

## 報 文

大豆たんぱく質による水中の微量水銀の濃縮と  
フレイムレス原子吸光分析\*

武者 宗一郎\*\*, 高橋 芳久\*\*\*

(1975 年 3 月 24 日受理)

大豆たんぱく質が酸類などの添加により凝固する性質及び重金属イオンと錯体形成する性質を利用して、水中の微量水銀を捕集濃縮する方法を検討した。試料水 {(100~1000)ml} に一定量 {(5~10)ml} の豆乳 (6.34%) 及び凝固剤  $\delta$ -グルコノラクトン (以下  $\delta$ -GL と略記) の所定量を加えて加熱し、たんぱく質を凝固させ、凝固物 (豆腐) に捕集濃縮された水銀をゼーマン効果を用いたフレイムレス原子吸光法 (日立ゼーマン水銀分析計 501 形) により定量した。たんぱく質の最も凝固する pH 4.5~5.0 付近になるように適量の  $\delta$ -GL を加えた場合、捕集率は 99% 以上であった。本法を人工海水や食塩中の微量水銀の濃縮、定量に応用した例も示す。

## 1 緒 言

最近、沿岸海域水中などの水銀汚染が重大な関心の的になっており、簡便迅速な分析法が要求されている。しかし、海水や河川水などの天然水中の水銀含有量は極めて低い<sup>1)~4)</sup>、なんらかの濃縮分離手段を必要とする。その手段として、銅<sup>5)</sup> やカドミウムの硫化物による共沈法<sup>6)</sup>、金、銀、銅などの金属アマルガムとして捕集する方法<sup>7)</sup>、硫化カドミウムを捕集剤とする吸着コロイド浮選法<sup>8)</sup> など種々の方法が報告されている<sup>9)</sup>。又、農産物やその副産物を捕集剤として用いる方法もあるが、あまり定量的でない<sup>10)</sup>。

一方、著者らは先に大豆たんぱく質の凝固過程を利用する水中の微量の金の捕集濃縮方法について報告した<sup>8)</sup>。本報では、これに引き続いて水銀の捕集定量方法を検討した結果について報告する。大豆たんぱく質の凝固物 (豆腐) に捕集濃縮された水銀をゼーマン効果を利用してバックグラウンド補正を行う原子吸光装置<sup>9)</sup> を用いて定量した。

\* 大豆たんぱく質の凝固過程を利用する微量金属の濃縮方法に関する研究 (第3報)。前報は武者宗一郎、高橋芳久：本誌，24，395 (1975)

\*\* 大阪府立大学工学部応用化学科：大阪府堺市百舌鳥梅町 4-804

\*\*\* 花王石鹼株式会社産業科学研究所：和歌山県和歌山市湊薬種畑 1334

## 2 実 験

## 2.1 試 薬

水銀標準溶液：塩化第二水銀 (和光純薬製、試薬特級) 1.354 g を 1N 硫酸 100 ml 及び準沸騰精製蒸留水 (sub-boiling distilled water, 以下単に水とはこれをさす) に溶解して 1 l とした (水銀として 1 mg/ml)。これを原液とし、使用の都度、適宜希釈して用いた。

硫酸第一スズ溶液：10%，1N 硫酸溶液

過塩素酸マグネシウム：元素分析用

混酸：硝酸 3，硫酸 1 及び 66% 過塩素酸 1 の割合で混合したものを用いた。

豆乳：前報<sup>8)</sup> のものと同様にして調製した (固形分として 6.34%)。

$\delta$ -グルコノラクトン (以下  $\delta$ -GL と略記)：前報<sup>8)</sup> と同様にして調製した (0.10 g/ml)。その他の試薬は特に断らない限り、試薬特級品を使用した。

## 2.2 装置及び器具

原子吸光分析装置：日立ゼーマン水銀分析計 501 形を使用した。試料容器は長さ 15 mm，幅 5 mm，深さ 4 mm の石英ボートと長さ 12 mm，幅 5 mm，深さ 4 mm の元素分析用白金ボート並びに内径 3.5 mm，深さ 10 mm の斜めの切口をもつ石英カップである。いずれの場合も使用の際、容器の底に石英綿約 5 mg を詰めておいた。試料容器への水銀標準溶液の注入にはエクスカリバー社製の P-3000A オートマイクロピペット (10  $\mu$ l) を使用した。

又、比較のために行った通常の開放通気式還元気化法に使用した装置は日立原子吸光光度計 207 形である。光

源にウェスチングハウス社製水銀中空陰極ランプを使用し、記録計に日立 QPD-54 形を用いた。吸光セルは長さ 20 cm, 内径 18 mm, 外径 20 mm の石英製である。反応容器として容量 30 ml の細長いバブラーびんを用い、その前に活性炭フィルターを取り付け、通気の際、空気を精製した。反応容器と吸光セルの間にドロップ・トラップ及び無水過塩素酸マグネシウムを詰めた脱水管を取り付けた。一方、豆腐の湿式分解には 250 ml のフラスコに還流冷却器を取り付けた Alvarez の分解装置<sup>10)</sup>を使用した。その他の装置は前報<sup>8)</sup>のものと同一である。

### 2.3 実験操作

一定量の試料水 {(100~1000)ml} をビーカーに採り、これに一定量の豆乳 {(5~50)ml} を加え、かき混ぜながら徐々に加熱し、約 70°C になったとき所定量の  $\delta$ -GL {0.1 g/ml, (0.35~3.50)ml}<sup>8)</sup> を加え、更に加熱して沸騰させる。(2~3) 分間煮沸した後、室温まで放置して凝固を完結させる(豆腐の生成)。これを遠心分離(約 10000 rpm, 10 分間)又は汙過して、豆腐と溶液部分を分離する。この豆腐を約 100 ml の水で 2 回水洗した後、適当な容器(ひょう量びん)に移し、湿潤のままの豆腐の重量を測定する。次に、この一部{約(10~30)mg} を減量法により石英ボートから成る試料ホルダーにひょう取して直接原子化炉へそう入し、原子吸光を測定する。原子化された水銀原子が同時に発生した煙などとともに、原子化炉内吸収セルに導かれ、ここで、ゼーマン原子吸収が行われる。煙などのバックグラウンドによる見掛け上の吸収が補正される。測定した値をもとの全豆腐重量に換算して試料中の全水銀含有量を求める。測定条件は原子化炉温度 900°C, 酸素流量 0.5 l/min である。

### 2.4 湿式分解操作

還元気化法で測定する場合、まず豆腐を Alvarez の分解装置中に入れ、これに混酸(硝酸 3 容+硫酸 1 容+66% 過塩素酸 1 容) 10 ml を加え、約 350°C のホットプレート上で分解液が透明になるまで加熱する。分解終了後水で希釈して全量を 20 ml として分析用試料溶液とした。

これを容量 30 ml のバブラーびんに移し、これに硫酸(1+1) 1 ml 及び 10% 硫酸第一スズ溶液 2 ml を加えて通常の開放通気式還元気化法で測定した。

測定条件はランプ電流 8 mA, 測定波長 253.7 nm, 通気流量 1.2 l/min である。

## 3 結果と考察

### 3.1 測定条件の検討

本研究に使用した水銀分析計は限られた空間内で試料の燃焼を行うため、試料量や酸素の供給量の相違によって燃焼状態が変わることが予想される。酸素流量を増すと感度が低下する傾向を示すので、一応 0.5 l/min に設定し、原子化炉温度を 900°C に保ち、湿潤試料(含水量約 70% 前後)量を変化させた場合、試料量の増加に伴い分析値が多少低下する傾向を示した(Fig. 1)。これは試料の不完全燃焼により水銀原子の有機物分子からの解離が不完全になるためと考えられる。又、試料量が 30 mg 以上になると、燃焼が不十分で、容器の底に黒い炭化物が残ることがあった。それゆえ、試料採取量は 30 mg 以下にとどめた。

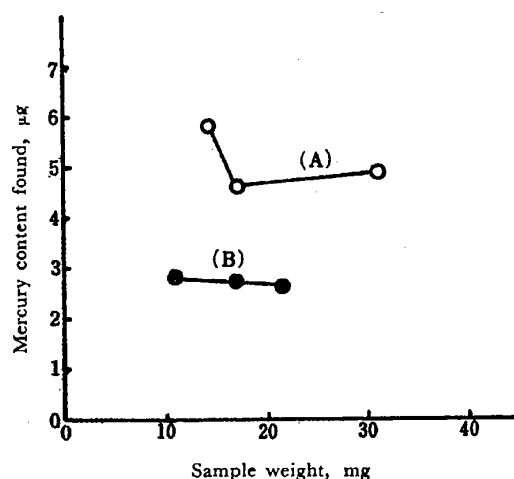


Fig. 1 Relationship between sample amounts and mercury contents found

Soybean curd (A) and (B) were obtained from sample solutions containing 5 µg and 2 µg of mercury, respectively.

一方、試料容器の形態について検討した結果、石英ボート、石英カップ及び白金ボートを用いて 5 ppm 水銀標準溶液(10 µl)について各 10 回測定した場合の変動係数は各々 3.6%, 6.3%, 5.4% であり、石英ボートを用いた場合に再現性がよく、又検量線も良い直線性を示した。それゆえ、以後の実験には石英ボートを使用した。

### 3.2 捕集条件の検討

#### 3.2.1 捕集率と pH との関係

大豆たんぱく質の凝固及びそれと重金属イオンとの反応性は溶液の pH と密接な関係がある<sup>8)</sup>ので、水銀の捕

集に及ぼす pH の影響を調べた。

水銀  $5\mu\text{g}$  を含む水溶液  $100\text{ ml}$  に豆乳  $20\text{ ml}$  を加え、 $\delta$ -GL 添加量<sup>8)</sup> を種々変化させ、凝固時の溶液の pH を変化させ、以下 2.3 の操作に準じて測定した結果を Fig. 2 に示す。金の場合<sup>8)</sup> と同様、pH が  $4.5\sim 5.0$  付近で捕集率は最大であった。この pH 範囲は凝固の最もよく起こる pH 領域とよく一致する<sup>8)</sup>。

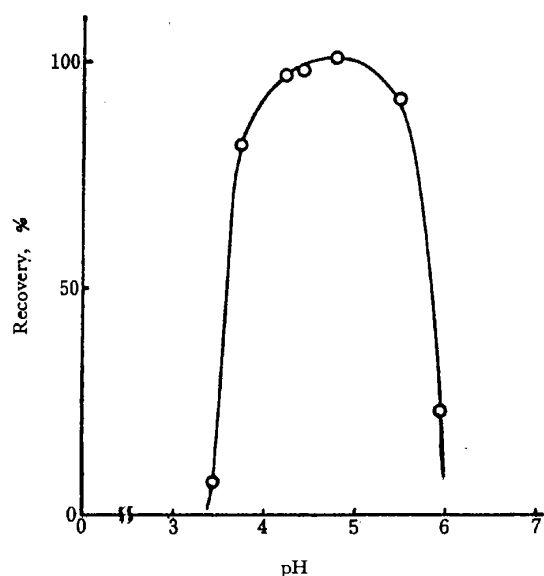


Fig. 2 Relationship between pH and the recovery of mercury

Volume of sample solution containing  $5\mu\text{g}$  of Hg:  $100\text{ ml}$ ; Soybean milk added:  $20\text{ ml}$ ; pH was adjusted by adding the varying amounts of  $\delta$ -gluconic lactone solution ( $0.1\text{ g/ml}$ ).

水銀の捕集機構については、主にたんぱく質のメルカプト基などの側鎖と配位結合するものと考えられる<sup>11)~14)</sup>。

**3.2.2 豆乳添加量と捕集率との関係** 水銀  $5\mu\text{g}$  を含む水溶液  $100\text{ ml}$  に豆乳の添加量を種々変え、以下 2.3 の操作に準じて捕集定量した結果を Fig. 3 に示す。豆乳添加量が  $(5\sim 50)\text{ ml}$  の範囲内で、99% 以上の捕集率を示した。5 ml 以下では、豆腐の実験器具への付着など操作上のロスの影響が大きくなり、分析値が低下し、ばらつきやすくなる。一方、豆乳量が多いと、豆腐の単位重量当たりの水銀捕集量が少なくなること及び分析試料採取量 ( $30\text{ mg}$  以内) に制限があるため、相対的に検出定量限界が低下する。それゆえ、以後の実験には豆乳 ( $5\sim 10\text{ ml}$ ) を使用することにした。

**3.2.3 捕集に及ぼす塩化ナトリウムの影響** 本法を海水などの試料に応用するに際して、水銀の捕集に及ぼす塩化ナトリウムのマトリックス効果を検討した。

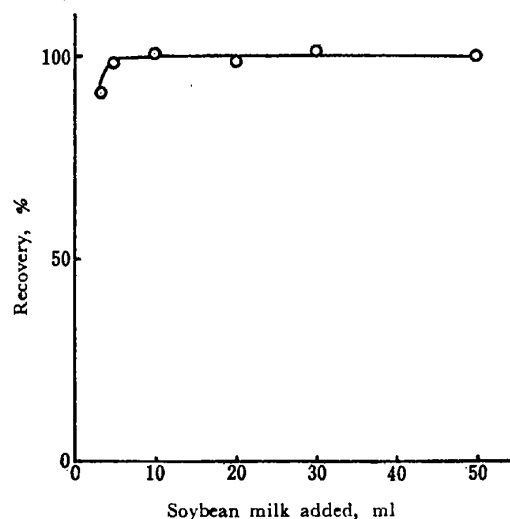


Fig. 3 Relationship between the amounts of soybean milk and the recovery of mercury

Volume of sample solution containing  $5\mu\text{g}$  of Hg:  $100\text{ ml}$

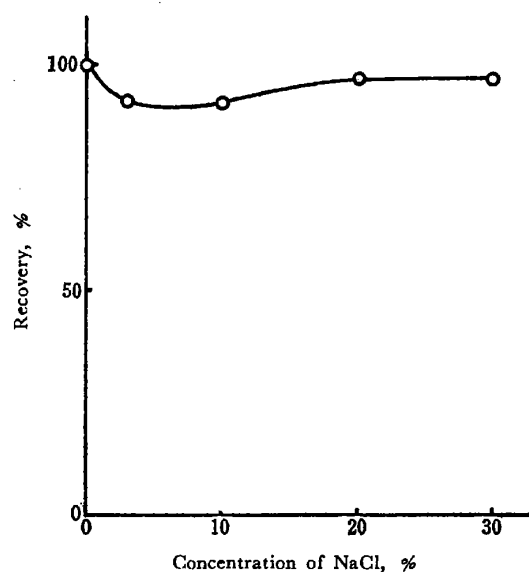


Fig. 4 Effect of NaCl concentration on the recovery of mercury

Volume of sample solution containing  $5\mu\text{g}$  of Hg:  $100\text{ ml}$ ; Soybean milk added:  $10\text{ ml}$

水銀  $5\mu\text{g}$  を含む種々の濃度の塩化ナトリウム水溶液  $100\text{ ml}$  に豆乳  $10\text{ ml}$  を加え、以下 2.3 の操作に準じて測定した結果を Fig. 4 に示す。塩化ナトリウムは捕集率を低下させる傾向をもつが、これは塩化ナトリウムがたんぱく質の溶解を促進させる作用をもつためと考えられる<sup>15)</sup>。一般に、塩化ナトリウムの共存は、そのイオン強度が比較的小さい区間において、たんぱく質の分子内あるいは分子間における静電結合を減少させ、親水性を大きくする働き（塩溶効果）をもつ<sup>16)</sup>。塩化ナトリウ

Table 1 Results of mercury analysis in various sample solutions

| Sample               | Volume of sample (l) | Hg added (ppb) | Zeeman effect Hg analyzer |              | Cold vapor AAS†† |              |
|----------------------|----------------------|----------------|---------------------------|--------------|------------------|--------------|
|                      |                      |                | Hg found (ppb)            | Recovery (%) | Hg found (ppb)   | Recovery (%) |
| Water                | 1                    | 5.0            | 5.17                      | 103.4        | 4.45             | 88.9         |
| "                    | 1                    | 4.0            | 3.95                      | 98.8         | 3.41             | 85.3         |
| "                    | 1                    | 3.0            | 3.04                      | 101.3        | 2.32             | 77.4         |
| "                    | 1                    | 2.0            | 1.93                      | 96.5         | 1.60             | 80.0         |
| "                    | 1                    | 1.0            | 1.09                      | 109.0        | 0.82             | 82.0         |
| "                    | 1                    | 0.50†          | 0.35                      | 70.0         | 0.43             | 86.6         |
| "                    | 1                    | 0.05†          | 0.05                      | 100.0        | 0.09             | 180.0        |
| 3% NaCl soln.        | 1                    | 5.0            | 4.20                      | 84.0         | 3.85             | 77.0         |
| "                    | 1                    | 1.0            | 0.98                      | 98.0         |                  |              |
| "                    | 1                    | 0.50†          | 0.34                      | 68.0         | 0.33             | 66.2         |
| "                    | 1                    | 0.05†          | 0.06                      | 120.0        | 0.07             | 140.0        |
| Artificial Sea water | 1                    | 5.0            | 3.79                      | 75.8         | 4.71             | 94.0         |
| "                    | 1                    | 1.0            | 1.09                      | 109.0        |                  |              |

Average of 3 determinations; Soybean milk added: 10 ml († 5 ml); †† Cold-vapor atomic absorption spectrometry

ム濃度が (3~10)% 前後の比較的低濃度において回収率が低下したのは、この塩溶効果によるものと考えられる。一方、比較的高濃度において、再び回収率が上昇するのは、イオン強度の増加自体が凝析力として働くため、つまり塩析効果によってたんぱく質の凝固が促進されるためと考えられる。

### 3.3 各種試料水中の水銀の定量

水、3% 塩化ナトリウム溶液及び人工海水に各種濃度の水銀を添加し、その回収率を測定した。Table 1 に示すように、1 l の試料水中の (0.05~5.0) ppb オーダーの水銀の回収率は多少ばらつきが見られるものの、ほぼ一定で、100(±30)% であった。

### 3.4 食塩中の微量水銀の定量への応用

本法を食用塩及び工業用岩塩中の微量水銀の定量に応用し、標準添加法により定量した。

試料食塩約 280 g をひょう取し、水約 900 ml に加温溶解し、もし不溶解きょう雑物がある場合これを濾過して除去した後、水で希釈して全量を 1 l とした。ただし溶液がアルカリ性を示す場合、これに希塩酸を加えて中和した。この試料溶液中の水銀を 2・3 の操作に準じて標準添加法で捕集定量した結果を Table 2 に示す。なお、試料中、シャークベイ産塩はオーストラリア、Shark bay 結晶池産のもの、メキシコ塩はアメリカ、カリフォルニア州とメキシコとの国境から南方 500 キロメートルの Black warrior 塩田産のものである。天塩はメキシコ産の天日塩を溶かし、これに中国産の天然にがり混ぜ、改めて鉄がまで結晶させた特殊用塩である（赤穂化製）。能登の揚げ浜塩とは、今日なお、観光用として保

全されている塩田産の食用塩である。食塩は日本専売公社発売の“食塩”（鳴門塩業株式会社製）で、精製塩は同じく日本専売公社発売のもの（日本食塩製造株式会社製）である。与根塩田産塩は沖縄県与根塩田産の天日塩である。

Table 2 Results of mercury analysis in common and industrial salts

| Sample                                   | Hg found (ppb)† |
|------------------------------------------|-----------------|
| Shark bay salt, Australia (Crushed salt) | 0.3             |
| Mexican salt (Crushed salt)              | 0.9             |
| "Ama-shio" (Salt for special use)        | 0.4             |
| Yone salt, Okinawa (Solar salt)          | 1.4             |
| Agehama salt, Noto (Solar salt)          | 1.2             |
| Kitchen salt                             | 0.4             |
| Refined salt                             | 0.3             |
| Salt for reagent (Guaranteed grade)      | 0.3             |

† Average of 3 determinations; Sample weight: 70 g; Soybean milk added: 5 ml

一方、海水中的の水銀含有量は海水試料の採取場所や分析方法などの相違によりかなりの範囲の幅があり、0.15<sup>17)</sup>, 0.1<sup>18)</sup>, (0.14~2.8)<sup>19)</sup> ppb などの値が報告されている。ちなみに 0.1 ppb の水銀を含む海水がそのまま濃縮乾燥されたと仮定すると、その海塩中には約 3 ppb の水銀が含まれることになる。本法による食塩中の水銀の定量結果、特に海水を天日塩田で濃縮した与根塩田産の塩や能登の揚げ浜塩の分析値はオーダーの上からこの値に近い妥当な数値であると考察する。食塩や精製塩などの値が低いのは、その製法などを考慮すれば、むしろ当然の結果と考察する。

## 4 結 論

大豆たんぱく質の凝固現象と水銀との配位結合性を利用して水中の微量水銀を捕集濃縮し、豆腐に濃縮された水銀を燃焼分解方式のゼーマン効果を利用してバックグラウンド補正を行うフレイムレス原子吸光分析法により定量する方法を提案した。

本法の特徴は、試料水に少量の豆乳及び  $\delta$ -GL を加え、試料液中で豆腐を作り、この豆腐に捕集濃縮された水銀を湿潤のまま直接燃焼方式のフレイムレス原子吸光法で測定するという比較的簡単な操作で濃縮定量できることである。又、本法で使用する試薬類は大豆と水と  $\delta$ -GL (豆腐製造に用いられている) 及び酸素だけであり、大部分が食用に供せられるものであり、分析実施上、これが仮に生活環境に流入しても安全かつ自然に環境サイクルに循環しうる物質である。つまり環境汚染の恐れが全くない点が大きな特色であり、無公害化学分析法というにふさわしいであろう。

終わりに、ゼーマン水銀分析計 501 形を提供してくださった日立製作所に深謝の意を表します。

(1974 年 11 月, 日本分析化学  
会第 23 年会において発表)

## 文 献

- 1) G. Topping, J. M. Pirie: *Anal. Chim. Acta*, **62**, 200 (1972).
- 2) H. V. Weiss, S. Yamamoto, T. E. Crozier, J. H. Mathewson: *Environ. Sci. Technol.*, **6**, 644 (1972).
- 3) J. Ólafsson: *Anal. Chim. Acta*, **68**, 207 (1974).
- 4) D. Voyce, H. Zeitlin: *ibid.*, **69**, 27 (1974).
- 5) A. M. Igoshin, L. N. Bogusevich: *Gidrokhim. Materialy*, **47**, 150 (1970); *Anal. Abstr.*, **18**, 625 (1970).
- 6) M. Friedman, A. C. Waiss, Jr.: *Environ. Sci. Technol.*, **6**, 457 (1972).
- 7) M. A. J. Mazurski, A. Chow, H. D. Gesser: *Anal. Chim. Acta*, **65**, 99 (1973).
- 8) 武者宗一郎, 高橋芳久: 本誌, **24**, 395 (1975).
- 9) 小泉英明, 保田和雄: 分光研究, **23**, 290 (1974).
- 10) R. Alvarez: *Anal. Chim. Acta*, **73**, 33 (1974).
- 11) 田村権央: 工化, **66**, 1224 (1963).
- 12) I. M. Klotz (今堀和友訳): “蛋白質化学”, 水島三一郎, 赤堀四郎編, 4 巻, p. 47 (1956), (共立出版).
- 13) W. L. Hughes, Jr.: *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.*, **14**, 78 (1949).
- 14) J. P. Milnor: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **75**, 63 (1950).
- 15) 渡辺篤二: 油化学, **12**, 14 (1963).
- 16) 佐竹一夫, 小沢 均: “実験化学講座”, 日本化学会編, 23 巻, p. 4 (1957), (丸善).

- 17) 内海誓一郎, 鈴木啓介, 坪田博行, 野田春彦, 好尾 学, 吉田幸一郎: “水”, 共立化学ライブラリー 7 巻, p. 90 (1974), (共立出版).
- 18) 浜口 博編: “超微量成分分析”, 1 巻, p. 11 (1970), (産業図書).
- 19) 細原匡一, 上妻博宣, 川崎克彦, 鶴田徳松: 日化, **82**, 1479 (1961).

☆

**Enrichment of trace mercury by soybean protein for the analysis by flameless atomic absorption method.** (Studies on the enrichment of trace amounts of metals utilizing the coagulation of soybean protein. III.) Soichiro MUSA\* and Yoshihisa TAKAHASHI\*\* (\*Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, University of Osaka Prefecture, 4-804, Mozu-umemachi, Sakai-shi, Osaka; \*\*Industrial Research Laboratories, Kao Soap Co., Ltd., 1334, Minato-yakushubata, Wakayama-shi, Wakayama)

A method for the enrichment of trace amounts of mercury in water utilizing the coagulation of soybean protein by adding acids or salts (calcium, magnesium, etc.) and its complex-forming character with heavy metal ions was proposed.

After adding fixed amounts of soybean milk (collector) and  $\delta$ -gluconic lactone (coagulant) to a sample solution, the mixture was heated to boiling in order to coagulate the protein. The coagulum (soybean curd) and solution was separated by centrifugation. The mercury enriched in soybean curd was determined by a Hitachi Zeeman effect mercury analyzer 501.

Effect of pH, the amounts of soybean milk added and the concentration of NaCl in sample solution on the recovery of mercury were examined systematically.

The best result was obtained under the following conditions: To a certain amount of sample containing more than 0.05  $\mu$ g of mercury, (5~10) ml of 6.34% soybean milk was added and its pH was adjusted to 4.5~5.0, in which the soybean protein seemed to the almost completely coagulated by adding the suitable amounts of  $\delta$ -gluconic lactone. Under the optimum conditions, the recovery of mercury was 99% or better. NaCl in the sample solution tended to decrease slightly the recovery in the range of about 3 to 10% of NaCl solution.

The proposed method was applied to the determination of mercury at (0.05~5 ppb) level in sample solutions such as water, 3% NaCl water and artificial sea water. The recovery was 100( $\pm$ 30)%. This method was also applied to the determination of mercury in common salts.

(Received Mar. 24, 1975)

## Keywords

Flameless atomic absorption

Mercury enrichment

Soybean protein coagulation