

フェニル誘導体化GC/MS法による環境水中のアルキル水銀の定量

Determination of alkyl mercury in environmental water samples by the GC/MS method and phenyl derivatization

伴 聡美*, 市川 喜美*, 梶 史生*, 鹿島 勇治*
Satomi BAN*, Yoshimi ICHIKAWA*, Fumio KAJI*, Yuji KASHIMA

【要約】

JIS K 0102 工場排水試験方法に追加されたアルキル水銀のフェニル誘導体化-GC/MS法を環境水に適用することを目的として、河川水及び海水を用いたフェニル誘導体化-GC/MS法の検討を行った。検量線は50~1000 ng/mLの範囲で直線性が確認され、メチル水銀及びエチル水銀の検出下限値 (MDL) はそれぞれ0.1 $\mu\text{g/L}$, 0.1 $\mu\text{g/L}$, 定量下限値 (MQL) は0.3 $\mu\text{g/L}$, 0.4 $\mu\text{g/L}$ であった。河川水及び海水を用いた添加回収試験では、メチル水銀及びエチル水銀で良好な回収率が得られた。これらの結果から本法は、アルキル水銀 (メチル銀及びエチル水銀) の分析において環境基準(0.5 $\mu\text{g/L}$)のオーダーの環境水の定量に適用可能である。

キーワード：アルキル水銀, GC/MS, フェニル誘導体化, 環境水

1. はじめに

水銀条約が締結され、今後、水銀の化学形態別、環境挙動の詳細調査が増えることが予想される。

水質環境基準や排水基準における告示法やJIS K 0102 工場排水試験方法 (以下「JIS K 0102」) では、アルキル水銀の分析方法として長年ベンゼン抽出後にL-システインに逆抽出し、パックドカラムGC-ECDを使用する方法が使用されてきた。JIS K 0102の2019年3月改訂により、アルキル水銀 (II) 化合物をテトラフェニルホウ酸ナトリウムにより誘導体化 (フェニル化) 後、トルエンで抽出し、ガスクロマトグラフ質量分析法 (GC/MS) を用いて定量する方法 (JIS K 0102 66.2.2) が追加された。この方法は工業排水を対象にしているため、環境水での適用については十分に検討されていないが、環境水においても誘導体化-GC/MS法を適用することによって、より選択性の高い定量が可能となる。

そこで、本研究ではJIS K 0102 66.2.2に示されている方法が環境水中のアルキル水銀の定量に適用できるか検討を行ったので報告する。

2. 実験

2.1 試薬及び標準液の調製

塩化メチル水銀及 (II) 及び塩化エチル水銀 (II) の標準原液として、富士フィルム和光純薬製2種アルキル水銀混合標準液 (各10 $\mu\text{g/mL}$, ベンゼン溶液, 水質試験用) を使用した。また内標準物質として、富士フィルム和光純薬製の2,4,6-トリクロロアニソール- d_3 (水質試験用) 及びフェナントレン- d_{10} (環境分析用) を用いた。その他の試薬として酢酸 (LC/MS用), メタノール (濃縮残留農薬・PCB試験用), トルエン (5000倍濃縮残留農薬・PCB試験用) 及びPEG300 (和光一級) は富士フィルム和光純薬製を用い、テトラフェニルホウ酸ナトリウム (GC/MS用), 塩酸 (特級), 水酸化ナトリウム (窒素測定用) は関東化学製を用いた。精製水はMerck Millipore製純水製造装置 (A-10) で精製した水を用いた。

アルキル水銀標準液は、標準原液をメタノールで適宜希釈したものを精製水に添加し、**2.4 操作**に従ってフェニル誘導体化して50~1000 ng/mL

* 一般財団法人日本環境衛生センター東日本支局環境事業本部環境事業第二部計測技術課
Japan Environmental Sanitation Center Environmental Science Department Environmental Chemical Analysis Division

(Hgとしての濃度、以下同じ)の範囲の検量線用標準液を作成した。各検量線用標準液には、内標準物質として2,4,6-トリクロロアニソール- d_3 を40 ng/mL, 及びフェナントレン- d_{10} を50 ng/mLになるように添加した。前者は、2,4,6-トリクロロアニソール- d_3 10 mgをメタノールに溶解して10 mLとして1000 ng/mLの内標準原液とし、この溶液をメタノールで25倍に希釈して40 μ g/mLの2,4,6-トリクロロアニソール- d_3 内標準液とした。後者は、フェナントレン- d_{10} 10 mgをトルエンに溶解して10 mLとして1000 ng/mLの内標準原液とし、この溶液をトルエンで希釈して1 μ g/mLのフェナントレン- d_{10} 内標準液とした。

酢酸緩衝液は、精製水500 mLに酢酸11.5 mL及び3 mol/L水酸化ナトリウム溶液42.5 mLを加え、精製水で1 Lとした。

テトラフェニルホウ酸ナトリウム溶液(20 g/L)は、テトラフェニルホウ酸ナトリウム2.0 gを精製水で100 mLとし、使用時に調製した。

2.2 装置

抽出にはADVANTEC製マグネティックスターラー(SR-506)を用いた。分析装置は島津製作所製GC/MS(GC:GC-2010Plus, MS:QP-2010Ultra)を用いた。GC/MS測定条件は表1に示す。

2.3 試料

試料には、2019年12月に採取した河川水(鶴見川)及び海水(川崎港)を用いた。

2.4 操作

図1に分析フローの概要を示す。JIS K 0102 66.2.2からの変更点は、濃縮率を上げるために①試料量100 mLを最終液量5 mL(20倍濃縮)とするところを200 mLを2 mL(100倍濃縮)とした点、②脱水後のトルエン層を濃縮した点、③2,4,6-トリクロロアニソール- d_3 内標準の回収率を確認するためフェナントレン- d_{10} 内標準を追加した点である。なお、試料量を増やしたことに伴い、各試薬も2倍量添加した。操作手順の概要を以下に示す。

水質試料200 mLを共栓平底フラスコ250 mLに取り、水酸化ナトリウム溶液(3 mol/L)又は塩酸(1+1)で中性とした後、酢酸緩衝液10 mL及び2,4,6-トリクロロアニソール- d_3 内標準液(40 μ g/mL)2 μ Lを加え、更に水酸化ナトリウム溶液(3 mol/L)又は塩酸(1+1)でpHを5.0 \pm 0.1とした。テトラフェニルほう酸ナトリウム溶液(20 g/L)2 mLを加えて緩やかに振り混ぜた後、トルエン10 mLを加え密栓し、マグネティックスターラーで約60分間激しくかき混ぜ、約10分間放置した。その後、トルエン層の下部が共栓平底フラスコの細口部に達するまで精製水を加えた後、トルエン層を硫酸ナトリウムで脱水しながら共栓試験管に移し、窒素気流下で2 mLまで濃縮後、フェナントレン- d_{10} 内標準液(1 μ g/mL)100 μ L及びPEG300溶液(100 g/L)4 μ Lを加えて試験液とした。

2.5 定量

検量線用標準液1 μ LをGC/MSに注入し、対象物質と2,4,6-トリクロロアニソール- d_3 内標準の濃度比及び得られたピーク面積比から検量線を作成した。また、2.4操作に従って調製した試験液1 μ LをGC/MSに注入し、対象物質と2,4,6-トリクロロアニソール- d_3 内標準の濃度及びピーク面積の比を検量線に照らして定量した。なお、フェナントレン- d_{10} 内標準は、2,4,6-トリクロロアニソール- d_3 の回収率を算出するために用いた。

3. 実験結果と考察

3.1 装置感度と検量線

JIS K 0102 66.2.2に記載されているGC条件を参考に条件の最適化を行った。キャピラリーカラムはJIS記載の液相(メチルシロキサン又はフェニルメチルポリシロキサン)を参考に、当初、微極性カラムで汎用性の高いAgilent製DB-5ms(30 mm \times 0.25 mm, 0.25 μ m, (5%フェニル)-メチルポリシロキサン相当)を用いたがピークのテーリングは激しかったため、中極性のDB-17ms(30 mm \times 0.25 mm, 0.15 μ m, (50%フェニル)-メチルポリシロキサン相当)に変更することによりピーク

表1 GC/MS条件

GC/MS 機器	: 島津製作所製 (GC : GC-2010Plus, MS : QP-2010Ultra)
使用カラム	: Agilent 製 DB-17ms (30 m × 0.25 mm, 0.15 μm)
カラム温度	: 100°C (3 min) → 20°C/min → 280°C → 30°C/min → 300°C (5 min)
注入口温度	: 250°C
注入方法	: パルスドスプリットレス (450.0 kPa, 1 min)
サンプリング時間	: 2 min
試料注入液量	: 1 μL
キャリアーガス	: 線速度一定 36.2 cm/s
パージ流量	: 3.0 mL/min
インターフェース温度	: 270°C
イオン源温度	: 240°C
検出モード	: SIM
モニターイオン	: フェニルメチル水銀 m/z 294 (確認イオン 292) フェニルエチル水銀 m/z 308 (確認イオン 306) 2,4,6-トリクロロアニソール- d_3 m/z 213 (確認イオン 215) フェナントレン- d_{10} m/z 188

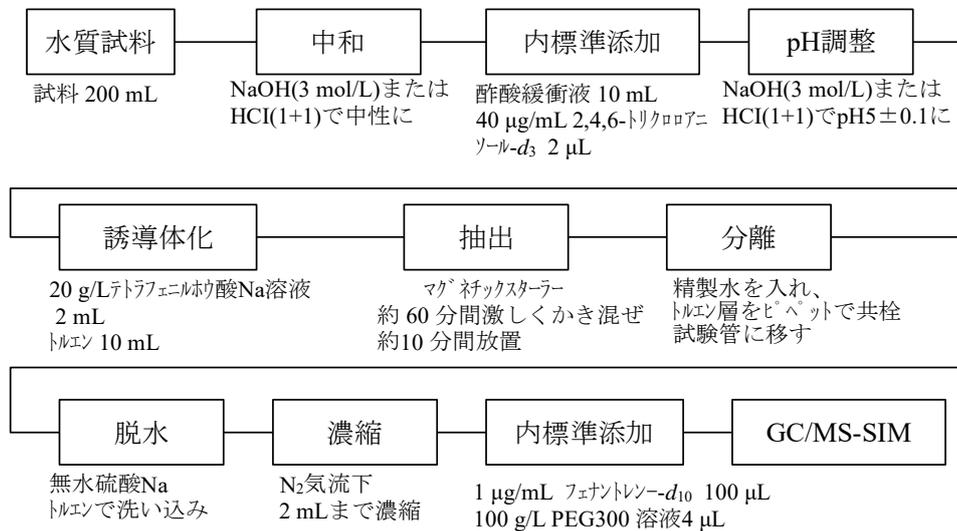


図1 メチル水銀(II)及びエチル水銀(II)の分析フロー

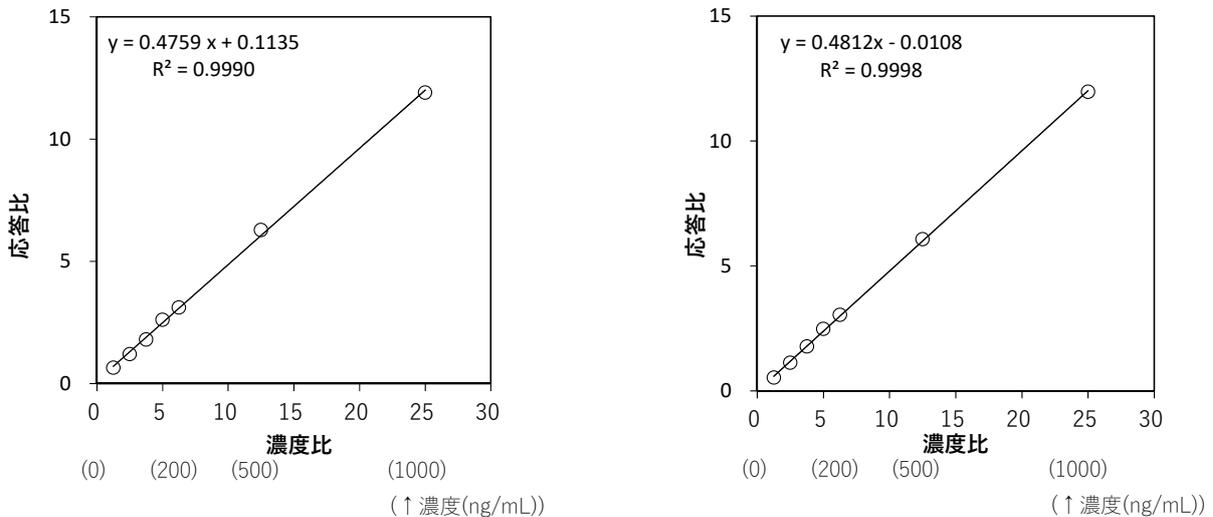


図2 検量線

(左図 : フェニルメチル水銀, 右図 : フェニルエチル水銀 : 50~1000 ng/mL(Hg として),
 2,4,6-トリクロロアニソール- d_3 40 ng/mL)

表2 環境水への添加回収試験結果

物質名	試料	試料量 (L)	添加量 (ng)	最終液量 (mL)	試験数	検出濃度 (μg/L)*1	回収率(%)*1	変動係数 (%)	2,4,6-トリクロロアニソール-d ₃ 回収率(%)
メチル水銀	河川水	0.20	0	2	1	0.0	-	-	97
		0.20	400	2	3	2.0	100	8.5	87
	海水	0.20	0	2	1	0.0	-	-	86
		0.20	400	2	3	2.1	100	3.5	84
エチル水銀	河川水	0.20	0	2	1	0.0	-	-	97
		0.20	400	2	3	2.1	110	7.8	87
	海水	0.20	0	2	1	0.0	-	-	86
		0.20	400	2	3	2.2	110	2.7	84

*1 : 2,4,6-トリクロロアニソール-d₃で補正した値

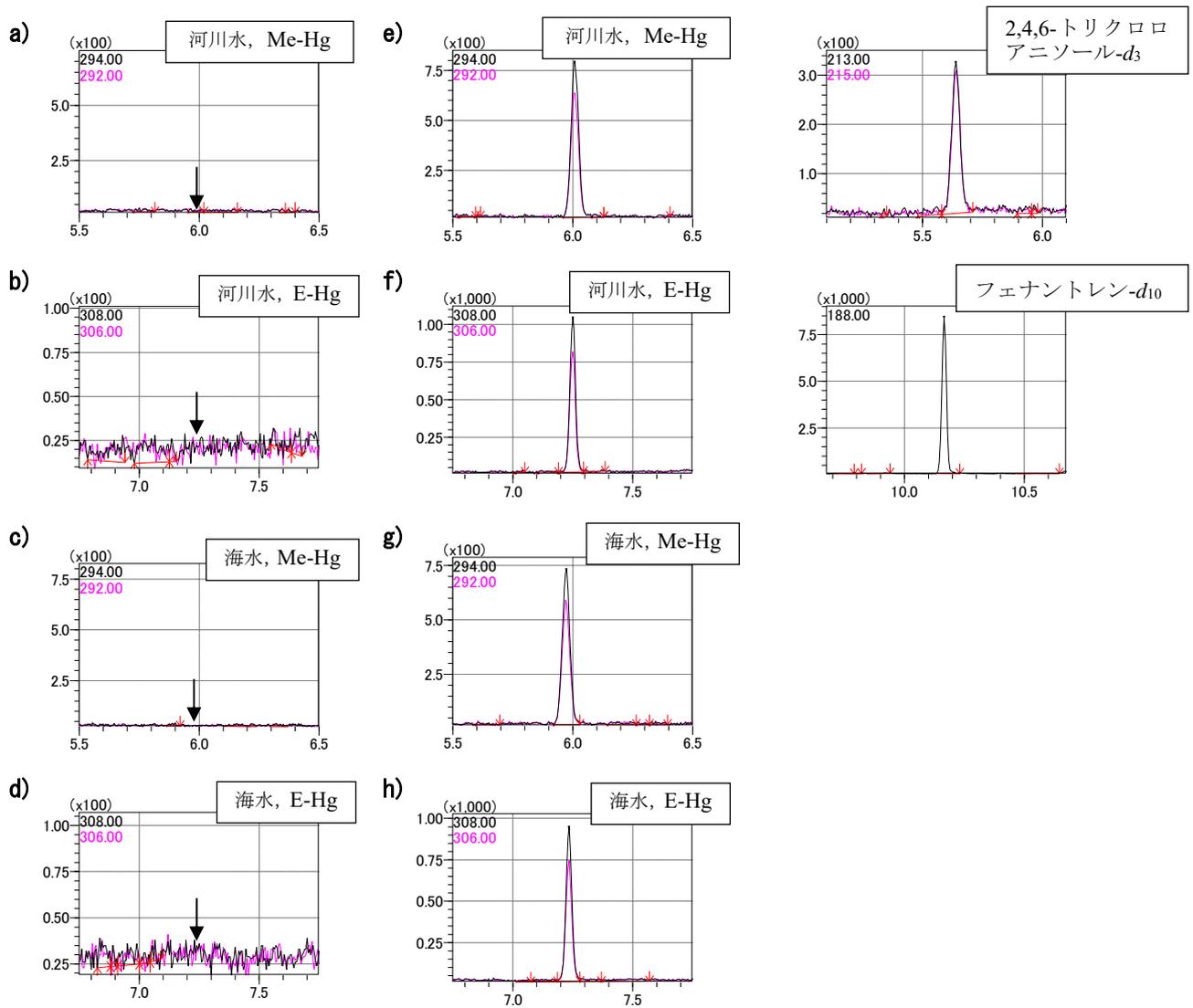


図3 添加回収試験時のクロマトグラム (a~d : 無添加試料, e~h : 添加試料, Me-Hg : フェニルエチル水銀, E-Hg : フェニルエチル水銀)

形状が改善した。カラム昇温においては、試験液に添加するPEGがカラム中に残留することを防ぐためにカラム温度を300℃まで昇温させることを考慮して、耐熱対応のカラムを選択した。また、フェニル化水銀が低沸点であるため、加圧注入にすることにより安定してカラムに注入することが可能となった。

図2にメチル水銀とエチル水銀標準液のフェニル誘導化物の検量線を示す。メチル水銀とエチル水銀ともに50～1000 ng/mLの範囲で良好な直線性 ($R^2=0.999$ 以上) が確認された。本分析に用いたGC/MSの装置検出下限値(IDL)は、フェニルメチル水銀が10 pg, フェニルエチル水銀が10 pgであった。

3.2 最終試験液の濃縮

JIS K 0102 66.2で示されているアルキル水銀の定量範囲はHg 0.2～10 $\mu\text{g/L}$ (試料換算値) であり、また、アルキル水銀の環境基準は「検出しないこと (定量限界 0.5 $\mu\text{g/L}$)」である。将来的に環境基準値を満たす測定精度を目指すためには同程度の感度が必要であったが、本検討に用いたGC/MSでは感度が不足していた。そこで、濃縮率をJIS K 0102 66.2.2の20倍から100倍に上げるため、試料量を2倍に増やすとともに最終試験液を濃縮することにより感度不足を補うことが可能か検討を行った。

20, 50, 100 ng/mLの検量線用標準液をそれぞれ2 mL分取し、窒素気流下で乾固直前まで濃縮後、再度トルエンで2 mLに定容して測定し、検量線を作成した。なお、ここではフェナントレン- d_{10} 内標準で補正した検量線を用いた。検量線用標準液の濃縮の有無による検量線の一次回帰式を表3に示す。比較の結果、メチル水銀、エチル水銀とも濃縮の有無による検量線の傾きに差がないことから、濃縮時のアルキル水銀の損失はないと考えられた。これを受けて、本検討での分析フローに抽出液を5倍濃縮する工程を追加した。装置感度が不足しているときやより高感度で測定したいときは濃縮操作を追加することが可能である。

表3 検量線用標準液の濃縮の有無による検量線の回帰式の比較

試料	濃縮	検量線回帰式*	
		メチル水銀	エチル水銀
検量線用標準液(20, 50, 100 ng/mL)	無	$y = 1.56x - 0.11$	$y = 1.18x - 0.12$
	有	$y = 1.61x - 0.30$	$y = 1.22x - 0.12$

*: フェナントレン- d_{10} 内標準で補正

3.3 環境試料からの回収率の評価と分析方法の検出下限値(MDL)及び定量下限値(MQL)

河川水及び海水への添加回収試験結果を表2、添加回収試験時のクロマトグラムを図3に示す。河川水及び海水にアルキル水銀各400 ngを添加し、**2.4 操作**に従って前処理を行い測定した結果、メチル水銀、エチル水銀ともに河川水及び海水で良好な回収 (100～110%) が得られた。また、2, 4, 6-トリクロロアニソール- d_3 内標準の回収率も84～97%と良好な回収率であった。JIS K 0102 66.2ではフェナントレン- d_{10} 内標準を添加していないが、今回添加することにより2, 4, 6-トリクロロアニソール- d_3 内標準の回収率を把握することが可能となった。

抽出方法の検討のひとつとして、スターラー抽出の代わりに振とう抽出が適用可能か検討したところ (30分×1回抽出)、60～80%程度と低い回収率で変動も大きかった。原因については不明であるが、抽出方法を変更する場合には注意が必要である。なお、検討に用いた河川水と海水からは、いずれもアルキル水銀 (メチル水銀及びエチル水銀) は検出されなかった。また、添加回収試験で調製した試験液を3週間冷暗所保存した後に再度測定した結果、調製濃度に対する残存率は94～110%の間であり、調製後3週間程度であれば保存可能であることを確認した。

本分析方法におけるMDL及びMQLを算出した ($MDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$, $MQL = \sigma_{n-1} \times 10$)。アルキル水銀各100 ngを添加した河川水200 mL ($n=7$, 試料換算濃度0.5 $\mu\text{g/L}$) を**2.4 操作**に従って前処理を行い測定した結果、メチル水銀のMDLは0.1 $\mu\text{g/L}$, MQLは0.3 $\mu\text{g/L}$ であった。また、エ

チル水銀のMDLは0.1 $\mu\text{g/L}$, MQLは0.4 $\mu\text{g/L}$ であった。

4. まとめ

JIS K 0102 工場排水試験方法に追加されたアルキル水銀のフェニル誘導体化-GC/MS法を環境水に適用することを目的として、河川水及び海水を用いたフェニル誘導体化-GC/MS法の検討を行った。本研究における検量線はHgとして50~1000 ng/mLの範囲で直線性が確認された。メチル水銀及びエチル水銀のMDLはそれぞれ0.1 $\mu\text{g/L}$ 及び0.1 $\mu\text{g/L}$, MQLは0.3 $\mu\text{g/L}$ 及び0.4 $\mu\text{g/L}$ であった。河川水を用いた添加回収試験については、メチル水銀及びエチル水銀でそれぞれ回収率100%及び110%, 海水を用いた添加回収試験については回収率100%及び110%であった。本分析法を用いて河川及び海水を測定したところ、いずれも不検出(MDL以下)であった。また、JIS K 0102 66.2.2に規定されていない濃縮操作を追加することにより、装置感度が不足しているときやより高感度での測定が可能となった。

以上の結果から本法は、アルキル水銀（メチル水銀及びエチル水銀）の分析において環境基準(0.5 $\mu\text{g/L}$)のオーダーの環境試料の定量に適用可能であると判断される。今後、環境水のアルキル水銀分析におけるフェニル誘導体化-GC/MS法の普及が期待される。

【参考文献】

- 1) 環境庁告示第59号 付表3
- 2) JIS K 0102 : 2019 工場排水試験方法

Summary

This method provides procedures for the determination of methyl and ethyl mercury in water samples by gas chromatography/mass spectrometry with selected ion monitoring (GC/MS -SIM) following phenyl derivatization.

A 500-mL sample of water was mixed with 10 mL of acetate buffer and 80 ng of 2,4,6-trichloroanisole-*d*₃ as internal standard. The sample is phenylated using

sodium tetraphenylborate and extracted with 10 mL of toluene. The toluene extracts were dehydrated with anhydrous sodium sulfate. Then the toluene solution was concentrated to 2-mL under a nitrogen stream, mixed with 100 ng of phenanthrene-*d*₁₀ and 4 μL of PEG300(100 g/L), and finally analyzed by GC/MS. The instrument detection limit (IDL) of methyl (phenyl) mercury and ethyl (phenyl) mercury are 10 pg for both the chemical series. The method detection limits (MDL) of both methyl and ethyl mercury for a water sample are

0.1 $\mu\text{g/L}$. The method quantification limit (MQL) of methyl and ethyl mercury for a water sample are 0.3 and 0.4 $\mu\text{g/L}$, respectively. The average of recoveries ($n = 3$) from 400-ng methyl and ethyl mercury added to water samples were 100% (CV = 3.5%–8.5%) and 110% (CV = 2.7%–7.8 %), respectively.