HPLC による環境中のアンモニア, 亜硝酸及び 硝酸体窒素の同時分析法

松居 正巳¹⁾, 後藤 武²⁾, 石橋 亨³⁾, 西川 雅高⁴⁾

¹⁾株式会社 島津製作所 応用技術部 (〒305 つくば市吾妻3-17-1)

²⁾株式会社 島津製作所 LC 部 (〒259-13 秦野市堀山下380-1)

³⁾財団法人 食品等分析調査研究所 (〒203 東久留米市前沢5-3-11)

⁴⁾国立環境研究所 (〒305 つくば市小野川16-2)

[平成 8 年10月 9 日受理]

Simultaneous Determination of Ammonia, Nitrite and Nitrate in the Environmental Samples by HPLC

Masami MATSUI¹⁾, Takeshi GOTOH²⁾, Tohru ISHIBASHI³⁾ and Masataka NISHIKAWA⁴⁾

¹⁾Tsukuba Environmental Analytical Laboratory, Shimadzu Corporation
(3-17-1 Azuma, Tsukuba, Ibaraki 305)

²⁾HPLC Business Department, Shimadzu Corporation
(380-1 Horiyamashita, Hadano, Kanagawa 259-13)

³⁾The Institute of Food Sciences
(5-3-11 Maezawa, Higashikurume, Tokyo 203)

⁴⁾National Institute for Environmental Studies
(16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305)

[Received October 9, 1996]

Summary

A high performance liquid chromatographic analysis for the simultaneous determination of ammonia, nitrite, nitrate and other anion compounds in the environmental samples has been developed.

The method is based on the separation of nitrite, nitrate and sulfate from cation using anion exchange column for ion chromatograph, and detection of ammonia by indophenol reaction.

In the flow pathway of HPLC carrier, anion compounds are detected by conductivity detector, and postcolumn derivatization using spectrophotometric detector at 640 nm of wave length was determined ammonia.

An ammonia can be detected selectivity in water at 0.01 ppm concentration.

It was applied determining of chloride, nitrite, nitrate, sulfate and ammonia in the environmental water samples such as lake, river, wastewater plant and rain by this method.

Key words: Simultaneous determination of ammonia and anion, HPLC postcolumn derivatization of indophenol reaction, Determination of ammonia in the environmental water and wastewater plant

1. はじめに

環境分野におけるアンモニア性窒素は、生物の屍骸や動物の排泄物が分解して生成する生態系の自然現象によるものと産業の生産活動に起因する人為的なものがある。

環境中ではアンモニアが酸化されて亜硝酸性窒素や硝酸性窒素を生成することが知られ、これらの化合物は水質の汚染状況を判断するのに有力な指標であると言われている。

また、化石燃料の燃焼過程で生成する窒素酸化物や硫黄酸化物は酸性雨の原因物質の一つとして考えられ、pHとともにアンモニウム、亜硝酸、硝酸、硫酸イオンなどは酸性雨評価の指標となっている。

アンモニウムイオンの分析はインドフェノール法による吸光光度法¹⁾がある。

亜硝酸イオンはジアゾカップリング法²⁾、イオンクロマトグラフ (IC) 法³⁾あるいは高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法によるジアゾカップリング反応を用いたポストカラム誘導体化による選択的分析法⁴⁾などがある。

硝酸イオンについてはカドミウムカラムによって亜硝酸に還元し、これを分析する方法⁵⁾がある。

吸光光度法によるアンモニウム、亜硝酸及び硝酸イオン分析はそれぞれの化合物に特異的に反応する試薬を用いるために、同一試薬でこれらの化合物を分析することができない。一方、IC法によるアンモニウム、亜硝酸及び硝酸イオンの分析は陽イオンのアンモニウムイオンと陰イオンの亜硝酸や硝酸イオンなどをそれぞれが異なる分析条件で行っている。これらの成分を同時に分析するには、分析条件の異なる2台の装置が必要である。

他方、吸光光度法を原理としたオートアナライザーによるアンモニウム、亜硝酸及び硝酸イオンの自動分析は試料点数が多い場合に適している。

環境や食品のように、複雑な組成を含む試料はアンモニウム、亜硝酸及び硝酸イオン分析において、狭雑成分の影響を受けて正確な分析値が期待できない場合もある。

著者はIC用の陰イオンカラムを用いてアンモニウム、亜硝酸及び硝酸イオンを分離し、亜硝酸と硝酸イオンを電気伝導度検出器で、アンモニウムイオンをインドフェノール法を用いた吸光光度検出器で検出する方法を考案した。

この方法を環境及び食品試料に応用するために、HPLCを用いたアンモニウムイオンをインドフェノール反応のポストカラム誘導体化による検出法について検討し、河川水や醤油などの環境や食品試料中のアンモニア、亜硝酸、硝酸性窒素の同時分析に適応したので報告する。

2. 実験方法

2. 1 試薬及び試料

- ①フェノールニトロプルシッドナトリウム溶液：フェノール5.0gとニトロプルシッドナトリウム25mgを秤量し、これを500ml容の三角フラスコに入れ、蒸留水500mlを加えて溶解した。
- ②次亜塩素酸ナトリウム溶液：市販の次亜塩素酸ナトリウム水溶液試薬（和光純薬工業株式会社製）を蒸留水で希釈し、有効塩素濃度が0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0%の水溶液500mlに対して、それぞれに水酸化ナトリウム7.5gを加えて溶解した。
- ③アンモニア性窒素標準溶液：塩化アンモニウム0.3819gを100ml容メスフラスコに入れ、蒸留水で溶解して定容した。この溶液を5ml容ホールピペットで採取し、50ml容メスフラスコに入れ、蒸留水で定容し、これを原液とした。
- ④亜硝酸性窒素標準溶液：亜硝酸ナトリウム0.493gを100ml容メスフラスコに入れ、蒸留水で溶解して定容した。この溶液を5ml容ホールピペットで採取し、50ml容メスフラスコに入れ、蒸留水で定容し、これを原液とした。
- ⑤硝酸性窒素標準溶液：硝酸カリウム0.722gを100ml容メスフラスコに入れ、蒸留水で溶解して定容した。この溶液を5ml容ホールピペットで採取し、50ml容メスフラスコに入れ、蒸留水で定容し、これを原液とした。
- ⑥標準試料：アンモニア性窒素標準溶液、亜硝酸性窒素標準溶液および硝酸性窒素標準溶液の原液を10ml容ホールピペットで採取し、100ml容フラスコに入れ、蒸留水で定容し、これを分析用の標準試料とした。
- ⑦環境試料：（1）排水処理水（つくば市内の排水処理場）、（2）湖沼水（茨城県霞ヶ浦境川付近）、（3）河川水（茨城県桜川下流）、（4）雨水（茨城県つくば市にて1996年3月12日採取）などの試料。
- ⑧食品試料：（1）醤油、（2）野菜つけものはつくば市内の市販されているものを用いた。食品試料の調製は醤油を蒸留水で2000倍に希釈したものを分析試料とした。野菜つけものはカッターミキサーで粉碎し、濾過したものを蒸留水で200倍に希釈して分析試料とした。

2. 2 装置及び分析条件

実験装置は島津製作所製的高速液体クロマトグラフLC-10Aシステム、ローラーポンプ、反応槽から構成され、概略はFig. 1に示したが、実験は下記の装置と条件で行った。

- ①ポンプ：島津高速クロマトグラフ用ポンプLC-10AD。

Fig. 1 Flow diagram of HPLC for determination of ammonia, nitrite and nitrate

1: Eluent, 2: Pump for HPLC, 3: Sample injector, 4: Column for separation of anion, 5: Column oven, 6: Conductivity detector, 7: 3-Way joint, 8: Spectrophotometric detector, 9: Drain, 10: Reagent for indophenol reaction, 11: Tubing roller pump, 12: Reactor oven, 13: Reaction coil.

- ②検出器：可視・紫外分光光度計SPD-10AV（測定波長640nm），電気伝導度検出器CDD-10A。
- ③カラム恒温槽：CTO-10A（40℃）。
- ④データ処理器：島津データ処理器CR-7A及びCR-4A。
- ⑤カラム：Shim pack IC-A1（内径4.6mm，長さ100mm）及びIC-A3（内径4.6mm，長さ150mm）。
- ⑥移動相：2.5mM フタル酸 + 2.4mM Tris（Tris [hydroxymethyl] aminomethane）及び8.0mM *p*-ヒドロキシ安息香酸 + 3.2mM Bis-Tris（Bis [2-hydroxyethyl] imino-tris [hydroxymethyl] methane）。流速は1.0mℓ/min. とした。
- ⑦反応コイル：外径1.6mm，内径1.0mm，長さ0.5～2.5m。
- ⑧反応コイル温度：20～80℃。
- ⑨試料注入量：25～200μℓ。
- ⑩インドフェノール反応試薬：フェノールニトロブシッドナトリウム溶液と次亜塩素酸ナトリウム溶液を1：1（V/V）の割合で混合したものをアンモニウムイオンのポストカラム誘導体反応試薬として用い，流速は1.0mℓ/min. とした。

3. 結果及び考察

3. 1 測定装置

装置の流路構成をFig. 1に示したが，キャリアー液（1）はHPLC用のポンプ（2）で送液され，インジェクター（3），カラム恒温槽（5）内のカラム（4），電気伝導度検出器（6）を経て，三方ジョイント（7）に

至る。

反応溶液の試薬（10）はローラーポンプ（11）で三方ジョイントに送られキャリアー液と混合される。

混合液は反応恒温槽内（12）の反応コイル（13），可視・紫外分光光度計検出器（8）を経て，廃液タンク（9）に至る。

反応液は多量の塩素を含む試薬を使用するために，反応液を送液するポンプは腐食を考慮してローラーポンプを使用した。

また，装置の使用後は配管類，ローラーポンプのチューブ，反応コイル及び可視・紫外分光光度計検出器内を蒸留水で良く洗浄した。

ローラーポンプのチューブはタイゴンチューブ（内径1/32，外径3/32inch）を用いたが，1日8時間稼働して20日間は使用に耐えられた。

3. 2 反応試薬の有効塩素濃度の検討

有効塩素濃度が0.1，0.5，1.0，2.5，5.0%の次亜塩素酸ナトリウム溶液100mℓとフェノールニトロブシッドナトリウム溶液100mℓを混合したものをアンモニウムイオンのポストカラム誘導体化におけるインドフェノール反応試薬の検討に用いた。

アンモニア性窒素標準溶液の原液を蒸留水で100倍に希釈したものを検討用試料とした。

Table 1は有効塩素濃度が異なる反応試薬でアンモニア性窒素のピーク面積を調べた結果である。反応温度は40℃とし，移動相は2.5mM フタル酸 + 2.4mM Trisを用いた。

インドフェノール法に用いる次亜塩素酸ナトリウムの反応試薬は有効塩素濃度が0.05～0.1%の範囲が良いと

Table 1 Relationship of hypochlorite concentration and peak area of ammonia on HPLC post-column derivatization

Concentration of hypochlorite solution(%)	Peak area of ammonia(μV・sec.)
0.1	not detected
0.5	315
1.0	2025
2.5	10210
5.0	47692

言われている⁶⁾。

HPLCのポストカラム誘導体化法において、有効塩素濃度が0.1%ではアンモニア性窒素を検出できなかった。本実験では有効塩素濃度が高くなるにつれてアンモニウムイオンの感度も増加し、5%濃度が最も感度がよかった。

この反応はアンモニアと塩素から下式の化学反応のように

モノクロラミンを生成する。

インドフェノール法によるアンモニウムイオン分析に脂肪族アミンの妨害はないが、芳香族アミン類の一部²⁾や有機物⁶⁾が妨害すると言われている。

しかし、ここでは移動相や反応試薬に芳香族アミンを使用していないので、移動相中の有機物による塩素消費量が大きく、感度が低下した原因と考えられた。

この実験において、反応液中の塩素がキャリアー液中の

-

ヒドロキシ安息香酸やBis-Trisなどの有機物に消費され、塩素濃度が低下し、モノクロラミンを生成しなかったと推定された。

3. 3 移動相におけるポストカラム誘導体化の検討

インドフェノール反応液において移動相を試料として、アンモニウムイオンのポストカラム誘導体化の検討を行った。

試料は2.5mMフタル酸+2.4mM Tris、8.0mM *p*-ヒドロキシ安息香酸+3.2mM Bis-Trisの水溶液にアンモニア性窒素が1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -Nの濃度になるように添加した。これをポストカラム誘導体化の検討用試料として用いた。

それぞれの試料5.0mLにインドフェノール反応試薬

5.0mLを加え、良く混合し、40℃で30分間放置した。これらの溶液は吸光度が640nmの波長で測定し、アンモニア性窒素濃度を求めた。その結果をTable 2に示した。

HPLCでは分析する成分によってカラムが異なり、カラムの種類が異なれば移動相が異なる。陰イオンの分析の場合ではShim pack IC-A1 カラムは2.5% mMフタル酸+2.4mM Tris 移動相が、IC-A3 カラムには8.0mM *p*-ヒドロキシ安息香酸+3.2mM Bis-Trisの移動相が用いられている。

移動相 (8.0mM *p*-ヒドロキシ安息香酸+3.2mM Bis-Tris) 中のアンモニア性窒素濃度が1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -Nの試料ではTable 2で見られるように、アンモニウムイオンの感度は得られないことがわかった。

インドフェノール反応によるアンモニウムイオンのポストカラム誘導体化は塩素を消費しない移動相が適していると判断した。

本実験では、ポストカラム誘導化試薬に5%の有効塩素濃度と2.5mM フタル酸+2.4mM Trisのキャリアー液を使用した。

3. 4 反応温度とアンモニア性窒素のピーク面積

アンモニア性窒素のピーク面積と反応温度について調べるために、試料にアンモニア性窒素の濃度が1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -Nの水溶液を用い、内径1.0mm、長さ1.0mの反応コイル、反応温度は20, 40, 60, 80, 100℃の条件で検討した。

Fig. 2にアンモニア性窒素のピーク面積と反応温度の関係を示した。

インドフェノール法によるアンモニア性窒素の測定は反応温度25~30℃、反応時間30~50分の条件が最適とされている⁶⁾。

インドフェノール反応を用いたアンモニウムイオンの

Table 2 Effect of HPLC eluents on indophenol reaction for ammonia determination

Standard sample & eluent	determination of ammonia(ppm)
Ammonia standard(1.00ppm)	1.00
1.00ppm Ammonia in Eluent I	0.46
1.00ppm Ammonia in Eluent II	0.11

Eluent I: 2.5 mM Phthalic acid + 2.4 mM Bis-Tris + 1.0 ppm ammonia

Eluent II: 8.0 mM *p*-hydroxy benzoic acid + 3.2 mM Bis-Tris + 1.00 ppm ammonia

Fig. 2 Relationship of reaction temperature and ammonia peak area

ポストカラム誘導体化は反応温度が高くなるにつれてアンモニア性窒素のピーク面積が増大する傾向であった。アンモニア性窒素の検出感度を考慮すれば、反応温度は60～80℃が適していた。

ここでは、カラム恒温槽温度を40℃としているので、反応コイルをカラム恒温槽内に設置することが実用的であると判断し、反応温度を40℃とした。

3. 5 反応コイルの長さとのピーク面積

反応コイルの長さとのアンモニア性窒素のピーク面積について検討するために内径が1.0mm、長さが0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5mのステンレス製の反応コイルを用い、アンモニア性窒素の濃度が1 μg/ml -Nの試料をそれぞれの反応コイルで調べた。

なお、反応にはインドフェノール反応試薬を用い、反応温度40℃に設定した。

Fig. 3はアンモニア性窒素のピーク面積と反応コイル長さの関係を示したが、アンモニア性窒素のピーク面積は反応コイルの長さが2.0mまでが増加の傾向にあった。

反応コイルが2.0m以上になるとアンモニア性窒素のピーク面積に顕著な増加が見られなかったため、本法では2.0mの反応コイルを用いた。

3. 6 アンモニア性窒素濃度とピーク面積

反応温度が40℃において、長さが2.0mの反応コイルとインドフェノール反応試薬を用いて、アンモニア性窒素濃度とピーク面積の関係について調べた。試料はアンモニア性窒素濃度が0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 μg/ml -Nのものを用いた。

Table 3にアンモニア性窒素濃度とピーク面積の関係を示したが、アンモニア性窒素として測定できる濃度範

Fig. 3 Relationship of reaction coil length and ammonia peak area

Table 3 linear response of ammonia on HPLC with postcolumn derivatization for indophenol reaction

Concentration(ppm)	peak area(μ V·sec.)
0.05	1797
0.1	4028
0.5	23763
1.0	47692
5.0	229425
10.0	580032

囲は0.05～5.0 μg/ml -Nであった。この範囲ではアンモニア性窒素濃度とピーク面積に直線性が得られ、アンモニア性窒素測定の検量線として使用できる。しかし、濃度が5～10 μg/ml -Nを越えると検量線の直線性が得られなかった。

なお、この方法での検出限界は次亜塩素酸ナトリウム溶液の反応試薬の保存状態に影響される。

反応試薬を調製した直後ではアンモニア性窒素として0.01 μg/ml -Nの試料を検出できるが、冷蔵庫内で2週間保存したのになると検出限界が0.05 μg/ml -N程度である。

したがって、反応試薬は使用時に調製したものが好ま

しく、時間経過した反応試薬を使用すると検出感度が低下した。

3. 7 繰り返し精度

繰り返し精度は2. 1の実験試料⑥の標準試料をアンモニア、亜硝酸、硝酸性窒素濃度がそれぞれ $0.5\mu\text{g/ml}$ -Nになるように蒸留水に希釈した試料を用いた。

アンモニウムイオンの分析は 40°C 、反応コイル長さ2.0m、亜硝酸及び硝酸分析は2. 2項の分析条件で行った。分離はカラムにShim pack IC-A1、移動相に2.5mM フタル酸+2.4mM Trisのキャリヤー液を用いた。

Table 4にアンモニア、亜硝酸および硝酸性窒素の繰り返し精度を示した。

アンモニア、亜硝酸、硝酸性窒素濃度がそれぞれ

Table 4 Repeatability of ammonia, nitrite and nitrate nitrogen (ppm)

No.	$\text{NH}_3\text{-N}$	$\text{NO}_2\text{-N}$	$\text{NO}_3\text{-N}$
1	0.507	0.498	0.504
2	0.497	0.509	0.510
3	0.516	0.498	0.499
4	0.509	0.498	0.504
5	0.487	0.502	0.505
6	0.491	0.505	0.504
7	0.502	0.507	0.506
8	0.505	0.504	0.504
9	0.498	0.509	0.508
10	0.505	0.499	0.502
Average	0.502	0.503	0.505
CV(%)	1.637	0.857	0.570

$0.5\mu\text{g/ml}$ -Nの試料ではTable 4に示したように、10回測定した測定値の変動係数が2%以下であった。

また、 $0.1\mu\text{g/ml}$ -Nのアンモニア、亜硝酸、硝酸性窒素濃度では5回の測定において、変動係数が5%以下であり、食品や環境試料の定量分析に十分に適用できると考えられた。

3. 8 環境分野への適用

環境分野への適用は湖沼水、河川水、雨水、排水処理水などの試料を用い、アンモニア、亜硝酸、硝酸性窒素を測定した。その結果はTable 5に示した。

アンモニア性窒素の酸化による亜硝酸および硝酸の生成や硝酸の還元作用によるアンモニアや亜硝酸性窒素を生成することから、人畜排泄物による環境汚染の指標としてアンモニア、亜硝酸及び硝酸性窒素が測定されている。

本法を湖沼水（Ⅰ）と雨水（Ⅱ）の測定例としてFig. 4のクロマトグラムに示したが、アンモニア、亜硝酸および硝酸性窒素以外に塩素や硫酸イオンなどの成分も同時に測定できた。

また、食品衛生分野においてアンモニア、亜硝酸及び硝酸性窒素は飲料水以外に発酵・腐敗の評価や食品添加物の検査に測定されている。

本法を醤油（Ⅰ）と野菜類つけもの（Ⅱ）中のアンモニア、亜硝酸、硝酸性窒素の測定に応用したが、Fig. 5のクロマトグラムに示したように、アンモニウムと塩素イオンが多量に検出されている。

環境試料においてIC法による排水中のふっ素⁷⁾、塩素⁸⁾、臭素⁹⁾、硫酸¹⁰⁾などの陰イオン成分分析法はすでに多くの分析マニュアルに採用されているので、これらの陰イオン成分も精度よく同時分析が可能であると思われる。

4. まとめ

アンモニウム、亜硝酸および硝酸イオンの同時分析の

Table 5 Determination of ammonia, nitrite and nitrate nitrogen in the environmental samples

sample	$\text{NH}_3\text{-N(ppm)}$	$\text{NO}_2\text{-N(ppm)}$	$\text{NO}_3\text{-N(ppm)}$
Kasumigaura lake(Ibaraki)	1.62	0.05	2.76
Sakura river(Ibaraki)	0.59	0.04	1.43
Effluent of wastewater plant	0.35	0.31	18.62
Rain(Tsukuba)	1.87	0.07	2.53

Fig. 4 Chromatograms of ammonia, nitrite and nitrate in the environmental samples by conductivity detector and spectrophotometric detector with indophenol postcolumn derivatization method

[I] : Lake water [II] : Rain

(A) : Spectrophotometric detector with indophenol postcolumn derivatization method

(B) : Conductivity detector

ために、HPLCの陰イオンカラムでアンモニウム、亜硝酸及び硝酸イオンを分離し、亜硝酸と硝酸イオンを電気伝導度検出器で、アンモニウムイオンをインドフェノール法を用いた吸光光度検出器で検出する方法を考案した。

アンモニウムイオンのインドフェノール反応によるポストカラム誘導体化について検討し、環境や食品試料中のアンモニア、亜硝酸、硝酸性窒素の同時分析に適応し、併せて塩化物および硫酸イオンなど成分が同時分析できた。

要 約

HPLCを用いた環境水中のアンモニア、亜硝酸、硝酸などの化合物の同時分析法を開発した。

この方法はイオン交換カラムによる陽イオンからの亜硝酸、硝酸イオンとインドフェノール反応によるアンモニアの検出を基にしている。

HPLC キャリヤー流路において、陰イオン化合物は電気伝導度検出器で検出し、アンモニアはポストカラムでインドフェノール反応を用いて可視・紫外検出器640nmの波長で0.01ppmが選択的に検出された。

この方法は湖沼、河川、排水、雨などの環境試料中のアンモニア、硝酸、亜硝酸、硫酸イオンなどの測定に適用できることがわかった。

文 献

- 1) 菅野三郎, 福井昭三, 内藤昭治, 金子幹宏: 有害ガスによる公害の衛生化学的研究 (第13報) 空気中の

Fig. 5 Chromatograms of ammonia, nitrite and nitrate in the food samples by conductivity detector and spectrophotometric detector with indophenol postcolumn derivatization method

[I] : Soy sauce [II] : Salt-fermented vegetables

(A) : Spectrophotometric detector with indophenol postcolumn derivatization method

(B) : Conductivity detector

- アンモニア定量法の検討, 衛生化学, **14**, 280~284 (1968)
- 2) 日本工業規格協会編: JISハンドブック10環境測定工場排水試験法 p 1148, 日本規格協会, 東京 (1996)
- 3) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解, p 11~15, 金原出版株式会社, 東京 (1990)
- 4) 松居正巳, 石橋亨, 水野竹美, 西川雅高: 環境中のN-ニトロソ化合物の分析法に関する研究 (II) — HPLCによるジアゾ化法を用いた環境中の亜硝酸の分析 —, 環境化学, **2**, 779~785 (1992)
- 5) 富田伴一, 中島治男, 浜村憲克: カドミウム-銅 (Cd-Cu) カラム還元法による飲料水中の硝酸窒素の微量定量法, 衛生化学, **19**, 88~93 (1973)
- 6) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解, p 954~955, 金原出版株式会社, 東京 (1990)
- 7) 環境化学研究会編: 新しい排水基準とその分析法, p 400~406, 環境化学研究会 (1994)
- 8) 日本工業規格協会編: JISハンドブック10環境測定工業用水試験法, p 1019~1020, 日本規格協会, 東京 (1996)
- 9) 日本工業規格協会編: JISハンドブック10環境測定工場排水試験法, p 1132~1033, 日本規格協会, 東京 (1996)
- 10) 日本工業規格協会編: JISハンドブック10環境測定工場排水試験法, p 1146, 日本規格協会, 東京 (1996)