[報文]

加工食品を対象としたアルキルシクロブタノン法 (EN1785) の性能評価

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⁾, 菊地正博³⁾, 小林泰彦³⁾, 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)

³⁾ 日本原子力研究開発機構 (〒 370-1292 群馬県高崎市綿貫町 1233)

Performance Evaluation of the European Committee Standardization Method EN1785 for the Detection of Irradiated Processed Food

Tsutsumi Tomoaki^{1)*}, Adachi Rika¹⁾, Takatsuki Satoshi¹⁾, Nei Daisuke²⁾,
Kameya Hiromi²⁾, Todoriki Setsuko²⁾, Kikuchi Masahiro³⁾,
Kobayashi Yasuhiko³⁾, Matsuda Rieko¹⁾ and Teshima Reiko¹⁾

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

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

³⁾ *Japan Atomic Energy Agency, 1233 Watanuki, Takasaki-shi, Gunma 370-1292, Japan*

Summary

2-dodecylcyclobutanone (DCB) and 2-tetradecylcyclobutanone (TCB) are specific radiolytic products in irradiated lipid-containing food and can be used to detect irradiated foods. We previously reported a performance evaluation test in a single laboratory for qualitative detection methods using DCB and TCB as markers for irradiated foods. EN1785, a European Committee Standardization Method, has been widely used for qualitative detection of DCB and TCB in irradiated foods. Here, we evaluated the applicability of EN1785 to camembert cheese, liquid whole egg, sausage and eel grilled without seasoning by using our evaluation test. In this test, extracted lipids from the food were used as negative samples. The lipids spiked with DCB and TCB were used as positive samples. For each food type, 4 negative and 16 positive samples were analyzed by EN1785. All of the negative samples were judged negative and all of the positive samples were judged positive. Thus, EN1785 should be able to detect irradiation in the tested food. Additionally, to confirm the ability of the validated method to detect irradiated food, the same type of food examined above, both unirradiated and irradiated at doses of 0.5-4 kGy, were analyzed by the method. All of the unirradiated samples were judged negative and all of the irradiated samples were judged positive.

Key words: Irradiated food (放射線照射食品), 2-dodecylcyclobutanone (2-ドデシルシクロブタノン), 2-tetradecylcyclobutanone (2-テトラデシルシクロブタノン), European standard EN1785 (ヨーロッパ標準分析法 EN1785), processed food (加工食品)

*連絡先: tutumi@nihs.go.jp

はじめに

日本国内では食品衛生法により、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）は認められていない。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。

脂肪を含む動物性食品を対象にした照射の検知法に 2-アルキルシクロブタノン（ACB）法がある。ACB 法は食品中の脂質から照射特異的に生成する ACB 類を検知指標とする定性試験法である。照射により食品中で生成する ACB 類は単一物質ではなく、前駆体となる脂肪の側鎖に応じた種々の ACB 類が生成する¹⁾。ACB 類の中でも、パルミチン酸及びステアリン酸から照射により生成する、2-ドデシルシクロブタノン（DCB）及び 2-テトラデシルシクロブタノン（TCB）を検知指標とすることが一般である。これらの ACB 類を検知指標とした ACB 法は欧州標準化委員会の標準分析法（EN1785）²⁾ に採用されており、日本においても平成 22 年に公定法として通知³⁾ されている。

日本の ACB 法の通知では単一試験室における ACB 法の性能評価方法が示されており、ACB 法を試験室に導入する際は定性試験法としての十分な性能を達成できているか評価する必要がある。また、通知では EN1785 に従った試験溶液の調製方法が例示されているが、それ以外の調製方法を用いた ACB 法^{4)~9)} も性能評価を実施し満足する結果が得られれば使用することが可能である。EN1785 は最も汎用されている ACB 法であり、食品試料からソックスレー抽出により脂肪を抽出した後、フロリジルカラムで精製を行い、DCB 及び TCB をガスクロマトグラフ質量分析計（GC/MS）により検出する。我々は EN1785 の牛肉、豚肉、鶏肉、及びサーモンへの適用について、通知に記載の性能評価方法により、これらの食品への適用性を検証してきた¹⁰⁾。しかし、諸外国ではこれらの食品以外にも加工品を含む種々の食品に照射が行われており、日本へ誤って輸入される可能性が考えられる。そこで、本研究

では通知に記載の性能評価方法により EN1785 の液卵、カマンベールチーズ、ソーセージ、及びウナギ白焼きへの適用性を評価した。

実験方法

1. 試料

鶏卵、カマンベールチーズ、ソーセージ、及びウナギ白焼きは、東京都内のスーパーマーケットで購入した。鶏卵を割卵し卵黄と卵白をミキサーにより混合均一化したものを液卵とした。鶏卵以外の試料は、ミキサーにより細切均一化した。照射試料の作製は、均一化した試料をポリエチレン袋等に入れ、ドライアイス存在下で凍結状態に保ち、Gamma Cell 220 (⁶⁰Co γ source, Nordion) あるいは(独)日本原子力研究開発機構高崎量子応用研究所のガンマ線照射施設 (⁶⁰Co) にて線量率一定 (2 kGy/h) で照射時間を変えることにより、0.5 ~ 4 kGy を目標に γ 線を照射した。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 $\pm 10\%$ 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。照射処理後、試料は -30℃ で保存し、1 ヶ月以内に分析に供した。

2. ACB 類の分析

通知³⁾ に例示されている EN1785 に従った。

2-1. 試験溶液の調製

試料 20 g と約 2 倍量の無水硫酸ナトリウムを混合後、ヘキサンを溶媒に使用してソックスレー抽出 (6 時間) を行った。なお、液卵については 3 mm 程度の厚さとし、100℃ で 2 時間乾燥させた後、ブレンダーで均一化した試料を分析に供した。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。

2-2. GC/MS による ACB 類分析

Agilent 7890A/5975C GC/MSD を使用し、次の条件により ACB 類を分析した。分析カラム: DB-5ms (30 m × 0.25 mm i.d., 膜厚 0.25 μm, Agilent Technologies 社製); 昇温条件 1 (液卵, カマンベールチーズ, ソーセージ): 60℃ (1 min) → 8℃ /min → 300℃ (5 min); 昇温条件 2 (ウナギ白焼き): 60℃ (1 min) → 8℃ /min → 210℃ (0 min) → 5℃ /min → 230℃ (0 min) → 10℃ /min → 300℃ (8 min); キャリヤーガス: ヘリウム (1 mL /min); 注入口温度: 250℃; Transfer line 温度: 280℃; イオン源温度: 230℃; 四重極温度: 150℃; イオン化電圧: 70eV (EI+); 注入量: 1 μL (スプリットレス注入); SIM 測定 (定量イオン m/z 98, 確認イオン m/z 112, 3.1 サイクル / 秒); スキャン測定 (m/z 95 ~ 115, 1.9 スキャン / 秒)

DCB および TCB は内部標準法により定量した。各濃度の検量線用標準溶液における内標準物質に対する DCB 及び TCB の相対感度を求め、それらの平均値を定量計算に使用した。

3. 単一試験室における ACB 法の性能評価方法

通知³⁾に記載されている性能評価方法に従い EN1785 の各食品に対する適用性を評価した。評価の対象となる食品から抽出した脂肪を陰性試料とした。また抽出した脂肪に、DCB 及び TCB をそれぞれ 0.05 μg/g 添加し、陽性試料とした。DCB 及び TCB の添加濃度は、鶏肉への放射線照射の文献値¹¹⁾から、約 0.5 kGy 以上を照射した際の生成量に相当すると思われる。陰性試料は 1 日 2 併行により 2 日間、また陽性試料は 1 日 4 併行により 4 日間の分析を EN1785 に従い実施した。分析結果は以下に示す判定基準に基づき陰性、あるいは陽性を判定した。なお、本判定基準は EN1785²⁾に既述されている判定基準に準じている。

- 1) DCB 及び TCB と同じ保持時間に、 m/z 98 及び m/z 112 に S/N3 以上のピークを認める。
- 2) 1) で認められたピークについて m/z 98 及び m/z 112 で観測される面積比は、 m/z 98 において近似した面積を与える検量線用標準溶液から得られるピーク的面積比の ± 20% 以内である。
- 3) 1) で認められたピークの保持時間付近で m/z

95 から m/z 115 の範囲でスキャン測定を行うとき、 m/z 98 及び m/z 112 が主要イオンである。

- 4) 上記 1) から 3) の項目を満たしたピークの定量値が、検量線用標準溶液の S/N3 から求めた濃度以上である。なお、本研究で検量線用標準溶液の SIM クロマトグラム (m/z 98) から求めた S/N3 に相当する濃度は、DCB が 0.021 ng/mL, TCB が 0.065 ng/mL であった。試料中の濃度に換算すると、DCB が 0.021×10^{-3} μg/g lipid, TCB が 0.065×10^{-3} μg/g lipid であった。

各試料で得られたピークについて、1) から 4) の項目を全て満足する時に陽性と判定し、一つでも満足しない時は陰性と判定した。評価する食品について 4 個の陰性試料が全て陰性であり、16 個の陽性試料が全て陽性である時、EN1785 のその食品への適用が妥当であると判断した。

実験結果および考察

単一試験室における EN1785 の加工食品に対する性能評価

既述した単一試験室における ACB 法の性能評価方法に従い、EN1785 の液卵、カマンベールチーズ、ソーセージ、及びウナギ白焼きに対する適用性を評価した。各食品試料について陰性試料 4 個及び、陽性試料 16 個について得られた分析結果を表 1 に示した。各食品について、陰性試料 (4 試料) では DCB 及び TCB は共に検出されず、全て陰性と判定された。一方、陽性試料 (16 試料) では両化合物が検出され、既述した判定基準を満たしたことから全て陽性と判定された。従って対象とした加工食品について本法の適用が妥当であると判断できた。評価した陽性試料数から本法は偽陰性率が約 17% の性能で照射の有無を判定することが可能であると考えられる。なお、上述の判定には支障が無かったが、DCB の m/z 112 のクロマトグラム上で DCB の直前に夾雑物由来のピークが出現することがあり、DCB ピークの同定にはやや注意を要する場合があった。一例として、夾雑物由来のピークが大きかったカマンベールチーズの陰性試料と陽性試料のクロマトグラフを図 1 に示した。また、ウナギ白焼きについては夾雑物由来のピークが TCB と重なったため、GC の昇温条件を変更し TCB と分離した。DCB の回収率は液卵で 110% から 149%、カ

Table 1 Analysis of positive and negative samples for evaluation of the detecting ability of EN1785.

Food	ACBs	Sample	No. of samples	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)	
				m/z 98	m/z 112				
Camembert cheese	DCB	Negative	4	—	—	—	5 ~ 6	—	All positive
		Positive	16	70 ~ 106	67 ~ 111	— 4 ~ 4	56 ~ 62	0.049 ~ 0.070	All positive
	TCB	Negative	4	—	—	—	8 ~ 12	—	All negative
		Positive	16	63 ~ 96	35 ~ 122	— 9 ~ - 2	73 ~ 80	0.038 ~ 0.057	All positive
Liquid whole egg	DCB	Negative	4	—	—	—	8 ~ 12	—	All negative
		Positive	16	80 ~ 135	62 ~ 177	— 2 ~ 5	59 ~ 65	0.055 ~ 0.074	All positive
	TCB	Negative	4	—	—	—	1 ~ 4	—	All negative
		Positive	16	64 ~ 156	38 ~ 93	— 7 ~ - 3	67 ~ 75	0.053 ~ 0.073	All positive
Sausage	DCB	Negative	4	—	—	—	21 ~ 22	—	All negative
		Positive	16	72 ~ 140	27 ~ 62	— 4 ~ 6	61 ~ 69	0.054 ~ 0.067	All positive
	TCB	Negative	4	—	—	—	0 ~ 9	—	All negative
		Positive	16	31 ~ 66	17 ~ 51	— 9 ~ 0	61 ~ 67	0.047 ~ 0.060	All positive
Eel grille without seasonig	DCB	Negative	4	—	—	—	14 ~ 21	—	All negative
		Positive	16	44 ~ 100	26 ~ 54	— 4 ~ 3	64 ~ 71	0.054 ~ 0.064	All positive
	TCB	Negative	4	—	—	—	12 ~ 22	—	All negative
		Positive	16	30 ~ 67	22 ~ 43	— 3 ~ 1	62 ~ 69	0.048 ~ 0.053	All positive

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 $\times 10^3$ µg/g lipid, TCB-0.065 $\times 10^3$ µg/g lipid).

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

Fig.1 SIM chromatograms of DCB in negative and positive camembert cheese samples monitored at m/z 98 and 112.

*The asterisk indicates an impurity eluting just before DCB.

マンベールで96%から141%,ソーセージで107%から134%,ウナギ白焼きで108%から127%であった。TCBの回収率は液卵で106%から145%,マンベールで75%から114%,ソーセージで93%から120%,ウナギ白焼きで96%から107%であった。回収率が顕著に低く,判定が困難となるような食品は認められなかった。

EN1785は試験室間共同試験により,液卵及びカ

マンベールチーズについて照射検知の妥当性が確認されている^{2),12)}。これらの報告では γ 線照射した食品を用いて試験が実施されており,1 kGy以上を照射した試料に対して,EN1785の妥当性が示されている。本研究で実施した単一試験室における評価の結果は,これらの試験室間共同試験の結果を支持するものであった。また,EN1785のソーセージ及びウナギ白焼きに対する照射検知の妥当性確認は実施されていない。本性能評価の結果から,EN1785がこれらの食品の照射検知に利用可能であることが示された。

EN1785による照射した加工食品の分析

妥当性評価したEN1785の検知性能を確認するため,液卵,カマンベールチーズ,ソーセージ及びウナギ白焼きに種々の線量(0.5~4 kGy)を照射し,本法により照射の有無を判定した。未照射試料ではDCB及びTCBは検出されず,全ての試料が陰性と判定された。一方,全ての照射試料でDCB及びTCBが検出され,既述した判定項目に従い判定した結果,全ての試料が陽性と判定された。試験した食品で検出されたDCB及びTCB濃度を表2に示した。いずれの食品についても照射した線量が高くなるほど当該化合物の検出濃度も増加した。また,両化合物の検出濃度は同一線量を照射した試料でも食品種が異なると大きく異なる場合がみられ,特にソーセージではTCBの検出濃度が他の食品よ

Table 2 Concentrations ($\mu\text{g/g}$ lipid) of DCB and TCB detected in irradiated food by EN1785¹.

Food	ACBs	Dose (kGy)				
		0	0.5	1	2	4
Camembert cheese	DCB	N.D. ²	0.094	0.23	0.50	1.0
	TCB	N.D.	0.032	0.081	0.20	0.43
Liquid whole egg	DCB	N.D.	0.085	0.21	0.45	0.92
	TCB	N.D.	0.025	0.065	0.16	0.34
Sausage	DCB	N.D.	0.051	0.092	0.18	0.48
	TCB	N.D.	0.084	0.16	0.35	0.85
Eel grilled without seasoning	DCB	N.D.	0.075	0.15	0.33	0.58
	TCB	N.D.	0.023	0.048	0.11	0.21

1. Samples ($n = 2$) irradiated with respective doses were analyzed by EN1785. The figures are average concentration ($\mu\text{g/g}$ lipid).

2. N.D.: not detected

Fig. 2 SIM chromatograms of DCB and TCB in irradiated food samples (0-2 kGy) monitored at m/z 98.

りも顕著に高かった。ソーセージの脂肪を構成する TCB の前駆体となるステアリン酸の量が他の食品と比較すると多いことが考えられた。図 2 には各食品の SIM クロマトグラムを示した。照射試料では DCB 及び TCB の明瞭なピークが認められている。食中毒防止や貯蔵期間延長の殺菌目的に使用される線量は一般的に約 1 kGy 以上であることから、先に評価した EN1785 は実用されている線量で照射された食品に対して十分な検知性能を有することが確認できた。

まとめ

単一試験室における ACB 法の性能評価方法により、EN1785 の液卵、カマンベールチーズ、ソーセージ、及びウナギ白焼きへの適用性を評価した。その結果、これらの加工食品 4 種について本法の適用が妥当であると判断できた。さらに、種々の線量で照射した加工食品 4 種を使用し、妥当性評価した EN1785 の検知性能を確認した結果、実用されている線量で照射された当該食品に対して十分な検知性能を有していた。

要 旨

2-アルキルシクロブタノン (ACB) 法は、食品中の脂質から放射線照射 (以下、照射) に特異的に生じる 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定性試験法である。本研究では、我々が既に報告している ACB 法の単一試験室における性能評価方法を用いて、汎用されている ACB 法であるヨーロッパ標準分析法 (EN1785) の液卵、カマンベールチーズ、ソーセージ、及びウナギ白焼きに対する適用性を評価した。未照射の各食品から抽出した脂肪を陰性試料、陰性試料に DCB 及び TCB を 0.05 µg/g lipid 添加した脂肪を陽性試料とした。各食品について 4 個の陰性試料、及び 16 個の陽性試料を分析し、本法の検知性能を評価した。本法は各食品の陰性及び陽性試料を全て正しく判定でき、これらの食品への適用が妥当であると判断できた。次に妥当性評価した本法の検知性能を確認するため、未照射及びガンマ線照射 (0.5 ~ 4 kGy) した上記と同種の食品を本法により分析した。その結果、全ての試料について照射の有無を正しく判定することができ、実用されている線量で照射された食品に対して十分な検知性能を有していた。

参考文献

- 1) Nawer W. W.. Volatiles from food irradiation. *Food Reviews International*. **2**(1), p.45-78 (1986).
- 2) European Committee for Standardization. Foodstuffs - Detection of irradiated food containing fat - Gaschromatographic/Mass spectrometric analysis of 2-alkylcyclobutanones. EN1785. (2003).
- 3) 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. 食安発第 0330 第 2 号. (平成 22 年 3 月 30 日) [最終改正: 食安発第 0910 第 1 号 (平成 24 年 9 月 10 日)]
- 4) 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).
- 5) 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).
- 6) Obana H. 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).
- 7) Tewfik I.. A rapid direct solvent extraction method for the extraction of cyclobutanones from irradiated chicken and liquid whole egg. *International Journal of Food Science and Technology*. **43**, p.108-113 (2008).
- 8) Chen S. 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).
- 9) Takahashi K. 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).
- 10) Tsutsumi T. 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).
- 11) 田辺寛子ほか. 2-アルキルシクロブタノン法による照射鶏肉の検知. *食品照射*. **36**, p.26-32 (2001).
- 12) Stevenson M.H.. "Validation of the cyclobutanone protocol for detection of irradiated lipid containing foods by interlaboratory trials." Detection methods for irradiated foods. McMurray C. H. et al. eds. London, The Royal Society of Chemical, p.269-284 (1996).

(2014 年 7 月 29 日受理)