

ケルダール法と改良デュマ法による全窒素分定量についての比較

長谷川 美来*, 津田 美穂*, 小林 正和*, 八木 潤*, 中山 清貴*

A comparison of the Kjeldahl and improved Dumas methods for determination of the total nitrogen in foods and animal feed

Miku HASEGAWA*, Miho TSUDA*, Masakazu KOBAYASHI*, Jun YAGI*
and Kiyotaka NAKAYAMA*

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance 6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882 Japan

In order to determine tariff classifications in the food and agriculture field, it is often necessary to quantify crud protein, which is generally calculated by multiplying total nitrogen content by a conversion factor. To determine total nitrogen in a faster, safer and more environment-friendly way, we studied the impact of changing from the conventional Kjeldahl method to the improved Dumas method. As a result of comparing the total nitrogen contents determined by the two methods concerning representative samples for customs analysis, the Dumas method often provided slightly higher values than the Kjeldahl method. As for repeatability, there was little difference between the two methods. A good correlation between the two methods ($R^2 = 0.9997$) was obtained by an evaluation using all the test results.

1. 緒 言

全窒素分の定量分析は、関税分類において、特に食品や農産品の分野で、物品の分類決定のためにしばしば必要とされる。例えば米粉とでん粉誘導体からなる調製品中の米粉含有量の分析¹⁾や、ペプトンと呼ばれ、微生物培養基等として用いられるたんぱく質加水分解物の分解の程度を確認するためのAN/TN(粗たんぱく質の全窒素(TN)に対するアミノ態窒素(AN)の含有割合)を求めるために使われる。また、全窒素分は、試料の種類に応じた一定の係数(窒素 - タンパク質換算係数)を乗じることで粗たんぱく質として表され(この換算係数として、一般的に使用されているのは6.25であり、これは、たんぱく質は平均16%窒素を含有するとして提唱された値である²⁾)、税関分析法では、食品等の種類ごとに異なる換算係数が定められている³⁾。粗たんぱく質の定量は、関税分類において重要であり、ペットフードの場合、その含有量により分類が異なり、税率格差も大きい。また、乳製品中のミルク分を求める目的など、粗たんぱく質の定量分析のニーズは非常に高い。

税関分析法³⁾において、粗たんぱく質の定量は、ケルダール法を基とした自動窒素測定装置により定量した全窒素分に定められた係数を乗じて算出している。ケルダール法は、試料を強酸下で熱分解後、強アルカリを加えてアルカリ性にした溶液を水蒸気蒸

留し、発生したアンモニアを定量して窒素量を算出する。この分析工程においては、濃硫酸を用いた試料の加熱分解過程(前処理)で亜硫酸ガスが発生するため、ドラフト設備が必須であることによると、劇物に対する分析担当者の安全確保に注意を要し、この前処理だけで最低3時間要する。また、測定後、処理の必要な廃液を大量に生じる。

これに対し、近年の分析機器の発展により注目されている燃焼法(改良デュマ法)は、試料を高温で燃焼・還元し、発生した窒素ガスから窒素量を定量するため、一検体当たりの分析時間が約4分と迅速で、かつ劇物(強酸及び強アルカリ)を使用しない分析法である。これは、国際的な標準法であるISOやAOACにおいて、粗たんぱく質を算出するための全窒素の定量分析法の1つとして採用されている^{4~7)}。日本国内ではJAS法で採用されており⁸⁾、また、『五訂 日本食品標準成分表分析マニュアルの解説』に改良デュマ法が追加分析法として記載されている⁹⁾。ケルダール法と改良デュマ法の分析の流れをFig.1に示す。今後は、安全面及び測定の迅速さから、全窒素の分析法として燃焼法が世界各国で一般的な分析法となるものと思慮される。

このような背景から、本研究では、税関分析の対象となる代表的な品目について、ケルダール法及び改良デュマ法で全窒素分を測定し、二法の定量値の傾向を把握することを目的とした。

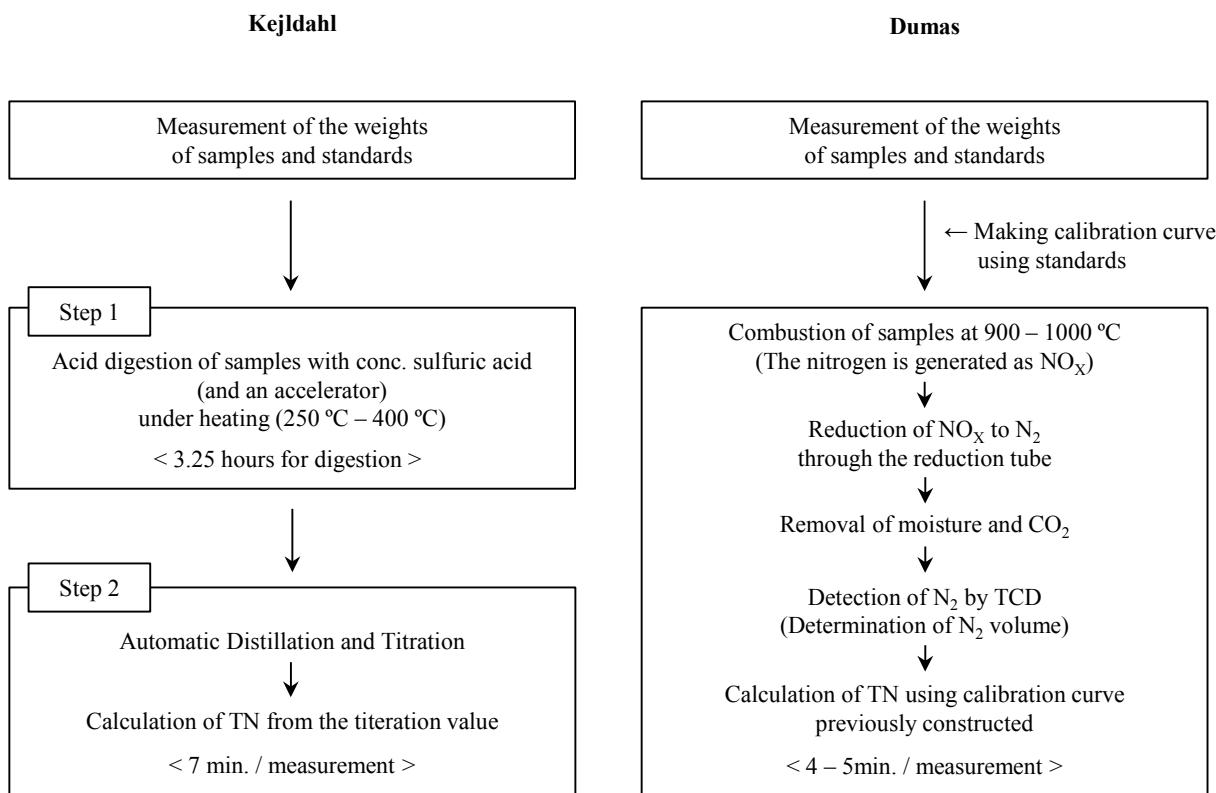


Fig.1 Experimental flowcharts for the determination of total nitrogen (TN) by the Kjeldahl method and the Dumas method

2. 実験

2.1 試料

ペットフード 3 種（原料：鶏ささみ肉）、米粉でん粉調製品とその原料米粉、大豆たんぱく質（いずれも輸入品）

うるち米粉、もち米粉、薄力粉、全粉乳（よつ葉乳業）、脱脂粉乳（よつ葉乳業）、グルテン（SIGMA）、ゼラチン（和光純薬）、カゼイン（和光純薬）ペプトン 5 種（SERVA）（いずれも市販品）
なお、固形の試料については、実験に先立ち、小さく切ったのち、粉碎機により均質化されるまで粉碎した。

2.2 試薬等

2.2.1 ケルダール法

L-トリプトファン、硫酸、過酸化水素、40%水酸化ナトリウム水溶液、2%ホウ酸水溶液、及び滴定用 0.05 mol/L 硫酸（全て和光純薬）分解促進剤（1000 Kjeltabs KPC、アクタック社製）、薬包紙（株東京日本油紙）

2.2.2 改良デュマ法

L-リジン塩酸塩（和光純薬）、エチレンジアミン四酢酸ナトリウム、スズ箔、燃焼管、還元銅（いずれも Gerhardt 社製）

2.3 分析装置及び条件

2.3.1 ケルダール法

熱分解装置：Vapodest50S（Gerhardt 社製）

蒸留滴定装置：Kjeldatherm KB20（Gerhardt 社製）

熱分解温度条件：250 °C で 1 時間 15 分加熱後、400 °C で 2 時間加熱

2.3.2 改良デュマ法

装置：Dumatherm（Gerhardt 社製）

キャリアガス：高純度ヘリウム（99.9999%以上）

燃焼ガス：高純度酸素（99.999%以上）

燃焼管温度：980 °C

還元管温度：650 °C

二酸化炭素吸着管温度：300 °C

ヘリウム流量：200 sccm（cc/min 1 気圧）

燃焼時の酸素量：200 sccm（cc/min 1 気圧）

2.4 実験方法

2.4.1 ケルダール法による全窒素分の定量

薬包紙に試料を粗たんぱく質含有量として約 0.1 g 採取し、試料を包むように薬包紙を小さく丸め、分解管に入れた。また、L-トリプトファン約 0.1 g を試料と同様に採取し、窒素回収率確認用の標準試料として使用した。ブランクは薬包紙のみとした。

分解操作は、試料が入った分解管に分解促進剤 1 個及び濃硫酸

10 mL を分解管に加え、更に過酸化水素 10 mL を加え、分解管内に有機物が溶けて溶液が透明になるのを確認した後、加熱し完全に分解した。プランク及び窒素回収率確認用の標準試料についても、同様に操作した。

熱分解後、各分解管に蒸留水を約 40 mL 加え、溶液内にある沈殿を完全に溶解させ、検液とした。

全窒素分の滴定は、まず難分解性のアミノ酸である L-トリプトファンを測定し、その回収率が 98%以上 100%以下となることを確認した上で、1 試料につき連続 7 回測定した。

2.4.2 改良デュマ法による全窒素分の定量

スズ箔に試料採取し、試料を包むようにスズ箔を小さく丸めた。試料採取量は以下のとおりとした。

EDTA（検量線用標準試料）：約 30–160 mg の範囲

L-リジン塩酸塩（窒素回収率確認用の標準試料）：約 30 mg

たんぱく質を含む試料：約 100 mg

窒素定量には、あらかじめ同装置により作成した検量線を使用した。検量線の作成には、EDTA を用い、熱伝導度検出器（TCD）で検出された窒素ガスのピーク面積（A）に対する EDTA の重量（W）をプロットし、一次式の検量線とした。窒素量が約 0.3–3.0 mg、3.0–10 mg 及び 10–16 mg の範囲でそれぞれ検量線（4–8 点検量）を作成し、予想される試料の窒素量から適当な検量線を選択し使用した。なお、作成した検量線はいずれも決定係数 $R^2 = 0.9999$ 以上の値を示し、検量線としての正確性を確認した上で、使用した。

試料の全窒素量は、TCD で検出した窒素ガスのピーク面積値から上記の検量線を用いて算出した。

回収率確認用として、難燃性のアミノ酸である L-リジン塩酸塩を使用し、全窒素分の回収率が 98%以上 100%以下となることを

確認した。

測定回数は、ケルダール法と同様 1 試料につき連続 7 回測定したデータを採用した。

3. 結 果

3.1 ケルダール法と改良デュマ法による定量分析の傾向

ケルダール法と改良デュマ法で測定した分析試料（19 種）の全窒素分（平均値）及びそれらの統計計算結果を Table 1 に示す。各試料について両分析法による全窒素分（平均値）を比較すると、改良デュマ法の定量値は、ケルダール法での値より、高い値を示す試料が多く、19 試料中 14 試料あった。窒素定量値の差については、-0.09–0.31% の範囲に収まった。

各試料について、二法による定量値について F 検定を行い、等分散である試料については Student の t 検定を、等分散でない試料については Welch の t 検定を実施した。その結果、19 試料中 12 試料で、有意差 ($p < 0.05$) が認められた。試料の種類別の傾向としては、たんぱく質含有量の少ない穀粉試料や、ペプトンの様な高たんぱく質の試料について、多くのもので有意差が認められた。

二法の繰り返し精度を調べるため、それぞれの全窒素定量値の相対標準偏差（RSD%）を求めたところ、ケルダール法は、0.2–2.1% の範囲に、改良デュマ法は、0.2–1.9% の範囲にあった（Table 1）。また、試料の種類別の繰り返し精度に特段の傾向は見られなかった。この結果から、二法の繰り返し精度は、同程度であると考えられる。

Table 1 Results of the total nitrogen determinations by the Kjeldahl method and the improved Dumas method

Category	Sample name	n	Method	Total nitrogen Mean	RSD%	Difference between two means	t-test p-value ^(a)	^(b)	Ratio K/D ^(c)
Animal feeds (Dry chicken tenderloin)	Chicken tenderloin jerky	7	Kjeldahl Dumas	7.50 7.49	1.17 1.01	-0.01	0.79		1.00
	Whole dry chicken tenderloin	7	Kjeldahl Dumas	13.12 13.03	1.89 0.56	-0.09	0.38 †		1.01
	Chicken tenderloin with shrimp	7	Kjeldahl Dumas	6.08 6.12	0.85 1.09	0.04	0.28		0.99
Milk proteins	Whole milk powder	7	Kjeldahl Dumas	4.28 4.27	0.21 0.24	-0.01	0.07		1.00
	Skim milk(nonfat)	7	Kjeldahl Dumas	5.74 5.72	0.83 0.58	-0.02	0.47		1.00
	Casein	7	Kjeldahl Dumas	14.07 14.16	0.28 0.56	0.09	0.02	*	0.99
Cereals	Mixture of Rice flour and starch	7	Kjeldahl Dumas	0.90 0.93	0.22 1.87	0.03	2.19E-03 †	**	0.96
	Imported rice flour	7	Kjeldahl Dumas	1.05 1.06	0.22 0.56	0.01	1.50E-04 †	**	0.99
	Rice flour(Non-glutinous)	7	Kjeldahl Dumas	1.01 1.02	0.24 0.11	0.01	5.11E-09	**	0.99
	Rice flour(Glutinous)	7	Kjeldahl Dumas	1.38 1.40	0.46 0.39	0.02	7.86E-05	**	0.99
	Weak flour	7	Kjeldahl Dumas	1.61 1.62	0.39 0.12	0.01	3.33E-03	**	0.99
Isolated Proteins	gelatin	7	Kjeldahl Dumas	15.75 15.85	0.18 0.19	0.10	6.48E-05	**	0.99
	gluten	7	Kjeldahl Dumas	12.61 12.59	1.01 0.29	-0.02	0.67		1.00
	Soy protein	7	Kjeldahl Dumas	13.65 13.70	0.18 0.42	0.05	0.04	*	1.00
Peptones	Peptone from soybean	7	Kjeldahl Dumas	9.39 9.62	0.40 0.17	0.23	4.64E-09	**	0.98
	Peptone from gelatin	7	Kjeldahl Dumas	15.18 15.49	1.60 0.52	0.31	0.01 †	**	0.98
	Peptone from casein	7	Kjeldahl Dumas	13.24 13.44	0.28 0.31	0.20	9.81E-07	**	0.99
	Peptone from potato	7	Kjeldahl Dumas	11.17 11.17	2.06 0.24	0.00	0.97 †		1.00
	Peptone from meat	7	Kjeldahl Dumas	15.38 15.71	0.37 0.75	0.33	2.68E-05	**	0.98

a) None: Student's t test, †: Welch's t test.

b) Significant differences: **: p < 0.01, *: p < 0.05

c) "K/D" indicates the ratio of the Kjeldahl value (mean) to the Dumas value (mean).

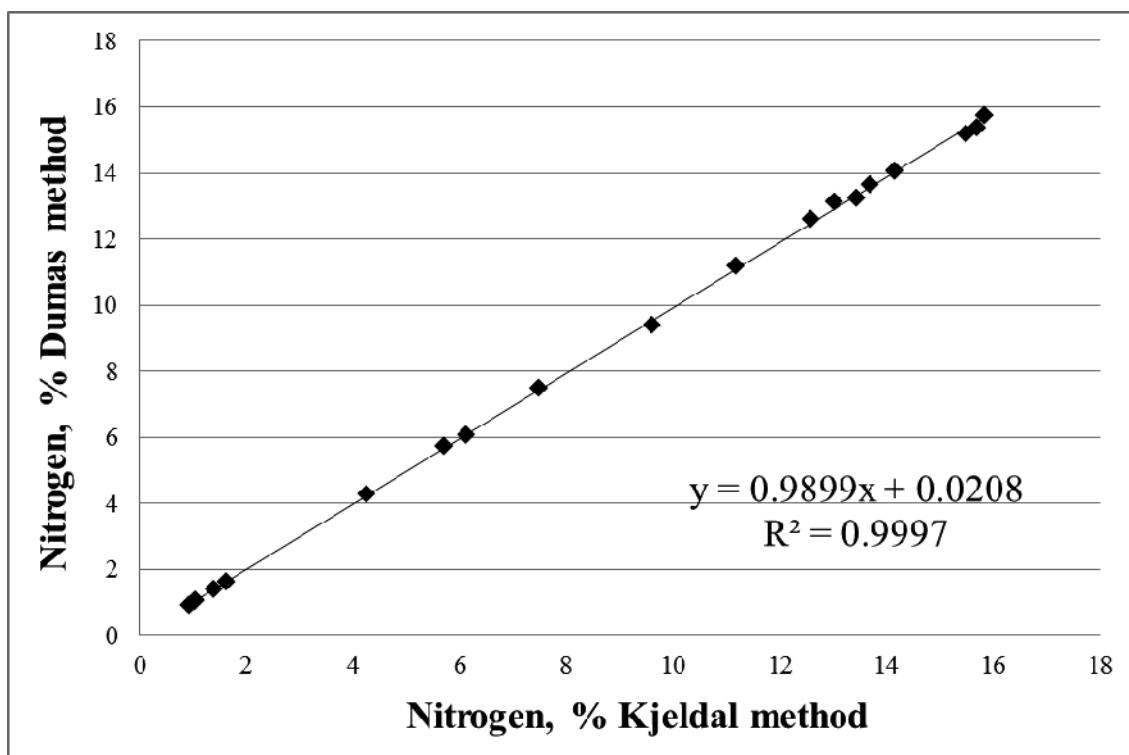


Fig. 2 Correlation between the Dumas method and the Kjeldahl method using total nitrogen data from the 19 different agricultural products used in this study.

3.2 二法の相関性

今回使用した試料全ての全窒素分の測定値を用いて、二法の相関性を求めたところ、Fig.2に示したとおり、決定係数 $R^2 = 0.9997$ であり、広範囲の全窒素測定域において、ケルダール法と改良デュマ法に良好な相関性を有することが確認された。

4. 考 察

改良デュマ法は、ケルダール法に比べ、全窒素定量値が高くなる傾向があると言われている。これは、試料中に硝酸態窒素等の非たんぱく質由来窒素が存在する場合、ケルダール法では、これら非たんぱく質由来窒素のアンモニア捕捉率が低くなるためであり、改良デュマ法では、硝酸態窒素の有無に関わらず、非たんぱく質由来窒素は全窒素として定量されるためである^{2), 5), 6), 10)}。

Simonne¹⁰⁾らによると、非たんぱく質由来窒素による、二法の差が大きくなるのは、野菜、果物、魚（加熱しているか否かを問わない）で見られ、ペットフード、穀粉、乳製品については、非たんぱく質由来窒素の影響は受けず、二法は近似した値を示すとしている。今回の研究では、改良デュマ法による全窒素の定量値が、ケルダール法よりも高くなる試料が多かったが、今回の測定では、硝酸態窒素等の非たんぱく質由来窒素を顕著に含むと言われる種類の試料は含まれておらず、測定結果に対する非たんぱく質由来窒素による影響は、ほぼないと考えられる。

改良デュマ法で全窒素の定量値が大きくなる傾向を示した他、t検定における評価で有意差のある試料が比較的多く認められた

理由については、二法で試料採取量が異なること、ケルダール法での分解が不十分であった可能性、装置誤差によるもの等が考えられる。

改良デュマ法に対するケルダール法の定量値の比（K/D；ケルダール法による定量値／改良デュマ法による定量値）について、Simonne^{5), 10)}らの研究では、この比が、供試試料全体では 0.33–1.40、今回扱った種類の試料（ペットフード、乳製品、穀粉など）では 0.85–1.02 の範囲にあったと報告されている。本研究でも、K/D 値は 0.96–1.01 の範囲に収まっており、特に、ペットフード、乳製品及びたんぱく質濃縮物では 0.99–1.01 となっており、これらの種類の試料では、実際の測定値において二法にほとんど差が認められていないことになる。

5. 要 約

関税分類を決定するうえで、全窒素分の定量分析を要する試料（ペットフード、乳製品、穀粉類、たんぱく質濃縮物及びペプトン）について、ケルダール法と改良デュマ法で測定を行い、結果を比較した。二法で得られた各試料の測定結果の差について t 検定を行ったところ、穀粉類やペプトンにおいて、多くの試料で有意差が認められた。一方で、二法の定量値の比（K/D）については、いずれの試料も 1 に近い値を示した。また、二法による繰り返し精度（RSD%）は、今回測定した試料について、ケルダール法が 0.2–2.1%、改良デュマ法が 0.2–1.9%で、同程度であった。

文 献

- 1) 関税中央分析所ホームページ：税関分析法「米粉とでん粉誘導体調製品中の米粉の定量分析法」。
(http://www.customs.go.jp/ccl_search/analysis_search/a_121_j.pdf)
- 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”。
- 3) 関税中央分析所ホームページ：税関分析法「粗たんぱく質の定量分析法」。
(<http://www.customs.go.jp/ccl/index.htm>)
- 4) ISO 14891: Milk and milk products-Determination of nitrogen content-Routine method using combustion according to the Dumas principle (2002).
- 5) ISO 16634-1: Food products-Determination of the total nitrogen content by combustion according to the Dumas principle and calculation of the curde protein content-Part 1: Oilseeds and animal feeding stuffs (2008).
- 6) ISO 16634-2: Food products-Determination of the total nitrogen content by combustion according to the Dumas principle and calculation of the curde protein content-Part 2: Cereals, pulses and milled cereal products (2009).
- 7) AOAC Official Method 968.06, Protein (Crude) in animal Feed.
- 8) JAS 規格一覧, 農林水産省 Web site. (http://www.maff.go.jp/j/jas/jas_kikaku/kikaku_itiran.html)
- 9) 財団法人日本食品分析センター編集：“分析実務者が書いた五訂日本食品標準成分表分析マニュアルの解説” P.271 (2001), (中央法規).
- 10) Simonne, A. H., E.H. Simonne, R.R. Eitenmiller, and C.P. Cresman, *J.Sci. Food Agric.*, **73**:39-45 (1997).