

ソルガム属青刈飼料作物含有青酸の拡散分析法による定量 について

誌名	日本草地学会誌
ISSN	04475933
著者	尾形, 昭逸 安藤, 忠男 藤井, 潤三
巻/号	18巻2号
掲載ページ	p. 118-121
発行年月	1972年7月

ソルガム属青刈飼料作物含有青酸の拡散 分析法による定量について

尾形昭逸・安藤忠男・藤井潤三

広島大学水畜産学部 (福山市緑町)

緒 言

ソルガム属作物は高温、早ばつに耐えることから、近時我国の西南暖地において夏期間の青刈用飼料作物として広く栽培されるようになってきた。しかし、本作物の成熟前の子実、莖葉には青酸配糖体が含有されており、この青酸配糖体より遊離される青酸が、ソルガム属青刈飼料を嚙食した家畜に中毒症状をもたらすことは、古くより知られている。

ソルガム属作物の青酸の定量に関しては、Hogg および AHLGREN³⁾ の提出した方法があり、最近、大山および加治⁴⁾ が青刈飼料用ソルガムの部位別、時期別の青酸含有濃度の測定に、この方法を用いた研究結果がある。この方法は、アルカリピクレート溶液を浸したろ紙に試料組織より遊離してくる青酸を吸収発色せしめ、ろ紙の呈色度をあらかじめ発色せしめてある標準色調溶液と肉眼的に比較定量する方法である。この方法で、使用する組織重量は新鮮物で 0.15g 程度と少量であるのと、呈色ろ紙の色調が均一でないで、分析法としては簡易であるが実験誤差を生じやすい。その他比較的少量の新鮮試料を水蒸気蒸溜法により、青酸を蒸溜し、この青酸をアルカリピクレートによる比色⁵⁾、あるいは滴定する方法がある。この方法は多量の試料を必要とするほか、多数の試料を一時に処理するには困難がある。そこで、著者らは、一時に多数の試料を分析し、しかも、実験誤差を可能なかぎり小さくするため、マイクロあるいは、セミマイクロ拡散分析法を応用した。その結果、満足すべき方法であることを確認したので、ここに報告する。

実験方法

使用試薬は 50g の Na_2CO_3 と 5g のピクリン酸を 1l の蒸溜水に溶解し、このアルカリピクレート溶液を遊離青酸の吸収発色液として使用する。クロロホルム液は新鮮試料に数滴滴下する。また 0.02% 希薄硫酸溶液も植物新鮮組織 1g に対し 1ml の割で添加する。使用

拡散分析用硝子器具はマイクロあるいは、セミマイクロ用標準型を使用する。なお、植物体試料、クロロホルムおよび希薄硫酸は拡散分析用ユニットの外室部に、アルカリピクレートは中央室部に入れる。なおユニットのカバーのための膠着剤としては微酸性にしたアラビヤゴムとグリセリンの混合液を使用する。

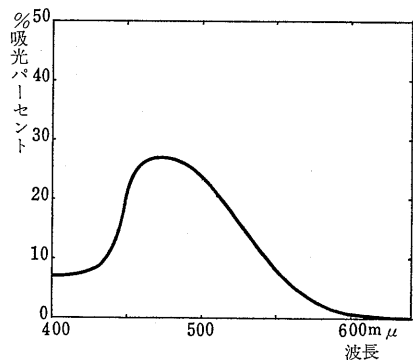
実験結果

1. 吸光度測定の方法

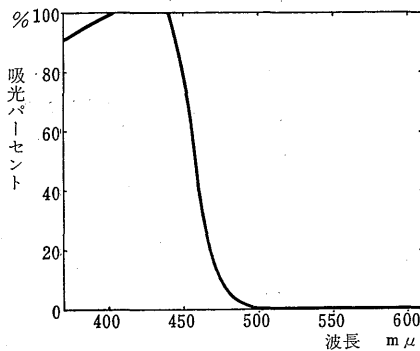
第1図に青酸アルカリピクレート呈色とアルカリピクレート液の差スペクトルを示した。これによると青酸アルカリピクレート呈色液の最大の吸光は約 470 m μ 附近にある。しかし、第2図に示したように、アルカリピクレート溶液単独の吸光も 500 m μ 附近より短波長にかけて急激におこるゆえ、アルカリピクレート液をブランクにして、青酸アルカリピクレート呈色液の吸光度を測定する場合でも、510 m μ ないし 520 m μ で測定するのが望ましいことになる。

2. 拡散分析法による青酸の定量

拡散分析法による植物組織の青酸の定量は前記アルカ



第1図 Na 青酸ピクレート-Na ピクレート差スペクトルグラフ
(発色液 5ml 中 HCN 0.04mg, Na ピクレート 0.2ml を含む)



第2図 Na ピクレート溶液の吸光スペクトルグラフ
(Na-ピクレート液 0.2 ml/5 ml 含有溶液)

リピクレートろ紙法に比較して、青酸の吸収と発色のために使用するアルカリピクレート溶液の量を比較的容易に増減出来、また使用試料組織量の調節も可能である。

第1表に各種濃度の青酸溶液を試料とし、拡散分析法により定量した結果を示した。なお、この結果はあらかじめ青酸アルカリピクレート標準液により作製した 510 mμ における標準曲線により算出したものである。

この表に示した標準偏差の数値より見てもまた、第2

第1表 拡散分析法による各種濃度の青酸溶液からの青酸量の定量値

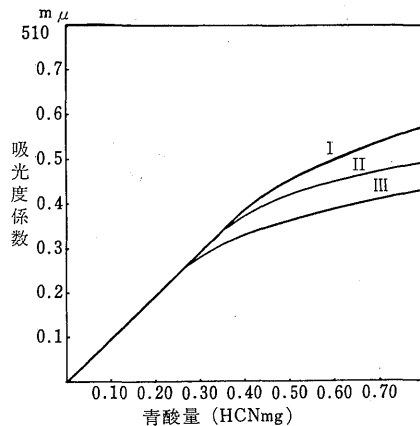
試料液中青酸量 HCN: mg	拡散法による定量値 HCN: mg	回収率 %	標準偏差 %
0.050	0.048	98.0	±3.16
0.100	0.103	103.0	
0.15	0.145	96.7	
0.200	0.192	96.0	
0.250	0.243	97.2	
0.300	0.289	96.3	

インキュベーション温度、時間はおのおの 25°C, 24時間とした。

第2表 スイートソルガム含有青酸濃度の拡散分析法による測定値と Hogg および Ahlgren 法による測定値の比較

拡散法による試料中青酸濃度 HCN: ppm	Hogg, Ahlgren 法による試料中青酸濃度 HCN: ppm
1196	1010
1295	1390
1217	1240
1165	980
1283	1050
平均値・標準誤差 1231±79.7	平均値・標準誤差 1134±160.0

インキュベーション温度、時間は 25°C, 24時間。発芽後40日の展開中の葉を試料とする。拡散法の場合の試料量は新鮮物 1.0 g, Hogg, Ahlgren 法の場合は 0.15 g とした。



第3図 拡散分析法による青酸定量時における Na ピクレート液量と発色度との関係
(青酸吸収発色液量 I-Na ピクレート 1.5 ml, II-Na ピクレート 1.0 ml+H₂O 0.5 ml, III-Na ピクレート 0.5 ml+H₂O 1.0 ml 25°C, 24 hrs インキュベート後発色液 0.5 ml とり 10 倍希釈し測定)

表に示した Hogg らの方法により得た分析値と比較してもあきらかであるように、拡散分析法による青酸の定量は充分満足すべきものであると考えられる。

つぎに、試料中の青酸量がより多量の場合の、吸収発色に使用するアルカリピクレート溶液量の適量を検討した。その結果は第3図に示したとおりである。すなわち青酸量が多くなる場合は使用アルカリピクレート量が少量であると分析値が低く出るおそれがあり、したがって含有青酸量に見合った量のアルカリピクレート溶液を使用する必要がある。すなわち、検体中青酸量約 0.4 mg に対して、アルカリピクレート量約 1.0~1.5 ml が適当である。

3. ソルガム試料中の青酸の定量

拡散分析法により、実際にスイートソルガム含有の青酸量を測定した。スイートソルガムの新鮮組織を試料とし、試料は約 3 mm×3 mm 位に細断した場合と、また試料を磨碎し、冷水により抽出部と残、渣に分離した場合とを分析し比較検討した(第3表)。磨碎組織の冷水抽出液と残渣の分離は冷凍遠心機により、0°C, 5000×g, 約 10 分間で行なった。なお試料の微酸性化のための 0.02% 硫酸液は添加しなかった。この結果からみてもあきらかなように、試料の磨碎はその操作中に加水分解にもとづく揮散等の何らかの形で含有青酸の大きな損失を招くと考えられる。したがって新鮮試料の調製は出来るだけ、低温で、短時間の中に細断することが望ましいと結論出来る。

4. 細断新鮮組織に対する稀薄硫酸の添加効果

第3表 スイートソルガム幼植物試料の処理の差による青酸定量値の差異

試料* 番号	細断(3mm×3mm) 新鮮試料 (対乾物HCN ppm)	冷水による新鮮試料磨碎物 (対乾物 HCN ppm)	
		抽出液部より	抽出残渣より
1	1033	360	97
2	1345	484	120
3	588	135	58
4	759	207	70

* 試料番号1と2は発芽後30日の展開中の若葉, 3と4は展開完了の成葉を使用, インキュベーション温度 25°C, 時間24時間.

新鮮試料各々 1.0g 相当量使用.

ソルガム中の青酸配糖体はクロロホルムの添加により, 組織が破壊され, 充分に加水分解をうけ, 青酸が遊離してくると考えられる. 拡散分析のインキュベーションの時間はクロロホルムのみ添加で Hogg³⁾らの述べているように約 20°C, 24 時間で充分と思われるが, さらにこのインキュベーション時間の短縮と青酸の遊離をより確実にするため試料組織 1g に対し, 0.02% 希薄硫酸 2ml を加え, 組織を微酸性化して, 組織よりの青酸の遊離状況を検討した. この結果は第4表に示した. この結果からみて, 0.02% 程度の希薄硫酸の添加はインキュベーション時間の短縮が計られると同時に, 青酸

第4表 拡散法におけるインキュベーション時間と試料に対する希薄硫酸添加効果

インキュベ ート時間 hr	無添加 (対乾物 ppm)	試料 1.0g に対し	
		0.01% H ₂ SO ₄ 2ml 添加 (対乾物 ppm)	0.02% H ₂ SO ₄ 2ml 添加 (対乾物 ppm)
3	638	877	985
6	1080	1230	1280
12	1250	1324	1344
24	1235	1289	1290

インキュベーション温度 25°C, 新鮮細断試料 1.0g

の組織よりの遊離をより確実にするものと考えられる.

結 論

ソルガム属青刈飼料作物中の青酸の定量をマイクロないしはセミマイクロ拡散分析法により, 満足に行ない得ることが明らかになった. また, この方法は Hogg ら等の方法に比較し多数の新鮮試料を一時に処理可能であると同時に, 試料の量も 0.5g~2.0g と調節出来るので迅速かつ, 精度が高い. 以下に, その標準的方法を示す.

- 1) 新鮮組織試料を約 3mm×3mm に細断し, 試料重量は 0.5g ないし 2.0g 秤取する. これを拡散分析器の外室に入れる.
- 2) さらに, 外室部に数滴のクロロホルムならびに 0.02% 希薄硫酸を試料 1g に対し 2ml の割合で加える.
- 3) アルカリピクレート量は試料量にもよるが 1.0ml~2.0ml とする.
- 4) インキュベーションは室温約 20°C~25°C で 12 時間以上 20 時間で充分である.
- 5) 発色液を 10 倍に希しやくし, 510 mμ で吸光度を測定し, 青酸量を算出する.

文 献

- 1) BOYD, F. T., AAMODT, O. S., BOKSTEDT, G. and TRUOG, E.: *J. Amer. Soc. Agron.*, **30**, 569-582 (1938)
- 2) LEEMAN, A. C.: *Onderstepoort J. Sci. and An. Ind.*, **5**, 97-136 (1935)
- 3) HOGG, P. G. and AHLGREN, H. L.: *J. Agr. Res.*, **67**, 195-210 (1943)
- 4) 大山 茂, 加治正春: 日草誌, **15**, 126~130 (1969)
- 5) JACKSON, M. L.: *Soil Chemical Analysis*, Prentice Hall, 337 (1958)

(昭和46年12月9日受理)

Determination of Hydrocyanic Acid Contained in Sorghum by the Method of Micro- or Semimicro- Diffusion Analysis

Shoitsu OGATA, Tadao ANDO and Junzo FUJII

Faculty of Fisheries and Animal Husbandry,
Hiroshima University (Fukuyama-shi, Hiroshima-ken)

Summary

This paper proposed that the method of micro- or semimicro- diffusion analysis could be applied for the determination of hydrocyanic acid content of plants such as Sorghum or Sudan grass and to give a reliable result for its determination.

The standard procedure of determination of hydrocyanic acid in plants as follows;

The outer compartment of a diffusion unit is placed with fresh sample cut into 3×3mm, and added with a few drops of chloroform and 1 to 2 ml of 0.02% sulfuric acid. Alkali picrate solution, 1.0 to 2.0 ml are pipetted into the central well of unit. The unit is tightly covered with using of slightly acidified gum arabic and glycerol mixture, and then incubated at about 20~25°C, for 12~20 hrs..

The differential optical density between alkali hydrocyanic acid picrate and alkali picrate is measured at 510 m μ .

(J. Japan. Grassl. Sci., 18, 118~121, 1972)