

乳牛ふん尿スラリーに含まれる低級脂肪酸の  
キャピラリーガスクロマトグラフによる  
簡易定量法

保井聖一\*・筒木 潔\*  
明石憲宗\*\*・木村義彰\*\*\*

キーワード 乳牛ふん尿, スラリー, 低級脂肪酸, キャピ  
ラリーガスクロマトグラフ, トリフルオロ酢酸

### 1. はじめに

乳牛ふん尿スラリー中には悪臭物質かつ作物生育阻害物質である低級脂肪酸が多く含まれる場合があり<sup>1)</sup>, これらを適正に評価する方法が求められている。また, 近年ではバイオガスプラントの建設が増加している<sup>2)</sup>が, 低級脂肪酸の濃度および組成はスラリーの嫌気発酵状態を判断するための重要な監視項目となっている<sup>3)</sup>。

低級脂肪酸の一つの定量方法として, ガスクロマトグラフ (GC) 分析法が挙げられる。カラムとしては, FFAP (free fatty acid phase), carbowax などの化学結合型ポリエチレングリコール (PEG) をコーティングしたキャピラリーGC カラムや, 同様の充填剤を充填したガラスカラムがよく用いられる。従来から低級脂肪酸の抽出液を直接ガスクロマトグラフに注入する方法が用いられているが, 分離率および回収率が低下する事例が認められている<sup>4)</sup>。このため, 水酸化ナトリウム溶液でアルカリ性にした抽出液を濃縮乾固した後, ギ酸に溶解して低級脂肪酸をプロトン型として揮発性を高め, 回収率および分離率を向上させる方法が開発されている<sup>5)</sup>。また, 試料中の低級脂肪酸を水酸化ストロンチウムで吸着した後, ギ酸により脱着し, ガスクロマトグラフに導入する方法も用いられている<sup>6)</sup>。キャリアーガスをギ酸で飽和させ, 抽出液を直接導入する方法も採用されている<sup>7)</sup>。

そこで, 著者らも, スラリー抽出液中の低級脂肪酸をギ酸でプロトン型にして, キャピラリーガスクロマトグラフィ法による定量を試みた。しかし, 結果および考察で触れるように, 溶媒ピークのテーリングおよびプロピオン

酸ピークの直前に異常なピークが出現することから, ギ酸を用いた定量を取りやめた。

その代替法として, 本研究では, トリフルオロ酢酸でスラリー抽出液中の低級脂肪酸をプロトン型とし, 低分子有機酸用に特殊処理された PEG 系液相をコーティングしたキャピラリーGC カラムを用いて定量する方法を検討した。その結果, 乳牛ふん尿スラリーに含まれる低級脂肪酸を簡便かつ高精度に定量できる方法を確立したので報告する。

### 2. 試料および方法

#### 1) 供試試料

供試スラリーは, 北海道内における好気発酵処理施設 (曝気処理施設) の発酵槽, 原料槽からそれぞれ採取した曝気処理液, 未処理液 2 点である。また, 嫌気発酵処理施設 (バイオガスプラント) の発酵槽, 原料槽からそれぞれ採取した消化液, 未処理液 2 点も分析に供した。

#### 2) 分析方法

スラリー 5 g を 50 mL 容ナルゲン管に採り, 蒸留水 20 mL を加え, 5 分間振とう後 12,000 rpm で 10 分間遠心分離した。上澄液 (抽出液) 2 mL を 50 mL メスフラスコに採り, 蒸留水で 25 倍に希釈した。ただし, 希釈倍率はスラリー中の低級脂肪酸濃度に応じて変更可能である。この希釈液 1 mL をポリ栓付 10 mL ガラススナップバイアルに採り, 冷蔵した (4°C) トリフルオロ酢酸 0.1 mL を加え, 密栓して混合し, 低級脂肪酸をプロトン型とした。その後, ただちに混合液 1  $\mu$ L をガスクロマトグラフに導入し, 酢酸, プロピオン酸, イソ酪酸, ノルマル酪酸, イソ吉草酸およびノルマル吉草酸をスプリットモードで定量した (図 1)。使用したキャピラリーGC カラムは Stabilwax-DA (Restek 社製) であり, ガスクロマトグラフの分析条件は表 1 のとおりとした。同表においてカラム温度を昇温させているが, これは高沸点成分を除去してカラムを再生するためであり, ノルマル吉草酸までの全ての低級脂肪酸は 145°C の定温時間内に溶出した。したがって保持時間の再現性は非常に高かった。標準試料は, 市販の標準試薬 (和光純薬製) を溶解して調整した 1 次標準液 (1,000 mg L<sup>-1</sup>) を蒸留水でさらに希釈し, 0~100 mg L<sup>-1</sup> の範囲で作成し, 同様に標準液 1 mL に 0.1 mL のトリフルオロ酢酸を添加した上でガスクロマトグラフに注入した。この検量線は, 上記の希釈倍率に従えば約 10,000 mg L<sup>-1</sup> までのスラリー中低級脂肪酸濃度に対応する。

#### 3) 内部標準法の検討

2-エチル酪酸を内部標準とする低級脂肪酸定量法を検討した。2-エチル酪酸 90.1 mg L<sup>-1</sup> に対し, 酢酸, プロピオン酸, イソ酪酸, ノルマル酪酸を 0~100 mg L<sup>-1</sup> (20 mg 間隔 6 段階) 含む水溶液を調整した。また, 2-エチル酪酸 36.2 mg L<sup>-1</sup> に対し, イソ吉草酸およびノルマル吉草酸を 0~50 mg L<sup>-1</sup> (10 mg 間隔 6 段階) 含む水溶液を調整した。これらの水溶液 1 mL に, 上記と同様, 0.1 mL のトリフルオロ酢酸を添加した上でただちにガスクロマトグラ

Seiichi Yasui, Kiyoshi Tsutsuki, Norimune Akashi and Yoshiaki Kimura: Simple Determination Method of Lower Volatile Fatty Acids in Cattle Manure Slurry by Capillary Gas Chromatography

\* 帯広畜産大学 (080-8555 帯広市稲田町西 2 線 11)

\*\* 株式会社ブローシャ (080-0048 帯広市西 18 条北 1 丁目 17)

\*\*\* 北海道立根釧農業試験場 (086-1100 北海道標津郡中標津町字中標津 1659)

2003 年 7 月 16 日 受付・受理

日本土壤肥料学雑誌 第 75 巻 第 1 号 p. 83~86 (2004)

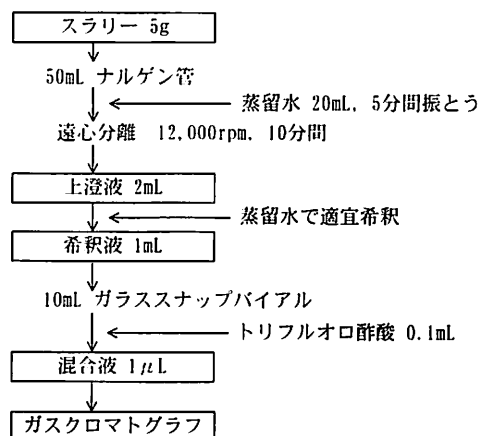


図1 低級脂肪酸の分析フロー

表1 分析条件

機器	島津ガスクロマトグラフ GC14A
カラム	Restek 社製 Stabilwax-DA 長さ 30 m, 内径 0.25 mm, 膜厚 0.25 μm
カラム温度	試料注入後 145°C で 11 min 保持し, その 後 40°C min <sup>-1</sup> で 250°C まで昇温, 250°C で 3 min 保持後冷却
注入部温度	200°C
検出器温度	250°C
キャリアーガス	ヘリウム 1.5 kg cm <sup>-2</sup>
メイクアップガス	窒素 0.3 kg cm <sup>-2</sup>
検出器の種類	水素炎イオン化検出器 (FID)
検出器用ガス	水素 0.5 kg cm <sup>-2</sup> , 空気 0.5 kg cm <sup>-2</sup>
注入部ガス流量	セプタムバージ流量 20 mL min <sup>-1</sup> スプリット流量 50 mL min <sup>-1</sup>
データ処理装置	島津クロマトバック CR-6A

フに注入した。

### 3. 結果および考察

#### 1) クロマトグラムおよび検量線

スラリー抽出液のクロマトグラムの例を図2に示した。標準試料と対比したところ、試料注入後約 1.6 min でトリフルオロ酢酸のピークが出現し、約 3.0 min 以降に低級脂肪酸ピークが順次検出された。この結果から、トリフルオロ酢酸によるテーリングの程度は小さく、各低級脂肪酸の分離は良好であることが明らかとなった。したがって、キャピラリーGCカラム Stabilwax-DA の使用、ならびにトリフルオロ酢酸の抽出液への添加は、乳牛ふん尿スラリーに含まれる低級脂肪酸の定量に適していると判断された。

表2に低級脂肪酸標準液の濃度とピーク面積との関係を示した。いずれの低級脂肪酸も、濃度 0~100 mg L<sup>-1</sup> の範囲で濃度とピーク面積がほぼ正比例し、決定係数  $R^2$  は 0.998 以上であった。このことから、検量線精度は極めて高いことが明らかとなった。また、添加回収試験を試みたところ、表3のように、いずれの低級脂肪酸も高い回収率が得られた。

参考として、好気発酵処理施設における未処理液の抽出

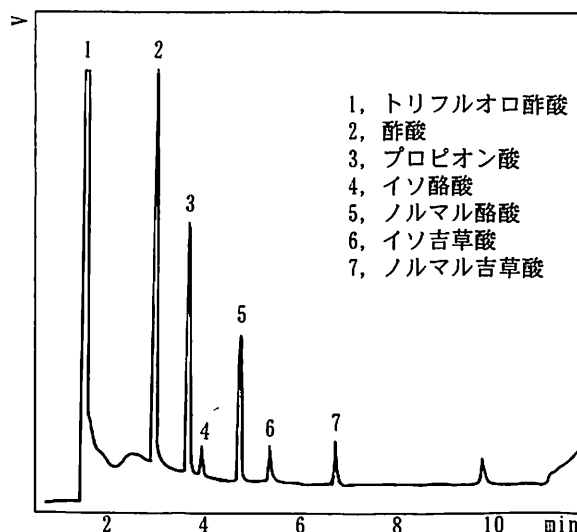


図2 スラリー抽出液のクロマトグラム例  
保持時間 1, 1.59 min ; 2, 3.02 min ; 3, 3.71 min ; 4, 3.99 min ; 5, 4.75 min ; 6, 5.39 min ; 7, 6.72 min.

表2 低級脂肪酸濃度とピーク面積との関係

低級脂肪酸	検量線	$R^2$	定量範囲 (mg L <sup>-1</sup> )	"
酢酸	$y=188x-21$	0.999	0~100	6
プロピオン酸	$y=287x-277$	0.999	0~100	6
イソ酪酸	$y=334x-118$	0.999	0~100	6
ノルマル酪酸	$y=380x-619$	0.999	0~100	6
イソ吉草酸	$y=496x-458$	0.999	0~100	6
ノルマル吉草酸	$y=534x-261$	0.998	0~100	6

$y, x$  はそれぞれピーク面積, 低級脂肪酸濃度を示す。

表3 添加回収試験による  
低級脂肪酸の回収率

低級脂肪酸	回収率 (%)
酢酸	98.5
プロピオン酸	96.4
イソ酪酸	98.5
ノルマル酪酸	99.5
イソ吉草酸	99.8
ノルマル吉草酸	99.8

抽出液中の各低級脂肪酸濃度が 40 mg L<sup>-1</sup> になるように添加, 回収した。

液について、本法および液体クロマトグラフ分析法<sup>9)</sup>により分析した結果を比較したところ、両分析方法の結果はほぼ一致した(表4)。

なお、同じ添加比率(10:1)でギ酸の使用も試みたが、試薬中の不純物質に由来するピークがプロピオン酸の直前に出現し、目的とする低級脂肪酸の定量を妨害した。また、溶媒ピークのテーリングも大きかった。さらに、スプリットレスモードでの分析も試みたが、本研究で使用したような、液相が 0.25 μm と薄くかつ細孔径のキャピラ

表4 本法と液体クロマトグラフ法との比較\* (mg L<sup>-1</sup>)

分析法	酢酸	プロ ピオン酸	イソ 酪酸	ノルマル 酪酸	イソ 吉草酸	ノルマル 吉草酸	合計
本法	3,464 (100)	811 (102)	nd (—)	512 (103)	95 (99)	19 (95)	4,901 (101)
液体クロマトグラフ分析法	3,455 (100)	798 (100)	nd (—)	498 (100)	96 (100)	20 (100)	4,867 (100)

\*好気性発酵処理施設における未処理液の事例。

nd は検出限界以下を示す。

( )内は液体クロマトグラフ分析法を100とした場合の比率を示す。

表5 乳牛ふん尿スラリーの低級脂肪酸濃度 (mg L<sup>-1</sup>)

スラリー	酢酸	プロ ピオン酸	イソ 酪酸	ノルマル 酪酸	イソ 吉草酸	ノルマル 吉草酸	合計
好気発酵処理施設							
曝気処理液	149	nd	nd	67	nd	nd	216
未処理液	3,464	811	nd	512	95	19	4,901
嫌気発酵処理施設							
消化液	650	nd	nd	29	nd	nd	679
未処理液	7,690	2,030	nd	1,407	323	70	11,520

nd は検出限界以下を示す。

表6 低級脂肪酸の内部標準法検量線とその精度

低級脂肪酸	検量線	R <sup>2</sup>	定量範囲 (mg L <sup>-1</sup> )	n
酢酸	$y=0.430x+0.0281$	0.998	0~100	6
プロピオン酸	$y=0.588x+0.0033$	0.999	0~100	6
イソ酪酸	$y=0.795x+0.0000$	0.999	0~100	6
ノルマル酪酸	$y=0.735x+0.0029$	0.999	0~100	6
イソ吉草酸	$y=0.787x-0.0051$	0.999	0~50	6
ノルマル吉草酸	$y=0.760x+0.0013$	0.999	0~50	6

y, x はそれぞれ2-エチル酪酸に対するピーク面積比, 低級脂肪酸濃度比を示す。

リーカラムにおいては、溶媒ピークのテーリング時間が長くなりすぎ、不適当であった。

### 2) 乳牛ふん尿スラリー中の低級脂肪酸定量結果

表5に乳牛ふん尿スラリーに含まれる低級脂肪酸の定量例を示した。好気発酵処理施設における曝気処理液、ならびに嫌気発酵処理施設における消化液の低級脂肪酸濃度は、未処理液に比べ著しく低かった。したがって、本法によって、スラリーの液肥としての品質、発酵状態を把握できると考えられた。

### 3) 内部標準法の検討結果

本研究ではふん尿スラリー中の低級脂肪酸を絶対検量線法で定量したが、ガスクロマトグラフィー法において、少量の試料(本研究では1μL)を正確にサンプリングするには熟練を要する。適当な内部標準を採用することによりこの問題は解決できる。最近Cruwysら<sup>9)</sup>は汚水中の低級脂肪酸の定量に2-エチル酪酸を内部標準物質として使用する方法を紹介している。ただし、Cruwysらの方法<sup>9)</sup>はヘッドスペースガスを分析する方法であり、特殊なヘッドスペースガス導入装置を必要とすること、ピーク面積が濃

度と比例しておらず複雑な計算式の適用が必要なことから本研究では試みなかった。

ここでは、トリフルオロ酢酸を用いた低級脂肪酸定量法における2-エチル酪酸の内部標準物質としての妥当性を検討した。その結果、いずれの低級脂肪酸も2-エチル酪酸とのピーク面積比が濃度比と非常に高い正の相関関係を示した(表6)。また2-エチル酪酸はノルマル吉草酸の溶離後、保持時間7.22 min付近に溶離した。供試した全てのスラリー試料においてこの保持時間付近にはピークが出現しなかったため、2-エチル酪酸はトリフルオロ酢酸を用いた定量法においても内部標準物質として適用可能と考えられる。

以上のように、低級脂肪酸をプロトン型にするための試薬としてトリフルオロ酢酸を抽出液に添加することにより、乳牛ふん尿スラリー中の低級脂肪酸を簡便かつ高精度に定量できることが明らかとなった。

謝辞 本研究の遂行にあたり、励ましおよびご助言を頂いた帯広畜産大学の近藤鍊三教授に厚く感謝する。

## 文 献

- 1) 小菅定雄・山本義弘：スラリーかんがい(スラリイゲーション)その理論と実際, p.240~248, 北海道開発局農業水産部, 札幌(1997)
- 2) 松田從三：北海道のバイオガスプラントの現状, p.103~109, 積雪寒冷地におけるバイオガスプラントの利用に関する国際シンポジウム資料, 北海道(2003)
- 3) Hills, D. J.: Methane gas production from dairy manure at high solids concentration. *Trans. ASAE*, **23**, 122~126 (1980)
- 4) Ortega, C., Lopez, R., Cacho, J. and Ferreira, V.: Fast analysis of important wine volatile compounds development and validation of a new method based on gas

- chromatographic-flame ionization detection analysis of dichloromethane microextracts. *J. Chromatogr. A*, **923**, 205~214 (2001)
- 5) Tsutsuki, K. and Ponnamperna, F. N.: Behavior of anaerobic decomposition products in submerged soils. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **33**, 13~33 (1987)
- 6) 古屋元宏・石田昌弘・北村雅彦・小宮山恆・安武純考: 畜産公害防止技術の開発—市販消臭資材の効果判定—, 山梨県畜産試験場研究報告, **41**, 71~78 (1994)
- 7) Hordijk, C. A., Burgers, I., Phylipsen, G. J. M. and Cappenberg, T. E.: Trace determination of lower volatile fatty acids in sediments by gas chromatography with chemically bonded FFAP columns. *J. Chromatogr. A*, **551**, 317~323 (1990)
- 8) 木村義彰・梅津一孝・高畑英彦: 貯留式メタン発酵における温度依存性(I) — 一回分試験による発酵温度特性の比較 —, 農業施設, **28**, 209~217 (1998)
- 9) Cruwys, J. A., Dinsdale, R. M., Hawkes, F. R. and Hawkes, D. L.: Development of a static headspace gas chromatographic procedure for the routine analysis of volatile fatty acids in wastewaters. *J. Chromatogr. A*, **945**, 195~209 (2002)
-