

PCBs・有機塩素系農薬類分析用生物標準物質に関する調査研究

大竹 貴光*

(平成18年10月12日受理)

A survey on biological reference materials for PCBs and organochlorine pesticides

Takamitsu OTAKE

1. はじめに

現在われわれは、地球温暖化、オゾン層破壊、自然環境の破壊、生物種の減少など、さまざまな環境問題に直面している。日本においては1960年代に公害問題が起きたことで環境に対する意識が高まり、当時、経済発展のスタートポイントに立った日本は、工業化促進のために環境対策を怠った結果、化学産業などの生産活動による水質汚濁、大気汚染、廃棄物などを原因とする水俣病、イタイイタイ病などの公害問題が発生し、被害者を出したという歴史がある¹⁾。

現在では日本の環境技術対策が世界のトップクラスとなり、かつての公害のように、ヒト健康などに大きな影響を与えるような問題はあまりなくなった。しかし、現在の環境問題においては、危険性の大きさはそれほど大きくないが、広範囲の地域・不特定のヒトが少しずつ影響を受けている可能性があるという問題は依然としてある²⁾。これに伴い、これまでのように急性毒性や発ガン性だけでなく、微量曝露による生殖系や神経系、内分泌系への影響など、化学物質によって引き起こされる可能性がある多岐にわたる影響が注目されるようになっており、より幅広い集団に対して化学物質の曝露を調査することで、健康影響との関連を見るが必要になってきている。

このようなヒトに影響を及ぼす有害化学物質の曝露には、経口、経気、経皮の3つの経路がある。例えばヒトの経口曝露パターンとしては、いったん環境中に排出された化学物質が大気に出て、雨などによって水系に入り、魚介類に濃縮され、ヒトがこれらを食すことによって曝露する、という場合などが考えられる³⁾。実際、この魚介類摂食による化学物質曝露は重要な経路の1つである

ことが分かっていることから、環境汚染による健康影響を考えるときに、魚介類は重要な媒体となりうる²⁾。したがって、魚介類など食物中の化学物質を分析することが必要となり、その結果からヒトの曝露量を推定したり、さらには健康影響との関連調査やリスクアセスメントをすることが可能になる。特に日本では魚介類の摂取量が多いこともあり、健康影響との関連が注目を集め、平成15年には、魚介類を通じたメチル水銀曝露による胎児への影響を考慮し、妊婦と妊娠の可能性のある女性に対し、厚生労働省から魚介類等の摂食に関する注意事項が公表された³⁾。世界的に見ても、魚介類摂取量が比較的多い地域で、化学物質曝露と健康影響に関する疫学調査が行われ⁴⁾⁻⁶⁾、魚介類摂取量、及びポリ塩化ビフェニル (PCBs) 曝露と甲状腺ホルモンへの影響が関連していることを示唆しているものもある^{5), 6)}。ここで、特に最近はこのような調査でPCBsや有機塩素系農薬類が取り上げられることが多いこともあり⁷⁾⁻¹¹⁾、本論文ではこれら化学物質に着目することとした。

先に述べたように、化学物質による健康影響を調べるためには曝露量をできるだけ正確に把握する必要があり、そのための手段の1つとして、化学物質の重要な曝露媒体と考えられている魚介類の化学物質含有量を正確に分析することが挙げられる。その分析の正確さを確認するためには、目的のマトリックスを持つ認証標準物質を使用することが考えられる。特に魚介類のような生物組成を持つ試料は、分析目的の化学物質以外にも、分析時に妨害となるタンパク、脂質等多くの物質を含むことから、機器分析までに抽出、精製、分画などの複雑な前処理操作を経なければならぬため、各工程での条件が最適化されていないと正確な分析値を得ることはできない。そこで認証標準物質を使うと、それぞれの工程で使用する方法について妥当性を評価することができるため、非常に有用であると言える。

* 計測標準研究部門 有機分析科

以上のような背景から、本論文では、その必要性が高まっている魚介類をマトリックスとしたPCBs, 有機塩素系農薬類分析用の生物標準物質について、開発の現状、分析方法を中心に述べることにする。

2. PCBs・有機塩素系農薬類について

2.1 PCBs・有機塩素系農薬類の構造と性質

「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）」の第一種特定化学物質や、「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約（POPs条約）」で対象となっているPCBsと有機塩素系農薬類を中心に、それらの構造を図1に示す（規制、条約の説明については2.2を参照）。

PCBsはビフェニルに1~10個の塩素が置換した有機塩素化合物であり、209の異性体を有し、物理化学的性質は塩素数や異性体によって異なる。PCBsのいくつかの異性体の分子量(MW)及びオクタノール-水分配係数(K_{ow})について表1に示した¹²⁾。また、有機塩素系農薬類についても同様に表1に示した¹³⁾。

このような情報は、化学物質の環境中における挙動解析や、分析を行うときに考慮しなければならない。

2.2 PCBs・有機塩素系農薬類（有機塩素系化学物質）の規制

PCBsや有機塩素系農薬類に代表される有機塩素系化学物質は、環境汚染や健康影響を契機に、化審法やPOPs条約などの規制が制定されるようになった。

化審法は、難分解性の性状を有し、かつ人の健康を損なうおそれがある化学物質による環境の汚染を防止するため、昭和48年（1973年）に制定された¹⁴⁾。PCBsやアルドリン、DDT等の有機塩素系農薬類を含む15物質は、難分解性、高蓄積性及び人、または高次捕食動物への長期毒性を有する化学物質として、政令で第一種特定化学物質に指定されている¹⁴⁾。

さて現在、日本国内ではPOPs（残留性有機汚染物質：Persistent Organic Pollutants）の製造、使用は禁止されているが、POPsの中には意図せずに生成するものがある。また、海外では現在でもPOPsを使用している国や、環境汚染について十分な対策を取っていない国もある。そこで、2001年5月にスウェーデンのストックホルムで、環境中での残留性が高いPCBs, 有機塩素系農薬類など12物質の削減や廃絶などに向けたPOPs条約が採択された¹⁵⁾。POPsは揮散移動性があることから、これまでにPOPsを製造、使用したことがない地域でもPOPsによる汚染が見られ、世界各地に広がったPOPsに曝露することにより、

鳥やアザラシ、クジラ、イルカなどの野生動物やヒトにおいて、免疫系や生殖系への影響、催奇形性などを引き起こすことが示唆されている^{15), 16)}。これら食物連鎖上位の動物やヒトの化学物質曝露源としては、魚介類の摂食による寄与も大きく^{2), 17), 18)}、毒性や健康影響との関連を調査するために、魚介類中の化学物質の分析が行われている^{5), 6)}。

2.3 日本国内における野生生物中のPCBs・有機塩素系農薬類濃度レベル

PCBs・有機塩素系農薬類は残留性、生物濃縮性、揮散移動性、毒性の4つの特性を持ち、環境汚染モニタリングが多く行われている¹⁹⁾⁻²³⁾。ここでは、日本全国での調査による、一般環境中及び野生生物中のPCBs, 有機塩素系農薬類濃度を表2に示す。

これより、日本国内で製造や開放系での使用が禁止されている現在でも、場合によってはこれら化学物質が高濃度で検出されていることが分かる。よって今後も、これら化学物質の環境モニタリングや曝露レベルの評価が必要であろう。

2.4 PCBs・有機塩素系農薬類の毒性

PCBs曝露による毒性、影響については、数々の動物実験や疫学調査などが行われている。動物実験における短期曝露の影響では、体重減少、胸腺萎縮、色素涙、脱水症、運動失調などの中枢神経系機能低下などが見られている²⁴⁾。また、催奇形性²⁵⁾、発ガン性²⁶⁾、生殖影響と胎児毒性²⁷⁾も示唆されている。ヒトへの影響では、PCBsなどの曝露により月経周期の乱れ、甲状腺機能異常などの影響が示唆されている^{28), 29)}。最近では微量でも、胎児期にPCBsなどに曝露することで、神経系に影響を及ぼすことも示唆されている^{9), 10)}。同様に数々の動物実験や疫学調査により、有機塩素系農薬類でも生殖系や神経系への影響、発がん性などが示唆されている^{30), 31)}。

以上から、PCBs, 有機塩素系農薬類に対し、多くの環境・健康影響評価やモニタリングが実施されていることが分かるが、このために行われている分析は複雑で手間がかかる方法が多い。しかし、その分析を精確に行わなければ、モニタリングや生体試料を用いた曝露レベル測定値の信頼性を高めることはできず、そのためには標準物質を用いて分析法の精確さを確認することが必要である。

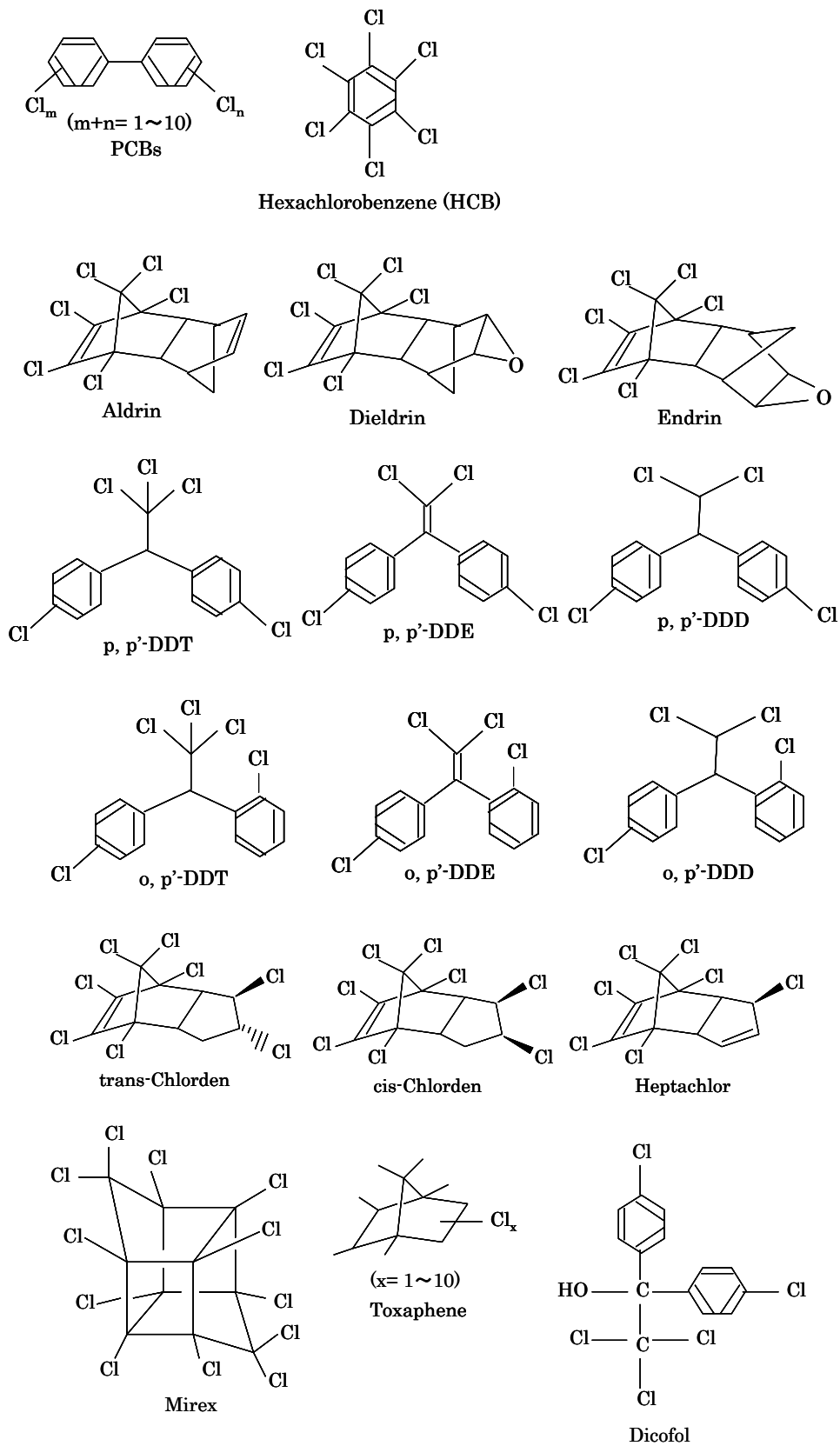


図1 PCBs・有機塩素系農薬類の構造^{12), 13)}

表1 PCBs・有機塩素系農薬類の分子量 (MW)とオクタノーラー水分分配係数 (K_{ow})^{12), 13)}

	MW	log Kow
PCBs (at 25°C)		
#3 (MoCB)	188.65	4.49
#8 (DiCB)	223.10	5.09
#15 (DiCB)	223.10	5.35
#28 (TriCB)	257.54	5.55
#52 (TeCB)	291.99	6.00
#101 (PeCB)	326.43	6.15
#105 (PeCB)	326.43	6.61
#118 (PeCB)	326.43	6.49
#138 (HxCB)	360.88	7.00
#153 (HxCB)	360.88	6.71
#180 (HpCB)	395.32	7.29
#194 (OcCB)	429.77	7.67
有機塩素系農薬類		
Hexachlorobenzene	284.78	5.23~6.18
Aldrin	364.91	3.01~6.75
Dieldrin	380.91	4.7~5.61
Endrin	380.91	5.22
p,p'-DDT	354.49	6.19~6.38
p,p'-DDE	318.03	6.51
p,p'-DDD	320.04	6.02
o,p'-DDT	354.49	5.98
o,p'-DDE	318.03	不詳
o,p'-DDD	320.04	不詳
trans-Chlordane	409.78	4.79
cis-Chlordane	409.78	5.01
Heptachlor	373.32	3.87~6.13
Toxaphene	413.8 (平均)	6.44
Mirex	545.54	6.89

PCBsの異性体はIUPAC No.で表記した; #3: 4-MonoCB, #8: 2,4'-DiCB, #15: 4,4'-DiCB, #28: 2,4,4'-TriCB, #52: 2,5,2',5'-TetraCB, #101: 2,4,5,2',5'-PentaCB, #105: 2,3,4,3',4'-PentaCB, #118: 2,4,5,3',4'-PentaCB, #138: 2,3,4,2',4',5'-HexaCB, #153: 2,4,5,2',4',5'-HexaCB, #180: 2,3,4,5,2',4',5'-HeptaCB, #194: 2,3,4,5,2',3',4',5'-OctaCB

表2 日本国内における一般環境中・野生生物中のPCBs・有機塩素系農薬類濃度¹³⁾

	一般環境		野生生物種		
	水質 (pg/L)	底質 (pg/g-dry)	貝類 (pg/g-wet)	魚類 (pg/g-wet)	鳥類 (pg/g-wet)
PCBs	140~4400	38~1300000	1500~150000	990~540000	5900~13000
HCB	11~180	6~25000	14~80	26~1800	410~2200
o,p'-DDE	0.6~170	nd~28000	19~360	0.9~5800	nd~3.7
p,p'-DDE	6~680	8~39000	220~8400	390~52000	6800~200000
o,p'-DDD	0.7~81	0.7~16000	6.0~2800	nd~1700	nd~25
p,p'-DDD	2.4~740	4~75000	7.8~8900	56~9700	52~1400
o,p'-DDT	nd~85	1.1~17000	20~910	3.7~1800	0.9~43
p,p'-DDT	nd~310	7~98000	48~2600	5.5~53000	160~700

nd; not detect, この調査は、平成16年度に日本国内の選択された地点で行われた; 水質は42地点, 底質は63地点, 生物 (貝類, 魚類, 鳥類)は22地点で調査が実施された.

3. PCBs・有機塩素系農薬類の生物標準物質開発

本調査研究で取り上げている生物マトリックスでは、組成が複雑なために、測定対象であるPCBs, 有機塩素系農薬類以外の物質による干渉や妨害が起きることで、対象物質を精確に測定できない可能性がある。したがって、精度管理のために生物組成型の標準物質を用いることにより、分析法の妥当性を確認することが必要となる。

魚介類をマトリックスとしたPCBs, 有機塩素系農薬類分析用の生物標準物質は、National Institute of Standards and Technology (NIST), National Research Council Canada (NRC), Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM), International Atomic Energy Agency (IAEA) などにより開発されている。それらの試料性状やPCBs異性体, 有機塩素系農薬類に付与されている認証値などのデータを, 表3に示す³²⁾⁻⁴⁰⁾。ここでは, 1995～2006年に開発, またはすでに開発された標準物質を改良し, 頒布されるようになった生物標準物質を挙げている³²⁾⁻⁴⁰⁾。一般に魚粉末の生物標準物質は, 原料を凍結乾燥, 粉碎, 篩い分け及びビン詰めした後, γ線照射による滅菌処理などによって準備, 調製される^{41), 42)}。

表3より, 生物標準物質には油, 組織などの形態があり, それぞれで濃度レベルが異なっていることが分かる。いずれもマトリックスは複雑であるが, 油の場合は濃度レベルが比較的高く (表3; SRM 1588b, BCR-349, BCR-598), 組織の場合は比較的低レベル(表3; SRM 1974b, SRM 2977, SRM 1946, CARP-2, BCR-718, IAEA-406) であり, 使用する場合は, 性状などを含め, 使用者の目的に合わせて選択することが必要である。

4. PCBs・有機塩素系農薬類の分析法

はじめに, 一次標準測定法と同位体希釈分析法について概説する。

一次標準測定法は, 「最高の計量学的な質を有している方法であり, その方法の操作が完全に記述され理解され得るものであり, その方法に対しての不確かさをSI単位によって完全に書き下せるものであり, したがって, その方法の結果が測定しようとしている (種類の) 量の標準を参照することなしで受け入れられるもの」として, 物質標準委員会 (CCQM) が定義した分析法である⁴³⁾。化学分析における一次標準測定法は, 同位体希釈分析法, 電量滴定法, 重量法, 滴定法, 凝固点降下法の5つが挙げられ⁴³⁾, このうち, 本論文で対象とする生物標準物質の開発に用いることができる方法が, 同位体希釈分析法

である。

同位体希釈質量分析法 (isotope dilution mass spectrometry, IDMS) はSI単位にトレーサブルであり, 試料とは異なる同位体存在比を持ったスパイクを試料に既知量添加し, 着目している同位体の比がどのように変わるかを測定することにより, 試料を精確に定量する方法である⁴³⁾。

IDMSは, 原理的には, 抽出前に測定対象化合物の同位体標識化合物を試料に添加すれば, 測定値は抽出法には依存しない。しかし, 実際には完全な同位体平衡の実現を確認することは困難であるため, 測定対象化合物と標識体化合物の抽出率の差が測定値のバイアスの原因となりうる。また, 複雑な組成を持つ生物試料の分析では, 測定対象以外の物質による妨害なども測定値のバイアスの原因になることがある。したがって, IDMSによって必ず精確な測定値が得られるというわけではなく, これらの問題をクリアするためには, 抽出や精製のような前処理操作を確実に行うことが大変重要となる。そこで, 以下にPCBs及び有機塩素系農薬類を分析する場合の前処理操作について概説する。

4.1 抽出法

抽出法を選択する際は, 抽出効率が良く, 安定している方法を採用しなければならない。マトリックス試料からの目的化学物質の抽出には, 一般的に5つの過程があると考えられている。すなわち, ①マトリックスからの目的化学物質の脱着, ②マトリックスへの目的物質の拡散, ③抽出液への目的物質の溶出, ④抽出液への目的物質の拡散, ⑤抽出された目的物質の回収, である。良い回収率を得るためには, このそれぞれの過程において, 条件を最適化することが必要である⁴⁴⁾。

4.1.1 溶媒抽出法

ホモジナイザーによる攪拌や, 超音波処理などと組み合わせ使用されることが多い方法である。環境省の「脂帯のダイオキシン類分析に関する暫定マニュアル」では, エタノール/ヘキサン (1:3, v/v) 溶媒中で脂帯をホモジナイズすることにより, PCBsなどを抽出する工程が含まれている⁴⁵⁾。

本論文で取り上げている生物試料の場合, 水分を含むことからメタノール, アセトン, アセトニトリルなどの親水性溶媒を用いて, 目的対象物質を抽出すると効率が良いと考えられる。または, 試料を無水硫酸ナトリウムと混合し, ヘキサンなどの疎水性溶媒により抽出する方法も考えられる。

表3 魚介類をマトリックスとした有機塩素系化学物質分析用・生物標準物質データ³²⁾⁻⁴⁰⁾

CRM	SRM 1588b (開発: NIST)	SRM 1974b (開発: NIST)	SRM 2978 (開発: NIST)	SRM 1946 (開発: NIST)	CARP-2 (開発: NRCC)	BCR-349 (開発: IRMM)	BCR-598 (開発: IRMM)	BCR-718 (開発: IRMM)	IAEA-406 (開発: IAEA)
試料性状	タラ肝油 (μ g/kg)	凍結貝組織 (μ g/kg)	凍結乾燥貝 組織 (μ g/kg)	凍結魚組織 (μ g/kg)	魚全部位 スラリー (μ g/kg)	タラ肝油 (μ g/kg)	タラ肝油 (μ g/kg)	ニシンの 缶詰 (μ g/kg)	凍結乾燥魚 組織 (μ g/kg)
<u>certified</u> <u>compounds</u> (congener IUPAC No. for PCBs)	<i>PCBs</i>								
#18	7.96	0.84			27.3				
#28	27.8	3.43	7.91		34.0	68		0.41	0.57
#31	8.52	2.88	21.40						0.29
#44	32.4	3.85	11.80	4.66	86.6				
#49	29.8	5.66	16.84	3.80					
#52	82.4	6.26	17.7	8.1	138	149		1.00	1.3
#66	51.7	6.37	18.4	10.8					
#70		6.01		14.9					
#74		3.55		4.83					
#77				0.327					
#82		1.16							
#87	54.6	4.33	10.20	9.4					
#95	37.7	6.04	20.8	11.4					
#99	101	5.92	18.84	25.6					
#101	127	10.7	35.9 (+ PCB 90)	34.6		372		2.12	3.1
#105	59.2	4.00	10.85	19.9				0.63	
#107		1.03							
#110	69.3	10.0	35.34	22.8					1.4
#118	172	10.3	35.1	52.1	148	460		1.78	
#126				0.380					
#128	39.9	1.79	5.25	22.8	20.4			0.62	
#132		2.43							
#138	212	9.2	35.7 (+ PCB 163, 164)	115				2.97	4.0
#146		1.92		30.1					
#149	90.0	7.01	34.73	26.3				2.58	2.0
#151	48.1	1.86	10.92						
#153	275	12.3	56.9	170	105	940		4.62	3.7
#156	18.0	0.718	1.97	9.52				0.19	0.27
#158		0.999							
#169				0.106					
#170	41.9	0.269		25.2				0.35	0.54
#180	98.5	1.17	7.81	74.4	53.3	282		0.80	1.2
#183	28.9	1.25	5.25	21.9					
#187	43.6	2.94	16.7 (+ PCB 159, 182)	55.2					

表3 魚介類をマトリックスとした有機塩素系化学物質分析用・生物標準物質データ^{32)~40)} (続き)

CRM	SRM 1588b (開発: NIST)	SRM 1974b (開発: NIST)	SRM 2978 (開発: NIST)	SRM 1946 (開発: NIST)	CARP-2 (開発: NRCC)	BCR-349 (開発: IRMM)	BCR-598 (開発: IRMM)	BCR-718 (開発: IRMM)	IAEA-406 (開発: IAEA)
試料性状	タラ肝油 (μ g/kg)	凍結貝組織 (μ g/kg)	凍結乾燥貝 組織 (μ g/kg)	凍結魚組織 (μ g/kg)	魚全部位 スラリー (μ g/kg)	タラ肝油 (μ g/kg)	タラ肝油 (μ g/kg)	ニシンの 缶詰 (μ g/kg)	凍結乾燥魚 組織 (μ g/kg)
#194	13.5			13.0	10.9				
#195				5.30					
#206	3.75			5.40	4.40				
#209	3.21			1.30					
有機塩素系農薬類									
2,4'-DDE		0.336	4.41						0.76
4,4'-DDE	676	4.15	37.5	373			61		9.2
2,4'-DDD	34.8	1.09	10.5	2.20			30		
4,4'-DDD	285	3.34	38.8	17.7			400		2.8
2,4'-DDT	162		9.2						
4,4'-DDT	570		3.84	37.2			179		
HCB	163			7.25			55.7		1.5
γ -HCH	23.3			1.14			23		
α -HCH	99						42		
β -HCH				5.72			16		
Heptachlor	30.0			5.50					0.32
Aldrin									0.75
cis-Chlordane	186	1.36	15.56	32.5			24.4		2.8
trans-Chlordane		1.14	11.38	8.36			6.9		
cis-Nonachlor	92.4		8.23	59.1					
trans-Nonachlor	222	1.30	11.5	99.6					
Dieldrin	156		6.30	32.5					
Oxychlordane	37.5		2.13	18.9					
Mirex	11.8			6.47					
PAHs		○ (22)	○ (7)						○ (1)
無機元素		○ (1)		○ (4)					
Reference compounds	PCBs (47); 農薬類 (3); α -Tocopherol; PBDE (6); Toxaphene (2); PCDDs (7)		PAHs (16); PCBs (8); 農薬類 (6); 無機元素 (11)	PAHs (20); PCBs (2)	PCBs (12); 農薬類 (2); 無機元素 (9)	PCBs (8); 農薬類 (7); PCDFs (2); PCDDs (7)			PCBs (27); 農薬類 (15); 石油 炭化水素 (24)

表中のカッコ内の数値は、認証値または参考値が付与されている物質の数をあらわす。

PCBsの異性体はIUPAC No.で表記した; #18: 2,2',5'-TriCB, #28: 2,4,4'-TriCB, #31: 2,4',5'-TriCB, #44: 2,2',3,5'-TetraCB, #49: 2,2',4,5'-TetraCB, #52: 2,2',5,5'-TetraCB, #66: 2,3',4,4'-TetraCB, #70: 2,3',4',5'-TetraCB, #74: 2,4,4',5'-TetraCB, #77: 3,3',4,4'-TetraCB, #82: 2,2',3,3',4'-PentaCB, #87: 2,2',3,4,5'-PentaCB, #95: 2,2',3,5',6'-PentaCB, #99: 2,2',4,4',5'-PentaCB, #101: 2,2',4,5,5'-PentaCB, #105: 2,3,3',4,4'-PentaCB, #107: 2,3,3',4,6'-PentaCB, #110: 2,3,3',4',6'-PentaCB, #118: 2,3',4,4',5'-PentaCB, #126: 3,3',4,4',5'-PentaCB, #128: 2,2',3,3',4,4'-HexaCB, #132: 2,2',3,3',4,6'-HexaCB, #138: 2,2',3,4,4',5'-HexaCB, #146: 2,2',3,4',5,6'-HexaCB, #149: 2,2',3,4',5,6'-HexaCB, #151: 2,2',3,5,5',6'-HexaCB, #153: 2,2',4,4',5,5'-HexaCB, #156: 2,3,3',4,4',5'-HexaCB, #158: 2,3,3',4,4',6'-HexaCB, #169: 3,3',4,4',5,5'-HexaCB, #170: 2,2',3,3',4,4',5'-HeptaCB, #180: 2,2',3,4,4',5,5'-HeptaCB, #183: 2,2',3,4,4',5,6'-HeptaCB, #187: 2,2',3,4',5,5',6'-HeptaCB, #194: 2,2',3,3',4,4',5,5'-OctaCB, #195: 2,2',3,3',4,4',5,6'-OctaCB, #206: 2,2',3,3',4,4',5,5',6'-NonaCB, #209: 2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-DecaCB

HCH: hexachlorohexane, PBDE: polybromodiphenylether, PCDDs: Polychlorinated dibenzo-p-dioxins, PCDFs: Polychlorinated dibenzofuran, PAH: polycyclic aromatic hydrocarbons

4.1.2 ソックスレー抽出法

固体状試料や吸着剤からの抽出法として一般的に用いられており、環境省による野生生物中のダイオキシン類⁴⁶⁾や、大気環境中のダイオキシン類の分析法⁴⁷⁾、さらには各国の標準物質の値付けや公定法として⁴⁸⁾⁻⁵⁰⁾、さまざまなマニュアル等で記載されている。魚介類など生物中のPCBsや有機塩素系農薬類を対象とする場合、溶媒としては、ヘキサン/アセトンの混合溶媒、ジクロロメタンなどがよく使われている⁵⁰⁾⁻⁵²⁾。

長所としては、試料が繰り返し抽出溶媒と接触するために平衡に達しやすいこと、系の温度を比較的高温に保てること、抽出後の過程でろ過が必要ないこと、などが挙げられる⁵³⁾。一方、欠点としては、時間がかかること、溶媒を比較的大量に使用すること、などが考えられる^{53), 54)}。最近では、マイクロ波などと組み合わせる抽出を行うことができるよう、ソックスレー抽出器に改良が加えられたタイプも使われており、従来のソックスレー抽出法の欠点に対してさまざまな工夫がなされている^{53), 55)}。

ソックスレー抽出法は上記のようないくつかの欠点はあるものの、広く使用され、すでに確立された方法であり、標準物質開発のための新たな抽出法を検討するときに、その有効性を比較するための標準的な方法としても有用であると考えられる。

4.1.3 アルカリ分解法

生物試料では、一般に多量の脂質やタンパク質を分解する目的で行われているが、場合によっては目的物質も同時に分解されてしまうこともあるので、注意が必要な方法である。PCBの場合、条件によっては高塩素化PCBが一部脱塩素反応を起こすことや、有機塩素系農薬類の場合、Dieldrin, Endrin, Methoxychlorなどが分解することが指摘されている^{56), 57)}。

環境省による「ダイオキシン類に係る水生生物調査暫定マニュアル」においては、1mol/Lの水酸化カリウムエタノール溶液により1夜室温で放置することで試料を分解し、ヘキサンによって目的物質を振とう抽出している⁵⁸⁾。このように、一般的にPCBs高塩素化異性体の回収率を高くするために室温で一晩放置したり、数時間振とうさせたりするようなマイルドな条件でアルカリ分解が行われているが、このような条件では時間がかかり、マトリックスを効率良く分解できないため、温アルカリを用いてより効率的に分解する方法も行われている⁵⁹⁾。

アルカリ分解法は、生物・生体試料中のPCBs分析法として公定法にも記載があることから^{60), 61)}、標準物質開発のための分析法としても検討する必要があるだろう。

4.1.4 加圧流体抽出法

(Pressurized Fluid Extraction, PFE)

高温、高圧条件下でマトリックスから目的物質の抽出を行う方法である。高圧であるため、抽出に用いる有機溶媒は100-200℃程度の高温になり、溶媒の粘度が下がることで、目的物質とマトリックス間の相互作用を阻害し、効率的な抽出が可能となる⁴⁴⁾。また、高温であるため目的物質の溶解度が高まり、高圧であると溶媒がマトリックスに浸透しやすくなる⁴⁴⁾。この方法は抽出時間が短く、溶媒量も少なく済み、EPA (United States Environmental Protection Agency) においては公定法としても認識されている^{44), 62), 63)}。PCBsや有機塩素系農薬類の抽出溶媒には、アセトン/ヘキサンやジクロロメタン/アセトンの混合溶媒、ヘキサンなどが用いられることが多い⁶³⁾。

Schantzら⁶⁰⁾は、大気粒子、底質、貝や魚組織のマトリックスを持つ数種類の標準物質を使い、PCBs、有機塩素系農薬類などを対象とし、溶媒としてジクロロメタン、アセトニトリル、ヘキサン/アセトン(1:1, v/v)を用いて、抽出法の効率評価を行った。その結果、PFEの抽出効率はソックスレー抽出法(4.1.2参照)と比較して遜色ないことが示された。またSaitoら⁶⁴⁾は、ウシやブタの脂肪、肝臓などの組織中におけるPCBs、有機塩素系農薬類を含む59種の有機ハロゲン系化学物質を対象として添加回収率試験を行い、ジクロロメタン/アセトン(1:1, v/v)を抽出溶媒としたとき、本抽出法を用いて十分な回収率が得られることを示した。

本論文で対象としている魚試料においては、目的物質と同時に抽出される脂肪などを除くために、抽出後に硫酸処理(4.2.1参照)やHPLC(4.2.3参照)などによる精製が必要となるものの、抽出条件の設定パラメータが比較的少なく、自動化が可能であることや、次の工程において抽出液のろ過が不要であるなどの利点があることから、有効な方法であると考えられる。

4.1.5 マイクロ波抽出法

(Microwave Assisted Extraction, MAE)

熱源としてマイクロ波放射を使用する方法で、比較的短時間で抽出することができる⁴⁴⁾。極性溶媒である水は本抽出法に影響し、生物試料のように水分含有量の多い試料では過度に温まることもあるため、抽出前に試料から水分を取り除いておくことが望ましい。また、試料容器の中で極端な高温にならなければ、マイクロ波放射により抽出された目的物質が分解されていることはほとんどない⁴⁴⁾。生物試料中のPCBsや有機塩素系農薬類を対象としたとき、抽出溶媒としてはヘキサン/アセトンや酢酸

エチル/シクロヘキサンの混合溶媒, アセトンなどが使用されている^{44), 65), 66)}.

Jayaraman⁶⁶⁾は, 底質, 海洋生物組織の認証標準物質を用い, MAE法と溶媒抽出 (4.1.1参照), 液液抽出法の比較を行った. PCBs, 有機塩素系農薬類などを対象物質として検討した結果, ヘキサン/アセトン (1:4, v/v) により抽出を行ったMAE法は, 他の方法と比較しても抽出効率に問題ないことが示された. Vetter⁶⁵⁾は, アザラシの脂肪およびタラ肝臓中のPCBsと有機塩素系農薬類の分析を行い, 溶媒として酢酸エチル/シクロヘキサン(1:1, v/v)を用いたときの抽出率がよく, この方法が優れていることを示した.

抽出後にろ過過程が必要となるため, 多少の回収率の低下や汚染を引き起こす可能性があるものの, 抽出条件の設定が比較的容易であり, PCBsや有機塩素系農薬類への適用も問題なく, さらに一度に比較的多くの試料を処理できるという利点もあることから, 有用な方法であると言える.

4.1.6 超臨界流体抽出法

(Supercritical Fluid Extraction, SFE)

抽出に超臨界状態の溶媒を用いる方法であり, 通常の液体状態よりも溶媒の粘性が低く, 拡散係数が高くなるために効率よく抽出できる^{44), 67)}. 環境, 植物, 食品, 脂肪, 高分子など, 幅広いマトリックスに対して使われており, 化学物質についてもPCBs, PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons), フェノール類, 農薬類, 天然産物, 添加物など, 多くを対象として用いられている^{44), 68), 69)}. 一方, 抽出効率に影響するパラメータがやや多くあるために (抽出溶媒, 温度や圧力, マトリックスの種類など), 選択性の高い抽出を可能にする反面, 条件の最適化が難しいという問題点もある⁴⁴⁾. この方法はマトリックス依存性が高く, マトリックスが変わると抽出条件を最適化し直さなければならないことも多い⁴⁴⁾.

Schantz⁷⁰⁾は, 貝組織や底質の認証標準物質を用い, SFE (CO₂で抽出) とソックスレー抽出 (ジクロロメタンで抽出) の抽出能の比較を行った. その結果, 両方法ともPCBs及び有機塩素系農薬類の認証値からは外れることなく, 抽出法の妥当性が確認された. またAntunes⁷¹⁾は, 魚の可食部からPCBs, 有機塩素系農薬類を抽出するために超臨界CO₂を用いて抽出効率を検討した結果, 凍結乾燥してある試料では問題ないが, 新鮮な状態だと効率が落ちることを示し (回収率: < 10%), 魚の場合では, 試料の状態が抽出率に影響する可能性があることが分かった.

ソックスレー抽出 (4.1.2) では, 抽出するために, 場

合によっては24時間程度の時間がかかるが, SFEではそれを1時間ほどで行うことができ, 有機溶媒の使用量もソックスレー抽出の30分の1程度で済む⁷⁰⁾. さらに, 上記のように抽出条件にもよるが, 効率もよく, 抽出法の1つとして使用できると考えられる.

4.2 精製法

PCBs・有機塩素系農薬類に限らず, 生物や環境試料中化学物質の微量分析を行う場合には, 目的物質以外の妨害物質を除去する目的で, 精製が不可欠である. PCBs・有機塩素系農薬類には比較的安定なものが多いことから, これまでさまざまな精製法が適用されてきた. ここでは, 特に生物試料の精製法について表4にまとめると共に, それぞれの特色について下記に述べる. 分析者は, これらの方法から分析目的及び試料の状況に応じて適切な方法を検討し, 採用する必要がある.

4.2.1 硫酸処理 (液-液洗浄, 硫酸/シリカゲル)

大部分の試料マトリックスの分解除去 (着色物質, PAHs, 不飽和炭化水素, フタル酸エステル類及び一部の有機塩素系化合物など) を目的として行われる (表4). この方法では, 有機塩素系農薬類のDieldrin, Endrin, Endosulfan (I and II), Endosulfan sulfateも分解されるため^{57), 72)}, これらを分析対象としている場合は他の精製法を検討しなければならない.

環境省によるPOPsの「モニタリング調査マニュアル」⁷³⁾においては, 魚介類, 鳥類のPCBs分析法で硫酸処理が記載されている. すなわち, アルカリ分解 (4.1.3), ろ過を行った試料に, ヘキサンや濃硫酸を加えて振とうするというものである. この場合, 硫酸による精製はヘキサン層の着色が薄くなるまで繰り返す. また, 多層シリカゲルカラムを用いて, 硫酸シリカゲルなどを充填したカラムクロマト管に試料抽出液を負荷することで, 精製する方法も併記されている. この精製法は, 環境省の野生生物のダイオキシン類蓄積状況等調査マニュアル⁴⁶⁾, ダイオキシン類に係る水生生物調査暫定マニュアル⁵⁸⁾などにも記載されている. またManirakiza⁵⁷⁾は, アフリカのタンガニーカ湖の魚中PCBs, 有機塩素系農薬類を分析したとき, PCBs及び酸に安定な農薬類は硫酸シリカゲルカラムにより, 酸に不安定な農薬類は15% KOHフロリジル, シリカゲル, アルミナ (4.2.2) の多層カラムクロマトグラフィーにより精製を行うことで, 分析目的物質が分解しないよう対策を講じた.

上記したように, 硫酸処理によって分解される物質があるため, 分析対象物質への影響の有無を調査, 検討し

表4 PCBs・有機塩素系農薬類分析における生物試料の精製法⁵⁶⁾

精製法	目的
硫酸処理（液-液洗浄，硫酸/シリカゲル）	大部分のマトリックスの分解除去 （着色物質，PAHs，不飽和炭化水素，フタル酸エステル類などの除去）
カラムクロマトグラフィー （シリカゲル，アルミナ，フロリジル）	シリカゲル：極性物質，着色物質などの除去，分画 アルミナorフロリジル：PCBs，有機塩素系農薬類，脂肪族炭化水素類，ダイオキシン類などの除去，分画
HPLC, GPC	高精度の精製，分取（高分子量・高沸点の化合物の分離）

PAHs: polycyclic aromatic hydrocarbons, HPLC: high performance liquid chromatography, GPC: gel permeation chromatography, SPE: solid phase extraction

た上で，この方法を行うことが必要である。

4.2.2 シリカゲル，アルミナ（or フロリジル）カラムクロマトグラフィー

一般にシリカゲルは，極性物質，着色物質などの除去，分画を行うために，またアルミナ（or フロリジル）はPCBs，有機塩素系農薬類，脂肪族炭化水素類，ダイオキシン類などを除去，分画するために使用される（表4）。各種充填剤は適切な調製，管理が重要であり，例えばアルミナは活性を維持するために水分，湿度の管理を行わないと，精製，分画を確実に行うことができないので注意が必要である。

活性化したシリカゲルによる精製は，厚生労働省の母乳中ダイオキシン類測定暫定マニュアルや⁶¹⁾，環境省の野生生物中のダイオキシン類の分析法⁴⁶⁾，臍帯のダイオキシン類分析に関する暫定マニュアル⁴⁵⁾（それぞれヘキサンにより溶出）などで行われており，これらの中では，次の工程で試料をアルミナカラムクロマトグラフィーに供している。Vivesら⁷⁴⁾は，魚の肝臓中PCBs，塩素系農薬類などを分析する過程で，精製，分画にアルミナカラムクロマトグラフィーを用いた（ヘキサン/ジクロロメタンで溶出）。また，環境省によるPOPsの「モニタリング調査マニュアル」⁷³⁾においては，生物中（魚介類，鳥類）のPCBs，有機塩素系農薬類分析を行うとき，脂肪除去を行った抽出液に対して，活性化フロリジルを用いたカラム精製，分画が行われている（ジエチルエーテル含有ヘキサンで溶出）。

ここで述べたカラムクロマトグラフィーでは，分画条件が充填剤の活性度やロットによって異なったり，自ら充填剤を詰めてカラムクロマトグラフィーを行うときは，分析者によってはHPLCなどの自動化された方法（4.2.3

参照）と比べると，再現精度が悪くなってしまう可能性が考えられる。しかし，上記のように公定法として記載されていることから，標準物質開発のときには検討する必要があるだろう。

4.2.3 HPLC（GPC）

高精度の精製，分取を行う目的で使われる方法である。HPLCの分離モードの1つであるGel Permeation Chromatography（GPC）は，サイズ排除クロマトグラフィー（size-exclusion chromatography, SEC）とも呼ばれ，脂肪のような分子量600～1500の高分子化合物から，分子量400程度までの有機塩素系化合物などの物質を分離するために適した方法である^{75), 76)}。しかし，生物や環境組成のような複雑なマトリックスを持つ試料の場合，GPCだけでは精製が不完全なことがあるため，カラムクロマトグラフィー（4.2.2）などの異なる技術と組み合わせて精製が行われることが多い⁷⁶⁾⁻⁷⁸⁾。

この方法は，魚やミルク，バター，チーズ，卵，肝臓などの脂肪を含むさまざまな生物，生体マトリックス中のPCBs，有機塩素系農薬類の分析において有効であることが示されているだけでなく^{76), 79)}，自動化が可能であり，装置で精製を行うために再現精度が比較的良いなどの利点があり，標準物質開発のための精製法として有用であると考えられる。ただし，分析対象物質や使用可能な溶離液を考慮し，カラムを選択するなどの注意が必要である。

4.3 測定

4.1, 4.2で述べた方法で抽出，精製を行った試料中のPCBsや有機塩素系農薬類は，GC/MSやGC/ECD（ECD；電子捕獲検出器）のような装置により測定される。特に近年では，環境モニタリングにおいて，これら化学物質に

対してもより高感度、高精度な分析が要求されることから、ガスクロマトグラフ高分解能質量分析計(GC/HRMS)が使われることも多い。これらの装置により精確な測定をするためには、カラムの選択や条件設定などを適切に行わなければならない。標準物質の開発にあたっては、高精度分析が可能なIDMSにより測定を行う予定である。同位体希釈法については、沼田⁸⁰⁾により詳しく述べられているので、参照されたい。

5. 今後の展望

5.1 生物標準物質開発のための分析法

本調査研究においては、生物試料中のPCBsや有機塩素系農薬類を分析するとき用いられている主な抽出法(4.1)、精製法(4.2)について述べた。今後は、2.1で示したような分析対象物質の性質等を考慮し、これら抽出法、精製法を適切に選択、組み合わせることで精密な分析を行い、標準物質を開発していきたいと考えている。またPCBs、有機塩素系農薬類は、4.3で触れたガスクロマトグラフィ-高分解能質量分析によるIDMSにより測定を行う予定である。

5.2 これからの標準物質開発

5.2.1 マトリックスについて

特に日本人における食品由来の化学物質の経口曝露を考えたとき、魚介類と同様に消費量の多い米などの穀類をマトリックスとした標準物質開発を検討する必要があるだろう。さらに、血液などの生体試料中の化学物質濃度を測定することによる曝露評価も多く行われていることから、生体標準物質のニーズも高まっており、将来的には開発していきたいと考えている。

5.2.2 化学物質について

健康影響があると言われているPCBsの代謝物^{81), 82)}、蓄積性が高いために、近年注目されているパーフルオロオクタンスルホン酸(PFOS)のような有機フッ素化合物⁸³⁾などの有機汚染物質を対象とし、標準物質開発を検討していきたいと考えている。

謝辞

本調査研究を行うにあたりご指導くださいました加藤健次有機分析科長、鎗田孝有機標準第2研究室長、ならびに貴重なアドバイスをくださいました有機分析科有機標準第2研究室の皆様へ深く感謝致します。

参考文献

- 1) 安井至: 市民のための環境学入門(丸善株式会社, 1998) 3-10.
- 2) 中西準子: 環境リスク論(株式会社岩波書店, 1995) 1-44.
- 3) 厚生労働省: 水銀を含有する魚介類等の摂食に関する注意事項(2003, <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2003/06/s0603-3.html>)
- 4) P. W. Davidson, G. J. Myers, C. Shamlaye, C. Cox, P. Gao, C. Axtell, D. Morris, J. Sloane-Reeves, E. Cernichiari, A. Choi, D. Palumbo and T. W. Clarkson: Association between prenatal exposure to methylmercury and developmental outcomes in Seychellois children: Effect modification by social and environmental factors, *Neurotoxicology*. 20 (1999) 833-841.
- 5) P. Stewart, J. Reihman, E. Lonky, T. Darvill and J. Pagano: Prenatal PCB exposure and neonatal behavioral assessment scale (NBAS) performance, *Neurotoxicol. Teratol.* 22 (2000) 21-29.
- 6) V. Persky, M. Turyk, H. A. Anderson, L. P. Hanrahan, C. Falk, D. N. Steenport, R. Chatterton Jr., S. Freels and G. L. Consortium: The effects of PCB exposure and fish consumption on endogenous hormones, *Environ. Health. Perspect.* 109 (2001) 1275-1283.
- 7) S. W. Jacobson, G. G. Fein, J. L. Jacobson, P. M. Schwartz and J. K. Dowler: The effect of intrauterine PCB exposure on visual recognition memory, *Child. Dev.* 56 (1985) 853-860.
- 8) Y-C. J. Chen, Y-L. Guo, C-C. Hsu and W. J. Rogan: Cognitive development of Yu-Cheng ('Oil Disease') children prenatally exposed to heat-degraded PCBs, *JAMA*. 268 (1992) 3213-3218.
- 9) J. L. Jacobson and S. W. Jacobson: Intellectual impairment in children exposed to polychlorinated biphenyls in utero, *N. Engl. J. Med.* 335 (1996) 783-789.
- 10) C. Koopman-Esseboom, N. Weisglas-Kuperus, M. A. J. de Ridder, C. G. van der Paauw, L. G. M. Th. Tuinstra and P. J. J. Sauer: Effects of polychlorinated biphenyl/dioxin exposure and feeding type on infants' mental and psychomotor development, *Pediatrics*. 97 (1996) 700-706.
- 11) P. Grandjean, P. Weihe, V. W. Burse, L. L. Needham, E. Storr-Hansen, B. Heinzow, F. Debes, K. Murata, H.

- Simonsen, P. Ellefsen, E. Budtz-Jorgensen, N. Keiding and R. F. White: Neurobehavioral deficits associated with PCB in 7-year-old children prenatally exposed to seafood neurotoxicants, *Neurotoxicol. Teratol.* 23 (2001) 305-317.
- 12) N. Li, F. Wania, Y. D. Lei and G. L. Daly: A comprehensive and critical compilation, evaluation, and selection of physical-chemical property data for selected polychlorinated biphenyls, *J. Phys. Chem. Ref. Data.* 32 (2003) 1545-1590.
- 13) 環境省: 第3章 平成16年度モニタリング調査結果 (詳細版, 2005; <http://www.env.go.jp/chemi/kurohon/2005/index.html>)
- 14) 環境省: 化学物質審査規正法ホームページ (2005, <http://www.env.go.jp/chemi/kagaku/index.html>)
- 15) 環境省: POPs 残留性有機汚染物質 (2004)
- 16) S. Tanabe, H. Iwata and R. Tatsukawa: Global contamination by persistent organochlorines and their ecotoxicological impact on marine mammals, *Sci. Total. Environ.* 154 (1994) 163-177.
- 17) D. Muir, T. Savinova, V. Savinov, L. Alexeeva, V. Potelov and V. Svetochev: Bioaccumulation of PCBs and chlorinated pesticides in seals, fishes and invertebrates from the White Sea, Russia, *Sci. Total. Environ.* 306 (2003) 111-131.
- 18) E. Vaclavik, A. Tjonneland, C. Stripp, K. Overvad, J. P. Weber, O. Raaschou-Nielsen, Organochlorines in Danish women: Predictors of adipose tissue concentrations, *Environ. Res.* 100 (2006) 362-370.
- 19) K. C. Jones, R. Duarte-Davidson and P. A. Cawse: Changes in the PCB concentration of United Kingdom air between 1972 and 1992, *Environ. Sci. Technol.* 29 (1995) 272-275.
- 20) W. A. Lead, E. Steinnes, J. R. Bacon and K. C. Jones: Polychlorinated biphenyls in UK and Norwegian soils: spatial and temporal trends, *Sci. Total. Environ.* 193 (1997) 229-236.
- 21) A. Bignert, M. Olsson, W. Persson, S. Jensen, S. Zakrisson, K. Litzén, U. Eriksson, L. Häggberg and T. Alsberg: Temporal trends of organochlorines in Northern Europe, 1967-1995. Relation to global fractionation, leakage from sediments and international measures, *Environ. Pollut.* 99 (1998) 177-198.
- 22) 酒井伸一: ゴミと化学物質 (株式会社岩波書店, 1998) 126-130.
- 23) 久保田彰, 染矢雅之, 渡部真文, 田辺信介: PCBsおよびダイオキシン類 (ポリ塩化ジベンゾ-p-ダイオキシン, ポリ塩化ジベンゾフラン, コプラナPCBs) による宇和海沿岸堆積物の汚染, *日本水産学会誌* 68 (2002) 695-700.
- 24) J. V. Bruckner, K. L. Khanna and H. H. Cornish: Biological response of the rat to Polychlorinated Biphenyls, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 24 (1973) 434-448.
- 25) M. Watanabe and T. Sugahara: Experimental formation of cleft palate in mice with polychlorinated biphenyls (PCBs), *Toxicology.* 19 (1981) 49-53.
- 26) C. V. Rao and A. S. Banerji: Induction of liver tumors in male Wistar rats by feeding polychlorinated biphenyls (Aroclor 1260), *Cancer. Lett.* 39 (1988) 59-67.
- 27) E. D. Levin, S. L. Schantz and R. E. Bowman: Delayed spatial alternation deficits resulting from perinatal PCB exposure in monkeys, *Arch. Toxicol.* 62 (1988) 267-273.
- 28) 楠田雅彦: 油症と女性—米ぬか油中毒症婦人の性機能に関する研究—, *産と婦* 38 (1971) 1063-1072.
- 29) 辻博, 佐藤薫, 下野淳哉, 東晃一, 橋口衛, 藤島正敏: 油症患者における甲状腺機能: 油症発生28年後の検討, *福岡医誌* 88 (1997) 231-235.
- 30) D. P. Brown: Mortality of workers employed at organochlorine pesticide manufacturing plants—an update, *Scand. J. Work. Environ. Health.* 18 (1992) 155-161.
- 31) J. Beard: DDT and human health, *Sci. Total. Environ.* 280 (2001) 195-206.
- 32) IAEA: International Atomic Energy Agency (<http://www-naweb.iaea.org/naml/files/iaea406.pdf#search=%22406%22>)
- 33) IRMM: Institute for Reference Materials and Measurements (http://www.irmm.jrc.be/html/reference_materials_catalogue/catalogue/attachements/BCR-349_cert.pdf)
- 34) IRMM: Institute for Reference Materials and Measurements (http://www.irmm.jrc.be/html/reference_materials_catalogue/catalogue/attachements/BCR-598_cert.pdf)
- 35) IRMM: Institute for Reference Materials and Measurements (http://www.irmm.jrc.be/html/reference_materials_catalogue/catalogue/attachements/BCR-718_cert.pdf)
- 36) NIST: Standard Reference Materials (https://srms.nist.gov/view_cert.cfm?srm=1588b)
- 37) NIST: Standard Reference Materials (https://srms.nist.gov/view_detail.cfm?srm=1946)

- 38) NIST: Standard Reference Materials (https://srms.nist.gov/view_detail.cfm?srm=1974b)
- 39) NIST: Standard Reference Materials (https://srms.nist.gov/view_detail.cfm?srm=2978)
- 40) NRCC: Institute for National Measurement Standards (http://inms-ienm.nrc-cnrc.gc.ca/calserv/crm_files_e/CA_RP2_certificate.pdf)
- 41) D. L. Poster, J. R. Kucklick, M. M. Schantz, B. J. Porter, S. D. Leigh and S. A. Wise: Determination of polychlorinated biphenyl congeners and chlorinated pesticides in a fish tissue standard reference material, *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003) 223-241.
- 42) J-P. Villeneuve, S. de Mora and C. Cattini: Determination of organochlorinated compounds and petroleum hydrocarbons in fish-homogenate sample IAEA-406: results from a worldwide interlaboratory study, *Trends. Anal. Chem.* 23 (2004) 501-510.
- 43) 久保田正明: 標準物質—分析・計測の信頼性確保のために— (化学工業日報社, 1998) 25-27.
- 44) V. Camel: Recent extraction techniques for solid matrices-supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls, *Analyst.* 126 (2001) 1182-1193.
- 45) 環境省: 臍帯のダイオキシン類分析に関する暫定マニュアル (2002, <http://www.env.go.jp/chemi/report/h14-07/h14-07.pdf>)
- 46) 環境省: 野生生物のダイオキシン類蓄積状況等調査マニュアル (2002, <http://www.env.go.jp/chemi/report/h14-06/index.html>)
- 47) 環境省: ダイオキシン類に係る大気環境調査マニュアル (2006, <http://www.env.go.jp/air/osen/manual/manual.pdf>)
- 48) US EPA: Method 8082, Polychlorinated biphenyls (PCBs) by gas chromatography (1996)
- 49) US EPA: Method 3540C, Soxhlet extraction (1996)
- 50) M. M. Schantz, R. Demiralp, R. R. Greenberg, M. J. Hays, R. M. Parris, B. J. Porter, D. L. Poster, L. C. Sander, K. S. Sharpless, S. A. Wise and S. B. Schiller: Certification of a frozen mussel tissue standard reference material (SRM 1974a) for trace organic constituents, *Fresenius. J. Anal. Chem.* 358 (1997) 431-440.
- 51) C. A. Fraser, G. J. Gardner, P. S. Maxwell, C. Kubwabo, R. Guevremont, K. W. M. Siu and S. S. Berman: Preparation and certification of a biological reference material (CARP-1) for polychlorinated dibenzo-p-dioxin and dibenzofuran congeners, *Fresenius. J. Anal. Chem.* 352 (1995) 143-147.
- 52) D. L. Poster, J. R. Kucklick, M. M. Schantz, B. J. Porter, S. D. Leigh and S. A. Wise: Determination of polychlorinated biphenyl congeners and chlorinated pesticides in a fish tissue standard reference material, *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003) 223-241.
- 53) M. D. Luque de Castro and L. E. Garcia-Ayuso: Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future, *Anal. Chim. Acta.* 369 (1998) 1-10.
- 54) Y. Abrha and D. Raghavan: Polychlorinated biphenyl (PCB) recovery from spiked organic matrix using accelerated solvent extraction (ASE) and Soxhlet extraction, *J. Hazard. Mater. B80* (2000) 147-157.
- 55) S. Sparring, S. Bøwadt, B. Svensmark and E. Björklund: Comprehensive comparison of classic Soxhlet extraction with Soxtec extraction, ultrasonication extraction, supercritical fluid extraction, microwave assisted extraction and accelerated solvent extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in soil, *J. Chromatogr. A.* 1090 (2005) 1-9.
- 56) 二瓶好正: JIS使い方シリーズ 詳解 ダイオキシン類及びコプラナーPCBの測定方法 (財団法人 日本規格協会, 2001) 86-104.
- 57) P. Manirakiza, A. Covaci, L. Nizigiyimana, G. Ntakimazi and P. Schepens: Persistent chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls in selected fish species from Lake Tanganyika, Burundi, Africa, *Environ. Pollut.* 117 (2002) 447-455.
- 58) 環境省: ダイオキシン類に係る水生生物調査暫定マニュアル (1998, <http://www.env.go.jp/chemi/dioxin/guide/aquatic/pdf/index.html>)
- 59) H. Otaka and S. Hashimoto: Fast matrix digestion with hot ethanolic alkali plus pyrogallol for polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and coplanar polychlorinated biphenyls analysis in biological samples, *Anal. Chim. Acta.* 509 (2004) 21-26.
- 60) 環境省: 外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル (水質, 底質, 水生生物) (1998, http://www.env.go.jp/chemi/end/manual/pdfs/full_document.pdf)
- 61) 環境省: 母乳中のダイオキシン類測定暫定マニュアル (2000, <http://www.nihs.go.jp/mhlw/chemical/dioxin/h121222-milk/hyousi.pdf>)
- 62) M. M. Schantz, J. J. Nichols and S. A. Wise: Evaluation

- of pressurized fluid extraction for the extraction of environmental matrix reference materials, *Anal. Chem.* 69 (1997) 4210-4219.
- 63) US EPA: Method 3545A, Pressurized fluid extraction (PFE) (1998)
- 64) K. Saito, A. Sjödin, C. D. Sandau, M. D. Davis, H. Nakazawa, Y. Matsuki and D. G. Patterson Jr.: Development of an accelerated solvent extraction and gel permeation chromatography analytical method for measuring persistent organohalogen compounds in adipose and organ tissue analysis, *Chemosphere.* 57 (2004) 373-381.
- 65) W. Vetter, M. Weichbrodt, K. Hummert, D. Glotz and B. Luckas: Combined microwave-assisted extraction and gel permeation chromatography for the determination of chlorinated hydrocarbons in seal blubber and cod livers, *Chemosphere* 37 (1998) 9-12.
- 66) S. Jayaraman, R. J. Pruell and R. McKinney: Extraction of organic contaminants from marine sediments and tissues using microwave energy, *Chemosphere* 44 (2001) 181-191.
- 67) US EPA: Method 3562, Supercritical fluid extraction of polychlorinated biphenyls (PCBs) and organochlorine pesticides (1998)
- 68) V. Camel, A. Tambuté and M. Caude: Analytical-scale supercritical fluid extraction: a promising technique for the determination of pollutants in environmental matrices, *J. Chromatogr. A.* 642 (1993) 263-281.
- 69) V. Camel: The determination of pesticide residues and metabolites using supercritical fluid extraction, *Trends. Anal. Chem.* 16 (1997) 351-369.
- 70) M. M. Schantz, S. Bøwadt, B. A. Benner Jr., S. A. Wise and S. B. Hawthorne: Comparison of supercritical fluid extraction and Soxhlet extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in environmental matrix standard reference materials, *J. Chromatogr. A.* 816 (1998) 213-220.
- 71) P. Antunes, O. Gil, M. Gabriela and B. Gil: Supercritical fluid extraction of organochlorines from fish muscle with different sample preparation, *J. Supercrit. Fluids.* 25 (2003) 135-142.
- 72) US EPA: Method 3600C, Cleanup (1996)
- 73) 環境省: モニタリング調査マニュアル (2003, <http://www.env.go.jp/chemi/kurohon/http2003/02moni-manu/000moni-manu.htm>)
- 74) I. Vives and J. O. Grimalt: Method for integrated analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine compounds in fish liver, *J. Chromatogr. B.* 768 (2002) 247-254.
- 75) US EPA: Method 3640A, Gel-permeation cleanup (1994)
- 76) G. G. Rimkus, M. Rummler and I. Nausch: Gel permeation chromatography-high-performance liquid chromatography combination as an automated clean-up technique for the multiresidue analysis of fats, *J. Chromatogr. A.* 737 (1996) 9-14.
- 77) C. Pirard, J-F. Focant and E. de Pauw: An improved clean-up strategy for simultaneous analysis of polychlorinated dibenzo-p-dioxin (PCDD), polychlorinated dibenzofurans (PCDF), and polychlorinated biphenyls (PCB) in fatty food samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 372 (2002) 373-381.
- 78) P. Suchan, J. Pulkrabová, J. Hajšlová and V. Kocourek, Pressurized liquid extraction in determination of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in fish samples, *Anal. Chim. Acta.* 520 (2004) 193-200.
- 79) J. de Boer, C. J. N. Stronck, F. van der Valk, P. G. Wester and M. J. M. Daudt, Method for the analysis of non-ortho substituted chlorobiphenyls in fish and marine mammals, *Chemosphere.* 25 (1992) 1277-1283.
- 80) 沼田雅彦: 同位体希釈法による有機化合物の精密定量に関する調査研究—より正確な測定と新たな環境化学分野への適用のために—, 産総研計量標準報告 1 (2002) 247-258.
- 81) A. G. Schuur, Å. Bergman, A. Brouwer and T. J. Visser, Effects of pentachlorophenol and hydroxylated biphenyls on thyroid hormone conjugation in a rat and human hepatoma cell line, *Toxicol. In Vitro* 13 (1999) 417-425.
- 82) I. A. T. M. Meerts, H. Lillenthal, S. Hoving, J. H. J. van den Berg, B. M. Weijers, Å. Bergman, J. H. Koeman and A. Brouwer, Developmental exposure to 4-hydroxy-2,3,3',4',5-pentachlorobiphenyl (4-OH-CB107): Long-term effects on brain development, behavior, and brain stem auditory evoked potentials in rats, *Toxicol. Sci.* 82 (2004) 207-218.
- 83) M. Houde, J. W. Martin, R. J. Letcher, K. R. Solomon and D. C. G. Muir, Biological monitoring of polyfluoroalkyl substances: A review, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 3463-3473.