ガスクロマトグラフィーによるサイレージ中の揮発性脂肪酸と乳酸の分析及び未知物質の同定

北田善三*・佐々木美智子*・谷川 薫*
清水 悟**・永谷憲三郎**

Determination of Volatile Fatty Acids and Lactic Acid in Silage by Gas Chromatography and Identification of Unknown Component

Yoshimi KITADA*, Michiko SASAKI,
Kaoru TANIGAWA*, Satoru SHIMIZU**
and Kenzaburo NAGATANI**

* Nara Prefectural Institute of Public Health,
Ohmori-cho, Nara-shi, Nara, 630

** Nara Prefectural Stockbreeding Experiment
Station, Ohuda-cho, Nara, 633-21

Gas chromatographic method was established for the simultaneous quantitative determination of 9 kinds of volatile fatty acids, lactic acid, and furfural in silage. They were separated within 16 min on a 1.5 m 1% KT-300 on Chromatobase AF, 40~60 mesh glass column. Column temperature was elevated from 120 to 190°C (5°C/min). Usually, it was necessary to add 0.05~0.10% H₂SO₄ to aqueous extract from silage as telephthalic acid solid support was used. But, the addition of H₂SO₄ was not necessary by using this column. The coefficient of variation for these components ranged from 2.08~2.74%. Unknown component in brewers grain silage extract was identified as furfural with GC-MS.

(Received Feb. 22, 1983)

サイレージは、草類を種々の微生物により嫌気的条件下で発酵させたものであり、その品質の良否判定の一手段として、発酵により生成した有機酸の含量を測定し、そのうち乳酸の多いものをすぐれたものとし、酪酸や吉草酸、カプロン酸などの多いものを品質の劣るものとするフリーク評価法が広く採用されている¹⁾。

サイレージ中の有機酸の分析法として、最近、高速液

体クロマトグラフィーによる方法が報告されたが²⁾、現在、多く用いられているのは、蔭山らによるガスクロマトグラフィー法³⁾であろう。しかし、この方法では、カラム温度を最高使用温度以上に上げる必要があり、また、乳酸ピークの再現性をよくするために、標準溶液およびサイレージ抽出溶液に硫酸を添加する必要がある。これらは、カラムの寿命や作業性を考えた場合、必ずしも好ましい方法とはいえない。今回、著者らは、これらの点を改良すべく、種々のカラムについて検討した。また、蔭山らの方法³⁾でビール糖化粕サイレージを分析した際に、酪酸とプロピオン酸との間に、しばしば観察される未知物質の同定をガスクロマトグラフ-質量分析装置(GC-MS)で行ったところ、この物質がフルフラールであることがわかったので合わせて報告する。

1. 実験方法

(1) 装置：ガスクロマトグラフ（島津製作所）4CM型、FID検出器、クロマトパック E1A データ処理機付、GC-MS（島津製作所）GCMS-6020型、SCAP-1123データ処理機付

(2) 試薬：酪酸（和光純薬）試薬特級、プロピオン酸、酪酸、イソ酪酸、吉草酸、イソ吉草酸、イソカプロン酸（和光純薬）和光特級、カプロン酸（和光純薬）試薬一級、カプリル酸（和光純薬）アミノ酸自動分析用、乳酸（和光純薬）試薬特級、総乳酸 85~92%、フルフラール（東京化成工業）東京化成特級

(3) 試験溶液の調製：おおむね蔭山ら³⁾の調製法Ⅱに従った。すなわち、細切したサイレージ 100g に蒸留水 200ml を加え、ときどき攪拌しながら、冷蔵庫内で 24hr 放置した後、ガーゼと濾紙で濾過し、濾液を試験溶液とした。

(4) GC-MS 測定条件：カラム：15% PEG 6000 Shimalite TPA, 30~60メッシュ, 2mm×1.5m, ガラス製、カラム温度：130°C, 注入口温度：200°C, セパレータ温度：300°C, キャリヤーガス (He) 流速：30ml/min, イオン化電圧：22/70 eV, イオン化電流：60 μA

2. 実験結果と考察

(1) GC 条件の検討

揮発性脂肪酸と乳酸の分析に適していると考えられるカラム 7 種 (Table 1) について検討した。なお、揮発性脂肪酸のうちギ酸は pH 調整のために、人為的に加えられることはあるが、品質評価の対象とならないために、今回は分析対象からはずした。まず、揮発性脂肪酸

* 奈良県衛生研究所 (〒 630 奈良市大森町 57-6)

** 奈良県畜産試験場 (〒 633-21 奈良県宇陀郡大宇陀町下竹)

Table 1 List of column for gas chromatography

	Column		Mesh	Max temp	Length
①	10% PEG 6000	Shimalite TPA	60/80	185°C	1.5 m
②	3% Thermon 3000	Shimalite TPA	60/80	185	1.5
③	3% Unisole 30T	Flusin P	60/80	185	1.5
④	3% KT-300	Chromatobase AT	60/80	185	1.5
⑤	1% KT-300	Chromatobase AF	40/60	210	1.5
⑥	1% NCG11H	Chromatobase AXF	40/60	210	1.5
⑦	TENAX GC		60/80	350	1.0

については、①でプロピオン酸とイソ酪酸の分離に多少難があった以外は特に問題なかった。乳酸については、①、②、⑤、⑥、⑦で良好なピークが得られたが、⑦では吉草酸との分離が困難であった。その他のカラムは0.50%濃度でも極端にピークが小さく、あるいはテーリングが激しいため、乳酸の分析には適していなかった。次に、①、②、⑤、⑥のカラムについてフルフラールとの同時分析を試みたところ、⑥で酢酸との分離が困難であったが、①は完全に分離し、②と⑤で酢酸と重なりながらも定量は可能であった。従って、フルフ

ラールとの同時分析には①、②、⑤がすぐれていた。しかし、⑥でも1.5mカラムを用いた時、カラム限界温度210°Cに対し、分析最高温度が180°Cとまだ余裕があり、カラム長さをさらに長くすることにより、フルフラールと酢酸が分離する可能性もある。これに対し、①、②は分析最高温度が限界温度かそれ以上に上げる必要があり、カラム寿命を短くする懸念がある。また、①では注入回数を増すごとに、乳酸の値が小さくなり、これを解決するために0.05~0.10%の硫酸を添加しており、これはテレフタル酸担体とポリエチレングリコールのエステル結合の加水分解によるとされている。³⁾しかし、⑤ではテフロン担体を使用しているため、硫酸添加の必要性はないと思われ、事実硫酸無添加の標準溶液や試験溶液を50回以上注入しても何ら影響はみられなかった。

以上を総合した時、揮発性脂肪酸、乳酸およびフルフラールの分析には⑤1% KT-300 Chromatobase AFがもっともすぐれていた。Fig. 1に標準溶液のクロマトグラムと分析条件を示した。

(2) 検量線

1% KT-300 Chromatobase AFを用いて分析した時の定量性を標準品を用いて調べたところ、Fig. 2に示したように、揮発性脂肪酸、フルフラールでは0.01~0.10%、乳酸では0.05~0.50%の範囲で直線を示した。なお、定量はデータ処理機による面積法で行った。また、揮発性脂肪酸(0.05%)、乳酸(0.25%)の標準溶液を用い、繰り返し6回注入した時の変動係数を求めたところ、酢酸2.62%、プロピオン酸2.08%、イソ酪酸2.43%、酪酸2.38%、イソ吉草酸2.65%、イソカプロン酸2.50%、カプロン酸2.55%、乳酸2.74%であった。

(3) GC-MSによる未知物質の同定

10% PEG 6000 Shimalite TPAを用いた従来の方法でビール糖化粕サイレージを分析する時、酢酸とプロピ

Fig. 1 Chromatogram of volatile fatty acid, furfural, and lactic acid standards

1: acetic acid, 2: furfural, 3: propionic acid, 4: iso-butyric acid, 5: butyric acid, 6: iso-valeric acid, 7: valeric acid, 8: iso-caproic acid, 9: caproic acid, 10: caprylic acid, 11: lactic acid, volatile fatty acids, furfural: 0.025%, lactic acid: 0.125%

Conditions; column: 1% KT-300 Chromatobase AF, 40-60 mesh, 3 mm×1.5 m (glass), column temp: 120→190°C (5°C/min), injection temp: 250°C, carrier gas (N₂): 30 ml/min, sensitivity: 10⁸MΩ, range: 0.16 V, injection volume: 2 μl

Fig. 2 Calibration curves for volatile fatty acids, furfural, and lactic acid
Conditions; same as Fig. 1

オン酸との間に未知物質がしばしばみられる。この物質の同定を GC-MS を用いて行ったところ、分子イオンピーク (m/z 96) とともに、アルデヒド特有の M-1 ピークおよび 5 員環ヘテロ芳香族に特徴的なピーク (m/z 39) が得られ、この物質がフルフラールであることがわかり、標準品のマスフラグメントとも一致した。また、GC での保持時間も標準品と一致した。なお、1% KT-300 でも同様に酢酸とプロピオン酸の間にフルフラールのピークがみられた。

フルフラールは、ペントサンを含む植物体を無機酸と加熱する時、ペントースを経て生成することが知られており、その毒性はホルムアルデヒドよりは弱い³、中枢

神経に作用して、のどの痛みや頭痛、目の炎症を起こさせ、慢性の吸入では神経障害や視力障害を起こすことが知られている。⁴⁾ しかし、複胃という特殊な内臓をもった牛に、直ちにこの毒性があてはまるかは疑問である。なお、1982 年 1 年間に当畜産試験場で分析したビール糖化粕サイレージ 249 件のうち 228 件 (91.6%) から最高 0.296% のフルフラールが検出された。

3. 要約

ガスクロマトグラフィーによるサイレージ中の揮発性脂肪酸と乳酸の分析法の検討を行った。

(1) カラムとしては、1% KT-300 Chromatobase AF、40~60 メッシュがもっともすぐれていた。

(2) テレフタル酸担体を用いた時、ピークの再現性を保つために、従来、硫酸を添加していたが、本カラムを使用することにより添加の必要性がなくなった。

(3) ビール糖化粕サイレージ中の未知物質を GC-MS で同定したところ、フルフラールであることがわかった。

文 献

- 1) 安宅一夫: サイロとサイレージ, デーリィ・ジャパン臨時増刊, **23**, 107 (1978).
- 2) 加藤 勲・吉沢貞男・浜口健治・安藤功一: 日畜会報, **53**, 642 (1982).
- 3) 藤山勝弘・森 治夫・佐藤勝郎: 日畜会報, **44**, 465 (1973).
- 4) 化学大辞典, 共立出版, (8), 56 (1964).

(昭和 58 年 2 月 22 日受理)