

十勝地区牛乳の HPLC による有機酸分析

島崎 敬一・島 真平・池 滝 孝・浜村 欣二・長谷川 富夫*

(受理: 1986年11月11日)

HPLC organic acid analysis in milk obtained from Tokachi area

Kei-ichi SHIMAZAKI, Shinpei SHIMA, Takashi IKETAKI,

Kinji HAMAMURA and Tomio HASEGAWA*

摘 要

十勝地区農家および本大学附属農場飼育ホルスタイン牛より採取した牛乳中の有機酸を定量した。試料乳はアセトニトリルによって除タンパク操作を行った後、強カチオン交換樹脂 TSKgel SCX を用いた高速液体クロマトグラフィーにより分析を行った。溶離液には 2 mM 磷酸を用い、流速を毎分 1.0 ml とした。

クロマトプロファイルから定量出来た有機酸は、オロチン酸、クエン酸、乳酸、コハク酸、酢酸、尿酸であり、それぞれの平均濃度と標準偏差 ($\mu\text{g/ml}$ 脱脂乳, 十勝地区試料について) は、 53.0 ± 15.4 , 976 ± 439 , 46.6 ± 25.2 , 790 ± 548 , 77.9 ± 14.8 , 21.0 ± 5.3 であった。その外にピルビン酸とギ酸が確認されたが、ほとんどの試料乳で含量は僅かであった。次いで、各有機酸含量について相関をみると、オロチン酸とコハク酸 ($r = -0.194$), オロチン酸と酢酸 ($r = 0.200$), 尿酸とコハク酸 ($r = 0.213$) が 5% 水準で有意な相関がみられ、乳酸とオロチン酸 ($r = 0.480$), 乳酸とコハク酸 ($r = -0.554$) が 1% 水準で有意であった。

牛乳には様々な有機酸が含まれている。これら各種有機酸の牛乳中の濃度は、個体による差を除くと、乳汁分泌組織の状態や搾乳後の牛乳の衛生状態に依存すると考えられる。この様に、特に乳質と関係があると考えられている有機酸には、クエン酸やピルビン酸があり^{1,4)}、さらにオロチン酸も乳質との関連が見い出されている^{5,6)}。そこで、十勝地区の農家および当大学附属農場より多数の個乳を採取し、体細胞数測定と有機酸分析を行った。体細胞数の測定は牛乳細胞自動計測装置によって、また各種有機酸の定量は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって行った。

実 験 方 法

1. 試料の前処理法

十勝各地区 (池田, 音更, 帯広, 川西, 土幌, 新得, 大正, 忠類, 本別) のホルスタイン牛から試料を得て (以下, 十勝地区試料と略す), 直ちに有機酸の分析を行わない場合には凍結保存した。また, 帯広畜産大学附属農場飼育ホルスタイン牛から月一度ずつ (1985年6月から9月迄) 朝乳を搾取し (以下, 大学農場試料と略す), 同様に処理した。HPLC による有機酸分析のための前処理は, 以下の様に行った。まず, 試料

帯広畜産大学 (帯広市稲田町)

* 十勝農業協同組合 (帯広市西3条南7丁目)

乳を遠心分離法により脱脂して得られた脱脂乳1容を蒸留水で2倍に希釈し、次いでアセトニトリルを加えて全体で6容とした。直ちに2分間振とうし、次いで遠心分離して沈殿物を除いた。上澄をポアサイズ0.45 μm のフィルター（ミリポア社製カラムガード HV（水系）またはゲルマンサイエンス社製エキクロディスク 3CR（非水系））で濾過し、HPLCによる有機酸分析用の試料とした。なお、この様にして調製した試料は、数時間内に分析に用いた。

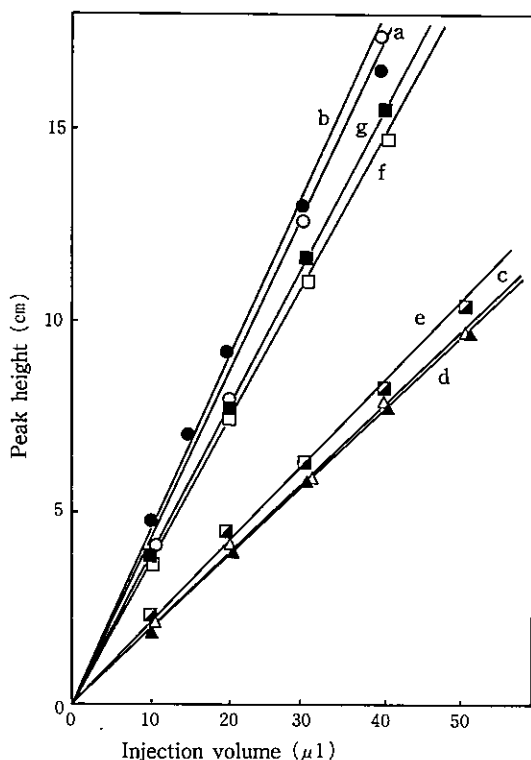


Fig. 1. Calibration curves for organic acids. The chromatography conditions are the same as described in Fig. 2. The injected volume of aqueous organic acid solution was changed from 10 to 50 μl . The concentrations of the organic acid solutions were as follows:

- a) orotic acid, 12.5 $\mu\text{g/ml}$ (○);
- b) citric acid, 1000 $\mu\text{g/ml}$ (●);
- c) lactic acid, 1000 $\mu\text{g/ml}$ (△);
- d) succinic acid, 1000 $\mu\text{g/ml}$ (▲);
- e) formic acid, 500 $\mu\text{g/ml}$ (◻);
- f) acetic acid, 2000 $\mu\text{g/ml}$ (□);
- g) uric acid, 50 $\mu\text{g/ml}$ (■).

2. 有機酸の分析

HPLCによる有機酸分析には、日立 635型高速液体クロマトグラフおよび有機酸分析用強カチオン交換樹脂 TSKgel SCX (7.8 ID×300 mm 東洋曹達工業 K. K. 製)を用いた。溶離液には2mM 磷酸溶液を用い、流速は毎分1.0 mlとし、溶出液は紫外部 210 nmの吸光度を測定した。1回の分析については通常35 μl の試料を注入し、約20分で分析を終了した。なお、クロマトグラフィーは室温で行った。クロマトプロフィール中の有機酸ピークの同定は、各有機酸標準液の個々のクロマトグラムから求めたピークの溶出位置と試料乳でのピーク位置とを比較して行った。さらに牛乳と個々の有機酸標準液を混合し、該当ピークの重なりを確かめた。試料乳中の有機酸含量は、各有機酸標準液について作成した検量線(図1)を用いて定量した。各有機酸の回収率は、濃度既知の有機酸標準液を一定量脱脂乳に混合し、次いで前処理を行って分析をし、得られた該当するピーク高と対照とを比較する事により算定した。さらに、有機酸定量のために適する内部標準物質の検討も行った。なお、各有機酸標準液調製に用いた試薬は、全て試薬特級である。

3. 体細胞数測定

前記の試料乳を搾取した当日に、あるいは翌日に体細胞数を測定した。体細胞数測定にはフォスエレクトリック社製のフォソマチックを用いた。

結果と考察

代表的な有機酸クロマトプロフィールを図2に示した。通常の乳汁の場合、有機酸プロフィール中に認められたピークは約12個で、その内オロチン酸、ピルビン酸、クエン酸、乳酸、コハク酸、ギ酸、酢酸、尿酸のピークが同定出来た。また、各ピーク高と試料注入量との間には、原点を通る直線性が認められた。しかし、前処理をした後、翌日まで冷蔵保存した試料についてクロマトグラフィーを行ってみると、試料注入量とクロマトグラフィーピーク高との間に直線性はみられても、原点を通らなくなる例が認められた。試料中の有機酸を定量するための内部標準物質も検討したが、適当な物質は見い出されず、外部標準を使用した検量線方式で行った。例えば酒石酸はクエン酸と、また、修酸はオロチン酸とかなり近接して溶出し、リンゴ酸ではピークが2個現れ、プロピオン酸のピークはアセトニトリルの溶出位置と重なり、酪酸やイソ酪酸は溶

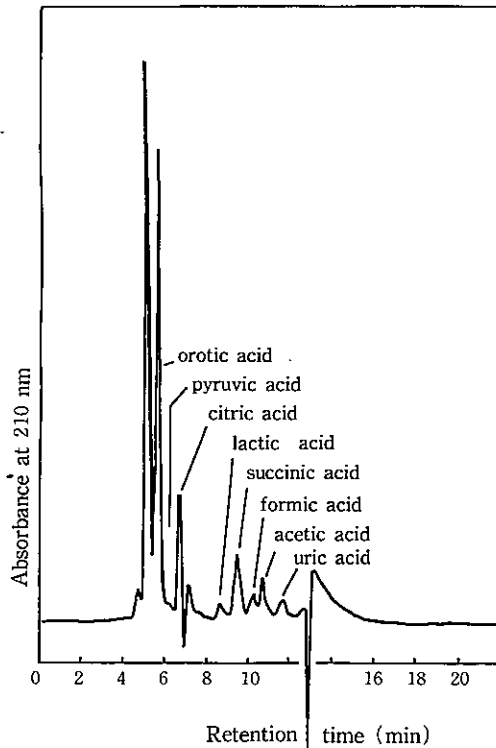


Fig. 2. Typical chromatograms of organic acids in milk using the following chromatographic conditions: TSKgel SCX column (7.8mm ID×30cm), 2mM phosphoric acid as mobile phase, flow rate of 1.0 ml/min, UV detection at 210nm (0.04 absorbance unit full scale), 35 μ l of sample injected.

出するまでに尿酸の倍近く時間がかかった。各有機酸の回収率は、オロチン酸で99.0%，クエン酸で94.8%，乳酸で94.1%，コハク酸で74.1%，ギ酸で89.4%，酢酸で79.4%，尿酸で84.7%であった。試料中の各有機酸の平均値、標準偏差および検体数等を表Iに示した。単位は脱脂乳1ml当たりの各有機酸 μ gである。ここに示したほとんどの有機酸の濃度は、今までに他の研究者により報告されている値とほぼ同じ範囲の値である⁷⁻¹³⁾。なお、ピルビン酸については、その含量が牛乳の衛生状態を反映するといわれている^{2,4)}が、今回調べたほとんど全ての試料について、ピルビン酸ピークが認められなかった。

各有機酸濃度の全体でのばらつきの程度に対する各

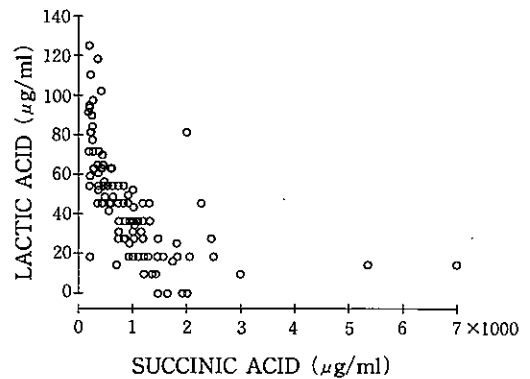
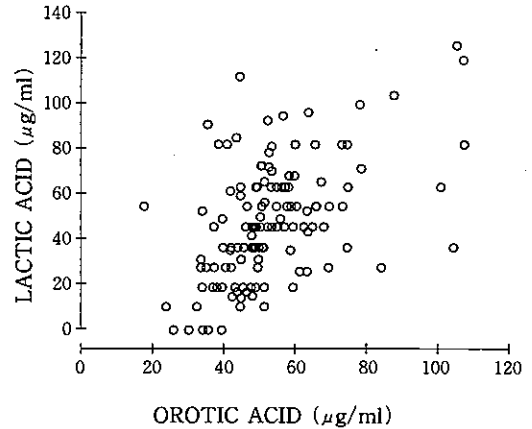


Fig. 3. Scattering diagrams for orotic acid vs. lactic acid (upper diagram) and succinic acid vs. lactic acid (lower diagram).

個体内での各月の値のばらつきの程度(反復率)を、大学農場試料乳について比較したところ、コハク酸(0.631)、オロチン酸(0.444)、乳酸(0.363)、クエン酸(0.319)、酢酸(0.112)、尿酸(0.104)、ギ酸(0.054)の順であった(括弧内は反復率)。なお、ここで用いた試料乳中には乳房炎乳と判定された検体は無かった。有機酸を何らかの指標とする場合には、ギ酸や尿酸よりもコハク酸やオロチン酸など反復率の値が大きい方が適しているといえる。なお、大学農場試料と十勝地区試料とで、乳酸、ギ酸、酢酸の含量について大きな違いがみられた。特にギ酸については、十勝地区試料142検体中、検出されたのは6検体であった。十勝地区試料の各有機酸含量について、体細胞数との相関を

Table I. Organic acid concentration in skim milk (mean value±standard deviation, µg/ml)

organic acids	university farm					Tokachi area	Hamakawa ^{b)} et al.	Marsili ^{c)} et al.
	June	July	August	September	total			
orotic acid	67.2±21.0	72.7±20.5	77.6±28.4	67.8±16.3	71.0±23.8 (0-178.5)	53.0±15.4 (17.5-108)	42-43	83.6
citric acid	1174±312	1304±312	1262±328	1164±221	1325±659 (565-6589)	976±439 (146-5648)	290	940
lactic acid	701±344	759±436	746±503	672±509	725±474 (0-3130)	46.6±25.2 (0-125.2)	186-254	<60
succinic acid	727±520	700±421	711±653	1034±814	806±654 (0-4346)	790±548 (182-3000)		
formic acid	120±41	225±97	203±93	200±62	201±87 (0-760)	325±203 ^{a)} (123-719)	94.7	<40
acetic acid	637±195	579±95	611±210	835±183	669±203 (0-1795)	77.9±14.8 (6.6-113.4)		<100
uric acid	12.3±6.5	17.2±6.1	14.3±6.7	13.5±5.8	14.8±6.5 (0-36.1)	21.0±5.3 (4.5-37.9)	<3	21.8
number of samples	18	62	61	57	198	142		

In the parenthesis, minimum and maximum values are described.

a) Mean value of 6 samples. In other samples, formic acid was not detected.

b) Reference 12.

c) Reference 13.

みたところ、オロチン酸で0.021, クエン酸で-0.135, 乳酸で0.106, コハク酸で-0.118, 酢酸で-0.164, 尿酸で0.095の相関係数が得られ、いずれも有意性はみられなかった。用いた試料乳の体細胞数は0.1~830万/mlの範囲であった。さらに各々の有機酸濃度間の相関をみたところ、5%水準で有意な相関を示す組合せはオロチン酸とコハク酸($r=-0.1942$), オロチン酸と酢酸($r=0.2058$), 尿酸とコハク酸($r=0.2131$)の3組で、1%水準で有意なものは乳酸とオロチン酸($r=0.4798$)および乳酸とコハク酸($r=-0.5541$)の2組であり、後者の2例の散布図を図3に示した。

今回の調査では、乳房炎乳の指標とされている体細胞数と有意な相関を示す有機酸は認められなかった。一方、乳酸とオロチン酸および乳酸とコハク酸の間では、それらの牛乳中の含量について、高い相関が見い出された。この事は各有機酸の乳腺細胞内での代謝および乳汁中への分泌について、何らかの関連がある事を示唆していると考えられる。オロチン酸についてはピリミジン生合成での中間生成物であり、牛や羊では乳腺細胞内で合成されると考えられている¹⁴⁾。しかし、他の有機酸について乳汁中への出現過程が明らかにさ

れている訳ではなく、今後の解明に期する所が大きい。

参 考 文 献

- 1) M. OSHIMA and H. FUSE, J. Dairy Res., 48: 387-392. 1981.
- 2) T. ZANDSTRA and T. DE VRIES, Neth. Milk Dairy J., 31: 109-119. 1977.
- 3) R. T. MARSHALL and C. C. HARMON, J. Food Protec., 41: 168-177. 1978.
- 4) G. F. SENYK, W. F. SHIPE, R. A. LEDFORD and P. WEINBERG, J. Dairy Sci., 67: 1660-1665. 1984.
- 5) 島崎敬一・佐々木正人・祐川金次郎, 日畜会報, 49: 859-865. 1978.
- 6) F. KIERMEIER and A. BUCKL, Z. Lebensmittel-Untersuch. Fors., 138: 284-294. 1968.
- 7) L. E. HALLENGER, J. W. LAAKSO and M. O. SCHULTZE, J. Biol. Chem., 202: 83-89. 1953.
- 8) T. TSUGO, M. IWADA and Y. SAITO, Proc. Int. Dairy Congr. XVII, B2: 245-252. 1966.

- 9) V. F. MÜNCHBERG, G. TSOMPANIDOU and R. LESKOVA, *Milchwissenschaft*, 26:210-214. 1971.
- 10) B. L. LARSON and H. M. HEGARTY, *J. Dairy Sci.*, 60: 1223-1229. 1977.
- 11) 長南隆夫・岡田迪徳, *日畜会報*. 55: 465-469. 1984.
- 12) 浜川弘茂・島崎敬一・祐川金次郎・加藤勲, *酪農科学食品の研究*. 32: A139-144. 1983.
- 13) R. T. MARSILI, H. OSTAPENKO, R. E. SIMMONS and D. E. GREEN, *J. Food Sci.*, 46: 52-57. 1981.
- 14) M. -H. CHEN and B. L. LARSON, *J. Dairy Sci.*, 54: 842-846. 1971.

Summary

Organic acid contents in milk were assayed by the method of high performance liquid chromatography. Acetonitril was used to remove proteins from milk. The column used was a strong cation exchange resin, TSKgel SCX (7.8mm ID×30cm), and the eluting solvent was 2 mM phosphoric acid. Flow rate was

1.0ml/min and the eluate was monitored by ultraviolet absorption at 210nm. Orotic acid, citric acid, lactic acid, succinic acid, formic acid, acetic acid, and uric acid were separated with good resolution in the chromatographic profiles. Milk samples were obtained from our university farm and farms around Tokachi county. The mean values and standard deviations of the organic acids were as follows: orotic acid ($53.0 \pm 15.4 \mu\text{g/ml}$), citric acid ($976 \pm 439 \mu\text{g/ml}$), lactic acid ($46.6 \pm 25.2 \mu\text{g/ml}$), succinic acid ($790 \pm 548 \mu\text{g/ml}$), acetic acid ($77.9 \pm 14.8 \mu\text{g/ml}$) and uric acid ($21.0 \pm 5.3 \mu\text{g/ml}$). Pyruvic acid was not observed in any of the samples. Formic acid was observed in only 6 of 142 samples. The mean value of the 6 samples was $328 \pm 203 \mu\text{g/ml}$.

High correlations were found between certain organic acids in milk. The correlation coefficient between lactic acid and orotic acid was 0.480 and that between lactic acid and succinic acid was -0.554.