

内海区水産研究所業績第114号

養魚餌料消化試験の指標物質としての酸化  
クロームの湿式定量法について

古川 厚・塚原宏子

日本水産学会誌  
第三十二卷 第六号 別刷  
昭和四十一年六月二十五日発行

Reprinted from Bulletin of  
the Japanese Society of Scientific Fisheries

Vol. 32, No. 6, June 1966.

## 養魚餌料消化試験の指標物質としての酸化 クロームの湿式定量法について\*

古川 厚・塚原宏子

(1966年2月21日受理)

### ON THE ACID DIGESTION METHOD FOR THE DETERMINATION OF CHROMIC OXIDE AS AN INDEX SUBSTANCE IN THE STUDY OF DIGESTIBILITY OF FISH FEED\*

Atsushi FURUKAWA\*\* and Hiroko TSUKAHARA\*\*\*

Numerous aspects of the wet acidic digestion procedure for the assay of chromic acid in a small amount of feed and excreta were examined to study the digestibility of feed by marine fishes; these examined were the spectral absorption curves of solutions prepared by the wet acid digestion of chromic oxide (Fig. 1), the stability of chromic acid solution obtained (Tables 1, 2), the effects of the amount of perchloric acid added (Table 2) and the wavelength to prepare the concentration-optical density curve (Fig. 2).

The results of the present work showed that the following procedures were adequate for the study of digestibility. Weigh 50~100 mg sample containing 1~3 mg chromic oxide, wrap in a piece of filter paper and transfer to a dry 100 ml Kjeldahl flask. Add 5 ml of concentrated nitric acid in such a manner that it will wash down the particles adhered on the inside of the flask and allow to stand for a short period. Heat flask over a micro-electric heater which has the holes in the asbestos board covered so as to allow more heat to come in contact with the flasks. Allow the sample to digest until white precipitate is obtained (for about 20 minutes). When black particles adhere to the neck or side of the flask, wash them down by turning the flask 180°. Turn off the heater, cool the flask and 3 ml perchloric acid to the digestion mixture and then reheat until green colour changes to yellow, orange or red. The reversal change in colour frequently occurs if the flasks are cooled just after the change in colour from green to yellow, because of the insufficient oxidation of the content. Therefore, the extension of digestion for 10 minutes is necessary after the colour change. Cool slightly and add about 50 ml distilled water. Cool to room temperature and make up to 100 ml in a volumetric flask with distilled water. Allow to stand for a few minutes to precipitate inorganic material. Transfer solution gently from the volumetric flask to a colorimetric tube, and read optical density at 350 m $\mu$  against distilled water. The standard curve obtained by the wet acid digestion technique is expressed by the following equation;  $Y = 0.2089 X + 0.0032$ , where  $Y$  is the optical density at 350 m $\mu$ , and  $X$  is the chromic oxide content of the sample (mg/100 ml).

魚類の餌料成分消化率の測定法にはいろいろの種類があり、筆者はさきに直接法とも称すべき方法で餌料蛋白消化率を測定した<sup>1,2,3)</sup>。この方法は飼育水の減圧濃縮などに手数がかかり、必ずしも便利なものではない。これに対し間接法とも称すべき指標物質法が最近多くの研究者に採用され、中でも酸化クローム法が魚

内海区水産研究所業績 第 114 号

\* Studies on feed for fish (Part VII)

\*\* 東北地区水産研究所 (Tohoku Regional Fisheries Research Laboratory, Shiogama, Miyagi, Pref. Japan)

\*\*\* 内海区水産研究所大野分室 (Naikai Regional Fisheries Research Laboratory, Ohno Branch, 7737 Ohno, Saeki-Gun, Hiroshima Pref. Japan)

類研究においても重要な位置を占めるに至っている<sup>4,5,6,7)</sup>。

餌料あるいは糞中の酸化クロームの定量は、これをクローム酸または重クローム酸に酸化する過程で、乾式灰化熔融法あるいは湿式法にわかれる。従来前者が多く採用され、筆者もこの方法によりハマチの蛋白消化率の測定をした。しかしながら乾式法は測定時間が比較的長く、熔融により使用容器の消耗破損がはなはだしく、常時多数の試料を処理するものにとつては、不経済な点が多い。

湿式測定法は、試料処理は乾式法より簡単であるが測定条件の設定にやや難があるとされており、多くの研究者によつていろいろの条件づけがされている<sup>8,9,10,11,12)</sup>。

魚類における餌料成分の消化率測定にあつては、特に糞の採集が困難で多量を集めるためには多くの問題があり、したがつて分析試料としては少量にとどまらざるを得ない。本報告はこのような 50~100 mg (乾物基準) の試料を使用し、その中に含まれる 0.4~5 mg の酸化クロームの湿式定量について若干吟味をしたものである。

本研究にあつて、文献その他の便宜をはかつていただいた日本農産工業中央研究所麻生所長ならびに庄司圭吾氏に厚く感謝の意を表する。

## 測定法

**試薬** 硝酸 (比重 1.42)、過塩素酸 (70%) いずれも試薬一級の規格品。

**器具** 100 ml Kjeldahl フラスコ、島津 Spetronic 20 分光光度計。

**測定法** 試料 50~100 mg (酸化クローム 1~3 mg を含む) を 100 ml 容 Kjeldahl フラスコに精秤し、5 ml の硝酸を加えてしばらく放置する。径約 1 cm の穴をあけたスレート板をもつ電熱器上で緩やかに加熱し、約 20 分後に内容液が白色固形物を生ずるようになった時 (内容は約 1 ml) 加熱をやめ、冷却し、3 ml の過塩素酸を静かに注加し、加熱する。溶液は泡立ち白煙を生じ、液色が急に褐色に変ずる。変色直後の溶液は放冷中褪色することがあるので、その後さらに 10 分間加熱を継続する。放冷後蒸留水で 100 ml

に定容となし、透過率測定用溶液とする。透過率の測定は光波長 350 m $\mu$ 、蒸留水を対象として行なつた。

上記方法は付記のないかぎり、本報告の実験すべてに適用した。

## 実験結果および考察

**吸収曲線の測定** 酸化クロームのみ (A 液)、マダイの糞に約 2% の酸化クロームを混じたもの (B 液) を上記方法で処理した溶液の吸収曲線 (330 m $\mu$  より 460 m $\mu$  の間) は Fig. 1 に示した通りである。顕著な吸収を示す波長は 345 m $\mu$  の付近にある。かなり低い吸収点ではあるが 435~440 m $\mu$  の付近にも一つのピークが考えられた。

A 液、B 液ともほとんど一致した型の吸収曲線を示した。得られた曲線は J. CZARNOCKI ら<sup>17)</sup> のそれと全く一致すると考えられるので測定溶

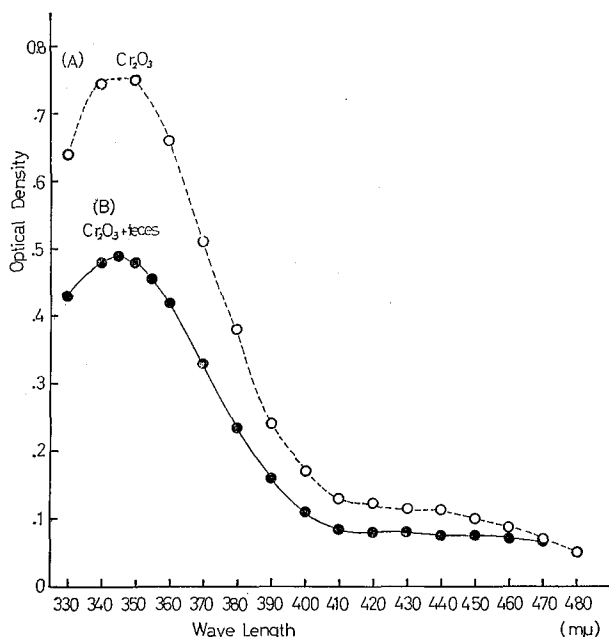


Fig. 1. Absorption spectra of solutions by the wet acid digestion of Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

液はいずれも酸化クロームが変じた dichromate ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ) であると考えてよいであろう。

375 m $\mu$  付近で特に曲線が変化を示さなかつたので、 $\text{CrO}_4^{2-}$  イオンの存在を否定してもよいであろう。乾式法では  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  がアルカリ性で酸化され  $\text{CrO}_4^{2-}$  イオンが生じその時の吸収曲線は 372 m $\mu$  に最大吸収点があるとされている<sup>13)</sup>。

重クロム酸イオンのかたちで定量する本法の場合には、440 m $\mu$  と 350 m $\mu$  のいずれかをえらぶべきであるが、きわめて少量の糞を使用せざるを得ない魚類実験の場合は、分析にあたってより sensitivity の高い 350 m $\mu$  が 440 m $\mu$  より適当であると考えられる。

**比色定量用溶液の安定性** 最終処理溶液の安定性は比色定量の際に重要なことで一般に発色溶液の保存時間はかなり厳格に規定されているのが普通である。本測定法により調製された最終処理溶液の安定度がどの程度であるかを吟味し次の結果を得た。すなわち  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  のみの処理溶液、魚粉との混合処理溶液について調製直後から2日目までの吸光度を光波長 350 m $\mu$  で測定した結果は Table 1, 2 の通りである。

Table 1. Stability of prepared solutions.

Sample Content of $\text{Cr}_2\text{O}_3$ Time kept	Optical density							
	$\text{Cr}_2\text{O}_3$ only (mg/100 ml)				$\text{Cr}_2\text{O}_3$ +Diet (mg/100 ml)			
	0.5	1.3	2.1	3.0	0.4	1.3	2.3	3.4
0	0.128	0.266	0.445	0.611	0.096	0.280	0.488	0.678
1 day	0.145	0.275	0.465	0.633	0.120	0.301	0.485	0.678
2 days	0.124	0.246	0.445	0.610	0.096	0.275	0.480	0.678

Table 2. Effect of the volume of perchloric acid on the stability of prepared solution.

Time kept (D) P. C. A. (ml)	Optical density					
	Soon after			1 day after		
	3	4	5	3	4	5
1	0.236	0.215	0.215	0.240	0.215	0.215
2	0.229	0.222	0.215	0.229	0.222	0.215
3	0.194	0.215	0.229	0.197	0.211	0.233
Mean	0.2197	0.2173	0.2197	0.2220	0.2160	0.2210

The results of analyses of variance

	ss	df	ms
Added P. C. A. (C)	0.000063	2	0.0000315
Day (D)	0.000003	1	0.000003
C $\times$ D	0.000010	2	0.000005
CD	0.000076	5	0.0000152
E	0.002457	12	0.000205
Total	0.002533	17	

$\text{Cr}_2\text{O}_3$  のみの場合  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  の濃度別放置時間別吸光度には1日目に高い値をしめす傾向がみられてはいるが、2日目にはもとかえつていいる。一方魚粉混合物の処理溶液においては比色定量について特に時間的考慮を必要としない。いずれにしても比色は溶液調製直後ないし 24 時間後に行なえばよいであろう。

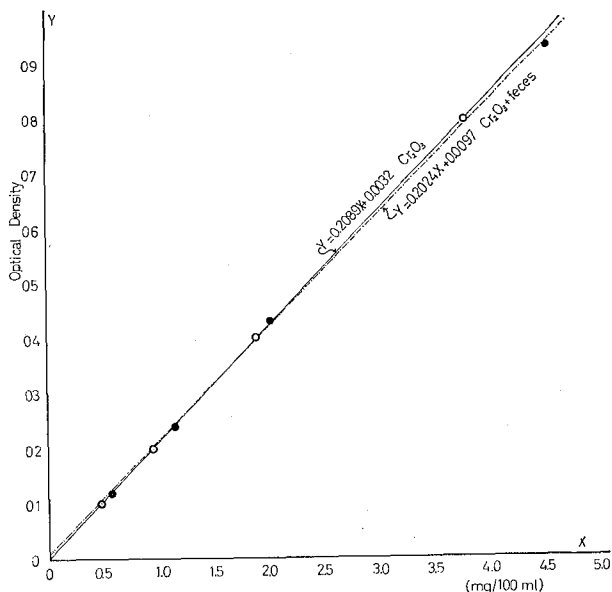


Fig. 2. Regression of chromic oxide concentration.

Table 3. The recovery of chromic oxide from excreta.

Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub> added to excreta mg/100 ml	Recoveries	
	mg	%
1.91	1.87	98
1.95	1.95	100
2.05	2.01	96
2.44	2.44	100
3.56	3.48	98
3.61	3.57	98

光度を求めた結果を Fig. 2 に示した。LAMBERT-BEER の法則が適用され、検定の結果は両式の回帰係数間には有意差は認められなかった。

**再現率** マダいの乾燥糞に既知量の Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> を混入し本方法により得られた分析値の再現率は Table 3 のようであった。すなわち約 98 % のかなり良いものであると考えてよいであろう。

## 要 約

魚類の餌料消化試験において指標物質として用いられる酸化クロムの湿式灰化酸化方式による定量法について、分析条件に若干の吟味を加え、少量試料 50~100 mg による比較的再現性のあるよい測定値を得た。測定方法の概略は次のようである。

試料 50~100 mg (乾物基準) (酸化クロム 1~3 mg を含む) を 100 ml 容 Kjeldahl フラスコに精秤し 5 ml の硝酸 (比重 1.42) を加え、約 20 分間加熱酸化する。放冷後 3 ml の過塩素酸 (70%) を静かに注加し、溶液が緑色より黄色を経て褐色に急変するまで加熱し、さらに変色後 10 分間加熱を継続する。放冷後蒸留水で 100 ml に定容し、光波長 350 m $\mu$  で蒸留水を対称に吸光度を測定し、次の検量式から酸化クロ

時に溶液中に無機物の沈澱の生ずる場合がみられるが、測定管に沈澱を注入しないように注意すれば障害となることはない。

**過塩素酸添加量** 加熱時間をほぼ一定にすれば、過塩素酸添加量の多少は最終処理溶液の酸性に関係して来る。このことが他の原因と一緒になつて吸光度測定値に変化をおよぼすことが考えられるので、この吟味を行なつた。

硝酸分解後に添加される過塩素酸量を 3, 4, 5 ml とし、それぞれ分解液が褐色に变じてからさらに 5 分間加熱を継続し、冷却後 100 ml に定容して 350 m $\mu$  の光波長で測定した。なお 24 時間後の測定も行ない最終溶液の時間的安定性の検討も行なつた。本検討に際しての Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

は 1 mg である。

得られた結果は Table 2 に示した。またこれらにもとづく分散分析の結果も並記した。添加された過塩素酸量 (3 ml から 5 ml の間) の差による吸光度間の差はみられず、24 時間後の変化もそれぞれの添加量別間にはみられなかった。

以上の結果から本測定法における過塩素酸の添加量はあまり問題とならず、試薬量および処理過程の便宜さから 3 ml の添加が適当と考える。

**検量線** Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 単独およびマダイ糞中に混入した場合の 0.5~4.5 mg の範囲内で本分析法にしたがい処理し吸

ームの含量を求める。

$$Y = 0.2089 X + 0.0032$$

ただし  $Y$  は吸光度,  $X$  は酸化クロームの mg/100 ml である。

#### 文 献

- 1) 花岡 資・古川 厚・小笠原義光: 本誌, **14**, 4, 219~222 (1948).
- 2) 古川 厚・小笠原義光: 本誌, **17**, 7, 45~48 (1951).
- 3) 古川 厚・小笠原義光: 内水研報告, No. 5, 25~29 (1954).
- 4) 能勢健嗣: 淡水研報告, **10**, 1, 11~22 (1960).
- 5) 稲葉伝三郎・荻野珍吉・高松千秋・菅野聖二・畑 博文: 本誌, **28**, 367~371 (1962).
- 6) 稲葉伝三郎・荻野珍吉・高松千秋・上田 忠・黒川憲一: 本誌, **29**, 242~244 (1963).
- 7) 北御門 学・森下達雄・立野新光: 本誌, **30**, 46~49 (1962).
- 8) D. W. BOLIN, R. P. KING and E. W. KLOSTERMAN: *Science*, **116**, 634~634 (1952).
- 9) K. M. DAY: *Science*, **120**, 717~718 (1954).
- 10) F. T. KIMURA and V. L. MILLER: *J. Agr. Food Chem.* **5**, 216 (1957).
- 11) J. CZARNOCKI, I. R. SIBBALD and E. V. EVANS: *Canadian J. of Animal Science*, **41**, 167~179 (1961).
- 12) 石川鹿生: 三重大学術報告, No. 18, 47~52 (1958).
- 13) 亀岡暎一・吉田 実・窪田大作・高橋正也: 農技研報告 C, No. 13, 67~72 (1957).