

# Spiked Rice Sample Preparation for Determination of Total Nitrogen as the Test Material of Collaboratory Study by an L-Glutamine Addition

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-12-20 キーワード (Ja): キーワード (En): spiked material, homogeneity, glutamine, rice, collaboratory study 作成者: 堀田, 博 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://doi.org/10.24514/00002843">https://doi.org/10.24514/00002843</a>

## 技術報告

## 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

堀田 博<sup>§</sup>

## Spiked Rice Sample Preparation for Determination of Total Nitrogen as the Test Material of Collaboratory Study by an L-Glutamine Addition

Hiroshi Horita<sup>§</sup>

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

## Abstract

Spiked rice samples were prepared for the total nitrogen analysis by an L-glutamine addition as a nitrogen source. They could not discriminate from those original rice flours by their color, smells and texture of flour, and they have sufficient homogeneity. A collaboratory study was performed using them as the test material.

From the result of this collaborative trial,  $S_r$  and  $S_R$  values of spiked samples were a small value which showed that there are few errors, and they were almost the same or smaller than those of original materials. These data indicated that homogeneity of spiked samples remained until a sampling by the collaborators, and was better than those of raw materials.

The HorRat values, 0.63 and 0.70 for raw materials, 0.28, 0.58 and 0.39 for spiked materials, show that measuring results of this collaborative trial were satisfying, and these values indicated that the combustion method according to the Dumas principle have a good performance and reproducibility to determine total nitrogen in rice.

## Keyword

spiked material ( 添加試料 ), homogeneity ( 均質性 ), glutamine ( グルタミン ), rice ( 米 ), collaboratory study ( 試験室間共同試験 )

## 緒言

国際調和プロトコールでは、試験室間共同試験（以後、室間共同試験と略す）を実施するに当たり、測定データを統計的に棄却した後に残る参加試験室数や配付する測定試料数などの最低基準が定められている。その中の試料数は5点以上が必要とされる<sup>1)</sup>。しかし、マトリックスが同じで測定対象成分の含有量の異なる試料を5点以上そろえるのは、事前に多くの試料を測

定調査する必要がある、含有量に余り大きな違いがない材料では非常に難しい。測定対象成分の含有率が高いあるいは逆に低い試料が見つければ、それを基にしてブレンドにより種々の含有量のものを作製できるが、例えば重金属類の高含有試料を探し出すのは難しい。また、その測定対象成分の含有量の違いが5%以内である「Youden ペア」<sup>1,2)</sup>の試料を探すのも同じような理由で難しい。

そこで、測定対象成分を化合物の形で添加してその含有量を調節する方法により、成分添加試料である標

<sup>§</sup>連絡先, horita@affrc.go.jp

準物質，粉スキムミルクにカドミウムなどの重金属を添加した BCR-150や BCR-151<sup>3)</sup>，農薬の添加による BCR-187や BCR-188<sup>4)</sup>が作製されている。

その利点は任意の量の測定対象成分を含有する複数の試料が作製できることである。欠点としては，添加・混合する成分が試料となるマトリックス中に含まれる場合でも，抽出時の回収率が試料由来のものと添加した化合物では異なることが予想される。また，添加化合物がうまく混合して均質になるか，さらに添加によって試料の色などの外観や臭い，テクスチャーの変化も問題となる。

筆者は米中の全窒素成分の測定に関する室間共同試験を実施し<sup>2)</sup>，それに使用した材料として，種々の窒素含量の米を精米業者の協力により入手したが，全窒素含有量は0.9~1.4%の範囲であった。

そのため，米の窒素含量を自在に調節できる化合物として，米中にも含まれるアミノ酸類の添加を考え，添加試料を作製し均質性を確認した後，さらに室間共同試験の配付試料として使用したので，それらの結果を報告する。

## 実験方法

### 1. 分析試料及び添加用原料

添加用原料として，2種類の市販の2005年産国産精白米（茨城県産のこしひかりとミルキークイーン）を用いた。

添加試験に使用したアミノ酸類，L-グルタミン，L-オルニチン塩酸塩，L-トリプトファン，グリシンは，和光純薬の試薬特級を用いた。

### 2. 粉碎と添加試料の作製

米試料の粉碎は Retch 社製の超遠心粉碎機 ZM200で，10000 rpm の回転速度，0.50 mm のスクリーンを装着して行い，さらに0.50 mm の篩目（ステンレス製）を通して，試料とした。

添加するアミノ酸類は乳鉢とミキサで粉碎し，75 μm の篩目（ステンレス製）を通したものをを用いた。粉碎した精白米試料1100 g を，業務用攪拌機（キッチンエイドミキサー，KSM5）で攪拌しながら，粉碎したアミノ酸を少量ずつ添加し，添加後さらに約1時間攪拌し，添加試料とした。

試料は業務用攪拌機で良く混合した後，約20 g ずつ，表層部分に沿って順次採取し，PP製の30 mL 広口ビンに保存し，小分けサンプルとした。10サンプルを採

取したら，ミキサーでの攪拌を1分間行い，その後と同様の操作手順で試料採取を再開し，小分けを行った。

### 3. 均質性

作製した試料の均質性は，小分けした16ピンそれぞれから測定用試料を各2点ずつ量り取り，燃焼法で全窒素含量を測定し，コクラン検定で外れ値を除外してから，Microsoft Excel 2003の「分散分析：一元配置」で，分析誤差 ( $S_{an}$ ) とサンプリング誤差 ( $S_{sam}$ ) を，グループ内の分散 =  $S_{an}^2$  と (グループ間の分散・グループ内の分散) /  $n = 2$  (今回の場合の繰り返し数) =  $S_{sam}^2$  により求め， $S_{sam}^2 < C[\sigma_{all}^2 = (0.3 \times \sigma_p)^2, C = F_1 \sigma_{all}^2 + F_2 S_{an}^2]$ <sup>5)</sup> と  $S_{an} < \sigma_{all} = 0.3 \sigma_p$  (Target Value, Horwits Function)<sup>6)</sup> により，均質性を確認した。

### 4. 室間共同試験について

(1) 燃焼法（改良デュマ法）による測定に用いた機器類は，Leco 社製が4機種，住化分析センター製とジェイ・サイエンス・ラボ社製，エレメンタル社製がそれぞれ1機種であった。

(2) 参加試験室は21で，同一機関でも異なる2機種で測定した場合には別の試験室として扱った。

#### (3) プロトコール

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を付け，試料として計11種類を各2点ずつ，総計22点を非明示反復試料として配付した<sup>1)</sup>。測定結果は水分補正をしない生のデータを報告させた<sup>2)</sup>。本報告では，その中の添加試験に関係した5種類だけの解析結果を示している。

### 5. 集計データの棄却，Cochran 及び Grubbs の検定<sup>1) 8) - 11)</sup>

集計したデータは外れ値の検定を行った。

#### (1) コクラン (Cochran) の検定

最初にコクランの検定を行った。これは，各試験室の測定データの分散値の総和とそれらの試験室の中で一番大きな分散値の比率を計算し，その値がコクラン検定の棄却限界値の表の参加研究室数と測定数から読み取った値よりも大きな場合は棄却される。JIS ハンドブック<sup>8)</sup>に載っている1%と5%の表ではなく，国際調和プロトコールである IUPAC の技能試験方法の2.5%の棄却限界値の表<sup>1)</sup>で検定を行った。棄却された試験室のデータを除き，同じ手順で検定を続ける。即ち，分散値の大きな順に棄却するか否かを検定する。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ルールがある<sup>1)9)-11)</sup>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21試験室の場合では4試験室が棄却できる最大数である。

## (2) グラッブス (Grubbs) の検定

次に、コクランの検定で棄却したデータを使い、グラッブスの検定を行った。

これは測定平均値の、①最小値あるいは最大値、②二番目までの最大値あるいは最小値、③最大値と最小値、をそれぞれ除いた測定平均値の標準偏差 ( $S_x$ ) と全ての平均測定値の標準偏差 ( $S_{all}$ ) を計算する。そこから求める  $(1 - S_{all}) \times 100$  の値が、グラッブス検定の2.5%の棄却限界値の表の参加研究室数から読み取った値より大きければ外れ値である。先に一番目、次に二番目までの検定を行う<sup>1)</sup>。この検定でも、棄却試験室が出たらそれを除いて再検定をするが、参加した2/9以上の試験室はやはり棄却はできない。さらに先に行ったコクラン検定で棄却された試験室数が上限まで達していれば、本検定で外れ値とされても棄却できない。

## 6. データの解析

解析は前報告<sup>2)</sup>と同様に、Microsoft Excel の「繰り返しのある分散分析」で計算し、総平均とその分散、繰り返し誤差の分散値 = 併行精度 =  $S_r^2$  (Repeatability)、列の分散 =  $S_d^2$  と JIS ハンドブックの Z8402-2 にある式<sup>7)</sup>から、室間分散 =  $S_L^2 = S_d^2 - S_r^2 / 2$  (今回の場合の繰り返し数) や室間再現精度 =  $S_R^2$  (Reproducibility) =  $S_r^2 + S_L^2$ 、併行相対標準偏差 ( $RSD_r$ )、室間相対標準偏差 ( $RSD_R$ ) を計算した。

また、数多くの室間共同試験から得られた  $RSD_R$  から経験的に導き出された  $PRSD_R$  [%、Predicted  $RSD_R$  =  $2 \times C^{-0.1505}$ 、 $C$  は測定平均値で含有量が1%ならば「0.01」、POWER( $C$ , -0.1505) という関数を使う<sup>9)-14)</sup> も Microsoft Excel で計算した。

HorRat 値は、 $RSD_R / PRSD_R$  で計算した<sup>10)-12),14-16)</sup>。

## 実験結果と考察

### 1. 添加物の選択

アミノ酸類の中から、窒素含有率が比較的高く、無味、無臭、無色の L-グルタミン、L-オルニチン、L-トリプトファン、グリシンを選択した。

事前に粉碎と篩を通したアミノ酸類を米粉砕物に混

合した場合の特徴は以下の通りであった。

①L-グルタミン；細かく、乳鉢で摺るとさらに細かくなる。米粉砕物と良く混ざる。②L-トリプトファン；板状の結晶で、摺ると細かくなるが粘着性があり、篩に付着する。米粉砕物と混合しても均質に混ざらない。③グリシン；摺っても粘着性が消えず余り細かくなならない。米粉砕物との混合物は乾いているが、大きめの結晶粒が識別できる。④L-オルニチン；元々細かいが粘着性もある。米粉砕物と混合すると粘着性のため篩に付着し、均質に混ざらない。

通常の室間共同試験は、試料名は明示せず同一の試料を二つ入れた試料群を、一試料につき各1回だけ測定する非明示反復 (blind replicates) という方法で行う。試料名を明示した場合、被験者は同じ容器からサンプリングした試料の測定値は同じと考えて、複数回測定した測定値から差が少ない値を選んでしまうことがあるので、そのような測定値の操作を防ぐために、非明示の試料を配付して1回だけ測定してもらう。しかし、非明示の場合でも、その特徴でペアとなる試料が被験者に識別されると、非明示反復の意味がなくなる。今回のような添加試料では、添加した成分由来の色や試料の形状等の外観、さらに臭いやテクスチャーの変化がなく、その試料ペアが識別されないことが重要である。

また、添加物としてアミノ酸類を選定したのは、それらが米中に存在しており、燃焼法やケルダール法での全窒素測定時の添加アミノ酸類の燃焼効率や分解率が米中のものと変わらないと考えたからである。

さらに、添加成分候補とする場合、その窒素含有率が高い成分ほど、少量の添加で試料の窒素含有量を変化させられるので効率が良い。精米の窒素含量は2.5% (たんぱく質換算で15%) 以下<sup>17)-19)</sup>であり、米の配付試料を作製する場合には余り高含量にする必要はないが、添加効率を考えると窒素含有率がある程度高いアミノ酸が良い。

以上の観点から、添加アミノ酸は、窒素含有率が高く、無味、無臭、無色で米試料に混ぜやすくその混合物に違和感のなく、添加により試料の窒素含量以外の質的な変化が起きない L-グルタミンを選択した。こしひかりの添加用原料 (Material 1) と L-グルタミンの高添加レベル試料 (Material 2)、ミルクキーン添加用原料 (Material 3) と L-グルタミンの低添加レベル及び中添加レベル試料 (Material 4 と Material 5) の測定用試料を作製した。

作製した添加試料は、色や粉の形状などの外観や臭

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

	Material 1 <sup>a</sup>	Material 2 <sup>a</sup>	Material 3 <sup>a</sup>	Material 4 <sup>a</sup>	Material 5 <sup>a</sup>
Number of accepted duplicate results	30	32	32	28	32
[ 14 to 16 distribution units( $m$ )]	( 2 × 15 )	( 2 × 16 )	( 2 × 16 )	( 2 × 14 )	( 2 × 16 )
Mean( $\bar{X}$ , % )	0.9856	1.629	0.9662	1.175	1.456
RSD( % )	1.24	0.872	0.994	1.03	0.847
Analytical standard deviation( $S_{an}$ , % )	0.0115	0.0105	0.00738	0.0111	0.0112
Sampling standard deviation( $S_{sam}$ , % )	0.00429	0.00970	0.00626	0.00498	0.00528
Target standard deviation					
[ $\sigma_p, 0.02 \times (\bar{X}/100)^{0.8495} \times 100$ , % ]	0.0395	0.0605	0.0388	0.0459	0.0550
Analytical variance( $S_{an}^2$ )	0.000132	0.00111	$5.44 \times 10^{-5}$	0.000124	0.000125
Sampling variance( $S_{sam}^2$ )	$1.84 \times 10^{-5}$	$9.40 \times 10^{-5}$	$3.91 \times 10^{-5}$	$2.48 \times 10^{-5}$	$2.78 \times 10^{-5}$
$\sigma_{all}^2 = (0.3 \times \sigma_p)^2$	0.000140	0.000330	0.000136	0.000189	0.000273
$C = F_1 \sigma_{all}^2 + F_2 S_{an}^2$	0.000331	0.000626	0.000264	0.000419	0.000540
$S_{sam}^2 < C$	Accept	Accept	Accept	Accept	Accept
$S_{sam}^2 < \sigma_{all}^2$	Accept	Accept	Accept	Accept	Accept

<sup>a</sup>; Material 1; Variety 'Koshihikari', material 2; Koshihikari high spiked level, material 3; Variety 'MilkyQueen', material 4; MilkyQueen low spiked level, material 5; MilkyQueen medium spiked level

い、粉のテクスチャーではそれら添加用原料の米粉碎物と全く識別できないものであった。

## 2. 均質性

添加試料を含む5試料の均質性についての統計的な評価をTable 1に示す。分析誤差( $S_{an}$ )は0.0074~0.012, サンプル誤差( $S_{sam}$ )は0.0043~0.0097, 添加試料の $S_{sam}$ は $S_{an}$ より常に小さく, 添加用原料と添加試料の $S_{an}$ と $S_{sam}$ は, 添加の有無やその添加量が異なってもほとんど同じであった。これらのデータから算出した均質性を確認する二つ指標, $S_{sam}^2 < C^{5.6)}$ と $S_{sam} < 0.3 \times \sigma_p^{7)}$ により, 作製した添加試料と添加用原料の5試料全てが十分に均質な試料であることを確認した。しかし, AOAC インターナショナルの OMA Program Manual の Appendix E<sup>20)</sup>で採用されている均質性の指標である $S_{sam} < 1/3 \times S_{an}$ は, 全ての試料で満たせなかった。

## 3. 室間共同試験

### (1) 結果

21試験室の参加による室間共同試験の測定結果をTable 2に示す。測定に用いた機種は, 試験室1~8がLeco-FP-2000, 試験室9~13がLeco-FP-528, 試験室14~15がLeco-TrueSpec, 試験室16がLeco-FP-428 [以上, 4機種はLECO ジャパン(株)], 試験室17がPROTEIN CORDER JMC-3000N [ (株)ジェイ・サイエンス・ラボ ], 試験室18~20がSUMIGRAPH NC-220F [ (株)住化分析センター ], 試験室21がElementar

rapid N [ 日本シーベルヘグナー(株) ] で, その燃焼室の設定温度と試料重量もTable 2に記載した。

検定による棄却は, ミルキークイーンの添加用原料(Material 3)ではなく, 他の試料では各1試験室が棄却された。それらのデータを基にした解析値をTable 3に示す。

室間共同試験で算出された, L-グルタミン添加により作製した試料の併行標準偏差( $S_r$ )及び室間再現標準偏差( $S_R$ )を, その添加用原料のものとは比べると余り差がなく, ほぼ同じか小さな値であった。それに対してRSD<sub>R</sub>とHorRat値は, こしひかりの無添加原料の2.51%と0.63が添加試料(Material 2, 高添加レベル, 増加した窒素含量は0.656%)では1.03%と0.28に, ミルキークイーンの無添加原料の2.83%と0.70が添加試料では2.27%と0.58(Material 4, 低添加レベル, 同0.215%)及び1.49%と0.39(Material 5, 中添加レベル, 同0.489%)になり, 共に試料中の窒素含量の増加に反比例して小さくなった。RSD<sub>r</sub>も同様であった。添加したグルタミン量(%)との相関は, RSD<sub>R</sub>値との間で $R^2=0.971$ , HorRat値との間では $R^2=0.963$ であった。これらの高い相関は添加したグルタミン量に比例してその添加試料の測定値が精確に求められたことを示しており, その理由として, 精米内の窒素化合物よりも添加したグルタミンの燃焼効率が良いあるいは燃焼の再現性が高いことにより, 添加量が多いほど安定した測定値が得られたのではないかと推測した。

AOAC インターナショナルでは, HorRat値は0.5~

Table 2. Total nitrogen contents (%) in spiked and raw rice samples measured by combustion method according to the Dumas principle

Laboratory	Material 1 <sup>a</sup>		Material 2 <sup>a</sup>		Material 3 <sup>a</sup>		Material 4 <sup>a</sup>		Material 5 <sup>a</sup>		S.W. (mg) <sup>c</sup>	C. T. (°C) <sup>d</sup>
1	1.040	1.024	1.648	1.646	1.003	1.009	1.220	1.211	1.490	1.486	500	1050
2	0.9731	0.9636	1.623	1.623	0.9515	0.9502	1.163	1.161	1.435	1.427	400	1350
3	0.9666	0.9645	1.619	1.619	0.9478	0.9392	1.165	1.167	1.437	1.438	900	1200
4	0.9299	0.9256	1.580 <sup>e</sup>	1.565 <sup>e</sup>	0.9086	0.9091	1.114	1.123	1.332 <sup>f</sup>	1.402 <sup>f</sup>	200	1300
5	0.9583	0.9420	1.625	1.626	0.9266	0.9259	1.150	1.153	1.427	1.435	500	1350
6	0.9742	0.9753	1.644	1.640	0.9636	0.9960	1.177	1.183	1.458	1.458	800	1350
7	0.9756	0.9760	1.630	1.636	0.9618	0.9773	1.177	1.177	1.449	1.453	500	1350
8	0.9905	0.9946	1.675	1.672	0.9866	0.9932	1.199	1.214	1.482	1.488	500	1250
9	1.011	1.014	1.658	1.652	0.9823	0.9953	1.195	1.213	1.447	1.446	200	950
10	0.9962	0.9970	1.652	1.656	0.9975	0.9940	1.211	1.220	1.463	1.470	200	950
11	1.011	1.019	1.668	1.675	1.012	1.001	1.231 <sup>f</sup>	1.191 <sup>f</sup>	1.480	1.492	200	850
12	1.023	1.018	1.662	1.657	1.005	1.004	1.219	1.219	1.498	1.492	250	950
13	0.9962	0.9906	1.645	1.655	0.9841	0.9796	1.194	1.190	1.470	1.469	300	950
14	0.9984	0.9958	1.653	1.668	0.9893	0.9947	1.199	1.199	1.488	1.484	300	950
15	0.9967	0.9977	1.636	1.631	0.9723	0.9959	1.188	1.194	1.483	1.483	200	950
16	1.000	0.9950	1.623	1.630	0.9640	0.9540	1.218	1.240	1.421	1.446	200	850
17	0.9909 <sup>g</sup>	0.9592 <sup>f</sup>	1.650	1.639	0.9555	0.9394	1.193	1.179	1.438	1.461	500	870
18	0.9820	0.9760	1.623	1.629	0.9590	0.9600	1.174	1.178	1.444	1.450	500	870
19	0.9719	0.9811	1.636	1.631	0.9648	0.9659	1.172	1.186	1.453	1.454	400	870
20	0.9730	0.9740	1.625	1.627	0.9590	0.9620	1.174	1.171	1.445	1.446	500	870
21	0.9890	0.9970	1.656	1.655	0.9990	0.9990	1.205	1.211	1.479	1.474	300	Nd <sup>h</sup>

<sup>a</sup>; Abbreviations are same as table 1 <sup>c</sup>; sample weight, <sup>d</sup>; combustion temperature

<sup>e</sup>; Data removed by Grubbs test <sup>f</sup>; data removed by Cochran test <sup>g</sup>; no data

The instruments used in this collaborative study were as follows. Leco FP-2000 used with Lab. 1 to 8, Leco FP-528 used with Lab. 9 to 13, Leco True Spec used with Lab. 14 and 15, Leco FP-428 used with Lab. 16, J-SCIENCE JMC-3000N used with Lab. 17, SUMIGRAPH NC-220F used with Lab. 18 to 20, and Elementar rapid N used with Lab. 21. Standard material used for calibration were as follows. EDTA used with Lab. 1 to 16 and 20, aspartate used with Lab. 15 to 19, glutamate used with Lab. 21.

Table 3. Collaborative study parameters of spiked and raw rice sample analyzed for total nitrogen measured by combustion method according to the Dumas principle

	Material 1 <sup>a</sup>	Material 2 <sup>a</sup>	Material 3 <sup>a</sup>	Material 4 <sup>a</sup>	Material 5 <sup>a</sup>
Number of accepted	20	20	21	20	20
Mean ( $\bar{X}$ , %)	0.9869	1.643	0.9723	1.187	1.461
RSD	2.48	1.02	2.79	2.24	1.47
Standard deviation of repeatability ( $S_r$ , %)	0.00499	0.00443	0.00805	0.00679	0.00638
Relative standard deviation of repeatability ( $RSD_r$ , $S_r/\bar{X}$ , %)	0.505	0.270	0.828	0.572	0.437
Standard deviation of reproducibility ( $S_R$ , %)	0.0247	0.0169	0.0275	0.0269	0.0218
Relative standard deviation of reproducibility ( $RSD_R$ , $S_R/\bar{X}$ , %)	2.51	1.03	2.83	2.27	1.49
Predicted relative standard deviation [ $PRSD_R$ , $0.02\sqrt{\bar{X}/100} \times 100$ , %]	4.01	3.71	4.02	3.90	3.78
HorRat value ( $RSD_R/PRSD_R$ )	0.625	0.277	0.703	0.582	0.394

<sup>a</sup>; Abbreviations are same as table 1.

1.5の間で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<sup>10),16)</sup>。今回の添加試料による HorRat 値は0.5を大幅に下回っているが、ケルダール法の室間共同試験<sup>21,22)</sup>でもこのような例が多い。これらの HorRat 値は、測定値の作為的な操作によるもの

ではなく、抽出操作もなく分析手順がシンプルな測定法であるケルダール法及び燃焼法が、測定者や測定機器が異なる試験室間でも、同じ試料の測定値はほとんど変わらない、再現性などのパフォーマンスが高い測定法であることを示したものと考える。

これらの結果を総合すると、今回の室間共同試験は

満足のいくものであった (Table 3)。

#### (2) 試料の配付後の均質性

室間共同試験は、使用した「試料」を評価する試験ではないが、配付した試料自体の均質性が悪化すればピンからサンプリングした試料に含まれる測定対象成分の量自体がばらつきその測定値の誤差が大きくなる。

今回の室間共同試験で算出された  $S_r$  と  $S_R$  には、輸送や保存、試料のサンプリングなどが実際に行われた室間共同試験に由来する試料の均質性が悪化した場合の誤差が含まれる。そのような観点から見た添加試料の  $S_r$  と  $S_R$  の値は、それらから算出される  $RSD_r$  や  $RSD_R$ 、数多くの室間共同試験から経験的に導き出された  $PRSD_R$  と  $RSD_R$  の比である HorRat 値から、小さな値すなわち誤差が非常に少ないと推測できる。さらに、添加用原料よりも添加試料の値がほぼ同じか小さい。以上のことから、配付した添加試料が室間共同試験の被験者が使った時点では均質性が保たれていたことを示していた。

さらに、Table 2 の測定結果から各試験室の標準偏差と RSD を計算すると、各試料の最大値で標準偏差が 0.011~0.023 (単位は%)、RSD も 0.64%~2.34% であり、含量が 1~1.6% 程度の成分測定の標準偏差と RSD としては小さな値である。また、添加用原料よりも添加試料の値は全て小さかった。個別の試料の RSD は、Material 1 で最大 1.21% と平均 0.39%、その添加試料である Material 2 で 0.64% と 0.22%、Material 3 は 2.34% と 0.57% でその添加試料である Material 4 で 1.27% と 0.43%、Material 2 で 1.23% と 0.30% であり、含量が 1~1.6% の成分測定の RSD としてはやはり小さな値であった。それぞれの試料の標準偏差の中には機器測定自体の誤差やサンプリング誤差だけでなく、試料の均質性が悪化した場合の誤差も含まれるので、添加用原料よりも添加試料の最大の標準偏差が小さいことを勘案すると、配付した添加試料は室間共同試験の開始まで十分に均質であったこと、添加用原料よりもその均質性が保たれていたことが推定される。

実際に配付した試料の試験後の均質性については、確認できなかった。そこで、配付による振動モデルとして、タッピング処理を行った。添加試料の中で Table 1 の Material 5 (中添加レベル) と同じバッチの小分け試料を用い、PP 製広口ピンのフタを上にして手でタッピングを 50 回行い、ピン内の試料を混ぜることなく、その上層部から試料をサンプリングして全窒素量を測定した。コ克蘭検定で残った 14 ピンのデータか

ら  $S_{an} = 0.0117$ ,  $S_{sam} = 0.00819$ ,  $Mean = 1.460$  となり、Material 5 とほとんど変わらず、添加成分の偏りに起因する窒素含量自体の変化もなかった。これらから計算した均質性の指標は、Table 1 の他の試料と同様に、 $S_{sam}^2 < C$  と  $S_{sam} < \sigma_{all} = 0.3 \times \sigma_p$  を満たしており、十分に均質な試料であった。配付 (輸送) やピンからの試料取り出しなど通常の取り扱いによる振動よりも、今回行ったタッピングは極端な物理的な振動を試料に与えていると考えられる。この結果から、配付試験室で通常の取り扱いをされるならば、今回作製した L-グルタミン添加試料の均質性は保たれることを示している。

以上のように、L-グルタミン添加により全窒素成分含量を増加させる目的で作製した試験室共同試験用の配付試料は、実際の配付の後でも十分な均質性を持つ安定で実用に耐えうるものであった。また、添加試料を含めた今回の燃焼法による室間共同試験は満足の行くものであった。

#### (3) 添加成分について

試料の窒素含有率を 1% 上げる 100g 当たりの成分量を試算すると、L-グルタミン (窒素含有率 19.2%) で 5.50g、L-グルタミン酸 (同 9.5%) で 11.74g、L-アルギニン (同 32.2%) で 3.21g などである。分子の窒素含有率が高い物質ほど効率が良く、窒素含有率が 66.6% と非常に高いメラミン (Melamine,  $C_3H_6N_6$ ) では、100g 当たり 1.52g の添加で窒素含有率を 1% 上昇させることが可能である。今回の試験では高含量のものは作製する必要はなかったので使用しなかったが、窒素含有率を上昇させる添加物質としては非常に効率が良く最適である。たんぱく質含量は窒素含有量に窒素・たんぱく質換算係数 (一般に 6.25、米; 5.95、乳製品; 6.38 など)<sup>23)</sup> を掛けて求めるので、窒素含有率を 1% 上げるとたんぱく質含量は 6% 前後も上げることができる。

#### (4) 添加試料の作製

測定対象となる成分を添加して試料を作製した場合、測定手順の中にその成分の抽出操作があるとその回収率が問題となる。原料からと添加物からの添加成分の回収率に大きな差異がある場合に、試験室間の測定値が大きくばらつく可能性が高い。そのような試料では精確な  $S_R$  を求めるのが主目的の室間共同試験を行う意味がない。それに対して、燃焼法は、計量した全試料を装置内で燃焼させるだけのシンプルで抽出操作がない測定法であるため、難燃性の添加物を使わない限り、試料の均質性と安定性を考慮すれば、添加試

料を使用しても問題が起こらない測定法であると考えられる。また、原子吸光法やICP-OES、ICP-MSによる無機成分の測定では、複数の化学種が存在する元素、例えばヒ素では有機態及び3価と5価の無機態それぞれの化学種の酸での分解率を、また有機溶媒で抽出・濃縮する方法ではその抽出率を考慮する必要があるが、調製した試料を直接測定する場合には、ミルクにカドミウムなどの重金属を添加した標準物質<sup>3)</sup>の例もあるように、添加試料を使ってもほとんど支障がない測定法の一つといえる。

## 要約

原料の米粉砕物と色や臭い、粉のテクスチャーでは識別できない、L-グルタミンを添加した全室素測定用試料を作製し、十分に均質なことを確認して、室間共同試験用試料として配付した。

その結果、添加試料の $S_r$ と $S_R$ の値は誤差が少ないことを示す小さな値であること、添加用原料の値と比較するとほぼ同じか小さいことから、配付した添加試料は室間共同試験の開始まで十分に均質であったこと、及び添加用原料よりもその均質性が保たれていたことを示していた。

また、HorRat値は、添加用原料が0.63と0.70、添加試料は0.28と0.58、0.39となり、本室間共同試験が満足なものであり、燃焼法が再現性などのパフォーマンスが高い分析法であることを示していた。

これらの結果から、L-グルタミン添加により作製した全室素測定用試料は、実際の室間共同試験に使用しても測定試料の均質性悪化に由来する試験結果の乱れもなく、十分な均質性が保たれる安定なものであった。

## 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、サッポロビール株式会社価値創造フロンティア研究所、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、日清製粉株式会社、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(あいう

えお順に並べた)の担当者の皆様方に感謝いたします。

## 文献

- 1) W. Horwitz, Protocol for the design, conduct and interpretation of Method-Performance Studies, *Pure & App. Chem.*, 67, 331 - 343 (1995).
- 2) 堀田 博, 燃焼法による玄米中の全室素定量の室間共同試験, *分析化学*, 55, 323-327 (2006).
- 3) T. Griepink and H. Muntau, The certification of the contents (mass fractions) of Cd, Cu, Fe, Hg and Pb in one natural sample of skim milk powder (BCR63) and two spiked samples of skim milk powder (BCR 150 and BCR151)., BCR information report EUR 9251, commission of the European Communities, Community Bureau of Reference, 1984.
- 4) J. Quirijns, T. K. Paauw, E. Mulders and B. Griepink, Development of milk powder reference materials BCR-CRM 187, 188. Part . Preparation, homogeneity, and stability, *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, 73, 773-776 (1990).
- 5) T. Fearn, M. Thompson, A New test for 'sufficient homogeneity', *Analyst*, 126, 1414 - 1417 (2001).
- 6) Protocol for the organization and analysis of data, 6th edition, 2002, food analysis performance assessment scheme (FAPAS), Central Science Laboratory, UK. <http://www.fapas.com/pdfpub/FAPASProtocol.pdf>
- 7) M. Thompson and R. Wood, The international harmonized protocol for the proficiency testing of (chemical) analytical laboratories (technical report), *Pure & App. Chem.*, 65, 2123 - 2144 (1993).
- 8) JIS Z 8402- 2 : 1999, 測定方法及び測定結果の精確さ(真度及び精度) - 第2部: 標準測定方法の併行精度及び再現精度を求めるための基本的な方法, 日本規格協会編, "JISハンドブック57 品質管理2004", p269-P301(2004)(日本規格協会).
- 9) W. Horwitz, L. R. Kamps, and K. W. Boyer, Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents, *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, 63, 1344-1354 (1980).
- 10) (独) 農研機構 食品総合研究所ホームページ, お役立ち情報, 分析法の妥当性確認に関するガイドランス (<http://www.nfri.affrc.go.jp/yakudachi/datosei/index.html>)
- 11) 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-P186 (2007).
- 12) 内藤成弘, 塚越芳樹, 食糧 - その科学と技術 - No 46, . データの統計的取り扱い, p27-p62 (2008), (独)農研機構食品総合研究所ホームページ(研究報告, 食糧), ([http://nfri.naro.affrc.go.jp/guidance/kankobutu/kanko\\_sou46.html](http://nfri.naro.affrc.go.jp/guidance/kankobutu/kanko_sou46.html))
- 13) M. Thompson, Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing, *Analyst*, 125, 385-386 (2000).
- 14) 安井明美, 食品の分析データの信頼性確保システムの確立, 日本食品科学工学会誌, 54, 356-361 (2007).
- 15) F. D. McClure and J. K. Lee, Computation of HOR-RAT values, *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, 86, 1056-1058 (2003).
- 16) 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>)
- 17) 平宏和, 平春江, 四国三県産水稲うるち玄米のタンパク質含量, 食品総合研究所研究報告, 35, 14-41 (1969).
- 18) 平宏和, 平春江, 水稲うるち玄米のタンパク質含量, 日本作物学会紀事, 40, 21-26 (1971).
- 19) 平宏和, 星川清親, 平春江, 矮性水稲玄米のタンパク質含量, 日本作物学会紀事, 41, 155-159 (1972).
- 20) OMA PROGRAM MANUAL, Appendix E, 2002. (<http://www.aoac.org/vmeth/omamannual/omamannual.htm>)
- 21) J. M. Lynch, D. M. Barbano and J. R. Fleming, Determination of total nitrogen content of hard, semi-hard, and processed cheese by the Kjeldahl method: collaborative study, *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, 85, 445-455 (2002).
- 22) S. Nozawa, A. Hakoda, K. Sakaida, T. Suzuki and A. Yasui, Method performance study of the determination of total nitrogen in soy sauce by the Kjeldahl method, *Analytical Sci.*, 21, 1129-1132 (2005).
- 23) 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1章 たんぱく質, p12-p13, 国立印刷局, 2005.