

# 辛子めんたいこ中の発色剤の分析に伴う測定不確かさの推定

佐多建一・菅弘樹・宮崎悦子

福岡市保健環境研究所保健科学課

## Estimation of Measurement Uncertainty Arising from Analysis of Nitrite as a Color Fixative in Spicy Cod Roe

Kenichi SATA, Hiroki KAN and Etsuko MIYAZAKI

Health Science Section, Fukuoka City Institute of Health and Environment

### 要約

測定不確かさは、分析により明らかにしようとする値である真値が存在する範囲を示すものであり、この推定値により分析値の品質を定量的に示すことができる。福岡市では、福岡市食品衛生監視指導計画において、特産品である辛子めんたいこの衛生対策を重点項目としており、他の食品と比較して多くの検体の収去検査を行っている。保健環境研究所では、発色剤としての亜硝酸根の検査において、分析結果の信頼性確保のため、検査毎に原材料のたらこの基準値相当 (0.0050 g/kg) の亜硝酸ナトリウムの標準品を添加して、添加回収試験を実施している。そこで、平成29年度から令和3年度までの間に実施した添加回収試験のデータを用いて、トップダウンアプローチによる、辛子めんたいこ中の亜硝酸根分析における測定不確かさの推定を行った。

解析の結果、添加回収試験の分析値に付随する拡張不確かさは0.00044 g/kgであり、平均値0.0044 g/kgに拡張不確かさを考慮した分析値の範囲は0.0039~0.0048 g/kgであった。拡張不確かさ0.00044 g/kgは、CAC/GL 54-2004「測定の不確かさに関するガイドライン」から予測される拡張不確かさの下限值0.0011 g/kgよりも小さかった。この結果から、当所における辛子めんたいこ中の亜硝酸根分析法により得られた分析値は妥当であると考えられた。

**Key Words** : 辛子めんたいこ spicy cod roe, 測定不確かさ measurement uncertainty, 発色剤 color fixative, トップダウンアプローチ top-down approach

### 1 はじめに

収去検査に代表される食品の規格基準の適合判定を目的とする検査において、分析値の品質を保証することは重要である。食品衛生法に基づく検査における品質保証の指針となる「食品衛生検査施設における検査等の業務管理要領」<sup>1)</sup>では、検査の信頼性を確保するため、精度管理及び外部精度管理等の結果に基づいた不確かさの評価の検討に努めることが求められている。測定の不確かさは、分析により明らかにしようとする値である真値が存在する範囲を意味している。言い換えれば、測定の不確かさは分析値が分布する範囲を示すパラメータであり、この値が小さければ、真値が狭い範囲に存在することになり、分析値に基づく基準適合等の判断をより正しく行うことができる。よって、不確かさを推定すること

によって分析値の品質を定量的に示すことが可能になる。

亜硝酸ナトリウムは発色剤として使用が認められている食品添加物であり、いくら、すじこ及びたらこにおける食品衛生法上の使用基準は、亜硝酸根としての最大残存量が、0.0050 g/kg以下と定められている。福岡市では、福岡市食品衛生監視指導計画において、市の特産品である辛子めんたいこの衛生対策を重点監視項目としており、毎年約40検体(毎年の総検体数の約5~16%)と、他の食品に比べ多くの検体の検査を実施してきた。保健環境研究所では、辛子めんたいこ中の亜硝酸根の分析結果の信頼性を確保するため、収去検査に際し、検査毎に2併行の添加回収試験を実施してきたことから、この結果を用いて測定不確かさの推定を行うこととした。

不確かさの一般的な評価方法としては、ボトムアップ

アプローチ及びトップダウンアプローチがある。ボトムアップアプローチは分析の工程ごとに不確かさの要因を評価し、積み上げることによって測定不確かさを評価する方法だが、食品の理化学検査では試料の多様さや前処理工程の複雑さから、要因ごとの単独評価が難しく、ボトムアップアプローチによる評価は困難である。一方、トップダウンアプローチは、再現精度の値等を用いる統計処理を用いて不確かさを評価する方法であり、食品添加物の検査結果の評価に用いることができる。そこで、これら添加回収試験のデータを用いて、トップダウンアプローチによる辛子めんたいこ中の亜硝酸根分析における測定不確かさの推定を行ったので結果を報告する。

## 2 実験方法

### 2.1 期間及び試料

平成 29 年度から令和 3 年度までの 5 年間に実施した収去検査において、検査日毎に福岡市内製造の辛子めんたいこから 1 検体を選択し、亜硝酸ナトリウムの標準品を添加したものを試料とした。検査は 1 日 1 検体 2 併行で行い、平成 29 年度に 5 日間、平成 30 年度に 4 日間、平成 31 年度（令和元年度）に 3 日間、令和 2 年度に 7 日間、令和 3 年度に 3 日間の計 22 日間実施した。

### 2.2 標準品及び試薬

亜硝酸ナトリウム標準原液：富士フィルム和光純薬（株）製の特級亜硝酸ナトリウム 150 mg を蒸留水に溶解し、正確に 100 mL とした（亜硝酸根として 1,000 µg/mL）。

添加用亜硝酸ナトリウム標準溶液：亜硝酸ナトリウム標準原液 5 mL に蒸留水を加えて正確に 100 mL とした（亜硝酸根として 50 µg/mL）。

その他試薬等については、第 2 版食品中の食品添加物分析法に記載の比色法<sup>2)</sup>（以下、「比色法」とする。）の調製方法に従って調製した。

### 2.3 装置

（株）島津製作所製紫外可視分光光度計 UVmini-1240

### 2.4 添加量の設定

たらこの成分規格値相当である 0.0050 g/kg とするよう、添加した。

### 2.5 試料液の調製及び測定方法

検体の辛子めんたいこ 10 g を量り採り、亜硝酸根濃度が 0.0050 g/kg とするよう添加用亜硝酸ナトリウム標準溶

液 1 mL を添加し、添加回収試験用試料とした。この試料をアルカリ性条件下にて抽出し、酢酸亜鉛を加えて除タンパクを行った後ろ過し、試料液とした。試料液をスルファニルアミド及びナフチルエチレンジアミンを用いて発色後 20 分静置し、波長 540 nm の吸光度を測定した。

## 3 実験結果及び考察

### 3.1 添加回収試験結果

22 日間にわたり実施した、1 日 2 併行の添加回収試験の結果を表 1 に示す。2 併行分析から得られた濃度の平均値を求め、添加濃度に対する割合から平均回収率を求めた。また、分析により得られた濃度の総平均値を求め、添加濃度に対する割合から真度を求めた。その結果、回収率は 78～96%（0.0039～0.0049 g/kg）であり、濃度の総平均値は 0.0044 g/kg、真度は 87%であった。回収率は、精度管理の一般ガイドライン<sup>3)</sup>の目標値である 70～120%の範囲内であった。

表 1 添加回収試験結果

No.	n1 (g/kg)	n2 (g/kg)	平均値 (g/kg)	平均回収率 (%)
1	0.0042	0.0044	0.0043	86
2	0.0041	0.0043	0.0042	85
3	0.0045	0.0045	0.0045	90
4	0.0042	0.0041	0.0042	84
5	0.0046	0.0046	0.0046	92
6	0.0040	0.0040	0.0040	81
7	0.0044	0.0044	0.0044	88
8	0.0042	0.0046	0.0044	89
9	0.0043	0.0045	0.0044	88
10	0.0043	0.0043	0.0043	86
11	0.0044	0.0042	0.0043	86
12	0.0042	0.0043	0.0042	85
13	0.0039	0.0039	0.0039	78
14	0.0041	0.0041	0.0041	82
15	0.0044	0.0044	0.0044	88
16	0.0046	0.0046	0.0046	92
17	0.0044	0.0045	0.0045	89
18	0.0046	0.0046	0.0046	92
19	0.0045	0.0044	0.0045	89
20	0.0044	0.0042	0.0043	86
21	0.0046	0.0046	0.0046	91
22	0.0049	0.0048	0.0048	96

総平均値 0.0044 g/kg

真度 87%

### 3.2 不確かさの推定

添加回収試験から得られた結果をヒストグラムに示した(図1)。分析値は正規分布しているとみなし、トップダウンアプローチを用いて不確かさの推定を行った。

一元配置の分散分析を行い、分散を V、1日当たりの試行回数を N として併行標準偏差 ( $\sigma_{併行}$ )、日間標準偏差 ( $\sigma_{日間}$ )、それらを合成した室内標準偏差 ( $\sigma_{室内}$ ) を以下の式を用いて算出した。その結果を表2及び表3に示す。

$$\text{併行標準偏差 } \sigma_{併行} = \sqrt{V_{併行}}$$

$$\text{日間標準偏差 } \sigma_{日間} = \sqrt{(V_{日間} - \sigma_{併行}^2) / N}$$

$$\text{室内標準偏差 } \sigma_{室内} = \sqrt{\sigma_{併行}^2 + \sigma_{日間}^2}$$

さらに、各標準偏差の値から併行分析のばらつき RSD<sub>併行</sub>、日間のばらつき RSD<sub>日間</sub>、試験所内でのばらつき RSD<sub>室内</sub> を算出した。また、標準不確かさを  $u = \sigma_{室内}$  とし、 $\sigma_{室内}$  の自由度が 20 を超えているため、正規分布に基づく包括係数  $k = 1.96$  を用いて  $U = k \times u$  の式に従い、拡張不確かさ (U) を算出した(表4)。

併行分析のばらつき RSD<sub>併行</sub> は 2.3% であり、日間のばらつき RSD<sub>日間</sub> は 4.6%、試験所内でのばらつき RSD<sub>室内</sub> は 5.1% であった。拡張不確かさは 0.00044 g/kg であり、拡張不確かさを考慮した分析値の範囲は 0.0039~0.0048 g/kg であった。

CAC/GL 54-2004「測定の不確かさに関するガイドライン」<sup>4)</sup>によると、共同試験からの室間再現標準偏差を使用した化学分析に関して、試験所が報告する拡張不確かさの予測値は、名目濃度 0.01 g/kg においては 22%、0.001 g/kg においては 32% とされている。添加濃度 0.0050 g/kg はこの範囲内にあることから、この分析における拡張不確かさの予測値の範囲は 22~32% (0.0011~0.0016 g/kg) と考えられる。実際の分析値から算出した拡張不確かさ 0.00044 g/kg は予測値の下限 (0.0011 g/kg) より小さかった(表5)。定期的に特定の分析を行っている極めて経験豊かな試験所では、得られる不確かさの値は予測値よりも小さいとされており、当所の辛子めんたいこ中の亜硝酸根の分析についても、同様に多くの検査経験によるものと考えられる。

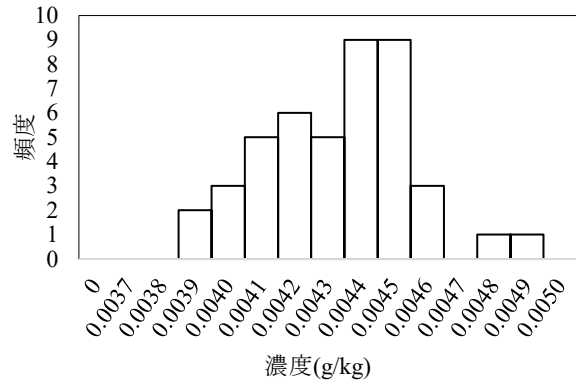


図1 添加回収試験から得られた分析値のヒストグラム

表2 分散分析表

変動要因	偏差平方和	自由度	分散
併行	2.2E-07	22	1.0E-08
日間	1.9E-06	21	8.9E-08

表3 各要因の標準偏差

	NO <sub>2</sub>
併行標準偏差 $\sigma_{併行}$ (g/kg)	0.00010
日間標準偏差 $\sigma_{日間}$ (g/kg)	0.00020
室内標準偏差 $\sigma_{室内}$ (g/kg)	0.00022

表4 各変動要因の分析値のばらつき及び拡張不確かさ

項目	NO <sub>2</sub>
併行分析でのばらつき RSD <sub>併行</sub> (%)	2.3
日間のばらつき RSD <sub>日間</sub> (%)	4.6
試験所内でのばらつき RSD <sub>室内</sub> (%)	5.1
拡張不確かさ(g/kg)	0.00044
拡張不確かさを考慮した分析値の範囲(g/kg)	0.0039~0.0048

表5 共同試験からの室間再現標準偏差を使用した拡張不確かさの予測値

濃度(g/kg) : 0.0050	
拡張不確かさの予測値の範囲(%)	22~32
拡張不確かさの予測値の範囲(g/kg)	0.0011~0.0016

### 3.3 Horwitz 式に基づき予測される値との比較

分析法やマトリクス、分析対象となる化合物に依存せず、濃度による分析値のばらつき（標準偏差）を予測するための経験式として Horwitz 式が知られている<sup>5)</sup>。Horwitz 式において、濃度 C における室間再現精度の予測値（標準偏差） $\hat{\sigma}_R$  及び室間再現相対標準偏差の予測値（PRSD<sub>R</sub> (%) ; predicted reproducibility relative standard deviation) は次式を用いて求められる。

$$\hat{\sigma}_R = 0.02C^{-0.8495}$$

$$\text{PRSD}_R (\%) = 2C^{-0.1505}$$

亜硝酸根の添加濃度 0.0050 g/kg における Horwitz 式による予測値は表 6 のとおりである。一般的に、 $\sigma_{\text{室内}} < \hat{\sigma}_R$  と考えられるが、添加回収試験から求めた室内標準偏差  $\sigma_{\text{室内}}$  0.00022 g/kg と試験所内でのばらつき (RSD<sub>室内</sub>) 5.1% はいずれも予測値より小さい値であった。

表 6 Horwitz 式による予測値

濃度(g/kg) : 0.0050	
室間再現精度予測値 $\hat{\sigma}_R$ (g/kg)	0.00063
室間再現相対標準偏差予測値 PRSD <sub>R</sub> (%)	13

CAC/GL 72-2009「分析用語に関するガイドライン」<sup>6)</sup>によると、実際の値から推定した併行相対標準偏差(RSD<sub>併行</sub>) と、Horwitz の式を用いて算出した室間再現相対標準偏差の予測値 (PRSD<sub>R</sub>) との比 HorRat (r) は次式を用いて求められる。

$$\text{HorRat} (r) = \text{RSD}_{\text{併行}} / \text{PRSD}_R$$

亜硝酸根の添加濃度 0.0050 g/kg における PRSD<sub>R</sub> 値と実際の値から推定した RSD<sub>併行</sub> との比として HorRat (r) を計算した結果 0.2 であった。試験室内試験に適用する場合、HorRat (r) は一般的に 0.3~1.3 の範囲であるとされており、1.3 を超える場合、分析値のばらつきが通常予想されるより大きいと解される一方で、0.3 より小さい場合、分析値の作為的な操作等の疑いがあるとされている<sup>7)</sup>。しかし、このような例はケルダール法の室間共同試験でも見られ、ケルダール法が測定者や測定機器が異なる試験室間でも測定値がほとんど変わらない再現性の高い測定法であるためと考えられている<sup>8)</sup>。当所における結果も同様に、吸光度法が再現性の高い測定法であることから、HorRat 値が 0.3 を下回ったと考えられた。

以上の結果から、当所における辛子めんたいこ中の亜硝酸根分析法からは妥当な分析値が得られていると考えられた。

## 4 まとめ

辛子めんたいこ中の亜硝酸根の分析について、日常的な分析値の品質管理として 22 日間で実施した添加回収試験から得られたデータを用いてトップダウンアプローチによる拡張不確かさの推定を行った。その結果、当所における辛子めんたいこ中の亜硝酸根の分析値に付随する拡張不確かさは 0.00044 g/kg と推定され、拡張不確かさを考慮した分析値の範囲は 0.0039~0.0048 g/kg であった。算出した拡張不確かさは、共同試験からの室間再現標準偏差を使用した予測値より小さい値であった。また、当所で得られた室内標準偏差  $\sigma_{\text{室内}}$  と試験所内でのばらつき RSD<sub>室内</sub> は Horwitz 式から予測される値と比較して小さかった。

以上の結果から、当所における辛子めんたいこ中の亜硝酸根における分析値の信頼性を定量的に説明することが可能になるとともに、妥当な分析値が継続して得られていると考えられた。

## 文献

- 1) 厚生省生活衛生局食品保健課長通知衛食第 8 号：別紙食品衛生検査施設における検査等の業務管理要領，平成 9 年 1 月 16 日
- 2) 厚生省生活衛生局食品化学課長通知衛化第 15 号：別添第 2 版食品中の食品添加物分析法，平成 12 年 3 月 30 日
- 3) 厚生省生活衛生局食品保健課長通知衛食第 117 号：別添精度管理の一般ガイドライン，平成 9 年 4 月 1 日
- 4) CAC/GL 54-2004 “測定の不確かさに関するガイドライン”，2004
- 5) William Horwitz : The certainty of uncertainty, J. AOAC Int., 86, 109~111, 2003
- 6) CAC/GL 72-2009 “分析用語に関するガイドライン”，2009
- 7) 農林水産省：分析法の妥当性確認に関するガイドライン，2019
- 8) Nozawa Shintaro, *et al.* : Method performance Study of the Determination of Total Nitrogen in Soy Sauce by the Kjeldahl Method, *Anal. Sci.*, 21, 1129, 2005