4.1.3 硝酸性窒素

4.1.3.c フェノール硫酸法

(1) 概要

この試験法は硝酸塩を含む肥料に適用する。なお、尿素、石灰窒素及び有機物のように加熱により分解しアンモニアを遊離する化合物を含む肥料においても適用できる。この試験法の分類は Type B であり、その記号は 4.1.3.c-2026 又は N-N.c-3 とする。

分析試料に硫酸銅－硫酸銀溶液、水酸化カルシウム及び塩基性炭酸マグネシウムを加えて塩化物及び有機物を除去すると共に硝酸性窒素(N-N)を抽出し、フェノール硫酸及びアンモニア水と反応して生ずるニトロフェノール硫酸アンモニウムの吸光度を測定し、分析試料中の硝酸性窒素(N-N)を求める。なお、この試験法の性能は**備考 4** に示す。

(2) 試薬 試薬は、次による。

a) 硝酸塩標準液(N-N 5 mg/mL)(1): 硝酸カリウム(純度 99.9 %(質量分率)以上)を 110 °C で 1 時間以上加熱し(2)、デシケーター中で放冷した後、36.09 g をひょう量皿にとる。少量の水で溶かし、1000 mL 全量フラスコに移し入れ、標線まで水を加える。

b) 硝酸塩標準液(N-N 0.01 mg/mL): 硝酸塩標準液(N-N 5 mg/mL)の一定量を水で希釈し、硝酸塩標準液(N-N 0.01 mg/mL)を調製する。

c) 硫酸銅－硫酸銀溶液(1): JIS K 8983 に規定する硫酸銅(II)五水和物 5 g を水 900 mL に溶かし、JIS K 8965 に規定する硫酸銀(I)4 g を加えて溶かした後、1000 mL とする(3)。

d) フェノール硫酸: JIS K 8798 に規定するフェノール 15 g を JIS K 8951 に規定する硫酸 100 mL に溶かし、80 °C～100 °C の水浴中で 2 時間加熱し、放冷する(3)。

e) アンモニア水: JIS K 8085 に規定する特級(NH_3 28 %(質量分率))又は同等の品質の試薬。

f) 水酸化カルシウム: JIS K 8575 に規定する特級又は同等の品質の試薬。

g) 塩基性炭酸マグネシウム: 硝酸性窒素を含まないもの。

注(1) 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

(2) 乾燥が不十分となることを防ぐために恒量に達するまで乾燥する。

(3) 褐色瓶に保存する。

備考 1. (2)の硝酸塩標準液に換えて、国家計量標準にトレーサブルな硝酸性窒素標準液(NO_3-N 100 μg/mL 又は 1000 μg/mL)を用いて検量線用硝酸塩標準液を調製することもできる。

(3) 装置 装置は、次のとおりとする。

a) 抽出機器: 次の上下転倒式回転振り混ぜ機又は垂直往復振り混ぜ機。

aa) 上下転倒式回転振り混ぜ機: 250 mL 全量フラスコを毎分 30 回転～40 回転で上下転倒して回転できるもの。

ab) 垂直往復振り混ぜ機: フラスコ用アダプターを用いて 250 mL 全量フラスコを毎分 300 往復(振幅 40 mm)で垂直往復振り混ぜできるもの。

b) 分光光度計: JIS K 0115 に規定する分光光度計。

c) 水浴: 80 °C 以上に調節できるもの。

(4) 試験操作

(4.1) 抽出 抽出は次のとおり行う。

(4.1.1) 粉状及び液状分析用試料

(4.1.1.1) 上下転倒式回転振り混ぜ機を用いる場合

a) 分析試料 1 g を 1 mg の桁まではかりとり、250 mL 全量フラスコに入れる。

b) 硫酸銅－硫酸銀溶液約 200 mL を加え、毎分 30 回転～40 回転で約 20 分間振り混ぜる。

c) 水酸化カルシウム約 1 g 及び塩基性炭酸マグネシウム約 1 g を加え、毎分 30 回転～40 回転で約 10 分間振り混ぜる。

d) 標線まで水を加える。

e) ろ紙 3 種でろ過し、試料溶液[4]とする。

(4.1.1.2) 垂直往復振り混ぜ機を用いる場合

a) 分析試料 1 g を 1 mg の桁まではかりとり、250 mL 全量フラスコに入れる。

b) 硫酸銅－硫酸銀溶液約 200 mL を加え、毎分 300 往復(振幅 40 mm)で約 20 分間振り混ぜる。

c) 水酸化カルシウム約 1 g 及び塩基性炭酸マグネシウム約 1 g を加え、毎分 300 往復(振幅 40 mm)で約 10 分間振り混ぜる。

d) 標線まで水を加える。

e) ろ紙 3 種でろ過し、試料溶液[4]とする。

(4.1.2) 液状分析用試料(簡易抽出)

a) 分析試料 0.4 g を 1 mg の桁まではかりとり、100 mL 全量フラスコに入れる。

b) 硫酸銅－硫酸銀溶液約 80 mL を加え、振り混ぜる。

c) 水酸化カルシウム約 0.4 g 及び塩基性炭酸マグネシウム約 0.4 g を加え、振り混ぜる[5]。

d) 標線まで水を加える。

e) ろ紙 3 種でろ過し、試料溶液[4]とする。

注(4) 試料溶液調製後、速やかに(**4.2**)**a**)の操作を行う。

(5) 全量フラスコに栓をして、栓が抜けないよう保持しながら、上下反転した状態で膨らんだ部分を左右に 5 回程度振り混ぜた後元に戻す。この操作を 5 回程度繰り返し、かつ、分析試料、硫酸銅－硫酸銀溶液、水酸化カルシウム、塩基性炭酸マグネシウム由来の沈殿がなく完全に分散している状態まで振り混ぜる。

備考 2. (**4.1.1.1**)、(**4.1.1.2**)、(**4.1.2**)**e**)のろ液が着色している場合は、活性炭 0.5 g 以下を加え、ろ紙 3 種でろ過し、試料溶液とする。

備考 3. 液状分析用試料については、(**4.1.1.1**)もしくは(**4.1.1.2**)の操作を選択して抽出することもできる。

(4.2) 発色 発色は次のとおり行う。

a) 試料溶液の一定量(N-N として 0.01 mg～0.1 mg 相当量)を小型蒸発皿[6]にとる。

b) 80 °C 以上の水浴上で水分を蒸発させて乾固する。

c) 放冷後、フェノール硫酸 2 mL を速やかに加え[7]、直ちに蒸発皿を回転し、全ての残留物をフェノール硫

酸と接触させる。

d） 約 10 分間放置後、水 20 mL を加える(8)。

e） 放冷後、水で 100 mL 全量フラスコに移し入れる。

f） 溶液の色が淡い黄色になるまでアンモニア水（1+2）を加えて弱アルカリ性とし、更にアンモニア水（1+2）3 mL を加える(9)。

g） 冷却した後、標線まで水を加え、約 30 分間放置する。

注（**6**） ガラス製又は磁製で丸底がよい。

（**7**） 駒込ピペット等で小型蒸発皿の中心部に加える。

（**8**） 残留物が溶けにくい場合は、ガラス棒で砕く。

（**9**） 検量線用空試験液は発色しないので、硝酸塩標準液とほぼ同量のアンモニア水（1+2）を加える。

（**4.3**） **測定** 測定は、JIS K 0115 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用する分光光度計の操作方法による。

a） **分光光度計の測定条件** 分光光度計の測定条件は、以下を参考にして設定する。

分析波長： 410 nm

b） **検量線の作成**

1） 硝酸塩標準液（N-N 0.01 mg/mL）の 1 mL～10 mL を小型蒸発皿(6)に段階的にとる。

2） （**4.2**）**b**）～**g**）と同様の操作を行って検量線用硝酸塩標準液とする。

3） 水 40 mL を 100 mL 全量フラスコに入れ、フェノール硫酸 2 mL を静かに加えて振り混ぜ、放冷し、（**4.2**）**f**）～**g**）と同様の操作を行って検量線用空試験液とする。

4） 検量線用空試験液を対照として検量線用硝酸塩標準液の波長 410 nm の吸光度を測定する。

5） 検量線用硝酸塩標準液の硝酸性窒素濃度と吸光度との検量線を作成する。

c） **試料の測定**

1） （**4.2**）**g**）の溶液について、**b**）**4**）と同様の操作を行って吸光度を測定する。

2） 検量線から硝酸性窒素（N-N）量を求め、分析試料中の硝酸性窒素（N-N）を算出する。

備考 4. 真度評価のため、調製試料（汚泥肥料を含まない固形肥料）を用いて回収試験を実施した結果、硝酸性窒素（N-N）として 16 %（質量分率）及び 1 %（質量分率）～3 %（質量分率）の含有量レベルでの平均回収率はそれぞれ 103.4 %及び 100.9 %～101.1 %であった。同様に、真度の評価のため、調製試料（汚泥肥料を含む固形肥料）を用いて回収試験を実施した結果、硝酸性窒素（N-N）として 1 %（質量分率）～5 %（質量分率）の含有量レベルでの平均回収率は 100.1 %～102.8 %であった。

精度の評価のため、試験法の妥当性確認のために実施した共同試験の成績及び解析結果を表 1 に示す。

硝酸ソーダ（2 点）、硝酸石灰（1 点）、液状窒素肥料（2 点）、被覆複合肥料（1 点）、化成肥料（5 点）、液状複合肥料（4 点）、配合肥料（3 点）、家庭園芸用複合肥料（2 点）、堆肥（1 点）を用いて垂直往復振り混ぜ機による抽出の測定値（y_i: 0.04 %～16.48 %（質量分率））及び上下転倒式回転振り混ぜ機による抽出の測定値（x_i）を比較した結果、回帰式は y=0.0059+0.9995x であり、その相関係数（r）は 0.9999 であった。

精度評価のため、化成肥料、家庭園芸用複合肥料、堆肥、液状窒素肥料及び液状複合肥料を用いた日を変えての分析の結果について一元配置分散分析を用いて解析し、中間精度及び併行精度を

推定した結果を表 2-1 に示す。同様に、精度評価のため、調製試料（汚泥肥料を含む固形肥料）（2 点）を用いた日を変えての分析結果について一元配置分散分析を用いて解析し、中間精度及び併行精度を推定した結果を表 2-2 に示す。また、試験法としての妥当性を確認するための共同試験の分析結果及び解析結果を表 3 に示す。

液状窒素肥料（3 点）、液状複合肥料（7 点）、家庭園芸用複合肥料（4 点）を用いて簡易抽出の測定値（y_i: 1.15 %～8.48 %（質量分率））及び上下転倒式回転振り混ぜ機による抽出の測定値（x_i）を比較した結果、回帰式は $y=-0.0098+0.9967x$ であり、その相関係数（r）は 0.9999 であった。

なお、この試験法の定量下限は、固形肥料で 0.01 %（質量分率）程度、汚泥肥料を含む固形肥料で 0.07 %（質量分率）、液状肥料で 0.003 %（質量分率）程度と推定された。

表1　硝酸性窒素試験法の妥当性確認のための共同試験成績の解析結果

試料名	試験室数[1]	平均値[2] (%)[3]	s_r[4] (%)[3]	RSD_r[5] (%)	s_R[6] (%)[3]	RSD_R[7] (%)
硝酸アンモニア	12(0)	18.04	0.13	0.7	0.64	3.6
化成肥料1	12(0)	14.03	0.17	1.2	0.40	2.8
化成肥料2	10(2)	5.04	0.07	1.4	0.24	4.8
化成肥料3	12(0)	3.87	0.05	1.2	0.10	2.7
化成肥料4	12(0)	1.18	0.03	2.4	0.04	3.4

1） 有効試験室数（外れ値を報告した試験室数）
2） 平均値（n=有効試験室数×試料数（2））
3） 質量分率
4） 併行標準偏差
5） 併行相対標準偏差
6） 室間再現標準偏差
7） 室間再現相対標準偏差

表2-1　硝酸性窒素の日を変えた試験成績の解析結果

試料名	日数[1] T	平均値[2] (%)[3]	併行精度 s_r[4] (%)[3]	併行精度 RSD_r[5] (%)	中間精度 $s_{I(T)}$[6] (%)[3]	中間精度 $RSD_{I(T)}$[7] (%)
化成肥料	5	15.89	0.07	0.5	0.1	0.8
家庭園芸用複合肥料	5	4.23	0.01	0.3	0.01	0.3
堆肥	5	0.184	0.003	1.5	0.008	4.2
液状窒素肥料	5	1.62	0.01	0.6	0.02	1.0
液状複合肥料	5	8.43	0.05	0.6	0.06	0.7

1）2点併行分析を実施した日数
2）平均値（n=日数（T）×併行数（2））
3）質量分率
4）併行標準偏差
5）併行相対標準偏差
6）中間標準偏差
7）中間相対標準偏差

表2-2　硝酸性窒素の日を変えた試験成績の解析結果（汚泥肥料を含む固形肥料）

試料名	日数[1] T	平均値[2] (%)[3]	併行精度 s_r[5] (%)[4]	併行精度 RSD_r[6] (%)	中間精度 $s_{I(T)}$[7] (%)[4]	中間精度 $RSD_{I(T)}$[8] (%)
調製試料1	5	5.06	0.03	0.6	0.09	1.8
調製試料2	5	1.03	0.01	0.8	0.02	2.1

1） 2 点併行分析を実施した日数
2） 平均値（n=日数（T）×併行数（2））
3） 質量分率
4） 併行標準偏差
5） 併行相対標準偏差
6） 中間標準偏差
7） 中間相対標準偏差

表3　室間共同試験による併行精度及び室間再現精度の推定結果

試料の形状	試料名	試験室数[1]	平均値[2] (%)[3]	s_r[4] (%)[3]	RSD_r[5] (%)	s_R[6] (%)[3]	RSD_R[7] (%)
固形肥料	硝酸ソーダ	11(1)	16.47	0.13	0.8	0.37	2.3
	配合肥料	11(1)	11.33	0.09	0.8	0.25	2.2
	化成肥料 1	11(1)	6.85	0.06	0.8	0.15	2.2
	化成肥料 2	11(1)	0.72	0.01	1.7	0.03	3.7
	堆肥	12(0)	0.18	0.01	3.1	0.02	10.8
液状肥料	液状窒素肥料	11(1)	8.61	0.09	1.0	0.27	3.1
	液状複合肥料 1	10(2)	6.86	0.13	1.9	0.23	3.3
	家庭園芸用複合肥料 1	10(2)	4.35	0.06	1.5	0.31	7.2
	液状複合肥料 2	11(1)	1.68	0.03	1.6	0.08	5.1
	家庭園芸用複合肥料 2	12(0)	1.01	0.02	2.4	0.05	4.5

1） 有効試験室数（外れ値を報告した試験室数）
2） 平均値（n=有効試験室数×試料数（2））
3） 質量分率
4） 併行標準偏差
5） 併行相対標準偏差
6） 室間再現標準偏差
7） 室間再現相対標準偏差

参考文献

1） 越野正義: 第二改訂詳解肥料分析法, p.52~55, 養賢堂, 東京 (1988)

2） 加藤公栄, 高橋佐貴子, 白井裕治: 吸光光度法による窒素, りん酸及びほう素試験法の妥当性確認 －検量線の評価－, 肥料研究報告, **2**, 137~144 (2009)

3） 加藤公栄, 千田正樹, 渡部絵里菜: 硝酸性窒素試験法の性能調査 －フェノール硫酸法－, 肥料研究報告, **6**, 148~155 (2013)

4） 平田絵理香, 添田英雄, 吉村英美, 八木啓二: 窒素試験法の性能評価 －共同試験成績－, 肥料研究報告, **12**, 84~93 (2019)

5） 白澤優子, 加藤公栄: フェノール硫酸法における硝酸性窒素の試料溶液調製方法の改良, 肥料研究報告, **14**, 12~24 (2021)

6） 白澤優子, 加藤公栄: 硝酸性窒素分析のためのフェノール硫酸法の改良と性能評価 －室間共同試験による妥当性確認－, 肥料研究報告, **15**, 33~43 (2022)

7） 白澤優子, 加藤公栄: フェノール硫酸法による硝酸性窒素の堆肥に対する妥当性確認 －続報－, 肥料研究報告, **16**, 123~128 (2023)
8） 奥西茉楠, 義本将之, 八木寿治, 増井亮太, 相良麻由, 青山恵介: アンモニア性窒素, 硝酸性窒素, く溶性加里及び水溶性加里の分析法の適用範囲確認（菌体りん酸肥料等） －単一試験室による妥当性確認－, 肥料研究報告, **19**, 1~18 (2026)

(5) 硝酸性窒素試験法フローシート　肥料中の硝酸性窒素試験法のフローシートを次に示す。

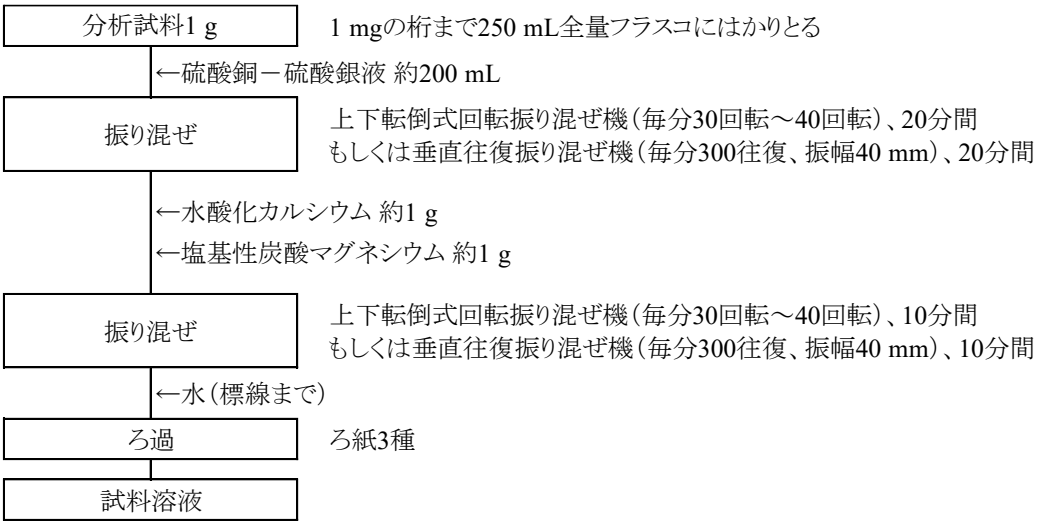


図1-1　肥料中の硝酸性窒素試験法フローシート（抽出操作（4.1.1.1）及び（4.1.1.2））

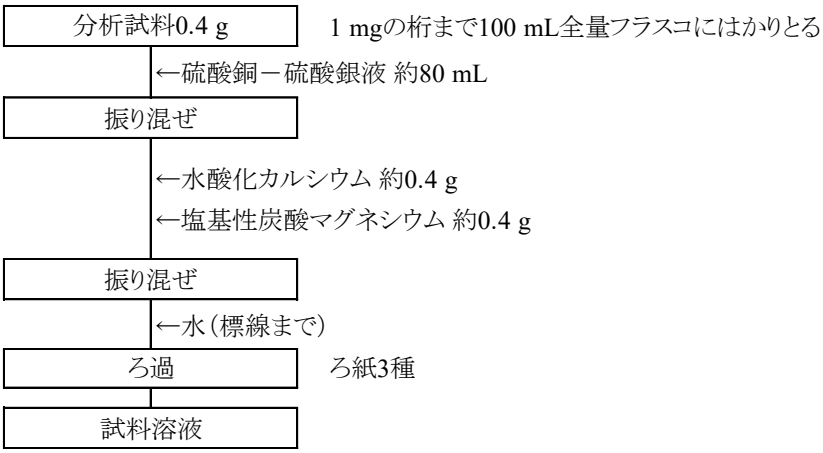


図1-2　肥料中の硝酸性窒素試験法フローシート（抽出操作（4.1.2））

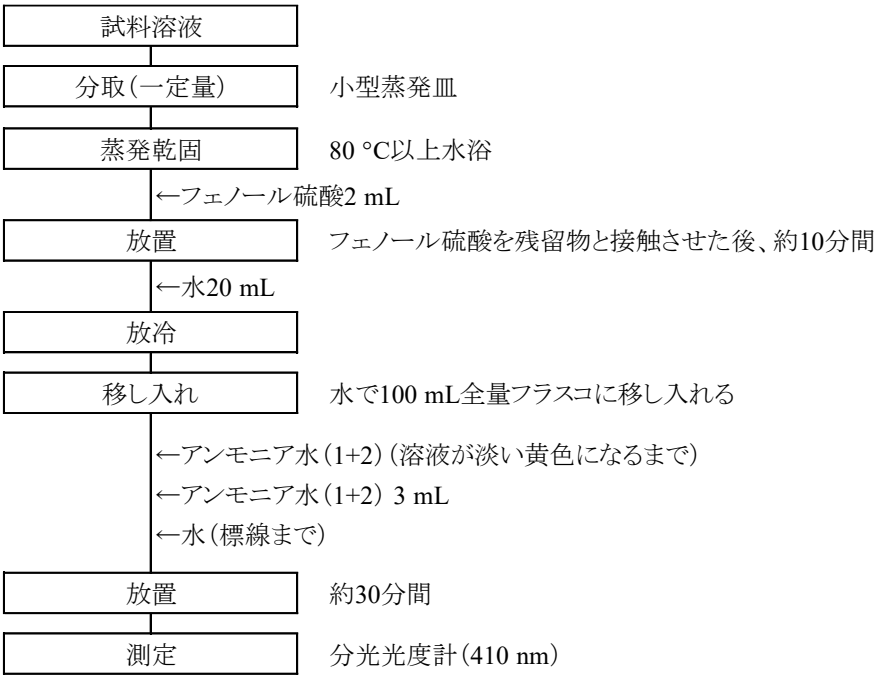


図2　肥料中の硝酸性窒素試験法フローシート（発色及び測定操作）