

反芻胃液中揮発性脂肪酸の分析方法に関する検討

誌名	九州東海大学農学部紀要
ISSN	02868180
著者	飛岡, 久弥 加藤, 正信
巻/号	5巻
掲載ページ	p. 77-82
発行年月	1986年3月

反芻胃液中揮発性脂肪酸の分析方法に関する検討

飛岡久弥・加藤正信

Methods of Sample Preparation for Determination of Volatile Fatty Acids in Rumen Fluid

Hisaya TOBIOKA and Masanobu KATO

(Accepted September 30, 1985)

To evaluate a gas-liquid chromatographic determination of volatile fatty acid (VFA) in rumen fluid, the values of VFAs peak area relative to the internal standard (relative VFA value, %) and the reproducibility were comparatively investigated, varying both acid reagents for sample treatment and time length to let sample stand after addition of the reagents. The reagents had not a significant effect on the relative VFA values. However, comparing the data obtained for letting stand 1 hr after the addition of reagent, the relative VFA values tended to be high in metaphosphoric acid than in the other reagents. The time length to let sample stand showed a significant influence on propionic and butyric acids ($P < 0.05$ - $P < 0.01$) and also a certain effects on acetic and iso plus normal caproic acids ($P < 0.1$). The relative VFA value of each VFA did not change with the various processes of sample preparation. However, when sample was allowed to stand 16 to 20 hr after the addition of reagent, the relative VFA values tended to be decreased. As compared with other procedures, the coefficient of variation of the relative VFA values was smaller for 1 N and 2 N sulfuric acid and 2 N and 4 N orthophosphoric acid followed by 1 hr letting stand and 2 N orthophosphoric acid followed by 16-20 hr standing. In conclusion, the most accurate and reproducible procedure was to let sample stand for 1 hr after addition of 1 N sulfuric acid.

緒言

反芻胃液やサイレージ抽出液の揮発性脂肪酸(VFA)を定量する方法としては、従来、試料を水蒸気蒸留してその留出液のVFAをガスクロマトグラフで定量する方法が行われてきた^{5,6,9)}しかし、近年定量法の簡便化を図るべく、試料を蒸留することなく、除蛋白後の遠沈上澄液^{1,3,8,12)}あるいはろ過後のろ液^{11,13)}を直接ガスクロマトグラフに注入して分析する方法が提唱されてきた。本研究では上記の方法のうち、各所で広く用いられている除蛋白上澄液をガスクロマトグラフで分析する方法について、特にガスクロマトグラフィー上での内部標準物質のピーク面積に対する各VFAのピーク面積の相対値(対内標相対値)と再現性について検討した。除蛋白試薬としては従来メタリン酸³⁾が用いられてきたが、ここでは阿部ら¹⁾、村上ら⁸⁾が用いた硫酸と新たにオルトリ

ン酸を加えて、いずれのサンプル処理試薬が最も適当か、また試料にこれらの試薬を添加した後の放置時間の長短について比較検討した。

材料及び方法

1) 装置および分析条件：島津ガスクロマトグラフ7AGと島津クロマトパックC-RIBを用いた。充填剤はUnisole F 200をTPA系担体(30/60)(ガスクロ工業株式会社)にコーティングしたもので、カラムは長さ2m、内径3mmのガラスカラムを使用した。分析は注入部と検出部温度210℃、カラム温度は110℃→175℃まで4℃/分の昇温条件で行った。キャリアーガスとして窒素(30ml/分)を用い、水素と空気の圧力はそれぞれ0.6kg/cm²、0.5kg/cm²であった。

2) VFA標準液：高濃度VFA標準液の組成は、酢酸33.2mM、プロピオン酸16.1mM、イソ酪酸4.6mM、酪酸9.1mM、イソ吉草酸3.9mM、吉草酸3.9mM、イソカ

ブロン酸3.4mM, カブロン酸3.4mMであった。VFAの中濃度と低濃度標準液は、上記高濃度液をそれぞれ2分の1, 4分の1に希釈したものをを用いた。各標準液の作製にあたっては、内部標準として45mMのクロトン酸溶液が全体の25% (V/V)となるように調整した。

3) 試料および操作: 本学に繋養しているジャージー種搾乳牛数頭から反芻胃液を採取し、二重ガーゼでろ過した。ろ液を50ml遠沈管に分配し、1500gで10分間遠沈した。上澄液を合して一つの試料とし、この液100ml当たり約70mgの塩化第2水銀を添加してよく攪拌混合した。サンプル処理試薬 (A因子)として1N硫酸, 2N硫酸, 10%メタリン酸, 25%メタリン酸, 2Nリン酸および4Nリン酸の各2mlをフタ付遠沈管10本ずつにホールピペットを用いて入れた。これらの遠沈管に、調製した反芻胃液の遠沈上澄液を4mlずつホールピペットを用いて加え、直ちにVortex Mixerで攪拌した。これらに添加試薬の異なる10本の遠沈管の内、半分の5本は放置時間 (B因子)を1時間とし、残りの5本については16~20時間放置した後、1500gで10分間遠沈した。上澄液をデイスペンサーでとり、このうち3mlを予め内部標準物質として45mMクロトン酸1mlを入れておいたカルチャーチューブにホールピペットで加えた。よく混合した後分析まで-20℃に保存した。VFAの分析に当っては、試料を冷凍庫から取り出してガスクロマトグラフに注入するまでの時間が一定 (1時間弱)となるように留意した。試料の分析はランダムに行い、ガスクロマトグラフへの注入量は2μlとした。

4) 統計処理: 各VFAの対内標相対値 (%)を用い

上記A, B2因子について、枝分れ分類による分散分析¹⁵⁾を行った。分析方法の違いによる各VFAの対内標相対値の平均値間の差の検定は、Tukeyの方法に準じたt検定で行った。

結果及び考察

高, 中, 低3種類のVFA標準液を3連ずつ分析して、各VFAのピーク面積と濃度との関連を検討した結果を第1表に示した。酢酸からイソ吉草酸までの各VFAは、相関係数が0.996~0.999 (P<0.01)という一回帰式を示した。吉草酸からカブロン酸の各VFAは、直線的な関係を示さず指数的な関係が認められた (r=0.968~0.982, P<0.01)。本実験では各VFAの濃度は反芻胃液中の濃度ではなく、対内標相対値として示した。これは実際の測定値としては意味がないが、この数値に一定の係数を乗ずると具体的な数値となるため、本研究の目的からすると全く問題はないと考えられた。

第2表に酢酸, 第3表にプロピオン酸, 第4表に酪酸の対内標相対値についての枝分かれ分類分散分析の結果を示した。第2表~第4表が示すように、これらのVFAについても、他のVFAと同様にサンプル処理試薬の違いによる対内標相対値の変化は認められなかった。しかし、試薬添加後の放置時間の長短については、プロピオン酸 (P<0.05)と酢酸 (P<0.01)で差異が認められた。酢酸と、ここでは分散分析の結果を表に示さなかったがイソカブロン酸+カブロン酸についても試薬添加後の放置時間によって変化する傾向が窺われた

Table 1. The relationships between concentrations (mM, Y) of standard solutions of volatile fatty acids (VFA) and peak area (modified electrical sign, X) obtained by gas-liquid chromatography

VFA	Regression equation	Correlation coefficient (r)
C2 ¹⁾	$Y = 4.245 \times 10^{-4}X + 0.1257$	0.999 ^{**2)}
C3	$Y = 1.965 \times 10^{-4}X + 0.0955$	1.000 ^{**}
iC4	$Y = 1.167 \times 10^{-4}X - 0.1363$	0.996 ^{**}
C4	$Y = 1.300 \times 10^{-4}X - 0.3429$	1.000 ^{**}
iC5	$Y = 9.379 \times 10^{-5}X - 0.2924$	0.997 ^{**}
C5	$Y = 1.226 \times 10^{-5}X^{1.160}$	0.968 ^{**}
iC6	$Y = 6.669 \times 10^{-6}X^{1.120}$	0.978 ^{**}
C6	$Y = 8.495 \times 10^{-5}X^{0.980}$	0.982 ^{**}

1) Volatile fatty acids are abbreviated to their carbon number, that is, iC4 for iso butyric acid.

2) **, P<0.01.

反芻胃液中揮発性脂肪酸の分析方法

($P < 0.1$)。その他の VFA については、放置時間の長短による差異は認められなかった。プロピオン酸と酪酸の場合、総分散に対する放置時間の分散成分の割合はそれぞれ 21.5%、46.5%であった。酢酸とイソカプロン酸+カプロン酸の場合、それはいずれも 17.2%であった。プロピオン酸や酪酸等の VFA が、放置時間を長くした場

合に影響を受けるということは、取りも直さず反芻胃液を酸性にして放置すると VFA の濃度が変化するというを示唆している。

第 5 表は、サンプル処理試薬と放置時間を組み合わせて試料調製方法を変えた場合の各 VFA の対内標相対値を示したものである。酪酸については 10% メタリン酸添

Table 2. The effect of methods of preparing ruminal sample on the value of acetic acid relative to internal standard¹⁾

Factor ²⁾	SS	DF	MS	F ₀
A	35.2833	5	7.0567	0.174
B(A)	243.5560	6	40.5927	2.261 ^{+ 3)}
C(AB)	861.5200	48	19.9483	

- 1) The value of acetic acid relative to internal standard (crotonic acid) was calculated based on the peak area obtained by gas-liquid chromatography.
- 2) Factors A, B and C represent the following processes of sample preparation in a hieracal classificathon, that is, the acid reagent for sample treatment (1 N and 2 N sulfuric acid, 10 % and 25 % metaphosphoric acid, 2 N and 4 N orthophosphoric acid), time length (1 hr vs. 16~20 hr) to let sample stand after the addition of reagent, and repetition of analysis, respectively.
- 3) +, $P < 0.1$.

Table 3. The effect of methods of preparing ruminal sample on the value of propionic acid relative to internal standard¹⁾

Factor ²⁾	SS	DF	MS	F ₀
A	4.0393	5	0.8079	0.124
B(A)	39.0660	6	6.5110	2.372 ^{* 3)}
C(AB)	131.7840	48	2.7455	

- 1) The relative value was calculated as described in the footnote of Table 1.
- 2) The symbols representing factors are the same as those indicated in Table 1.
- 3) *, $P < 0.05$.

Table 4. The effect of methods of preparing ruminal sample on the value of butyric acid relative to internal standard¹⁾

Factor ²⁾	SS	DF	MS	F ₀
A	34.9588	5	6.9918	0.092
B(A)	455.9510	6	75.9918	5.346 ^{** 3)}
C(AB)	682.3520	48	14.2156	

- 1) The relative value was calculated as described in the footnote of Table 1.
- 2) The symbols representing factors are the same as those indicated in Table 1
- 3) **, $P < 0.01$.

加1時間放置の場合が最も高く、1 N 硫酸もしくは2 N リン酸添加16~20時間放置の場合に比べると有意に ($P < 0.05$) 大きかった。酪酸以外の各VFAについては、対内標相対値間の差異は認められなかった。しかし前述したように、放置時間を変えると酢酸、プロピオン酸、酪酸およびイソカプロン酸+カプロン酸の対内標相対値は影響を受け、これらの値は放置時間を長くすると、いずれも低下する傾向があることが示された。血漿中のVFAを硫酸酸性下で水蒸気蒸留法により回収すると、酢酸やプロピオン酸の回収率が他のVFAに比べて低くなる⁷⁾という結果が報告されており、この点については今後更に検討をすることが必要である。イソ吉草酸の対内標相対値は上記に述べたVFAと異なり、むしろ増加する傾向を示した。試料に除蛋白試薬を加えて遠沈するまでの時間は、従来30分³⁾から一晩¹²⁾まで様々であった。今回得られた結果は、16~20時間放置する場合よりも1時間放置の方が高い対内標相対値を示し、再現性も16~20時間放置とほぼ同様であるため、1時間放置後遠沈した方がすぐれていると考えられた。

反芻胃液中VFAのガスクロマトグラフ用サンプルの

処理試薬としては、今までメタリン酸³⁾、硫酸⁸⁾および硫酸・メタリン酸混液¹²⁾等が用いられてきた。第5表に示した結果から、これらの酸を添加して放置時間を1時間とした場合だけの結果を比較すると、4 N リン酸が他の試薬に比べて対内標相対値がわずかに低く、メタリン酸がわずかに高い傾向を示したが、使用した試薬の違いによる対内標相対値の有意な差異は認められなかった。

第5表に示した測定値について、くり返し分析の変動係数を変動係数で示すと、1 N 硫酸、2 N 硫酸、2 N リン酸および4 N リン酸を用い1時間放置した場合と2 N リン酸で16~20時間放置した場合は、各VFA測定の変動係数が最大でも10%前後で相対的に小さくすぐれていると考えられた。しかし蔭山ら⁴⁾、REMESY and DEMIGNE¹⁰⁾およびRYAN¹¹⁾は、サイレージ抽出液、血漿或いは反芻胃液のVFAを測定した場合、その変動係数がそれぞれ1.48~1.89%、1~3%および1~5%と述べており、今回の結果と比較すると変動も小さかった。これは、彼らがVFAを測定するに当たって酸性のサンプル処理試薬等を一切用いず、エタノール抽出液や試料を定量用ろ

Table 5. The values of volatile fatty acids relative to internal standard¹⁾ as affected by the methods of sample preparation (mean \pm S. D., n = 5)

Procedure ²⁾	C2 ³⁾	C3	iC4	C4	iC5	C5	C6 + iC6
A ₁ B ₁	75.9 \pm 2.3	39.1 \pm 1.3	7.5 \pm 0.6	46.9 \pm 4.4	7.9 \pm 0.7	7.6 \pm 0.7	0.8 \pm 0.0
A ₁ B ₂	70.1 \pm 4.6	37.5 \pm 1.1	7.2 \pm 0.6	41.0 \pm 0.7 ^b	9.0 \pm 1.0	7.7 \pm 0.9	1.0 \pm 0.3
A ₂ B ₁	74.2 \pm 2.5	38.0 \pm 1.0	7.5 \pm 0.3	46.4 \pm 2.9	8.0 \pm 0.4	8.0 \pm 0.5	0.7 \pm 0.1
A ₂ B ₂	71.9 \pm 5.6	37.9 \pm 1.4	7.2 \pm 1.2	42.5 \pm 1.8	8.2 \pm 1.7	7.1 \pm 1.7	0.8 \pm 0.1
A ₃ B ₁	77.4 \pm 6.7	39.9 \pm 3.0	7.8 \pm 1.6	49.7 \pm 5.6 ^{a4)}	8.5 \pm 1.0	8.1 \pm 1.3	1.8 \pm 2.4
A ₃ B ₂	71.3 \pm 3.9	37.4 \pm 1.5	7.4 \pm 0.5	42.6 \pm 3.0	8.5 \pm 0.7	7.9 \pm 0.6	0.8 \pm 0.1
A ₄ B ₁	76.0 \pm 5.6	39.1 \pm 2.3	6.7 \pm 0.5	47.4 \pm 6.1	7.7 \pm 0.6	7.2 \pm 1.6	0.8 \pm 0.2
A ₄ B ₂	73.2 \pm 0.7	37.4 \pm 1.3	7.1 \pm 0.9	42.0 \pm 2.4	8.6 \pm 1.1	8.0 \pm 1.0	0.8 \pm 0.1
A ₅ B ₁	75.3 \pm 4.3	38.9 \pm 1.6	7.0 \pm 0.6	47.6 \pm 5.2	8.1 \pm 0.5	7.6 \pm 0.6	1.0 \pm 0.4
A ₅ B ₂	71.6 \pm 3.8	37.3 \pm 1.6	7.2 \pm 0.5	41.1 \pm 0.9 ^b	8.5 \pm 0.9	8.0 \pm 0.7	0.8 \pm 0.0
A ₆ B ₁	72.5 \pm 3.3	37.3 \pm 1.7	6.9 \pm 0.5	45.4 \pm 4.7	7.9 \pm 0.4	7.5 \pm 0.3	0.7 \pm 0.0
A ₆ B ₂	72.5 \pm 3.9	38.4 \pm 1.1	7.5 \pm 1.3	42.2 \pm 2.5	8.3 \pm 0.7	7.9 \pm 0.7	0.8 \pm 0.0

1) The relative value of each acid was calculated as described in Table 1.

2) Factors A, B and C are the same as described in the footnote of Table 1.

The symbols representing the processes in sample preparation are as follows: A₁ (1 N sulfuric acid), A₂ (2 N sulfuric acid), A₃ (10% metaphosphoric acid), A₄ (25% metaphosphoric acid), A₅ (2 N orthophosphoric acid) and A₆ (4 N orthophosphoric acid); B₁ (1 hr) and B₂ (16~20 hr).

3) Volatile fatty acids are abbreviated to their carbon number, for example, iC4 for *iso* butyric acid.

4) Values with different superscripts in a same column were significantly different, $P < 0.05$.

紙でろ過するだけで直接ガスクロマトグラフィー分析を行ったり、或いは用いた試料の量が多かったためであろうと考えられた。

本実験では内部標準物質としてクロトン酸を用いた。内部標準物質としては、従来イソカブロン酸²⁾、ドデカン³⁾、2-メチル吉草酸⁷⁾、フェノール¹¹⁾、或いはクロトン酸¹²⁾等が用いられてきた。クロトン酸は今回用いたガスクロマトグラフィー条件下では、イソカブロン酸と保持時間がわずかに重複した。しかし、イソカブロン酸やカブロン酸は反芻胃液中では量的にほとんど問題とならないため、内部標準物質としてクロトン酸を用いたことは、各VFAの対内標相対値や再現性の検討に何ら支障はなかったと考えられた。今後実際の試料を測定するに当たっては、反芻胃液中の各VFAと内部標準物質の保持時間が重複しないことが望ましく、この点については更に検討することも必要であろう。

サンプル処理試薬として用いる酸性物質とカラムの充填剤との反応について、ある場合には酸性物質を注入するとガスクロマトグラフィーでのベースラインが上がって、分析が不可能になること¹¹⁾等も報告されている。本研究で用いた充填剤については、Tween 80³⁾やPEG 6000⁴⁾と同様に酸性物質の注入を繰り返すことによって起こる障害は認められなかった。しかし分析回数が200回程度以上になると、イソ酪酸の濃度が高いとそれがわずかにテーリングする場合が認められるようになった。最後に今回用いたガスクロマトグラフィー条件下で、反芻胃中のVFAを分析する方法を考えた場合最もすぐれた方法は、変動係数も相対的に小さく、かつ対内標相対値の高い、1N硫酸をサンプル処理試薬として用いて放置時間を1時間とした場合であると考えられた。変動係数を更に小さくするためには、試料の採取量を多くして、ガスクロマトグラフへの試料の注入量を2 μ lから3~4 μ l程度に大きくすることによって更に改善されるものと考えられた。

要 約

反芻胃液中の揮発性脂肪酸(VFA)を定量する方法について、サンプル処理試薬の種類と試薬添加後の放置時間を変え、ガスクロマトグラフィーでの内部標準物質のピーク面積に対する各VFAのピーク面積の相対値(対内標相対値)と再現性を比較検討した。対内標相対値は、添加試薬の種類によって有意な差異が認められなかったが、試薬添加後1時間放置した場合の結果のみを比較するとメタリン酸の場合に高い傾向が示された。サンプル処理試薬添加後の放置時間を変えると、対内標相

対値はプロピオン酸と酪酸で有意な影響を受け($P < 0.05 - P < 0.01$)、また酢酸やイソカブロン酸+カブロン酸についても差異のある傾向が示された($P < 0.1$)。各VFAの対内標相対値は、試料の調製法によってほとんどの場合差異は認められなかった。しかし、試薬添加後の放置時間を長くすると各VFAの対内標相対値は低下する傾向を示した。対内標相対値の変動係数は、1N硫酸、2N硫酸、2Nオルトリン酸或いは4Nオルトリン酸を添加して1時間放置した場合と2Nリン酸を用いて16~20時間放置した場合が他の方法に比べて小さかった。本試験の結果、VFA定量のための最もすぐれた試料調製法は、1N硫酸を用いて1時間放置した場合であると結論された。

謝 辞

VFA分析用充填剤を試供品としてご提供いただいたガスクロ工業(株)の外丸勝彦氏に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) ABE, M. and T. IRIKI, 1978, Effects of diet on the protozoa population in permeable continuous cultures of rumen contents, *Br. J. Nutr.*, **39**: 255-264.
- 2) BLOCK, H. -J. und F. WEISSBACH, 1982, Zur gaschromatographischen bestimmung flüchtiger fettsäuren in silagen mit innerem standard, *Forshung, Tierprod. Dummer. Bereich Tierernäh.*, **32**: 693-702.
- 3) ERWIN, E. S., G. J. MARCO and E. M. EMERY, 1961, Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography, *J. Dairy Sci.*, **44**: 1768-1771.
- 4) 藤山勝弘・森治夫・佐藤勝郎, 1973, ガスクロマトグラフィーによるサイレージの揮発性脂肪酸と乳酸の同時測定法, *日畜会報*, **44**: 465-469.
- 5) KIBE, K. and S. KAGURA, 1976, Distribution of volatile components of grass silage, *J. Sci. Fd. Agric.*, **27**: 726-732.
- 6) 条野文雄, 1962, 揮発性脂肪酸のガスクロマトグラフィーによる定量, *日本農化会誌* **36**: 181-183.
- 7) KURTZ, D. J., H. L. LEVY, W. PLOTKIN and Y. KISHIMOTO, 1971, A rapid method for the quantitative analysis of short-chain fatty acids in serum or plasma, *Clin. Chim. Acta*, **34**: 463-466.
- 8) 村上進・小林剛・板橋久雄, 1980, 牛の第一胃内発

- 酵ならびに乳成分に及ぼす第一胃内プロトゾアの影響, 日畜会北陸支部報, 41:20-29.
- 9) 大山嘉信, 1971, 揮発性脂肪酸 (VFA) の定量, 森本宏監修: 動物栄養試験法, 養賢堂, 東京, 416-418.
- 10) REMESY, C and C. DEMIGNE, 1974, Determination of volatile fatty acids in plasma after ethanolic extraction, *Biochem. J.*, 141:85-91.
- 11) RYAN, J. P., 1980, Determination of volatile fatty acids and some related compounds in ovine rumen fluid, urine, and blood plasma by gas-liquid chromatography, *Anal. Chem.*, 108:374-384.
- 12) 須藤恒二, 1981, ルーメンの検査 第3節6. VFA, 中村良一, 米村寿男, 須藤恒二共編: 牛の臨床検査法, 養賢堂, 東京, 6~39-6~42.
- 13) SUZUKI, M. and C. W. LUND, 1980, Improved gas-liquid chromatography for simultaneous determination of volatile fatty acids and lactic acid in silage, *J. Agric. Food. Chem.*, 28:1040-1041.
- 14) 吉田実, 1980, 畜産を中心とする実験計画法, 養賢堂, 東京, 84-85.
- 15) 吉田実, 1980, 畜産を中心とする実験計画法, 養賢堂, 東京, 256-270.