[報文]

振とう抽出法による放射線照射した食肉および サーモンにおける 2-アルキルシクロブタノン類の検知

堤 智昭^{1)*}, 足立利華¹⁾, 高附 巧¹⁾, 根井大介²⁾,
亀谷宏美²⁾, 等々力節子²⁾, 松田りえ子¹⁾, 手島玲子¹⁾

¹⁾ 国立医薬品食品衛生研究所食品部 (〒 158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1)

²⁾ (独)農研機構食品総合研究所 (〒 305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12)

Detection of 2-alkylcyclobutanones in Irradiated Meats and Salmon by Shaking Extraction

Tomoaki Tsutsumi^{1)*}, Rika Adachi¹⁾, Satoshi Takatsuki¹⁾, Daisuke Nei²⁾,
Kameya Hiromi²⁾, Setsuko Todoriki²⁾, Rieko Matsuda¹⁾ and Reiko Teshima¹⁾

¹⁾ *Division of Foods, National Institute of Health Sciences, Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501 Japan*

²⁾ *National Food Research Institute, Kannondai 2-1-12, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8642 Japan*

Summary

2-dodecylcyclobutanone (DCB) and 2-tetradecylcyclobutanone (TCB) are specific radiolytic products in irradiated lipid-containing food and can be used to detect irradiation of foodstuffs. Here, we evaluated a rapid shaking extraction method to detect irradiation in beef, pork, chicken and salmon. The amounts of DCB and TCB extracted by the shaking extraction method were 77- 121% of those by the conventional Soxhlet extraction method in irradiated meats and salmon. The selected ion-mode chromatograms of DCB and TCB obtained from both extractions were visually inspected, but showed no significant differences. These results suggest that the shaking extraction method achieved similar extraction efficiencies for DCB and TCB to the Soxhlet extraction method. Finally, we used the shaking extraction method to detect irradiation in beef, pork, chicken and salmon irradiated at 0.5 kGy or 1 kGy. All of the non-irradiated samples were judged negative and all of the irradiated samples were judged positive. Overall, our results indicate that the shaking extraction is a useful method for extracting DCB and TCB from meats and salmon. The main advantage of this method is the short extraction time (approximately 1 h), thereby allowing rapid detection of irradiated meats and salmon.

Key words: Irradiated food, 2-dodecylcyclobutanone, 2-tetradecylcyclobutanone, European standard EN1785, Shaking extraction method

キーワード：放射線照射食品，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，ヨーロッパ標準規格法，EN1785，振とう抽出法

*連絡先：tutumi@nihs.go.jp

はじめに

日本国内では馬鈴薯の発芽抑制を目的とした場合を除き、食品への放射線照射（以下、照射）は食品衛生法により禁止されている。しかし、諸外国では殺虫・殺菌などを目的に食品への照射が認められており、照射された食品（照射食品）が日本に誤って輸入される恐れがある。照射食品を輸入した場合は、食品衛生法 11 条違反として取り扱われるため、輸入食品を対象に照射の有無を監視する必要がある。

照射の有無を判別する検知法として、国内では熱ルミネッセンス法、アルキルシクロブタノン（ACB）法、および電子スピン共鳴法が公定法として通知されている¹⁾。このうち、ACB 法は食品中の脂質から照射特異的に生じる 2-ドデシルシクロブタノン（DCB）と 2-テトラデシルシクロブタノン（TCB）を検知指標として照射の有無を判定する方法である。DCB および TCB の前駆体となる脂肪酸はパルミチン酸およびステアリン酸であることから、これらの脂肪酸を含む食品が ACB 法の適用対象となる。通知には ACB 法の一例として、欧州標準規格として採用されている標準分析法（EN1785）²⁾ が記載されている。本法では、ACB 類の標準的な抽出法としてソックスレー抽出が示されているが、6 時間程度の長時間を要する欠点がある。また、高速溶媒抽出装置³⁾、超臨界抽出装置^{4,5)}、および高速万能ホモジナイザー⁷⁾ による ACB 類の抽出も報告されているが、特殊な装置が必要となる。一方、振とう抽出法は特殊な装置を必要とせず、簡便で迅速に ACB 類の抽出操作が行える利点がある。近年、ヘキサンやヘキサンとヘプタンの混合液を抽出溶媒に使用した振とう抽出法が報告されている^{8),9)}。しかし、振とう抽出法による ACB 類の抽出効率を種々の食品について検討した報告は無い。本研究では、ACB 法の迅速・簡便化を目的として、抽出時間の大幅な短縮が期待される振とう抽出法について ACB 類の抽出効率を評価した。さらに評価した振とう抽出法を用いた ACB 法により、通知¹⁾ の記載に基づいた照射の有無の判定が可能であるか検討した。

実験方法

1. 試料

牛肉、豚肉、鶏肉、サーモン（各 2～3 試料）は

東京都内のスーパーマーケットで購入した。照射試料の作製は、細切均一化した試料をポリエチレン袋に入れ、ドライアイス存在下で冷凍状態に保ち、Gamma Cell 220 (⁶⁰Co γ source, Nordin) により γ 線照射した。試料に 0.5kGy あるいは 1 kGy を目標に ⁶⁰Co の γ 線を照射した後、-30℃で保存した。試料に照射した線量はアラニン線量計により測定し、目標線量のほぼ±10%の範囲にあることを確認した。従って、本研究では目標線量を実際に照射した線量とみなした。

2. 脂肪酸の分析

試料に含まれるパルミチン酸およびステアリン酸の含有量は、栄養表示のための成分分析¹⁰⁾に従って測定した。

3. ソックスレー抽出法による ACB 類の分析

通知¹⁾に例示されている方法（EN1785）に従った。試料 20 g と 2 倍量の無水硫酸ナトリウムを混合後、ヘキサンを溶媒に用いてソックスレー抽出（6 時間）を行った。得られた抽出液をヘキサンにより 100 mL に定容後、無水硫酸ナトリウム 10 g を加えて一晩放置した。抽出液の一部を採取し、溶媒を留去した後、残留物の重量を測定し、これを脂肪重量とした。脂肪 200 mg に相当する抽出液をフロリジルカラム（20% 含水）に負荷し、ヘキサン 150 mL で洗浄後、1% ジエチルエーテル / ヘキサン 150 mL により ACB 類を溶出した。溶出液は濃縮乾固後、内部標準物質である 2-シクロヘキシルシクロヘキサノンを含むヘキサン溶液 200 μ L を加え、GC/MS 試験溶液とした。GC/MS 分析には DB-5ms カラムを取り付けた Agilent 7890A/5975C GC/MSD を使用した。SIM 測定（定量 :m/z 98, 確認 :m/z 112）により、DCB および TCB を内部標準法により定量した。試験結果は通知に記載されている判定に従い、照射の有無を判定した。

4. 振とう抽出法による ACB 類の分析

試料 20 g を乳鉢に秤量し、約 2 倍量の無水硫酸ナトリウムを加え、よく攪拌しながら脱水、粉末状にした。これを分液ロートに入れ、ヘキサン 150 mL を加え、振とう機を用いて抽出（290 rpm, 10 分）した。上清を抽出液として回収した後、残渣に

ヘキサン 100 mL を加え、同様に 2 回目の抽出 (290 rpm, 10 分) を行った。抽出液を回収後、残渣にヘキサン (50 mL) を加え、手で 3 回目の抽出 (5 回程度振る) を行った。4 回目の振とう抽出を行う場合は 3 回目の操作と同様に行った。得られた抽出液は無水硫酸ナトリウムで脱水した後、減圧濃縮器によりヘキサンを留去し、ヘキサンを加えて 100 mL に定容した。抽出液の一部を採取し、溶媒を留去した後、残留物の重量を測定し、これを脂肪重量とした。脂肪 200 mg に相当する抽出液を採取し、前述した EN1785 に従い ACB 類を分析した。

実験結果および考察

1. 振とう抽出法による ACB 類の抽出効率

1 kGy 照射した豚肉およびサーモンを使用して、ヘキサンによる振とう抽出の抽出回数を決定した。振とう抽出操作を 4 回まで実施し、照射試料より抽出された供試料あたりの DCB および TCB 量をソックスレー抽出の値と比較した (Fig. 1)。いずれの試料でも 3 回までの抽出により、当該化合物の抽出量はソックスレー抽出に対して 88% 以上の値となり、その後、顕著な抽出量の増加は認められなかった。そのため、振とう抽出回数は 3 回に決定した。

次に振とう抽出法を、EN1785 の適用の妥当性が確認されている 4 種の食品¹¹⁾ (0.5 kGy あるいは 1 kGy 照射) に適用し、DCB および TCB の抽出効率を評価した。食品に含まれる DCB および TCB 量

は、ACB 類の前駆体となる脂肪酸 (パルミチン酸およびステアリン酸) 量に依存する。同種の食品でも産地や生育条件、さらには個体差等によりこれらの脂肪酸量が異なることが考えられるため、評価に当たっては各食品について 2~3 種類の異なった

Fig. 1 The effect of number of shaking extraction cycles on the extraction efficiency of ACB.

Table 1 Concentrations of precursor fatty acids in tested meats and salmon.

Food	Production area	Part	Precursor fatty acids (g/100g fresh weight)	
			Palmitic acid	Stearic acid
Beef	A domestic	thigh	4.1	1.6
	B domestic	beef ribs	7.9	2.8
	C imported	chuck	6.6	3.0
Pork	A domestic	thigh	1.8	1.0
	B imported	chuck	2.5	1.6
	C imported	chuck	2.0	1.2
Chicken	A domestic	breast	1.7	0.48
	B domestic	thigh	2.0	0.60
	C imported	thigh	1.8	0.59
Salmon	A domestic	fillet	2.2	0.54
	B imported	fillet	2.0	0.48

Fig. 3 SIM chromatograms of DCB and TCB in an irradiated beef sample (1 kGy) monitored at m/z 98 and 112.

Fig. 2 Extraction efficiency of ACB by shaking extraction in the irradiated samples.

試料を用いた。各試料の脂肪酸量の詳細については Table 1 に示した。同種の食品でも最大で2倍程度、前駆体となる脂肪酸の量が異なっていた。振とう抽出法により抽出された供試料あたりの DCB 量は、ソックスレー抽出と比較すると、牛肉で 86 ~ 104%，豚肉で 77 ~ 99%，鶏肉で 108 ~ 121%，およびサーモンで 82 ~ 96% であった (Fig. 2)。また、供試料あたりの TCB 量はソックスレー抽出法と比

較すると、牛肉で 85 ~ 108%，豚肉で 90 ~ 120%，鶏肉で 101 ~ 107%，およびサーモンで 93 ~ 101% であった (Fig. 2)。振とう抽出法とソックスレー抽出法の当該化合物の抽出効率に顕著な違いはないと考えられた。また、Fig. 3 には、照射した牛肉試料において、振とう抽出法とソックスレー抽出法で得られた SIM クロマトグラムの一例を示した。両者に顕著な違いは認められず、振とう抽出法を適用した場合でも DCB および TCB の明瞭なピークが確認された。牛肉に限らず、その他の全ての試料についても同様の結果であった。

2. 振とう抽出法による未照射および照射食品の判定

照射食品の検知法は、照射の有無を判定する定性試験法である。そこで、4 種の食品について、振とう抽出法を適用した場合でも通知¹⁾に従った照射の判定が正しく可能であるか評価した。対象として同一試料についてソックスレー抽出による判定も行った。その結果、全ての試料について振とう抽出法でも未照射および照射の判定が正しく行え、各判定項目の内容についてもソックスレー抽出と同様に判定に支障は無かった (Table 2)。定性試験法と

Table 2 Detection of irradiated samples by Soxhlet and shaking extractions.

Food	No. of samples	Dose	ACB	Extraction method	Evaluation item ¹				Result ²
					1) S / N	2) Peak area ratio at m/z 98 and m/z 112 against standard ion ratio (%)	3) Sum of relative intensities at m/z 98 and m/z 112 in scanning measurement (%)	4) ACB concentration (μg/g lipid)	
Beef	3	0 kGy	DCB	Shaking extraction	-	-	7 ~ 9	-	All negative
			Soxhlet extraction	-	-	-	7 ~ 8	-	
		1 kGy	TCB	Shaking extraction	-	-	12 ~ 26	-	All positive
			Soxhlet extraction	-	-	-	11 ~ 39	-	
	3	1 kGy	DCB	Shaking extraction	131 ~ 151	98 ~ 127	0 ~ 3	62 ~ 75	0.13 ~ 0.14
			Soxhlet extraction	63 ~ 114	82 ~ 116	-1 ~ 2	61 ~ 73	0.13 ~ 0.15	0.11 ~ 0.14
Pork	3	0 kGy	DCB	Shaking extraction	53 ~ 87	55 ~ 86	-2 ~ 2	73 ~ 74	0.13 ~ 0.14
			Soxhlet extraction	49 ~ 94	64 ~ 84	-5 ~ 0	73 ~ 76	0.13 ~ 0.14	0.13 ~ 0.14
		1 kGy	DCB	Shaking extraction	-	-	12 ~ 34	-	All negative
			Soxhlet extraction	-	-	-	9 ~ 10	-	
	3	1 kGy	TCB	Shaking extraction	-	-	0	-	All positive
			Soxhlet extraction	-	-	-	0 ~ 28	-	
Chicken	3	0 kGy	DCB	Shaking extraction	61 ~ 259	47 ~ 84	0 ~ 4	60 ~ 64	0.037 ~ 0.059
			Soxhlet extraction	94 ~ 213	32 ~ 66	0 ~ 4	54 ~ 62	0.052 ~ 0.063	0.15 ~ 0.20
		0.5 kGy	TCB	Shaking extraction	175 ~ 1383	132 ~ 704	-2 ~ 1	77 ~ 79	0.16 ~ 0.18
			Soxhlet extraction	72 ~ 511	62 ~ 786	-5 ~ -2	74 ~ 79	0.16 ~ 0.18	-
	3	0 kGy	DCB	Shaking extraction	-	-	8 ~ 17	-	All negative
			Soxhlet extraction	-	-	-	7 ~ 13	-	
Salmon	2	0 kGy	TCB	Shaking extraction	-	-	6 ~ 25	-	All positive
			Soxhlet extraction	-	-	-	9 ~ 12	-	
		0.5 kGy	DCB	Shaking extraction	102 ~ 228	174 ~ 332	0 ~ 3	70 ~ 71	0.076 ~ 0.13
			Soxhlet extraction	114 ~ 177	143 ~ 263	-2 ~ 3	65 ~ 70	0.067 ~ 0.11	0.027 ~ 0.042
	2	0 kGy	TCB	Shaking extraction	59 ~ 64	29 ~ 50	-5 ~ 0	62 ~ 80	0.025 ~ 0.041
			Soxhlet extraction	25 ~ 40	34 ~ 51	-2 ~ 2	73 ~ 83	0.025 ~ 0.041	-
Salmon	2	0 kGy	DCB	Shaking extraction	-	-	4 ~ 11	-	All negative
			Soxhlet extraction	-	-	-	5 ~ 8	-	
		1 kGy	TCB	Shaking extraction	-	-	22 ~ 26	-	All positive
			Soxhlet extraction	-	-	-	0 ~ 32	-	
	2	1 kGy	DCB	Shaking extraction	138 ~ 249	193 ~ 1256	1 ~ 13	60 ~ 68	0.10
			Soxhlet extraction	143 ~ 339	169 ~ 204	3 ~ 14	58 ~ 62	0.11 ~ 0.12	0.033 ~ 0.035
		1 kGy	TCB	Shaking extraction	115 ~ 139	66 ~ 103	2 ~ 5	73 ~ 83	0.033 ~ 0.035
			Soxhlet extraction	76 ~ 124	78 ~ 387	-2 ~ 3	78 ~ 79	0.035	0.035

1. Each item was judged positive if the following conditions were met: 1) Within the same retention time as DCB and TCB, S/N of peaks at m/z 98 and m/z 112 was greater than 3; 2) Regarding peaks observed in 1), the area ratios at m/z 98 and m/z 112 were $\pm 20\%$ of the peak area ratios obtained from the standard calibration solution which produced a similar area at m/z 98; 3) The scanning measurement conducted between m/z 95 and m/z 115, near the retention times for the peaks observed in 1), produced m/z 98 and m/z 112 as the major ions (Sum of the intensities was over 50% of the total intensity); 4) Quantitative values for the peaks that met 1), 2) and 3) monitored at m/z 98, were higher than the concentrations obtained from the S/N3 for the standard calibration solution (DCB - 0.021×10^3 μg/g lipid, TCB - 0.065×10^3 μg/g lipid).

2. The samples were judged positive when their peaks obtained met all of 1)-4); otherwise, they were judged negative.

しては、両抽出法により得られた DCB および TCB 濃度が同一である必要はなく、検知に十分な量が抽出できると同時に、検知の妨害になるピークが無く、正しく判定できることが重要である。振とう抽出法は、1 時間程度で ACB 類の抽出が可能であり、ソックスレー抽出に比べ 1/6 程度と大幅な作業時間の短縮が可能であった。このように振とう抽出法を評価した結果、検討した食品に対してソックスレー抽出法の代替とすることが可能であり、検査の迅速化が図れるものと考えられた。

まとめ

照射食品の検知法の迅速化を目的として、振とう抽出法の評価を実施した。振とう抽出法による DCB および TCB の抽出効率は、ソックスレー抽出法と比較して顕著な差は認められず、当該化合物を良好に抽出可能であった。また、振とう抽出法を用いた場合も、4 種の食品の未照射試料と照射試料に対して、正しく照射の判定が可能であった。振とう抽出法はソックスレー抽出法と比較すると大幅な抽出時間の短縮が可能であった。

要 旨

アルキルシクロブタノン法は、食品中の脂質から放射線照射特異的に生じる 2-ドデシルシクロブタノン (DCB) と 2-テトラデシルシクロブタノン (TCB) を検知指標として照射の有無を判定する方法である。DCB および TCB の抽出法としては、ソックスレー抽出法が広く用いられているが、長時間を要する欠点がある。本研究では、分析法の迅速化を目的として、抽出時間の短縮が期待される振とう抽出法の評価を実施した。振とう抽出法により抽出された DCB 量は、ソックスレー抽出と比較すると、牛肉で 86 ~ 104 %、豚肉で 77 ~ 99 %、鶏肉で 108 ~ 121 %、およびサーモンで 82 ~ 96 % であった。また、TCB 量はソックスレー抽出法と比較すると、牛肉で 85 ~ 108 %、豚肉で 90 ~ 120 %、鶏肉で 101 ~ 107 %、およびサーモンで 93 ~ 101 % であった。また、両抽出法で得られた SIM クロマトグラムに顕著な違いは認められなかった。以上より、振とう抽出法とソックスレー抽出法の当該化合物の抽出効率に顕著な違いはないと考えられた。さらに、肉類およびサーモンの未照射と照射試料に対

して、振とう抽出法を適用した場合でも照射の判定が正しく可能であるか評価した。全ての試料について振とう抽出法でも未照射および照射の判定が正しく行え、各判定項目の内容についてもソックスレー抽出と同様に判定に支障は無かった。以上の結果より、振とう抽出法は、ソックスレー抽出に比べ 1/6 程度に作業時間の短縮が可能であることから、検査の迅速化が図れるものと考えられた。

参考文献

- 1) 放射線照射された食品の検知法. 食安発 0910 第 1 号 (平成 24 年 9 月 10 日).
- 2) European Committee for Standardization. Foodstuffs - Detection of irradiated food containing fat - Gaschromatographic/Mass spectrometric analysis of 2-alkylcyclobutanones. EN1785. (2003).
- 3) Obana, Hirotaka et al. Analysis of 2-alkylcyclobutanones with accelerated solvent extraction to detect irradiated meat and fish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53**, p.6603-6608 (2005).
- 4) Tewfik, I.H. et al. A rapid supercritical fluid extraction method for the qualitative detection of 2-alkylcyclobutanones in gamma-irradiated fresh and sea water fish. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. **50**, p.51-56(1999).
- 5) Horvatovich, P. et al. Supercritical fluid extraction of hydrocarbons and 2-alkylcyclobutanones for the detection of irradiated foodstuffs. *Journal of Chromatography A*. **897**, p.259-268(2000).
- 6) Stewart, E.M. et al. Isolation of lipid and 2-alkylcyclobutanones from irradiated foods by supercritical fluid extraction. *Journal of AOAC International*. **84**(3), p.976-986(2001).
- 7) Takahashi, Kunihiro et al. Rapid analysis of 2-alkylcyclobutanones in irradiated meats, cheese and salmon by direct solvent extraction followed by GPC. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. **54**(3), p.173-177(2013).
- 8) Tewfik, I. A rapid direct solvent extraction method for the extraction of cyclobutanones from irradiated chicken and liquid whole egg. *Inter-*

- national Journal of Food Science and Technology*.
43, p.108-113(2008).
- 9) Chen, Susu et al. Identification of irradiated prawn (*Penaeus monodon*) using thermoluminescence and 2-alkylcyclobutanone analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59, p.78-84 (2011).
- 10) 日本食品分析センター編集. 分析者が解説 栄養表示のための成分分析のポイント. 中央法規出版株式会社, p.22-34. (ISBN978-4-8058-4765-7).
- 11) Tsutsumi, Tomoaki et al. Detection of irradiated food using 2-alkylcyclobutanones as markers: verification of the european committee standardization method EN1785 for the detection of irradiated food containing lipids. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. 52(6), p.321-329(2011).
- (2013 年 7 月 29 日受理)