

鯨肉製品中の亜硝酸根試験法の妥当性確認

小出石千明・佐多建一・栗屋真紀・大木望・
永井里苗・江副サハラ・坂本智徳

福岡市保健環境研究所保健科学課

Validation of an Analytical Method for Nitrite in Whale Meat Products

Chiaki ODEISHI, Kenichi SATA, Maki AWAYA, Nozomi Oki,
Satomi NAGAI, Sahara EZOE and Tomonori SAKAMOTO

Health Science Section, Fukuoka City Institute of Health and Environment

要約

食品中の食品添加物分析法については、「食品中の食品添加物分析法について」（平成 12 年 3 月 30 日付け衛化第 15 号厚生省生活衛生局食品化学課長通知）の別添「第 2 版 食品中の食品添加物分析法」により定められている。今般、「食品中の食品添加物分析法の妥当性確認ガイドライン」（令和 6 年 3 月 8 日付け健生食基発 0308 第 1 号・健生食監発 0308 第 1 号 厚生労働省健康・生活衛生局食品基準審査課長・食品監視安全課長通知）が策定され、各試験所で導入している試験法についても、当該ガイドラインに示される性能の基準を満たせば、「第 2 版 食品中の食品添加物分析法」に定められた分析法の代わりに用いることができるとされた。そこで、福岡市保健環境研究所で実施する鯨肉製品中の亜硝酸根試験法について、当該ガイドラインに基づき妥当性確認を実施した結果、選択性は良好で、真度は 95%，併行精度は 1.3 RSD%，室内精度は 2.3 RSD%とガイドラインの性能基準を満たしており、本試験法の妥当性が確認された。

Key Words : 亜硝酸根 nitrite, 鯨肉製品 whale meat product, 妥当性確認 validation

令和 6 年 3 月 8 日付け健生食基発第 1 号・健生食監発第 1 号厚生労働省健康・生活衛生局食品基準審査課長及び食品監視安全課長通知

1 はじめに

日本では、鯨肉製品のうち鯨肉ベーコンは、発色剤として亜硝酸ナトリウム、硝酸ナトリウム及び硝酸カリウムの使用が認められている。その使用基準は、亜硝酸ナトリウムについては、「亜硝酸根としてその 1 kg につき 0.070 g を超える量を残存しないように使用しなければならない」、硝酸ナトリウム及び硝酸カリウムについては、「亜硝酸根として、その 1 kg につき 0.070 g 以上残存しないように使用しなければならない」と定められている¹⁾。

これら使用基準への適合を判定するための分析法については、平成 12 年 3 月 30 日付け衛化第 15 号厚生省生活衛生局食品化学課長通知「第 2 版 食品中の食品添加物分析法」（以下、「通知分析法」とする。）²⁾により定められている。ただし、令和 6 年 3 月 8 日付け

健生食基発 0308 第 1 号・健生食監発 0308 第 1 号 厚生労働省健康・生活衛生局食品基準審査課長・食品監視安全課長通知「食品中の食品添加物分析法の妥当性確認ガイドライン」³⁾（以下、「ガイドライン」とする。）が策定されたことにより、ガイドラインに基づき妥当性が確認された分析法については、通知分析法の代わりに用いることのできる同等以上の性能を有する試験法とみなすこととされた。

亜硝酸根の通知分析法は、ジアゾ化反応を利用した比色法が採用されているが²⁾、福岡市保健環境研究所では、鯨肉製品中の亜硝酸根の試験を、通知分析法に準じた方法で行っている。ガイドラインでは、既存の添加試験データが利用可能な場合はそのデータを用いて性能を評価し、妥当性を確認することが可能とされていることから、今回、過去に実施した鯨肉製品中の亜硝酸根試験法の精度管理データを利用して試験法の

妥当性確認を行ったので報告する。

2 実験方法

2.1 試料

性能評価には、分析対象物質を含まない食品（以下、「ブランク試料」とする。）を用いることとされているが、今回性能評価の対象とした鯨肉製品（鯨肉ベーコン）については、発色剤として亜硝酸ナトリウム、硝酸ナトリウム及び硝酸カリウムのいずれも使用していないものを準備することが困難であったため、分析対象物質濃度の低い試料（以下、「トレース試料」とする。）として、亜硝酸ナトリウムが使用された鯨肉ベーコンを用いた。

2.2 標準品及び試薬

標準品：富士フィルム和光純薬（株）製亜硝酸ナトリウム（特級）を用いた。

亜硝酸ナトリウム標準原液：標準品 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 1000 µg/mL）。

添加用亜硝酸ナトリウム標準溶液：標準品 105 mg を蒸留水に溶解し、正確に 100 mL とした（亜硝酸根として 700 µg/mL）。

検量線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 10 mL を正確に量り、蒸留水で正確に 100 mL とした（100 µg/mL）。この液 1 mL を正確に量り、蒸留水を加えて正確に 100 mL とした（1 µg/mL）。この液 0.5 mL，1 mL，2 mL，4 mL，6 mL 及び 8 mL を正確に量り、それぞれ正確に 20 mL とした（亜硝酸根として 0.025 µg/mL，0.05 µg/mL，0.1 µg/mL，0.2 µg/mL，0.3 µg/mL 及び 0.4 µg/mL）。

0.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム（特級）20 g を蒸留水に溶かして 1 L とした。

酢酸亜鉛溶液（9→100）：酢酸亜鉛二水和物（特級）107.7 g を蒸留水に溶かして 1 L とした。

塩酸（1→2）：塩酸（特級）50 mL を蒸留水と混合し、100 mL とした。

スルファニルアミド溶液：スルファニルアミド（特級）0.25 g を塩酸（1→2）50 mL に加温しながら溶解した。

ナフチルエチレンジアミン溶液：N-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩（特級）0.06 g を蒸留水 50 mL に溶解した。

2.3 器具及び装置

ろ紙：アドバンテック東洋（株）製 No. 5A，18.5 cm
紫外可視分光光度計：（株）島津製作所製 UVmini-1240

蒸留水製造装置：アドバンテック東洋（株）製 RFD240ND

恒温水槽：ヤマト科学（株）製サーモメイト BF200
ホモジナイザー：（株）セントラル科学貿易製ポリトロロン PT3100

水道水に含まれる硝酸根による影響を除くため、試験に使用するガラス器具類は、全て事前に蒸留水ですすいだものを使用した。

2.4 試験溶液の調製

2.4.1 試料試験溶液

試料 10 g を 200 mL のトールビーカーに量り、80℃～90℃の蒸留水 80 mL 及び 0.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 12 mL を加え、直ちにホモジナイズ（10000 rpm，2 分間）した。ホモジナイザーのシャフトを 80～90℃の蒸留水 1 mL で 3 回洗い、洗液を 200 mL トールビーカーに加えた。200 mL トールビーカーの内容物を全て 200 mL のメスフラスコに移し、トールビーカーを 80～90℃の蒸留水 10 mL で 5 回洗い、洗液をメスフラスコに加えた。これに 0.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 20 mL を加えて混和後、さらに、酢酸亜鉛溶液（9→100）20 mL を加えて混和し、80～90℃の水浴中で 20 分間加温した。氷水中で 10 分間以上冷却した後、蒸留水で正確に 200 mL としたものをろ紙ろ過し、ろ液を蒸留水で正確に 2 倍希釈し、試料試験溶液とした。

2.4.2 添加回収試験溶液

添加回収用試料としては、トレース試料である鯨肉ベーコン 10 g に、使用基準値相当 0.070 g/kg となるよう、添加用亜硝酸ナトリウム標準溶液を 1 mL 添加したものを作製し、試料試験溶液と同様に操作し、ろ液を蒸留水で 20 倍希釈したものを添加回収試験溶液とした。

2.4.3 空試験溶液

試料 10 g の代わりに水 10 mL を用い、試料試験溶液と同様に操作した後、遠心分離（5℃，12000×g，10 分間）し、上清を空試験溶液とした。

2.5 測定方法

2.5.1 検量線用亜硝酸ナトリウム標準溶液

検量線用亜硝酸ナトリウム標準溶液及び蒸留水各 5 mL を正確に量り、それぞれにスルファニルアミド溶液 1 mL ずつを加えて振り混ぜ、さらにナフチルエチレンジアミン溶液 1 mL ずつ加えて振り混ぜた後、蒸留水を

加えて正確に 10 mL とし，よく振り混ぜた．20 分間放置して発色させた後に蒸留水を対照として波長 540 nm における吸光度を測定し，それぞれ A_s 及び A_c とした．検量線用亜硝酸ナトリウム標準溶液の濃度及び A_s と A_c との吸光度差 ΔA_s を一次直線に回帰させ，検量線を作成した．

2.5.2 試料試験溶液，添加回収試験溶液及び空試験溶液

試料試験溶液，添加回収試験溶液及び空試験溶液を各 5 mL 正確に量り，それぞれにスルファニルアミド溶液 1 mL ずつを加えて振り混ぜ，さらにナフチルエチレンジアミン溶液 1 mL ずつを加えて振り混ぜた後，蒸留水を加えてそれぞれ正確に 10 mL とし，よく振り混ぜた．20 分間放置して発色させた後に蒸留水を対照として波長 540 nm における吸光度を測定し，それぞれ A_{Ta} 及び A_b とした．

また，着色ブランクとして，各試験溶液 5 mL を正確に量り，これに塩酸 (1→2) 1 mL 及び蒸留水を加えて正確に 10 mL とし，蒸留水を対照として波長 540 nm における吸光度を測定し， A_{Tc} とした．

吸光度の差 ΔA ($A_{Ta} - (A_b + A_{Tc})$) を求め，検量線から，試験溶液中の亜硝酸根の濃度を求めた．なお， A_{Tc} がマイナスである場合は 0 として計算した．

2.6 妥当性確認の方法

ガイドラインに基づき妥当性確認を実施した．検査員 5 名が，1 日 2 併行で添加回収試験を行った精度管理データを用いて，選択性，真度，併行精度及び室内精度を求め，試験法の性能を評価した．

3 結果及び考察

3.1 検量線

検量線用亜硝酸ナトリウム標準溶液を測定したところ，決定係数 (R^2) 0.999 以上の良好な直線性を示した．

3.2 選択性

2.1 に記載のとおり，トレース試料として亜硝酸ナトリウムを使用した鯨肉ベーコンを用いたが，トレース試料を用いる際には，試験溶液中の分析対象物質により得られる信号強度の目安が，原則として試験物質の添加により得られる信号強度の 10% 未満であることが求められている³⁾．そこで，鯨肉ベーコンを試料として，2.4 及び 2.5 のとおり試験溶液の調製及び測定を行った結果，鯨肉ベーコンの試料試験溶液の吸光度は，亜硝酸ナトリウムを添加した添加回収用試験溶液の吸

光度の 0.6% であった．これは，ガイドラインの目標値である 10% 未満を満たしていたことから，トレース試料として適切であると判断した．なお，着色ブランクの吸光度はマイナスであった．

3.3 真度

妥当性確認の結果を表 1 に示す．添加濃度と比較した真度は 95% であり，ガイドラインの目標範囲である 70～120% を満たしており，良好な結果であった．なお，真度の算出にあたっては，トレース試料の試験溶液の吸光度が検量線の最低濃度より低かったため，令和 6 年 3 月 8 日付け厚生労働省健康・生活衛生局食品基準審査課事務連絡「「食品中の食品添加物分析法の妥当性確認ガイドラインに関する質疑応答集 (Q&A)」の公表について」⁴⁾ を参考に，トレース試料の試験溶液の吸光度を添加回収試験溶液の吸光度から差し引いて計算した．

3.4 精度

表 1 に示すとおり，併行精度が 1.3 RSD%，室内精度が 2.3 RSD% であり，ガイドラインに記載の目標範囲である 10 RSD% 及び 15 RSD% 未満を満たしており，良好な結果であった．選択性，真度及び精度の結果から，本試験法の妥当性が確認された．

表 1 性能評価結果

評価パラメーター	結果	目標値
選択性 (%)	0.6	<10
真度 (%)	95	70～120
併行精度 (RSD%)	1.3	<10
室内精度 (RSD%)	2.3	<15

4 まとめ

ガイドラインに基づき，鯨肉製品中の亜硝酸根試験法の妥当性を確認した．その結果，ガイドラインに示された選択性，真度及び精度の目標値を満たしており，本試験法の妥当性が確認された．今後は，鯨肉製品以外の食品についても本試験法の妥当性を確認していく予定である．

文献

- 1) 厚生省告示第 370 号：食品，添加物等の規格基準，昭和 34 年 12 月 28 日

- 2)厚生省生活衛生局食品化学課長通知 衛化第 15 号：
食品中の食品添加物分析法について 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)厚生労働省健康・生活衛生局食品基準審査課長及び
厚生労働省健康・生活衛生局食品監視安全課長通知
健生食基発 0308 第 1 号及び健生食監発 0308 第 1 号
：「食品中の食品添加物分析法の妥当性確認ガイドラ
イン」，令和 6 年 3 月 8 日
- 4)厚生労働省健康・生活衛生局食品基準審査課事務連
絡：「食品中の食品添加物分析法の妥当性確認ガイ
ドラインに関する質疑応答集（Q&A）」の公表につ
いて，令和 6 年 3 月 8 日