

デュマ法によるたんぱく質の定量分析

村岡 幸恵*, 五十嵐 智大*, 八木 潤*, 片山 貴之*

Quantitative analysis of proteins by the Dumas method

Yukie MURAOKA*, Tomohiro IGARASHI*, Jun YAGI* and Takayuki KATAYAMA*

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

In the Customs analysis method, the Kjeldahl method has been adopted for determination of crude proteins. However, there are some concerns about the Kjeldahl method's safety and environmental burden. In our previous study, some tests were conducted to evaluate whether the Dumas method, which is a safer, more environmentally friendly and more rapid quantification method, is substitutable for the Kjeldahl method, but some samples had different quantities of total nitrogen in the two methods. Consequently, in this study, we changed the measurement conditions for the Dumas analysis from the first report version and again compared the two methods. When we doubled the sample amount (200mg) in the Dumas method, the quantitative amount of total nitrogen became closer to that of the Kjeldahl method than the prior 100 mg sample in the Dumas method. Significant differences between the Kjeldahl and Dumas methods weren't apparent and the relative standard deviation by the Dumas method was smaller than that by Kjeldahl. In addition, the rice flour content in a mixture of rice flour and starch calculated from the quantities of nitrogen obtained by the Kjeldahl and Dumas methods (sample 200mg) were nearly the same.

1. 緒 言

税関分析において、粗たんぱく質の定量は重要な分析試験項目の一つである。例えば、ペットフードの場合、粗たんぱく質含有量によって税率格差が生じる。また、乳製品中のミルク分を求める場合も粗たんぱく質の定量が必要となる。粗たんぱく質量は一般的に試料に含まれる全窒素量に、品目に応じた換算係数を乗じて算出する。他にも米粉とでん粉誘導体からなる調製品は、全窒素量から米粉含有量を算出する¹⁾。さらに、たんぱく質加水分解物であるペプトンは、全窒素量に対するアミノ酸窒素量の割合を求めるために、全窒素量が必要となる。このように、全窒素量及びそれから算出される粗たんぱく質量の定量は、食品や農産品の関税分類決定において重要である。

現在、税関分析法「粗たんぱく質の定量分析法」²⁾において、試料に含まれる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滴定装置によるもの」と規定されている。ケルダール法は古くから知られている全窒素定量法であり、試料を硫酸下で熱分解後、水酸化ナトリウムを加えて水蒸気蒸留する。その後、発生したアンモニア量を測定し、窒素量を算出している。ケルダール法では、強酸や強アルカリなどの劇物を使用することや、測定後に大量の銅含有廃液処理が必要となり、職員の安全や環境への負荷が懸念される。

これに対し、ケルダール法とは測定原理の異なる全窒素定量方

法にデュマ法があり、近年多くの品目に関して、分析条件の検討やケルダール法との相関についての研究が行われている^{3,4)}。デュマ法の測定では試料を高温で燃焼・還元し、発生した窒素ガスから全窒素量を定量している。デュマ法は、ISO⁵⁾やAOAC⁶⁾などの国際標準法で採用が進んでおり、国内でも日本農林規格（JAS）⁷⁾や肥料等試験法⁸⁾などで粗たんぱく質定量の公定分析法に追加され、ケルダール法と併用されている。デュマ法の特徴として、劇物を使用しないこと、測定による廃液が生じないこと及び試料採取から測定終了までの時間が1検体あたり約4分と迅速であることが挙げられる。今後は、分析業務の安全面、環境への影響、そして測定の迅速さから、粗たんぱく質の定量法としてデュマ法の採用がより一層進むものと思慮される。

このような背景から、長谷川らの報告⁹⁾では税関分析の対象となる品目について、ケルダール法とデュマ法において全窒素分の定量を行い、二法の比較検討を行った。その結果、二法で近似した窒素量が得られたものの、ペプトンや穀粉等一部の試料では二法の窒素定量値に差異が生じた。そのため、本研究では、デュマ法において試料採取量等の条件をこれまでの報告⁹⁾から変更すると共に、試料数を増やして測定を行いケルダール法と比較することで、デュマ法の最適な分析条件の検討を行った。

2. 実験

2.1 試料

輸入品：ペットフード 7 種、米粉でん粉調製品（原料米粉及び原 料でん粉を含む）、大豆たんぱく質 21 種、ペプトン 3 種
市販品：全粉乳（よつ葉乳業）、脱脂粉乳（よつ葉乳業）、カゼイ ン（和光純薬工業）、うるち米粉（東海澱粉）、もち米粉（東海 澱粉）、薄力粉、グルテン（SIGMA）、ゼラチン（和光純薬工業）、 ペプトン 5 種（SERVA）

2.2 試薬等

2.2.1 ケルダール法

分解促進剤（1000 Kjeltabs KPC、アクタック社製）、L-トリプト ファン、濃硫酸、過酸化水素水、0.05 mol/L 硫酸、硫酸アンモニウム（いずれも和光純薬工業）

2.2.2 デュマ法

スズ箔、燃焼管、還元銅（いずれも Gerhardt 社製）、エチレンジアミン四酢酸ナトリウム（以下、EDTA と略記する。）、L-リジン 塩酸塩（いずれも和光純薬工業）

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 2 時間加熱後、400 °C で 2 時間加熱

2.3.2 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

粗たんぱく質含有量が約 0.1 g となるよう試料を薬包紙に採取し、薬包紙ごと分解管に入れた。また、ブランクには薬包紙のみを使用した。窒素回収率を確認する標準試料として L-トリプトファン約 0.1 g を試料と同様に採取したものを使用した。なお、固形の試料は、乳鉢で均質化されるまで粉碎したものを使用した。

各分解管に分解促進剤 1 個及び濃硫酸 10 mL、過酸化水素水 10 mL を加え、溶液が透明になるのを確認した後、熱分解温度条件（2.3.1 参照）に従い熱分解した。

熱分解後、各分解管に蒸留水約 40 mL 加え、溶液内にある沈殿

物を完全に溶解させ、滴定の検液とした。また、滴定に用いる 0.05 mol/L 硫酸のファクターを決定するため、硫酸アンモニウム約 0.07 g を精秤し、蒸留水約 40 mL に溶解させた溶液及びそのブランクとして蒸留水約 40 mL を用意した。

滴定は、まず上記で調製した硫酸アンモニウム水溶液を 3 回測定し、滴定に用いる 0.05 mol/L 硫酸のファクターを決定した。その後、標準試料である L-トリプトファン分解液を測定し、回収率が 98 - 100 % であることを確認した後、各試料分解液につき連続 7 回測定した。

2.4.2 デュマ法による全窒素分の定量

デュマ法において、測定は試料をスズ箔に採取して行い、窒素量の算出は EDTA を用いて作成した検量線を使用した。検量線は、熱伝導検出器（TCD）で検出された窒素ガスのピーク面積に対する EDTA の重量をプロットし、窒素量として約 0.3 mg - 30 mg の範囲で一次式（22 点検量）を作成した。作成した検量線は、相関係数が 0.9999 以上の正確性が確認できたものを使用した。これまでの報告⁹⁾では、部品の交換時やメンテナンス時に作成した検量線を用いて窒素量を算出していたが、本研究では、精度向上のために、作成した検量線を基とし、装置を起動させた際に、EDTA（試料量 120 mg）を 2 検体定量し、その窒素量の平均値が EDTA の真の窒素量（9.57 %）となるように検量線に係数を掛け、補正した検量線により窒素量を算出した。

試料の測定は窒素回収率を確認する標準試料として難燃性のアミノ酸である L-リジン塩酸塩（試料量 200 mg）を使用し、全窒素分の回収率が 98 - 100 % となることを確認した後に、試料の窒素分定量を行った。測定はケルダール法と同様にそれぞれ連続 7 回行い、試料採取量は、これまでの報告⁹⁾では 100 mg の 1 通りであったが、本研究では 100 mg, 200 mg の 2 通りで行った。

3. 結果及び考察

3.1 ケルダール法、デュマ法における窒素量の定量結果

ケルダール法とデュマ法により定量した分析試料（49 種）について、定量した全窒素分の平均値、相対標準偏差及びケルダール法に対するデュマ法の窒素定量値及び統計結果を Table 1 に示す。二法の繰り返し精度について、それぞれの全窒素定量値の相対標準偏差（RSD%）を算出したところ、ケルダール法では 0.13 - 1.30 %、デュマ法（試料量 100 mg）では 0.05 - 0.74 %、デュマ法（試料量 200 mg）では 0.05 - 0.41 % となった。また、デュマ法に対するケルダール法の窒素定量値の比（K/D）は、デュマ法（試料量 100 mg）の場合は 0.965 - 1.015、デュマ法（試料量 200 mg）の場合は 0.990 - 1.005 となった。さらに、各試料について、ケルダール法とデュマ法の定量値について 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。

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

Category	Sample name	Kjeldahl		Dumas (sample 100 mg)				Dumas (sample 200 mg)			
		Mean	RSD	Mean	RSD	<i>t</i> -test ^a	K/D ^b	Mean	RSD	<i>t</i> -test ^a	K/D ^b
Animal feeds	Imported animal feeds 1	7.540	0.52	7.557	0.62		0.998	7.513	0.40		1.004
	Imported animal feeds 2	13.225	0.42	13.229	0.26		1.000	13.241	0.09		0.999
	Imported animal feeds 3	6.107	1.30	6.078	0.67		1.005	6.079	0.41		1.005
	Imported animal feeds 4	5.449	0.50	5.393	0.21	*	1.010	5.452	0.17		0.999
	Imported animal feeds 5	5.476	0.69	5.441	0.32		1.007	5.472	0.14		1.001
	Imported animal feeds 6	5.099	0.88	5.131	0.34		0.994	5.107	0.09		0.999
	Imported animal feeds 7	4.646	0.58	4.661	0.45		0.997	4.664	0.29		0.996
Milk proteins	Whole milk powder	4.281	0.28	4.291	0.05		0.998	4.286	0.05		0.999
	Skim milk (non-fat)	5.764	0.32	5.749	0.20		1.003	5.765	0.16		1.000
	Casein	14.205	0.37	14.201	0.17		1.000	14.217	0.08		0.999
Cereals	Mixture of Rice flour and starch 1	0.923	0.31	0.911	0.54	*	1.013	0.920	0.19		1.003
	Mixture of Rice flour and starch 2	0.864	1.17	0.895	0.74	*	0.965	0.873	0.40		0.990
	Imported rice flour 1	1.071	0.27	1.067	0.40		1.004	1.068	0.17		1.002
	Imported rice flour 2	1.069	0.68	1.075	0.44		0.994	1.073	0.23		0.996
	Imported starch	0.072	1.12	0.072	0.68		0.998	0.072	0.24		1.003
	Rice flour (Non-glutinous)	1.031	0.30	1.032	0.22		0.999	1.032	0.17		0.999
	Rice flour (Glutinous)	1.399	0.73	1.378	0.39	*	1.015	1.408	0.07		0.993
	Weak flour	1.625	0.37	1.610	0.23	*	1.009	1.628	0.08		0.998
Isolated proteins	Gelatin	15.773	1.14	15.777	0.10		1.000	15.767	0.07		1.000
	Gluten	12.533	1.05	12.535	0.06		1.000	12.541	0.06		0.999
	Soy protein 1	13.533	0.20	13.484	0.19	*	1.004	13.507	0.09		1.002
	Soy protein 2	13.571	0.36	13.604	0.28		0.998	13.581	0.15		0.999
	Soy protein 3	13.598	0.41	13.570	0.16		1.002	13.597	0.06		1.000
	Soy protein 4	13.522	0.25	13.507	0.10		1.001	13.519	0.06		1.000
	Soy protein 5	13.627	0.66	13.647	0.16		0.999	13.600	0.06		1.002
	Soy protein 6	13.551	0.79	13.538	0.12		1.001	13.511	0.07		1.003
	Soy protein 7	13.466	0.49	13.432	0.24		1.003	13.471	0.23		1.000
	Soy protein 8	13.530	0.36	13.506	0.14		1.002	13.528	0.11		1.000
	Soy protein 9	13.581	0.31	13.573	0.21		1.001	13.570	0.16		1.001
	Soy protein 10	13.629	0.39	13.613	0.18		1.001	13.638	0.09		0.999
	Soy protein 11	13.569	0.15	13.546	0.37		1.002	13.573	0.07		1.000
	Soy protein 12	13.508	0.20	13.513	0.31		1.000	13.494	0.10		1.001
	Soy protein 13	13.508	0.16	13.520	0.34		0.999	13.514	0.07		1.000
	Soy protein 14	13.564	1.23	13.563	0.13		1.000	13.550	0.07		1.001
	Soy protein 15	13.541	0.16	13.557	0.29		0.999	13.540	0.08		1.000
	Soy protein 16	13.579	0.35	13.531	0.44		1.004	13.570	0.07		1.001
	Soy protein 17	13.541	0.43	13.527	0.69		1.001	13.551	0.09		0.999
	Soy protein 18	13.508	1.08	13.541	0.60		0.998	13.552	0.18		0.997
	Soy protein 19	13.544	0.39	13.575	0.25		0.998	13.536	0.06		1.001
	Soy protein 20	13.545	0.38	13.556	0.34		0.999	13.533	0.06		1.001
	Soy protein 21	13.577	0.53	13.564	0.23		1.001	13.605	0.05		0.998
Peptones	Peptone from soybean	9.521	0.22	9.560	0.16	*	0.996	9.540	0.15		0.998
	Peptone from gelatin	15.383	0.20	15.392	0.15		0.999	15.355	0.14		1.002
	Peptone from casein	13.393	0.39	13.354	0.18		1.003	13.436	0.07		0.997
	Peptone from potato	11.116	0.13	11.135	0.23		0.998	11.132	0.13		0.999
	Peptone from meat	15.544	0.20	15.607	0.16	*	0.996	15.513	0.16		1.002
	Imported peptone 1	12.387	0.17	12.346	0.14	*	1.003	12.405	0.10		0.999
	Imported peptone 2	12.187	0.23	12.231	0.22	*	0.996	12.178	0.17		1.001
	Imported peptone 3	11.897	0.34	11.868	0.18		1.002	11.934	0.14		0.997

a) Significant differences between Kjeldahl method and Dumas method: *; *t*-test *p*-value < 0.05

b) The "K/D" indicated the ratio of the Kjeldahl value (mean) to the Dumas value (mean)

3.2 デュマ法における試料採取量による窒素定量値比較

デュマ法において試料採取量で比較すると、200 mg 採取した場合の相対標準偏差は、49 試料全てにおいて 100 mg 採取した場合のものと比較して小さかった。

また、t 検定を実施した結果、デュマ法（試料量 100 mg）の場合、49 試料中 10 試料で有意差（有意水準 5 %）が認められた。試料の傾向としては、これまでの⁹⁾と同様に、主に穀粉やペプトンについて二法に有意差が認められた。一方、デュマ法（試料量 200 mg）の場合、49 試料全てで有意差は認められなかった。以上のことから、デュマ法において試料量を 200 mg にすることで、試料量 100 mg と比較して定量の繰り返し精度が向上すると考えられる。

3.3 ケルダール法とデュマ法（試料量 200 mg）による窒素定量値比較

各試料について、7 回定量した結果の窒素量域を示すグラフを作成し、主な試料のグラフを Fig.1 に示す。いずれの試料についても、窒素量域はケルダール法よりもデュマ法の方が狭い範囲に収まった。また、Table 1 において、デュマ法（試料量 200 mg）に対するケルダール法の窒素定量値の比（K/D）から、二法で定量した窒素量は近似していることが確認され、相対標準偏差は、ケルダール法よりもデュマ法（試料量 200 mg）の方が小さくなつた。以上のことから、デュマ法（試料量 200 mg）はケルダール法と比較して定量の繰り返し精度が高いと考えられる。

3.4 デュマ法による米粉とでん粉の混合試料中の米粉含有率算出の検討

米粉とでん粉の混合試料について、Table 1 で定量した窒素量を

用いて、米粉含有率を算出したところ、79.32%（ケルダール法）、82.01%（デュマ法、試料量 100 mg）、80.01%（デュマ法、試料量 200 mg）となった。デュマ法（試料量 100 mg）の場合、試料の窒素含有量はケルダール法との有意差が認められ、さらに算出した米粉含有率はケルダール法とわずかに差異が生じた。これは、試料採取量が少ないことから、試料が不均一になったためと考えられる。一方、デュマ法（試料量 200 mg）の場合、ケルダール法との有意差は認められず、米粉含有率はケルダール法と同等の割合が得られた。以上のことから、米粉とでん粉からなる調製品に関して、デュマ法（試料量 200 mg）はケルダール法と同様に混合割合を求めるために利用できるものと考えられる。

4. 要 約

農産品、食品等の全窒素分の定量について、ケルダール法とデュマ法（試料量 100 mg 及び 200 mg）で測定を行い、窒素定量値を比較した。デュマ法において、相対標準偏差は試料量 100 mg よりも試料量 200 mg の方が小さくなつた。また、ケルダール法とデュマ法の測定結果について t 検定を行つたところ、デュマ法（試料量 100 mg）の場合はペプトン等でケルダール法との有意差が認められた一方、デュマ法（試料量 200 mg）の場合は全ての試料で有意差が認められなかつた。また、ケルダール法とデュマ法（試料量 200 mg）の定量値の比（K/D）はいずれの試料も 1 に近い値を示し、定量値の相対標準偏差はデュマ法の方が小さくなつた。さらに、米粉でん粉混合物の混合率を算出したところ、デュマ法（試料量 200 mg）はケルダール法と同等の結果が得られた。以上の結果からデュマ法（試料量 200 mg）はケルダール法と遜色ない粗たんぱく質定量法であると考えられる。

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) 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_search/analysis_search/a_105_j.pdf)
- 3) 久保田貴志、押田智子、矢内こずえ、井上譲、松井精司、松本孝春、石黒瑛一、安井明美：分析化学、**60**, 65 (2011)
- 4) 吉野功、高橋仁恵、関口昭博:群馬県立産業技術センター研究報告、**2013**, 31 (2014)
- 5) ISO 16634-1, Food products-Determination of the total nitrogen content by combustion according to the Dumas principle and calculation of the crude protein content-Part 1: Oil seeds and animal feeding stuffs (2008)
- 6) AOAC 968.06, Protein (Crude) in Animal Feed Dumas Method (1969)
- 7) JAS 規格、ハム類の日本農林規格(2015)
- 8) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター：肥料等試験法(2016)
- 9) 長谷川美来、津田美穂、小林正和、八木潤、中山清貴：関税中央分析所報、**56**, 31(2016)

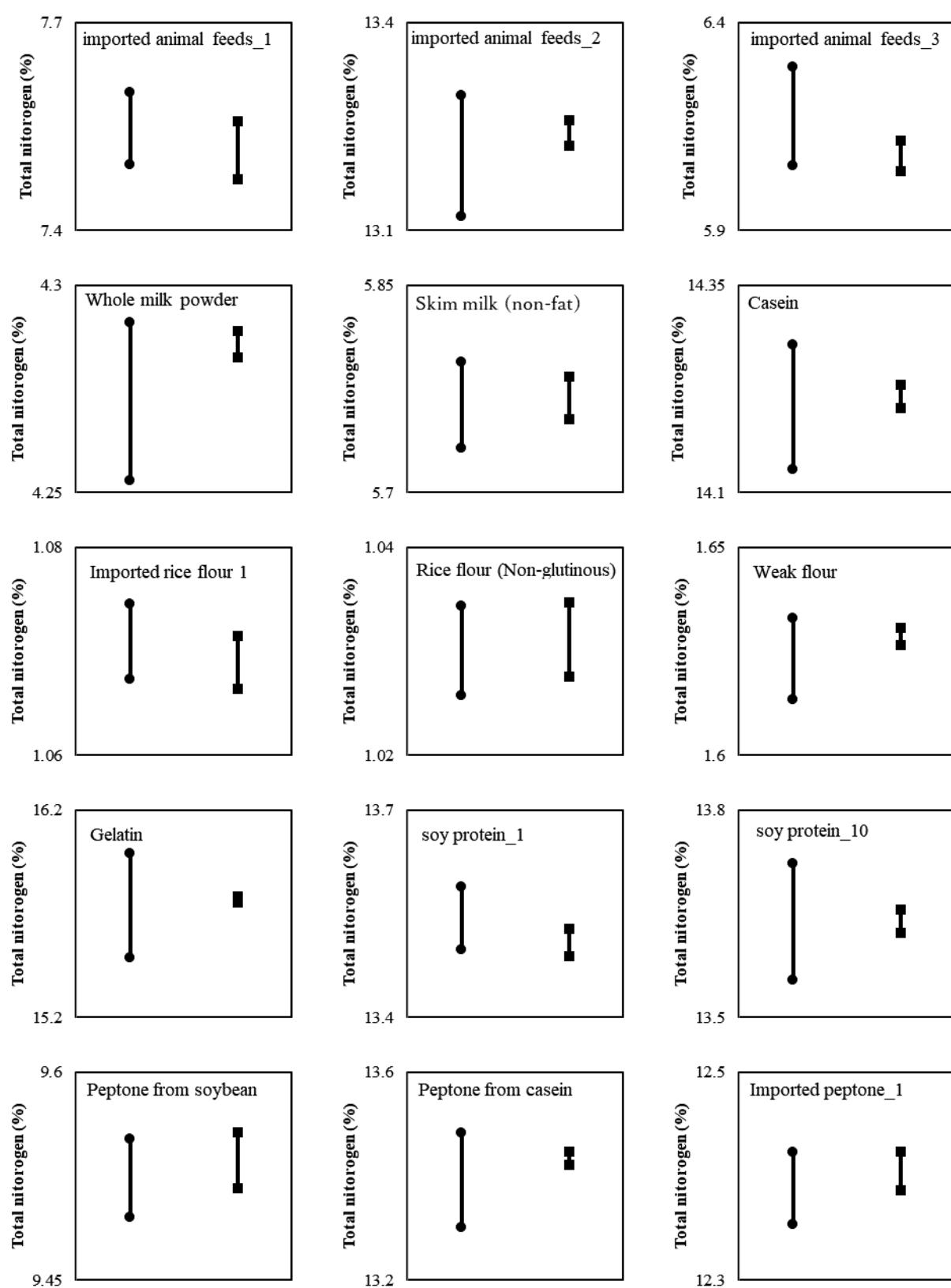


Fig. 1 Total nitrogen range of 7 times quantification: ●; determined by Kjeldahl method, ■; determined by Dumas method (sample 200 mg).