

技術報告

燃焼法によるコメ中の全窒素測定の試験室間共同試験 - 第3報

堀田 博[§]Determination of Total Nitrogen in Rice with the Dumas Combustion Method;
Collaborative StudyHiroshi Horita[§]

National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8642 Japan

Abstract

Nitrogen content in rice was determined by the Dumas combustion method in cooperation with 22 laboratories. Proficiency test by the Kjeldahl methods using same sample was performed with 12 laboratories.

HorRat values and RSD_R of 7 samples for the Dumas Combustion method were 0.51 to 0.70, 1.97 to 2.81 % and 0.48 to 0.77 %, respectively, showed that the measuring results of this collaborative trial were satisfying, and this method have a good performance and reproducibility to determine total nitrogen in rice.

The value of z-score obtained from the result of proficiency test to determine nitrogen content in rice by the Kjeldahl method performed with various measuring condition, were -0.72 to 0.95, and half of them were -0.2 to 0.2, showed that the Kjeldahl method have a good performance and robustness to determine total nitrogen in rice.

Keywords: nitrogen content (窒素含量), the Dumas combustion method [燃焼 (改良デュマ) 法]
the Kjeldahl method (Kjeldahl 法), rice (コメ)

緒言

現在, 食品中のたんぱく質の定量分析法として広く使われているのは, 手分析や種々の自動分析装置によるケルダール法 (the Kjeldahl method)^{7)・9)}, 燃焼法 [改良デュマ法 (the Dumas combustion method)]^{1)・10)・19)}及び近赤外分光 (NIR) 法^{20)・21)}である。

ケルダール法では, 硫酸と触媒でたんぱく質などの有機物を分解してその中の窒素をアンモニア態とし, それを滴定して窒素量を算出する。また, 燃焼法では, 試料を燃焼管内で燃焼させると, たんぱく質などに由

来する窒素酸化物が生成するので, それを還元して窒素とし, 窒素量を TCD 検出器で定量する。食品中のたんぱく質含有量は, ケルダール法及び燃焼法で得られた窒素量に食品毎に決められた窒素 - たんぱく質換算係数^{2)・3)}を掛けて算出する。一方, NIR 法による種々の食品成分の測定原理は, 近赤外線 (700 ~ 2500 nm) や中赤外線 (2500 ~ 15000 nm) の吸収スペクトルを測定し, 定量する成分に関係するいくつかの吸収波長 (分子の基本振動数など) を選び, 標準法による測定値に対する検量線を作成し, 試料を測定し検量線と比較して, 成分含量を求める。

食品中のたんぱく質の定量法としてはケルダール法

[§]連絡先, horita@affrc.go.jp

2009年10月30日受付 2009年10月30日受理

が最も早く AOAC インターナショナルの公認法になった¹⁾。燃焼法は、ケルダール法と比較すると、危険な試薬や環境負荷が大きな試薬を使わず、測定時間が数分間で済み、簡易・迅速に自動測定が可能であるので²⁾、品質管理用としても使える、ケルダール法の代替法として普及している。また、ケルダール法との比較により同等の性能を持つ定量分析法であることが確認され^{10)~14)}、飼料やペットフード¹²⁾²²⁾、ビールとその材料²³⁾、穀類や油量種子¹³⁾、肉及び肉製品¹⁴⁾、牛乳²⁴⁾ などについては、燃焼法が ISO (International Organization for Standardization, 国際標準化機構) 規格や AOAC インターナショナルの公認法として採用されている。日本国内でも燃焼法が、ハム類、ベーコン類、マカロニ類、醸造酢、乾燥スープ、熟成ベーコン、しょう油の日本農林規格 (JAS) や飼料分析基準の公定分析法の一つとなっている^{16),17)25)}。

ある食品に関する定量分析法が公定法となるためには、その食品での試験室間共同試験 (以後、室間共同試験と略す) を行い、試験室間再現性などを確認する必要がある。また、既に公認されている公定法との比較も新分析法の公定法化のポイントとなる。日本の食品では最も摂取量が多く日本人の主食でもあるコメについては、AOAC インターナショナルの穀類の公認法の記載の中には含まれていないので、著者らはコメを試料とした燃焼法の室間共同試験を行い、燃焼法によるコメにおける全窒素測定の妥当性確認を行った¹⁸⁾。ここに報告する共同試験は、コメを試料とした燃焼法による 2 回目の共同試験になるが、前回よりも参加試験室数が増え、国産だけではなくタイ産米も試料として使い、また使用する燃焼装置の機種も増え、日本において使用されている燃焼装置の機種全体をほぼ網羅できる状態での共同試験として、より適切な条件下での妥当性確認となっている。また、この燃焼法の共同試験で使用したのと同じコメ試料を使用してのケルダール法による室間共同試験 (技能試験) も実施し、両測定法の比較検討を行った。ここに報告する共同試験の結果は、アミノ酸を添加して窒素含有量の範囲を広くして行った 3 回目の共同試験の結果¹⁹⁾ と併せて、コメ試料の燃焼法による全窒素測定の信頼性を保証するものとなる。

なお、2007年に発覚したメラミン混入事件は、たんぱく質含量が飼料や牛乳、粉ミルクの品質や価格を決めるため、たんぱく質含量を高く見せかけるために起こったものである。ケルダール法と燃焼法では、食品中の窒素を定量してたんぱく質に換算するため、メ

ラミン分子中の窒素もたんぱく質由来の窒素と区別なく定量され、その定量値をもとにたんぱく質が推定される。分子中の窒素含有率が非常に高いメラミンの添加でその食品の窒素含有率を高めてたんぱく質含量が高いように偽装されたのだが、このような測定法の原理自体を悪用した偽装に対しては、たとえ妥当性が確認された分析法でも無力になる。この偽装に対しては、ペプチド結合に由来する吸収波長の利用という原理をまったく異にした NIR 法が威力を発揮する。NIR 法も標準法であるケルダール法や燃焼法との比較により全窒素測定における妥当性が確認されており²¹⁾、原理の異なる複数の妥当性が確認された分析法が存在することは、食の安全確保の上でも好ましいことである。

実験材料及び方法

1. 分析試料

分析試料として、5 種類の 2003 年及び 2004 年産の玄米 (新潟県、福島県、茨城県産のコシヒカリ 3 種類と山形県産のはえぬき 2 種類) 及び 2 種類の市販の白米 (新潟県産コシヒカリとタイ産米) を用いた。

2. 粉碎と小分け、小分け試料の均質性

試料用のコメの粉碎は Retch 社製の超遠心粉碎機 ZM200 を用い、10000 rpm の回転速度で、0.50 mm のスクリーンを装着して行った。

粉碎したコメ試料を業務用攪拌機 (キッチンエイド ミキサー, KSM5) で良く混合した後、約 150 g ずつ、表層部分に沿って順次採取し、ガスバリアー性のあるアルミ袋 (ラミジップ) に保存し、小分けサンプルとした。5 サンプルを採取したらミキサーでの攪拌を 1 分間行い、その後に同様の操作手順で試料採取を再開し、小分けを行った。

小分けした 20 袋から測定用試料を各 2 点ずつ取り燃焼法で全窒素を測定し、文献に従って統計処理を行い、試料の均質性を確認した (Table 1)²⁶⁾²⁷⁾。

3. 妥当性確認試験及び技能試験

(1) 燃焼法の妥当性確認試験

燃焼法 (改良デュマ法) による測定報告のあった試験室が用いた機種は、試験室 1~8 が Leco-FP-2000 [LECO ジャパン(株)], 試験室 9~12 が Leco-FP-528 (同), 試験室 13 が Leco-FP-428 (同), 試験室 14 が Leco-TrueSpec (同), 試験室 15~17 が Sumigraph NC-220H [株住化分析センター], 試験室 18 が Sumigraph NC-900s

Table 1. Homogeneity of rice sample analyzed for total nitrogen measured by combustion method according to the Dumas principle

	Material 1 ^a	Material 2 ^a	Material 3 ^a	Material 4 ^a	Material 5 ^a	Material 6 ^a	Material 7 ^a
Number of accepted duplicate results	40	38	40	40	40	40	40
[19 or 20 distribution units (<i>m</i>)]	(2 × 20)	(2 × 19)	(2 × 20)	(2 × 20)	(2 × 20)	(2 × 20)	(2 × 20)
Mean (\bar{X} , %)	0.9276	1.052	0.9335	1.178	1.254	1.306	1.097
RSD(%)	0.881	1.26	1.46	1.16	0.979	1.36	1.58
Target standard deviation	0.0375	0.0418	0.0377	0.0460	0.0485	0.502	0.0432
[S_p , $0.02 \times (\bar{X}/100)^{0.8495} \times 100$, %]							
Analytical variance (S_{an}^2)	2.49×10^{-6}	9.10×10^{-6}	6.56×10^{-6}	1.47×10^{-5}	8.11×10^{-6}	1.11×10^{-5}	1.00×10^{-5}
Sampling variance (S_{sam}^2)	4.10×10^{-5}	8.62×10^{-5}	0.000118	2.91×10^{-5}	6.54×10^{-5}	0.000200	0.000198
$S_{all}^2 = (0.3 \times S_p)^2$	0.000127	0.000157	0.000128	0.000191	0.000211	0.000228	0.000168
$C = F_{18} S_{all}^2 + F_2 S_{an}^2$	0.000204	0.000256	0.000208	0.000314	0.000341	0.000369	0.000275
$S_{sam}^2 < C$	Accept	Accept	Accept	Accept	Accept	Accept	Accept
$S_{sam}^2 < S_{all}^2$	Accept	Accept	Accept	Accept	Accept	Accept	Not accept

^a; Material 1, 2, 3, 6; Variety 'Koshihikari', material 4, 7; Variety 'Haenuki', material 5; Indica varieties produced in Thailand

Table 2. Mean and its relative standard deviation (RSD) of each 7 samples reported by 22 laboratories participated in collaborative study for determination of nitrogen in brown and milled rice by the combustion according to the Dumas principle

Code of Laboratory	Sample No.														Sample Weight (mg)	C.T. ^{c)} °C
	1		2		3		4		5		6		7			
	Result ^{a)}	RSD ^{b)}	Result	RSD	Result	RSD	Result	RSD	Result	RSD	Result	RSD	Result	RSD		
1	0.9114	0.43	1.008	0.56	0.9220	0.39	1.128	0.31	1.257	0.40	1.306	0.51	1.082	0.71	300	1350
2	0.9349	0.85	1.030	0.85	0.9451	0.81	1.146	0.55	1.267	0.34	1.317	1.01	1.108	2.05	200	1300
3	0.9535	0.69	1.051	0.42	0.9655	0.51	1.170	0.63	1.294	0.60	1.344	0.70	1.125	0.77	500	1250
4	<i>0.9227^{d)}</i>	1.61	<i>1.014</i>	1.27	<i>0.9223</i>	1.50	1.136	0.58	<i>1.261</i>	1.34	1.305	1.03	<i>1.084</i>	1.28	800 - 1000	1200
5	0.9513	0.21	1.048	0.33	0.9616	0.30	1.165	0.32	1.286	0.33	1.335	0.29	1.119	0.22	500	1350
6	0.9430	0.66	1.041	0.43	0.9531	0.42	1.159	0.23	1.286	0.23	1.336	0.31	1.119	0.29	750	1350
7	<i>0.9333</i>	1.45	1.024	0.93	0.9381	0.71	1.146	0.59	1.267	0.40	1.316	0.24	1.098	1.03	500 - 600	1050
8	0.9212	0.72	1.013	1.05	0.9226	0.48	1.133	0.88	1.248	0.39	1.303	0.28	1.086	0.48	200	1350
9	0.9149	0.56	1.009	0.87	0.9236	0.56	1.117	0.91	1.237	0.71	1.295	0.39	1.067	0.83	250	950
10	0.9959	1.06	1.091	0.43	1.008	0.34	1.204	0.47	1.328	0.29	1.373	0.41	1.162	0.25	300	950
11	<i>0.9745</i>	1.42	<i>1.073</i>	1.39	<i>0.9819</i>	2.05	<i>1.187</i>	1.70	<i>1.308</i>	1.08	1.359	0.90	<i>1.131</i>	1.06	150 - 250	950
12	0.9642	0.84	1.065	0.26	0.9722	0.26	1.169	0.49	1.299	0.45	1.341	0.64	1.126	0.58	300	950
13	<i>0.9608</i>	3.67	<i>1.045</i>	2.69	<i>0.9647</i>	2.19	<i>1.181</i>	6.42	<i>1.268</i>	1.73	<i>1.338</i>	2.66	<i>1.094</i>	2.61	200	950
14	0.9642	0.48	1.058	0.72	0.9676	0.70	1.163	0.57	1.284	0.39	1.330	0.56	1.115	0.35	300	950
15	0.9471	0.27	1.041	0.33	0.9558	0.35	1.164	0.35	1.282	0.23	1.333	0.29	1.117	0.29	500	900
16	0.9500	0.51	1.039	0.18	0.9568	0.32	1.159	0.37	1.278	0.34	1.333	0.33	1.118	0.37	500	870
17	0.9393	0.23	1.031	0.27	0.9490	0.30	1.151	0.25	1.278	0.25	1.326	0.67	1.110	0.37	500	870
18	0.9504	0.57	1.045	1.07	0.9659	0.54	1.174	0.87	1.279	1.64	1.343	0.82	1.125	0.79	100	830
19	1.004	1.12	1.089	0.55	1.008	0.44	1.213	0.80	1.334	0.45	1.389	0.65	1.172	0.47	800	Nd ^{e)}
20	0.9870	1.04	1.080	0.63	1.006	0.46	1.204	2.36	1.325	0.41	1.378	0.64	1.157	0.70	150	Nd
21	<i>0.9740</i>	1.24	<i>1.063</i>	1.37	<i>0.9803</i>	1.31	<i>1.180</i>	1.17	1.309	0.90	1.356	0.64	1.138	0.73	500	Nd
22	0.9497	1.08	1.034	1.17	0.9668	0.76	1.153	0.82	1.281	0.77	1.334	0.85	1.126	0.93	500	850
Mean	0.9521		1.045		0.9607		1.164		1.284		1.336		1.121			

^{a)} Average of 9 sample values, g/100 g, ^{b)} Standard deviation/average, (%), ^{c)} Combustion temperature, ^{d)} Results of italic figure indicate outliers eliminated, ^{e)} Nd; no data.

(同), 試験室19が Vario Max (エレメンタル社), 試験室20が Vario Macron (同), 試験室21が rapid N (同), 試験室22が Protein Corder JM1000N (ジェイ・サイエンス・ラボ) で, その燃焼室の設定温度と試料重量は Table 2に記載した。

参加試験室には試料の取り扱いや分析方法についてのプロトコール^{18),19)}を付け, 試料計7種類を配付した。プロトコールの概要は以下の通り。

①本測定試験中は, 同じ機器で測定すること。②本測定試験中は, 校正には同じ標準物質(同一バッチ)を使うこと。③本測定試験には, 試料を100 mg 以上

使うこと。④本測定試験は, 3点繰り返しで測定すること。⑤本測定試験の室内再現性試験は3回, 異なる日に行うこと。⑥これら以外の測定条件については, 各試験室で使っている機器を使い, 通常の測定手順・測定方法で測定すること。⑦測定値は水分含量で補正しないこと(乾燥重量当たりではなく送付した試料そのままの重量当たりのデータ)。⑧結果の報告は全ての生のデータを送付すること。

(2) ケルダール法の技能試験

ケルダール法の試験は, ①本測定試験中は, 同じ機器で測定すること, ②本測定試験には, 試料を1 g 以

Table 3. Collaborative study parameters of the combustion according to the Dumas principle

Sample No.	1	2	3	4	5	6	7
Number of laboratories retained after eliminating outliers	18	18	18	18	18	21	18
Number of accepted results	162	162	162	162	162	189	162
Mean and precision parameters for accepted results							
Mean (\bar{X} , %)	0.9531	1.044	0.9604	1.158	1.286	1.336	1.120
Standard deviation of repeatability (S_r)	0.007	0.007	0.005	0.007	0.006	0.008	0.007
Relative standard deviation of repeatability (RSD_r , S_r/\bar{X} , %)	0.77	0.68	0.51	0.60	0.48	0.63	0.61
Standard deviation of reproducibility (S_R)	0.026	0.026	0.027	0.025	0.027	0.026	0.028
Relative standard deviation of reproducibility (RSD_R , S_R/\bar{X} , %)	2.78	2.48	2.81	2.15	2.11	1.97	2.46
Predicted relative standard deviation ($PRSD_R$, $0.02\bar{X}^{-0.1505}$, %)	4.03	3.97	4.02	3.91	3.85	3.83	3.93
HorRat ($RSD_R/PRSD_R$)	0.69	0.62	0.70	0.55	0.55	0.51	0.63
Mean and precision parameters for all valid results							
Mean	0.9521	1.045	0.9607	1.164	1.284	1.336	1.121
S_r	0.011	0.010	0.009	0.019	0.010	0.011	0.007
RSD_r	1.19	0.98	0.90	1.64	0.76	0.84	0.58
S_R	0.027	0.026	0.027	0.031	0.027	0.027	0.028
RSD_R	2.84	2.53	2.85	2.65	2.09	1.99	2.48
$PRSD_R$	4.03	3.97	4.02	3.91	3.85	3.83	3.93
HorRat	0.70	0.64	0.71	0.68	0.54	0.52	0.63

上使用すること、③本測定試験は、2点以上の繰り返しで測定すること、及び燃焼法のプロトコールとして示した⑥⑦⑧項の計6点を指示して行ったが、試薬の種類や量、触媒などの詳細は示さず、室間共同試験ではなく技能試験の形で実施した。

4. 集計データの棄却、コクラン (Cochran) 及び グラッブス (Grubbs) の検定²⁸⁾

集計したデータは外れ値の検定を、国際調和プロトコールである IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry, 国際純正・応用化学連合) の方法の2.5%の棄却限界値の表²⁸⁾により行った。

最初にコクランの検定を行い、棄却された試験室のデータを除き、次にグラッブスの検定を行った。ただし、参加試験室から異常値や室間共同試験のプロトコールに従わなかった有効でないデータを報告した試験室を除いた数の2/9以上は棄却できない²⁸⁾ので、検定で棄却とされる試験室が多く出ても、例えば、今回の22試験室の場合では4試験室が棄却できる最大数である。

5. データの解析

集計データの解析は前報告^{18),19)}と同様に行い、最大4試験室のデータを棄却した場合(棄却済データと略す)と全試験室のデータを使った場合(全試験室データと略す)それぞれについて、試料毎に分散分析を行った。その結果から、総平均(\bar{X})とその分散、併行分散(S_r^2 , Repeatability), 室間再現精度(S_R^2 , Reproducibility), 併行精度標準偏差(S_r)や室間再現精度標準偏差(S_R), 併行相対標準偏差(RSD_r), 室間相対標準偏差(RSD_R), Horwitz式による予測値 $PRSD_R$ ($0.02\bar{X}^{-0.1505}$, %) 及び HorRat 値 ($RSD_R/PRSD_R$) を算出した^{26),29)}。また、繰り返し測定と室内再現性試験の解析結果から、室間再現精度(分析誤差)を試験室間誤差と試験室内誤差、誤差に分けて計算した。

試料1と3, 試料4と7, 試料5と6は、室素含有量の差が5%以内の Youden ペア³⁰⁾としての解析も行った。

ケルダール法の技能試験としての解析は、文献^{31),32)}に従って行った。

実験結果および考察

1. 燃焼法の妥当性確認試験(室間共同試験)

(1) データ

22試験室の参加による燃焼法の妥当性確認試験で報告された測定結果を Table 2に示す。各試験室の9回の測定平均値とその相対標準偏差(RSD), 燃焼室の設定温度, 試料重量を記載した。

この結果からは、燃焼法では RSD が大きな試験室もあるが、機種による測定結果の違いはないといえる。

(2) 解析結果・1

これらの室間共同試験のデータの解析により外れ値を検定・棄却し、 S_r や S_R などを求めた (Table 3)。なお、棄却されたのは室内の測定値の分散の大きさによ

Table 4. Nested random effects analysis of variance for values of sample No.1 to 7 determined by the combustion according to the Dumas principle

Sample No.	1	2	3	4	5	6	7
Calculated with accepted results							
Inter-laboratory error (LAB, %)	91.4	91.1	96.2	91.2	94.6	88.9	93.4
Intra-laboratory error (DAY, %)	3.6	5.5	2.2	4.6	1.4	3.8	1.8
Errors except inter- and Intra-laboratory error (ERROR, %)	5.0	3.4	1.6	4.2	4.0	7.3	4.8
Calculated with all valid results							
LAB	81.4	83.4	89.6	-	86.3	81.7	84.4
DAY	4.0	6.7	2.2	-	2.4	2.7	3.8
ERROR	14.6	9.9	8.2	-	11.3	15.6	11.8

るコクランの検定によるものだけで、測定値の大小によるグラブスの検定での棄却はなかった。

全試験室データと棄却データによる RSD_R や $HorRat$ 値は、燃焼法では試料3以外はほとんど同じであった。

7試料の S_r と S_R , RSD_r , RSD_R についてまとめると、 S_r は棄却済データでは0.005~0.008g (単位は全窒素の重量)、全試験室データでは0.007~0.019g (同)、 S_R は棄却済データで0.025~0.028g (同)、全試験室データでは0.026~0.031g (同)、 RSD_r は棄却済データで0.48~0.77%、全試験室データでは0.58~1.64%、 RSD_R は棄却済データで1.97~2.81%、全試験室データでは1.99~2.85%の範囲になった。

さらに、 $HorRat$ 値は棄却済データで0.51~0.70、全試験室データでは0.52~0.71の範囲であった。

今回の燃焼法の室間共同試験で得られた RSD_r と RSD_R は、コムギや大豆などの穀類の室間共同試験の報告¹³⁾や前回の室間共同試験の RSD_r や RSD_R とほぼ同じ範囲に収まっていた (Table 5)⁸⁾。さらに、AOAC インターナショナルでは、 $HorRat$ 値は0.5~1.5の間にあればその室間共同試験は満足の行くもの、逆に0.5以下だと測定値の作為的な操作が行われたのではないかと見なされるのが²²⁾、今回の室間共同試験の $HorRat$ 値は0.51~0.70であり、本定量法の妥当性が確認される満足のいくものであること、即ち、コメ中の全窒素定量法としての燃焼法の有用性を示していた。

また、試料1と3、試料4と7、試料5と6は Youden ペア²⁸⁾としての解析も行った。燃焼法では、それぞれの解析値は、各試料単独で解析した値よりもほとんどの場合小さかった。これは、各試験室の Youden ペアとする試料の測定値間では、 R^2 (決定係数、相関係数の二乗) = 0.960以上の高い相関があったことに関連すると推定した。

前回の燃焼法の室間共同試験の報告¹⁸⁾では参加16試験室の内 Leco 社以外は2試験室であったが、今回の参加22試験室中 Leco 社は14試験室と同数で、メーカー

が1社、測定機種は3種類増えている。前回の試験の RSD_r (0.32~0.91%)、 RSD_R (1.74~2.56%)、 $HorRat$ 値 (0.56~0.66) の結果と比較してもほぼ同じ範囲であることから、機種に由来する測定値の違いはほとんどないといえる。

さらに、試料5はタイ産米であるが、Table 2と Table 3の結果を含めて、 RSD_r 、 RSD_R 、 $HorRat$ 値に他の試料との差異はなく、この測定法が日本産の中粒米 (ジャポニカ種) だけでなく外国産の長粒米 (インディカ種) にも応用できる結果が得られた。

(3) 解析結果-2

燃焼法で得られた室間再現精度 (分析誤差) を、試験室の違いによる変動 (試験室間) と測定日による変動 (試験室内日間変動) の分散、測定法自体に由来するなどのその他の誤差とに分けて算出した (Table 4)⁸⁾。

その結果、試験室間に由来する変動は、棄却済データで89~96%、全試験室データでも81~90%と高い割合であった。試験室内の日間変動は1.4~6.7%と小さく、その他の誤差の割合も1.6~15.6%であり、今回の室間共同試験の測定値の変動の主体も、前回の室間共同試験と同様に¹⁸⁾、各試験室間での測定値のばらつきに由来するものであった。

2. ケルダール法の技能試験

12試験室の参加によるケルダール法の測定条件を Table 5に示す。手分析2試験室、ケルテック (Kjeltec) システム (FOSS社製) 7試験室、ケルオートシステム (なかやま理化製作所製) 2試験室、スーパーケルシステム (アクタック社製) 1試験室の、合計12試験室が測定値を報告した。また、その中の10試験室が詳細な測定条件も報告した。

自動装置を使用した8試験室では、硫酸銅0.5g、硫酸カリウム4.5gとなる KjelTabs KPC (Thompson & Capper LTD 製) などの市販錠剤を使用していた。そ

Table 5. The measuring conditions of Kjeldahl method

Code of Lab.	Auto Analyzer	Auto Digester	Catalyst and materials to promote digestion				Conditions of Digestion	Additional time for digestion	Sodium hydroxide	Boric acid	Acids for volumetric analysis	Sample weight (g)
			Sulfate (ml)	Copper sulfate (g)	Potassium sulfate (g)	Another materials						
1	Kjeltec Auto 1035 ^{a)}	Nd	10	0.5	4.5	Hydrogen peroxide (30%) 5 ml	420°C - 120 min	-	40% , 50 ml	2% , 30 ml	0.05 mol/l Sulfate, B	1.0
4	Kjeltec Auto 1035 ^{a)}	Kjeltec 2020 ^{a)}	15	0.5	4.5	-	A	60 min	40% , 70 ml	2% , 50 ml	0.025 mol/l Sulfate	1.0
5	KJEL-AUTO VS-KT.P ^{b)}		10	0.5	4.5	-	A	30 min	30% , 60 ml	3% , 25 ml	0.05 mol/l Sulfate, B	2.0
6	Kjeltec Analyzer unit ^{c)}		15	0.5	4.5	Hydrogen peroxide	< 420°C - 60 min	-	40% , 80 ml	1% , 30 ml	0.05 mol/l Sulfate	1.0
7	KJEL-AUTO DTP-3 ^{b)}		13	0.5	4.5	-	220°C - 30 min 450°C - 60 min	-	30% , 50 - 60 ml	3% , 25 ml	0.05 mol/l Sulfate	1.2 - 1.5
9	2300 Kjeltec Analyzer Unit ^{a)}		10	0.5	4.5	-	440°C - 90 min	-	40% , 50 ml	2% , 30 ml	0.05 mol/l Sulfate	0.3 - 0.5
11	Manual analysis		25	0.5	15	Titanium oxide 0.5 g	A	30 min	45% , 70 ml	4% , 50 ml	0.1 mol/l Hydrochloric acid, B	1.0
12	Kjeltec Auto 1035 ^{a)}	Kjeltec 2006 ^{a)}	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	1.0 - 1.3
13	Kjeltec Auto 1035 ^{a)}	Kjeltec 2020 ^{a)}	10	0.5	4.5	-	420°C - 60 min	-	40% , 50 ml	2% , 30 ml	0.05 mol/l Sulfate	1.0
17	Manual analysis		10	0.2	10	-	A	80 min	40% , 50 ml	4% , 20 ml	0.05 mol/l Sulfate	1.0
16	Superkjel 1300 ^{a)}	DK-20 ^{a)}	12	0.5	4.5	Hydrogen peroxide (35%) 5 ml	420°C - 80 min , A	15 - 30 min	40% , 50 ml	2% , 30 ml	0.05 mol/l Sulfate, B	1.0
18	2400 Kjeltec Analyzer Unit ^{a)}		Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	0.05 mol/l Sulfate, B	1.0

^{a)} FOSS Japan, ^{b)} Nakayama-rika, ^{c)} ACTAC L.T.D.

A; Digestion continue until the solution change to clear and its color turn to blue or slightly blue green.

B; Grade for volumetric analysis.

Table 6. Results of each 7 samples reported by 12 laboratories participated in collaborative study for determination of nitrogen in brown and milled rice by the Kjeldahl method

Code of Laboratory	Sample No.														Sample Weight (g)
	1		2		3		4		5		6		7		
	Result ^{a)}	z-s ^{b)}	Result ^{a)}	z-s ^{b)}	Result ^{a)}	z-s ^{b)}	Result ^{a)}	z-s ^{b)}	Result ^{a)}	z-s ^{b)}	Result ^{a)}	z-s ^{b)}	Result ^{a)}	z-s ^{b)}	
1	0.9628	0.50	1.081	0.95	0.9587	0.18	1.167	0.35	1.277	0.05	1.307	-0.34	1.102	-0.20	1.0
4	0.9226	-0.55	1.017	-0.59	0.9280	-0.62	1.142	-0.20	1.257	-0.37	1.287	-0.72	1.092	-0.43	1.0
5	0.9410	-0.07	1.046	0.10	0.9670	0.39	1.159	0.16	1.291	0.33	1.342	0.36	1.133	0.51	2.0
6	0.9516	0.21	1.046	0.10	0.9604	0.22	1.159	0.17	1.286	0.23	1.336	0.24	1.119	0.19	1.0
7	0.9393	-0.11	1.024	-0.44	0.9540	0.05	1.127	-0.54	1.268	-0.13	1.337	0.26	1.114	0.08	1.2-1.5
9	0.9358	-0.21	1.036	-0.15	0.9412	-0.28	1.148	-0.07	1.267	-0.15	1.322	-0.03	1.099	-0.26	0.3-0.5
11	0.9327	-0.29	1.034	-0.20	0.9339	-0.47	1.147	-0.10	1.257	-0.36	1.311	-0.25	1.100	-0.23	1.0-2.0
12	0.9438	0.003	1.048	0.15	0.9527	0.02	1.149	-0.06	1.285	0.20	1.331	0.14	1.116	0.12	1.0
13	0.9575	0.36	1.054	0.29	0.9725	0.54	1.166	0.31	1.288	0.27	1.332	0.16	1.123	0.27	1.0
16	0.9475	0.10	1.048	0.15	0.9545	0.07	1.155	0.06	1.275	0.001	1.327	0.06	1.111	0.01	1.0
17	0.9415	-0.06	1.025	-0.41	0.9420	-0.26	1.140	-0.27	1.263	-0.25	1.313	-0.22	1.102	-0.21	1.0-1.25
18	0.9478	0.11	1.044	0.05	0.9583	0.17	1.161	0.20	1.284	0.19	1.341	0.33	1.117	0.15	1.0
S _p	0.337		0.041		0.038		0.045		0.049		0.051		0.044		
Mean	0.9437		1.042		0.9528		1.152		1.276		1.324		1.111		

^{a)}Average of 2 sample values, g/100 g, ^{b)} z-score = (Result - Mean)/S_p

の他の分解促進剤として、3 試験室で過酸化水素水、1 試験室が二酸化チタンを用い、硫酸は、手分析の 1 試験室の 25 ml 以外は 10 ~ 15 ml を使用していた。分解時間や終了の目安については、温度 (420°C ~ 450°C) と加熱時間 (60 ~ 120 分) を決めて分解した 5 試験室 (全て自動分解装置) と、分解溶液が透明になり、青色あるいはわずかに緑色がかかった青色になった後にさらに加熱を 15 ~ 80 分続けた 5 試験室に分かれた。

さらに、中和用に 40 ~ 45% 水酸化ナトリウム溶液、蒸留したアンモニアの捕集用に 1% ~ 4% ホウ酸を 20 ~ 50 ml、滴定には 0.05 mol/l 硫酸が塩酸溶液 (容量分析用 5, 自家調製 6 試験室) を用いた。

技能試験の報告された測定結果を Table 6 に示す。2 回の測定平均値と z-score を記載した。

その z-score は -0.72 ~ 0.95 の範囲であり、±0.5 以上は全体の 10% 程度で、約半数が ±0.2 以下であった。

これは種々の測定条件下でのケルダール法の測定値がよく一致することから、測定法の優秀さ並びにその頑健性 (robustness) を示すデータである。

3. ケルダール法と燃焼法の測定値の比較

ケルダール法の測定値と、ケルダール法の試験に参加した12試験室に限定して、棄却された試験室のデータは除外した燃焼法のデータ(ケース1)、及び燃焼法の参加全試験室から統計的な棄却後に残った18~21試験室の棄却済データ(ケース2)とを比較した。その結果、各試験室内の両定量法の測定値間の相関は全くなかったが、7試料の測定平均値間には、ケース1では $R^2 = 0.9995$ [ケルダール法の値 = $0.987 \times$ (燃焼法の値) + 0.015]、ケース2では $R^2 = 0.999$ [ケルダール法の値 = $0.990 \times$ (燃焼法の値) + 0.003]と、非常に高い相関があった。

要約

コメ中の全窒素を測定する燃焼法の妥当性試験を22試験室の参加により行い、ケルダール法についても同じ試料を用い12試験室で技能試験を行った。

今回の試験の7試料の燃焼法の HorRat 値は0.51~0.70の間であり、満足の行く結果であった。また、RSD_R は1.97~2.81%であり、本測定法がコメ中の全窒素の定量法としてパフォーマンスが高い妥当な分析法であることが示された。

また、ケルダール法の技能試験の z-score は -0.72~0.95の範囲に収まり約半数が ± 0.2 以下となり、種々の測定条件下での測定値もよく一致することから、ケルダール法が優秀な測定法であること並びにその頑健性 (robustness) を示していた。

謝辞

本室間共同試験に参加し測定値を報告していただいた、(株)アクタック、アサヒビール株式会社、サッポロビール株式会社価値創造フロンティア研究所、麒麟ビール株式会社醸造研究所、三和酒類株式会社、(株)ジェイ・サイエンス・ラボ、(株)住化分析センター科学機器営業部、製粉協会製粉研究所、日本シイベルヘグナー株式会社、日本食品分析センター基礎栄養分析課、日本水産(株)食品分析センター、日本生活協同組合連合会商品検査センター、日本製粉株式会社、(独)農林水産消費技術センター、不二製油株式会社、ヤマキ株式

会社開発、レコジャパン株式会社(50音順に並べた)の担当者の皆様方に感謝いたします。

文献

- 1) AOAC Official Method 920.87, Protein (Total) in Flour, First Action 1920.
- 2) 日本食品科学工学会, 新・食品分析法編集委員会編, 新・食品分析法, 第1章-3 たんぱく質, p30 (1999), (光琳).
- 3) 五訂増補日本食品標準成分表分析マニュアル, 文部科学省科学技術・学術審査会資源調査分科会食品成分委員会資料 第2章2 たんぱく質, p12(2005), (国立印刷局).
- 4) 安井明美, 小泉英夫, 堤忠一, 松永隆司, 吉川誠次, 二酸化チタンと硫酸銅を触媒として用いるケルダール改良法のクロスチェックによる精度の検討, (第2報) コーンスターチ及び2種類のはちみつを用いての解析, 食総研報, 33, 79-85 (1978).
- 5) P. F. Kane, Comparison of HgO and CuSO₄ as Digestion Catalysts in Manual Kjeldahl Determination of Crude Protein in Animal Feeds: Collaborative Study, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **67**, 869-877 (1984).
- 6) N. Thiex, H. Manson, S. Anderson and J. Persson, Determination of Crude Protein in Animal Feed, Forage, Grain, and Oilseeds by Using Block Digestion with a Copper Catalyst and Steam Distillation into Boric Acid: Collaborative Study, *J. AOAC Int.*, **85**, 309-317 (2002).
- 7) S. Nozawa, A. Hanada, K. Sakaida, T. Suzuki and A. Yasui, Method Performance Study of the Determination of Total Nitrogen in Soy Sauce by the Kjeldahl Method, *Anal., Sci.*, **21**, 1129-1132 (2005).
- 8) 野澤慎太郎, 坂井田健一, 鈴木忠直, 安井明美, Kjeldahl法によるしょうゆの全窒素定量における分解条件の最適化, 分析化学, 55, 15-21 (2006).
- 9) 橋本 佳子, 忠田 吉弘, 鈴木 忠直, 安井 明美, ケルダール法による米黒酢の全窒素分測定方法の最適化, 分析化学, 58, 379-385 (2009).
- 10) G. Bellomonte, A. Costantini and S. Giammarioli, Comparison of Modified Automatic Dumas Method and the Traditional Kjeldahl Method for Nitrogen Determination in Infant Food, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**, 227-229 (1987).
- 11) R. A. Sweeney and P. R. Rexroad, Comparison of LECO FP-222 "Nitrogen Determinator" with AOAC

- Copper Catalyst Kjeldahl Method for Crude Protein, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**, 1028–1030 (1987).
- 12) R. A. Sweeney, Generic Combustion Method for Determination of Crude Protein in Feeds: Collaborative Study, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **72**, 770–774 (1989).
- 13) R. C. Bicsak, Comparison of Kjeldahl Method for Determination of Crude Protein in Cereal Grains and Oilseeds with Generic Combustion Method: Collaborative Study, *J. AOAC Int.*, **76**, 780–786 (1993).
- 14) M. K. Brink and J. G. Sebranek, Combustion Method for Determination of Crude Protein in Meat and Meat Products: Collaborative Study, *J. AOAC Int.*, **76**, 787–793 (1993).
- 15) M. Thompson, L. Owen, K. Wilkinson, R. Wood and A. Damant, Testing for bias between Kjeldahl and Dumas Methods for the Determination of Nitrogen in Meat Mixtures, by Using Data from a Designed Inter-laboratory Experiment, *Meat Sci.*, **68**, 631–634 (2004).
- 16) 野澤慎太郎, 笠間裕貴, 鈴木忠直, 安井明美, 改良デュマ法によるしょうゆの全窒素定量, *分析化学*, **56**, 179–183 (2007).
- 17) 八木寿治, 榊原良成, 吉永 晋, 福本祐二, 石黒瑛一, 安井明美, 飼料中の粗たん白質の燃焼法による定量法の妥当性確認, *飼料研究報告*, **33**, 91–98 (2008).
- 18) 堀田 博, 燃焼法による玄米中の全窒素定量の室間共同試験, *分析化学*, **55**, 323–327 (2006).
- 19) 堀田 博, 成分添加試料の作製とそれを使用した試験室間共同試験, *食総研報*, **73**, 15–22 (2009).
- 20) 斎尾恭子, 秋山美展, 趙来光, 近赤外分光分析法による日本国産大豆の粗蛋白, 粗脂肪, 水分含量の定量, *食総研報*, **51**, 11–14 (1987).
- 21) S. Anderson, Determination of Fat, Moisture, and Protein in Meat and Meat Products by Using the FOSS FoodScan™ Near-Infrared Spectrophotometer with FOSS Artificial Neural Network Calibration Model and Associated Database: Collaborative Study, *J. AOAC Int.*, **90**, 1073–1083 (2007).
- 22) AOAC Official Method 990.03 Protein (Crude) in Animal Feed, Combustion Method, First Action 1990 Final Action 2002.
- 23) AOAC Official Method 997.09, Nitrogen in Beer, Wort, and Brewing Grains Protein (Total) by Calculation, Combustion Method, First Action 1997.
- 24) ISO 14891:2002 Milk and milk products – Determination of nitrogen content – Routine method using combustion according to the Dumas principle, ISO web site, <http://www.iso.org/iso/store.htm>
- 25) JAS 規格一覧, 農林水産省 Web site, http://www.maff.go.jp/j/jas/jas_kikaku/kikaku_itiran.html
- 26) 内藤成弘, 第3章化学分析法の妥当性確認, 第3節 データの統計的取り扱い, 食品分析法の妥当性確認ハンドブック, サイエンスフォーラム, P 163–P 186 (2007).
- 27) T. Fearn, M. Thompson, New test for ‘sufficient homogeneity’, *Analyst*, **126**, 1414 – 1417 (2001).
- 28) W. Horwitz, Protocol for the design, conduct and interpretation of Method–Performance Studies, *Pure & App. Chem.*, **67**, 331 – 343 (1995).
- 29) Edited by W. Horwitz, “Official methods of analysis of AOAC International” 18th ED, Appendix D, p9 (2005), AOAC Int., Gaithersburg, MD, USA. (<http://www.aoac.org/vmeth/omamannual/omamannual.htm>)
- 30) F. D. McClure and J. K. Lee, Computation of HOR-RAT values, *J. AOAC Int.*, **86**, 1056–1058 (2003).
- 31) Thompson M. , L. Stephen and R. Wood, The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories, *Pure & App. Chem.*, **78**, 145–196 (2006).
- 32) Protocol for the organization and analysis of data, 6th edition, 2002, food analysis performance assessment scheme (FAPAS), Central Science Laboratory, UK. FAPAS web site, <http://www.fapas.com/pdfpub/FAPASProtocol.pdf>