

# 微量拡散法によるアンモニア態窒素の定量法並びに Formol 法によるアミノ酸の定量について

片倉 健二・畑中 千歳

## A Microdiffusion Method for Ammonia-Nitrogen Assay and a Study on the Formol Method for Amino Acid Determination.

Kenji KATAKURA and Chitoshi HATANAKA

(1) A microdiffusion method was established for the determination of 5~40 $\gamma$  in 0.1 ml. samples of ammonia-nitrogen with an average recovery of 99.4~100.5%, where the technique employed is essentially the same as that described by E. J. Conway. The apparatus used, however, is different from his unit and is consisted of two curved test tubes (Fig. 1).

(2) The Formol method was found available in estimating separately the amino- and ammonia-nitrogens in the same samples when used in conjunction with the microdiffusion method. The average recovery of 0.5~2.5 mg. amino-nitrogen in 10 ml. samples was 97.0~103.0% with the concomitant content of 1~2 mg. ammonia-nitrogen.

### 緒 言

アミノ酸の定量に従来からよく用いられる方法として VAN SLYKE のガス分析法と SÖRENSEN の Formol 法とが挙げられる。前者はその信頼性に於いて後者よりも優れているが、条件の吟味、操作等の点からいえば遙かに後者の方が簡易であり実際的である。しかし、いずれにせよ、試料中に塩基窒素が共存する場合には両者共著しい影響を受け正確な値は得難い。著者等は携つてゐる仕事の関係で、多数の試料につき同時にアミノ酸と揮発性塩基窒素（主としてアンモニア態窒素）の定量を行わねばならない場合がある。そこで両者の定量法について若干検討を加えてみた。アンモニア態窒素の定量法については FOLIN の通気法、減圧蒸溜法、拡散法<sup>1)2)</sup>等があるが、拡散法が最も適している様に思われる。装置としては普通 CONWAY の unit<sup>1)3)</sup>を使用するか、高田、高橋等<sup>2)</sup>はシャーレを用いている。著者等は試験管利用の手製装置を用い好結果を得た。また、本法と Formol 法とを組合すことによつて、アミノ酸がアンモニア態窒素共存下に於いても、比較的正確に定量出来ることを知つたのでこれらの結果について報告する。

### I. 実 験 方 法

#### 1) 装 置

2×12 cm 及び 1×12 cm の試験管を第 1 図の様に曲げゴム栓を介して一組とする。

その他、滴定用としてマイクロビュレット（総量 2 ml, 1 目盛 1/100 ml）、試料採取用として 0.1~0.2 ml のマイクロピペットを用意する。

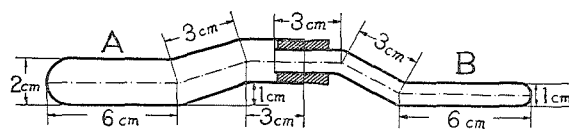


Fig. 1. Apparatus for Ammonia-Microdiffusion Analysis.

## 2) 試薬

指示薬含有定規  $H_2SO_4$  溶液及び定規  $NaOH$  溶液は常法<sup>1)</sup>に従つて調製し、標準検液としては  $NH_4Cl$  溶液を用いた。

その他、アンモニア放出用として飽和  $K_2CO_3$  溶液、ゴム栓塗布用白色ワセリン、固形パラフィンを用意する。

## 3) 操作

代表的な方法について述べる。第1図に於いて、先ず、ゴム栓の内室に接する部分にパラフィンを塗布し、B室に分析液 0.1 ml を採取する。この際管の下壁に沿つて静かに流し込む様にする。A室に  $N/600 H_2SO_4$  2 ml を採り、次いでゴム栓の中央部にワセリンを環状に塗布する。全面に塗布すると途中で装置がはずれる場合があるので、環状に塗り内方に摩擦面を作る様にする。最後にB室に飽和  $K_2CO_3$  溶液 0.3 ml を先を切つたピペットで下壁に沿いながら速やかに添加し、直ちに装置する。A部を右手で水平に保ち、人差指でゴム栓の部分を押え、静かにB部を左右前後に振盪し、分析液と飽和  $K_2CO_3$  溶液とを完全に混合する。装置を恒温器中の台に載せA、B両部を水平に保ち  $38^\circ C$  で吸収を行う。一定時間 (2~2.5時間) 後とり出し、B部をはずし、蒸溜水 1 ml でA室内面を洗滌してから  $N/600 NaOH$  で滴定する。

尚、 $N/600 H_2SO_4$  及び  $NaOH$  は  $NH_3-N: 5\sim 40\gamma/0.1 ml$  の試料に対して用い、 $NH_3-N: 40\gamma/0.1 ml$  以上の試料については  $N/100$  の酸及びアルカリを、 $NH_3-N: 5\gamma/0.1 ml$  以下の場合には  $N/1000\sim N/2000$  の酸及びアルカリを用いるとよい。また、実際の定量に於いては同一操作に従つて blank test を行い、これに並行して適当な濃度 ( $NH-N: 5\sim 20\gamma/0.1 ml$ ) の標準検液につき control test を行う様にする。

## II. 実験結果及び考察

### 1) 微量拡散法による $NH_3-N$ の定量

a) 分析液量と飽和  $K_2CO_3$  液量：第2図は夫々  $NH_3-N: 20\gamma$  を含む分析液 0.1, 0.2, 0.3 及び 0.4 ml に対し飽和  $K_2CO_3$  溶液 0.3 ml を加え、A室に  $N/600 H_2SO_4$  2 ml を採り、 $38^\circ C$  で吸収を行つた結果である。第3図は分析液量及び飽和  $K_2CO_3$  液量と完全吸収時間との間係を示したものであり、 $I_1$  は飽和  $K_2CO_3$  溶液 0.3 ml,  $I_2$  は 0.5 ml を用い、A室に  $N/600 H_2SO_4$  2 ml を容れ吸収を行つたものである。II<sub>1</sub> 及び II<sub>2</sub> は、I とは逆に、飽和  $K_2CO_3$  溶液 0.3 ml, または 0.5 ml をA室に添加し、B室に  $N/600 H_2SO_4$  1 ml を容れ完全吸収時間をみたものである。この場合は液量の関係でB室内面の洗滌は省略し直ちに

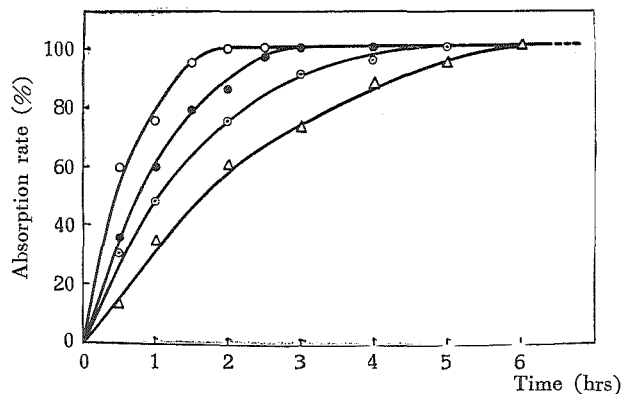


Fig. 2. The Relation between Ammonia-Absorption Rate and Sample Volume.

- (○—○) : 0.1 ml. sample solution.
- (●—●) : 0.2 ml. sample solution.
- (⊙—⊙) : 0.3 ml. sample solution.
- (△—△) : 0.4 ml. sample solution.

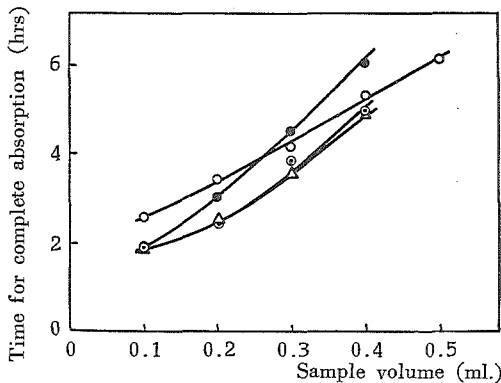


Fig. 3. Influence of  $K_2CO_3$  Addition on Ammonia-Absorption.

- (●—●): added with 0.3 ml. saturated  $K_2CO_3$  solution (I<sub>1</sub>).  
 (○—○): added with 0.5 ml. saturated  $K_2CO_3$  solution (I<sub>2</sub>).  
 (⊙—⊙): added with 0.3 ml. saturated  $K_2CO_3$  solution (II<sub>1</sub>).  
 (△—△): added with 0.5 ml. saturated  $K_2CO_3$  solution (II<sub>2</sub>).  
 (I):  $NH_3$  absorbed by 2 ml. N/600  $H_2SO_4$  in chamber A.  
 (II):  $NH_3$  absorbed by 1 ml. N/600  $H_2SO_4$  in chamber B.

於いては、Iに比較して、同量分析液に対する拡散面積は著しく大となり、液層も薄くなるが、分析液 0.1 ml の場合、完全吸収時間に殆んど差はなく、また、他の場合に於いても 30 分程度の短縮がみられるにすぎない。飽和  $K_2CO_3$  液量との関係では I の如き明らかな差は得られなかつた。これらに対する一原因として吸収面積が I に比較して非常に狭くなつたことが考えられる。II の方法では管が細く滴定操作にやや困難な点があるので、以下の実験ではすべて I<sub>1</sub> の方法に従つた。尚、分析液としては 0.1 ml を採用した。

b) 温度: 第 4 図は温度と完全吸収時間との関係を示したものである。NH<sub>3</sub>-N は 20  $\gamma$  を用いた。図から明らかな様に、温度と完全吸収時間との間には負の相関があり、38°C では完全吸収に約 2 時間必要とするが、60°C では 1 時間足らずでよい。しかし、高温に於いては、アミド、あるいは有機窒素物が分解し、アンモニアを生ずるおそれがあるので他の実験は、すべて 38°C で行つた。

c) NH<sub>3</sub>-N 量: 第 5 図は NH<sub>3</sub>-N : 5~45  $\gamma$  / 0.1 ml を含む溶液につき、飽和  $K_2CO_3$  溶液 0.3 ml を加え、N/600  $H_2SO_4$  2 ml で吸収を行つた結果である。図から明らかな様に、一例 (NH<sub>3</sub>-N : 45  $\gamma$ ) を除くと、窒素量には殆んど関係なく約 2 時間で吸収は終る様である。尚、NH<sub>3</sub>-N : 45  $\gamma$  は N/600  $H_2SO_4$  2 ml の最大吸収理論値の 96.5% に相当する。以上の結果から、窒素量が多くなりすぎると完全吸収時間はやや延長される様であるが、窒素量が酸の最大吸収理論値の範囲内であれば、窒素量には殆んど無関係に、約 2 時間で完全に吸収されると考えてよいと思う。

滴定した。尚、I, II 共に各分析液は NH<sub>3</sub>-N : 20  $\gamma$  を含み 38°C で吸収を行つた。

図より明らかな様に、いずれの場合も分析液量の増加と共に完全吸収時間は長くなつてゐる。また第 3 図の I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub> にみられる様に、少量の分析液に対しては飽和  $K_2CO_3$  溶液も少量用いた方が有効な様である。CONWAY<sup>1)</sup> によれば、定規アンモニア液の pH が 11.6 の場合、全アンモニアの 99.5% が遊離ガスとして存在し、また、液層の厚みの増加はガス発生を妨げる様である。従つて、必要以上に飽和  $K_2CO_3$  溶液を加えることは避けるべきである。II<sub>1</sub>, II<sub>2</sub> に

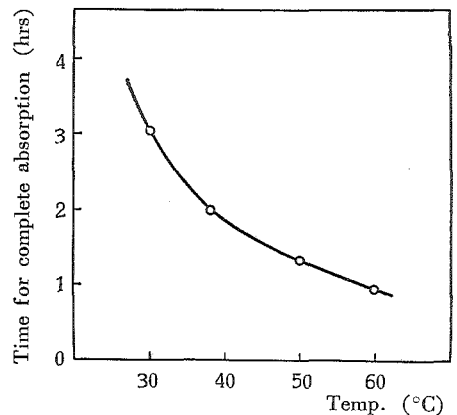


Fig. 4. Influence of Temperature on Ammonia-Absorption.

d) 吸収用酸濃度：第6図は酸濃度と吸収との関係を示したものである。酸としては N/800, N/1200, 及び N/2400  $H_2SO_4$  を用い、 $NH_3-N$  は最大吸収理論値の 42.75%, 即ち, 15, 10 及び 5  $\gamma$  を与えて行つた。滴定はすべて N/1000 NaOH で行つた。図から明らかな様に、酸濃度に関係なく約 2 時間で吸収は完了している。これは先の  $NH_3-N$  量と吸収時間との関係で得られた結果を裏付けるものである。

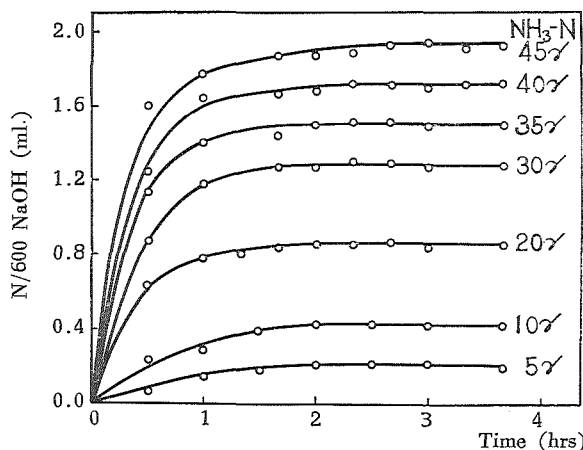


Fig. 5. The Relation between Ammonia-Absorption Rate and Sample Concentrations.

e) 精度：第1表は精度を検討するために  $NH_4Cl$  溶液 ( $NH_3-N$ : 5~40 $\gamma$ /0.1 ml) につき行つた分析結果である。吸収時間として 2.5 時間を採用した他はすべて上述の方法に従つた。滴定には N/600 NaOH を用いた。尚, N/600 NaOH 1 ml は  $NH_3-N$ : 23.33  $\gamma$  に相当する。第1表によると、平均回収率は 99.4~100.5% であり、誤差は僅かに 0.6% である。個々の回収率からみると 98.7~101.0% となり、

Table 1. Recoveries of Ammonia-Nitrogen by the Microdiffusion Method.

$NH_3-N$ Contents ( $\gamma$ /0.1ml.)	No. of Experiments	NaOH required (ml, N/600)	$NH_3-N$ obtained ( $\gamma$ /0.1ml.)	Recovery (%)	Mean Recovery (%)
5.00	1	0.216	5.05	101.0	100.5
5.00	2	0.216	5.05	101.0	
5.00	3	0.213	4.97	99.4	
10.00	1	0.423	9.87	98.7	99.6
10.00	2	0.426	9.94	99.4	
10.00	3	0.431	10.06	100.6	
15.00	1	0.646	15.07	100.5	99.4
15.00	2	0.636	14.84	98.9	
15.00	3	0.636	14.84	98.9	
20.00	1	0.858	20.02	100.1	99.7
20.00	2	0.858	19.83	99.2	
20.00	3	0.855	19.94	99.7	
30.00	1	1.286	30.00	100.0	99.6
30.00	2	1.275	29.75	99.2	
30.00	3	1.279	29.84	99.5	
40.00	1	1.720	40.13	100.3	100.0
40.00	2	1.710	39.89	99.7	
40.00	3	1.714	39.98	100.0	

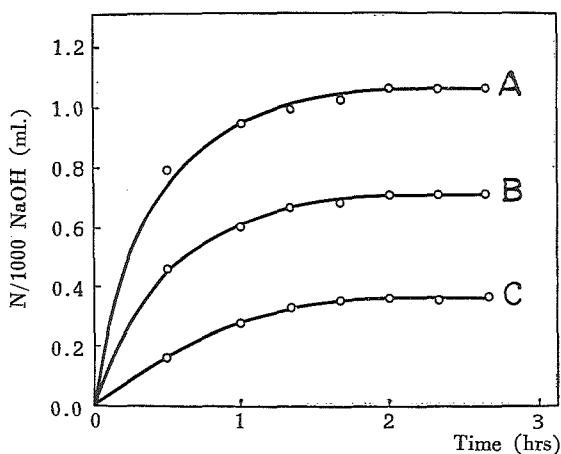


Fig. 6. The Relation between Ammonia-Absorption Rate and Sulfuric Acid Concentrations.

A : N/ 800 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>3</sub>-N : 15γ.

B : N/1200 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>3</sub>-N : 10γ.

C : N/2400 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>3</sub>-N : 5γ.

点がある。また、吸収時間の延長はさほど不便ではなく、場合によっては、室温で一晩吸収を行い翌朝滴定するとよい。実際の定量所要時間は一試料につき僅か数分であり、多数の試料を短時

誤差は 1.3% となるが、2・3 の例を除くと殆んど 1% 以内である。

f) 考 察: 以上の様に, NH<sub>3</sub>-N : 5~40 γ に対して誤差 0.6% という値が得られたが, 精度としては極めて高いといえよう。完全吸収には少なくとも 2 時間を必要とするが, 他の報告者<sup>2)</sup>の値 (35~40 分) と比較すると相当長い。これは主として装置の構造に原因するものと考えられる。しかし, 他の装置と比較して, 本装置は, 1) 洗滌が容易である, 2) 滴定し易い, 3) 試料は僅か (0.1ml) でよい, 4) 試験管とゴム栓さえあれば研究室で手軽に作れる等の利

Table 2. Recoveries of Ammonia-Nitrogen by the Formol Method.

NH <sub>3</sub> -N Contents (mg/10ml.)	No. of Experiments	NaOH required (ml., N/10)	NH <sub>3</sub> -N obtained (mg./10ml.)	Recovery (%)	Mean Recovery (%)
1.00	1	0.72	1.01	101.0	99.3
1.00	2	0.71	0.99	99.0	
1.00	3	0.72	0.98	98.0	
2.00	1	1.42	1.99	99.5	99.7
2.00	2	1.43	2.00	100.0	
2.00	3	1.42	1.99	99.5	
3.00	1	2.13	2.98	99.3	99.5
3.00	2	2.15	3.00	100.0	
3.00	3	2.13	2.98	99.3	
4.00	1	2.86	4.00	100.0	100.1
4.00	2	2.87	4.02	100.5	
4.00	3	2.85	3.99	99.8	
5.00	1	3.59	5.03	100.6	100.5
5.00	2	3.59	5.03	100.6	
5.00	3	3.58	5.01	100.2	
6.00	1	4.29	6.01	100.2	99.7
6.00	2	4.25	5.96	99.3	
6.00	3	4.27	5.98	99.7	

間で処理出来る。極く微量の  $\text{NH}_3\text{-N}$  はゴム栓等に吸着されるおそれもあるが、実験範囲内ではその心配はない様である。

## 2) Formol 法によるアミノ酸定量に対する検討

a)  $\text{NH}_3\text{-N}$  による Formol 価の消費：第2表は  $\text{NH}_3\text{-N}$  による Formol 価の消費を調べた結果である。定量は常法に従った。即ち、分析液 10 ml に対しフェノールフタレイン溶液2滴を加え、中和後ホルマリン液（市販品を2倍に希釈し中和したもの）10 ml を加え、N/10 NaOH で微赤色になる迄滴定した。表から明らかな様に、N/10 NaOH 1 ml は  $-\text{NH}_2\text{-N}$  の場合と同じく N : 1.4 mg に相当することがわかる。回収率よりみた誤差は約 0.7 % である。 $\text{NH}_3\text{-N}$  として  $\text{NH}_4\text{Cl}$  の他に  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  及び  $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COONH}_4$  についても検討したが同様な結果が得られた。以上の結果から、アミノ酸の定量に於いて、 $\text{NH}_3\text{-N}$  が共存する場合でも、別法で  $\text{NH}_3\text{-N}$  を定量しておき、それに相当する Formol 価を差引く様にすれば、Formol 法によるアミノ酸の定量が可能となるはずである。

Table 3. Differential Determination of Amino- and Ammonia-Nitrogens by the Combination of the Formol Method and the Microdiffusion Method.

N-Contents		Formol Method		Microdiffusion Method		(a)-(b)	Recovery (%)
$-\text{NH}_2\text{-N}$ (mg./10ml)	$\text{NH}_3\text{-N}$ (mg./10ml.)	(a) $-\text{NH}_2\text{-N}$ + $\text{NH}_3\text{-N}$ (mg./10ml.)	Recovery (%)	(b) $\text{NH}_3\text{-N}$ (mg./10ml)	Recovery (%)	$-\text{NH}_2\text{-N}$ (mg./10ml)	
0.50	0.00	0.49	98.0	—	—	—	—
0.50	1.00	1.50	100.0	0.99	99.0	0.51	102.0
0.50	2.00	2.48	99.2	1.98	99.0	0.50	100.0
1.00	0.00	1.02	102.0	—	—	—	—
1.00	1.00	2.00	100.0	1.01	101.0	0.99	99.0
1.00	2.00	2.98	99.3	2.01	100.5	0.97	97.0
1.50	0.00	1.51	100.7	—	—	—	—
1.50	1.00	2.48	99.2	0.99	99.0	1.49	99.3
1.50	2.00	3.50	100.0	1.98	99.0	1.52	101.3
2.00	0.00	2.02	101.0	—	—	—	—
2.00	1.00	3.05	101.7	0.99	99.0	2.06	103.0
2.00	2.00	3.99	99.8	1.97	98.5	2.02	101.0
2.50	0.00	2.49	99.6	—	—	—	—
2.50	1.00	3.47	99.1	1.01	101.0	2.46	98.4
2.50	2.00	4.48	99.6	2.01	100.5	2.47	98.8

b)  $\text{NH}_3\text{-N}$  共存下に於けるアミノ酸の定量：第3表は、微量拡散法と Formol 法との組合せによる  $\text{NH}_3\text{-N}$  と  $-\text{NH}_2\text{-N}$  の分別定量の結果である。 $\text{NH}_3\text{-N}$  としては  $\text{NH}_4\text{Cl}$  を、 $-\text{NH}_2\text{-N}$  としてはグリシンを用いた。表中の値は、 $-\text{NH}_2\text{-N}$  : 0.5~2.5 mg/10ml 及び  $\text{NH}_3\text{-N}$  : 1~2 mg/10ml を含む溶液についての2回の分析結果の平均値である。微量拡散法では分析液 0.1 ml, 飽和  $\text{K}_2\text{CO}_3$  溶液 0.3 ml を用い、表中には実測値の100倍の値を示した。Formol 法の場合は分析液 10 ml につき前述の方値で定量した。表より明らかな様に、 $-\text{NH}_2\text{-N} + \text{NH}_3\text{-N}$

N としての回収率は 98.0~102.0% であるが,  $-\text{NH}_2\text{-N}$  としての回収率は 97.0~103.0% となり, 誤差は 3% である.

c) 考 察: Formol 法によるアミノ酸の定量に於いて, 塩基窒素が共存する場合には甚しい影響を受け, 正確な値が得られないということは衆知の事実であるが, 以上の結果から明らかな様に, 微量拡散法と組合すことによつて,  $\text{NH}_3\text{-N}$  が共存する場合でも約 3% の誤差でアミノ酸の定量が可能ながわかつた. いずれにせよ, 多数の試料を短時間で処理しようとする場合, 操作, 設備の点で最も簡単な Formol 法が  $\text{NH}_3\text{-N}$  共存下に於いても使用出来るということは極めて好都合なことと思う.

### Ⅲ. 要 約

1) E. J. Conway の微量拡散法の原理を応用し, 試験管利用の手製装置 (第 1 図) によるアンモニア態窒素の定量法を考案した. 平均回収率は  $\text{NH}_3\text{-N}$ : 5~40 $\gamma$ /0.1 ml に対し 99.4~100.5% であつた.

2) Formol 法によるアミノ酸の定量に一検討を加え, 微量拡散法と組合すことによつて,  $\text{NH}_3\text{-N}$  共存下に於いてもアミノ酸の定量が可能なることを知つた. 平均回収率は,  $\text{NH}_3\text{-N}$ : 1~2 mg/10 ml 共存下に於いて,  $-\text{NH}_2\text{-N}$ : 0.5~2.5 mg/10 ml に対し 97.0~103.0% であつた. 終りに, 本実験に当り有益な助言を賜つた本学理学部中原清士助教授に謝意を表する.

### 文 献

- 1) E. J. CONWAY (1950): Microdiffusion Analysis and Volumetric Error, 3 rd. Ed., Crosby Lockwood and Son, London ; 石坂音治訳 (1957): 微量拡散分析及び誤差論, 改訂第 2 版, 南江堂, 東京.
- 2) 高田侃, 高橋信之 (1954): 揮発性塩基窒素と全窒素の吸収定量法, 化学の領域, **8**, 259~264.
- 3) 京大農芸化学教室編 (1957): 農芸化学実験書, 521.