

研究報文

アルゴンガスをキャリアガスとした改良デュマ法による
しょうゆの全窒素分析

関根悠太

(一般財団法人 日本醤油技術センター)

(令和5年1月26日受理)

Application of improved Dumas method using argon gas
to the determination total nitrogen in soy sauce

Yuta Sekine

(Japan Soysauce Technology Center)

改良デュマ法（燃焼法）によるしょうゆの全窒素分析において、キャリアガスとしてアルゴンガスを用いた分析条件の検討を行った。検量線の精度を確認するためにニコチン酸を測定した結果、理論値とほぼ一致した値が得られた。次に品種や製造方式の異なる12種類の市販品しょうゆを測定し、ヘリウムガスの代替えとしてアルゴンガスを使用した時の再現精度を検討した結果、分析条件ごとの相関性は $R^2=0.9999$ であった。以上の結果から、改良デュマ法でキャリアガスをアルゴンガスに切り替えても分析結果に問題がないことを確認した。

緒言

改良デュマ法は、穀類等および菜種に含まれるタンパク質¹⁾、や肉類および肉製品のタンパク質の分析法²⁾、乳および乳製品の全窒素分析法³⁾、としてAOAC法や国際標準化機構（ISO）に採用されている分析法で、日本農林規格（JAS）においてもしょうゆの全窒素分析法⁴⁾として採用されている。

測定原理は、試料と助燃ガスになる酸素ガスを反応炉内で燃焼し、生成した窒素酸化物が銅還元管内を通過することによって酸素を除去し、熱伝導度検出器で検出するものである。キャリアガスには試料に影響を及ぼさない不活性ガスとして、ヘリウムガスが広く用いられてきた。ヘリウムガスは不燃性で熱伝導率が高く、安全性にも優れており、MRIやNMR等の医療分野を中心に、光ファ

イバーや半導体の製造といったエレクトロニクス分野や、リニアモーターカーや宇宙ロケット等の先端技術にも広く用いられている。分析分野においても入手のしやすさや比較的広い最適線速度範囲を持っている等の理由から広く用いられてきたが、酸素や窒素、アルゴンと違い空気中から分離することができず、現状では天然ガスの副産物として産出するヘリウムから分離、精製することでしか手に入れることができない。そのため生産国がアメリカ合衆国やカタール、ロシア等の天然ガス田を有する一部の国に限られてしまい、供給が生産国の国策や社会情勢に強く依存してしまうといった側面がある。こういった背景から近年供給が急激にひっ迫してきており、代替えのキャリアガスを早急に検討せざるを得ない状況となっている。

ヘリウムガスの代替えとしてはアルゴンガス等が考えられるが、「ヘリウムガス使用時と比べて検出感度が低下する」「1試料当たりの測定時間が2倍程度になり、作業効率が著しく低下する」等の理由から、広く普及はしていない。

これまでも改良デュマ法を用いたしょうゆの全窒素測定については様々な報告⁵⁻⁷⁾があるが、これらは全てヘリウムガスを使用したものであり、キャリアガスを他のものに変更して行ったものはない。そこで今回は改良デュマ法におけるヘリウムガスの代替えとしてアルゴンガスを使用し、日本農林規格で要求される分析精度を満たしているか検討を行った。

実験方法

1. 試薬等

DL-アスパラギン酸

(キシダ化学株式会社, 純度 99%以上)

ニコチン酸

(東京化成工業株式会社, 純度 99%以上)

ヘリウムガス

(純度 99.9999%以上, G1グレード相当)

アルゴンガス

(純度 99.9999%以上, G1グレード相当)

2. 測定装置と測定条件

測定装置は、しょうゆの日本農林規格で定められた燃焼法全窒素測定装置としての能力（燃焼温度、塩分対策等）を有する当センター所有の2機種（SUMIGRAPH NC-220FならびにSUMIGRAPH NC-TRINITY；株式会社住化分析センター製）を使用した。

測定条件は、現在、当センターで日常的に使用しているヘリウムガスを用いた条件（条件①）を比較対象とし、機器メーカーである株式会社住化分析センターが推奨するアルゴンガスを用いた際の条件（条件②）を検討した。この条件②では条件①と比べて1試料あたりの測定時間が2倍以上になり、一日の中で多くの測定を行う工場の品質管理での運用としては実用的ではないと考え、今回新たにキャリアガスの流量を増やして測定時間を短縮した条件（条件③）を設定し、合わせて検討を行った。今回検討した測定条件の詳細を表1にまとめた。

3. 測定方法

検量線の作成にはDL-アスパラギン酸を使用し、メーカー推奨の方法に従って0.1gの3点並行で測定日毎に検量線を作成した。しょうゆは約

表1 測定条件の詳細

測定条件No.	①	②	③
使用装置名	NC-220F	NC-TRINITY	NC-TRINITY
キャリアガス種類	ヘリウム	アルゴン	アルゴン
キャリアガス流量[ml/min]	80 ±5	20 ±5	40 ±5
燃焼炉温度[°C]	870	900	900
還元炉温度[°C]	600	600	600
熱伝導検出器温度[°C]	100	100	100
分離カラム温度[°C]	80	90	90
PURGE[sec]	50	60	60
PUMP[sec]	150	150	150
MRAS.[sec]	100	450	150
1測定あたりの目安時間[min]	5	11	6

0.2 gを小数点以下5桁まで精秤して石英濾紙を敷いた石英ボートに量り取り，測定終了後に別途それぞれ求めた密度でg/100 mlに換算した。

4. アルゴンガス使用時の測定条件

日本農林規格の公定法ではキャリアガスの規定はないが，繰り返し測定した際の精度条件があり，アルゴンガスを使用した際にこれを満たしているかどうかの検討を行った。繰り返し精度の確認には日本農林規格の公定法にあるニコチン酸を標準物質として使用した。公定法では標準物質をそのまま確認を行うことになっているのでそれに準じ，過去の報告^{5,7)}で検討されている，全窒素2.0～2.2 g/100 mlと同程度のピーク面積となるような標準物質（今回のニコチン酸の場合は約0.04 g）で確認することとした。測定は10点並行の連続分析で行った。続けて，品種・製造方式の異なる市販品しょうゆ12本（全窒素0.4～2.5 g/100 ml）を採取し測定した。測定は1サンプル1点の測定を計3日間ずつ行い，日間差の確認と再現性の検討を行った。

結 果

1. ニコチン酸を用いた繰り返し精度の確認

結果を表2にまとめた。条件②の測定結果の平均値が11.289 g/100 gと，その他の条件での測定結果平均値（11.339 g/100 gまたは11.333 g/100 g）と比べて若干低めであったが，アルゴンガスを使用した条件②および条件③は共にヘリウムガスを使用した条件①と比べても測定値が大きく異なることはなかった。

また，条件②の測定結果は「10回繰り返しの測定平均値が理論値の-0.081，相対標準偏差が0.16%」，条件③の測定結果は「10回繰り返しの測定平均値が理論値の-0.037，相対標準偏差が0.18%」であり，日本農林規格の公定法で求められる燃焼法装置の繰り返し精度条件である「10回繰り返しの測定平均値が理論値の±0.15以内，かつ相対標準偏差が1.3%以内」を共に満たしており，キャリアガスとしてのアルゴンガスの使用が問題ないことを確認した。

表2 測定条件ごとのニコチン酸の測定結果

サンプル	測定条件	全窒素分[g/100g]	理論値との差 ^{*1}	標準偏差	相対標準偏差[%] ^{*2}
ニコチン酸	①	11.339±0.023	-0.031	0.015	0.13
	②	11.289±0.027	-0.081	0.018	0.16
	③	11.333±0.031	-0.037	0.020	0.18

*1 ニコチン酸の全窒素分理論値（11.37）－測定平均値

*2 (標準偏差/測定平均値) × 100

2. 市販品しょうゆの測定値

市販品しょうゆ 12 検体の測定結果を表 3 にまとめた。また、しょうゆの測定条件の違いによる

測定値の相関性を求めたところ、図 1～3 に示したとおり、いずれも $R^2 = 0.9999$ であり、非常に良好な相関性が確認された。

表 3 測定条件ごとのしょうゆの測定結果

試料No. (品種・製造方式)	測定条件	全窒素分 [g/100ml]					最大日間差	相対標準偏差 [%]
		1日目	2日目	3日目	平均値	最大日間差		
1 (しろ・本醸造)	①	0.437	0.438	0.437	0.437	0.001	0.16	
	②	0.433	0.438	0.438	0.436	0.005	0.62	
	③	0.440	0.432	0.433	0.435	0.008	1.02	
2 (しろ・本醸造)	①	0.683	0.685	0.684	0.684	0.002	0.17	
	②	0.679	0.685	0.682	0.682	0.006	0.44	
	③	0.688	0.674	0.683	0.681	0.014	0.97	
3 (うすくち・混合)	①	1.058	1.062	1.062	1.061	0.004	0.19	
	②	1.058	1.052	1.052	1.054	0.006	0.32	
	③	1.044	1.042	1.050	1.045	0.008	0.40	
4 (こいくち・混合)	①	1.237	1.243	1.242	1.241	0.006	0.25	
	②	1.243	1.232	1.236	1.237	0.012	0.47	
	③	1.229	1.237	1.240	1.235	0.010	0.44	
5 (たまり・混合)	①	1.443	1.447	1.446	1.445	0.005	0.17	
	②	1.446	1.432	1.429	1.436	0.017	0.64	
	③	1.431	1.432	1.443	1.435	0.012	0.45	
6 (こいくち減塩・本醸造)	①	1.575	1.586	1.585	1.582	0.011	0.39	
	②	1.578	1.572	1.579	1.577	0.007	0.23	
	③	1.559	1.571	1.577	1.569	0.018	0.58	
7 (こいくち・本醸造)	①	1.699	1.709	1.711	1.706	0.013	0.40	
	②	1.701	1.690	1.695	1.695	0.011	0.31	
	③	1.688	1.699	1.700	1.695	0.012	0.38	
8 (こいくち・本醸造)	①	1.852	1.863	1.865	1.860	0.013	0.39	
	②	1.855	1.840	1.848	1.848	0.015	0.41	
	③	1.838	1.850	1.850	1.846	0.013	0.41	
9 (こいくち・本醸造)	①	1.966	1.983	1.984	1.978	0.018	0.50	
	②	1.972	1.963	1.960	1.965	0.012	0.32	
	③	1.958	1.967	1.974	1.967	0.017	0.42	
10 (さいしこみ・混合醸造)	①	2.110	2.101	2.102	2.104	0.009	0.23	
	②	2.077	2.077	2.081	2.078	0.004	0.11	
	③	2.077	2.078	2.088	2.081	0.011	0.30	
11 (さいしこみ・本醸造)	①	2.340	2.347	2.349	2.345	0.009	0.19	
	②	2.331	2.322	2.320	2.324	0.011	0.25	
	③	2.317	2.328	2.325	2.323	0.011	0.24	
12 (たまり・本醸造)	①	2.424	2.437	2.434	2.432	0.013	0.28	
	②	2.429	2.404	2.419	2.417	0.025	0.52	
	③	2.398	2.411	2.419	2.410	0.021	0.45	

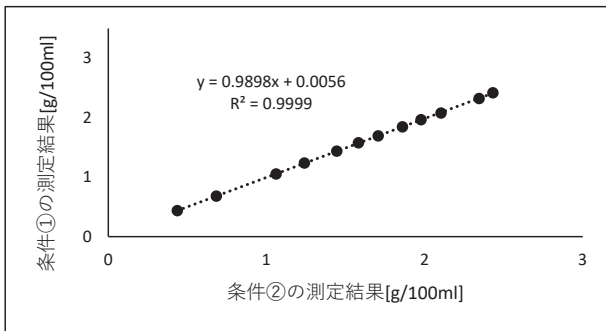


図1 条件①と条件②の測定値の相関

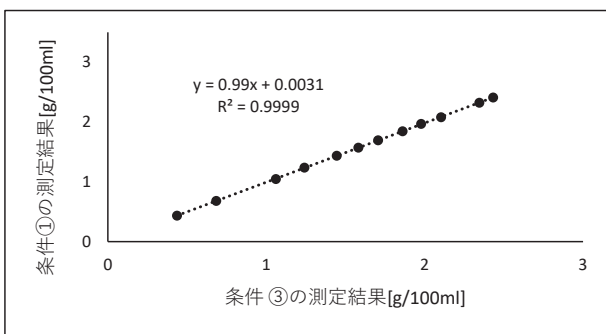


図2 条件①と条件③の測定値の相関

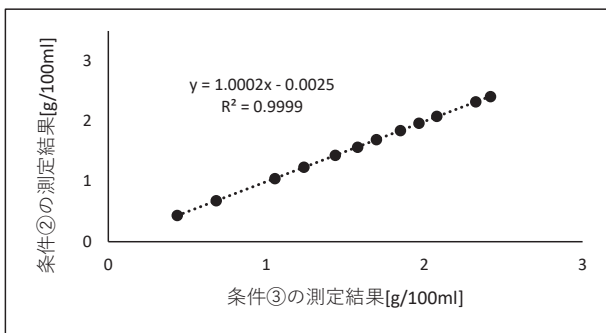


図3 条件②と条件③の測定値の相関

試料1と試料2の条件③での測定で、相対標準偏差が1.02%、0.97%と、その他の条件の結果と比べるとやや高い値となったが、アルゴンガスを使用したことによる分析感度の低下の影響によるものと考えられる。条件①のヘリウムガス使用時の測定ピーク面積を100%とすると、アルゴンガスを使用した条件②では約80%、条件③では約40%となっており、ピーク面積自体が小さいことにより測定値にばらつきが出たものと考えている。しかしながら、実測値を比較した場合の差は最大でも0.008 g/100 ml (試料1)、0.014 g/100 ml (試料2)と、その他の試料の最大日

間差の範囲内に含まれる程度のものであり、実質的な差はほぼないと判断した。以上の事から、キャリアガスをアルゴンガスに変更してもヘリウムガスを使用した場合と同等程度の分析性能を有していることを確認した。

考 察

以上の結果から、しょうゆにおけるキャリアガスにアルゴンガスを使用した改良デュマ法の測定は、ヘリウムガスを使用したものと同等程度の精度を有すると判断した。また、測定精度を重視したい場合には機器メーカー推奨の条件(条件②)、測定に要する時間の短縮等の作業効率性を重視したい場合は今回新たに検討した条件(条件③)にするなど、それぞれのユーザーが重視したいもので選択性が得られたと考えられる。

ヘリウムガスは空気から分離することのできない資源ガスであり、石炭や石油等の化石燃料と同じくいずれ枯渇するものである。今後も安定的な供給の見込みは立っておらず、供給の停止や購入価格の上昇が止まらない状況である。当センターの例になるが、現在のヘリウムガスの購入価格は供給が安定していた2015年時点と比較すると約2.5倍となっており、測定ランニングコストの増加が著しいものとなっている。アルゴンガスの価格は現在のヘリウムガスの価格の半分程度で安定しているので、キャリアガスをアルゴンガスに置き換えることで、ユーザーの測定ランニングコストの削減も期待できると考えられる。

今回の検討では実質的な差はないと判断したが、作業効率性を維持しながらも低濃度域で更なる測定精度の向上が見込めるような測定条件の検討を引き続き行っていきたいと考えている。

また、今回の検討は住化分析センター製の装置のみで行ったが、同等の改良デュマ法の測定装置であれば応用が利くものと考えられる。しかしながら、それぞれの装置によって最適な測定条件は異なるため、こちらについても検討を行ってきたいと考えている。

なお、今回の測定に供したしょうゆは食塩濃度

の低いもので8.60 g/100 ml (試料6), 高いもので20.07 g/100 ml (試料3)と広範囲の食塩濃度であったが, いずれの試料においても測定値の実質的な差はなかったことから, 試料中の食塩濃度が分析値に影響を与えることはないと考えられた。

要 約

しょうゆの全窒素分析について, 改良デュマ法におけるキャリアガスとしてアルゴンガスを使用した際の分析条件について検討した。

- ・アルゴンガスを使用した2つの条件(条件②ならびに条件③)について, ニコチン酸を用いて10回繰り返し分析を行った結果, 条件②は理論値との差=0.081, 相対標準偏差=0.16%だった。また条件③は理論値との差=0.037, 相対標準偏差=0.18%であり, どちらも日本農林規格の全窒素分測定 of 繰り返し精度条件である「10回繰り返しの測定平均値が理論値の ± 0.15 以内, かつ相対標準偏差が1.3%以内」を満たしていることが確認できた。
- ・ニコチン酸ならびに, 品種や製造方式の異なるしょうゆについて, ヘリウムガスを使用した条件(条件①)とアルゴンガスを使用した2つの条件(条件②ならびに条件③)の測定値ならびに相対標準偏差の比較を行った。またそれぞれの結果より各条件の相関を求めたところ, いずれも $R^2 = 0.9999$ であり非常に良好な相関を有していることが確認できた。以上の結果よりキャリアガスをアルゴンガスに変更しても, ヘリウムガスを使用した場合と同等程度の分析性

能を有していることが確認できた。

- ・アルゴンガスを使用した2つの条件(測定精度を重視・作業効率性を重視)を検討し, ユーザーが重要視したいものによって選択ができるようにした。
- ・キャリアガスをアルゴンガスに置き換えることで, ヘリウムガス使用時に比べてユーザーのランニングコストの削減が期待できる。

謝 辞

測定条件の検討についてご指導頂いた株式会社住化分析センターの松井精司氏, 金子弘氏に厚く御礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) AOAC Official Method 992.23, Crude Protein in Cereal, Grains and Oilseeds. AOAC Official methods of Analysis (2005)
- 2) AOAC Official Method 992.15, Crude Protein in Meat and Meat Products including Pet Foods. AOAC Official methods of Analysis (2005)
- 3) Milk and milk products-Determination of nitrogen content-Routine method using combustion according to the Dumas principle, ISO 14891 (2002)
- 4) JAS 1703, 5.3.3, 燃焼法 (2021)
- 5) 野澤慎太郎, 笠間裕貴, 鈴木忠直, 安井明美: 分析化学, **56**, 179-183 (2007)
- 6) 鈴木節男, 中澤豊志, 大津宣明, 吉田昭治, 加藤良樹: 本誌, **27**, 9-13 (2001)
- 7) 花江佳孝, 松尾和吉, 橋本忠明, 築山良一: 本誌, **41**, 207-214 (2015)