

# 粗飼料中の硝酸塩と血中メトヘモグロビンの 簡易測定法

吉田条二・藤田力男\*・中村亮八郎

## Simple Methods of the Determination of Nitrate in Roughages and Methemoglobin in Blood

JOJI YOSHIDA, RIKIO FUJITA\*, and RYOHACHIRO NAKAMURA

### I. 緒 言

近年、酪農の多頭飼育化に伴い、飼料作物や牧草の多肥多収が進められ、また、新種の牧草等の導入および既報<sup>1)</sup>の“ひゆ”のような雑草の侵入によって、しばしば所謂硝酸中毒の発生がみられる現状である。筆者等は、さきに、青刈とうもろこしの生育、施肥と硝酸含量との関係を求め、多肥は硝酸含量を高め、生育の進行に伴い、その含量が低下することを認めた<sup>2)</sup>。また、生育初期のかぶ葉や若刈とうもろこし、さらに雑草のひゆはDM中14~16%にもおよぶ多量の硝酸塩を含有するものがあり、これらの給与実験において、ルーメン中における多量の亜硝酸生成と血中メトヘモグロビンの著増を認め、硝酸中毒の可能性を指摘した<sup>3),4)</sup>。高硝酸含有飼料の給与は急性中毒の危険を有するのみならず、生育、産乳の低下および流産等をもたらす<sup>5)</sup>、酪農経営に大きな影響を及ぼすものと考えられる。しかしながら、飼料中の硝酸塩および本中毒特有の血中メトヘモグロビンの定量は、やや繁雑であったので、これを現場的に簡易に行う方法を検討した。

### II. 実験の方法

#### 1. 硝酸含量の測定

##### 1) 材料

当研究室圃場に生育したイタリアンライグラス、えん麦、かぶ等の飼料作物と混生した雑草のひゆを材料とし、これ等を鋏で細切し、簡易な搾汁器で汁液を採取した。通常は、まず、この搾汁1 mlを回線目盛付試験管にと

り、蒸留水で10倍稀釈し、以後その1部を採って適当な濃度になるように稀釈したものを試料液とした。

##### 2) 発色試薬

ジフェニルアミン0.5 gを80%硫酸100 mlに溶解したものを使用した。

##### 3) 測定方法

水彩用の陶製パレットの凹部に上記発色試薬を5滴滴下したもの、または、シャーレ上に置いたガラス紙(東洋紙 GA 200, 24 mm)に上記試薬約0.7 mlを均一に充分しませたものを用意し、これに前記試料液1滴(約30  $\mu$ l)を滴下する。この際、硝酸塩が存在すると青色を呈し、約1分間位の時間経過により、呈色度は強くなり、約5分間位安定である。本法においては、発色の限界を求めなければならないので、通常は、試料からの搾汁またはその10倍稀釈液を倍数稀釈し乍ら、青色の発色を確認しつつ最後に発色しなくなった点を求め、その前段階の僅かに発色する点を発色限界とする。なお、KNO<sub>3</sub>標準液の発色限界濃度を求め、当該稀釈試料液のKNO<sub>3</sub>濃度を知り、稀釈倍率から作物中の硝酸含量を計算する。例えば、試料の発色限界が60倍稀釈液で、KNO<sub>3</sub>標準液の発色限界濃度が0.01 g/dlであったならば、試料搾汁中のKNO<sub>3</sub>濃度は0.6 g/dlとなり、試料水分が80%ならば試料中KNO<sub>3</sub>含量は0.48%とする。また、搾汁中の硝酸塩の定量はスルファニル酸、 $\alpha$ -ナフチルアミンを使用する既報<sup>4)</sup>の方法に従った。

##### 4) 発色に影響を及ぼす物質の検討

本測定法では、材料中の含有物質が発色に影響を及ぼすことが予想されたので検討を行った。

(イ) 材料搾汁: 極めて低硝酸のイタリアン-4の搾汁10倍稀釈液にKNO<sub>3</sub>を添加して発色に対する影響を求めた。

(ロ) 糖: 搾汁中には遊離の糖類が存在するので、デキ

\* 茨城県竜ヶ崎地区農業改良普及所  
The Agricultural Extension Service Station of  
Ryugasaki, Ibaraki Prefecture.

ストリン、シ<sub>3</sub>糖、グルコースおよびフルクトースを用い、その 0.5 g/dl 液と KNO<sub>3</sub> 0.04 g/dl 液を混合し、発色に対する糖の影響を求めた。

(ハ) アミノ酸等: アルギニン、グルタミン酸等5種類のアミノ酸を用い、その 0.2 g/dl 液を、また、ビタミンC-Na の 0.4 g/dl 液を KNO<sub>3</sub> 0.01 g/dl 液と等量混合し、さらにそれを水で倍数稀釈しながら発色に対するこれらの影響を求めた。なお、アルギニンについてはその水溶液を 10~1000 倍に稀釈し、KNO<sub>3</sub> 0.01 g/dl 液と等量混合し、検討を行った。

### 2. メトヘモグロビン含量の測定

KNO<sub>3</sub> 水溶液をカテーテルで第1胃内に注入し、メトヘモグロビン血症を起させた綿羊の頸静脈血、または、正常綿羊の頸静脈血 2 ml に NaNO<sub>2</sub> の生理食塩水液 0.05 ml を添加し、39°C 恒温水槽中で 30 分間反応させて作製したメトヘモグロビン含有血液 0.5 ml をガラス沨紙 (東洋沨紙 GA 200, 24 mm) に均一に吸収させ、測色色差計 (日本電色, ND-IV 型) で、L, aL, bL 値を測定し、また、色差 ΔE 値を計算によって求めた。なお、血中メトヘモグロビン (MHb)、全ヘモグロビン (THb) の定量は、既報と同様 Evelyn-Malloy 法<sup>6)</sup>に従った。

## III. 実験結果

### 1. 搾汁中の硝酸含量

#### 1) 測定結果

本法を KNO<sub>3</sub> 標準液に適用すると、その発色限界濃度は、通常は 0.01 g/dl であったが、発色試薬が調製後日数を経過している場合には、この限界濃度は高くなる傾向が認められた。また、本試薬により亜硝酸塩も同様の発色を示し、その限界濃度は N 基準で KNO<sub>3</sub> とほぼ等量であった。各種搾汁の硝酸 (KNO<sub>3</sub> 換算) 含量をその定量値と本法測定値と併記したものが第1表である。6~8月に行ったパレットを使用した実験では、測定値と定量値はよい一致を示したが、ひゆの測定値は高い値を示した。パレットによる測定の場合は、試料液の滴下の仕方により発色限界が異なることが多く、判定がやや困難であった。ガラス沨紙では 11~12 月の測定値はやや

第1表 試料搾汁の硝酸 (KNO<sub>3</sub>) 含量

	試料	測定時期	測定値, g/dl	定量値, g/dl
パ レ ッ ト	ひ ゆ-1		0.40	0.19
	ひ ゆ-2	6	2.00	1.50
	イタリアン-1	く	0.10	0.12
	イタリアン-2	8	0.125	0.11
	青刈コーン	月	1.00	0.98
ガ ラ	イタリアン-3	11	0.90	0.65
	えん麦-1	く	0.70	1.35
	かぶ-1	12	1.32	0.90
ス 沨 紙	イタリアン-4		0	0.008
	イタリアン-5	2	0.60	0.27
	イタリアン-6	く	0.30	0.12
	かぶ-2	3	0.60	0.23
	えん麦-2	月	1.20	0.16

第3表 発色に対する糖添加の影響

添加物	発色限界濃度 (KNO <sub>3</sub> g/dl)	糖濃度, g/dl
デキストリン	0.01	0.375
シ <sub>3</sub> 糖	0.01	0.375
グルコース	0.01	0.375
フルクトース	0.02	0.250

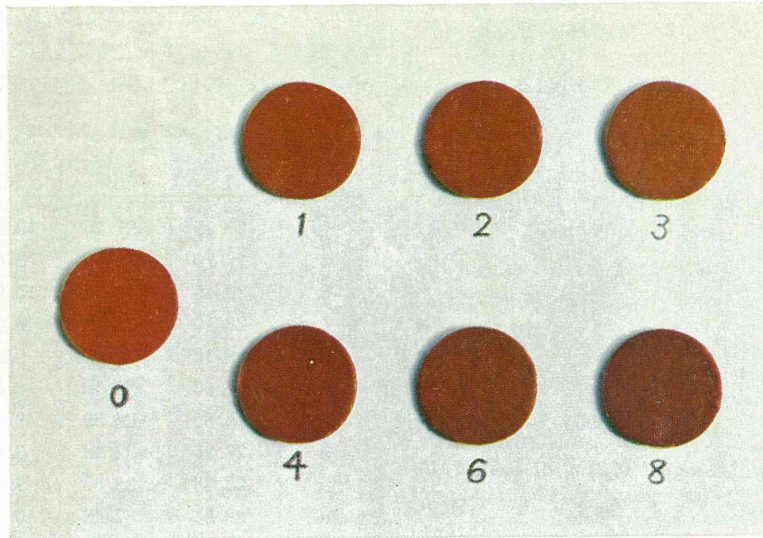
高い値を示した。えん麦-1 は低い値を示したが、発色限界判定の誤差であろう。2~3月の測定値は低硝酸のイタリアン-4 以外は定量値の2倍以上を示し、特にえん麦-2 は 7.5 倍の高値を示した。

#### 2) 発色に影響を及ぼす物質

第2表の通り低硝酸イタリアンの搾汁だけでは発色しないが、搾汁の存在が KNO<sub>3</sub> の発色を促進し、この場合は約4倍高い値が得られると認められた。従って、搾汁中に発色促進物質が存在すると考えられた。デキストリン、シ<sub>3</sub>糖およびグルコースの添加は第3表の通り発色限界に影響なく標準と同様であったが、フルクトースはやや発色を阻害した。アミノ酸等添加の結果は第4表の通りで、アルギニン自身は本試薬で発色しないが、アルギニンの発色促進作用は顕著で8倍稀釈、すなわち KNO<sub>3</sub>

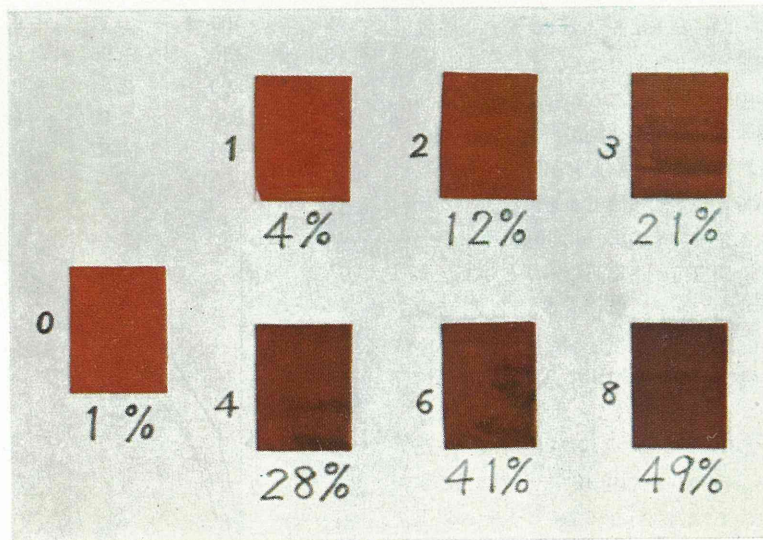
第2表 搾汁の発色に対する影響

KNO <sub>3</sub> 濃度, g/dl	0	0.02	0.01	0.005	0.0025	0.00125
標準液		+	+	-		
搾汁に添加	-	+	+	+	+	-



第1図 ガラス沓紙法による血中 MHb 含量と色調の変化

No.	MHb	No.	MHb
0	0.7%	4	28.0%
1	4.4	6	41.1
2	12.2	8	48.7
3	21.0		



第6図 試作標準色調表

各色彩片の左側数字はガラス沓紙法の血液相当 No. 下部の % は相当する MHb 含量

第4表 発色に対するアミノ酸等添加の影響

添加物	混液	2倍稀釈	4倍	8倍
	KNO <sub>3</sub> g/dl 0.005	0.0025	0.00125	0.00063
アルギニン	+	+	+	±
バリン	±	-		
ロイシン	±	-		
グルタミン酸	±	-		
フェニルアラニン	阻害			
ビタミンC-Na	±	-		

第5表 発色に対するアルギニン濃度の影響

稀釈倍率	10	100	500	1000
アルギニン濃度*	10 mg/dl	1 mg/dl	0.2 mg/dl	0.1 mg/dl
発色	+	+	+	±

\* アルギニン濃度は混液中の濃度

0.00063 g/dl, アルギニン 0.0125 g/dl の濃度でも僅かに発色した。また、フェニルアラニンは発色を阻害し、他のアミノ酸、ビタミンCはやや発色促進の傾向を示した。アルギニンの発色促進作用は第5表の通り1000倍稀釈、混液中濃度 0.1 mg/dl まで認められた。

## 2. 血中のメトヘモグロビン含量

血液を普通の沓紙 (No. 2, No. 5, No. 50 等) に吸収させた場合は、色調差は余り鮮明でなく、かつ、変色が速かで色調の判別が困難であった。しかし、沓紙の代わりにガラス沓紙を使用すると鮮明な色調が得られ、かつ、変色も遅延し、従って色調差の判別も容易となった。数頭の正常細羊について2~3回頸静脈血を採取し、ガラス沓紙に吸収させ、色差計でその L, aL, bL の平常値を求め、また、これらの測定値の平均値を基準として ΔE を計算したものが第6表である。試料血液の各測定値間には大差はなかった。ついで、正常細羊の頸静脈血に NaNO<sub>2</sub> 液を添加作製した血液の MHb, THb 含量等は第7表の通りである。添加 NO<sub>2</sub>-N 1γ は 10 mg 前後の MHb を生成した。この血液をガラス沓紙に吸収させたものが第1図である。色調の差は肉眼的には No. 4, すなわち MHb 約 30% まで判別可能であるが、それ以上は困難であった。これを色差計で測定すると、MHb 濃度の増加につれ、L, aL, bL 値は減少し、aL 値の減少が大であった。また、各測定値は No. 8, すなわち MHb 約 50% までは減少が顕著であったが、それ以上では小さくなり、色差の測定が困難となった。さらに2例の実

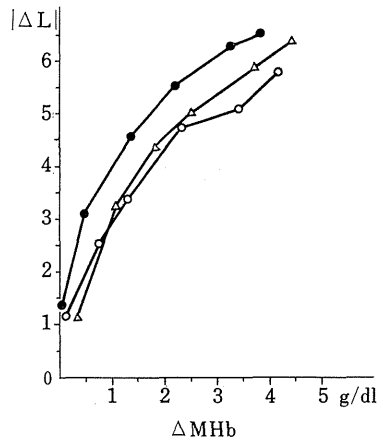
験を行い、NaNO<sub>2</sub> 無添加を基準として、L, aL, bL 値の減少の絶対値と MHb 濃度の増加との関係を図示したものが第2, 3, 4図で、3例とも良く似た傾向を示した。また、ΔE 値を計算して MHb 濃度との関係を図示したも

第6表 細羊血液の平常値

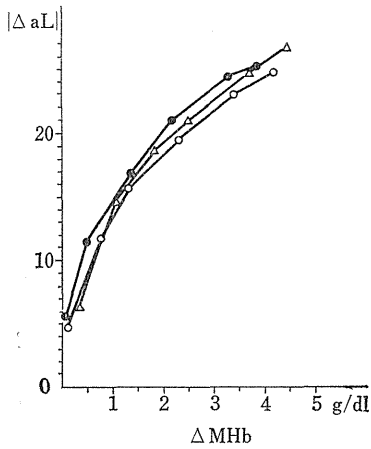
No.	L	aL	bL	ΔE (m基準)
1	30.45	37.15	10.30	3.31
2	27.70	32.55	8.65	2.36
3	29.45	36.20	10.02	1.93
4	28.10	33.05	8.95	1.70
5	28.10	35.00	9.26	0.53
6	27.96	32.10	8.62	2.71
7	28.59	36.59	9.81	1.99
8	27.26	32.43	8.69	2.63
9	28.38	33.88	9.09	0.83
10	29.01	37.58	10.01	3.04
平均(m)	28.50	34.66	9.34	2.10
標準偏差	0.88	2.00	0.61	0.85

第7表 添加 NO<sub>2</sub>-N と MHb 含量

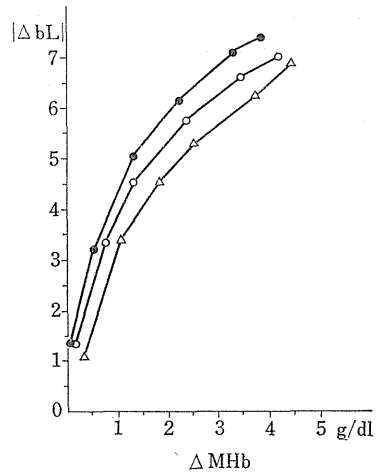
No.	添加 NO <sub>2</sub> -N γ/dl	MHb g/dl	THb g/dl	MHb %
0	0	0.06	9.38	0.68
1	50	0.41	9.21	4.42
2	100	1.14	9.34	12.21
3	150	1.95	9.28	20.98
4	200	2.64	9.41	28.03
6	300	3.89	9.45	41.14
8	400	4.62	9.48	48.73



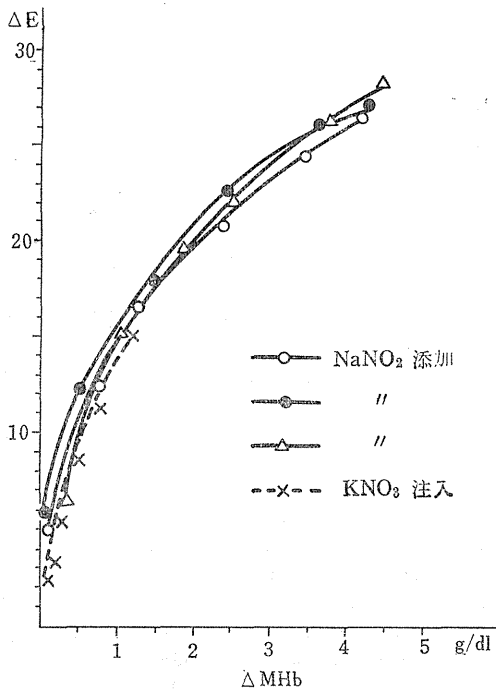
第2図 MHb 濃度の増加と L 値の減少量の関係



第3図 MHb 濃度の増加と aL 値の減少量の関係



第4図 MHb 濃度の増加と bL 値の減少量の関係



第5図 MHb 濃度の増加と ΔE 値の関係

のが第5図である。なお、KNO<sub>3</sub> 液注入細羊の頸静脈血を採取して測定した結果も併記した。人工的 MHb 血3例、MHb 血症動物の血液は何れも極めて近似した曲線を示した。

色調により血中 MHb 含量を推定するため、第1図の血液の各種測定値を基礎に、ポスターカラー、絵具を No. 50 の紙に塗附彩色して乾燥し、近似の L, aL, bL

値を示す色調表を作製した。第6図に示す通り肉眼的にもかなり近似の色調が得られた。

#### IV. 考 察

硝酸中毒は、摂取飼料中の硝酸塩よりルーメン内で亜硝酸が生成し、これが吸収されて血液中で MHb を生ずるために起り、牛の硝酸塩の中毒死量は 0.5 g/kg または飼料中約 2% で、安全量は 0.5% 以下と云われている<sup>7)</sup>。従って粗飼料中の硝酸塩含量を知る必要がある。硝酸の検出法には FeSO<sub>4</sub> と H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、ジフェニルアミン、Zn 末還元後の Griess 反応<sup>8)</sup>等があるが、これらを原理とする Morris の法<sup>9)</sup>、Roux の法<sup>10)</sup>等の定量法は簡易に行う事は出来ない。また、ジフェニルアミンの硫酸液を試料に滴下して硝酸の存否を知る方法<sup>5)</sup>は定性反応としては簡便な方法であるが、量的な判定が困難であった。筆者等はこの定性反応を利用し、簡易に定量可能な方法を検討した。作物の搾汁は、試料の細切物から“にんにく搾り器”等の簡単な搾汁器で得られ、この搾汁をそのまま蒸留水で適当濃度に稀釈すれば良い。この稀釈は目盛付試験管で容易に行い得る。発色操作はパレットの使用では終末点の確認が困難で、ガラス紙に試薬を充分しみ込ませたものに試料液を滴下するのが良い。この反対の操作では発色不良であった。発色は滴下点を中心に環状に拡がり、その外縁に起るので滴下量を約 30 μl 程度に規制する必要がある。本法では、発色しなくなる前段階を終末点とするが、倍数稀釈を行えば、終末点濃度は次段階の濃度の2倍となり、判定を誤ると大きな誤差を生ずる。第1表のえん麦-1はその一例であろう。なお、より正確を期するならば、終末点附近をさらに数段階に分けて判定すれば良いと考えられる。本法では、

冬から早春の生育初期の材料で定量値より可成り高い測定値が得られたのは、材料中に発色促進物質が存在した為と推論された。すなわち、低硝酸搾汁の添加により、 $\text{KNO}_3$  標準液の発色が促進され、また、アルギニンの添加も発色を促進した。本実験に使用したグルコース等の糖類やアルギニン以外のグルタミン酸等のアミノ酸およびビタミンC等は、存在しても発色にほとんど影響を与えないと考えられた。アルギニンは広く植物界に分布し、幼植物に存在し<sup>11)</sup>、このように低濃度でも発色を促進するので、汁液による発色促進への関与が推定された。本法では、材料によっては真値より高い値が得られたが、実際的には冬期の幼植物の給与はほとんど行われず、また、高い値を与えるので中毒の危険防除の面からは余り問題にならないであろう。

血液はMHb含量の増大に伴いチョコレート色を呈する。MHb含量の差が大きい時は採血管中のままで色調の差を或る程度判別しうるが、MHb濃度の判定は極めて困難であった。この判別を容易にするため、血液を濾紙に塗附しても、色調の変化等の難点があったが、ガラス濾紙の使用によりこれ等の困難は克服された。本法は採血後速やかに実施することが望ましいが、測定までの保存は水冷によらねばならない。凍結は色調を相当変化させるので避ける必要がある。第1図のように肉眼的判別はMHb数%以上、30%以下で可能であるが、30%以上では中毒死を予想しなければならず、直ちに対策が必要であるので、実用上は充分な範囲と考えられる。色差計ではMHb50%以下で判別可能で、中毒死危険域のMHb量の測定も可能である。色差 $\Delta E$ 値からMHb量の推定は充分可能で、本法で色調から簡易にMHb量の測定が出来ると考察された。また、これ等の測定値を基礎にしてMHb血の色調表を試作したが、近似した色調の再現が可能であった。本表はMHb含量の区分が少く、まだ不十分ではあるが大略の判別には使用出来るであろう。

## V. 要 約

粗飼料中の硝酸塩および血中のメトヘモグロビンを簡易に測定する方法を案出した。

- 1) 粗飼料の搾汁を適当に蒸留水で稀釈する。ガラス

濾紙にジフェニルアミン試薬を充分にしみこませた後、この稀釈試料液を1滴滴下する。若し比較的多量の硝酸塩が存在すれば、濃青色を呈する。稀釈を続け、僅かに青色の発色する点を終末点とする。標準液では、この終末点の濃度は $\text{KNO}_3$ としてほぼ0.01g/dlであった。この濃度に搾汁試料液の稀釈倍率を乗じて搾汁中の $\text{KNO}_3$ 含量を計算し、さらに、試料の水分から粗飼料中の $\text{KNO}_3$ 含量を計算する。

- 2) この呈色反応は、グルコース等の糖の存在には影響されないが、アルギニンの存在によって著しく促進された。本法による測定値は、冬期には実際の含量より高い値を示した。

- 3) 頸静脈血をガラス濾紙に吸収させ、その色調を判別することによりメトヘモグロビン含量を測定することを試みた。判別可能な範囲は、肉眼ではメトヘモグロビン含量が数%以上、30%以下、色差計では50%以下であった。色差計で測定した $\Delta E$ 値からメトヘモグロビン含量の測定は充分に可能であると推定された。

- 4) また、肉眼的測定のために、メトヘモグロビン血の色調表を作製した。

## 文 献

- 1) 中村亮八郎・吉田条二・中村 豊・加藤寿次・荻野順三：日畜会報，43，286 (1972)
- 2) 中村亮八郎・吉田条二・藤田力男：茨大農学術報告，No. 14，41 (1966)
- 3) 吉田条二・中村 豊・堀 周作・中村亮八郎：同上，No. 17，31 (1969)
- 4) 中村 豊・吉田条二・初貝 康：同上，No. 20，45 (1972)
- 5) Case, A. A.: J. Amer. Vet. Med. Ass., 130, 323 (1957)
- 6) Evelyn, K. A. and H. T. Malloy: J. Biol. Chem., 126, 655 (1938)
- 7) Ladeff, R. D.: Veterinary Toxicology, P. 154 (1964) Lea & Febiger
- 8) 石館守三：微量定性分析，P. 267 (昭39) 南山堂
- 9) Morris, M. P. and A. González-Más: J. Agr. Food Chem., 6, 456 (1958)
- 10) Roux, F., C. Nofre, and A. Cier: Bull. trav. Soc. Pharm. Lyon, 4, 25 (1950)
- 11) Steele, C. C.: Introduction to Plant Biochemistry, P. 136 (1949) G. Bell and Sons, Ltd.

### Summary

Simple methods of the determination of nitrate in roughages and methemoglobin in blood were contrived.

One drop of the roughage juice diluted properly with distilled water was dropped on glass filter paper saturated with diphenylamine reagent. At that time, glass paper showed a deep blue color if nitrate existed rather in excess. After multiple dilution was continued, it was decided that the dilution reached to the end point when this blue color developed very slightly.

In the case of standard solution, potassium nitrate concentration was about 0.01 g per dl at the end point. Nitrate contents in the juice or roughage were calculated from nitrate concentration of standard solution and values of the dilution multiple and moisture.

This color reaction was not affected by sugar but promoted very much by arginin. The values obtained by this method were higher than true values of roughages in winter.

The determination of methemoglobin in jugular blood was tried by the distinction of color tone of glass filter paper saturated with blood. The distinguishable ranges of methemoglobin contents were under about 30% with the naked eye and about 50% with the color difference meter.

It was concluded that methemoglobin contents would be able to determine satisfactorily from  $\Delta E$  values obtained with the color difference meter.

On the other hand, the color table of blood contained methemoglobin was made for the determination of methemoglobin by the naked eye.