

飼料中マグネシウム，カリウム，カルシウム含量の迅速測定法(2)

誌名	近畿中国四国農業研究センター研究報告
ISSN	13471244
著者名	西口,靖彦 大坂,隆志 安藤,貞 早坂,貴代史 池田,順一 堀,兼明 須賀,有子 福永,亜矢子
発行元	農業技術研究機構近畿中国四国農業研究センター
巻/号	6号
掲載ページ	p. 141-151
発行年月	2007年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



飼料中マグネシウム，カリウム，カルシウム含量の迅速測定法

2. 比色・比濁法による定量法

西口靖彦・大坂隆志*・安藤 貞・早坂貴代史**・池田順一***・堀 兼明****・
須賀有子****・福永亜矢子****

Key words : colorimetric, turbidimetric, determination, magnesium, potassium, calcium

目 次

I 緒 言	141	III 結 果	143
II 材料および方法	142	IV 考 察	145
1 供試飼料及び前処理法	142	V 摘 要	149
2 Mg, K, Ca定量法の検討	142	謝 辞	149
3 測定内・測定間誤差の解析	143	引用文献	149
4 回収率ならびに他元素による影響の調査	143	Summary	151
5 比色法と原子吸光法・炎光法との比較	143		

I 緒 言

筆者らは前報⁸⁾において、飼料中のマグネシウム (Mg), カリウム (K), カルシウム (Ca) 定量のための前処理方法として、希塩酸抽出法が乾式灰化法の代替となり得ること、希塩酸抽出法により前処理操作が公定法にくらべて、簡便化され得ることを報告した。しかしながら、定量方法は原子吸光法に依っていて、さらなる簡便化と分析時間の短縮のためには、原子吸光法に替わる測定法の適用が求められた。

「飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律施行規則の規定に基づく検定の方法」¹²⁾ では、3 ミネラル分析の公定法として原子吸光法が、Caについては原子吸光法と滴定法がそれぞれ指定されてい

る。原子吸光法は高感度で高精度であるが機材費が高価であること、滴定法は操作が煩雑で熟練を要することなど、簡便かつ迅速な方法としては必ずしも適していない。

臨床検査分野では、血清・血しょう中の Mg, Ca 測定法として、キレート発色剤を使用した比色法が用いられているほか、炎光法が一般化する以前は、比濁法による K 測定が行われていた。これらの方法は、手法が比較的簡便で、機材費も原子吸光度計より安価である。比色・比濁法によるミネラル測定範囲は、おおむね 0.1~数 10mg/dl と、原子吸光法と比較して低感度である。しかし、飼料中の供試試料調製方法の検討により、飼料中のミネラル定量に適用することが可能であると思われる。

本研究では、灰化法または希塩酸抽出法で前処理した飼料の Mg, K, Ca 含量を、Mg, Ca はキレ

(平成18年9月14日受付, 平成18年11月1日受理)

粗飼料多給型高品質牛肉研究チーム

*広島県立畜産技術センター

**現畜産草地研究所

***産学官連携推進センター推進リーダー

****環境保全型野菜研究チーム

ート発色剤を用いた比色法にて、Kは比濁法にて定量する方法を検討し、原子吸光法（Kについては炎光法）で得られた含量値と比較検討した。

II 材料および方法

1 供試飼料及び前処理法

飼料及び前処理法は既報⁸⁾の試料をそのまま用いた。すなわち、濃厚飼料原料・食品工業副産物・粗飼料72標品の乾物1g相当を、乾式または湿式灰化して残さを1% (w/w) 塩酸にて50mlに定容したもの、及び、50mlの1% HClを用いて振とう抽出したものである。これらを必要に応じて希釈して供試した。なお、MgとCa濃度を原子吸光法で定量する溶液には、他元素による測定値への影響を除くた

め、最終濃度0.2%のストロンチウムを添加した。各ミネラルの標準液は、市販の原子吸光分析用標準液（和光純薬、大阪）を1%塩酸で希釈し、比色法の標準液はMg：0～5mg/dl、K：0～50mg/dl、Ca：0～10mg/dlの各溶液を、原子吸光法・炎光法の標準液はMg：0～5ppm、K：0～50ppm、Ca：0～20ppmの各溶液を作製した。

2 Mg, K, Ca定量法の検討

Mg定量は、Mann and Yoe^{4, 5)}によるキシリジブルー（XB）法の渡辺・田中変法¹⁸⁾を、さらに改変して行った。改変項目は、手順の簡略化を目的に、マスキング試薬を含むXB溶液の1液法としたことである。溶液調製法ならびに測定方法は第1表に示した。

第1表 キシリジブルー1によるMg定量プロトコル

溶液類	
キシリジブルー溶液	
キシリジブルー1	0.05g
20%(w/w) "Triton X-100"	100ml
アッセイ溶液	
トリエタノールアミン	0.60g
硫酸ナトリウム(無水和物)	0.85g
GEDTA	0.008g
テトラエチレンペンタミン	0.49g
リン酸水素2ナトリウム(12水和物)	0.90g
キシリジブルー溶液	40ml
水酸化ナトリウム溶液でpH 11.8とし、 純水にて総量500mlとする	
方法	
1)	25μlの試料溶液または標準液(0～5mg/dl)を試験管に採る
2)	5mlのアッセイ溶液を加え、混和する
3)	室温で10分間放置し、520nmの吸光度を測定する

第2表 テトラフェニルホウ素によるK定量プロトコル

溶液類	
アルカリEDTA溶液	
EDTA-2ナトリウム	12g
1N 水酸化ナトリウム	70ml
純水を加えて1,000mlとする	
アルカリEDTA - ホルマリン溶液	
容積比で、アルカリEDTA溶液5に対し、 37%ホルマリン溶液1を加える(用時調製)	
テトラフェニルホウ素溶液	
テトラフェニルホウ素ナトリウム("Kalibor") 5g	
純水約50mlに溶解	
1N 水酸化ナトリウム溶液	1ml
純水を加えて100mlとする	
沈殿物が認められる場合は、JIS6号ろ紙にてろ過する	
方法	
1)	25μlの試料溶液または標準液(0～25mg/dl)を試験管に採る
2)	2.5mlのアルカリEDTA-ホルマリン溶液を加え、混和する
3)	0.5mlのテトラフェニルホウ素溶液を、ミキサーで混和しながら添加する
4)	室温で10分間放置し、420nmの吸光度を測定する
	テトラフェニルホウ素溶液の添加から吸光度測定まで、30分以内を実施する

K定量は、アルカリ EDTA 溶液中にて、テトラフェニルホウ素 (TPB) がKと不溶性化合物を形成する反応を利用した比濁法¹⁴⁾を改変して実施した。原法は、血清中K定量を目的としているためトリクロロ酢酸による除タンパク試料を用いて定量を実施しているが、今回は、灰化または抽出試料をそのまま使用した。定量方法の概要は第2表に示した。なお、ホルマリンは TPB とアンモニウムイオンとの反応防止のために添加するが、灰化試料を用いた場合は、ホルマリンの添加・非添加で濃度に差はなかった(結果は図示せず)ことから添加を省略し、希塩酸抽出試料定量時のみ添加した。

Ca 定量はオルトクレゾールフタレインコンプレキソン (OCPC) 法⁷⁾により行った。定量方法は第3表に示した。

いずれの定量法でも、反応液を光路長1cmのアクリル製セルに移して、分光光度計(日立製作所 U-1500, 東京)で吸光度を測定し、各ミネラルの標準直線より濃度を測定した。

XB, TPB-Na 塩, OCPC ならびに GEDTA は同仁化学(熊本)の製品を、他は和光純薬(大阪)の製品を用いた。

3 測定内・測定間誤差の解析

測定誤差の解析は、アルファルファ乾草、チモシー乾草ならびに大豆粕の3種飼料を、前述の条件で乾式灰化と定容した前処理溶液について実施した。測定内誤差と測定間誤差は、3種試料中のミネラルを6反復で測定した変動係数(CV%)で求めた。

4 回収率ならびに他元素による影響の調査

各ミネラル定量における回収率、ならびに他元素

による影響を調査することを目的に、アルファルファ乾草前処理溶液に、種々の元素の溶液を添加して濃度を調査した。添加元素の種類並びに濃度は、イオウ(S)とリン(P), Kがそれぞれ100mg/dl(飼料中含量として5%乾物中含量(以下、%DMと記述する)相当), MgとCa, アルミニウム(Al)がそれぞれ10mg/dl(同, 0.5%DM相当), 亜鉛(Zn)と鉄(Fe), 銅(Cu)がそれぞれ1mg/dl(同, 500mg/kgDM相当)である。なお、回収率調査を目的とした場合のMg, K, Ca添加量は、検量線に収まる範囲内とした。

5 比色法と原子吸光法・蛍光法との比較

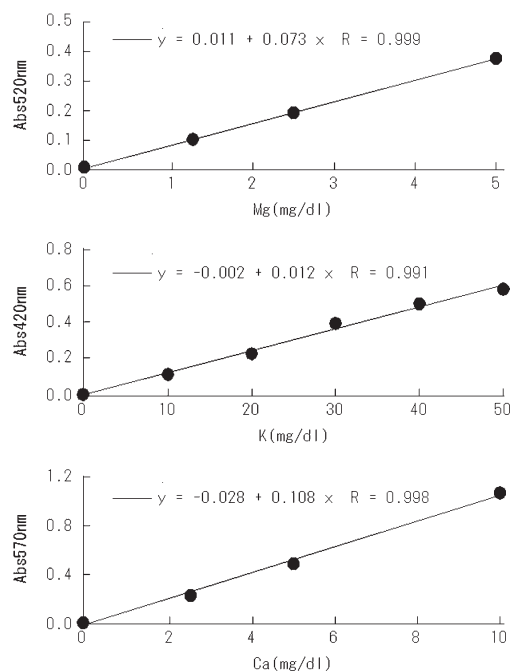
飼料72標品(Mgについては米ヌカを除く71標品)中の比色法で測定した各ミネラル濃度結果は、既報のMg, K, Caの定量結果と比較した。

Ⅲ 結 果

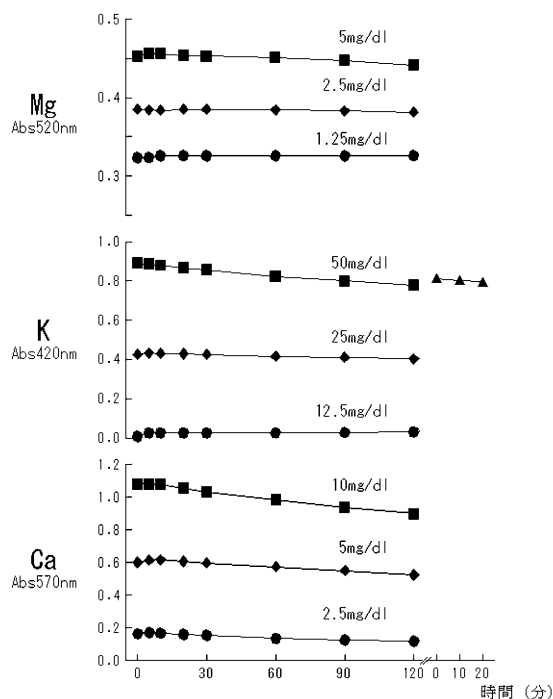
比色法によるMg, K, Caの検量線を第1図に示した。第1~3表に示した条件で分析した場合の、各ミネラルの検出最少濃度は、Mg:1.25mg/dl, K:6.25mg/dl, Ca:2.5mg/dlであった。これは、飼料乾物1g相当を前処理して50mlに定容した前処理溶液を供試試料とした場合、飼料中含量はMgが0.065%DM, Kが0.313%DM, Caが0.125%DM以上であれば測定可能な感度であった。この数値と、日本標準飼料成分表²⁾に示された各種飼料中ミネラル含量とを比較すると、穀実など一部の飼料中Ca含量が測定域を下回る以外は、ほとんどの粗飼料・濃厚飼料は、本条件で3ミネラルの測定が可能な測定域であった。

第3表 オルトクレゾールフタレインコンプレキソン (OCPC) による
Ca 定量プロトコル

反応溶液	
OCPC	40mg
ジェタノールアミン	250ml
ジェチルアミン	250ml
ポリビニルピロリドン	1.0g
8-ヒドロキシキノリン	1.25g
褐色ビンに保存する	
方法	
1)	50 μ lの試料溶液または標準液(0~10mg/dl)を試験管に採る
2)	2.5mlの純水を加え、混和する
3)	0.5mlの反応溶液を加え、混和する
4)	室温で10分間放置し、570nmの吸光度を測定する



第1図 マグネシウム (Mg), カリウム (K), カルシウム (Ca) の検量線



第2図 反応液混和後の吸光度の推移

Mg の呈色反応は、試薬混合10分後以降120分後まで安定していて、吸光度の変化は認められなかった (第2図上)。K の反応は、25mg/dl以下の低濃度域で安定していたが、50mg/dlでは時間経過に伴って吸光度の低下が認められ、120分後では約0.1単位低下した。120分経過後に再度溶液をかくはんして、吸光度を測定したが、吸光度は回復しなかった (第2図中)。そのため、K の測定域は吸光度の変動が小さい25mg/dl以下が妥当であると思われる。Ca の呈色は、時間経過に伴って吸光度の低下が認められたが、濃度による退色傾向の差は小さく、そのため120分後の測定値から作成した検量線であっても、Ca 定量に適用可能であった (第2図下)。しかし、多数の試料を同時に測定する場合は、試薬添加から吸光度測定までの時間を、一定とする等が必要であると考えられた。

アルファルファ乾草、チモシー乾草ならびに大豆粕を検定試料として測定した、測定内誤差ならびに測定間誤差 (単位は変動係数) は、Mg がそれぞれ0.4~3.9%と1.8~3.5%、K が10.4~26.6%と21.3~31.5%、Ca が0.5~4.9%と4.5~5.6%であった。Mg と Ca の測定精度は十分に高かったがKは低かった。

第4表に、回収率及び他元素による阻害の程度を示した。なお、Mg 測定時のSとPは、測定系にNa₂SO₄, NaH₂PO₄溶液が含まれていること、K測定時のAlは化合物(KAl(SO₄)₂)中にKを含むことから省略した。3定量法とも各ミネラルに特異的で、特に同族元素であるMgとCa、KとNaの相互作用は認められなかった。他の金属イオン並びに陰イオンは、通常考えられる濃度の範囲内であれば各ミネラル測定値への影響は観察されなかった。

供試試料72標品は、乾式灰化法および希塩酸抽出法にて前処理し、加えてイタリアンライグラス乾草、アルファルファ乾草、コーンサイレージ、大豆粕、トウモロコシの5標品は湿式灰化法での前処理も実施した。これらの試料について、各ミネラル含量を原子吸光法 (Kについては炎光法) と比色法とで測定した結果の比較を、第3~5図に示した。ただし、米ヌカのMg含量は、他の71標品と比較すると約2%DMと著しく高いことから除外した。Mgは、一部の飼料を希塩酸抽出処理した場合に、原子吸光法と比色法で差のある試料が認められたが、概ね3前処理法のいずれを用いても、2測定法で得られた値は一致していた。Kは、希塩酸抽出試料で濃度を過小評価するものが認められたが、灰化試料では差

第4表 Mg・K・Ca 測定に対する他元素の影響

測定元素	添加物	添加量 ¹⁾ (mg/dℓ)	測定値 (mg/dℓ)	Δ (mg/dℓ)
Mg	無添加		4.78 ± 0.10 ²⁾	
	Mg (MgCl ₂)	5	9.76 ± 0.30	+ 4.98
	K (KCl)	100	4.72 ± 0.29	- 0.06
	Ca (CaCl ₂)	10	4.93 ± 0.29	+ 0.15
	Al (KAl(SO ₄) ₂)	10	4.62 ± 0.18	- 0.16
	S (Na ₂ SO ₄)		実施せず	
	P (NaH ₂ PO ₄)		実施せず	
	Zn (Zn(NO ₃) ₂)	1	4.55 ± 0.10	- 0.23
	Fe (FeCl ₃)	1	4.80 ± 0.35	+ 0.02
	Cu (CuCl ₂)	1	4.73 ± 0.25	- 0.05
K	無添加		31.9 ± 5.8	
	K	10	43.7 ± 6.2	+11.8
	Mg	10	29.9 ± 7.2	- 2.0
	Ca	10	28.9 ± 5.3	- 3.0
	Al		実施せず	
	S	100	30.5 ± 3.2	- 1.4
	P	100	30.4 ± 2.7	- 1.5
	Zn	1	30.3 ± 3.4	- 1.6
	Fe	1	34.1 ± 3.4	+ 2.2
	Cu	1	32.5 ± 7.5	+ 0.6
Ca	無添加		27.7 ± 0.6	
	Ca	10	38.0 ± 0.7	+10.3
	Mg	10	27.6 ± 0.3	- 0.1
	K	100	28.0 ± 0.6	+ 0.3
	Al	10	27.8 ± 0.4	+ 0.1
	S	100	27.9 ± 0.3	+ 0.2
	P	100	27.9 ± 1.4	+ 0.2
	Zn	1	27.9 ± 0.3	+ 0.2
	Fe	1	28.2 ± 0.3	+ 0.5
	Cu	1	27.8 ± 0.3	+ 0.1

1) 元素としての添加量

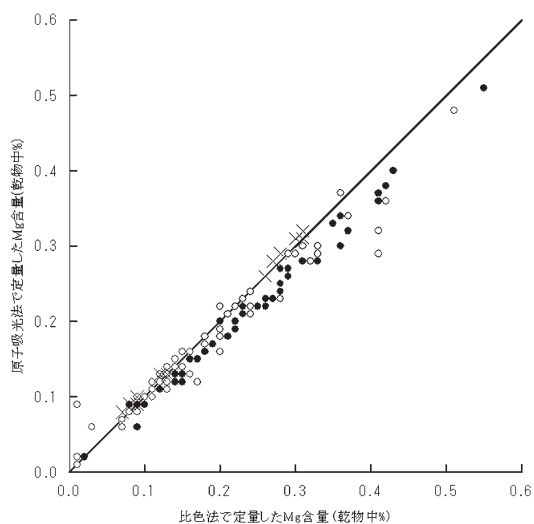
2) 平均±標準偏差, n = 3

は認められなかった。Ca はいずれの前処理法を用いた場合でも、比色法での測定値と原子吸光法での値とが一致した。

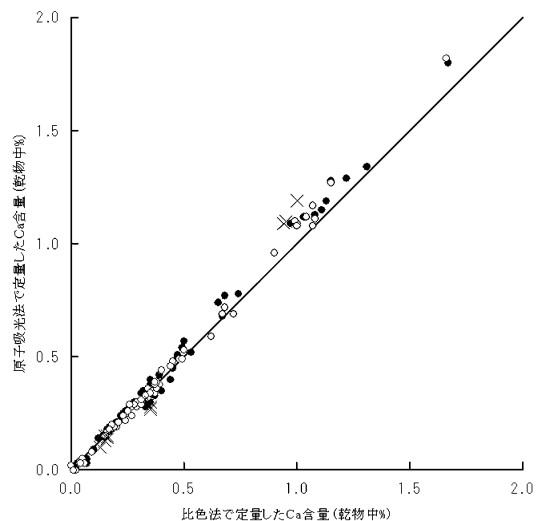
IV 考 察

健全な畜産物の低コスト生産と、資源循環型社会の構築を目的として、食品工業副産物や都市ちゅう芥等の飼料化、遊休農地等を利用した自給粗飼料生産等が推進されている。これらの飼料資源は、飼料成分の変動が比較的大きいことから、栄養成分分析の精密化が求められる。加えて、水分含量が高い飼料資源は、保存性に欠ける場合が多いことから、迅

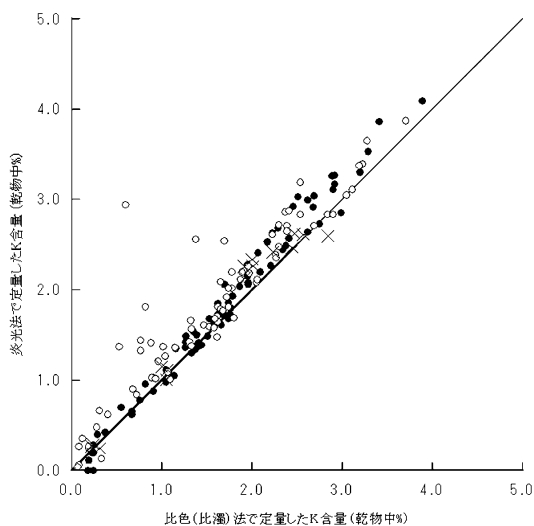
速な成分分析が求められる。近赤外線分析計は、有機成分の非破壊的多項目迅速分析が可能であり、近赤外線分析法により飼料の栄養成分分析が実施されている。飼料中ミネラル分析についても、この分析法の適用が試みられているが、十分な感度と精度を得るには至っていない。そのため、ミネラル分析は原子吸光光度法に依ることが多かった。近年、マクロミネラルバランスの悪化、特にたい肥の長期連用や過剰還元起因する、自給粗飼料のK過剰が問題となっていて、低カルシウム症（「乳熱」）や低マグネシウム症（「グラスタニー」）等の発生の危険性が高まっている。「グラスタニー比：K ÷ (Mg + Ca)」は、ミネラルバランスの簡便かつ有効な指標



第3図 原子吸光法と比色法で測定した Mg 含量の比較
 ●：乾式灰化法 (n=71)
 ○：希塩酸抽出法 (n=71)
 ×：湿式分解法 (n=15) による前処理法を示す。
 直線は、 $y = x$ を表す。



第5図 原子吸光法と比色法で測定した Ca 含量の比較
 ●：乾式灰化法 (n=72)
 ○：希塩酸抽出法 (n=72)
 ×：湿式分解法 (n=15) による前処理法を示す。
 直線は、 $y = x$ を表す。



第4図 炎光法と比色(比濁)法で測定したK含量の比較
 ●：乾式灰化法 (n=71)
 ○：希塩酸抽出法 (n=71)
 ×：湿式分解法 (n=15) による前処理法を示す。
 直線は、 $y = x$ を表す。

であり、この3ミネラルの迅速で簡便な測定方法が確立すれば、飼養管理の高度化につながり、ミネラルバランスに起因する疾病の防止効果が期待される。

ミネラル含量は、飼料を灰化または抽出によって前処理した溶液を用いて、原子吸光度計や炎光光

度計等による機器分析法や、滴定法などによって定量される¹²⁾。原子吸光法は高感度であり、ランプと波長の選択により、多種の元素が測定可能であること等の利点がある反面、機器が高価なことから、高温を得るために使用する可燃性ガスの取り扱いに注意を要すること、マクロミネラル定量には感度が高すぎるために希釈操作を伴う場合があること、等の欠点がある。一方、滴定法は比較的ミネラル含量の高い場合に用いられ、高価な機器は使用しないが、操作は煩雑で熟練を要する。

簡便かつ迅速な検査が求められる臨床検査分野においては、血清・血しょう中ミネラル分析として、比色法が原子吸光法に取って代わられている。比色法(比濁法を含む)の長所として、機器が比較的安価で取り扱いが容易であること、呈色反応であるため概算値を目視で判定できること等が挙げられる。このことから、飼料中ミネラル定量への比色法の導入により、迅速化・簡便化が期待できる。

比色法による Mg, K, Ca 測定感度は、概ね mg/dl 単位であり、原子吸光法 (mg/l ~ μg/l) より低い。しかし、これらミネラルの飼料中含量は 0.01 ~ 数% と比較的高濃度であることから、供試試料重量や液量を調整することにより、比色法での測定は可能と思われるが、その検討はあまり行われていな

かった。

XB は、アルカリ溶液中で Mg と結合すると 520nm に極大吸光を持つキレート化合物を生成するが、Mg 以外の 2 価金属イオンも同一条件で、480~530nm に極大吸光を持つ化合物を生成する。従って、Mg を特異的に測定する場合には、共存元素による妨害を除去することが必要である。生物試料においては、一般に多量の Ca が共存するため影響は大きい。Mann and Yoe⁴⁾ はイオン交換法で Ca を除去する方法を報告しているほか、Ca 飽和法¹⁾ や溶媒抽出法⁶⁾ 等の前操作が検討されたが、いずれも操作が煩雑であった。

渡辺と田中¹⁸⁾ は、Mg 以外の元素の影響を、4 種のマスキング剤（トリエタノールアミン、GEDTA、テトラエチレンペンタミン、硫酸ナトリウム）を添加することによって除き、前操作が不要な直接定量法を確立した。この方法は、メスフラスコに試料溶液、各マスキング剤溶液、及び XB 溶液を混合して定容後に、2 波長の吸光度を測定するもので、試料溶液の添加量を増加させることにより、数10ppm~数10ppb の高感度 Mg 定量が可能である。それに対し、飼料中の Mg 定量を目的とする場合、その範囲は概ね 0.05~0.5%DM である²⁾。乳肉用牛の要求量である 0.23%DM^{9, 10)} を測定する場合、飼料 1 g 乾物を灰化または抽出して 50ml に定容すれば、4.6mg/dl に相当する。従って、今回は定量域を 1~5 mg/dl と設定し、操作の簡略化を目的として、一定量の試料溶液とマスキング剤を含んだ XB 溶液とを混合して、1 波長吸光度を測定する方法に改変した。その結果、前処理液 25 μ l を供試して、Mg 1.25mg/dl、前出の条件で 0.065%DM 以上であれば定量が可能となり、Mg への特異性を維持しながら迅速化と簡便化が図られた。

TPB は、Na を除くアルカリ金属、アンモニウムイオン、ならびに重金属類と定量的に結合し、水不溶性沈殿物を形成する。この反応を利用して K などの分離に用いられる^{15, 16, 17)}。TPB-K 結合物は、酸性溶液中では粒子の粗大な沈降性物質となるが、アルカリ溶液中ではコロイドとなることから、比色（比濁）法による K 定量に用いられる。動植物体に含まれる、Na・K 以外のアルカリ金属は微量であることから、K 測定への影響はほとんど無視できる。

一方、アンモニウムイオンはホルマリンと反応させ、TPB 非結合物質であるヘキサメチレンテトラミンに変換することにより、影響を除くことができる¹⁴⁾。なお、アルカリ溶液中では、アルカリ土類金属などの陽イオンの多くは、水和物として沈降するため、EDTA の添加により沈降を防止している。

Sunderman Jr. と Sunderman¹⁴⁾ は、血清 K の定量法として、トリクロロ酢酸による除タンパク処理した試料溶液と、TPB のアルカリ溶液（EDTA 及びホルマリンを含む）とを混和して、比濁法にて測定する方法を報告した。今回の TPB 法は彼らの定量法に準拠しているが、トリクロロ酢酸による除タンパク処理は実施しなかった。加えて、灰化法で前処理した試料を定量する場合には、溶液中にアンモニウムイオンが存在しないことから、ホルマリンの添加を省略して、操作の簡便化を図った。

TPB-K 結合物は、時間経過に伴い沈降して、溶液の吸光度が低下する。特に 50mg/dl では 120 分後で約 0.1 単位の吸光度低下が認められ、反応液を再度かくはんして懸濁させても、吸光度の回復は認められなかった。このことは、溶液中に分散している TPB-K 結合物が沈降するだけでなく、時間経過に従い粒子が凝集して粗大化することを示している。

TPB-K 結合物が、コロイド物質であることに起因するこれらの反応は、保護コロイド物質の添加によって遅延させることができる。Sunderman Jr. と S-underman¹⁴⁾ は、インドゴム抽出物を添加して、コロイドの安定化を図っている。国内でインドゴムは入手困難であるため、代替としてゼラチンを用いて安定性を検討した。その結果、最終濃度 0.01% のゼラチン添加により、50mg/dl 濃度であっても 90 分後まで吸光度は安定したが、吸光度が無添加時と比較して約 30% 低下し、測定精度の悪化が認められた（結果は図示せず）。そのため、今回の測定条件は、保護コロイド物質の添加は行わず、測定までの時間を TPB 添加から 30 分以内とすること¹⁴⁾、定量域を経時的な吸光度低下傾向が小さい 25mg/dl 以下（第 2 図中）とすることとした。

今回の結果で、灰化試料を用いた場合は比色法の測定値は、炎光法との値とよく一致したが、希塩酸抽出試料を用いた場合、濃度を過少に評価する傾向が認められた。これは飼料、特に濃厚飼料中のタン

パク質や糖質の一部が抽出液に溶解し、保護コロイド作用によりTPB-K化合物の析出を抑制するためと考えられた。これは、前出のゼラチン添加試験で、最終濃度0.5%の添加すれば、K濃度が50mg/dlであっても沈降物が生成しなかった（結果は図示せず）ことから支持される。従って、タンパク質・糖質含量の高い飼料のK定量では、前処理法として灰化法を用いるか、共存物質による測定値への影響を回避できる標準添加法による定量が望ましい。しかし、標準添加法は操作と濃度計算が煩雑であり、簡便に実施できる方法ではない。

実際的な方法としては、測定対象となる飼料と同種類で、K含量既知の飼料を対照飼料とし、希塩酸抽出法による前処理からTPB法による定量までを、測定飼料と並行して実施し、次式によりK含量を測定する。

$$\text{測定飼料のK含量} = \frac{\text{測定飼料の吸光度}}{\text{対照飼料の吸光度}} \times \frac{\text{対照飼料の供試重量}}{\text{測定飼料の供試重量}} \times \text{対照飼料のK含量}$$

OCPCは、アルカリ溶液中でアルカリ土類金属と結合して、570nmに極大吸光を持つ紫紅色のキレート化合物を生成する。MgもCaと同条件でOCPCと結合するため、Mg共存下でCaを特異的に測定するには、Mgを除去する必要がある。Morin⁷⁾は、8-キノリノールを添加してMgをマスクすることにより、Caを特異的に測定する方法を確立した。今回のCa定量は、この方法をそのまま用いて実施した。

乳肉用牛のCa要求量は、乾物当たり0.3~1%程度であるから^{9, 10)}、0.3%DMは乾物1gを前処理して50mlとした場合に6mg/dlとなる。従って、今回は10mg/dlまでの定量を試みた結果、Caが2.5mg/dl以上で定量が可能であった。これを、上記の前処理条件に適用した場合、飼料中に0.125%DM以上であることを示す。この定量域を、日本標準飼料成分表²⁾のCa含量値と比較すると、粗飼料はほぼこの範囲内であったが、穀実（加工品を含む）のCa含量は測定範囲を下回った。しかし、穀実のCa含量はトウモロコシ0.03%DM、大麦0.07%DMなど、

Ca要求量^{9, 10)}の約1/10であり、Ca含量測定の意義は小さく、実用上の問題とはならない。

今回の実験で、OCPC添加後に時間経過に伴い、吸光度が低下する傾向が認められた。一般に、キレートの発色性は溶媒のpHに依存し、XBとOCPCの吸光度はともにpH11~12で極大となることから、今回の2法は概ねそのpH範囲内で実施している。溶液がアルカリ性を示す場合、長時間の放置により、空気中の二酸化炭素を吸収してpHが低下して吸光度が減少しやすい。今回、XB法とOCPC法との間に吸光度の推移に差が認められた原因は、XB反応液に含まれるリン酸緩衝液のpKa値（25℃）は12.38¹¹⁾でありイオン濃度が高いのに対し、OCPC反応液に含まれるジエタノールアミンのpKa値が8.95¹¹⁾と、pH11付近における緩衝能が低く、イオン濃度も低いいため、溶液のpH低下が大きかったことによると考えられた。そのため、多検体を連続してOCPC法にて定量する場合、OCPC溶液添加から吸光度測定までの時間を統一するか、緩衝剤の濃度を高める必要がある。

3ミネラル定量法の精度は、キレート発色反応を利用するMgとCaが、測定内誤差と測定間誤差がともに変動係数5%以下と高精度であった。既知量の同一元素を添加した場合の回収率はほぼ100%であり、他元素による妨害は認められず、感度・精度・特異性とも良好な結果を示した。

一方、K測定は特異性は高かったものの、測定内誤差が最大27%、測定間誤差が32%（いずれも変動係数）と、他2元素より精度が低かった。特に、前処理方法として希塩酸抽出法で前処理した試料溶液の場合に、精度の低下が大きかった。これは、K測定が不溶性のTPB-K化合物による懸濁反応を利用していることから、希塩酸抽出法で前処理した試料溶液に共存する有機物の影響や、測定時の液温により、TPB-K化合物の形成が不安定になりやすいためと考えられた。しかし、乳肉用牛飼料からのK供給不足はまれであり、むしろ3%DMを超える供給過剰を防ぐことが求められている。そのため、TPB法はK含量の迅速診断や原子吸光法のための概算など、用途を限定した利用が考えられる。

Mg, Caは重要な血液検査項目であるため、XB法ならびにOCPC法による測定キットが市販され

ている。従って、これらのキットを、必要に応じてプロトコルを一部改変すれば、飼料中の Mg, Ca 定量に適用可能と思われる。さらに多数の前処理液中の濃度を定量する場合、自動分析装置を使用すれば迅速化と自動化することが期待される。さらに、多検体中の複数のミネラル濃度を、連続的に自動分析することが可能なフローインジェクション装置が開発されている³⁾。これらの装置は高価であるが、導入すれば飼料中ミネラル含量測定 of 迅速化と省力化に寄与すると思われる。

今回の比色法は、機材費の削減や手法の簡略化などの他に、濃度を呈色として目視で判定できる利点がある。そのため、高精度の測定を要しない場合においては、希塩酸抽出法と組み合わせることにより、3 ミネラルの迅速定量が可能である。この方法を利用すれば、例えば飼料配合時に設定したミネラル濃度の確認、自給粗飼料や食品工業副産物等の給与可否判断などが、迅速に判別することが可能となった。これらのミネラル定量法と、近赤外線分析による栄養分析、および代謝プロファイルテスト等を組み合わせることにより、飼養管理や疾病防止等への貢献が期待できる。

今回の実験で用いた供試飼料は、飼料分析の常法に則り、60℃で48時間の風乾後に、1 mmメッシュを通過するまで粉碎したものを、材料として用いている。今後、フィールドにおいてミネラルを迅速定量するためには、乾燥・粉碎の迅速化等について、検討が必要である。

V 摘 要

飼料中のマグネシウム (Mg)・カリウム (K)・カルシウム (Ca) の定量法である原子吸光法及び炎光法の代替として、比色 (比濁) 法の適用可否を調査した。Mg はキレート発色剤であるキシリジルブルー (XB) を、Ca はキレート発色剤であるオルトクレゾールフタレインコンプレキソン (OCPC) を、それぞれ用いる比色法により測定した。K はテトラフェニルホウ素 (TPB) を用いる比濁法により測定した。その結果、Mg : 1.25mg/dl, K : 6.25mg/dl, Ca : 2.5mg/dl 以上の濃度であれば、定量が可能であった。これは、飼料乾物 1 g 相当を前処理して、

50ml に定容した前処理溶液を供試した場合、Mg が 0.065%DM, K が 0.313%DM, Ca が 0.125%DM 以上に相当した。

XB, OCPC 法は、それぞれのミネラルに特異的であり、他元素の影響を受けなかったが、TPB 法は他の方法と比較し、他元素の影響を受けた。

XB 法と OCPC 法は、試料溶液の前処理方法が乾式灰化法と希塩酸抽出法のいずれであっても、原子吸光法と同等の濃度となった。TPB 法は、乾式灰化法で前処理した場合は、炎光法と同等の結果が得られたが、希塩酸抽出法で前処理すると、炎光法より低い値となった。従って、飼料中の K 含量を、希塩酸抽出法と TPB 法とにより測定する場合は、K 含量既知の対照飼料を同時に抽出と定量を行うことが、必要と思われた。

謝 辞

一連の実験遂行にあたり、中村範子氏に多大なる協力をいただいたことを、感謝いたします。

引用文献

- 1) Abbey S and Maxwell JA. 1962. Photometric determination of small amounts of magnesium in rocks. *Analytica Chimica Acta* 27 : 241 - 247.
- 2) 独立行政法人農業技術研究機構. 2001. 日本標準飼料成分表 (2001年版) 独立行政法人農業技術研究機構, 茨城.
- 3) Liu JF, Feng YD and Jiang GB. 2001. Identical flow injection spectrophotometric manifold for determination of protein, phosphorus, calcium, chloride, copper, manganese, iron, and zinc in feeds or premixes. *Journal of AOAC International* 84 : 1179 - 1186.
- 4) Mann CK. and Yoe JH. 1956. Spectrophotometric-determination of magnesium with sodium 1-a-zo-2-hydroxy-3-(2,4 dimethylcarboxanilido)naphthalene-1'- (2-hydroxybenzene-5-sulfonate). *Analytical Chemistry* 28 : 202 - 205.
- 5) Mann CK. and Yoe JH. 1957. Spectrophoto-

- metric-determination of magnesium with 1-azo-2-hydroxy-3-(2,4 dimethylcarboxanilido)-naphthalene-1'-(2-hydroxybenzene). *Analytica Chimica Acta* 16 : 155 - 160.
- 6) Maurice MJ. 1959. The determination of magnesium in the presence of large amounts of zinc: A spectrophotometric method. *Analytica Chimica Acta* 20 : 181 - 186.
- 7) Morin LG. 1974 Direct colorimetric determination of serum calcium with o-cresolphthalein complexone. *American Journal of Clinical Pathology* 61 : 114 - 117.
- 8) 西口靖彦・安藤 貞・早坂貴代史・池田順一・堀 兼明・須賀有子・福永亜矢子 2007. 飼料中マグネシウム, カリウム, カルシウム含量の迅速測定法 1. 希塩酸抽出法による分析試料の前処理. 近中四農研報 6 : 133 - 139.
- 9) 農林水産省農林水産技術会議事務局編, 1999. 日本飼養標準・乳牛 (1999年版) 農林水産省農林水産技術会議事務局, 東京.
- 10) 農林水産省農林水産技術会議事務局編, 2000. 日本飼養標準・肉用牛 (2000年版) 農林水産省農林水産技術会議事務局, 東京.
- 11) 生化学データブック. 日本生化学会編 東京化学同人. 1982.
- 12) 飼料分析基準研究会編, 1998. 飼料分析基準注解 (第三版). p31, (社) 日本科学飼料協会, 東京.
- 13) 飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律施行規則の規定に基づく検定の方法. 農林省告示第758号, 昭和51 (1976) 年7月24日.
- 14) Sunderman, Jr FW and Sunderman FW. 1958. Studies in serum electrolytes. XXXII. A rapid, reliable method for serum potassium using tetraphenylboron. *American Journal of Clinical Pathology* 29 : 95 - 103.
- 15) 上野景平・斎藤幹彦・玉奥克己 1968. テトラフェニルホウ素ナトリウム—その分析化学的応用— (その1). *Japan Analyst* 17 : 1548-1559.
- 16) 上野景平・斎藤幹彦・玉奥克己 1969a. テトラフェニルホウ素ナトリウム—その分析化学的応用— (その2). *Japan Analyst* 18 : 81 - 95.
- 17) 上野景平・斎藤幹彦・玉奥克己 1969b. テトラフェニルホウ素ナトリウム—その分析化学的応用— (その3). *Japan Analyst* 18 : 264 - 279.
- 18) 渡辺寛人・田中裕晃 1977. キシリジルブルー I と非イオン性界面活性剤を用いるマグネシウムの二波長吸光光度定量. 分析化学26 : 635 - 639.

Rapid analysis of magnesium, potassium and calcium contents in feedstuffs

2. Colorimetric and turbidimetric determination of magnesium, potassium and calcium

Yasuhiko NISHIGUCHI, Takashi OHSAKA*, Sada ANDO, Kiyoshi HAYASAKA**, Jun-ichi IKEDA***,
Kaneaki HORI****, Yuko SUGA**** and Ayako FUKUNAGA****

Key words : colorimetric, turbidimetric, determination, magnesium, potassium, calcium

Summary

The reliability of a colorimetric determination of magnesium (Mg) and calcium (Ca), and a turbidimetric determination of potassium (K) were evaluated. The concentrations of Mg, K and Ca were determined with xyldil blue (XB), tetraphenylboron (TPB) and orthocresolphthaleincomplexone (OCPC) method, respectively. The detective range of each element was followed; Mg >1.25mg/dl, K > 6.25mg/dl, and Ca > 2.5mg/dl.

These colorimetric determination of XB and OCPC methods were specific for Mg and Ca, and no interference with other elements was observed. The determination of K was slightly interfered with other elements.

XB and OCPC methods were applied both dry-ashing and HCl extraction samples, however, K content measured by TPB method using HCl extraction samples had tendency to underestimate than those using ashing samples. Therefore, the determination of K in HCl extraction samples needs to assay the K concentration of sample as control simultaneously.

Japanese Black Cow Production Research Team

*Hiroshima prefectural Livestock Technology Research Center

**National Institute of Livestock and Grassland Science

***Collaboration Promoting Center, Director Promotion Leader

****Research Team for Sustainable Vegetable Production