

論文

照射鶏肉の炭化水素法及びESR法による検知

後藤典子^{*1)} 田辺寛子^{*1)} 宮原 誠^{*2)}

Detection of irradiated chicken by hydrocarbon and ESR methods

Michiko GOTO^{*1)}, Hiroko TANABE^{*1)} and Makoto MIYAHARA^{*2)}

Abstract Chicken meat with bone was irradiated by gamma rays at -19~10 °C. Both amounts of hydrocarbons formed from fatty acids and intensity of ESR signals in bone fragments were measured. Very good correlation was found between the amount of hydrocarbons and the intensity of ESR signals.

The amount of hydrocarbons (C_n-2:1), had 2 carbon atoms less than the original fatty acids and an additional double bond, was almost constant irrespective of the irradiation temperature. The amount of hydrocarbons (C_n-1:0), had 1 carbon atom less than the original fatty acids, increased as the irradiation temperature raised. As the ratio between corresponding fatty acids, the ratio between hydrocarbons (C_n-2:1) is a suitable index in the detection of the irradiation. On the contrary, the ratio of hydrocarbons from the same fatty acid, (C_n-2:1)/(C_n-1:0), varied according to the kind of fatty acid and temperature used at irradiation.

It was found that under the irradiation temperature of -19~10 °C, the intensity of ESR signals of bone is not affected by the irradiation temperature.

Keywords Food irradiation, Chicken, Identification, Hydrocarbons, ESR, Irradiated temperature, Gamma irradiation, Gas chromatography(GC), Gas chromatography/mass spectrometry(GC/MS)

1. はじめに

食肉および肉加工食品への放射線照射処理は、大腸菌 O-157 やサルモネラ菌による食中毒対策として注目されている。米国ではFDAが1997年12月に赤身肉の照射処理を認可し、食肉照射基準を発表した。これを受けて1999年12月に米国農務省は、生肉、冷凍肉および肉加工食品への放射線照射時の実施規則の改正を完了し、「照射済み」の表示を義務づけた。この規則は2000年2月から施行された。また、フランス、南アフリカ、タイでは食肉や肉加工品への放射線照射が行われている。

このような現状から、肉類の放射線照射に関する精度の良い検知法の確立が求められている。今日までヨーロッパ基準として、脂肪からの照射生成物を対象とする炭化水素法¹⁾ (以下「ヨーロッパ基準(炭化水素法)」

という。)とシクロブタノン法²⁾、骨を対象とするESR法³⁾が規定されている。しかし、脂肪の放射線分解の結果生成する炭化水素は、一部のものは加熱処理によっても生成すると言われ、器具の洗浄不良、試薬の管理不良、試験環境等の原因で混入する可能性もある。

炭化水素法による検知、および炭化水素生成における温度影響についても、興味ある結果を得たので報告する。また、同一の骨付き鶏肉を試料として、炭化水素法とESR法での検知を比較し、炭化水素法の実用性を検討することを目的とした。

我々はすでにESR法による線量付加法を調べ、照射経歴の不明な試料の線量を推定する方法を確立した⁴⁾。しかし、この方法に対する温度影響については未検討であったので、今回この点も検討した。

*1) 精密分析技術グループ

*2) 国立医薬品食品衛生研究所

2. 実験方法

2.1 試料調製・照射

世田谷区内のスーパーで、同じ種類の骨付き手羽もと肉を購入し、骨と肉を分離した。肉部分から脂肪含量の高い皮を分別し炭化水素法の試料とし、骨をESR法の試料とした。それぞれの試料を別々の共栓試験管に入れ、 ^{60}Co で0.5kGy~10kGy照射した。線量率は3.0~3.2kGy/hであった。照射時の温度設定は次の4条件とした。

- 19 (温度範囲; -20~-18, 寒剤重量比; 氷:NaCl=100:33)

- 10 (温度範囲; -11~-9, 寒剤重量比; 氷:KCl=80:20)

1 (温度範囲; 0~2, 氷冷)

10 (温度範囲; 9.5~10.5, 水冷)

2.2 炭化水素の定量

ヨーロッパ基準(炭化水素法)に若干の改良を加えた方法で定量した。

2.2.1 試薬

・n-ヘキサン: 残留農薬用。
・無水硫酸ナトリウム: 試薬特級。550 で1晩加熱後、冷却し、使用した。

・フロリジル: 550 で1晩加熱後、ただちに共栓三角フラスコに分取し、放冷後水分濃度3%(w/w)まで蒸留水を加え、良く攪拌して1時間放置したものを使用。使用の都度調整した。

・炭化水素: 以下、ガスクロマトグラフ(GC)用標準物質。

n-テトラデカン(C14:0)

1-テトラデセン(1-C14:1)

n-ペンタデカン(C15:0)

n-ヘキサデカン(C16:0)

1-ヘキサデセン(1-C16:1)

n-ヘプタデカン(C17:0)

n-エイコサン(C20:0, 内部標準)

以下、照射食品検知用標準物質。

1,7-ヘキサデカジエン(1,7-C16:2)

8-ヘプタデセン(8-C17:1)

以下、炭化水素を括弧内に示したように記す。

2.2.2 炭化水素の抽出・分離

照射後、鶏肉15~20gを細かく切り、無水硫酸ナトリウム30gと混ぜてからヘキサン100mlを加え、250mlフラスコで5時間還流して脂肪を抽出した。このヘキサン溶液を100ml共栓試験管に移し、新鮮なヘキサンを添加

し全量を100mlとした後、無水硫酸ナトリウム(10~15g)を加え、1晩放置した。

105 で乾燥し、恒量にした蒸発皿にヘキサン抽出液5mlを入れ、ヘキサンを自然蒸発させた。次いでこの蒸発皿をデシケータ中で30分間減圧乾燥した。空の蒸発皿重量とヘキサンを蒸発・乾燥した蒸発皿重量の差から、ヘキサン抽出液5mlの脂肪含量を求めた。

脂肪1gに相当するヘキサン抽出液を分取し、ロータリーエバポレータを使用して(40, 約25KPa), 数mlにまで濃縮した。濃縮液に内部標準溶液(4.0 µg/mlのC20:0)を1ml加え、フロリジルカラム(直径20mm, フロリジル20g)に添加した後、ヘキサンを1分間に3mlの速さで流下させ炭化水素を分離した。初出の流出液60mlをロータリーエバポレータを用いて数mlに濃縮した後に、窒素ガスを吹き付けて1mlにまで濃縮し、ガスクロマトグラフ質量(GC/MS)分析及びGC分析の試料とした。

2.2.3 炭化水素の同定

炭化水素の同定は、横河電機(株)製HP6890/HP5973MSDを用い、25mのキャピラリーカラムHP-Ultra2によりGC/MS分析をおこなった。キャリアガスはヘリウム(1ml/分 コンスタントフローモード), 試料注入量は1.0 µlでスプリットレス条件で測定した。注入口温度は250, 検出器はMSD(スキャンレンジ: M/Z 45~350)を用いた。イオン化法はEI, イオン源温度は200とした。オープン温度は55で2分保持し、130まで10/分, その後200まで5/分で昇温し、200で20分保持した。

このようにして得られた試料のGC/MSのクロマトグラムを標準物質の保持時間, 分子イオンピーク, フラグメントイオンと比較し, それぞれの炭化水素を同定した。標準物質を入手できなかった炭化水素については分子イオン等をヨーロッパ基準(炭化水素法)に収載されたクロマトグラムと比較し, 同定した。

2.2.4 GCによる炭化水素の分離・定量

島津製作所製GC-14A(検出器, FID)を用い, 25mのキャピラリーカラムDB5(5% phenylmethyl polysiloxane)によりGC分析を行った。キャリアガスはヘリウム(流速: 約1ml/分), 試料注入量は1.0 µlでスプリットレス条件で測定した。注入口温度は200, 検出器温度は280とした。オープン温度は55で2分保持した後, 155まで12/分, その後230まで5/分で昇温し, 230で10分保持した。

各炭化水素は標準物質の保持時間を対照として同定し,

その量はC20:0を用いて内部標準法で求めた。2.2.1に記した標準物質を各々0.1~20.0 $\mu\text{g/ml}$ と4.0 $\mu\text{g/ml}$ の内部標準(C20:0)を含む標準液をGCで分析し、その面積値から各々の炭化水素について、検量線を作成した。これらの検量線の相関係数は $R^2 = 0.9988 \sim 0.9996$ であった。

一般的には、ノイズの3倍以上のピーク高さがあるものをシグナルとして検討している。今回ノイズの3倍以下のピーク高さではあるが、未照射試料からC14:0, C15:0, C17:0の3種の炭化水素が検出された。また、購入した鶏肉への包装材の影響を知るために、ラップと発泡スチロールのトレイをヘキサソールで洗浄し、GC分析したが炭化水素は検出されなかった。従って未照射試料の炭化水素は器具の洗浄不良、試薬の管理不良等に由来すると考えられるが、以下に述べる照射試料で得られた結果には反映させていない。

2.2.5 炭化水素の分析精度の確認

標準液を5回繰り返し測定した結果、標準液中の各炭化水素濃度が0.1 $\mu\text{g/ml}$ の場合は変動係数(標準偏差÷平均値×100)が6~28%, 0.2 $\mu\text{g/ml}$ の場合は5~11%であることが分かった。なお、内部標準C20:0の濃度は4.0 $\mu\text{g/ml}$ とした。

2.3 ESRによる測定

照射後、試料を冷凍庫に保存し、1日後から骨の処理を行った。骨幹中央部を切り取り、肉、骨髄と海綿骨を取り除き、五酸化リン共存下で真空中、24時間乾燥させた。乾燥後、骨を砕き、1~2mmの骨片を得た。この骨片100mgを5mmのESR試料管に詰めた。

ESRのシグナル強度は照射直後にかなり低下する⁴⁾ので、ESRのシグナル強度がほぼ安定する照射6日後に室温で、この試料を測定した。ESR装置は日本電子製JER-RE2Xを用いた。測定条件は、掃引磁場: 335 \pm 7.5mT, 掃引時間: 4分, モジュレーション幅: 0.32mT, タイムコンスタント: 0.03秒, マイクロ波出力: 1mWで行った。

骨の密度差による測定値の変動を避けるため、1条件につき2試料を作成した。測定したシグナルは $g = 2.002$ で、ESRのシグナル強度はピーク高さで表した。

3. 結果及び考察

3.1 炭化水素生成量の線量依存性

脂肪に放射線を照射したとき生成する主な炭化水素ともとなる脂肪酸の関係を表1に示す。炭素数が脂肪酸のそれより1少ない炭化水素(C_{n-1}:0)と炭素数が2少なく不飽和度が1増えた炭化水素(C_{n-2}:1)が多く

生成する。これらの炭化水素をGC分析したクロマトグラムの1例を図1に示す。表1に示した8種の炭化水素を同定したが、このうち標準物質が入手できた6種の炭化水素について定量した。-19, -10, 1, 10におけるオレイン酸由来の炭化水素生成量と線量との関係を図2に示す。また、他の脂肪酸由来の炭化水素においても、照射線量と生成量は非常に良い直線関係($R^2 = 0.96 \sim 1.00$)を示した。

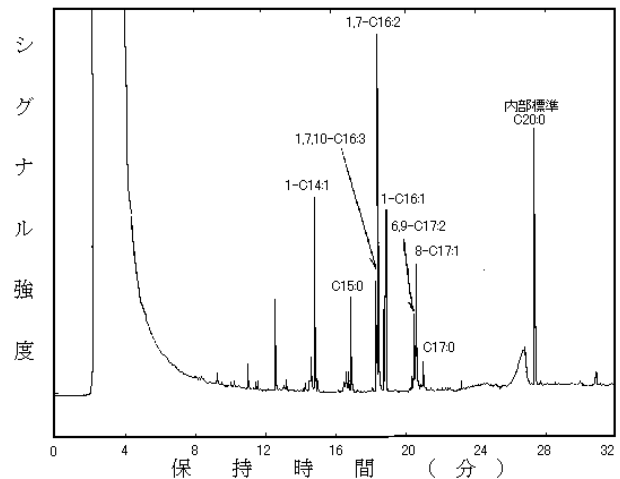


図1 GCクロマトグラムの例(-19, 5kGy)

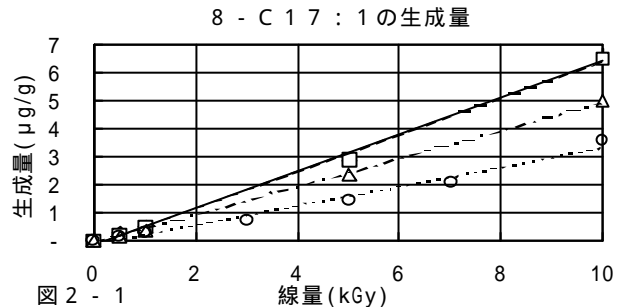


図2-1

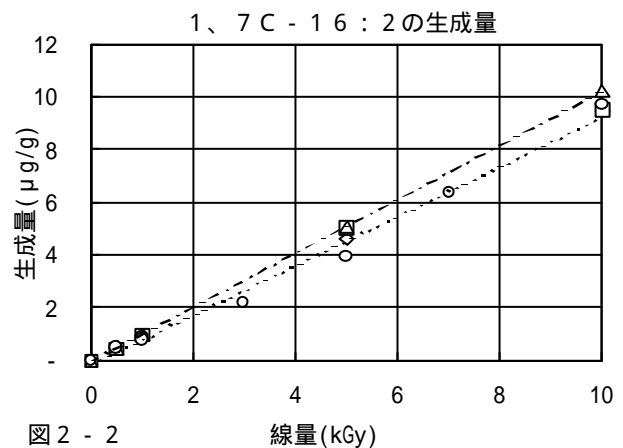


図2-2

図2 炭化水素生成量の線量依存性(-19~10) 照射温度 ;10, ;1, ;-10, ;-19

表1 脂肪に線を照射したとき生成する主な炭化水素

もとなる脂肪酸	C _n -1:0	C _n -2:1
パルミチン酸(FA16:0)	C15:0	1-C14:1
ステアリン酸(FA18:0)	C17:0	1-C16:1
オレイン酸(FA18:1)	8-C17:1	1,7-C16:2
リノール酸(FA18:2)	6,9-C17:2	1,7,10-C16:3

3.2 炭化水素の生成量に対する照射温度の影響

脂肪に線を照射したとき生成する炭化水素の量は照射温度が低くなる程減少することが報告されている^{5,6)}。

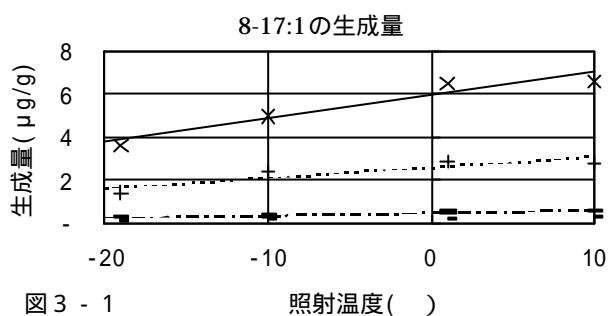


図3-1 照射温度()

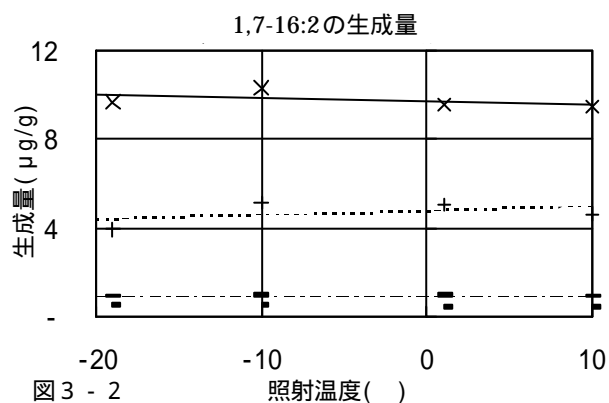


図3-2 照射温度()

図3 炭化水素生成量と照射温度の影響

x 10kGy, + 5kGy, - 1kGy

1例として、オレイン酸由来の炭化水素について同一線量での炭化水素の生成量を照射温度毎に検討した結果を図3に示す。他の炭化水素についても、同様に検討した結果、2つのグループに分かれた。1つは炭素数が脂肪酸のそれより1少ない炭化水素(C_n-1:0)のグループ(C15:0, 8-C17:1, C17:0)で、これらの生成量は照射温度が高い程多くなった(図3-1)。

もう1つは、炭素数が2少なく不飽和度が1増えた炭化水素(C_n-2:1)のグループ(1-C14:1, 1,7-C16:2, 1-C16:1)で、これらの生成量は照射温度の影響を受けなかった(図3-2)。

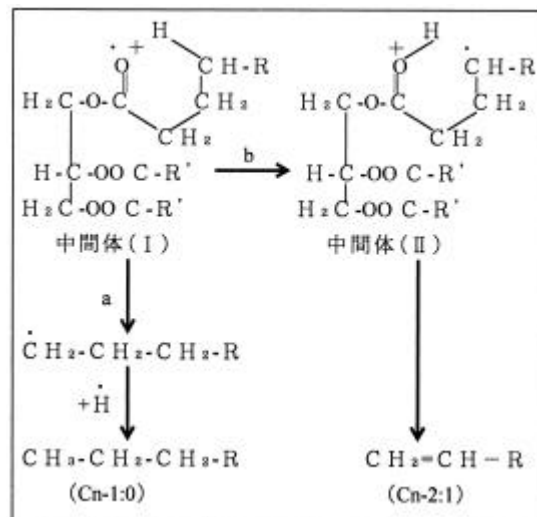


図4 炭化水素の生成メカニズム⁶⁾

脂肪を照射することによって得られる炭化水素の生成メカニズムについてNawarが図4に示す反応経路を提唱している⁶⁾。脂肪に放射線を照射するとラジカル反応により中間体ができる。

aのルートでは、炭素数が脂肪酸より1少ない炭化水素(C_n-1:0)が生じる。この生成メカニズムは2分子反応であり、温度の影響を受けると考えられ、本研究の結果と一致する。一方、中間体からbのルートを経て、6員環の中間体を経て、炭素数が2少なく不飽和度が1増した炭化水素(C_n-2:1)が生成する。この反応は1分子反応であり、温度による影響を受けないと思われ、本研究の結果と一致する。

3.3 炭化水素の生成比

ヨーロッパ基準(炭化水素法)では、正確な照射の検知を行うために、生成した炭化水素の量比を食品中の脂肪酸組成比と比較して判断することとしている。そこで、本研究では鶏肉中の脂肪酸組成を日本食品脂溶性成分表⁷⁾を参考にして、パルミチン酸(FA16:0)24%、ステアリ

表2 炭化水素の生成比

炭化水素比	照射温度()				平均	脂肪酸の比
	-19	-10	1	10		
1-C14:1 1,7-C16:2	0.49	0.46	0.49	0.49	0.48	0.56
C15:0 8-C17:1	0.76	0.58	0.66	0.57	0.66	
1-C16:1 1,7-C16:2	0.13	0.12	0.12	0.12	0.12	0.14
C17:0 8-C17:1	0.21	0.19	0.16	0.16	0.19	

: パルミチン酸由来 / オレイン酸由来

: ステアリン酸由来 / オレイン酸由来

ン酸 (FA18:0) 6%, オレイン酸 (FA18:1) 43%, リノール酸 (FA18:2) 15% として, 実験結果を考察した。

炭化水素生成量が 0.2 μg/g (脂肪) 以上の測定値を基に生成比を算出し, -19 ~ 10 での照射温度範囲の平均生成比を表 2 に示す。

3.3.1 Cn-2:1の生成量比およびCn-1:0の生成量比

鶏肉の脂肪中のパルミチン酸とオレイン酸の組成比⁷⁾は 0.55 である。照射によりこれらの脂肪酸から生成する炭化水素のうちで Cn-2:1 の量比 (1-C14:1 / 1,7-C16:2) は平均 0.48 で, 温度影響はほとんどなかった (表 2 の)。Cn-1:0 の量比 (C15:0 / 8-C17:1) は 0.76 ~ 0.57, 平均 0.66 であった。この値は照射温度が低いほど大きくなる傾向を示した (表 2 の)。

鶏肉の脂肪中のステアリン酸とオレイン酸の組成比⁷⁾は 0.14 である。照射によりこれらの脂肪酸から生成する Cn-2:1 の量比 (1-C16:1 / 1,7-C16:2) は平均 0.12 で, 温度影響はみられなかった (表 2 の)。Cn-1:0 の量比 (C17:0 / 8-C17:1) は 0.21 ~ 0.16, 平均 0.18 であった。この値は照射温度が低いほど大きくなった (表 2 の)。

脂肪酸の組成比と照射によりこれらの脂肪酸から生成する炭化水素の生成比を比べて, 検知するためには, 照射温度がわからなくても判断できることが必要である。炭化水素の生成比が温度の影響を受けないことが望ましい。そこで, 各脂肪酸から生成する Cn-2:1 の生成量比は理論的にもとの脂肪酸の組成比に一致するので, これを利用して検知精度を向上することができる。

3.3.2 1つの脂肪酸から生成するCn-2:1 / Cn-1:0の値

Schreiberらは, 1つの脂肪酸から生成する Cn-2:1 / Cn-1:0 の値はもとなる脂肪酸の種類に関わらず理論的に一定であると述べている⁸⁾。しかし, 本研究では, Cn-1:0 の生成量は照射温度の影響を受け, Cn-2:1 の生成量は照射温度の影響を受けないという結果を得た。図

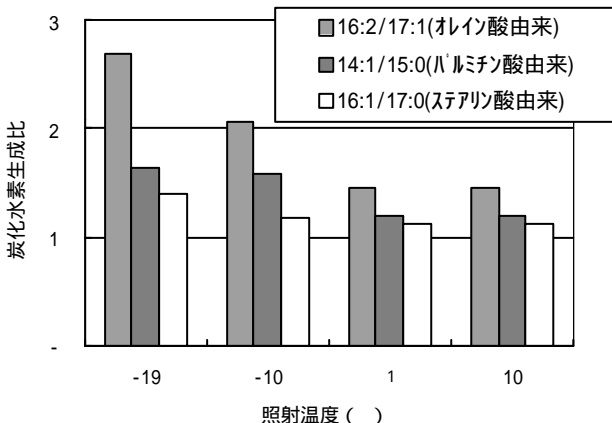


図 5 各脂肪酸由来の炭化水素生成比(10kGy)

4 に示したように, 反応経路が Cn-2:1 と Cn-1:0 ではルートが異なるため, 照射温度により生成量に差が出たと考えられる。

各脂肪酸由来の Cn-2:1 / Cn-1:0 の値に対する照射温度の影響を検討した。10kGy 照射した例を図 5 に示す。各脂肪酸由来の Cn-2:1 / Cn-1:0 の値が温度の影響を受けていることが示されている。

照射温度に関わらず, 1つの脂肪酸から生成する Cn-2:1 / Cn-1:0 の値は, 一定の傾向が見られた。それは, 由来する脂肪酸で識別すると, オレイン酸由来 > パルミチン酸由来 > ステアリン酸由来の順であった。すなわち, 炭化水素生成量比で示すと (1,7-C16:2 / 8-C17:1) > (1-C14:1 / C15:0) > (1-C16:1 / C17:0) の順であった。この傾向はどの線量に対しても同様であった。

3.4 ESRのシグナル強度に対する温度影響

ESR法は照射骨付き鶏肉において, 低線量から線量依存性を示すとともに, 精度良く検知できる方法である⁹⁾。

照射温度 -19 ~ 10, 線量 0.5 ~ 10kGy の範囲で照射した骨の ESR のシグナル強度を図 6 に示す。照射した骨の ESR シグナル強度と線量の関係は非常に良い直線関係 ($R^2 = 0.98 \sim 1.00$) が確認された。測定条件を統一した結果, シグナル強度は照射温度の影響を受けず, 同一線量ではほぼ一定であることが分かった。

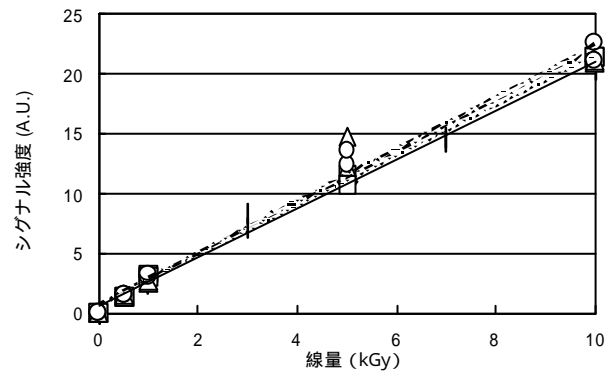


図 6 ESRシグナル強度の線量依存性 (照射温度 -19 ~ 10, 試料数 = 2)

-19	$y = 2.05x + 0.59$	$R^2 = 0.99$
-10	$y = 2.11x + 0.48$	$R^2 = 1.00$
1	$y = 2.15x + 0.63$	$R^2 = 0.98$
10	$y = 2.18x + 0.70$	$R^2 = 0.99$

3.5 炭化水素生成量とESRシグナル強度

照射温度 1 の場合の, オレイン酸由来の炭化水素生成量と ESR シグナル強度の関係を図 7 に示す。他の炭化水素についても生成量と ESR 強度は直線関係になり,

その相関係数を求めると $R^2 = 0.96 \sim 0.99$ という高い値であった。また、 -19 、 -10 、 10 の照射温度においても同様な高い相関係数($R^2 = 0.96 \sim 1.00$)が得られた。

炭化水素法はESR法と同様、実用的な検知法であることが裏付けられた。対象とする試料の形状、線量の違いによって、炭化水素法とESR法を使い分けることができる。また、検知精度の向上を目的とした両方法の併用等がさらに実用的な検知方法として適用できる。

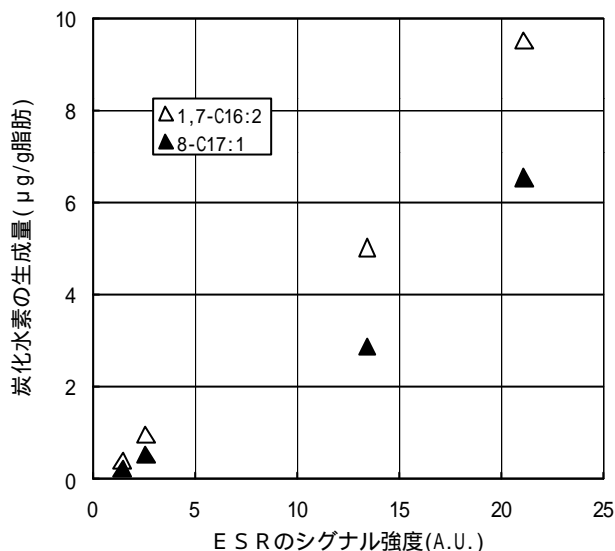


図7 炭化水素生成量とESRシグナル強度との相関関係 (照射温度1, 線量0.5~10kGy)

4. まとめ

4.1 炭化水素法の要点

これまでに示した分析結果から、炭化水素法で鶏肉の照射の有無を判別する際の要点として次の3点を提案する。

照射の結果、表1にある炭化水素が全部または一部検出されること。

パルミチン酸とオレイン酸の組成比と、それらの脂肪酸から生成する $C_n-2:1$ 量比(1-C14:1 / 1,7-C16:2)がほぼ同じであること。また、ステアリン酸とオレイン酸の組成比とそれらの脂肪酸から生成する $C_n-2:1$ 量比(1-C16:1 / 1,7-C16:2)がほぼ同じであること。(これは $C_n-2:1$ 生成量比が照射温度に影響されないためである。)

オレイン酸由来の $C_n-2:1 / C_n-1:0$ (1,7-C16:2 / 8-C17:1)の値はパルミチン酸由来(1-C14:1 / C15:0)の値、またはステアリン酸由来(1-C16:1 / C17:0)の値より大きいこと。

4.2 炭化水素法およびESR法の実用性

我々はESR法について検討し、検知法を確立したが、ESR法は操作が簡単で、感度もよいので、骨付き鶏肉にも適用できる。炭化水素法は骨の存在の有無に関係なく脂肪を含む食品の照射判別に適用できるが、実験に使用する器具の洗浄、試験環境など十分注意することが必要である。より精度を上げるためには、試料中の脂肪酸の組成を予め知ることも必要である。これらの条件を満足すれば、炭化水素法はESR法と同様に実用的検知技術として利用できることを確認した。また、骨を対象とするESR法と肉を対象とする炭化水素法の結果には大きな相関があり、炭化水素法とESRの併用で検知精度が向上する。

一般には照射された食品の照射温度はわからないので、照射温度によらず検知できることは線量依存性があることと同様に、検知法として重要である。今回、ESRのシグナル強度に対する温度効果がないことが明らかになり、線量付加法の実用性を含め、ESR法は有効な検知法であることが確認できた。

【参考文献】

- 1) BSI: Foodstuffs- Detection of irradiated food containing fat- Gas chromatographic analysis of hydrocarbons, BS EN 1784(1997).
- 2) BSI: Foodstuffs- Detection of irradiated food containing fat- Gas chromatographic/mass spectrometric analysis of 2-alkylcyclobutanones, BS EN 1784(1997).
- 3) BSI: Foodstuffs-Detection of irradiated food containing bone- Method by ESR spectroscopy, BS EN 1784(1997).
- 4) 田辺寛子:食品照射,32,1-12(1997).
- 5) A.Spiegelberg, G.Schulzki, N.Helle, K.W.Boegl and G.A.Schreiber: Radiat. Phys. Chem., 43,433(1994).
- 6) W.W.Nawar: Food Reviews International, 2(1),45-78(1986).
- 7) 科学技術庁資源調査会編:日本食品脂溶性成分表 大蔵省印刷局出版,102 (1998.5.25発行) .
- 8) G.A.Schreiber, G.Schulzki, A.Spiegelberg, N.Helle and K.W.Boegl: Journal of AOAC international, 77,1202(1994).
- 9) J.S.Lea, N.J.F.Dodd and A.J.Swallow: Int. J. Food Sci. and Tech., 23,625(1988).

(原稿受付 平成12年7月17日)