

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月12日現在

機関番号：80122

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22780165

 研究課題名（和文）固相抽出法を駆使した木材保存剤の高精度かつ効率的な定量分析法の確立
 研究課題名（英文）Development of precision and efficient method for quantitative analysis
 of wood preservatives using solid-phase extraction

研究代表者

宮内 輝久（Miyuchi Teruhisa）

地方独立行政法人 北海道立総合研究機構・森林研究本部 林産試験場 性能部・研究主任

研究者番号：20446339

研究成果の概要（和文）：保存処理木材（防腐防蟻処理木材）の性能を明らかにするためには、処理材中に含まれる有効成分の量を正確に定量分析する必要がある。本課題では、木材保存剤に用いられている有機系抗菌剤の高速液体クロマトグラフィーを用いた定量分析について、固相抽出法や蒸発光散乱検出器を適用することで、木材成分による妨害のない分析方法を確立した。これらの方法は保存処理木材の性能を評価する屋外暴露試験などにおける定量分析にも応用可能であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The quantitative determinations of active ingredients of wood preservatives in treated wood are important to guarantee protection. Organic active ingredients are extracted from treated wood with organic solvents, such as methanol, and then analyzed using high-performance liquid chromatography (HPLC). However, it was expected that co-extracted wood components interfere with the HPLC analysis of the active ingredients. In the case of triazole biocides, co-extracted wood components interfere with HPLC analysis with UV detection. The interfering components could be removed from sample solutions by solid-phase extraction (SPE) using strong cation exchanger. The SPE method could be used for removed interfering components of wood specimens exposed in soil. Quaternary ammonium compounds could be quantified using HPLC with evaporative light scattering detection (ELSD). In this case, co-extracted wood components did not affect the HPLC-ELSD analysis. This method could be applied to the determination of the quaternary ammonium compounds in wood specimens exposed in soil.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2011年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2012年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 総計 | 2,600,000 | 780,000 | 3,380,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：木材保存, 分析化学, 固相抽出法, 高速液体クロマトグラフィー, 蒸発光散乱検出器

1. 研究開始当初の背景

(1) 木材保存剤の定量分析の必要性と問題点

現在、木造住宅の長寿命化や屋外構造物の

木製化が進められており、保存処理の重要性が増している。保存処理木材の性能は処理材中の有効成分量に依存するため、日本農林規格（JAS）における製品認証等や工場等にお

ける品質管理では、処理材に含まれる有効成分の定量分析が必須となる。

処理材中の有効成分を定量分析する場合、何らかの方法によって有効成分を処理材から回収し、これを分析機器により定量するのが一般的である。現在、主に用いられている木材保存剤は、銅と有機系抗菌剤あるいは有機系抗菌剤のみを有効成分とするものである。銅などの金属の場合、そのほとんどが有機物である処理材を酸などで分解し回収するので、分析試料にはほとんど木材由来の成分が残らない。

一方、有機系抗菌剤は有機溶媒等を用いた抽出により回収される。木材には有機溶媒に可溶な多種多様な成分が含まれるため、分析試料には有効成分とともに様々な木材成分が共存することになる。木材保存剤の有効成分の定量分析には、試料中の複数の成分を分離分析することが可能な高速液体クロマトグラフィー（HPLC）が用いられている。しかし、木材成分は樹種のみならず辺心材間でも異なり、多種多様である。したがって、有効成分との分離が必ずしも分離することが可能であるとは限らないため、正確な定量分析が困難であることが予想される。そこで、木材成分による分析の妨害の有無の把握と妨害を除去する方法の確立が必要である。

（2）保存処理木材の性能評価や性能向上技術の開発における有効成分の定量分析

使用環境における処理材からの有効成分の溶出（溶脱）は性能の低下を引き起こす。そのため、溶脱挙動の把握は、保存処理木材の性能評価や性能向上技術の開発において重要な検討事項である。溶脱挙動の検討では、保存処理した試験体を水中に浸せきし、試験体に溶出した有効成分の量、または試験体に残存する量により評価する方法がある。その他、長期間土壌中に暴露した試験体に残存する有効成分量を調べることで、溶脱挙動を評価する方法が用いられる。そのため、水溶液中あるいは土壌に暴露された木材中の有効成分を定量分析する必要がある。

土壌に暴露した試験体では、土壌あるいは腐朽による生成物も分析試料に共存する。そこで、木材成分による分析の妨害の有無の把握と妨害を除去する方法の確立が必要である。

2. 研究の目的

これまでに著者は、木材保存剤の有効成分として用いられる頻度の高いトリアゾール化合物のうちシプロコナゾール（CYP）およびテブコナゾール（TEB）、第4級アンモニウム化合物の塩化ベンザルコニウム（BKC）のUV検出器を用いたHPLC（HPLC-UV）分析における木材成分による妨害を確認するとともに

に、固相抽出（SPE）法を用いた妨害成分の除去方法を確立している。SPE法とは写真1に示すようなカートリッジを用いた簡便な前処理方法である。



写真1 SPE用カートリッジ

本課題では、ヒノキ、ベイマツなど、著者らがこれまで検討していなかった樹種について、木材成分によるHPLC分析の妨害の有無を把握するとともに、SPE法による妨害成分の除去方法を確立することを目的とした。

次に、使用されるが、これまで検討されていなかった木材保存剤の有効成分としてトリアゾール化合物のヘキサコナゾール（HEX）、プロピコナゾール（PRO）、第4級アンモニウム化合物であるジデシルジメチルアンモニウムクロリド（DDAC）、N,N-ジデシル-N-ポリオキシエチルーアンモニウムプロピオネート（DMPAP）のHPLC分析について、木材成分による妨害の有無を確認するとともに、SPE法による妨害成分の除去方法を確立することを目的とした。

さらに、屋外暴露試験などにおいて木材保存剤の溶脱挙動を評価する際に問題となる、土壌成分や腐朽生成物による妨害の有無を明らかにし、SPE法による妨害成分の除去方法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

（1）固相抽出法の適用樹種の拡大

①CYPおよびTEBのHPLC分析におけるヒノキ、ベイマツ成分による妨害の確認とSPE法による妨害成分の除去

無処理のヒノキ、ベイマツの心材をそれぞれカッターミルで2 mm-mesh以下に粉碎したものを抽出試料とした。各抽出試料1gをサンプル瓶に入れ、20 mLのメタノールを加え、超音波照射下2時間抽出した。その後、ろ過するとともに残渣をメタノールで洗浄しろ液と洗液を合わせて25 mLに定容したものをメタノール抽出液とした。各抽出液を、HPLC-UV分析に供し、CYPおよびTEBの分析結果と比較することで妨害の有無を確認し

た。また、メタノール抽出液に CYP および TEB を加えた後、図 1 (左) に示した手順に従った SPE 法を実施し、妨害成分の除去について検討した。

②BKC の HPLC 分析におけるヒノキ、ペイマツ、ベイツガ成分による妨害の確認と SPE 法による妨害成分の除去

無処理のヒノキ、ペイマツおよびベイツガ心材をカッターミルで 2 mm-mesh 以下に粉碎したものを抽出試料とした。各抽出試料 500 mg に対し、20 mL の塩酸-エタノールを加え、超音波照射下 3 時間抽出した。抽出後、ろ過するとともに残渣を塩酸-エタノールで洗浄し、ろ液と洗液を合わせて 25mL に定容したものを塩酸-エタノール抽出液とした。各抽出液を、HPLC-UV 分析に供し、BKC の分析結果と比較することで妨害の有無を確認した。また、塩酸-エタノール抽出液に BKC を加えた後、図 1 (右) に示した手順に従った SPE を実施し、妨害成分の除去について検討した。

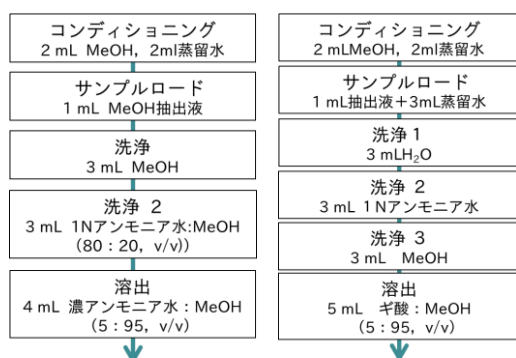


図 1 CYP と TEB (左) および BKC (右) の SPE 手順

(2) 木材成分による分析への影響が検討されてない有機系抗菌剤について

①HEX, PRO の分析における木材成分による妨害の確認と SPE 法による妨害成分の除去

スギ、カラマツ、トドマツ、ヒノキ、ペイマツ、ベイツガの辺材および心材を対象とした。それぞれを、カッターミルで 2 mm-mesh 以下に粉碎したものを抽出試料とした。各抽出試料を (1) ①と同様に抽出し、各抽出液を HPLC-UV 分析し HEX, PRO の標準品の結果と比較して、妨害の有無を確認した。また、各抽出液に HEX, PRO を添加した後、図 1 (左) に従った SPE を実施し、妨害成分の分離を実施した。なお、SPE にはこれまでの検討に用いた強陽イオン交換体カートリッジの他に、同じく強陽イオン交換体である市販の 2 種類のカートリッジも用いて行った。また、参考として CYP および TEB も加えて実験を行った。

②DDAC および DMPAP の蒸発光散乱検出器を用いた HPLC 分析条件の検討

①と同様の方法で調整した木粉各 500mg を 20mL のギ酸-メタノール (3 : 100, v/v) で抽出し、0.45 μ m のメンブレンフィルターでろ過したものをギ酸-メタノール抽出液とした。これらの抽出液および DDAC および DMPAP の標準品を蒸発光散乱検出器 (ELSD) とする HPLC 分析 (HPLC-ELSD) で分析した。得られた結果から木材成分による妨害の有無を調べ、最適な分析条件を確立した。

③木材保存剤で処理した木粉からの回収率についての検討

①と同様に調製した各樹種の辺材、心材木粉に DDAC または DMPAP を含む木材保存剤の水溶液を滴下し、②と同様の方法で抽出した。得られたギ酸-エタノール抽出液 HPLC-ELSD で定量分析し、添加量に対する定量値の割合から回収率を算出した。

(3) 腐朽生成物や土壌成分による分析への影響と SPE 法による妨害成分の除去

①腐朽試験体の作成

ファンガスセラ (屋外の土壌等を用いて作成した配合土壌) にスギ、カラマツおよびトドマツの辺材、心材の試験片を 4 ヶ月間設置し、腐朽および土壌成分を含む試験材を作成した。

②トリアゾール化合物の分析における妨害の確認と SPE 法による除去

各樹種・部位の試験材を遠心粉碎機で粉碎し 2 mm-mesh 以下の腐朽木粉を作成した。腐朽木粉をそれぞれ (1) ②と同様の方法で抽出することで、腐朽材メタノール抽出液を得た。各腐朽材メタノール抽出液を HPLC 分析し、CYP, TEB, HEX および PRO の分析結果と比較することで分析への影響を確認した。

腐朽材のメタノール抽出液に CYP, TEB, HEX および PRO を加えた後、図 1 (右) に示した手順に従った SPE を実施し、妨害成分の除去について検討した。

③第 4 級アンモニウム化合物の分析における妨害の確認と SPE 法による妨害成分の除去

スギ、カラマツおよびトドマツの辺材、心材の腐朽木粉をそれぞれ (2) ②と同様の方法で抽出した。得られた腐朽材木粉のギ酸-メタノール抽出液および DDAC, DMPAP の標準品を HPLC-ELSD に供した。得られた結果と比較することで分析への影響を確認した。

4. 研究成果

(1) 固相抽出法の適用樹種の拡大

①CYP および TEB の HPLC 分析におけるヒノキ、ペイマツ成分による妨害の確認と SPE による

る妨害成分の除去

ヒノキ心材およびベイマツ心材のメタノール抽出液、CYP および TEB の標準品の HPLC-UV の結果を図 2 に示す。ヒノキ心材およびベイマツ心材には、CYP および TEB と同じ位置に比較的大きなピークを有する成分が含まれ、定量分析を妨害することが確認された。そこで、図 1 (左) の SPE 法を適用したところ、妨害成分の除去が可能であることが確認された (図 3)。また、ヒノキ心材およびベイ

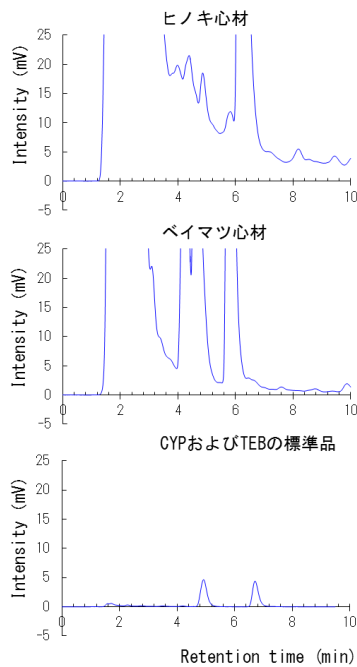


図 2 ヒノキ心材およびベイマツ心材のメタノール抽出液、CYP および TEB の標準品のクロマトグラム

マツ心材のメタノール抽出液に添加した CYP

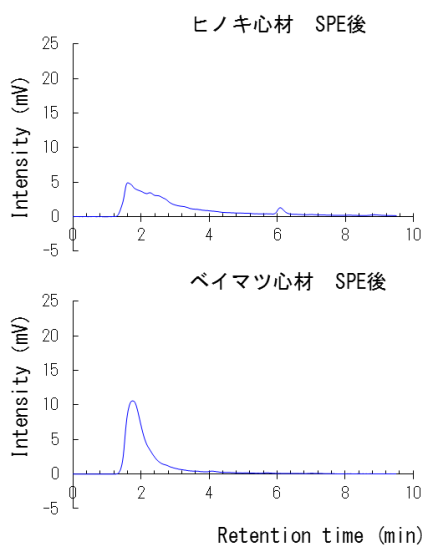


図 3 ヒノキ心材およびベイマツ心材のメタノール抽出液の SPE 後のクロマトグラム

および TEB は SPE によりほぼ 100% 回収できることが確認された。

②BKC の HPLC 分析におけるヒノキ、ベイマツ、ベイツガ成分による妨害の確認と SPE 法による妨害成分の除去

ヒノキ、ベイマツおよびベイツガ心材の塩酸-エタノール抽出液を HPLC-UV 分析することで得られたクロマトグラムを BKC の標準品のクロマトグラムと比較したところ、ヒノキ心材およびベイツガ心材で、木材成分による分析の妨害が確認された。次に、ヒノキおよびベイツガ心材の塩酸エタノール抽出液について図 1 (右) に示した SPE を行ったところ、分析に影響する成分を除去できることが確認された。また、ヒノキおよびベイツガ心材の塩酸エタノール抽出液に添加した BKC は SPE によりほぼ 100% 回収できることが確認された。

以上の結果、CYP、TEB、および BKC についてこれまで確立した SPE 法は、その他の樹種の妨害成分の除去にも適用可能であることが確認された。

(2) 木材成分による分析への影響が検討されてない有機系抗菌剤について

①HEX、PRO の分析における木材成分による妨害の確認と SPE 法による除去

スギ、カラマツ、トドマツ、ヒノキ、ベイマツおよびベイツガ心材のメタノール抽出液を HPLC-UV 分析し、得られたクロマトグラムを CYP、TEB、HEX および PRO の標準品と比較した (図 4)。その結果ベイツガを除いたすべての樹種で木材成分が CYP、TEB、HEX および PRO の定量分析を妨害することが確認された。また、一部の樹種の辺材成分もトリアゾール化合物の定量分析を妨害する可能性が確認された。

各メタノール抽出液について図 1 (右) に示した手順で SPE を行ったところ、3 種のカートリッジすべてにおいて、妨害成分を除去できることが確認された。次に、各メタノール抽出液に 4 種の TAZ を添加したものを、3 種のカートリッジを用いた SPE を実施し、回収率を比較した。その結果、CYP、TEB および HEX はいずれのカートリッジを用いた場合も高い回収率が得られたが、PRO については、回収率が他のカートリッジよりも低いものがあった。

以上の結果、HEX、PRO の定量分析においても木材成分による妨害が確認されたが、SPE を用いることにより妨害成分を除去できることが確認された。但し、SPE に用いる強陽イオン交換体カートリッジによっては一部の TAZ の回収率が低くなることが確認されたため、使用するカートリッジの性能をあらかじめ

じめ評価しておく必要があった。

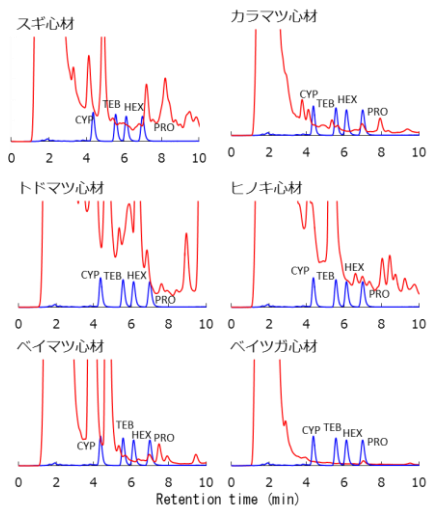


図4 各心材のメタノール抽出液と CYP, TEB, HEX および PRO の標準品のクロマトグラム

②DDACおよびDMPAPのHPLC-ELSD分析における木材成分による影響

DDACおよびDMPAPはHPLCに用いられるUV検出器では、検出が困難である。そこで、本課題では蒸発光散乱検出器を用いたHPLC(HPLC-ELSD)による定量分析を試み、その場合の木材成分による影響について検討を行った。

スギ、カラマツ、トドマツ、ヒノキ、ベイマツおよびベイヒバの辺心材それぞれのギ酸-メタノール抽出液をHPLC-ELSD分析し、得られたクロマトグラムをDDACおよびDMPAPの標準品と比較した。その結果、定量分析を妨害する木材成分は、いずれの樹種においても確認されなかった(図5(心材の結果))。この結果、DDACおよびDMPAPのHPLC-ELSDを用いることで、固相抽出等による分析試料の前処理が必要ないことが確認された。

③処理木粉からの回収率

DDACまたはDMPAPを有効成分とする木材保存剤で処理した各樹種の辺心材の木粉を用い、各処理木粉からの回収率を算出した結果、DDACの回収率は97~104%、DMPAPの回収率は93~104%の範囲にあることが確認された。樹種あるいは辺心材の違いによって多少の差はあるものの、概ね100%近い回収率が得られた。また、回収率の変動係数はDDACで0.4~1.8%、DMPAPで0.3~2.1%の範囲にあり、バラツキの小さい良好な結果が得られた。

以上の結果、DDACおよびDMPAPの新たな定量分析方法として、HPLC-ELSDを用いた効率的かつ高精度な定量分析方法が確立された。

(3)腐朽生成物や土壌成分による分析への影響とSPEによる除去

①トリアゾール化合物

スギ、カラマツおよびトドマツの辺心材の腐朽木粉の各メタノール抽出液をHPLC-UV分析し得られたクロマトグラムを、4種類のトリアゾール化合物のクロマトグラムと比較した。その結果、腐朽した木材の成分の場合も、トリアゾール化合物の定量分析を妨害する可能性が高いことが確認された。

次に、腐朽木粉のメタノール抽出液に4種類のトリアゾール化合物を添加した後、図1に示した手順でSPEを実施し、HPLC-UVによる定量分析を行った。その結果、4種類のトリアゾール化合物は90~98%の回収率が得られ、その変動係数は最も高いもので5%と良好な結果が得られた。以上の結果、保存処理木材の性能を評価する上で重要な、土壌に暴露した試験体に含まれるトリアゾール化合物の効率的かつ高精度な定量分析方法が確立された。

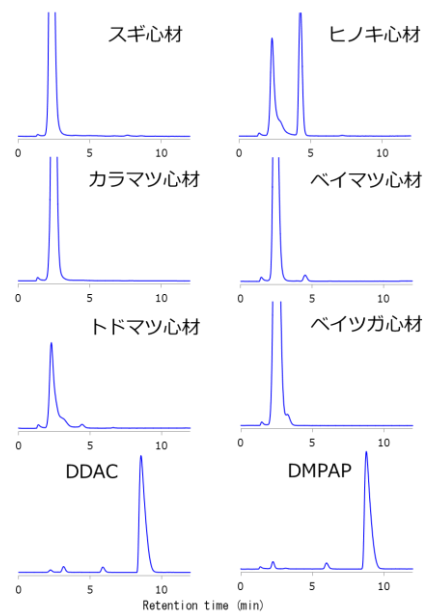


図5 各心材のギ酸-メタノール抽出液とDDACおよびDMPAPの標準品のクロマトグラム

②DDACおよびDMPAP

スギ、カラマツおよびトドマツの辺心材の腐朽木粉のギ酸-メタノール抽出液をHPLC-ELSD分析し、得られたクロマトグラムをDDACおよびDMPAPのクロマトグラムと比較した。その結果、DDACおよびDMPAPの定量分析に影響する成分が存在しないことが確認された。以上の結果、HPLC-ELSDを用いることで、土壌に暴露した試験体に含まれる

DDAC および DMPAP が、効率的かつ高精度に定量分析できることが確認された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 5 件)

- ①宮内輝久, 森 満範, 木材保存剤の LC-UV 分析における妨害成分の固相抽出による除去, 第 61 回日本木材学会大会, 平成 23 年 3 月, 京都
- ②宮内輝久, 森 満範, 木材保存剤の回収率の抽出溶媒間での比較, (社) 日本木材保存協会 第 27 回年次大会, 平成 23 年 5 月 27 日, 東京
- ③宮内輝久, 森 満範, 異なる強陽イオン交換体を用いた固相抽出におけるシプロコナゾールおよびテブコナゾールの挙動, 日本木材学会北海道支部・平成 23 年度研究発表会, 平成 23 年 11 月 11 日, 旭川
- ④宮内輝久, 森 満範, 木材保存剤に用いられているトリアゾール化合物の LC-UV 分析, 第 62 回日本木材学会大会, 平成 24 年 3 月 15 日, 札幌
- ⑤宮内輝久, 木材保存剤に用いられている第 4 級アンモニウム化合物の HPLC-ELSD を用いた定量分析, (公社) 日本木材保存協会 第 29 回年次大会, 平成 25 年 5 月 28 日, 東京

[その他]

第 14 回日本木材学会技術賞受賞「効率的かつ高精度な木材保存剤の定量分析技術の開発」

(<http://jwrs.org/woodience/mm027/miyauchi.pdf>)

“木材保存剤シプロコナゾールの固相抽出-HPLC - UV 定量分析法の開発”
http://www.waters.com/waters/promotionDetail.htm?id=134699218&locale=ja_JP

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮内 輝久 (Miyuchi Teruhisa)

地方独立行政法人 北海道立総合研究機構・森林研究本部 林産試験場 性能部・研究主任

研究者番号 : 20446339