

2-アルキルシクロブタノンを指標とした放射線照射食品の検 知法の検討

誌名	愛知県衛生研究所報
ISSN	05157803
著者	上野, 英二 井上, 知美 大野, 春香 渡邊, 美奈恵 猪飼, 誉友 森下, 智雄
巻/号	63号
掲載ページ	p. 25-31
発行年月	2013年3月

調査研究

2-アルキルシクロブタノン 放射線照射食品の検知法の検討

上野英二、井上知美、大野春香、渡邊美奈恵、猪飼誉友、森下智雄

要旨

ガスクロマトグラフィー/質量分析法 (GC-MS) による 2-アルキルシクロブタノン (2-ドデシルシクロブタノン、2-テトラデシルシクロブタノン) を指標とした放射線照射食品の検知法について検討した。牛肉を試料として、均一化した試料にケイソウ土を加えて混和したのち、n-ヘキサンで抽出した。抽出された脂質を分取してゲル浸透クロマトグラフィー (GPC)、次いで PSA/シリカゲルミニカラムクロマトグラフィーにより精製し、内標準に 2-シクロヘキシルシクロヘキサノン を添加して GC-MS により測定した。ブランク試料から抽出した脂質を陰性対照、ブランク試料から抽出した脂質に 2-ドデシルシクロブタノン及び 2-テトラデシルシクロブタノンを各 0.05 µg/g 添加したものを陽性対照として、4 個 (2 併行 2 日間) の陰性対照及び 16 個 (4 併行 4 日間) の陽性対照を分析したところ、すべて正しく判定できたことから、本法の放射線照射食品への適用の可能性が示唆された。

キーワード：放射線照射食品、2-アルキルシクロブタノン、2-ドデシルシクロブタノン、2-テトラデシルシクロブタノン、GC-MS

序文

食品にガンマ線などの放射線を照射すると腐敗や食中毒の原因となる微生物が死滅するとともに、農産物では成熟、発芽等が抑制され、長期保存が可能となる。この技術は、食肉や香辛料などに多くの国で利用されている。しかし、日本では、馬鈴薯の発芽防止以外の目的での使用は原則認められていない¹⁾。

脂質を含む食品にガンマ線、電子線、エックス線を照射すると、トリグリセリドから 2-アルキルシクロブタノン (2-alkylcyclobutanones) が照射線量に比例して生成する。この物質は、放射線照射

以外のプロセスでは生成しないとされ、現在、国際食品規格である Codex を始め、国内でも脂質を多く含む畜水産食品を対象に

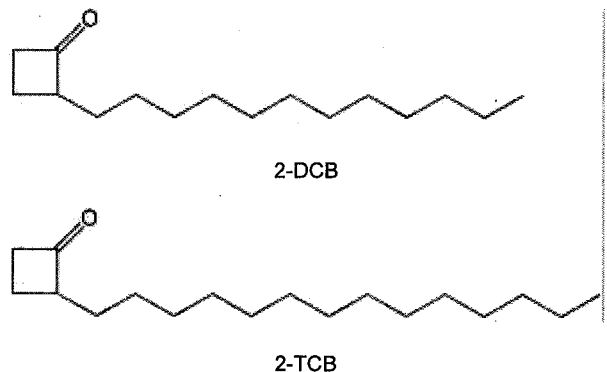


Fig. 1. Structure of 2-dodecylcyclobutanone (2-DCB) and 2-tetradecylcyclobutanone (2-TCB).

Table 1. Retention time and monitor ion of 3 compounds obtained by EI-Scan/SIM mode GC-MS

Compound	RT, min		Monitor ion, <i>m/z</i>		
	Rxi-5Sil	Rtx-200	Scan	SIM	
	MS	MS		Target	Qualifier
2-CCH ^{a)}	8.55	7.95	-	98.1	-
2-DCB	12.04	10.50	95-115	98.1	112.1
2-TCB	14.40	12.36	95-115	98.1	112.1

^{a)} Internal standard.

して、パルミチン酸由来の 2-ドデシルシクロブタノン (2-dodecylcyclobutanone、以下 2-DCB) 及びステアリン酸由来の 2-テトラデシルシクロブタノン (2-tetradecylcyclobutanone、以下 2-TCB) (Fig. 1) を指標とする検知法が通知されている²⁾。本通知法はソックスレー装置を用いた抽出法、及びフロリジル (合成ケイ酸マグネシウム) を充てんしたオープンカラムを用いた精製法を採用しており、いずれも溶媒の使用量が多く、操作が煩雑で長時間を要するといった問題がある。そこで、試料調製にゲル浸透クロマトグラフィー (gel permeation chromatography, GPC)、エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル (primary secondary amine, PSA) ミニカラム/シリカゲルミニカラム連結クロマトグラフィーなどを採用した迅速な検知法を検討したので報告する。

実験方法

1. 試料

試料 (牛肉、500 g) は、愛知県内の小売店で購入した。

2. 試薬及び標準品

試薬は和光純薬工業 (株) または関東化学 (株) の残留農薬試験用を用いた。ケイソウ土は Merck 社製の Extrelut[®] を用いた。

2-DCB 及び 2-TCB 混合標準溶液 (10 µg/mL アセトン溶液) は林純薬工業 (株) の食品分析用を用い、穏やかな窒素気流下で溶媒

を揮散させたのち、n-ヘキサンに溶解して 1 µg/mL 標準原液とした。標準原液を n-ヘキサンで適宜希釈し、添加用及び検量線用の標準溶液とした。また、2-シクロヘキシルシクロヘキサノン (2-cyclohexylcyclohexanone、以下 2-CCH) 標準溶液 (100 µg/mL アセトン溶液) は林純薬工業 (株) の食品分析用を用い、穏やかな窒素気流下で溶媒を揮散させたのち、n-ヘキサンに溶解して 10 µg/mL 標準原液とした。標準原液を n-ヘキサンで適宜希釈し、内標準溶液とした。

PSA/シリカゲルミニカラムは、Waters 社製 Sep-Pak Plus Silica (690 mg) の手前に Agilent 社製 Bond Elut Jr-PSA (500 mg) を連結し、ジエチルエーテル-石油エーテル (2:98) 10 mL、次いで石油エーテル 10 mL で洗浄したものを用いた。

3. 装置及び条件

GPC 装置: (株) 島津製作所製 LC10 シリーズ GPC クリーンアップシステムに、昭和電工 (株) 製カラム CLNpak EV2000AC-12F (内径 12 mm、長さ 300 mm) 及びガードカラム CLNpak EV-G AC12C (内径 12 mm、長さ 100 mm) を装着し、カラム温度 45 °C、溶出液 アセトン-シクロヘキサン (15:85)、流速 3 mL/min、モニター波長 254 nm の条件で用いた。

GC-MS 装置: (株) 島津製作所製 GCMS-QP2010Ultra (デュアルカラム MS システム付) に、Restek 社製の不活性処理済カスタムライナー (石英ウール入)、デュアルカラム ①Restek 社製

Table 2. Elution of 2 compounds from GPC and PSA/Silica gel mini-column

Compound	GPC elution volume, mL (min)	PSA/Silica gel elution, % ^{a), b)}	
		Fraction 1	Fraction 2
2-DCB	22.5 - 27.3 (7.5-9.1)	0	97
2-TCB	21.6 - 26.4 (7.2-8.8)	0	98

^{a)} Mean of 3 replicates.

^{b)} Each compound (0.1 μg) in 2 mL petroleum ether was loaded on the column, and eluted with 10 mL of petroleum ether, followed with 2 mL of diethylether-petroleum ether (2:98) (Fraction 1), and eluted with 10 mL of diethylether-petroleum ether (2:98) (Fraction 2).

Rxi-5Sil MS (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μm) ②Restek 社製 Rtx-200MS (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μm) を装着して用いた³⁾。測定条件は、注入口温度 250 °C、カラム温度プログラム 60 °C (1 min) → 20 °C/min → 160 °C → 8 °C/min → 240 °C → 25 °C/min → 290 °C (7 min)、インターフェース温度 300 °C、イオン源温度 200 °C、イオン化法 EI、イオン化電圧 70 eV、キャリアガス ヘリウム、キャリアガス線速度 40 cm/sec、注入量 1 μL、注入モード 高圧スプリットレス (250 kPa, 1 min)、測定モード (インターバル) SIM/スキャン同時取込 (0.2/0.2 sec)、スキャン範囲 95~115 m/z に設定した (Table 1)。

4. 分析操作

(1) 試験溶液の調製

ガラス製乳鉢に均一化した試料 5 g を量り採り、ケイソウ土 7.5 g を加えて乳棒で十分に粉碎・混和したのち、50 mL 容ポリプロピレンチューブに移した。これに n-ヘキサン 30 mL を加え、3 分間振とう抽出した。これを 3,100 回転/分で 5 分間遠心分離し、ヘキサン層を採取したのち、残さに n-ヘキサン 20 mL を加えて同様に操作し、ヘキサン層を合わせて綿栓ろ過した。ろ液を減圧濃縮後、70°C で 20 分間 GC オープン中に放置して溶媒を完全に除去した。抽出さ

れた脂質の重量を量り、0.1 g 脂質/mL になるようにアセトン-シクロヘキサン (15 : 85) に溶解して試料原液とした。

試料原液を 3,100 回転/分で 5 分間遠心分離したのち、上清 2 mL (脂質 0.2 g 相当) を GPC 装置に注入し、7.2~9.2 分 (21.6~27.6 mL) に溶出する画分を 32 mL 容コレクターチューブ (内径 15 mm、長さ 150 mm) に分取した。この画分を穏やかな窒素気流下で約 0.5 mL まで濃縮し、石油エーテル 1 mL を加えてボルテックスミキサーで攪拌したのち、PSA/シリカゲルミニカラムに負荷した。コレクターチューブは、さらに石油エーテル 1 mL を加えて同様に操作し、同ミニカラムに負荷した。このミニカラムに石油エーテル 10 mL、次いでジエチルエーテル-石油エーテル (2 : 98) 2 mL を注入し、流出液を捨てた。その後、PSA ミニカラムを取り外したのち、シリカゲルミニカラムにジエチルエーテル-石油エーテル (2 : 98) 10 mL を注入して 10 mL 容濃縮管に溶出した。溶出液を穏やかな窒素気流下で乾固させ、器壁を洗い込みながら石油エーテルで 1 mL 容濃縮管に移した。これをさらに穏やかな窒素気流下で乾固させたのち、内標準溶液 (2-CCH, 0.1 μg/mL) 0.4 mL を加え、ボルテックスミキサーで攪拌して GC-MS 用の試験溶液 (0.5 g 脂質/mL) とし

結果及び考察

た。

(2) 定性及び定量

GC-MS ワークステーションのデータ解析画面上で、SIM クロマトグラムとマススペクトルを表示させ、目視により保持時間、イオンの強度比、及び標準マススペクトルとの類似度を確認することにより定性を行ったのち、内標準法により定量した。

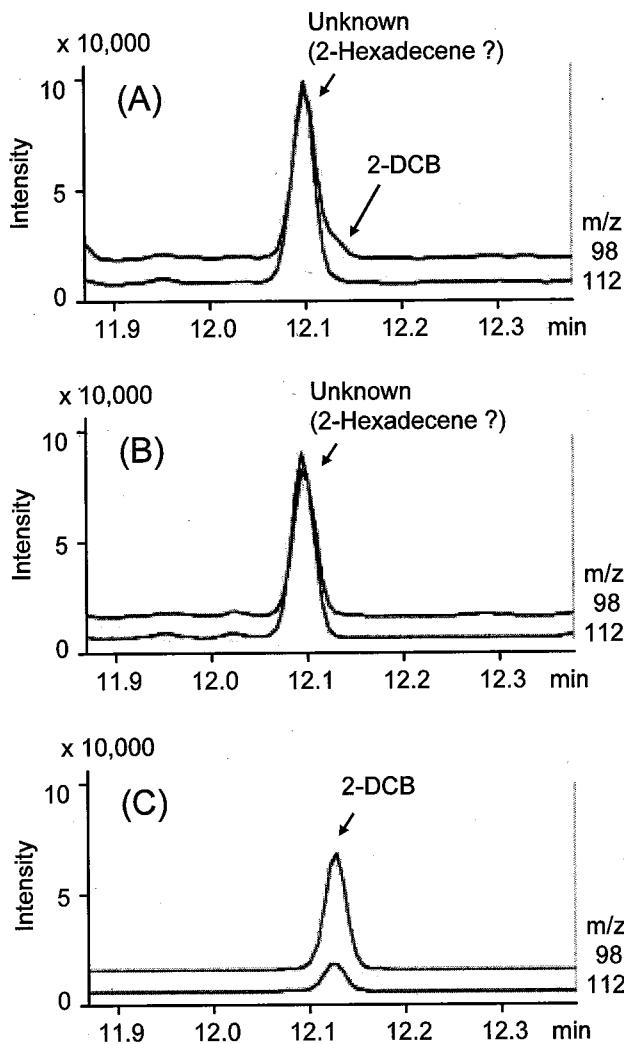


Fig. 2. Extracted ion chromatograms (Scan-mode, Rxi-5Sil MS column) of extract of beef lipid fortified with 0.05 $\mu\text{g/g}$ of 2-DCB after PSA/Silica gel mini-column chromatography. (A) eluate with 10 mL of diethylether-petroleum ether (2:98) (No fractionation), (B) eluate with 10 mL of petroleum ether, followed with 2 mL of diethylether-petroleum ether (2:98) (Fraction 1), (C) eluate with 10 mL of diethylether-petroleum ether (2:98) after (B) (Fraction 2).

1. GC-MS 条件

通知法では、Agilent 社製 DB-5ms カラムを採用している²⁾。しかし、m/z 98 及び m/z 112 のイオンをモニターする条件では、レバーなど食品によっては脂質成分由来の妨害ピークが少なからず出現し、定性が困難となる場合もあった。そこで、分離挙動の大きく異なる2種類のカラムを装着したデュアルカラム GC-MS システムを採用することにした³⁾。Restek 社製の 5% フェニル系カラム Rxi-5Sil MS 及びトリフルオロプロピル系カラム Rtx-200MS を装着し、定性・定量は前者、確認は後者により得られた SIM クロマトグラム及びマススペクトルを用いる方法とした (Table 1)。

2. 抽出法

通知法では、ソックスレー装置を用いて6時間還流抽出したのち、脱水のために無水硫酸ナトリウムを加えて一晩放置する²⁾。本法では、比較的硬い牛肉を脱水しながら、より細かく粉碎して脂質成分が抽出されやすくするために、ケイソウ土⁴⁾を加え、粗面に仕上げられたガラス製乳鉢と乳棒で回転を加えながら圧搾粉碎したのち、n-ヘキサンを加えて振とうする迅速な抽出法を採用した。

3. 脱脂・精製法

通知法では、550 $^{\circ}\text{C}$ で5時間活性化したのち、水を加えて一晩放置した不活性化フロリジルを調製し、これを湿式充てんしたオープンカラムを用いて脱脂・精製する²⁾。本法では、GPC により大部分の脂質成分を除去し、さらに、比較的 low molecular weight の脂肪酸を PSA ミニカラムで除去したのち、シリカゲルミニカラムクロマトグラフィーにより分画・精製する方法を採用した。Table 2 に示したように両成分は GPC において 7.2~9.1 min (21.6~27.3 mL) の画分に溶出したことから、この画分のみを選択的に分取することにした。一方、トリグリセリドなどの脂質成分は 5.5~7.2 min (16.5~21.6 mL) の画分に溶出し、高い脱脂・精製効果が期待された。次に、Fig. 2(A) に示したよ

Table 3. Analytical results of blank and fortified beef samples

Compound	Sample	No. of samples	Evaluation item ^{a)}					Judgment
			1) <i>S/N</i>		2) Peak area ratio against standard ion ratio (<i>m/z</i> 112/98), %	3) Sum of relative intensities at <i>m/z</i> 98 and 112 in <i>m/z</i> 95-115, % ^{b)}	4) Concentration, $\mu\text{g/g}$ lipid (Recovery, %)	
			<i>m/z</i> 98	<i>m/z</i> 112				
2-DCB	Blank	4	-	-	-	5-8	N.D.	All negative
	Fortified ^{c)}	16	43-48	31-35	-9 - -2	74-82	0.038-0.041 (76.4-82.4)	All positive
2-TCB	Blank	4	-	-	-	3-7	N.D.	All negative
	Fortified ^{c)}	16	40-47	29-37	-3 - +5	69-78	0.041-0.045 (81.3-89.1)	All positive

^{a)} Each item was evaluated by the SIM chromatograms and the MS spectra obtained by Rxi-5Sil MS column.

^{b)} 3) was obtained by the MS spectra in scanning measurement.

^{c)} Samples were fortified with 0.05 $\mu\text{g/g}$ of each compound.

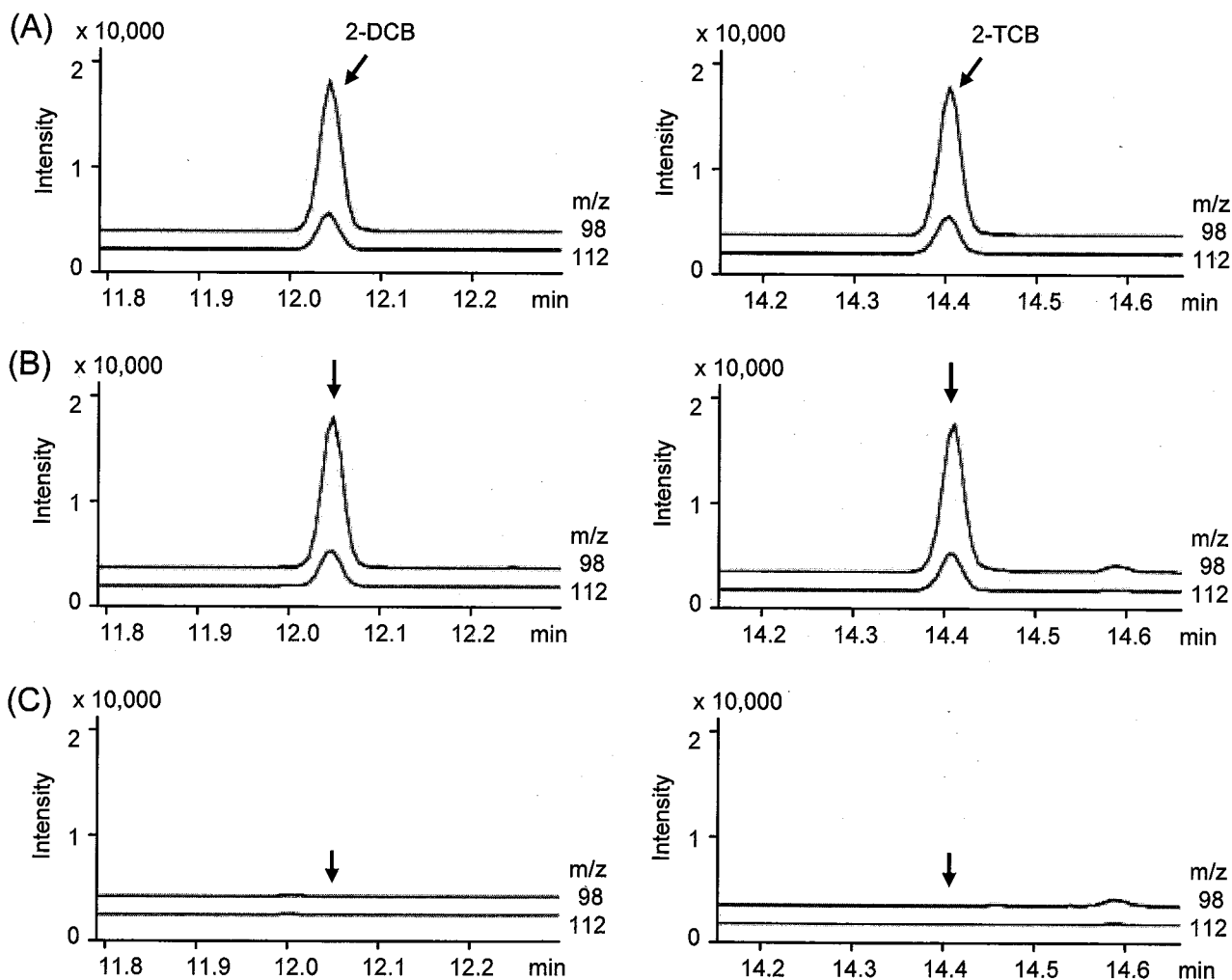


Fig. 3. SIM chromatograms (Rxi-5Sil MS column) of (A) 0.025 $\mu\text{g/mL}$ standard mixture of 2-DCB and 2-TCB, (B) extract of beef lipid fortified with 0.05 $\mu\text{g/g}$ of each compound, (C) extract of blank beef lipid.

うに、PSA/シリカゲルミニカラムに GPC 精製後の試料溶液を負荷したのち、ジエチルエーテル-石油エーテル (2:98) 10 mL で溶出したところ、Rxi-5Sil MS カラムにより得られたクロマトグラム上に 2-ヘキサデセン類と見られるピークが出現して 2-DCB のピークと重なり、定性が困難であった。このためミニカラムを石油エーテル 10 mL、次いでジエチルエーテル-石油エーテル (2:98) 2 mL で洗浄して妨害成分を除去したのち (Fig. 2(B))、ジエチルエーテル-石油エーテル (2:98) 10 mL で両成分を溶出する方法とした (Fig. 2(C)) (Table 2)。なお、窒素気流下での濃縮効率を高めるために、n-ヘキサンに代えて揮発性の高い石油エーテルを用いることにした。本法ではミニカラム吸引精製システム⁵⁾を用いたが、減圧条件下でジエチルエーテル-石油エーテル (2:98) が気化しないように PSA ミニカラムを取り外したのち、シリカゲルミニカラムから両成分を溶出することにした。

4. 性能評価試験

通知法に示されている方法²⁾に従って、本法の性能評価試験を実施した。すなわちブランク試料から抽出した脂質を陰性対照、ブランク試料から抽出した脂質に 2-DCB 及び 2-TCB 標準品を 0.05 µg/g 添加したものを陽性対照として 4 つの判定項目により評価した。Table 3 に示したように、4 個 (2 併行 2 日間) の陰性対照を分析したところ、1) m/z 98 及び m/z 112 の SIM クロマトグラム上にピーク (S/N \geq 3) は認められず、すべて陰性と判定された。次に、16 個 (4 併行 4 日間) の陽性対照を分析したところ、1) m/z 98 及び m/z 112 の SIM クロマトグラム上にピーク (S/N \geq 3) がすべて認められた。2) 認められたピークの面積比 (m/z 112/98) は、m/z 98 の SIM クロマトグラムにおいて近似した面積を与える標準品のピーク面積比 (m/z 112/98) のすべて \pm 20% 以内であった。3) スキャン測定で得られたマ

スペクトル (m/z 95~115) において、m/z 98 及び m/z 112 がすべて主要イオン (相対イオン強度の合計が 50%以上) であった。4) 上記 1)~3) の項目を満たしており、すべての定量値が検出限界濃度 (両成分ともに 0.003 µg/g、S/N=3) 以上であった。以上、すべての陽性対照についても全判定項目を満足しており、陽性と判定された。Fig. 3 に Rxi-5Sil MS カラムにより得られた標準溶液、標準品を添加した牛肉の試験溶液、及び牛肉のブランク試験溶液の SIM クロマトグラムを示した。このように陰性及び陽性対照ともにすべて正しく判定できたことから、本法の放射線照射食品への適用の可能性が示唆された。

文 献

- 1) 厚生省告示“食品、添加物等の規格基準”，昭和 34 年 12 月 28 日付け第 370 号，1959.
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知“放射線照射された食品の検知法について”平成 19 年 7 月 6 日付け食安発第 0706001 号，2007.
- 3) 上野英二：ガスクロマトグラフィー/質量分析法の農薬残留分析への利用：GC-MS および GC-MS/MS を用いた食品中の農薬残留分析，日本農薬学会誌，36(4)，544-558，2011.
- 4) 上野英二：多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィーの農薬残留分析への利用，日本農薬学会誌，35(1)，74-78，2010.
- 5) Ueno E, Oshima H, Saito I, Matsumoto H: Determination of nitrogen- and phosphorus-containing pesticide residues in vegetables by GC-NPD and -FPD after GPC and a two-step mini-column cleanup, Journal of AOAC International, 86(6), 1241-1251, 2003.

Detection of irradiated foods using 2-alkylcyclobutanones as markers

Eiji Ueno, Tomomi Inoue, Haruka Ohno, Minae Watanabe,
Yoshitomo Ikai, Toshio Morishita

A method has been developed for the detection of irradiated food using 2-alkylcyclobutanones (2-dodecylcyclobutanone and 2-tetradecylcyclobutanone) as markers. Beef sample pestled with diatomaceous earth was extracted with n-hexane. An aliquot of the extracted lipid was cleanup by gel permeation chromatography and PSA/silica gel mini-column chromatography. The test solution spiked with 2-cyclohexylcyclohexanone as an internal standard was subjected to gas chromatography with mass spectrometry. Lipids extracted from blank sample were used as negative controls. Further, negative samples fortified with 2-dodecylcyclobutanone and 2-tetradecylcyclobutanone were used as positive controls. In the performance evaluation test, 4 negative and 16 positive controls were analyzed to verify the method's ability to detect irradiation. All of the negative controls were judged negative, and all of the positive controls were judged positive. These results suggest that the present method is able to detect irradiation in foods such as animal and fishery products.

Key words : irradiated food, 2-alkylcyclobutanone, 2-dodecylcyclobutanone, 2-tetradecylcyclobutanone, GC-MS