であった魚肉中の有機、無機水銀の無炭原子吸光法による微量分析法を確立した。

実験材料および方法

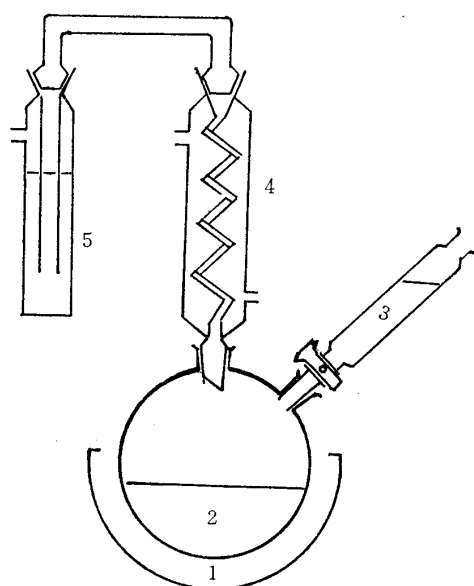
試薬：試薬類はすべて市販の特級試薬を用いた。溶媒は、クロロホルム、*n* 酢酸ブチルは和光純薬特級品、酢酸エチル、エチルエーテル、*n* ヘキサンは市販1級品を蒸留して用いた。水は2次蒸留水を用いた。

魚肉：コイ

原子吸光装置：日立 208型

魚肉中の総水銀の定量法

魚肉1g(湿重量)に相当する魚肉ホモジネート液5mlを200ml 湿式分解用二口フラスコにとり、図1のように装置を組む。トラップには0.1M KMnO_4 -10% H_2SO_4 溶液を入れる。滴下ロートのコックを開き、濃硫酸2ml、濃硝酸2.5mlを滴下し、コックを閉じた後マントルヒーター中で3~5時間、液が黄色澄明になるまで加熱を続ける。分解終了後放冷すると、トラップ中の KMnO_4 - H_2SO_4 溶液は逆流してフラスコ中に流れ込み、冷却器を洗浄する役割を果す。トラップの残液をフラスコに移し、さらにトラップ管および冷却器の壁を水で洗い込む。20%塩酸ヒドロキシルアミンで過剰の KMnO_4 を還元脱色し、300ml ビーカーに移し水を加えて200ml に調製する。これを300ml 還元気化瓶に移し、1% CuSO_4 溶液1ml、10% SnCl_2 溶液10ml、10N NaOH 20mlを加え、空気



- 1 マントルヒーター
- 2 200ml二口分解フラスコ
- 3 100ml滴下ロート
- 4 45cm蛇管冷却器
- 5 トラップ

図1 試料分解装置

を循環通気させ，原子吸光分光光度計で 253.7nm における吸光度を測定する（図 2 参照）。別に同様の方法で測定した空試験値を差引き，検量線より総水銀を算出する。

魚肉中の有機水銀の定量法

30ml 共栓つき遠沈管に魚肉 1g（湿重量）に相当する魚肉ホモジネート液 5 ml をとり，濃塩酸 3.1ml および水

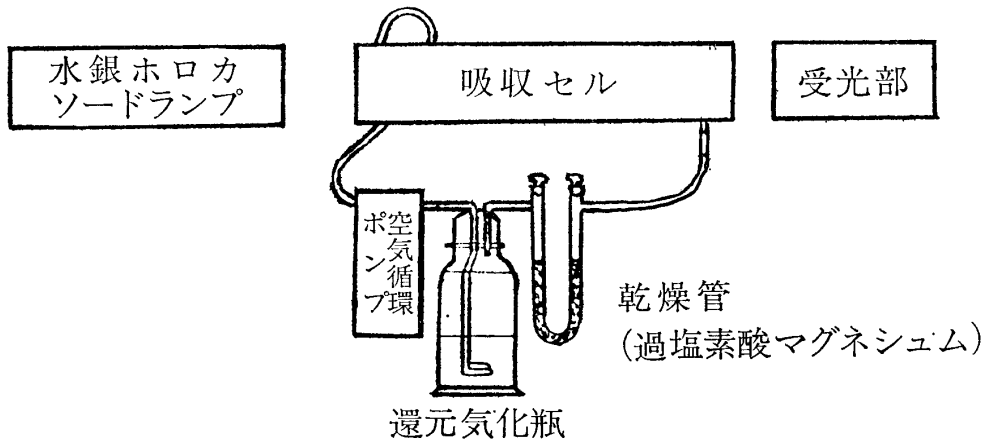


図 2 還元気化法装置

を加えて全量 10ml とし，3 N 塩酸酸性とする。これに n 酢酸ブチル 10ml を加え，10分間振とうしたのち遠心分離する。有機層を 30ml 分液ロートに移し，さらに水層に n 酢酸ブチル 10ml を加え同様の抽出を行い，分離した有機層を前者に合する。次に，これに L システイン 1 mg を含む 2 N アンモニア水 10ml を加え 10分間振とうする。分離した水層を 300ml のビーカーに移し，水を加えて 200ml に調製する。これを 300ml 還元気化瓶に移し，以下，前項の総水銀の定量法を準用する。

結果と考察

梅崎らの方法を魚肉中の無機水銀および有機水銀の分析に直接適用してみたが，還元条件 1 では無機水銀の回収率 87%，有機水銀についてはメチル水銀 38%，エチル水銀 25%，酢酸フェニル水銀 53% と，いずれも低い回収率しか得られなかった。また，還元条件 2 では，無機水銀 4% という一層悪い回収率を示した。このことは，魚肉が共存する状態では水銀化合物が充分還元されないことを示しており，生体試料中の水銀分析には梅崎らの方法はそのまま適用できないことを認めた。そこで著者らは，魚肉中の無機，有機水銀の含量は魚肉を硫酸で分解したのち，また有機水銀量は溶媒抽出したのち，それぞれ還元条件 1 で還元気化し，原子吸光光度法で定量する方法を検討した。

魚肉中有機水銀化合物の溶媒抽出

有機水銀化合物は，塩酸酸性で種々の有機溶媒に抽出されることが知られている。ガスクロマトグラフ法ではベンゼン抽出が一般に利用されている。しかし，原子吸光法では，253.7nm の測定波長を利用するため，その領域に吸収を有するベンゼンは抽出溶媒として不適當である。

また，原子吸光法で測定するための還元気化は水溶液として行われるため，一たん有機層へ抽出された有機水銀は

再び水層へ逆抽出される必要がある。これらの逆抽出条件についても詳細に検討を加えた。

1) 抽出溶媒

水層にある有機水銀化合物を抽出するための有機溶媒として、酢酸エチル、n 酢酸ブチル、クロロホルム、n ヘキサン、エチルエーテルについて検討を加えた。その結果を表 1 に示した。

表 1 種々の溶媒によるメチル水銀の抽出率

有機溶媒	メチル水銀	抽出率(%)
酢酸エチル	1.0 μ g as Hg	83.4
n 酢酸ブチル	//	98.7
クロロホルム	//	22.2
n ヘキサン	//	21.2
エチルエーテル	//	92.7

酢酸エチルやエチルエーテルを用いた場合は、メチル水銀の抽出率は比較的高く、測定系における溶媒自体の妨害も見られなかったが、水層との分離が良好ではなかった。n 酢酸ブチルでは、抽出率も高く、水層との分離も良好であり、取扱いも容易で、もっとも適当な抽出溶媒である。

2) 抽出時の塩酸濃度

Westöo⁴⁾ は、メチル水銀を水層からベンゼン層に抽出するとき、塩酸の存在はメチル水銀のイオン化を妨げ、有機溶媒に移行しやすくすると述べている。著者らは、1 μ g のメチル水銀を含む水層 10ml を n 酢酸ブチル 10ml で抽出する際の、塩酸濃度と抽出率の関係を検討した。その結果を表 2 に示した。塩酸濃度の増大と共に抽出率も増大したが、水層と有機層との分離も悪くなる傾向を示したので、適当な塩酸濃度として 3 N をえらんだ。

表 2 メチル水銀の抽出率におよぼす塩酸濃度の影響

塩酸濃度(N)	メチル水銀	抽出率(%)
0	10. μ g as Hg	79.0
1	//	85.5
2	//	95.4
3	//	98.7
4	//	102.0

3) 水層への逆抽出条件

有機溶媒中の有機水銀化合物は下記の処理によって水層に移行することが知られている。

- 水酸化アルカリ、アンモニア水と振りまぜるとき、 $R \cdot Hg \cdot X$ は $R \cdot Hg \cdot OH$ となり、水層に移行する。
- 水溶性有機イオウ化合物（システイン、グルタチオン、チオサリチル酸、チオグリセリン、チオリンゴ酸）の水溶液と振りまぜるとき、 $R \cdot Hg \cdot X + R'SH \rightarrow R \cdot Hg \cdot SR' + HX$ のように反応し、水層に移行する。

著者らは、n 酢酸ブチル層に抽出されたメチル水銀を水層に転溶させるため、Lシステインを含むアンモニア溶液を用いることとし、それらの濃度と抽出率との関係について検討した。その結果は表 3 の通りである。Lシステインを添加しない場合には、2 Nアンモニア濃度で最高の抽出率が得られた。そこで、アンモニア濃度を 2 N に一定させ、Lシステインの添加量の効果をみたところ、0.01%濃度でもっともよい結果が得られた。Lシステイン濃度が0.01

%以上になると抽出率が却って低下する傾向がみられたが、これは測定系に多量のシステインが移行することによって有機水銀の還元気化が妨害されるためと考えられる。

なお、抽出の際の振とう時間の影響についても検討を加えたが、n 酢酸ブチルによる抽出も、水層への逆抽出も、30秒から15分まで全く差違はみられなかった。

表3 メチル水銀の n 酢酸ブチル溶液 (10ml) から水層 (10ml) への逆抽出率におよぼすアンモニア濃度とLシステイン濃度の影響

アンモニア濃度 (N)	Lシステイン濃度 (%)	メチル水銀 ($\mu\text{g as Hg}$)	抽出率 (%)
0	0	1.0	37.0
1	0	〃	58.4
2	0	〃	61.8
3	0	〃	59.7
4	0	〃	59.8
2	0.0001	〃	90.3
2	0.001	〃	96.8
2	0.01	〃	98.7
2	0.1	〃	78.7
0	0.01	〃	87.5
1	0.01	〃	98.1
3	0.01	〃	98.7
4	0.01	〃	98.5

4) 回収率および標準偏差

以上、抽出条件についての検討の結果、実験の部の「魚肉中の有機水銀の定量法」を設定した。この方法に従い、まず水銀として $1\mu\text{g}$ に対応する各種有機水銀化合物を含む水溶液について定量した結果が表4である。回収率および標準偏差パーセントは、それぞれメチル水銀 99%、1.2%、エチル水銀 102%、1.7%、酢酸フェニル水銀 100%、0.9%ときわめて満足すべき結果が得られた。

次に、魚肉 1g (湿重量) に相当する魚肉ホモジネート 5 ml に、水銀として $1\mu\text{g}$ に対応する有機水銀を添加し、同様の方法で測定した結果も表4に示した。回収率および標準偏差パーセントは、それぞれメチル水銀92%、1.2%、エチル水銀95%1.4%、酢酸フェニル水銀92%、1.9%という値がえられ、水溶液の場合に比べてやや劣るが、充分実用性のある結果といえる。

5) 無機水銀共存の影響

試料中に無機水銀が共存する場合、これまで述べた溶媒抽出法による測定値にどの程度の影響をおよぼすかについて検討を加えた。その結果は表5である。無機水銀として塩化第二水銀を用いた。これらの結果から、多量の無機水銀が共存する場合以外は、有機水銀の測定に大きな影響をおよぼさないものと考えられる。しかし、多量の無機水銀が共存する場合には、梅崎らの「還元条件2」による測定を同一試料について行い、補正するほうがのぞましい。

湿式分解条件

水銀は水銀イオンとしてもきわめて揮発しやすいことが知られている。^{42,43)}したがって、総水銀定量のための湿式分解に際しては、揮散して失われる水銀をできるだけ抑えるため分解フラスコに還流冷却器を付し、その先端にトラップ

表4 溶媒抽出法を利用した水溶液および魚肉中の有機水銀化合物
(水銀として1 μ g 添加)の無炎原子吸光分析

有機水銀化合物		水溶液からの回収率 (%)	魚肉からの回収率 (%)
CH ₃ HgCl	1	100	94
	2	99	92
	3	98	93
	4	97	91
	5	99	92
	av.	99	92
	S.D. (%)	1.2	1.2
C ₂ H ₅ HgCl	1	100	97
	2	100	94
	3	102	94
	4	104	94
	5	102	96
	av.	102	95
	S.D. (%)	1.7	1.4
C ₆ H ₅ HgOCOCH ₃	1	101	94
	2	101	93
	3	100	91
	4	99	89
	5	100	92
	av.	100	92
	S.D. (%)	0.9	1.9

表5 無機, 有機水銀を含む水溶液についての溶媒抽出法による
有機水銀の無炎原子吸光分析

水銀添加量(μ g as Hg)		測定値(μ g)	回収率(%)
CH ₃ HgCl 1.0 } HgCl ₂ 1.0 }	1	0.98	98
	2	0.98	98
	3	1.00	100
	4	1.02	102
	5	1.01	101
	av.		100
CH ₃ HgCl 1.0 } HgCl ₂ 50.0 }		1.70	170

を連結させる。著者らは、トラップ吸収液として従来の希硫酸にさらに過マンガン酸カリウムを加え、揮散水銀の損失を防止する工夫を行った。分解終了後、トラップ中の KMnO₄-H₂SO₄ 溶液で冷却器を洗い流す処置は重要なポイントで、この処置によって水銀測定の回収率は上昇し、測定値のバラツキも改善される。

以上の諸点を留意して実験の部の「魚肉中の総水銀の定量法」が設定された。この方法に従い、1 μ g の Hg に相

当する水銀化合物について測定を行った結果が表 6 である。きわめて安定した良好な回収率がえられている。

表 6 総水銀定量法によるメチル水銀および塩化第二水銀のそれぞれについての分析

CH ₃ HgCl*	回収率(%)	HgCl ₂ *	回収率(%)
1	97	1	101
2	100	2	101
3	101	3	99
4	99	4	102
5	100	5	99
av.	99	av.	100
S.D. (%)	1.3	S.D. (%)	1.4

* Hg 1 μg に対応する量

魚肉中の水銀分析への適用

水銀として 0.2ppm に相当するメチル水銀を含む水槽中で 8 日間飼育した魚の肉について、実験の部の「定量法」に従い、総水銀量と有機水銀量を測定し、その差より無機水銀量を算出した値が表 7 である。また、市販魚肉についての分析結果も併せて表示した。

表 7 メチル水銀含有水槽で飼育した魚肉と市販魚肉中の水銀分析

試料	総水銀	有機水銀	無機水銀
1	2.60ppm	2.52ppm	0.08ppm
2	2.63	2.51	0.12
3	2.68	2.55	0.13
4	2.64	2.56	0.08
5	2.65	2.54	0.11
av.	2.64	2.54	0.10
S.D. (%)	1.1	0.8	23.5
エビ	0.16	0.10	0.06
クジラ	0.02	0.02	0.00
マグロ	0.31	0.24	0.07
カジキ	0.17	0.09	0.08
アジ	0.03	0.03	0.00
ハマチ	0.08	0.06	0.02
イワシ	0.00	0.00	0.00

結 論

1) 梅崎等が創案した無炎原子吸光法による有機、無機水銀の分別定量法は、水溶液の場合には適用できるが、魚肉中の水銀の定量には適用できない。

2) 魚肉中の有機水銀は 3 N 塩酸酸性で n 酢酸ブチル層に抽出し、次に、L システイン 0.01 % を含む 2 N アンモ

ニア水で水層へ逆抽出したのち、微量の Cu^{2+} を含むアルカリ溶液中 SnCl_2 で還元気化することにより定量することができる。

3) 魚肉中の総水銀量は、魚肉を硫硝酸で湿式分解したのち無炭原子吸光法で定量する。前項で求めた有機水銀量との差から無機水銀量を算出する。

4) 湿式分解の際、トラップ吸収液として、 KMnO_4 を含む希硫酸溶液を用いることによって、揮散水銀の損失を防止する工夫を加えた。

文 献

- 1) 公害分析指針 5, 日本分析化学会関東支部編, 共立出版 (1972)
- 2) G. Westöö: *Acta Chem. Scan.*, **20**, 2131 (1966)
- 3) 喜田村正次, 塚本利之, 早川清, 住野公昭, 柴田孝子: *医学と生物学*, **72**, 274 (1966)
- 4) G. Westöö: *Acta Chem. Scan.*, **21**, 1790 (1967)
- 5) 石倉俊治, 小野寺祐夫: *分析化学*, **16**, 15 (1967)
- 6) 石倉俊治: *分析機器* Vol. 5, No. 5, 52 (1967)
- 7) 寺本亘二, 北畠道俊, 田辺正士, 野口芳孝: *工業化学雑誌*, **70**, 1061 (1967)
- 8) 住野公昭: *Kobe J. Med.*, **14**, 115, 131 (1968)
- 9) 西 未雄, 堀本能之: *分析化学*, **17**, 75 (1968)
- 10) 松本久男: *日衛誌*, **24**, 74 (1969)
- 11) 喜田村正次, 住野公昭: *臨床検査*, **16**, 1019 (1972)
- 12) P. Russel: *Nature*, **176**, 1123 (1955)
- 13) K. Furukawa, T. Suzuki, K. Tonomura: *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 128 (1969)
- 14) K. Tonomura: *J. Ferment. Technol.*, **46**, 685 (1968)
- 15) T. Suzuki: *J. Ferment. Technol.*, **46**, 1048 (1968)
- 16) 曾根興三: *化学*, **20**, 618 (1965)
- 17) 上田喜一: *日本公衛誌*, **15**, 531 (1968)
- 18) K. Tonomura, T. Nakagami, F. Futai, K. Maeda: *J. Ferment. Technol.*, **46**, 506 (1968)
- 19) 守谷茂雄: *日本植物防疫協会誌*, P. 5 (1965)
- 20) K. Tonomura, K. Maeda, F. Futai, T. Nakagami, M. Yamada: *Nature*, **217**, 644 (1968)
- 21) G. Westöö, A. Jensen: *Var. Foda*, **119**, 135 (1967)
- 22) 外村健三: *化学*, **24**, 508 (1969)
- 23) 浮田忠之進, 井村 伸正: *科学*, **41**, 586 (1971)
- 24) S. Jensen, A. Jernelöv: *Nord. Biocid*, **110**, 4 (1967)
- 25) S. Jensen, A. Jernelöv: *Nature*, **223**, 753 (1969)
- 26) 外村健三, 山田 勝: *現代化学*, No. 5, 17 (1971)
- 27) J. M. Wood, R. S. Wolfe: *Biochemistry*, **5**, 3598 (1966)
- 28) J. M. Wood, F. Scott Kennedy, C. G. Rosen: *Nature*, **220**, 173 (1968)
- 29) 外村健三, 山田 勝: *醸酵工学会講演要旨集*, P. 45 (1970)

- 30) 福田勝洋，三宅浩次，岡田 晃：日衛誌，**26**，291（1971）
- 31) 武内次夫，鈴木正巳：原子吸光分光分析，南江堂
- 32) W. Ronald Hatch, Welland L. Ott : *Anal. Chem.*, **40**, 2085（1968）
- 33) 山根靖弘，宮崎元一，坂井和男，村上詔子，古田栄敬，岸 宏侑，石川栄一，新谷千鶴子，永田倫子，川口和恵，笠松隆洋，木藤住子：衛生化学，**17**，274（1971）
- 34) 下田泰助：公害，**20**，92（1972）
- 35) W. F. Fitzgerald, W. B. Lyons : *Nature*, **242**, 5893（1973）
- 36) 浮田忠之進，大沢利昭，井村伸正，外村正治，佐谷戸安好，中室克彦，菅野三郎，福井昭三，金子幹宏，石倉俊治，与那覇政憲，中村 俊：衛生化学，**16**，258（1970）
- 37) G. Lindstedt : *Analyst*, **95**，264（1970）
- 38) G. Lindstedt, I. Skare : *Analyst*, **96**，223（1971）
- 39) I. Skare : *Analyst*, **97**，148（1972）
- 40) 梅崎芳美，岩本和子：分析化学，**20**，173（1971）
- 41) 梅崎芽美：分析化学，**20**，256（1971）
- 42) 下村 滋，西原洋一，棚瀬弥一郎：分析化学，**17**，1148（1968）
- 43) 下村 滋，西原洋一，棚瀬弥一郎：分析化学，**18**，1072（1969）