

ノ　ー　ト

ブロック分解台を用いたケルダール法による 大豆中の粗蛋白質の定量

串　岡　慶　子

Kjeldahl Determination of Soybean Protein,
Using a Block Digestor

Keiko Kushioka

1883年, Kjeldahlは, 濃硫酸のみで穀類を加熱し, 穀類中の蛋白質を定量する方法を考案した。この方法は, その後, 色々な食品に応用され, 試料の完全な分解および分解時間の短縮, 蛋白質中の窒素の定量的な NH_4^+ への変換, NH_3 の遊離, 定量などについて, 接触剤をはじめ数多くの改良が加えられた。これらの変遷は, Bradstreet¹⁾, Kirk²⁾などの総説に詳しく述べられている。現在においても, ケルダール法は, 食品中の粗蛋白質定量の中心的な位置を占めているが, 基本的には, 1900年代初期の方法となんらかわりのない。食品中の蛋白質含量を求めるには, 窒素を定量し, その値に窒素係数を乗じる。窒素係数は, 6.25で蛋白質の構成アミノ酸により多少変動する³⁾。

ケルダール法は, 周知のように原理的には,

- (i) 蛋白質中の窒素 $\xrightarrow[\text{触媒}]{\text{濃硫酸}+\text{無機塩類}}$ NH_4^+
(分解)
- (ii) NH_4^+ +強アルカリ \longrightarrow NH_3 遊離 (蒸留)
- (iii) NH_3 (定量)

の三過程からなり, 正確な窒素量を得るにはまず(i)の操作で, 蛋白質中の窒素が完全に NH_4^+ の形に分解されなければならない。この過程は, 濃硫酸の量, 濃硫酸と無機塩類の比, 触媒, 酸化剤, 還元剤, 分解温度, 分解時間, 装置など数多くの要因によって影響される。

本学の食品化学実験においては, 今年度より温度制御付金属ブロック分解装置 (以下 TCMD装置と略す) 京都女子大学食物学科食品学第2研究室 (食品化学)

を, 大豆中の蛋白質を定量する学生実験に, 従来の直火式ケルダール分解装置にかわって導入した。そこで, この装置を使用する時の分解条件を確立するために, 色々な条件下で分解を行い, 一応の結論を得たので報告する。

実験に先立ち, 現在, ケルダール法実施に際し, 一般に用いられている試薬の量およびその作用について比較検討を行った。

試薬量の比較——ケルダール法による食品中の蛋白質の分解は, 金属あるいは金属化合物と無機塩の存在下, 濃硫酸を加熱沸騰させて行われる。この過程は, 先にも述べたように色々な要因によって左右されるが, ここでは, 分解試薬量について検討する。

表1には, AOAC マクロ法と本報告の標準条件, およびいくつかの実験書に記載の条件を, 大豆粉末1gを分解するのに必要な各試薬の量(換算値)と共に記した。表1に記された試薬の種類を比べると, 触媒に金属水銀あるいは水銀化合物を用いているのは, AOACであり, 満田・千葉は, 水銀化合物と硫酸銅を, その他は硫酸銅だけを用いている。分解時間が極端に短縮される自動分析機による方法と, TCMD装置使用の場合は, 酸化剤(H_2O_2)と濃硫酸が併用される。また, 無機塩類は, すべて硫酸カリウムを用いている。

各試薬の使用量を比べると, 非常に大きな違いがあることが注目される。比較しやすいように記した換算値について検討すると, 標準条件, 永原・岩尾と稲

表1 試薬量の比較

	分解 操作	定量操作 (分解液全 部または 一部)	I							II												
			試料 (g)	接 触 剤					濃硫酸 (ml)	H ₂ O ₂ (ml)	試料 (g)	接 触 剤					濃硫酸 (ml)	H ₂ O ₂ (ml)				
				無機塩 K ₂ SO ₄ (g)	触 媒 (g)							無機塩 K ₂ SO ₄ (g)	触 媒 (g)									
					HgO	Hg	HgSO ₄	CuSO ₄ ·5H ₂ O					HgO	Hg	HgSO ₄	CuSO ₄ ·5H ₂ O						
AOAC (1) ^{4a)}	マクロ	全 部	0.7~2.2	15	0.7				25					15	0.7				25			
AOAC (2) ^{4a)}						0.65									0.65							
AOAC (3) ^{4b)} Kjel-Foss自動分析機 16210型	マクロ	全 部	1.0(蛋白質 45%以下) 0.5(蛋白質 45%以上)	15	0.75				12~15	10				15	0.75				12~15	10		
満田・千葉 ⁵⁾ (標準条件)	セミ ミクロ	全 部	N-0.003 ~0.005*)	0.85 ~1.7			0.064 ~ 0.128	0.085 ~0.17	5		1			19.1			1.44	1.91	60			
永原・岩尾 ⁶⁾	マクロ	全 部	N-0.01*)	10				1	20					60				6	120			
稲垣・岡崎 ⁷⁾	マクロ	全 部	N-0.01 ~0.02*)	9				1	25					36				4	100			
神立 ⁸⁾	マクロ	全 部	N-0.015*)	0.9 ~2.7				0.1~0.3	20					3.6 ~10.8				0.4~1.2	80			
		一 部	1~2											0.9 ~2.7					0.1~0.3	20		
藤原 ⁹⁾	マクロ	一 部	N-0.03*)	1.8 ~3.6				0.2~0.4	20					3.6 ~7.2				0.4~0.8	40			
本学の従来の方法	マクロ	一 部	1	2.7				0.3	10					2.7				0.3	10			
TCMD 装置 ¹⁰⁾	マクロ	一 部	1	4.5				0.5	10	8				4.5				0.5	10	8		

I : 文献記載の試料および試薬量

*) 例えば, N-0.003~0.005 とは, 試料が窒素として, 0.003~0.005 g 含んでいることを示す

II : 1g 中に 60mg の窒素を含むものとして計算した大豆試料 1g につき必要な各試薬の換算値

垣・岡崎の三方法は、他に比べ3～33倍の試薬を用いている。AOACでは、試料量を1～3倍の範囲に、また、神立も試料量を1～7倍の範囲に変化させているが、各試薬は同量用い、試薬量と分解される試料量を比例的には関連づけていない。分解液の一部を定量する方法においては、試薬量はすべて少なくして後述の障害を避けていることが注目される。

各試薬の量と使用量——濃硫酸は、高温で脱水および酸化作用を行い、有機物をC、CO₂、H₂Oに分解する。この時、アミノ窒素、アミド窒素、プリン塩基などの窒素は、NH₄⁺に変化する。分解時における濃硫酸の必要量については、Bradstreetが詳細に検討している¹¹⁾。硫酸カリウムあるいはその他の分解促進剤と反応する量、分解時の蒸発量などはすべての場合に共通するので、Bradstreetに従ってこれらの量を計算すると、本年度の本学の分解条件下では、約2.4mlが消費される。一方、炭水化物、蛋白質、脂肪の各1gが分解されるには、濃硫酸は、それぞれ7.3g、9.0g、17.8g必要であると、Selfにより報告されている¹²⁾。四訂日本食品成分表の大豆の主要成分分析値、糖と繊維28.2%、蛋白質35.3%、脂肪19.0%から大豆1gを分解するのに必要な濃硫酸の量を求めると、約4.7mlになった。多量の濃硫酸は、分解を効率良く行い、消泡作用にも役立つという報告¹³⁾もあるが、大豆1gに対して、最低約7mlが必要ということになる。

無機塩類は、硫酸の沸点を高め、分解過程を促進させるために用いられ¹¹⁾¹⁴⁾¹⁸⁾、最も効果的な塩として、硫酸カリウムが広く使われている。酸に対する無機塩の割合が高くなると、分解液の突沸や固化がおこり、窒素含量の測定値が小さくなる¹¹⁾¹⁴⁾¹⁹⁾。また、分解液が硫酸水素カリウムの組成に近づくことも、測定値が小さくなる¹¹⁾¹⁶⁾原因につながるので、酸に対する塩の割合は考慮されなければならない。Nelsonらは、硫酸1mlに対し最も望ましい硫酸カリウムの量は、0.33～0.5gと報告している¹⁴⁾。

触媒としては、金属水銀および水銀化合物が、分解時間を短縮し、かつ、最も精度の高い結果を与えるため、これまで広く利用されてきた。しかし、その強い毒性による環境汚染のため、他の金属および金属化合物、すなわち、CuSO₄、Se、SeOCl₂、TiO₂、あるいは、これらの組み合わせられたものが利用されている。これらの触媒の作用は、明らかでなく、使用量についても色々と検討されている²⁰⁾²⁴⁾。

最後に、酸化剤の作用であるが、ケルダールの分解系においては、極端に強い酸化剤(KMnO₄、HClO₄な

ど)が使用されると、生成したNH₃までも酸化される。H₂O₂は、従来、酸化剤として広く使われ、分解を促進するといわれてきたが¹³⁾²⁵⁾、最近では、H₂O₂添加による激しい発泡のため、試料の損失を伴うなど、その効果については否定的である¹⁴⁾²⁶⁾²⁷⁾。

結果と考察

1. 各分解条件下における結果の比較

本報告の標準条件のほか、従来本学で実施していた条件と、TCMD装置使用条件下での実験結果を比較する。

標準条件には、満田・千葉によるセミマイクロ法を選んだが、この方法は、標準方法として認められているAOACケルダールマクロ法と比べて、操作時間や試薬が節約され、しかも正確度は劣らないと報告されている⁵⁾。

(1) 標準条件

文献⁵⁾記載の方法に従い、大豆粉末に接触剤と濃硫酸を加え、加熱沸騰させると、50分後に分解液は淡緑色になった。さらに続けて1時間加熱し分解を完了させた。その後、所定の処理をし常法により定量した結果は、次の通りである。窒素係数は、5.71を用いた。

回数	1	2	3	4	平均
蛋白質含量(%)	35.2	35.3	34.7	35.4	35.2

(2) 本学で従来実施していた条件

表1に記載の条件により、試料および試薬を分解フラスコに入れ、8時間加熱沸騰させた。分解液は、水で希釈後、その一部を蒸留し定量した。結果は、次の通りである。

試料番号	1		2		平均
	1	2	1	2	
蛋白質含量(%)	34.5	34.5	34.5	34.5	34.5

(3) TCMD 装置使用

表1に記載の試料および試薬を分解フラスコに入れ、本装置を用いて分解を行った。但し、酸化剤(H₂O₂)は、後述の理由により、使用しなかった。分解液は、試料1、2ともに黄緑色であった。その後の操作は、(2)に準じた。結果は、次の通りである。

試料番号	1		2		平均
	1	2	1	2	
蛋白質含量(%)	34.4	34.4	34.2	34.3	34.3

(4) 操作および結果の検討

i) 実験操作の比較

標準条件および本学の従来の条件においては、どちらも直火式ケルダールの分解装置を用いた。この場合、分解時の硫酸の飛散による窒素含量の誤差をなくすため、必要以上の強い加熱を避けたが、周辺への熱の伝達は激しく、コンクリートブロックや石綿板により、実験台を保護する必要があった。加熱初期には、発泡するので絶えず分解フラスコを回転させ、そして、分解状況に応じて、加熱の仕方を調節するなどの注意が必要であった。

学生実験では、20班同時に行うので、分解台(6本組)は、4台が必要であり、発生するSO₂の排気も十分には行えなかった。また、濃硫酸の取り扱い、加熱の強さ、発泡など、指導する側では目を離すことができない。分解時間も、8時間を要した。

標準条件では、試料の量が少ないので、約2時間で分解は完了した。触媒に加えたHgSO₄が、分解時間を短縮したとも考えられるが、確かではない。

次に、TCMD装置は、20個の試料を同時に一台で分解でき、しかも、小型であらかじめ420°Cに温度を設定しておけば、約40分という短時間で分解は完了する。分解時の発泡および加熱の強さに気を付ける必要もなく、非常に順調に進行する。

蒸留については、標準条件の場合、分解フラスコをそのまま使用するので、パルナスの装置を使用する時に比べ、洗浄操作がなく円滑に進められた。

ii) 実験結果の比較

前述のように、各条件下で得られた蛋白質含量測定値は、標準条件では、35.2%、本学の従来の方法では、34.5%、TCMD装置を用いた方法では、34.3%であった。四訂日本食品成分表の国産全粒大豆の蛋白質含量の35.3%は、硫酸銅と硫酸カリウムを接触剤として、標準的なマクロ改良ケルダール法で定量された値である。食品成分表の値と、実験で得た結果を、直ちに、比較することはできないが、両者の値が、ほぼ等しいことから、今回、使用した大豆は、国産の平均的なものであると判断できる。

各条件下での実験結果を比べると、標準条件のセミマイクロ法が、最も高い値を示している。この条件では、

触媒には、最も効率が良いといわれているHgSO₄を加え、蒸留時には、分解フラスコをそのまま用いている。本学の従来の方法と、TCMD装置を用いた方法での結果はほぼ等しく、共にやや低い値を示している。

TCMD装置付属の説明書¹⁰⁾には、標準操作としてH₂O₂を添加しているので、次に、H₂O₂の効果について検討した。

2. 分解に及ぼすH₂O₂の効果

TCMD装置を用いて、H₂O₂および接触剤(K₂SO₄ 9: CuSO₄·5H₂O 1)が、試料の分解に及ぼす影響を及ぼすかを調べるため、学生実験において、20班を6組に分け、420°Cで40分間異なる条件下で、大豆粉末1gを分解させた。結果は、表2に記す。濃硫酸は、すべて10ml用いた。

H₂O₂は、加熱する前に、試料、接触剤、および濃硫酸が入っている分解フラスコに加えられるが、添加と同時に、激しい反応と発熱を伴い危険である。そこで、H₂O₂は、指導者の監視のもと、少量ずつ反応状況をみながら学生に加えさせたが、添加を要した13班すべてが入れ終わるのに、1時間30分以上もかかった。分解時間より前処理に、かなりの時間を要した。

接触剤が3gの場合、H₂O₂の添加量がふえるに従って、蛋白質含量測定値も増加した。H₂O₂は、分解時間を短縮することがわかる。これは、各分解液の色からも判断できる。

一方、5gの接触剤を用いた場合にも、H₂O₂は同様の作用ををすると思われるが、この場合には、接触剤の増加に伴う効果の方が大きく、H₂O₂の添加量を4mlから8mlにふやしても影響しなかった。ただ、8ml添加した方が、データにばらつきがなく、分解は完全である。私達が用いた条件下では、H₂O₂が、分解促進に寄与することは明白である。また、接触剤を5g用いた方が、

表2 分解に及ぼすH₂O₂と接触剤の影響^{a)}

接触剤(g)	H ₂ O ₂ (ml)	蛋白質含量(%) ^{b)}					分解液の色
		1	2	3	4	平均	
3	0	33.5	34.0	34.6	31.0	33.3	褐色
	4	34.6	34.4	33.9	33.5	34.1	黄緑色
	8	34.9	34.8	34.7	—	34.8	淡緑色
5	0	35.0	35.0	34.3	—	34.8	黄緑色
	4	33.2	36.5	36.2	—	35.3	緑色
	8	35.2	35.2	35.2	—	35.2	淡青色

a) 濃硫酸: 10 ml,

接触剤: K₂SO₄ 9: CuSO₄·5H₂O 1

b) 1~4 は、学生実験時の測定値を示す。

一般に蛋白質含量測定値は高くなっており、完全な分解には、多量の接触剤が必要であることがわかる。

これらの結果から、精度の高い蛋白質含量測定値が必要な場合には、TCMD装置では、接触剤 5 g、濃硫酸 10 ml と H₂O₂ 8 ml の存在下、分解すれば良い。しかし、学生実験においては、H₂O₂ 添加時の危険性、添加に要する時間など考慮すれば、H₂O₂ を加えず、接触剤 5 g と濃硫酸 10 ml のみで、十分であると思われる。この条件でも、分解時間をもう少し長くすれば、良い結果が得られることは、分解液の色から推定できる。

3. 触媒の効果

H₂O₂ を用いない場合、触媒の種類が分解にどのような影響を及ぼすかを、HgO、CuSO₄、Se、CuSO₄-TiO₂ の組み合わせの計 4 種類について調べた。先の CuSO₄ を用いた実験では、K₂SO₄ 9: CuSO₄・5H₂O 1 の組成の接触剤を 5 g 使用した時、良い結果が得られたので、接触剤は、すべてほぼ 5 g 用いた。まず、それぞれの組成及び添加した量を、表 3 に示す。

約 1 g を精秤した大豆粉末と、接触剤 I、II、III、IV をそれぞれ別の分解フラスコに入れ、濃硫酸 10 ml を加えて、常法通り TCMD 装置で分解した。分解液は、水で希釈後、蒸留し、定量した。結果は、表 4 に記す。

表 4 の結果から、この条件下でも、HgO が最も効果的な触媒であることがわかる。これは、分解液の色からも推定できたが、Se の場合、分解液を清澄にする効果が大きいので、分解の程度を色でのみ判断するのは、危険である^{28,29)}。続いて、触媒効果は、CuSO₄、Se、CuSO₄-TiO₂ の順に減少する。TiO₂ を含む触媒は、希釈時、不溶性の TiO₂ 水和物をつくるため、定容に際し、ろ過の操作が加わり、めんどうであった。測定値が低いのも、ろ過時に生ずる誤差に起因しているのかもしれない。

表 3 接触剤の組成および量

接触剤	触 媒 (mg)	K ₂ SO ₄ (g)
I a)	HgO 233	5
II b)	CuSO ₄ ・5H ₂ O 500	4.5
III b)	Se 5	5
IV b)	CuSO ₄ ・5H ₂ O 150 TiO ₂ 150	5

a) AOAC マクロケルダール法に準じている。

b) 日本ゼネラル株式会社製ケルダール用分解促進剤に準じている。

II-ケルタブ C

III-ケルタブ S

IV-ケルタブ CT

表 4 触媒の種類による蛋白質含量測定値

触 媒	分解液の色	実験 1		実験 2		平均
		1 a)	2 a)	1 a)	2 a)	
HgO	無 色	34.7	35.3	34.7	34.9	34.9
CuSO ₄	黄緑色	34.4	34.4	34.3	34.2	34.3
Se	黄 色	33.9	34.0	34.3	34.0	34.1
CuSO ₄ -TiO ₂	淡黄色	33.7	34.0	33.6	33.4	33.7

a) 分解後の滴定をそれぞれの実験で 2 回行った。

れない。

触媒として用いる、HgO、CuSO₄、Se、TiO₂ は、いずれも毒性をもつが、特に、水銀の毒性は強く、水俣病にみられるような、大きな社会問題にさえなった。精度の高い結果が必要な場合には、HgO の使用が望ましいが、環境汚染を考慮して、それにかわる触媒の研究は、最近、特に盛んである^{22-24, 30, 31)}。

学生実験では、毒性の少ない CuSO₄ の使用で十分であると思われる。

4. 結 論

前述のように本学の従来の方法と、TCMD 装置を用いた方法による蛋白質含量測定値は、ほぼ等しかった。しかし、前者の条件では、非常に分解時間が長くなり、また、分解時における発泡、加熱の仕方などの注意が必要であった。TCMD 装置の使用によって、これらの問題点が解決されており、極めて有益である。

この装置を学生実験に用いて、大豆を分解する時は、「大豆粉末 1 g に対し、接触剤 (K₂SO₄ 9: CuSO₄・5H₂O 1) 5 g と濃硫酸 10 ml を加えて、420°C で 40 分間分解すれば良い。」但し、精度の高い結果が必要な場合には、H₂O₂ を加えたり、あるいは、毒性は強いが金属水銀または、水銀化合物を添加したり、分解時間を多少延長するなどの考慮が必要となる。

実 験

試料は、市販の昭和 56 年産、丹波産の鶴の子大豆を、Tecator 社製の高速粉碎機サイクロテック (16 メッシュ) によって粉末にして用いた。濃硫酸、硫酸カリウム、各種触媒などは、市販品 (1 級あるいは特級) を使用した。H₂O₂ (特級) は、三徳化学工業株式会社から購入し用いた。

標準条件

文献⁹⁾記載の方法に従い、大豆粉末約 0.078 g (N と

して約 4 mg を含有する) を精秤し, 接触剤 (HgSO_4 3: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4: K_2SO_4 40) 1.5g, 濃硫酸 5ml とともに分解フラスコに入れ, 直火式ケルダール分解台を用いて, 約 2 時間加熱した。放冷後, 無機塩類が析出しないうちに水で希釈し, 30% 水酸化ナトリウム, 硫化カリウム-水酸化ナトリウム溶液, 硫酸銅を分解フラスコに順次加え, そのまま窒素蒸留装置(マクロ)に接続して, NH_3 を遊離させ, 常法により定量した。

本学で従来用いていた条件

条件は, 表 1 に記載の通りで, 試料および試薬を分解フラスコに入れ, 直火式ケルダール分解台を用いて, 8 時間加熱沸騰させた。分解液は, 100 ml に水で定容後, その一部をパルナスの装置を用いて蒸留し, 常法通り定量した。

TCMD装置使用の条件

装置は, Tecator 社製, 1015型 Digestion System 20 を用いた。一般分解条件は, 表 1 に記載の条件を設定し, 試料および試薬を分解フラスコに入れ, 420°C で 40 分間分解を行った。但し, 酸化剤(H_2O_2)は, 使用しなかった。分解液のその後の操作は, 上記, 本学で従来用いていた条件に準じた。

H_2O_2 添加の効果を調べた実験では, 表 2 に記載した試料および試薬を分解フラスコに入れ, 加熱する前に, 4 ml または 8 ml の H_2O_2 を, 少量ずつ加えた。

また, 触媒の効果の検討では, H_2O_2 を添加せず接触剤を除いては, 一般分析条件を用いた。この時の接触剤は, HgO , CuSO_4 , Se , $\text{CuSO}_4 \cdot \text{TiO}_2$ の組み合わせの 4 種類を用いたが, 触媒の組成及び量は, 表 3 に記した。

本研究にあたり, 多大な御指導を賜りました本学家政学部谷本岩夫教授に深く感謝いたします。

参考文献および注

- 1) R.B. Bradstreet, Chem. Rev., **27**, 331, (1940).
- 2) P.L. Kirk, "The Chemical Determination of Proteins," in "Advances in Protein Chemistry," ed by M.L. Anson and J.T. Edsall, Academic Press, New York (1947), vol **3**, p. 139.
- 3) 医歯薬出版株式会社編, "四訂 日本食品成分表" 医歯薬出版株式会社 (1981) p. 14.
- 4) (a) W. Horwitz, ed., "Official methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists" 13th edition, Association of Official Analytical Chemists, Washington, 1980, p. 15;
- (b) *ibid.*, p. 127.
- 5) 満田久輝, 千葉英雄, "新改版 農芸化学実験書 (増補)" 第 2 巻 京都大学農学部農芸化学教室編, 産業図書 (1980) p. 518.
- 6) 永原太郎, 岩尾裕之, "食品分析法", 柴田書店 (1962) p. 88.
- 7) 稲垣長典, 岡崎正一, "食品化学実験" 第 2 版 (増刷) 医歯薬出版株式会社 (1969) p. 75.
- 8) 神立誠, "最新食品分析法", 同文書院 (1976) p. 81.
- 9) 藤原耕三, "精選実験-25 シリーズ食品学実験-25" 大西正三編, 医歯薬出版株式会社 (1979) p. 20.
- 10) Tecator 社の日本総代理店, 日本ゼネラル株式会社発行の取扱説明書に記載の大豆カスの分解条件を用いた。
- 11) R.B. Bradstreet, Anal. Chem., **29**, 944 (1957).
- 12) P.A.W. Self, Pharm. J., **88**, 384 (1912).
- 13) J.M. Concon and D. Soltess, Anal. Biochem., **53**, 35 (1973).
- 14) D.W. Nelson and L.E. Sommers, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **63**, 770 (1980).
- 15) R.B. Bradstreet, Anal. Chem., **26**, 185 (1954)
- 16) P.L. Kirk, Anal. Chem., **22**, 354 (1950).
- 17) H.W. Gerritz and J.L. St. John, Anal. Chem., **7**, 380 (1935).
- 18) F.M. Stubblefield and E.E. DeTurk, Anal. Chem., **12**, 396 (1940).
- 19) A.V. Barker and R.J. Volk, Anal. Chem., **36**, 439 (1964).
- 20) C.H. Perrin, Anal. Chem., **25**, 968 (1953).
- 21) R.B. Bradstreet, Anal. Chem., **12**, 657 (1940).
- 22) P.R. Rexroad, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **56**, 862 (1973).
- 23) P.R. Rexroad and R.D. Cathey, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **59**, 1213 (1976).
- 24) P.R. Rexroad and G.F. Krause, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **61**, 299 (1978).
- 25) G.L. Miller and E.E. Miller, Anal. Chem., **20**, 481 (1948).
- 26) L.G. Hambleton and R.J. Noel, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **58**, 143 (1975).
- 27) Tecator Application Note, AN 30/81 (May, 1981) Tecator AB, Höganäs, Sweden.
- 28) R.L. Shirley and W.W. Becker, Anal. Chem., **17**,

- 437 (1945).
29) S.M. Patel and A. Sreenivasan, *Anal. Chem.*, **20**,
63 (1948).
30) W. Glowa, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **57**, 1228
(1974).
31) R. Odland, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **55**, 984
(1972).