【公報種別】特許法第１７条の２の規定による補正の掲載
【部門区分】第６部門第１区分
【発行日】令和3年12月16日(2021.12.16)

【公表番号】特表2019-535006(P2019-535006A)
【公表日】令和1年12月5日(2019.12.5)
【年通号数】公開・登録公報2019-049
【出願番号】特願2019-515449(P2019-515449)
【国際特許分類】
Ｇ０１Ｎ　31/00　(2006.01)
Ｃ０１Ｃ　 1/02　(2006.01)
Ｇ０１Ｎ　31/22　(2006.01)
Ｇ０１Ｎ　21/77　(2006.01)
Ｇ０１Ｎ　21/78　(2006.01)
【ＦＩ】
Ｇ０１Ｎ　31/00　Ｇ
Ｃ０１Ｃ　 1/02　Ｚ
Ｇ０１Ｎ　31/22　１２２
Ｇ０１Ｎ　21/77　Ｂ
Ｇ０１Ｎ　21/78　Ｚ

【誤訳訂正書】
【提出日】令和3年11月4日(2021.11.4)
【誤訳訂正１】
【訂正対象書類名】特許請求の範囲
【訂正対象項目名】全文
【訂正方法】変更
【訂正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
水性サンプルのアンモニウム含有量の定量方法であって、
ａ）塩素化剤、フェノール誘導体およびニトロプルシドをアルカリ性ｐＨでサンプルに添加する、
ｂ）ステップａ）において得られた混合物の吸光が、形成された青色染料の吸収領域においておよびニトロプルシドの吸収領域において定量される、
前記方法。
【請求項２】
塩素化剤が、ジクロロイソシアヌル酸であることを特徴とする、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
フェノール誘導体が、２－クロロフェノールであることを特徴とする、請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
ステップａ）におけるアルカリ性ｐＨが、水酸化ナトリウム溶液の添加により生じることを特徴とする、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
ステップａ）におけるｐＨが、ｐＨ１１～ｐＨ１２の間に設定されることを特徴とする、請求項１～４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
ステップｂ）における吸光の定量が分光計を用いて行われることを特徴とする、請求項

１～５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
吸光の定量が３５０～４５０ｎｍの波長範囲における光度測定および６００～８００ｎｍの波長範囲における光度測定を行うことにより行われる、請求項１～６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
ａ）アルカリ性ｐＨを有するサンプルの調製および塩素化剤、フェノール誘導体およびニトロプルシドの本サンプルへの添加、
ｂ）形成した青色染料の吸収領域においておよびニトロプルシドの吸収領域において、ステップａ）における調製された混合物の吸光を定量、
ここで、ニトロプルシドの吸収領域における吸光が、ステップａ）において添加されたニトロプルシドの量の少なくとも５０％の存在を示す先に定量された閾値を超える場合にのみ、形成された青色染料の吸収領域におけるサンプルの吸光が妥当な測定結果とみなされる、
により水性サンプルのアンモニウム含有量の定量の測定結果の妥当性を決定する方法。
【請求項９】
請求項８に記載の方法であって、閾値が、
ｉ．アンモニウムを含有せず、アルカリ性ｐＨを有する水溶液の形態におけるブランク値サンプルの提供ならびにステップｂ）において吸光が定量される混合物とｐＨ、塩素化剤、フェノール誘導体およびニトロプルシドに関して同じ組成および濃度を有するように、本水溶液への塩素化剤、フェノール誘導体およびニトロプルシドの添加、
ｉｉ．ニトロプルシドの吸収領域におけるブランク値サンプルの吸光の定量、
ｉｉｉ．ステップｉｉ．）において定量される吸光値を二分することにより閾値を計算、
により定量されることを特徴とする、前記方法。
【請求項１０】
塩素化剤が、ジクロロイソシアヌル酸であることを特徴とする、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
フェノール誘導体が、２－クロロフェノールであることを特徴とする、請求項９または１０に記載の方法。
【請求項１２】
ステップａ）におけるアルカリ性ｐＨが、水酸化ナトリウム溶液の添加により生じることを特徴とする、請求項９～１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３】
ステップａ）におけるｐＨが、ｐＨ１１～ｐＨ１２の間に設定されることを特徴とする、請求項９～１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４】
ステップｂ）およびステップｉｉ）におけるニトロプルシドの吸光の定量が、ステップｂ）およびステップｉｉ）の各場合においてニトロプルシドの吸収極大において行われることを特徴とする、請求項９～１３のいずれか一項に記載の方法。
【誤訳訂正２】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】全文
【訂正方法】変更
【訂正の内容】
【発明の詳細な説明】
【発明の名称】アンモニウムの定量方法
【技術分野】
【０００１】
本発明は、公知のベルテロ法（Berthelot method）による水性サンプルにおけるアンモ

ニウムまたはアンモニアの定量方法に関し、ここで触媒として用いられたニトロプルシドの吸収領域における吸光のさらなる測定により誤った低い結果の危険性を大幅に低減する。

【背景技術】

【０００２】

先行技術

アンモニウム態窒素（NH_4－Ｎ）は多くの地上水流、複数の地下水、ならびに家庭内および多くの商業廃水に存在する(情報源:DIN 38406-5、ISO 7150-1)。

アンモニアは低濃度でさえ、魚には有毒である。したがって、水中のアンモニウム含有量０．５～１ｍｇ／ｌは、水のｐＨに依存して、魚に有害であると分類される。１ｍｇ／ｌを超えるアンモニウム含有量では、水流は典型的に漁業目的には適さない。

【０００３】

したがって、水危機物質に属するアンモニウム化合物制限値が多くの規制に見出され得る。したがって、水および汚染水サンプルにおけるアンモニウム含有量のモニタリングが定期的に極めて重要である。

標準化されたアンモニウム含有量の定量方法が頻繁に用いられる。これらは、とりわけ、ベルテロ法を含む。

方法は、アルカリ性ｐＨで行われ、そこでアンモニウムはアンモニア（NH_3）の形態である。

【発明の概要】

【０００４】

ベルテロ法の第１段階において、アンモニアは次亜塩素酸塩と反応してモノクロラミンを与える。

次のステップにおいて、形成したモノクロラミンは触媒のニトロプルシドの存在下でフェノール誘導体と反応してクロロキノンモノイミンを与える。原則として、様々な化合物がフェノール誘導体に適している。例えば、サリチラート、チモールまたは２－クロロフェノールが公式な方法において頻繁に用いられる。

最終反応ステップにおいて、形成したクロロキノンモノイミンはフェノール誘導体のさらなる１分子と反応して、対応するインドフェノールを与える。

【０００５】

形成したインドフェノールの青色は、光度的に（吸収極大の領域における波長で）測定され、特定の測定範囲においてサンプルのアンモニウム含有量と関連する。

完全な反応機構は、これまで明白に明らかにされておらず、多くの中間体を介して進行する。

ベルテル法のさらなる情報および詳細が、例えばPhilip L. Searle, Analyst, May 1984, Vol 109, pages 549-568 “The Berthelot or Indophenol Reaction and Its Use in the Analytical Chemistry of Nitrogen”またはMichael D. Krom, Analyst, April 1980, Vol. 105 No. 1249, pages 305-316 “Spectrophotometric determination of Ammonia:A Study of a Modified Berthelot Reaction Using Salicylate and Dichloroisocyanurate”に見出され得る。

【０００６】

本方法は、サンプル／試薬比が相応に適合するかまたはサンプルが前希釈される場合、原則として様々な測定範囲で用いられ得る。この方法を使用するアンモニウム試験はまた即時使用できる試験セットの形態において様々な製造業者から利用可能である。

【０００７】

上記方法は、形成した青色がアンモニウムの特定の濃度範囲におけるアンモニウム含有量と関連するのみで、定量されるという不利益を有する。

一般に、光度測定における測定シグナル（吸光）は、サンプルのアンモニウム含有量の上昇と共に上昇する。

測定シグナル、すなわち吸光、は、サンプルの非常に高いアンモニウム濃度で再び降下

する（図１参照）ということが実際に見出された。原因はこれまで曖昧で確認されていない。反応機構は、好ましくない検体／試薬比ではもはや完全に進行しない。形成した過剰量のモノクロラミンによるｐＨシフトはまたこの原因となり得る。アンモニウム含有量の信頼性のある報告はこの場合には不可能であり、最悪の場合、環境上の深刻な影響を伴う、アンモニウム含有量の重大な誤った評価が生じ得る。

【０００８】

したがって、標準的な試験セット製造業者は、測定結果の妥当性を検査するために、サンプルの分析に加えて、希釈したサンプル（様々な汚染ステップ）を用いたさらなる分析が行われるべきことを指示する。

【０００９】

発明の目的

したがって、本発明の目的は、水性サンプルのアンモニウム含有量の定量方法、さらに単一の測定の測定結果を提供することであり、それはまた、例えば希釈系列の一部として、さらにサンプルを測定する必要性なく本測定結果の妥当性の情報を直接的に供給する。

【００１０】

目的の達成

さらに形成した青インドール染料の吸収領域における吸光の測定、触媒として用いたニトロプルシドの吸収領域における吸光の測定がサンプル上で行われる場合、ベルテロ法によるアンモニウム含有量の測定の妥当性が検査され得ることを見出した。

触媒として用いられるニトロプルシドの吸収領域における測定が十分なニトロプルシドが存在することを示す場合、アンモニウム定量の結果は妥当性がある。ニトロプルシドの吸収領域における測定が、触媒がほとんどまたは全く存在しないことを示す場合、アンモニウム定量の結果の妥当性を疑わなければならない。

【００１１】

このように、アンモニウム定量の実際の測定結果の妥当性を、同一のサンプル上で直接的に行われるニトロプルシドの吸収領域における吸光のさらなる測定により検査することができる。サンプルの希釈物のさらなる測定は通常必要ない。

したがって、本発明は、水性サンプルのアンモニウム含有量の定量方法であって、

ａ）塩素化剤、フェノール誘導体およびニトロプルシドをアルカリ性ｐＨでサンプルに添加する、

ｂ）ステップａ）において得られた混合物の吸光が、任意に反応時間を待った後に、形成された青色染料の吸収領域においておよびニトロプルシドの吸収領域において定量される、

前記方法、

に関する。

【００１２】

好ましい態様において、塩素化剤はジクロロイソシアヌル酸である。

好ましい態様において、フェノール誘導体は２－クロロフェノールまたはチモール、特に好ましくは２－クロロフェノールである。

好ましい態様において、ステップａ）におけるアルカリ性ｐＨは水酸化ナトリウム溶液の添加により生じる。

【００１３】

好ましい態様において、ステップａ）におけるｐＨは、ｐＨ１１～ｐＨ１２の間である。サンプルに最適なｐＨは用いられるフェノール誘導体に依存し、例えば、２－クロロフェノールの場合、ｐＨ１１．５～１１．８の間のｐＨが好ましい。

好ましい態様において、ステップｂ）における吸光の測定は分光計を用いて行われる。

【００１４】

好ましい態様において、吸光の定量は３５０～４５０ｎｍの間の波長範囲における測定および６００～８００ｎｍの間の波長範囲における測定を行うことにより行われる。

【００１５】

さらに、本発明は、水性サンプルのアンモニウム含有量の定量のための発明による方法に従って行われる、水性サンプルのアンモニウム含有量の定量の測定結果の妥当性を決定する方法、
すなわち、
ａ）アルカリ性ｐＨを有する水性サンプルの調製および塩素化剤、フェノール誘導体およびニトロプルシドの本サンプルへの添加、
ｂ）形成した青色染料の吸収領域においておよびニトロプルシドの吸収領域において、任意に反応時間を待った後に、ステップａ）において調製された混合物の吸光を定量、
ここで、ニトロプルシドの吸収領域における吸光が、先に定量された閾値を超える場合にのみ、形成した青色染料の吸収領域におけるサンプルの吸光が妥当な測定結果とみなされる、
による方法、
に関する。

【００１６】

好ましい態様において、この混合物がアンモニウムを全く含有しない場合、閾値は、ステップａ）からの混合物に存在するニトロプルシドの半分によりこの混合物に引き起こされるだろう吸光に対応する。

【００１７】

好ましい態様において、閾値は
ｉ．アンモニウムを含有せず、アルカリ性ｐＨを有するブランク値サンプルの提供、ならびにステップｂ）において吸光が定量される混合物とｐＨ、塩素化剤、フェノール誘導体およびニトロプルシドに関して、同じ組成および濃度を有するように、塩素化剤、フェノール誘導体およびニトロプルシドのブランク値サンプルへの添加
ｉｉ．ニトロプルシドの吸収領域におけるブランク値サンプルの吸光の定量、ここでステップｂ）およびステップｉｉにおけるニトロプルシドの吸光は好ましくは同じ波長で定量される、
ｉｉｉ．ステップｉｉ）において定量される吸光値を二分することにより閾値を計算、
によって定量される。

【００１８】

好ましい態様において、塩素化剤が、ジクロロイソシアヌル酸である。
好ましい態様において、フェノール誘導体は２－クロロフェノールまたはチモール、特に好ましくは２－クロロフェノールである。
好ましい態様において、ステップａ）におけるアルカリ性ｐＨは水酸化ナトリウム溶液の添加により生じる（produced）。

【００１９】

好ましい態様において、ステップａ）におけるｐＨはｐＨ１１～ｐＨ１２の間である。サンプルに最適なｐＨは用いられるフェノール誘導体に依存し、例えば、２－クロロフェノールの場合、ｐＨ１１．５～１１．８の間のｐＨが好ましい。
好ましい態様において、ステップｂ）およびステップｉｉにおけるニトロプルシドの吸光の定量は、ニトロプルシドの吸収極大で行われる。

【００２０】

上記発明の個々の側面または主題はまた２以上の側面または主題の任意の所望の組み合わせにおいて達成され得る。

【００２１】

「図１」図１は、様々なアンモニウム濃度のベルテロ法によるサンプルのアンモニウム含有量の定量の場合における測定された吸光を示す。
「図２」図２は、形成した青染料の吸収領域におけるおよびニトロプルシドの吸収領域における、様々なアンモニウム濃度のベルテロ法によるサンプルのアンモニウム含有量の定量の場合における測定された吸光を示す。

【００２２】

本発明によると、水性サンプルは、水に溶解した１または典型的にそれ以上の成分を含有するサンプルである。一般に、水性サンプルは水以外のさらなる溶媒を含有しない。しかしながら、１以上の水混和性溶媒、例えば、エタノールなどを２０％まで含有してもよい。水性サンプルは水サンプル、食品または飲料、あるいは体液であり得る。水性サンプルは非常に好ましくは水サンプル、例えば水流、排水サンプル、地下水サンプル、水道水サンプル、産業工程に供給されるかまたは排水として産業工程から排出される水のサンプルなどから採取されるサンプルなどである。

【００２３】

サンプルのアンモニウム含有量は、サンプルがアルカリ性にされ、アルカリ性サンプルにおいてアンモニアの形態であるとき、アンモニアに変換され得る存在するアンモニウム化合物のサンプルの含有量である。ここでサンプルは典型的にｐＨ１０～ｐＨ１３．５の間、好ましくは１１～１２の間のｐＨをもたらす。これは塩基または水酸化物溶液を用いて、例えばＬｉＯＨ、ＮａＯＨ、ＫＯＨ水溶液を用いて、好ましくは水酸化ナトリウムを用いて行われ得る。したがって、アンモニウム化合物の例はアンモニウム塩、水酸化アンモニウムおよびアンモニアである。

【００２４】

ベルテロ法によるアンモニウム含有量の定量において、塩素化剤、フェノール誘導体および触媒としてのニトロプルシドは、アルカリ性領域において、一般に５～３０分の間、好ましくは１０～２０分の間である特定の時間にサンプルに添加され、典型的には検出反応を行うことができるように期待される。青色化したインドフェノールは複数の反応ステップにわたり形成する。インドフェノールの吸収領域において定量される吸光は、当業者に公知である特定の測定範囲におけるサンプルのアンモニウム含有量と関連がある。アンモニウム含有量の測定はニトロプルシドを触媒として用いるベルテロ法の任意の変形を用いる発明にしたがって行われ得る。

【００２５】

適切な塩素化剤は、例えば、次亜塩素酸ナトリウムおよびジクロロイソシアヌラート（ＤＩＣ）またはジクロロイソシアヌル酸である。ジクロロイソシアヌル酸は特に好ましい。

例えば、適切なフェノール誘導体は、フェノールまたは２－クロロフェノールなどの２－置換フェノール、チモールまたはサリチラートである。

【００２６】

例えば、DIN 38406/5に記載される方法を使用することが可能であり、その中で頻繁に使用される次亜塩素酸塩の代わりにジクロロイソシアヌル酸が使用され、サリチル酸ナトリウムがフェノールの代わりに使用される。

ニトロプルシドナトリウムとも呼ばれるニトロプルシドは、実験式$Na_2[Fe(CN)_5NO]2H_2O$で表される錯体である。

【００２７】

アンモニウム含有量を定量的に定量するために、必要な試薬の添加後および青～青緑のインドフェノールの形成後のサンプルの吸光をインドフェノールの吸収領域における特定の波長で定量する。測定は典型的に吸収極大で行われる。その後、定量的な定量はキャリブレーション曲線を用いて行われ得る。手順は当業者に公知である。キャリブレーション曲線および吸光が定量される波長は各試薬の組み合わせ（塩素化剤、フェノール誘導体、ｐＨの型および量、など）に対して相応に定量されなければならない。６００～８００ｎｍの間の波長範囲における吸収極大を有するインドフェノールは、典型的に定量において形成される。

【００２８】

本発明の中心は、ベルテロ法による水性サンプルのアンモニウム含有量の測定結果の妥当性またはまた正確さを、これまでのようにこのサンプルの希釈系列の複雑な(complex)測定により定量する必要がないが、代わりにこの１つのサンプル自身だけの測定により定量できることである。

【００２９】
このため、ベルテロ法によるアンモニウム含有量の定量は公知の方法に従って当業者に公知な従来の試薬を用いて行われ、ここで使用される触媒はニトロプルシドである。形成されるインドフェノールの吸収領域、好ましくは吸収極大におけるサンプルの吸光の通常の測定に加えて、第２の測定をニトロプルシド、好ましくは約４００ｎｍで、同一サンプルで行う。
【００３０】
ニトロプルシドの吸収領域における第２の測定の結果は、測定サンプルに存在するニトロプルシドの量の記述を許容する。インドフェノールの吸収領域における不正確に低い吸光値へと導く、アンモニウムの非常に高い含有量で、ニトロプルシドの量およびしたがってニトロプルシドの吸収領域における吸光がまた同時に非常に低いということを見出した。この関連により、サンプルにおけるニトロプルシド含有量の定量は、アンモニウム含有量の定量結果の妥当性の直接的な結論を許容する。
【００３１】
当業者はどれほどのニトロプルシドがサンプルに添加されたかを知っているので、ニトロプルシドの吸収領域における測定の結果から対応する結論を描くことができる。典型的に、ニトロプルシドの吸収領域における測定が、サンプルに初めに添加されたニトロプルシドの少なくとも半分が、かかるようにいまだ存在し、したがって、この領域における吸収に寄与することを示す場合、アンモニウム定量の結果は妥当であると推測できる。
【００３２】
しかしながら、アンモニウム含有量の定量のために得られた測定結果の妥当性の決定は、好ましくはニトロプルシドの吸収領域における測定結果と前に定義した閾値との比較により行われる。測定結果が閾値を超える場合、サンプルのアンモニウム含有量の定量結果は妥当である。ニトロプルシドの吸収領域における測定結果が閾値より低い場合、サンプルのアンモニウム含有量の定量結果の妥当性は疑われ、例えば希釈系列の測定により相応に検査されなければならない。
【００３３】
十分なニトロプルシドが測定される混合物にまだ存在していることを確かめることにより当業者は閾値を確立することができる。はじめに添加されたニトロプルシドの量の４０％、好ましくは約５０％が典型的に十分である。
【００３４】
閾値は、好ましくは、アンモニウムを全く含有しないブランク値サンプルの準備に先立って設定され、アルカリ性ｐＨへの調整および塩素化剤、フェノール誘導体およびニトロプルシドを添加してこのブランク値サンプルとするので、それはアンモニウム含有量が定量され、それらの試薬を添加する水性サンプルと、ｐＨ、塩素化剤、フェノール誘導体およびニトロプルシドに関して同一の組成および濃度を有する。ブランク値サンプルの吸光は、その後ニプロプルシドの吸収領域において測定される。閾値は、その後吸光値を二分することにより計算される。水性サンプルにおけるおよびブランク値サンプルにおけるニトロプルシドの吸光の定量は好ましくは同一の波長において行われる。
【００３５】
光度測定の性能は当業者に知られている。光度測定は典型的に３００～７００ｎｍの範囲における少なくとも２つの波長での吸光の測定により行われる。３００ｎｍ～７００ｎｍの間の測定に適する全ての光度計が本目的に適している。
【００３６】
吸光の測定のために、水性サンプルは一般にセルに注入される。
本発明によると、セルは光度測定が行われ得る容器（vessel）である。セルは典型的に石英、ガラスまたはプラスチックからなり、少なくとも２つの平面－平行な側面を有するかまたは円形である。セルの選択およびセルの厚さは、測定されるサンプルの同一の組成に対して減少するかまたは増加する吸光を許容する。
【００３７】

アンモニア含有量の定量のための試薬の他に、サンプルのアルカリ化の前または後に、さらに試薬を水性サンプルに添加することができる。例えば、これは定量のために必要である高いｐＨ値での沈殿からのサンプルに存在する他の成分を防止するため、あるいはインドフェノールの形成を伴う干渉を妨げるために必要となり得る。このタイプの試薬の例はＥＤＴＡまたはクエン酸三ナトリウムである。

【００３８】

本発明はベルテロ法によるアンモニウム含有量の定量において行われる仕事量を大幅に削減することができる。特に多くのサンプルが日常的に測定される実験室において、行われる仕事量を大きく削減できる。本発明の方法による妥当性検査が、妥当性が疑わしいに違いないことを示す場合、最後の説明のために希釈系列のみが行われなければならない。

【００３９】

本記載は当業者が適用でき、本発明を包括的に行うことができる。したがって、さらなる解説なしでさえ、当業者は最も広い範囲における上記記載を利用できるだろうことが推測されるだろう。不明確なことがあれば、引用出版物および特許文献を調べるべきである。したがって、本明細書に言及される全ての出願、特許および出版物、特に２０１６年９月２０日出願のEP16189652.7の完全な開示内容が参照により本願に組み込まれる。

【００４０】

よりよい理解のため、且つ本発明の説明のために、以下に例を示す。これらの例はまた可能な変形を説明するのに役立つ。しかしながら、記載された進歩性の理論の一般的妥当性により、例は本発明の保護範囲をそれらのみに縮小するのに適さない。

さらに、示された例においておよびまた記載の残りの両方において、組成物に存在する成分量が、通常、全組成物に基づき１００重量％またはｍｏｌ％まで添加するのみで、これを超えることができず、より高い値の場合でさえ、示されたパーセント範囲から生じ得るということは当業者にとって言うまでもない。他で示されない限り、％データは重量によるものであり、例えば、溶媒が特定の体積比における混合物において用いられる調製のための溶離液など、体積量で再現される、比の除外を有する。

【００４１】

例および説明において、ならびに特許請求の範囲において示される温度は通常℃である。

【００４２】

例

先行技術による例

アンモニウムの異なる含有量を有するサンプルのアンモニウム含有量の定量はＭｅｒｃｋからのアンモニウムの定量のための即時使用できる試験セットにしたがって行う。商品コード（Article number）1147390001 Spectroquant（登録商標）アンモニウムセルテストが本明細書において用いられる。この場合フェノール誘導体は２－クロロフェノールである。測定は７０３ｎｍの波長で行われる。結果は図１に示される。

吸光はアンモニア含有量が約２０～３０ｍｇ／ｌまで上昇するとみられる。その後高いアンモニウム含有量にかかわらず再び落ちる。１００ｍｇ／ｌを超えるアンモニウム含有量での２つの測定は本質的に過度に低い吸光値を引き起こす。

【００４３】

本発明による例:

【表１】

NH_4-N [mg/l]	A_{703nm} (インドフェノールブルー)	A_{397nm} (ニトロプルシド)
0	0.057	3.854
0.2	0.279	3.921
2	2.281	4.227
20	4.487	3.733
200	1.828	1.124
2000	0.039	0.699
閾値 1: $A_{703nm} \leq 2.400$		
閾値 2: $A_{397nm} \geq 3.400$		

表１

【００４４】
表１における値および図２において示される曲線はＭｅｒｃｋからのアンモニウムの定量のための即時使用できる試験セットを用いて定量される。商品コード（Article number）1147390001 Spectroquant（登録商標）アンモニウムセルテストが本明細書において用いられた。試験セットは、NH_4－Ｎが０．０１０-２．０００ｍｇ／ｌの測定範囲内のサンプルに適している。NH_4－Ｎが０／０．２０／２．００／２０．０／２００および２０００ｍｇ／ｌの含有量を有する標準サンプルが分析された。用いられる標準サンプルは塩化アンモニウムNH_4Clであった。ＮＨ４－Ｎの２０００ｍｇ／ｌ溶液を調製するために、７．６３８ｇのNH_4Clを１０００ｍｌの蒸留水に溶解させなければならない。示された他の濃度は蒸留水を用いた希釈によりこの溶液から調製される。試験セットは必要とされた試薬が即時使用できる形態にあるという事実により区別される。測定は直径１６ｍｍを有するいわゆる円形セルにおいて行われる。円形セルは既に１．５ｍｌの試薬を含有する。この試薬は水酸化ナトリウムならびにフェノール誘導体として2-クロロフェノールを含有する。両方の成分が蒸留水に溶解される。
【００４５】
第１の反応ステップにおいて、サンプルまたは標準溶液の５．０ｍｌが円形細胞に既に存在する試薬に添加され混合される。第２の反応ステップにおいて、固体試薬を計量スプーンを用いて添加し、溶解し、振とうして均一に混合する。固体試薬は、他の必要な反応成分ニトロプルシドおよびジクロロジクロロイソシアヌル酸ならびに充填剤を含む。
【００４６】
全ての成分が互いに均一に混合されるとき、１５分の反応時間が始まる。
１５分終了後、円形細胞の吸光が分光光度計で、７０３ｎｍおよび３９７ｎｍで測定される。測定は蒸留水で満たされた同じ型の対照細胞に対しても行われる。
【００４７】
７０３ｎｍでの測定は、存在する反応条件下（ｐＨおよび反応時間）で形成されたインドフェノールの吸光を示し、３９７ｎｍでの測定は、存在する反応条件下（ｐＨおよび反応時間）での完了後にニトロプルシドの吸光を示す。
インドフェノールの吸光は表示されたNH_4－Ｎの０．０１０-２．０００ｍｇ／ｌの測定範囲において比例して増大すると見られる。インドフェノールの吸光のさらなる増大

はまたＮＨ$_4$－Ｎの２０ｍｇ／ｌの濃度で生じる。この増大はＮＨ$_4$－Ｎの濃度に比例しない。ＮＨ$_4$－Ｎの２００ｍｇ／ｌで、７０３ｎｍでの吸光がＮＨ$_4$－Ｎの２ｍｇ／ｌの含有量を有する標準の吸光を下回る。極端な場合、これは概説された誤解へ導くだろう。存在するニトロプルシドの検出のために同時に行われる３９７ｎｍでの測定の場合において、非常に高い濃度で吸光がかなり落ちるとみられる。２つの波長での測定の連結する解釈が今、設定される妥当な規則となり得る。これは以下の通り例に示される：
７０３ｎｍ＜２．４００Ａで吸光および３９７ｎｍ＞３．４００Ａで吸光する場合、測定は妥当であり得る。