固相抽出-HPLC-UV法によるタナリスCY処理木材中のシプロコナゾールの定量分析

宮内 輝久^{*1}, 桃原 郁夫^{*2}, 森 満範^{*1}

Quantitative determination of cyproconazole in wood treated with Tanalith CY using solid-phase extraction followed by HPLC UV analysis

Teruhisa MIYAUCHI^{*1}, Ikuo MOMOHARA^{*2}, Mitsunori MORI^{*1}

Copper and triazole (CUAZ) wood preservatives are among the most widely used wood preservatives for pressure treated wood in Japan. Accurate quantitative methods for determination of the active ingredients are required to guarantee the quality of treated wood. HPLC with ultraviolet detection (HPLC-UV) analysis is employed to determine cyproconazole, an active ingredient of CUAZ. In some wood species, however, co-extracted components interfere with the quantitative determination of cyproconazole. To overcome this interference, a solid-phase extraction with Oasis MCX has been developed. As a further development for the quantification of cyproconazole in treated wood, instead of the 4.6mm conventional column, we applied a 2.1mm I.D. column in the present paper. The results indicated that the 2.1mm I.D. column simplified the method of sample preparation and sufficient recoveries of cyproconazole could be achieved using both external and internal standard methods with tebuconazole. The present method could be applied to the quantification of cyproconazole in treated wood at 120-5 µg/g wood.

Key words : CUAZ ; cyproconazole ; solid-phase extraction

銅・アゾール化合物系木材保存剤 (CUAZ) は最も広く用いられている加圧注入用木材保存剤のひとつである。処理木材中の有効成分量を分析することは、保存処理木材の品質を保証するうえで重要である。CUAZ 系木材保存剤の有効成分であるシプロコナゾールは HPLC を用いて定量分析されるが、木材成分による妨害が生じる場合がある。この妨害を除去する方法として、固相抽出を用いた前処理方法が確立されている。本論文では、固相抽出と HPLC

* 1 北海道立林産試験場 071-0198 旭川市西神楽 1 線10号
Hokkaido Forest Products Research Institute, Nishikagura 1-10, Asahikawa, Hokkaido, 071-0198 Japan

* 2 独立行政法人 森林総合研究所 305-8687 つくば市松の里 1
Forestry and Forest Products Research Institute, Matsunosato 1, Tsukuba, Ibaraki, 305-8687 Japan

を用いた処理木材中のシプロコナゾールの定量分析法において、内径2.1mmのカラムを用いた手順の簡便化について検討し、AQの保存処理木材1～3種に相当する有効成分を含む木材中の保存剤の定量分析への本手法の適性を確認した。内径2.1mmのカラムを使用することで検出感度の向上が認められ、これにより前処理を簡略化することが可能であった。絶対検量線（外部標準）法と内部標準法を用いた定量分析の結果、いずれの方法でもAQの保存処理木材1～3種の分析に適用可能であることが確認された。

1. 緒 言

銅・アゾール化合物系木材保存剤(CUAZ)は銅とトリアゾール類を有効成分とし、JIS規格ではトリアゾール類としてテブコナゾールを含むものはCUAZ-1、シプロコナゾールを含むものはCUAZ-2およびCUAZ-3に分類されている¹⁾。CUAZは、CCA代替薬剤として使用されている主要な加圧注入用薬剤のひとつであるが、現在は主にシプロコナゾールを含むCUAZ-2およびCUAZ-3が用いられている²⁾。

処理木材中に含まれる銅の定量分析は、湿式分解により回収後、原子吸光分析法(AAS)あるいはプラズマ誘導発光分析法(ICP)を用いて行われている^{3,4)}。この方法では、木材中の有機物がほぼ完全に分解されること、AASやICPによる分析が選択的であることから、木材成分による分析の妨害はほとんど生じないと考えられる。他方、有機化合物であるシプロコナゾールの場合は、銅のように酸化分解を用いることはできない。処理木材中のシプロコナゾールは、有機溶媒により抽出された後HPLCあるいはGCを用いて定量分析されている⁴⁾。木材をメタノールで抽出した場合、シプロコナゾールのみならず、抽出成分も同時に抽出され、これらの成分が試料マトリクスとして残存しHPLC-UV分析を妨害する場合がある⁵⁾。GC分析の場合、試料マトリクスが分析対象のカラムへの導入に影響し、過少な分析値が得られる場合がある⁶⁻⁸⁾。以上のような場合、分析に影響を及ぼす成分を何らかの方法で除去する必要がある。

固相抽出法は、試料中に含まれる妨害成分を除去する方法として有用であり、前処理方法として様々な分野で使用されている⁹⁻¹³⁾。著者らはこれまでに、いくつかの樹種の心材成分がHPLC-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することを確認し、さらに、これらの妨害を除去するための強陽イオン交換カートリッジ(Oasis MCX)を用いた固相抽出法を確立している⁵⁾。さらに、CUAZ系薬剤を使用した検討から、保存剤由来の成分がOasis MCXによる試料精製に影響を与えないことを確認し、同じくトリアゾールであるテブコナゾールを内部標準として用いることで効果的に定量分析できる可能性を確認している¹⁴⁾。

本検討では、内径2.1mmのカラムを使用し、検出感度を向上させることで固相抽出操作をより簡便に行う手順を新たに確立し、CUAZ-2としてタナリスCYで処理された木材中に含まれるシプロコナゾールの定量分析への適用を試みた。

2. 実 験

2.1 試薬

タナリスCY、シプロコナゾールおよびテブコナゾールは(株)ザイエンスから提供されたものを用いた。28%アンモニア水およびメタノールはシグマ社製、HPLC用アセトニトリルおよびHPLC用メタノールは関東化学(株)製のものを用いた。

2.2 試料の調製

スギ(*Cryptomeria japonica*)、カラマツ(*Larix kaempferi*)、トドマツ(*Abies sachalinensis*)およびベイツガ(*Tsuga heterophylla*)の辺・心材をワイレーミル(目開き2mm)で粉碎し、使用するまで室温下で保存した。木粉1gを30ml容のバイアルに入れ、タナリスCYの水溶液を加えた。バイアルを密栓し3日間室温下で養生した。養生後、栓を外し、室温下で2日間乾燥し、その後50℃のオーブンで2日間乾燥したものを処理木粉とした。乾燥後、再びバイアルに栓をし、抽出に用いるまで室温下で保存した。

2.3 抽出

バイアル内の処理木粉に少量のメタノールに溶解したテブコナゾール（約50 μ g）を加え、1日間室温下で乾燥した。次に、バイアルに20mlのメタノールを加え、超音波洗浄機内で2時間抽出を行った。この際、過剰な水温の上昇を防ぐ目的で、超音波洗浄機内の水を30分おきに交換した。抽出後、ガラスフィルターを用いて吸引ろ過し、残渣を約5mlのメタノールで洗浄し、全量を25mlとした。無処理木粉についても、同様の抽出操作を行い、25mlのメタノール溶液とした。これらの溶液のうち各1mlを減圧濃縮後、HPLCの移動相（後述）に再溶解し、0.45 μ mのPTFE製メンブレンフィルターでろ過後HPLCに供した。また、抽出で得られた25mlのメタノール溶液のうち5mlを固相抽出に用いた。

2.4 固相抽出

固相抽出はOasis MCX（Waters）を用い、これまでに確立されている手法（図1）に従って実施した。回収した溶出液5mlのうち、1mlを減圧乾固後、1mlのHPLCの移動相に溶解し、0.45 μ mのメンブレンフィルターでろ過した後、HPLC分析に供した。

2.5 HPLC 分析

HPLC分析は以下に示す条件を用いて行った。

HPLC システム：LC-10A（島津製作所）

カラム：Xbridge C18 150mm $\times$ 2.1mm I.D.（Waters）

移動相：アセトニトリル：100mM リン酸緩衝液（pH2.1）：H₂O（50：10：40，v/v/v）

流速：0.25ml/min

カラムオープン温度：40℃

検出器：UV 220nm

注入量：20 μ l

Xtera C18（150 $\times$ 4.6mm I.D.，Waters）カラムを用いた場合は、流速を1.0ml/minに変更して行った。

2.6 定量分析

テブコナゾールの定量分析は絶対検量線（外部標準）法、シプロコナゾールの定量分析は外部標準法およびテブコナゾールを内部標準とした内部標準法により行った。外部標準法に用いた検量線は0.1–10 μ g/mlのシプロコナゾールおよびテブ

図1 固相抽出の手順

Fig. 1 Solid-phase extraction procedure

コナゾールを含む標準液を用いて作成した。内部標準法に用いた検量線は、0.1–10 μ g/mlのシプロコナゾールに一定量のテブコナゾールを加えた標準液を用いて検量線を作成した。回収率はシプロコナゾール、テブコナゾールとも以下の式に従い算出した。

$$\text{回収率}(\%) = \frac{\text{定量結果から算出したアゾール量}}{\text{添加したアゾール量}} \times 100$$

3. 結果と考察

3.1 カラム内径の影響

HPLC分析では、カラム内径が小さいほど、検出器に到達する濃度が高くなり、検出感度が向上する^{15,16)}。充填剤の充填密度が同じ場合、内径2.1mmのカラムの検出感度はHPLC分析に汎用され

図2 内径の異なるカラムを用いて得られた HPLC クロマトグラム

A : カラム内径2.1mm, B : カラム内径4.6mm
 ↓ : シプロコナゾール (5 µg/ml), ⇓ : テブコナゾール (5 µg/ml)

Fig. 2 HPLC chromatograms of cyproconazole (5 µg/ml) and tebuconazole (5 µg/ml) using different internal diameter columns
 A : 2.1mm i. d. column, B : 4.6mm i. d. column
 Black arrow : cyproconazole, white arrow : tebuconazole

ている内径4.6mmのカラムの場合の約4倍以上となり、また、内径が小さくなることでカラムの全容積も低下するので移動相流量を低減することができる¹⁷⁾。そこで、シプロコナゾール、テブコナゾール(ともに5 µg/ml)を2.1mmのカラムを用いて分析し、その検出感度をこれまでの検討で使用していた4.6mmのカラムと比較した。両カラムを用いて得られたクロマトグラムを図2に示す。内径2.1mmのカラムで得られたシプロコナゾールのピーク面積値は、4.6mmで得られた値の約4倍であり、検出感度が向上していることが確認された。そこで、以下の実験については内径2.1mmのカラムを用いた。

3.2 木材成分の影響

スギ、カラマツ、トドマツおよびベイツガ心材の無処理木粉の抽出物のクロマトグラムを確認すると、内径2.1mmのカラムを用いた場合でも、これまでの報告と同様⁵⁾、ベイツガを除くすべての樹種において、シプロコナゾールおよびテブコナゾールの保持時間に一致する位置に木材由来の成分のピークが確認された。図3に代表的なクロマトグラムを示した。他方、辺材の場合、スギではテブコナゾールと重なるピークが確認されたが、ベイツガは、辺材の場合でもアゾールの保持時間と一致する位置に木材成分のピークは確認されなかった(図4)。クロマトグラムは示していないが、

図3 無処理心材とタナリス CY 処理心材の HPLC クロマトグラム

A : トドマツ心材 (無処理)
 B : ベイツガ心材 (無処理)
 C : トドマツ心材 (タナリス CY 処理, シプロコナゾール含量: 50µg/g)
 D : ベイツガ心材 (タナリス CY 処理, シプロコナゾール含量: 50µg/g)
 ↓ : シプロコナゾール, ⇓ : テブコナゾール (内部標準)

Fig. 3 HPLC chromatograms of the methanol extracts from heartwood of (A) Sakhalin fir and (B) western hemlock, (C) Sakhalin fir and (D) western hemlock treated with Tanalith CY cyproconazole (50µg/g wood)
 Black arrow : cyproconazole, white arrow : tebuconazole (internal standard)

カラマツ辺材の場合も、アゾールの保持時間と一致するピークは確認されなかった。また、スギ、トドマツ辺材とも、シプロコナゾールのピークは、初期に溶出するピークのテール部分に位置することが確認され、定量分析への影響が推測された。

以上のように、内径2.1mmのカラムを用いた場合も、分析試料中に含まれる処理木材に由来する成分の影響によるシプロコナゾールの定量分析の妨害が確認された。また、テブコナゾールのピークにも影響を与える場合が確認され、これを内部標準とした分析も影響を受けることが確認された。

3.3 固相抽出による妨害の除去

処理木材由来の成分による妨害を除去するため、固相抽出を行った。前述のように内径2.1mmのカラムを使用することで検出感度の向上が認め

図4 無処理辺材とタナリス CY 処理辺材の HPLC クロマトグラム
A : スギ辺材 (無処理)
B : トドマツ辺材 (無処理)
C : スギ辺材 (タナリス CY 処理, シプロコナゾール含量 : 50 μ g/g)
D : トドマツ辺材 (タナリス CY 処理, シプロコナゾール含量 : 50 μ g/g)
↓ : シプロコナゾール, ⇓ : テブコナゾール (内部標準)

Fig. 4 HPLC chromatograms of the methanol extracts from untreated and Tanalith CY treated sapwoods
A : Japanese cedar (untreated), B : Sakhalin fir (untreated), C : Japanese cedar (treated, cyproconazole 50 μ g/g wood), D : Sakhalin fir (treated, cyproconazole 50 μ g/g wood).
Black arrow : cyproconazole, white arrow : tebuconazole (internal standard)

られたことから、内径4.6mmのカラムを使用して分析する際に必要であった濃縮操作¹⁴⁾を省略し、メタノール抽出で得られた25mlの溶液のうち5mlを濃縮することなく固相にロードする方法を用いて実験を行った。

図5にタナリス CY で処理したスギ、トドマツの辺・心材をメタノール抽出し、固相抽出で精製した後、HPLCで分析した際のクロマトグラムを示す。図5と図3、4を比較すると明らかなように、固相抽出により定量分析の妨害となるピークが除去され、両アゾールのピークを明確に確認することが可能であった。テブコナゾールのピークに影響する成分を除去できたことにより、テブコナゾールを内部標準とした定量分析が可能である

図5 固相抽出による前処理を適用したタナリス CY 処理木材のメタノール抽出物の HPLC クロマトグラム
A : スギ心材, B : スギ辺材, C : トドマツ心材, D : トドマツ辺材
シプロコナゾールの添加量はすべて50 μ g/g
↓ : シプロコナゾール, ⇓ : テブコナゾール (内部標準)

Fig. 5 HPLC chromatograms of the methanol extracts from Tanalith CY treated woods after the solid-phase extraction with Oasis MCX.
A : Japanese cedar heartwood, B : sapwood, C : Sakhalin fir heartwood, D : sapwood.
Black arrow : cyproconazole, white arrow : tebuconazole (internal standard)

ことが確認された。

3.3 タナリス CY で処理された木材中のシプロコナゾールの定量分析

タナリス CY で処理された木材に対する AQ の規定値は、「保存処理木材 1 種」の2.0kg/m³、2 種の1.0kg/m³、3 種の0.5kg/m³である¹⁸⁾。JIS¹⁾ではCUAZ-2について、銅とシプロコナゾールが98.6~99% : 1.4~1.0%の質量分率で含有されていることが規定されている。これらの値を用いて計算すると、少なくとも1種では28~20g/m³、2種では14~10g/m³、3種では7~5g/m³のシプロコナゾールが木材に含まれていることになる。ここで、木材の比重を0.4と仮定すると、1種で70~50 μ g/g、2種で35~25 μ g/g、3種で17.5~12.5 μ g/gのシプロコナゾールが処理木材に含まれていることになる。そこで本検討では、これらの濃度に対応するため、タナリス CY を用いて120,

表1 外部標準法によるシプロコナゾールおよびテブコナゾールの回収率

Table 1 Recoveries of cyproconazole and tebuconazole using an external standard method

	回収率 (%) ^a Recovery (%)					
	添加量: 120 μ g/g spiking level: 120 μ g/g		添加量: 50 μ g/g spiking level: 50 μ g/g		添加量: 5 μ g/g spiking level: 5 μ g/g	
	シプロコナゾール cyproconazole	テブコナゾール ^b tebuconazole ^b	シプロコナゾール cyproconazole	テブコナゾール ^b tebuconazole ^b	シプロコナゾール cyproconazole	テブコナゾール ^b tebuconazole ^b
スギ心材 Japanese cedar heartwood	78 (0.5)	93 (0.3)	85 (0.5)	93 (1.1)	82 (3.0)	94 (1.6)
スギ辺材 Japanese cedar sapwood	79 (3.4)	91 (1.3)	83 (3.4)	92 (1.8)	84 (1.5)	93 (1.1)
カラマツ心材 Japanese larch heartwood	82 (2.0)	93 (2.6)	85 (2.0)	92 (0.8)	87 (2.4)	94 (1.7)
カラマツ辺材 Japanese larch sapwood	83 (1.2)	92 (3.4)	88 (1.2)	91 (2.3)	87 (3.4)	93 (1.1)
トドマツ心材 Sakhalin fir heartwood	86 (0.7)	94 (4.3)	86 (0.7)	92 (0.6)	80 (2.4)	97 (1.2)
トドマツ辺材 Sakhalin fir sapwood	84 (1.4)	92 (1.3)	88 (1.4)	92 (1.9)	87 (5.6)	96 (2.5)
ベイツガ心材 Western hemlock heartwood	79 (2.1)	95 (4.0)	80 (2.1)	93 (1.6)	81 (1.8)	93 (1.6)
ベイツガ辺材 Western hemlock sapwood	82 (0.5)	94 (2.4)	85 (0.5)	94 (0.3)	84 (5.3)	94 (0.9)

a () 内は標準偏差

a standard deviation in parentheses

b テブコナゾールの添加量は50 μ g/gb spiking level of tebuconazole is 50 μ g/g

50, 5 μ g/g のシプロコナゾールを含む木粉を調製し検討を行った。

外部標準法を用いた定量分析により得られたシプロコナゾールの回収率を表1に示す。いずれの場合も AWPA 規格¹⁹⁾に記載されているアゾール類の回収率 (74~78%) を上回っており、今回用いた手法は、1種から3種に相当する処理木材中のシプロコナゾールの定量分析法として十分使用可能であると考えられる。

内部標準として添加したテブコナゾールの回収率は、濃度水準や樹種にかかわらず、シプロコナゾールの回収率よりも高い値を示した (表1)。テブコナゾールはメタノール溶液として木粉に加え、添加後ただちに乾燥している。一方、シプロコナゾールはタナリス CY の水溶液として加え、添加後数日間の養生期間を経ている。したがって、回収率に認められた差には両アゾールの木材への定着性等が影響していると考えられるが、添加方法の違いも影響していると推測された。

内部標準法を用いた場合の回収率 (表2) についても外部標準法の場合と同様 AWPA¹⁹⁾ 規格に記

載されているアゾール類の回収率よりも高く、さらに外部標準法の回収率よりも高い傾向が認められた。内部標準法は前処理過程で生じる誤差、HPLC 分析時の試料導入量の誤差等を補正できるというメリットがある²⁰⁾。本検討においても、抽出操作前にテブコナゾールを内部標準として加えることで、分析操作上に生じる誤差をある程度補正できたものと考えられる。

4. まとめ

処理木材中のシプロコナゾールの定量分析について、これまでに確立されている方法において、内径2.1mm の HPLC カラムを用いることで、固相抽出を用いた前処理を効率的に行うことが可能であった。また、外部標準法と内部標準法を用いたシプロコナゾールの回収率は、内部標準法の方がやや高いものの、両者とも AWPA に記載されているアゾール類のそれよりも高く、認証に係る試験で対象となる濃度範囲について問題なく定量分析できることが確認された。

表 2 内部標準法によるシプロコナゾールの回収率
Table 2 Recoveries of cyproconazole using an internal standard method

	シプロコナゾール回収率 (%) ^a Recovery of cyproconazole (%) ^a					
	添加量：120μg/g spiking level : 120μg/g		添加量：50μg/g spiking level : 120μg/g		添加量：5μg/g spiking level : 120μg/g	
スギ心材 Japanese cedar heartwood	82	(0.8)	89	(1.3)	86	(4.5)
スギ辺材 Japanese cedar sapwood	85	(1.8)	89	(4.7)	88	(2.2)
カラマツ心材 Japanese larch heartwood	86	(1.4)	91	(1.5)	91	(0.8)
カラマツ辺材 Japanese larch sapwood	88	(0.9)	94	(2.2)	92	(4.4)
トドマツ心材 Sakhalin fir heartwood	90	(3.0)	92	(0.8)	80	(1.5)
トドマツ辺材 Sakhalin fir sapwood	89	(1.3)	94	(0.9)	88	(4.5)
ベイツガ心材 Western hemlock heartwood	81	(1.0)	84	(2.0)	86	(2.1)
ベイツガ辺材 Western hemlock sapwood	85	(2.8)	88	(0.8)	87	(5.3)

a () 内は標準偏差

a standard deviation in parentheses

謝 辞

本研究を進めるにあたり協力いただいた(株)ザイエンスの白石徹氏, (財)日本住宅・木材技術センターの高橋典之氏に謝意を表する。

引用文献

- 1) JIS K1570 (2004): 木材保存剤, 日本規格協会
- 2) 財団法人日本住宅・木材技術センター: 優良木質建材等認証(AQ 認証)一覧表, <http://www.howtec.or.jp/ninsyou/aq/aq-itiran.html>, (2007年4月30日)
- 3) 社団法人日本農林規格協会: 針葉樹の構造用製材, (2006)
- 4) 財団法人日本住宅・木材技術センター: 優良木質建材等の品質試験に係る防腐・防蟻処理試験の試験方法(別冊), (2002)
- 5) Miyauchi, T., Mori, M. and Ito, K.: Application of solid-phase extraction to quantitatively determine cyproconazole and tebuconazole in treated wood using liquid chromatography with UV detection, *J. Chromatogr. A*, **1063**, 137-141

(2005)

- 6) Grob, K. (日本分析化学学会ガスクロマトグラフィー研究懇談会 訳): CGC における試料導入技術ガイドブック, 丸善, 2001, pp64-66, 184-192
- 7) 佐藤正幸, 藤原 修, 竹内伸治, 内山康裕, 新山和人: 農産物への残留農薬迅速分析法の適用性について(第2報), 道衛研所報, **50**, 32-40 (2000)
- 8) 佐藤正幸, 内山康裕, 宇野豊子, 新山和人: 農作物への残留農薬迅速分析法の適用性について(第3報), 道衛研所報, **52**, 1-11 (2002)
- 9) Hennion, M.-C.: Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, **856**, 3-54 (1999)
- 10) Fernandez-Alba AR, Agüera A, Contreras M, Penuela G, Ferrer I and Barceló D: Comparison of various sample handling and analytical procedures for the monitoring of pesticides and metabolites in ground waters, *J. Chromatogr. A*, **823**, 35-47 (2000)
- 11) Huck, C.W. and Bonn, G.K.: Recent devel-

- opment in polymer-based sorbents for solid-phase extraction, *J. Chromatogr. A*, **885**, 51-72 (2000)
- 12) Pichon V. : Solid-phase extraction for multiresidue analysis of organic contaminants in water, *J. Chromatogr. A*, **885**, 195-215 (2000).
- 13) Walker, V. and Mills, G. A. : Solid-phase extraction in clinical biochemistry, *Ann. Clin. Biochem.* **39**, 464-477 (2002)
- 14) Momohara, I., Miyauchi, T. and Mori, M. : Quantitative Determination of Cyproconazole in Wood treated with Tanalith CY, International Research Group on Wood Protection, Document No. IRG/WP 07-20369
- 15) Terragno A. and Tackett R. : Picogram detection of eicosanoids by ultraviolet absorbance after narrow-bore high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **308**, 31-41 (1984)
- 16) Baeyens, W. R. G., Van der Weken, G., Smet, E., García-Campaña, A. M. and Remon, J. P. : Comparison of morphine and hydromorphone analysis on reversed phase column with different diameters. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **32**, 913-920 (2003)
- 17) 日本ウォーターズ : http://www.waters.co.jp/product/column/xas/2_1lineup.html, (2007年4月30日)
- 18) 日本住宅・木材技術センター : 優良木質建材等の性能評価基準 (2004)
- 19) AWPA standard A28-01 : Standard method for determination of propiconazole and tebuconazole in wood, in waterborn formulations and in treating solutions by HPLC., American Wood-Preservers Association, Selma, Al, USA, 2001.
- 20) Meyer, V. R. : Practical High-Performance liquid chromatography (4th Edition), Wiley & Sons Inc., NJ, USA, 2004.

(2007. 6. 18受付)

(2007. 8. 8 受理)