

二三の Kjeldahl 窒素定量法の比較研究 土壌及び植物質への応用

Kinnosuke Niina: A Comparative Study of Four Kjeldahl Methods.
Application to Soils and Plant Materials.

農林技官 新 名 謹 之 助

I 緒 言

Kjeldahl 窒素定量法の触媒を 適当に 選択することにより 分解及び 熟成の時間を 短縮し、分析を 迅速に 終らせる 試みについては、従来 多数の研究が 行われている。著者の 所属する 実験室では 多数の 土壌や 植物質の 全窒素を 定量する 必要が 頻繁にある。そこで これら 試料について 迅速で 而も 分析値の 高い方法が 見出されれば 好都合である。尙研究用 としてばかりでなく、routine work 式な 実用分析にも 往々用いるので、 SeOCl_2 の如き あまり 特殊な 試薬は 用いたくない。Stubblefield & De Turk⁽¹⁾ 法は 土壌や 植物質に対して 極めて 優秀な 成績を示して いて、この 目的に 適合するもの と思われる。また 最近 Patel & Sreenivasan⁽²⁾ が 詳細に 研究した 方法も 優秀なもの と思われるが、不幸にも 土壌や 植物質への 応用例が 示されていない。そこで 著者は 土壌や 植物質を 試料として 前法を 追試すると 共に、後法を 新たに 並行実験して 両者の 性能の 比較を行い、更に 当実験室に 於て 従来用いた 二方法をも これらに 対比せしめた。即ち 本報に 用いた 方法を 試薬によつて 表示すると 次の 如くなる：

A法： $\text{CuSO}_4 + \text{K}_2\text{SO}_4$

B法： $\text{Se} + \text{CuSO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$ [Ohmasa⁽³⁾]

C法： $\text{HgO} + \text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 + \text{K}_2\text{HPO}_4$ [Stubblefield & De Turk⁽¹⁾]

D法： $\text{HgO} + \text{Se} + \text{CuSO}_4 + \text{K}_2\text{SO}_4$ [Patel & Sreenivasan⁽²⁾]

最後の NH_3 定量は、通常は 一定容の 酸標準液に NH_3 を 吸収させ 過剰の 酸を アルカリ 標準液で 滴定して 行つて いるが、本実験では この 間接法を 避け、 吸収液として 4%-硼酸 溶液を用い これを 酸標準液で 直接滴定する 方法を採用 してみた。

II 実 験

(1) 器具：200 ml.-Kjeldahl フラスコ。普通の ガス・バーナー式 分解台。アスベスト 附金網は 水でしめ してから 押し 凹めて 台の穴にはめ、フラスコ の底が 出来る だけよく 焰の部分に 当るように した。普通の 水蒸気 蒸溜装置。 滴定の際の 酸の ビューレットの 読みは、本実験の 規模では 10 ml. 以下である から、10 ml. 容セミマイクロ・ビューレット (一目盛 0.02 ml.) を 検

度して用いた。

(2) 試薬: a. 分解用濃硫酸: 毎回10 ml. b. 触媒及び助剤: 最大約 15mg., 平均約 8mg. の窒素を含有する試料に対し毎回第 1 表の処方を用いた。K₂HPO₄ (稍々吸湿性) 及び Fe₂(SO₄)₃ (無定形粉末) 以外はサラサラしていてメノウ乳鉢内で微細にしつつ均一に混合しうるから、処方の数十倍量の混合物をつくっておける。この点では A 及び D 法は便利で、B 及び C 法は不便である。 c. 30%-NaOH 溶液: 過剰に加える。 d. 5%-Na₂S₂O₃ 溶液: HgO を用いる C 及び D 法の蒸溜に際し、Hg-NH₄-錯化合物を破壊するため NaOH と共に 10 ml. 添加する。 e. NH₃ 吸収液: 下記の如くにして調製した 4%-硼酸溶液 20 ml. をメス・シリンダーでとり 200ml.-三角フラスコ中に移す。 f. 0.1N-H₂SO₄ 標準液: 3 回再結した Na₂B₄O₇·10H₂O の一定量を秤取し水に溶解したものに対し、methyl red を指示薬として標定した。

Table 1. Catalysts and promoters, in gram unit.

Method	CuSO ₄ ·5H ₂ O	Se	HgO	K ₂ SO ₄	K ₂ HPO ₄	Fe ₂ (SO ₄) ₃	Note
A	0.3	—	—	2.7	—	—	* P ₂ O ₅ was used in the original.
B	0.15	0.15	—	—	3*	—	
C†	—	—	0.26	—	4	2.4	† 2/5 and †† 1/2 quantity in the original method, respectively.
D††	0.1	0.025	0.25	3	—	—	

硼酸溶液の調製法: H₃BO₃ 40g を水 1l 中に入れ暫時煮沸して溶解する。冷後これに混合指示薬 (Brom-resol green, 0.1%-アルコール溶液 3 部 + methyl red, 0.2%-アルコール溶液 1 部) を 2~3ml. 加えるとブドウ酒のような赤色を呈する。これに 0.1N 位の NaOH 溶液を注意しつつ数滴加入して紫色調を帯びる。一手前迄もつてゆく。本溶液をパイレックス級の試薬瓶中に密栓して貯える。室温の低い季節には硼酸の結晶が析出して紫色調を帯びてくることがある。この場合には温湯の中へ瓶をつけて結晶を溶解してしまうと色が元に戻るから、その後に使用する。

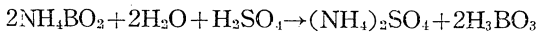
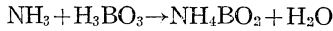
(3) 試料: 第 2 表の如きものを用いた。

Table 2. List of samples.

Sample	Description	Drying loss (105~110°), %	Weight of Sample, g.
Soil No. 1	Volcanic ash, Horizon A ₁ , Iwate Pref. (岩手県元盛岡農専演習林, A ₁ 層)	30.37	ca. 0.8
Soil No. 5	Volcanic ash, F layer, Iwate Pref. (岩手県滝沢, アカマツ F 層)	17.48	0.6
Soil No. 41	Volcanic ash, Horizon B ₂ , Iwate Pref. (岩手県上防山国有林, B ₂ 層)	18.56	1
Cedar leaf	Nursery tree, air-dried, powdered. (林業試験場苗圃苗木, 風乾後製粉)	11.15	0.6
Soybean	Air-dried, powdered.	12.81	0.2
Wheat	Home-grown, powdered.	14.42	0.3

(4) 操作法: 常法通り操作したから注意すべきことについてのみ述べる。a. 比較実験の性質上ガス焰は最初から強い酸化焰が分解台の円い穴を充分おおう程度に強くし、最後迄同様に保つよう注意した。b. 分解液は冷後 25 ml. の水で稀釈する。c. 蒸溜しはじめると吸収液の色は緑色になる。蒸溜中吸収液が温くならないよう注意する。内容が 150 ml. 位になつたら、蒸溜をやめる。d. 滴定は充分攪拌しつつ行い、緑色から紫色がかつた色を経て赤色に変わる点を以て終点とする。鋭敏である。e. 各方法につき試料のあるときと全操作を全く同じくして blank test を行い、最後の H₂SO₄ 消費量を求めておき、これを試料のあるときの滴定値から差引き、試薬類からの窒素の補正とした。著者の場合は方法によつて最低 0.27 ml., 最高 0.41 ml. (いずれも 3 回の平均値) の値を示した。

(5) 計算法:



0.1N-H₂SO₄, 1 ml. ≡ 1.4008 mg N

$$x \text{ mgN} = 1.4008 \times f(0.1\text{N-H}_2\text{SO}_4 \text{ のファクター}) \times V \left(\frac{0.1\text{N-H}_2\text{SO}_4 \text{ の ml. 数}}{-\text{blank の ml. 数}} \right)$$

$$W \text{ mg}(105 \sim 110^\circ \text{ 乾燥試料}) = w \text{ mg}(\text{風乾試料}) \times \{100 - \text{乾燥減量, \%}\}$$

$$X \% \text{N} = \frac{x}{W} \times 100$$

(6) 実験結果: 値は原則として少くとも 2 回の平均をとり、結果の一致が不充分なときは何回も繰返した。相対平均偏差は 0.4% 以下であつた。

[実験 1] A 法による NH₄Cl 溶液の分析 (第 3 表)

Table 3. Recovery of nitrogen using NH₄Cl (Theoretical N: 26.18%).
NH₄Cl solution: 0.0287₉ g / 10 ml.

Catalyst	Nitrogen recovery, % N.			
	Time of digestion, min.			
	0	30	60	90
A. CuSO ₄ +K ₂ SO ₄	24.97	26.01	26.10	26.17

[実験 2] A, B, C, D 法の比較。a. 試料: 土壌 No. 1 (第 4 表及び第 1 図)。b. 試料: スギの葉 (第 5 表及び第 2 図)。

Table 4. Comparative nitrogen recovery with Soil No. 1.

Catalyst	Time of clearance, min.	Nitrogen recovery			
		At clearance	Minutes after clearance		
			30	60	90
A. CuSO ₄ +K ₂ SO ₄	60	1.12 ₀	1.17 ₅	1.18 ₄	1.19 ₁
B. Se+CuSO ₄ +K ₂ HPO ₄	20	1.16 ₅	1.20 ₉	1.23 ₇	1.24 ₅
C. HgO+Fe ₂ (SO ₄) ₃ +K ₂ HPO ₄	15	1.21 ₂	1.26 ₀	1.28 ₄	1.28 ₈
D. HgO+Se+CuSO ₄ +K ₂ SO ₄	13	1.23 ₉	1.25 ₅	1.26 ₉	1.27 ₁

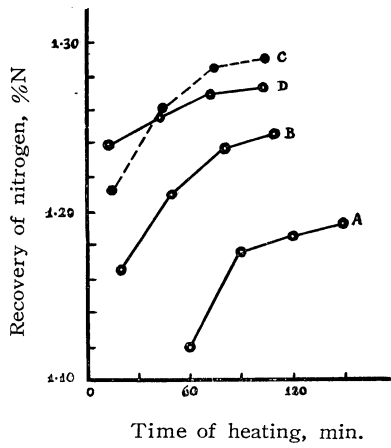


Fig. 1. Comparative nitrogen recovery with Soil No. 1.

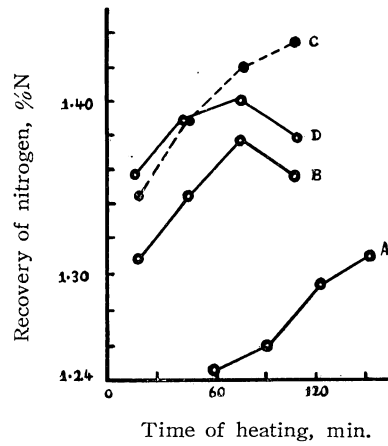


Fig. 2. Comparative nitrogen recovery with Cedar leaf.

Table 5. Comparative nitrogen recovery with Cedar leaf.

Catalyst	Time of clearance, min.	Nitrogen recovery, %N			
		At clearance	Minutes after clearance		
			30	60	90
A. $\text{CuSO}_4 + \text{K}_2\text{SO}_4$	58	1.24 ₆	1.26 ₀	1.29 ₆	1.31 ₁
B. $\text{Se} + \text{CuSO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$	15	1.31 ₀	1.34 ₇	1.37 ₈	1.35 ₇
C. $\text{HgO} + \text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 + \text{K}_2\text{HPO}_4$	17	1.34 ₉	1.39 ₀	1.42 ₀	1.43 ₃
D. $\text{HgO} + \text{Se} + \text{CuSO}_4 + \text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$	16	1.35 ₉	1.39 ₀	1.40 ₁	1.37 ₉

〔実験3〕 応用例： 次項に述べる実用的見地から4種の試料にD法 (After boil 30分) を適用し、その結果をA法 (After boil 60分) の場合と比較した (第6表)。

Table 6. Application of D method to soils and plant materials, as compared with A method.

A: $\text{CuSO}_4 + \text{K}_2\text{SO}_4$; D: $\text{HgO} + \text{Se} + \text{CuSO}_4 + \text{K}_2\text{SO}_4$

Sample	Method	Time of clearance, min.	Minutes after clearance.	Total time required, min.	%N	Difference (D-A), %N	$\frac{D-A}{A} \times 100, \%$
Soil No. 5	D	13	30	43	1.46	} 0.11	ca. 8
"	A	42	60	102	1.35		
Soil No. 41	D	15	30	45	0.23	} 0.05	28
"	A	45	60	105	0.18		
Soybean	D	11	30	41	6.96	} 0.20	3
"	A	27	60	87	6.76		
Wheat	D	10	30	40	1.84	} 0.16	10
"	A	26	60	86	1.68		

Ⅲ 考 察

(1) 本研究の性質上〔実験1〕以外には試料として化合物を用いなかつた。化合物を用いた例は Patel & Sreenivasan の論文⁽²⁾並びにその引用文献中に多数見出されるから、それらを参照されたい。これらについての結果を吟味すると、分解及び熟成時間と収量の関係は触媒の種類は勿論のこと試料化合物中の窒素の結合状態によつて相当異なることが明白となる。従つて自然物のような試料に好適な触媒と熟成条件を選定するには、化合物についての所見をそのまま直ちに適用するわけにはいかないことに留意すべきである。

(2) 〔実験1〕について：本報の試料はすべて自然物であるから、実験の全操作が果して適正であるか否かをその分析値のみから判断出来ない。そこで NH_4Cl のような最も単純な化合物の濃度既知溶液に対し、反応に最も長時間を要するが最も安全な A 法を適用したところ、最後に殆んど理論値に近い値がえられた。よつて全操作は適正であると思つてよからう。

(3) NH_3 吸収液について：a. 4%-硼酸溶液を用いることの簡便さは既に種々な新しい分析書⁽⁴⁾に記載されているが、この方面ではあまり実用されていないようである。硼酸は稍々高価であるが、著者はそれを償つてあまりある利点をもつものと思う。本法によれば、i) 標準液は滴定用として殆んど安全で且つ取扱いやすい酸溶液のみ用意すればよい。従つて調製・標定・滴定・保存・その他の取扱いに於て特別な注意を要し、且つ初心者に過誤を生じさせやすい NaOH 溶液を用いないですむ。ii) 吸収液は大体の濃度のものを大体一定容（少くともマクロ乃至セミマイクロ法に於ては）とればよい。iii) 容量分析の操作が1回ですむから間接滴定よりも誤差を小さくしうる。b. 指示薬は通常 methyl red (変色範囲, $\text{pH}=4.2\sim 6.3$)⁽⁵⁾ 更に良好なものとして bromcresol green ($\text{pH}=3.8\sim 5.4$) があげられている。methyl red は稍々変色範囲が広いので、終点に於ける色の対比法については、E. C. Wagner⁽⁶⁾ が懇切な操作法を記述している。混合指示薬 bromcresol green+methyl red ($\text{pH}=5.1$) は近年發展されてきた E. J. Conway の Microdiffusion analysis⁽⁷⁾ に採用されている。著者はこれをマクロ法乃至セミ・マイクロ法に適用してみたが、簡便的確であつた。

(4) 〔実験2〕について：第1図及び第2図は、いずれの試料についても4法が大体同様な相互関係をもつことを示している。即ち同じ After boil の時間についての $\text{NH}_3\text{-N}$ の収量は大体 $C>D>B>A$ の順位にある。但し C と D の関係は稍々異常で、透明化のとき $C<D$, After boil 30 分に於て $C=D$, その後は $C>D$ であつた。土壌の場合は4法とも After boil 90 分に於ても未だ増大の傾向にあつたが、葉の場合には B と D が After boil 60 分以後に於て減量を示した。この現象については既に Patel & Sreenivasan⁽²⁾ が相当深い注意をはらつていて、自己の研究した方法は有効だが無制限に推奨するわけにはいかぬと明言している。

(5) 以上総合すると次の結論がえられる： i) C法は常に最良の結果を与える。原報に於ては After boil 30 分に於ける分析値を、著名な標準的方法たる Kjeldahl-Gunning-Arnold 法による分析値と比較して殆んど全く一致した成績をえている。よつて著者も研究上にも実用上にも After boil 30 分と規定して充分であろうと思う。本法の小さな欠点を強いて探すと、触媒混合物を予め調合しておくことが出来ないこと、 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ が煮沸中も溶解せず懸濁状態を保ち内壁に附着するから他の方法に比して何となく不快である（しかし事実はこの現象の故に本法の性能は高いのである）ことである。 ii) D法はC法にかなり接近した高い分析値を示すが、試料によつては或る After boil の時間後に収量の減少を起す可能性をもつ。この傾向の有無は予測出来ず、分析すべき試料について本実験と同様にして二三試行することにより見出す他はない。けれども大抵の場合 After boil 30 分に於ては充分安全であり、且つ結果もC法に殆んど近い値を示すものと思う（実験3参照）。本法は次の長所をもつ：試薬はすべて結晶性だから予め大量を混合しておける、不溶性試薬を含まぬから透明化が明瞭で、特に植物質のときは著しく快適である。 iii) B法は更に低い結果を与えるが、傾向は大体D法に並行している。 iv) A法は最低の結果を与える。本法により良好な分析値をうるには、〔実験1〕に於ける NH_4Cl の如き単純な試料や〔実験3〕に於ける大豆の如き含量の比較的高い物質は別として、大抵の試料に対し 2~3 時間或はそれ以上もの熟成を必要としている。本法はこのように極めて時間のかかるという欠点をもつが、酸が過剰にある限り数時間熱しつづけても窒素の loss が認められず極めて安全である。

(6) 〔実験3〕について：D法の原報に土壌や植物質への応用例が見られぬため、及びこの方法がこれら試料に対して充分好適に應用されることを示すため、更に4種の試料に After boil 30 分と規定して適用し、且つ従来相当広く採用されているA法の After boil 60 分の値と比較してみた。総時間に於て半分以下ですみ、収量に於て最低 3%、最高 28% の増大を示した。

終りに臨み本研究実施の機縁を与え絶えざる御支援を賜つた部長大政正隆博士に深甚なる謝意を表し、実験の補助に甚力してくれた技官市川孝義君の労に心から感謝する。

(1951, I, 22)

引用文献

- (1) Stubblefield, F. M. and E. E. De Turk, Ind. Eng. Chem., Anal. Ed. 12 (1940), 396. [“分析化学の進歩” 1 (昭 16), 142. 又は石橋雅義, “基礎容量分析法”, 上巻 (昭 21), 190 に全内容が紹介されている].
- (2) Patel, S. M. and A. Sreenivasan, Anal. Chem., 20 (1948), 63.
- (3) Ohmasa, M., Bull. Tokyo Univ. Forests, No. 25 (1937), 63.
- (4) 例えば, Kolthoff, I. M. and E. B. Sandell, “Textbook of Quantitative Inorganic Analysis,” (1940), p. 564.

- 高木誠司, “定量分析の実験と計算,” Vol. 2 (1950), p. 161.
- (5) 1例をあげると, “JIS 試薬規格,” Vol. 1 (1951), p. 25 にセミ・マイクロ法として採用されている。
- (6) Wagner, E. C., *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 12 (1940), 771.
- (7) Conway, E. J., “Microdiffusion Analysis and Volumetric Error.” (1947). [石坂音治, *化学の領域*, 4 (1950), 591 に要点が紹介されている]。

Résumé

(1) METHODS

Stubblefield-DeTurk's method (designated as C-method in this paper) and Patel-Sreenivasan's method (D-method in this paper) were compared with the two methods (A- and B-method in this paper) which have been used in our laboratory, to ascertain their applicability to the determination of total nitrogen in soils and plant materials.

(2) APPARATUS

- a) 200ml.-Kjeldahl flasks.
- b) Ordinary digestion apparatus with gas burners and steam distillation apparatus.
- c) Calibrated 10 ml.-semimicro buret (graduation interval: 0.02ml.).

(3) REAGENTS

Reagents used in digestion and distillation are:

- a) 10 ml. of conc. sulfuric acid.
- b) Catalysts and promoters shown in Table 1.
- c) 30%-sodium hydroxide solution, added in excess.
- d) 5%-sodium thiosulfate solution: In the case of the C- and D-methods, in which mercuric oxide is used, 10ml. of this solution were added with conc. sodium hydroxide solution in order to destroy mercury-ammonium complexes during distillation.

Reagents used for titration are:

- e) 0.1N-sulfuric acid standard, standardized with borax and methyl red.
- f) Ammonia absorbent: 20ml. of 4%- boric acid solution with the mixed indicator (bromocresol green and methyl red) were taken into a 200ml.-Erlenmeyer flask with a measuring cylinder.

(4) SAMPLES

Samples used in this study are shown in Table 2. The weight of sample taken in each digestion was regulated so as to contain less than 15 mg. of nitrogen.

(5) EXPERIMENTAL

i) Procedure.

All determinations were carried out in the usual manner. It will be noted at this point that a) very strong heating was employed from the start of digestion and special care was taken to keep the degree of heat always as uniform as possible; b) 25ml. of water were added to every digest after cooling it below 50°C; c) the distillation was stopped when the content of a receiver became about 150 ml.; d) the titration was continued until the color of the solution in a receiver turned from green through purple to wine-red; e) in order to eliminate errors introduced by

the impurities contained in the reagents, blank determinations were made for each method.

ii) Calculation.

To calculate the percentage of nitrogen the following formulas were used, where 1 ml. of 0.1N-H₂SO₄ is equivalent to 1.4008 mg. of nitrogen.

x mg. (nitrogen in a sample) = 1.4008 × F (factor of 0.1N-H₂SO₄)

× V (ml. of 0.1N-H₂SO₄ for sample—ml. of 0.1N-H₂SO₄ for blank)

W mg. (dried sample at 105°) = w mg. (air-dried sample)

× (100—Drying loss, %)

$$X\%N = \frac{x}{W} \times 100$$

iii) Results

Results given in Tables 3, 4, 5 and 6 are the average of at least two determinations. When duplicates were not in good agreement, three or more determinations were made. In all cases relative average deviations were not more than 0.4%.

(Exp. 1) Digestions with ammonium chloride as a standard using A-method:

The results obtained are presented in Table 3.

(Exp. 2) Comparison of the four methods:

The results obtained are shown in Tables 4 and 5, and in Figures 1 and 2.

(Exp. 3) Application of D-method to four more samples:

The results are given in Table 6.

(6) DISCUSSION

i) As the samples in this work are all natural materials, it is impossible to ascertain only by the observed values whether the whole procedure is properly performed or not. Therefore the conditions of digestion, distillation, and other procedures were carefully checked with A-method, using standard solutions of ammonium chloride. Nearly theoretical value was obtained as is shown in Table 3, so it is assumed that the whole procedure is carried out properly.

ii) The comparison of the four methods is presented in Tables 4 and 5, and can more easily be seen in Figures 1 and 2. Nitrogen recovery at the end of after boil of a certain period is arranged in the following order: C ≥ D > B > A.

In the case of the soil the nitrogen recovery shows a tendency to increase with the time of after boil in all four methods.

In the case of the leaf, however, the loss of nitrogen on continued digestion is observed in B- and D-methods. This phenomenon has already been discussed by Patel and Sreenivasan.⁽²⁾

The application of D-method to soils or plant materials was not discussed in the original paper. As is shown in the above mentioned tables and figures, this method can be applied to those samples similarly to the C-method using 30 minutes after boil, which has already been found by Stubblefield and DeTurk to give nearly the same results with various soils and plant materials as the famous Kjeldahl-Gunning-Arnold method.

iii) To ascertain the applicability of the D-method, four more samples were used, the results of which are given in Table 6. These results show that the D-method can satisfactorily be applied to soils and plant materials.

(1951, I, 22.)