

イオン電極法による牧草の硝酸態窒素定量

安宅一夫*・榎崎 昇*

吉田 則人**・朝日 敏光**

Nitrate Determination in Plant Materials by Nitrate Electrode

Kazuo ATAKU*, Noboru NARASAKI*, Norihito YOSHIDA**
and Toshimitsu ASAH**

(May, 1979)

緒 言

近年、牧草の集約的な多肥栽培により、牧草中の硝酸態窒素含量が増加し、これを摂取した乳牛が硝酸中毒をおこす例が多く報告されるようになった。そのため牧草の硝酸態窒素含量について研究者や生産者の間で大きな関心が持たれている。

牧草や飼料作物の硝酸態窒素は、これまでいろいろな方法によって定量されてきたが、これらを大別するとつぎのようである。

(1) 1,2,4-フェノールスルホン酸と硝酸との反応によって生ずる黄色の化合物を比色して定量する方法 (フェノール硫酸法)^{2),6)}。

(2) 硫酸中に溶かされた硫酸第一鉄と硝酸との反応によって生ずる赤色の化合物を比色して定量する方法 (Morris らの方法)^{2),3)}。

(3) 硝酸を亜硝酸あるいはアンモニアに還元し、これを比色または滴定によって定量する方法⁵⁾。

しかし、これらの方法はいずれも操作が煩雑で多量の試料を迅速に処理することが不可能であり、その試薬も比較的高価なものを必要とする。

最近、簡便性と迅速性をもったイオン電極法による硝酸態窒素の定量法が開発されたの

* 酪農学科、家畜飼養学研究室

Laboratory of Animal Nutrition, Department of Dairy Science, The College of Dairying, Ebetsu, Hokkaido, Japan.

** 帯広畜産大学草地利用学研究室

Laboratory of Grassland Utilization, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Hokkaido, Japan.

で^{1),4),6)}, われわれはこれが牧草の硝酸態窒素定量法として適切であるかどうかを検討するために、イオン電極法による再現性と回収率を調査し、従来一般的に用いられている Morris らの方法と比較した。

材 料 と 方 法

1. イオン電極法による硝酸態窒素の定量

装置：硝酸イオン電極（オリオン社製，92-07 型）を装着したデジタルイオンメーター（オリオン社製，701 型）を使用した。

標準溶液：硝酸ナトリウム（特級）を蒸留水に溶かし、硝酸態窒素として 5, 10, 20, 50, 100 および 200 ppm の標準溶液を調製した。

試料：一般成分分析用に調製したオーチャードグラス，アルファルファおよびトウモロコシの乾燥・粉碎試料を供試した。

操作法：試料一定量（0.5～1.0 g）に 50 ml の蒸留水（以下水と略す）を加え，30 分間往復振とう後，ろ紙でろ過する。ろ液に硝酸イオン電極を挿入して電極電位（0.1 mV 精度）を読みとり，標準溶液より求めた検量線から硝酸態窒素を定量した。検量線はつぎのようにして作成する。片対数方眼紙の対数軸に硝酸態窒素濃度，均等軸に電位をとり，その方眼紙の上に，硝酸態窒素の標準溶液と電位との関係をプロットし，それぞれの点を通る線をもって検量線とする。なお，この検量線は使用のつど作成する。

2. イオン電極法による定量法の検討

(1) 水抽出法による抽出時間の影響：試料 0.5 g および 1.0 g に水 50 ml を加え，10, 20, 30 および 40 分間往復振とう抽出し，抽出液のろ液についてイオン電極法により硝酸態窒素を定量した。

(2) 水抽出法と煮沸抽出法との比較：試料 1.0 g に水 50 ml 加え，30 分間振とう抽出した場合と 30 分間煮沸抽出した場合の硝酸態窒素の定量値をイオン電極法により比較した。

(3) イオン電極法の精度の検討：イオン電極法の精度を検討するため，硝酸態窒素含量の異なる試料（いずれもオーチャードグラス）について，おのおの 5 回の反復測定による定量値の再現性をみるとともに，硝酸態窒素含量既知の試料に硝酸ナトリウムを 3～4 段階で添加し，回収率を調査した。

(4) イオン電極法と Morris らの方法による定量値の比較：イオン電極法と従来よく使用されている Morris らの方法による硝酸態窒素の定量値を 32 の試料を用いて比較した。Morris らの方法は，宮崎²⁾が紹介している方法に準じて行った。

結果および考察

1. 牧草からの硝酸態窒素の抽出法について

乾燥された飼料からの硝酸態窒素の抽出は、従来煮沸によって行われてきた^{2),4)}。今回、イオン電極法による分析の抽出法として、より簡便な水抽出法を試み、煮沸抽出法と比較した結果を Fig. 1 および Table 1 に示した。

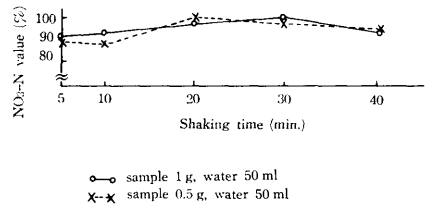


Fig. 1. Effect of shaking time on yield of nitrate.

Table 1. Effect of method of extraction with water on nitrate content in plant materials

Sample		NO ₃ -N (mg %)	
		Shaking for 30 min.	Boiling for 30 min.
Orchardgrass	1	32.0	30.7
"	2	52.8	49.3
"	3	77.7	79.2
"	4	170.5	175.8
"	5	233.0	217.0
"	6	389.4	393.1
"	7	394.6	387.1

まず、水抽出法による振とう抽出時間とイオン電極法による定量値の関係は Fig. 1 の通りである。すなわち、抽出時間 20~30 分で定量値が最大となることが知られた。

つぎに、水抽出法と煮沸抽出法による定量値の比較は Table 1 の通りである。定量値は両抽出法で極めて近似している。

以上のことから、牧草からの硝酸態窒素の抽出は 30 分間水で振とう抽出する方法を採用することにした。

2. イオン電極法の精度について

硝酸イオン電極を用いて測定した電位と硝酸態窒素濃度との検量線は Fig. 2 に示した。標準溶液中の硝酸態窒素濃度が変化するとネルンスト式に従って硝酸電極の電位が変化するが、硝酸態窒素濃度が 10~200 ppm の範囲では硝酸態窒素濃度の対数と電位がよく直線関係を示し、直線の勾配もネルンスト式におおむね一致した。しかし、10 ppm 以下の硝酸態窒素濃度では勾配が急激となり直線性が失われることが認められた。また、応答時間も硝酸態窒素濃度が低くなるにつれて長くなった。なお、今回の実験において、測定時に抽出液の攪拌を行わなかったが、今後は測定時に抽出液の攪拌を行い、安定までの所要

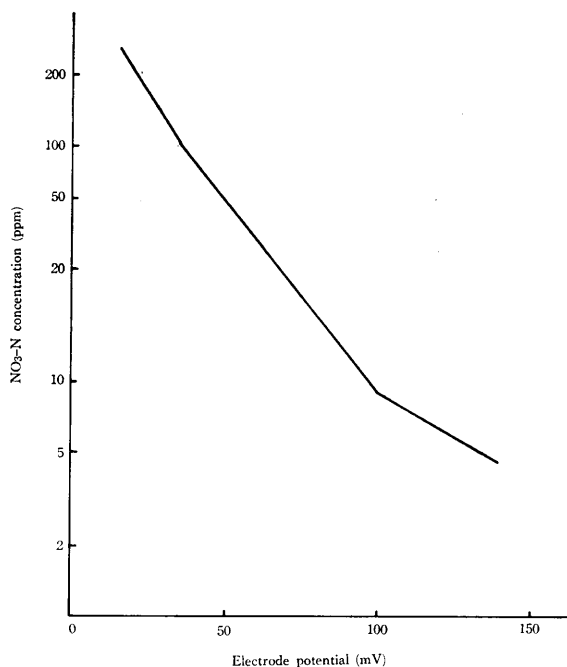


Fig. 2. Standard curve obtained with the nitrate electrode.

Table 2. Reproducibility of determination by the electrode method

Sample		Number of determination	Mean NO ₃ -N concentration (mg %)	Standard deviation (mg %)	Coefficient of variation (%)
Orchardgrass	1	5	36.6	1.38	3.8
"	2	5	47.3	1.23	2.6
"	3	5	74.9	1.35	1.8
"	4	5	177.4	3.19	1.8
"	6	5	371.9	2.60	0.7

時間を短縮するとともに、試料の採取量を加減することにより、検量線の直線部分で測定を行い、精度を向上させることが必要であろう。

イオン電極法による硝酸態窒素の定量値の再現性は Table 2 に示した。硝酸態窒素含量の異なるオーチャードグラスの反復測定における変動係数は 0.7~3.8% であった。とくに、家畜飼養上問題となる高硝酸態窒素含量の試料で高い精度が示された。Paul and Carlson⁴⁾ および Milham ら¹⁾ も同様に、イオン電極法により、いろいろな植物材料の硝酸態窒素含量を測定し、その変動係数はそれぞれ 3.1% および 1.52~2.61% であったと報告している。いっぽう、宮崎は²⁾、フェノール硫酸法および Morris らの方法による変動

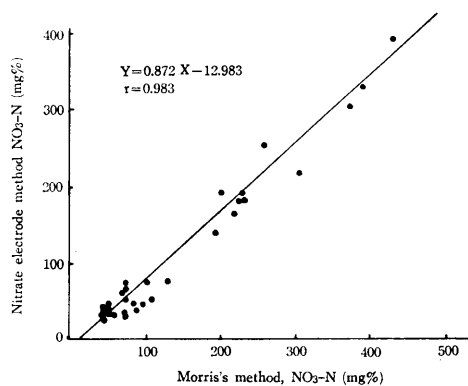
Table 3. Recovery of added nitrate from plant by the electrode method

Sample		NO ₃ -N in plant (mg)	Added NO ₃ -N (mg)	Recovery (%)
Orchardgrass 1		0.242	0.501	76.2
			1.002	92.2
			2.004	94.8
			4.008	97.8
” 2		0.281	0.501	90.3
			1.002	92.9
			2.004	99.3
			4.008	99.9
” 4		1.273	0.501	100.3
			1.001	99.1
			2.004	100.9
” 6		1.819	0.501	100.9
			1.002	102.0
			2.004	100.9

係数は前者で1.36%, 後方で3.05%と報告しており, イオン電極法による定量法が, 従来
の方法と同等以上の正確性を有していることが示唆された。

イオン電極法による硝酸態窒素の回収率は Table 3 に示した。既知濃度の試料に濃度の
異なる硝酸ナトリウム溶液を添加した時の回収率は, 低硝酸態窒素の試料でやや低かった
が, 添加硝酸態窒素量の増加にともない100% 近くになった。また, 高硝酸態窒素の試
料では, いずれの添加量においてもほぼ
100% の回収率が示された。Paul and
Carlson⁴⁾ および Milham ら¹⁾ は, イオン電
極法による回収率は, いずれもほぼ100%
であったと報告し, とくに後者は, デバル
ダ法のそれよりすぐれていることを指摘し
ている。

以上のように, 再現性および回収率から
判断して, イオン電極法は従来の方法と比
較して同等以上の精度をもつ分析法である
と考えられた。

**Fig. 3.** Comparison of nitrate electrode method and Morris's method for nitrate in 32 plant materials.

3. イオン電極法と Morris らの方法による定量値の比較

イオン電極法と Morris らの方法による牧草 32 点の硝酸態窒素の定量値の比較は Fig. 3 の通りである。すなわち、両者の間に $r=0.983$ ($P<0.001$) の相関がみられ、 $Y=0.872 X - 12.983$ の回帰式が得られ、定量値はほぼ一致した。Paul and Carlson⁴⁾ および Milham ら¹⁾ は、イオン電極法による定量値はフェノール硫酸法およびデバルダ法によるそれとよく一致することを認めている。

Morris らの方法は、従来粗飼料の硝酸態窒素の分析法としてもっとも簡便な方法とされているが²⁾、1 日に 10 点程度の分析しかできず、ルーチンワークとして用いる方法としては必ずしも適していない。それに対しイオン電極法は、操作法が極めて簡便かつ迅速なため、1 日に 50 点以上の分析が可能である。

なお、イオン電極法による硝酸態窒素の定量の際、抽出液中に塩素、重炭酸および有機酸などが多量に存在する場合、それらが定量値に干渉するといわれている^{1), 4)}。しかし、今回用いた材料においては、そのような現象は認められなかった。

このようにイオン電極法による牧草の硝酸態窒素の定量法は、正確性・簡便性・迅速性から判断して従来方法よりすぐれているといえる。

要 約

牧草の $\text{NO}_3\text{-N}$ 分析法として、イオン電極法の応用を試み、つぎのような結果を得た。

1. イオン電極法は、従来方法にくらべ、操作が極めて簡便であり、迅速に実施できる。
2. イオン電極法は、反復測定の変動係数 (0.7~3.8%) および回収率 (ほぼ 100%) から判断して従来法以上の精度を有する。
3. イオン電極法による硝酸態窒素の定量値は Morris らの方法によるそれとほぼ一致した。

謝 辞

本実験の実施にあたり、御指導と御配慮を賜った本学原田勇教授ならびに村山三郎教授に謝意を表する。

文 献

- 1) Milham, P. J., A. S. Awaad and J. H. Bull, 1970. Analysis of plants, soils and waters for nitrate by using an ion-selective electrode. *Analyst.*, **95**: 751-757.
- 2) 宮崎 昭, 1965. 粗飼料中の硝酸塩の定量方法について. *日畜会報*, **36**: 177-179.
- 3) 大山嘉信, 1971. 動物栄養試験法. pp. 338-339, 養賢堂, 東京.

- 4) Paul, J. L. and R. M. Carlson, 1968. Nitrate determination in plant extracts by the nitrate electrode. J. Agr. Food Chem., **16**: 765-768.
- 5) 提 忠一, 1975. 栽培植物分析測定法. pp. 231-235, 養賢堂, 東京.
- 6) Usher, C. D. and G. M. Telling, 1975. Analysis of nitrate and nitrite in foodstuffs: A critical review. J. Sci. Fd Agric., **2**: 1793-1805.

Summary

Studies were conducted to evaluate the use of nitrate ion electrode method for nitrate determination in aqueous extracts of dried plant materials.

The electrode method of analysis is rapid, simple, precise, and its results agree closely with those obtained by the ordinary Morris' method in the samples examined.