

- 再掲 (Reprint) -

固相抽出法を用いたLC-UVによる保存処理木材中の シプロコナゾールおよびテブコナゾールの定量分析

宮内 輝久

森 満範

伊藤 勝彦^{*1}

Application of Solid-phase Extraction to Quantitatively Determine Cyproconazole and Tebuconazole in Treated Wood Using Liquid Chromatography with UV Detection

Teruhisa MIYAUCHI

Mitsunori MORI

Katsuhiko ITO

Solid-phase extraction (SPE) procedures were developed to avoid interference during the quantitative determination of cyproconazole and tebuconazole co-existing in wood extractives. Five species of wood were used, Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*), Japanese larch (*Larix leptolepis*), Yezo spruce (*Picea jezoensis*), Sakhalin fir (*Abies sachalinensis*), and western hemlock (*Tsuga heterophylla*). Methanol extractives from the heartwood of all wood samples, except western hemlock, interfered with the quantitative determination of cyproconazole and tebuconazole using LC with UV detection (LC-UV). SPE with Oasis MCX was effective in avoiding this interference. This method also reduced the time and volume of mobile phase required for LC-UV, since wood extractives with long retention times were also removed.

Key words: solid-phase extraction, wood
固相抽出, 木材

木材成分がシプロコナゾールおよびテブコナゾールの定量分析におよぼす影響を除去するための固相抽出法を開発した。スギ, カラマツ, エゾマツ, トドマツおよびベイツガの心材部のメタノール抽出物は, ベイツガの場合を除き, UV検出器を用いた液体クロマトグラフィー(LC-UV)によるシプロコナゾールおよびテブコナゾールの定量分析を妨害した。Oasis MCXを用いた固相抽出法はこれらの妨害を除去するのに効果的であった。この方法によれば, 保持時間の長い成分も除去できることから, LC-UVに必要な時間の短縮, 移動相の量を減らすことが可能であった。

1. はじめに

木材および木製品は主に担子菌やシロアリによる生物劣化を受ける材料であるが、構造材料等に広く用いられている。したがって、比較的水分の高い環境や接地環境で木材を使用する場合は、生物劣化による被害を防ぐために木材保存処理を行う必要がある。現在、様々な化合物が木材保存処理剤の有効成分として使用されている¹⁾。たとえば、果物や野菜の抗菌剤として広く用いられているシプロコナゾールやテブコナゾールもそのひとつである。保存処理木材中に必要な有効成分の量については、使用環境等に対応した基準が設けられており、シプロコナゾールやテブコナゾールについては、(財)日本住宅・木材技術センター(以下、住木センター)による基準が設けられている²⁾。よって、処理木材中のシプロコナゾールおよびテブコナゾールを正確に定量分析する必要がある。

住木センターの方法³⁾では、木材中のシプロコナゾールおよびテブコナゾールはメタノールで抽出された後、UV検出器を用いた液体クロマトグラフィー(LC-UV)あるいは窒素リン検出器等を用いたガスクロマトグラフィーにより定量分析される。米国木材保存協会(American Wood-preservers' Association(AWPA))のテブコナゾールの分析方法^{4,5)}の場合も、メタノールによる抽出が用いられている。木材は有機溶媒で抽出される成分、いわゆる抽出成分を有しているため、メタノールを用いた抽出を行った場合、これらも同時に抽出される。したがって、特に、UV吸収など選択性が低い方法で検出する場合、シプロコナゾールとテブコナゾールの定量分析が抽出成分によって妨害される可能性がある。

AWPAの方法⁴⁾では、LC-UVによるテブコナゾールの定量分析に対する抽出成分の妨害を排除する方法として、LC-UV分析の条件の変更をあげている。しかし、抽出成分は樹種により異なることから⁶⁾この対処方法では分析条件が樹種ごとに変わる可能性がある。これに対し、定量分析の妨害となる成分を分析試料中から除去することができれば、樹種に依存することなくLC-UV分析を行うことができる。

固相抽出法は分析試料の濃縮や精製方法として、広く用いられている方法である⁷⁻⁹⁾。この方法はす

に、環境水中¹⁰⁻¹²⁾や農作物中¹³⁾に含まれるシプロコナゾールやテブコナゾールの定量分析に用いられている。しかし、我々の知る範囲では、保存処理木材中のシプロコナゾールおよびテブコナゾールの分析に固相抽出法を用いたという報告はない。

前述の固相抽出法を用いた報告では、固相抽出にODSやスチレン-ジビニルベンゼン共縮合樹脂などの逆相系の担体が用いられている。シプロコナゾールおよびテブコナゾールに対するこれらの担体の選択性はそれほど高くない。逆相系とカチオン交換能を有する担体によれば、化合物はカチオン交換作用によっても保持される^{7,8)}ことから、逆相系のODSなどに比べて選択性は高い。Zrostlíkováら¹⁴⁾は果実中のシプロコナゾールの分析にカチオン交換能を有するOasis MCX^{8,15)}を用いて、共雑物による妨害を除去した定量分析を行っている。本報告では、保存処理木材中のシプロコナゾールおよびテブコナゾールのLC-UVによる定量分析にOasis MCXを用いた固相抽出を適用した。

なお、本論文はJournal of Chromatography A¹⁶⁾に掲載された論文を和訳・転載したものである。

2. 実験

2.1 試薬

シプロコナゾールおよびテブコナゾールの標品は株式会社ザイエンスから入手した。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)用のメタノールおよびアセトニトリルは関東化学株式会社より、28%アンモニア水(NH₄OH)はキシダ化学株式会社から購入した。

2.2 試料調製

添加用の試料は、5 mgのシプロコナゾールまたはテブコナゾールを100 mLのメタノールに溶かし調製した。検量線の作成用試料として、濃度20, 10, 5, 1, 0.5 μg/mLのメタノール溶液を調製した。これらを0.45 μmのメンブレンフィルターでろ過し、LC-UV分析に供し、ピーク面積と濃度から検量線を作成した。

スギ、カラマツ、エゾマツ、トドマツおよびベイツガの木粉1 gをウィレーミルで粉碎後、20 mLの熱メタノールを用いて2時間抽出した。抽出液をろ過したのち、減圧濃縮し20 mLのメタノールに再溶解

した。この際、添加用の試料液を2 mLまたは0.2 mL加えた後、メタノールを用いて全量を20 mLとしたものも調製した。添加用の試料液を加えたもの加えないものをそれぞれ6つ調製し、そのうちの3つは固相抽出に供した。残りの3つは減圧濃縮乾固後、移動相に溶解し、0.45 μmのメンブレンフィルターでろ過した後、LC-UV分析に供した。

2.3 固相抽出

固相抽出はOasis MCXカートリッジ(60 mg/3 mL, ウォーターズ)を用いて行った。カートリッジをバキューマニホールド(スペルコ)にセットし、2 mLのメタノール、続いて2 mLの蒸留水を通液した。引き続き、試料を導入した後、5%のNH₄OH(28%水溶液として)を含むメタノールと蒸留水の混合液(20:80(v/v))およびメタノールを用いて固相を洗浄した。次に、28%アンモニア水:メタノール(5:95, v/v)を用いて溶出させた。溶出液を減圧濃縮乾固し、移動相に再溶解した後、0.45 μmのメンブレンフィルターでろ過した後、LC-UV分析に供した。

2.4 LC分析

LC分析は、LC-10ADポンプ(島津社製), DIL-10AXLオートインジェクター(島津社製), CTO-10ACカラムオープン(島津社製), SPD-10A UV検出器(島津社製), SIL-10Aシステムコントローラー(島津社製)を用いて行った。得られたCR-5Aデータはクロマトパック(島津社製)を用いて記録した。カラムはInertsil ODS-3(5 μm, 150 × 4.6 mm, GLサイエンス)を用いた。カラムオープンの温度は40 に設定

した。移動相はアセトニトリル:10 mMリン酸緩衝液(pH 2.6)(60:40)を用い、流速は1.0 mL/minとした。検出はUV(220 nm)で行った。

3. 結果と考察

3.1 木材抽出成分による妨害

木材抽出成分がシプロコナゾールとテブコナゾールの定量分析におよぼす影響を確認するため、抽出成分がより多く存在する心材を用いた⁶⁾。LC-UV分析は住木センターの方法³⁾に準じて行った。詳細は実験の章に記述している。

各樹種のメタノール抽出物に、シプロコナゾールおよびテブコナゾールを加えた後、LC-UVにより定量分析した結果を第1表に示す。0.1 mg/gの添加の場合、トドマツ以外の樹種においては、添加量に対する定量値の割合は100%以上であった。シプロコナゾールおよびテブコナゾールを添加した場合としない場合のクロマトグラムを比較すると(クロマトグラムは示していない)、トドマツの場合の低い定量値は、抽出成分由来のピークによる妨害が原因であることが確認された。スギおよびエゾマツのメタノール抽出物に添加したシプロコナゾールとカラマツとエゾマツのメタノール抽出物に添加したテブコナゾールの場合、やや高い定量値が得られた。これも各樹種の抽出成分のピークが抗菌剤のピークと重なることが原因であった。このような影響は0.01 mg/gに相当する抗菌剤を加えた場合に顕著であった。

0.01 mg/gに相当するシプロコナゾールをトドマツ

第1表 木材抽出物中のシプロコナゾールおよびテブコナゾールの定量分析(n=3)

Table 1. Quantitative determination of cyproconazole and tebuconazole in wood extractives. (n=3)

	添加量: 0.1 mg/g Spiking level: 0.1 mg/g				添加量: 0.01 mg/g Spiking level: 0.01 mg/g			
	シプロコナゾール Cyproconazole		テブコナゾール Tebuconazole		シプロコナゾール Cyproconazole		テブコナゾール Tebuconazole	
	ratio (%) ^{a)}	SD	ratio (%) ^{a)}	SD	ratio (%) ^{a)}	SD	ratio (%) ^{a)}	SD
スギ Japanese cedar	118	2.0	105	0.6	233	13.4	95	26.0
カラマツ Japanese larch	103	0.4	108	0.7	96	5.0	194	15.8
エゾマツ Yezo spruce	108	1.1	111	1.0	131	0.6	221	2.1
トドマツ Sakhalin fir	100	0.9	49	2.3	20	2.6	-	-
ベイツガ Western hemlock	101	1.6	101	1.6	102	4.5	110	3.4

^{a)} 添加量に対する定量値

^{a)} Ratio of quantitative amount to spiking amount.

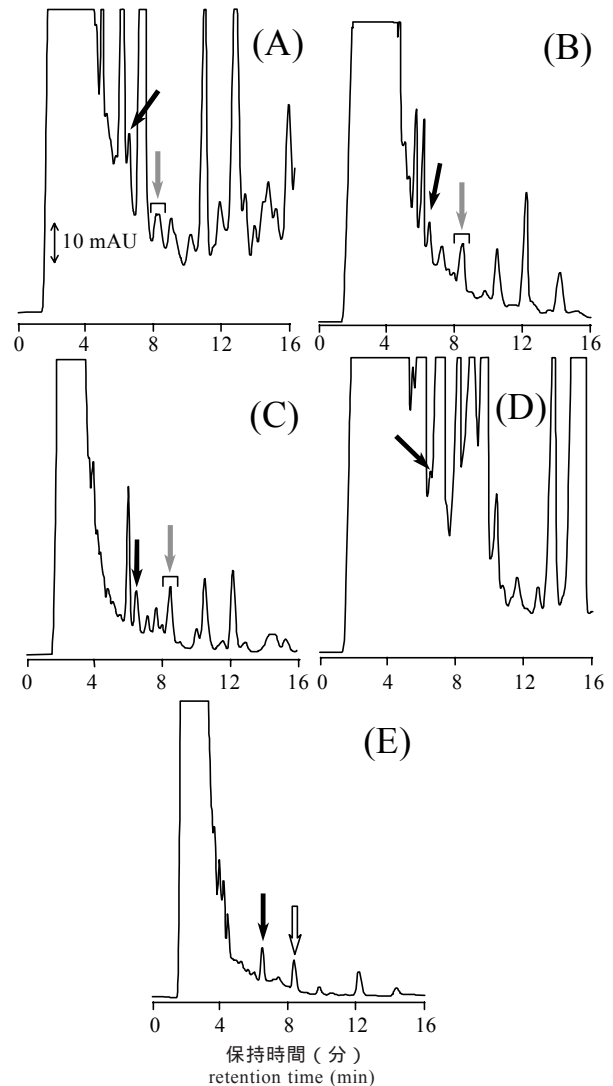
の抽出物に加えた場合の定量値は添加量よりも低く、また、テブコナゾールのピークは確認できなかった。第1図に示すように、このような誤った定量値は抽出成分由来の比較的大きなピークや高いベースラインによるものであると考えられた。他方、スギおよびエゾマツに添加したシプロコナゾールおよびカラマツおよびエゾマツに添加したテブコナゾールについては、抽出成分由来のピークが重なることで定量値は高くなった。ベイツガの場合、シプロコナゾールの定量値は抽出成分の影響を受けていないが、0.01 mg/gに相当するテブコナゾールを加えた場合は若干高い値を示した。

3.2 固相抽出による精製

シプロコナゾールおよびテブコナゾールなどのトリアゾール系の抗菌剤は、その化学構造中にトリアゾール環を有する。トリアゾール環に含まれる窒素は解離し、生成したカチオンはOasis MCXのような陽イオン交換体によって保持される。一方、抽出成分も同様にOasis MCXにより保持されると考えられるが、これらのほとんどはおそらく中性あるいはアニオン性であると考えられることから、逆相系の相互作用により保持されると考えられる。したがって、この保持機構の違いに基づき、木材抽出成分とトリアゾール系の抗菌剤を分離することが可能であると考えられる。

シプロコナゾールおよびテブコナゾールをメタノールに溶解し、固相抽出に供した場合の回収率はそれぞれ99% (SD=1.3%, n=3), 98% (SD=1.1%, n=3)であった。この結果から、シプロコナゾールおよびテブコナゾールをメタノール溶液として添加した場合でも、固相に保持されることが確認できた。既報¹⁴⁾では、ODS系の固相を用いて有機溶媒中のテブコナゾールを回収する場合、試料にH₂Oを添加している。これに対し、メタノール溶液として固相に導入しても保持が可能であれば、H₂Oの添加による沈殿の生成がなく、ろ過を行う必要がない。

一方、固相に保持された定量分析の妨害となる抽出成分は、試料導入後の固相をメタノールで洗浄することにより除去されることが確認された。このことから、妨害となる成分のほとんどは逆相系の相互作用によりMCXに保持されていたと考えられた。メ



第1図 シプロコナゾールおよびテブコナゾールを加えたメタノール抽出物のHPLCクロマトグラム (0.01 mg/g)

凡例) A:スギ, B:カラマツ, C:エゾマツ, D:トドマツ, E: ベイツガ
黒矢印: シプロコナゾール, 白矢印: テブコナゾール, 灰色矢印: 抽出成分と重なったテブコナゾール

Fig. 1. HPLC chromatograms of cyproconazole and tebuconazole, which added to the methanol extractives of (A) Japanese cedar, (B) Japanese larch, (C) Yezo spruce, (D) Sakhalin fir, and (E) western hemlock, at a concentration of 0.01 mg/g. Black arrow: cyproconazole, white arrow: tebuconazole, grey arrow: tebuconazole overlapping with the matrix peaks.

タノールによる洗浄の後、5%のNH₄OH (28%水溶液として)を含むメタノールと蒸留水の混合液 (20:80 (v/v))によりさらに多くの成分を除去することができた。そこで、試料導入後の固相の洗浄には両方の溶媒を用いた。今回用いた固相抽出法により、クロ

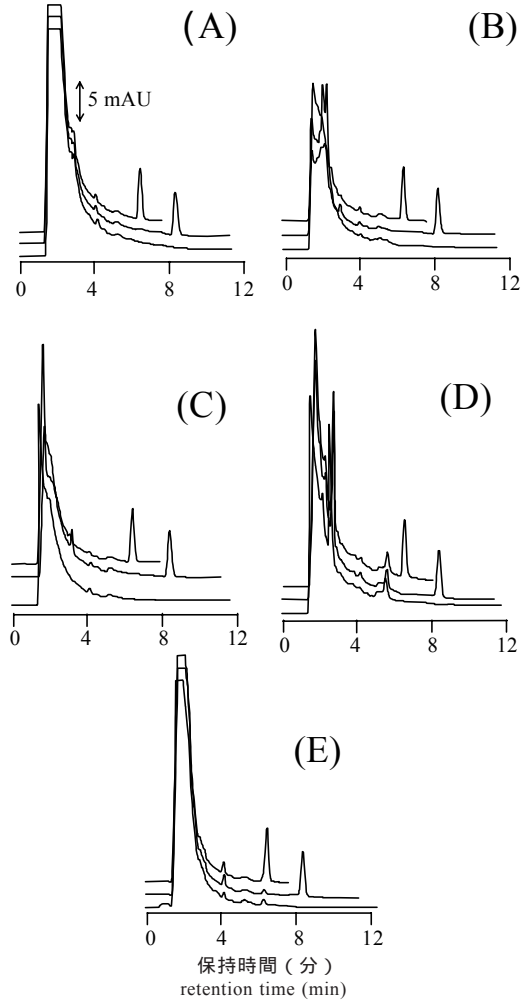
マトグラム上のシプロコナゾールおよびテブコナゾールのピークは明確となった(第2図)。

この固相抽出法によれば、保持時間の長い抽出成分によるピークも除去できる。したがって、この方法によれば、LC分析にかかる時間や移動相の量を減らすことができる。シプロコナゾールおよびテブコナゾールの保持時間が6.5分および8.3分であることから、LC分析にかかる時間はおよそ8分あるいは10分程度であると考えられる。

第2表に固相抽出法を用いた場合の、シプロコナゾールとテブコナゾールの回収率を樹種ごとに示す。シプロコナゾールおよびテブコナゾールの添加量が0.1 mg/gおよび0.01 mg/gのいずれの場合においても良好な回収率が得られ、抽出成分による妨害は固相抽出法を用いることで除去することができた。

4. まとめ

スギ、カラマツ、エゾマツおよびトドマツ心材のメタノール抽出物はLC-UVを用いたシプロコナゾールおよびテブコナゾールの定量分析を妨害することが確認された。Oasis MCXを用いた固相抽出により、この妨害を除去することができた。この方法によれば、LC-UVの条件を変更することなく、抽出成分の影響を除去した分析が可能である。さらに、この方法では保持時間の長い成分も同時に除去できることから、分析にかかる時間や移動相の量を減らすことができる。



第2図 固相抽出を行った後の抽出成分(下)、シプロコナゾール添加した抽出成分(中)およびテブコナゾールを添加した抽出成分のHPLCクロマトグラム(0.01 mg/g)

凡例) 第1図参照

Fig. 2. HPLC chromatograms of the extractives (lower), of the extractives spiked with cyproconazole at a concentration of 0.01mg/g (middle), and of the extractives spiked with tebuconazole at a concentration of 0.01mg/g (upper), after SPE with MCX. See Fig. 1 for key to figures A-E.

第2表 MCXを用いた固相抽出法による回収率 (n=3)

Table 2. Average recovery of cyproconazole and tebuconazole from wood extractives using SPE with MCX. (n=3)

	添加量: 0.1 mg/g Spiking level: 0.1 mg/g				添加量: 0.01 mg/g Spiking level: 0.01 mg/g			
	シプロコナゾール Cyproconazole		テブコナゾール Tebuconazole		シプロコナゾール Cyproconazole		テブコナゾール Tebuconazole	
	回収率 (%) Recovery (%)	SD	回収率 (%) Recovery (%)	SD	回収率 (%) Recovery (%)	SD	回収率 (%) Recovery (%)	SD
スギ Japanese cedar	103	0.4	98	0.6	94	3.5	97	3.4
カラマツ Japanese larch	100	3.9	98	0.4	94	1.5	99	3.4
エゾマツ Yezo spruce	100	2.1	97	2.0	94	2.1	101	1.9
トドマツ Sakhalin fir	100	3.5	95	3.4	98	1.1	105	2.6
ベイツガ Western hemlock	99	2.5	94	1.9	102	1.2	103	4.2

謝 辞

本研究を行うにあたりご協力いただいた株式会社
ザイエンスに感謝いたします。

文 献

- 1) (財)日本工業規格協会:“木材保存剤 JIS K 1570 :
2004”(2004)
- 2) (財)日本住宅・木材技術センター:“優良木質建材
等の品質性能基準”(2002)
- 3) (財)日本住宅・木材技術センター:“優良木質建材
等の品質性能試験にかかる防腐防蟻処理試験の
試験方法(別冊)(2000)
- 4) AWP Standard A28-01: Standard Method for
Determination of Propiconazole and Tebuconazole in
Wood, in Waterborn Formulation and in Treating Solutions
by HPLC, American Wood-Preservers' Association
(AWPA), Granbury, TX (2003).
- 5) AWP Standard A31-01: Standard Methods for the
Analysis of Solutions and Wood for Azoles by Gas
Chromatography (GC), American Wood-Preservers'
Association (AWPA), Granbury, TX (2001).
- 6) Kollmann, F.F.P., Côté, W.A.Jr.: Principles of Wood
Science and Technology. I. Solid wood. Springer-
Verlag, Berlin Heidelberg, 70(1968).

- 7) Hennion, M.-C.: *J. Chromatogr. A*, **856**, 3-54 (1999).
- 8) Walker, V., Mills, G.A.: *Ann. Clin. Biochem.* **39**, 464-
477 (2002).
- 9) Smith, R.M.: *J. Chromatogr. A*, **1000**, 3-27 (2003).
- 10) Fernandez-Alba, A.R., Agüera, A., Contreras, M., Peñuela,
G., Ferrer, I., Barceló, D.: *J. Chromatogr. A*, **823**, 35-47 (1998).
- 11) Jeannot, R., Sabik, H., Sauvard, E., Genin, E.: *J. Chromatogr.
A*, **879**, 51-71 (2000).
- 12) Picho, V.: *J. Chromatogr. A*, **885**, 195-215 (2000).
- 13) Štajnbaher, D. Zupančič-Kralj, L.: *J. Chromatogr. A*,
1015, 185-198 (2003).
- 14) Zrostlíková, J., Hajšlova, J., Kovalczuk, T., Štěpán, R.,
Poustka, J.: *J. AOAC Int.*, **86**, 612-622 (2003).
- 15) Huck, C.W., Bonn, G.K.: *J. Chromatogr. A*, **855**, 51-72 (2000).
- 16) Miyauchi, T., Mori, M., Ito, K.: *J. Chromatogr. A*,
1063, 137-141 (2004), [http://dx.doi.org/10.1016/
j.chroma.2004.11.086](http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2004.11.086).

- 性能部 耐朽性能科 -

- *1 : 元 (社) 北海道林産技術普及協会 -

(原稿受理 : 05.08.12)