γ 線照射のグレープフルーツ中の β -ピネン及び発芽に与える影響

(昭和63年6月23日受理)

内山 貞夫^{*1} 長島きみよ^{*2}
河村 葉子^{*1} 斎藤 行生^{*1}

Effects of γ -Irradiation on β -Pinene Content and Germination in Grapefruit

Sadao UCHIYAMA^{*1}, Kimiyo NAGASHIMA^{*2}, Yoko KAWAMURA^{*1} and Yukio SAITO^{*1}

(^{*1}National Institute of Hygienic Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo, Japan;

^{*2} Kyoritu Pharmaceutical College: 30-5-1, Shibakoen, Minato-ku, Tokyo, Japan)

Effects of γ -irradiation on β -pinene content and germination in grapefruit were investigated in order to develop a method to identify γ -irradiated grapefruit.

β -Pinene is a component of essential oil in grapefruit and was reported to be susceptible to γ -irradiation. However, it was not degraded by irradiation (30 to 200 krad) in this experiment. When grapefruit irradiated at 50 krad were stored at 10°C for 2 months, no change of β -pinene content was found. β -Pinene itself was also stable to γ -irradiation at 1 Mrad. Thus, identification of irradiated grapefruit from the amount of β -pinene was impossible.

On the other hand, the effect of γ -irradiation on radicle elongation was small but that on plumule expansion was so large as to prevent shooting in grapefruit irradiated even at 30 krad. Therefore it should be possible to identify γ -irradiated grapefruit by a germination method.

(Received June 23, 1988)

Key words: グレープフルーツ grapefruit; γ 線照射 γ -irradiation; 照射食品 irradiated food; β -ピネン β -pinene; 発芽 germination; 精油成分 essential oil

緒 言

我が国ではかんきつ類であるグレープフルーツ、オレンジ、レモンのほとんどを米国など諸外国からの輸入に依存している。米国ではこれらかんきつ類に寄生するミバエの殺虫駆除に二臭化エチレン (EDB) を使用してきたが、その毒性が認められて以来使用禁止に踏切り、それに代わるものとして1986年4月より γ 線照射 (100 krad 以下) によるミバエ殺虫を許可した。現在、日本では照射食品として、発芽防止の目的でジャガイモの γ 線照射 (15 krad 以下) のみが許可され、他の食品に対しては認められていない^{1)~4)}。従って、輸入食品の監視上の点からも照射グレープフルーツの検知法の確立は急務と言わざるを得ない。

照射食品の検知法としては、構成成分の変化、物理化学的な変化、酵素活性の消長、組織化学的な変化、微生物菌相の変化などを指標とする方法が報告されてい

る^{5), 6)}。しかし実用上有効な検知法はなかなか見いだせないのが実状である。

本研究では、グレープフルーツの照射に関する研究で Moshonas⁷⁾ らが精油成分中の β -ピネンが分解することを報告していることに着目し、 β -ピネンの変動に基づく検知法の可能性を調べた。また同時に放射線に極めて感受性の高い発芽に対する予備的実験を行ったので併せて報告する。

実験方法

1. 試 料

実験に使用したグレープフルーツは米国、カルフォルニア産、Marsh White 種。収穫時期は8月中旬。あらかじめロット間で試料を混合し実験に供した。グレープフルーツ1個の重量は約500 g である。また種なしの品種ではあるが、平均2個の種子 (重量、200 mg 以上) を採取できた。

2. γ 線照射設備

各試料は東京都立アイソトープ総合研究所による AL

^{*1} 国立衛生試験所: 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

^{*2} 共立薬科大学: 東京都港区芝公園 1-5-30

Fig. 1. Gas chromatogram of essential oil in a grapefruit
Peak b: β -pinene; other peaks: see Table 1

-Table 型 ^{60}Co -線照射装置で照射した。グレープフルーツの照射は線源 3,000 Ci, 線量率 3~12 krad/hr で室温 (25°) 下 30~200 krad の範囲で照射した。

β -ピネン自体に関しては、試験溶液をガラス製試験管にとり密栓し、脱気せずそのまま室温 (25°) 下で照射した。線源 5,000 Ci, 線量率 300 krad/hr で 1 Mrad 照射した。

3. 試 薬

精油成分標準品 (α -ピネン, β -ピネン, ジペンテン, 酢酸イソオクチル, n -ノニルアルデヒド, sec -オクチルアルコール, シトロネラール, 酢酸 n -オクチル, n -デシルアルデヒド, リナロール, n -オクチルアルコール, テレピネオール, 酢酸 n -デシル, 酢酸ゲラニル, シトロネロール) は和光純薬工業(株)製, 化学用を使用した。 n -ヘキサンなど有機溶媒は使用前に蒸留精製したものを使用した。

4. 精油成分の抽出

グレープフルーツの外果皮 (epicarpophoderm) 50 g (コルク層を除く) を細切した後, 精製水 50 ml を加えて水で冷却しながら, 1~2 分間ホモジナイザーで破碎均一化した。ホモジネートは精製水 150 ml を用いてディーン・スターク蒸留フラスコに移し, n -ヘキサン 10 ml を加え, 沸騰石を入れた後, 1 時間加熱還流し, 精油成分を抽出した。 n -ヘキサン抽出液は液相分離用紙 (アドバンテック東洋, No. 2S) を用いてろ過した後, トラップ及び冷却部を 10 ml の n -ヘキサンで洗い, n -ヘキサン抽出液に合わせた。 n -ヘキサン抽出液を無水 Na_2SO_4 の少量で脱水した後, n -ヘキサンで全量を 20 ml に定容し, ガスクロマトグラフィー (GC) 用試験溶液とした。

抽出法の別法として, A 法は外果皮のホモジネートにアセトン 50 ml を加えた後, n -ヘキサン 75 ml で抽出し, 脱水後 20 ml に濃縮し試験溶液とした。B 法は外果皮のホモジネートを吸引ろ過し, 残留物とろ液 (精油を含む) に分け, ろ液について n -ヘキサン 20 ml で抽出し, 脱水し試験溶液とした。

5. GC 及び GC/MS

精油成分中の β -ピネンの分析は以下のような GC 条件で行った。

ガスクロマトグラフ: Hewlett Packard 社製ガスクロマトグラフ 5890A 型; カラム: Carbowax 20M, 25 m $\times$ 0.2 mm i.d. (キャピラリーカラム); カラム温度: 初期温度 50°, 初期時間 4 分, 最終温度 200°, 最終時間 5 分, 昇温 4°/min; キャリアーガス: N_2 , 1.2 ml/min; 注入量: 1 μl ; 検出器: FID。

GC/MS の条件は以下のとおりである。

GC/MS: 日本電子(株)製, JMS-DX300, GC/MS; カラム, Carbowax 20M, 25 m $\times$ 0.2 mm i.d.; カラム温度 50~200°; キャリアーガス, He 1.5 kg/cm²; イオン化電流/電圧, 300 μA /70 eV; 注入量, 1 μl 。

6. 発芽試験

グレープフルーツより重量 200 mg 以上の種子約 10 個を採取し, シャーレ内の精製水で湿らせた脱脂綿上に並べ, 暗所, 23° に放置し, 観察した。実験開始 2~3 日後, カビが生えた場合は種子をよく洗浄し, 脱脂綿を新しいものと交換した。

実験結果

1. 精油成分の抽出

精油成分の変動に関する実験に先立ち, グレープフルーツの精油成分を効率良く抽出する方法を比較検討し

た. まず Moshonas⁷⁾らの方法に準じ, n -ヘキサンによる直接抽出法 (A 法) を検討したが, 精油成分を含む外果皮の部分に塗布されている高分子のワックス類がヘキサンに抽出され, キャピラリーカラムを劣化させる危険性があった. そこで外果皮をホモジナイズした後, 残留物を吸引ろ過して除き, ろ液に n -ヘキサンを加えて精油成分を抽出する方法 (B 法) を検討した. また一般的な精油成分の抽出法に準じて, 実験方法の部に記述したディーン・スターク蒸留装置を用いる方法 (C 法, Scheme 1) の 3 種の方法を比較した. その結果, 有機溶媒による抽出法 A, B 法ともに同様の GC-ピークパターンとピーク高さを示したのに対して, ディーン・スターク抽出法 (C 法) は前 2 者とピークパターンにおいて変わらないものの, 大幅に抽出効率を上げることができた. すなわち, β -ピネン量 (Fig. 1, ピーク b) の比較では 3.4 倍も抽出率を高めることができた.

Table 1. Retention Times of Standard Substances Contained in Essential Oil of a Grapefruit

Peak	Substance	Retention time (min)
a	α -Pinene	2.1
b	β -Pinene	2.85
c	Dipentene	4.0
d	Isooctyl acetate	10.05
e	n -Nonyl aldehyde	10.05
f	<i>sec</i> -Octyl alcohol	11.1
g	Citronellal	12.7
h	n -Octyl acetate	12.95
i	n -Decyl aldehyde	13.4
j	Linalool	15.15
k	n -Octyl alcohol	15.35
l	Terpineol	19.05
m	n -Decyl acetate	19.2
n	Geranyl acetate	21.25
o	Citronellol	21.5

See the experimental part as to the conditions of gas chromatography

2. GC の条件

キャピラリーカラムによる GC は, 従来用いられてきた充てんカラムに比べて, 分離能及び感度の向上, 分析時間の短縮などの利点がある. カラムの初期温度を 50° に, 昇温を 4°/min にして 15 種の精油成分標準品の GC を行ったところ, ほぼ満足する分離を示した. 特に保持時間の小さい β -ピネンは α -ピネンとよく分離し, 定量可能となった. なお, n -ノニルアルデヒドと酢酸イソオクチルのピークは分離しなかった. β -ピネンは試験溶液中 0~100 ppm の範囲で直線性を示した.

Table 1 は精油成分標準品のピークの保持時間を示している. β -ピネンのピークは 2.85 分に出現した.

3. γ 線照射によるグレープフルーツ中の β -ピネン量の変化

γ 線照射直後の果皮中の β -ピネン量を照射群と非照射群について比較検討した. 照射線量を 30~200 krad の範囲で変化させたときの β -ピネンの存在量を Table 2 に示す. β -ピネンは非照射のものでは 28.05~67.76 ppm 外果皮中に存在しており, 多重比較法⁸⁾によって非照射群と照射群との間で統計学的に平均値の検定を行ったところ, 有意差は認められなかった ($p > 0.05$).

なお, Fig. 2 に示すように, 200 krad 照射群においても精油成分のピークパターンは非照射群とほとんど変わらなかった.

グレープフルーツ中の β -ピネンは GC/MS によって確認した. Fig. 3 はグレープフルーツ中の β -ピネンの MS スペクトルである. なお, β -ピネン以外の精油成分も非照射群に比べて照射群に著しい差異は認められなかった.

4. 照射グレープフルーツの官能試験

30~200 krad 照射グレープフルーツと非照射グレープフルーツについて, 3 名のパネラーによる官能試験を行った. 味覚及び風味については非照射群と照射群との間に明確な相違はなかったが, 200 krad 照射群において水分の抜けたような舌触りを示した. また日焼けような褐変や著しい脱水などによる果皮表面の損傷は見いだせなかった.

5. 照射後の保存日数と β -ピネン量

50 krad で照射したグレープフルーツを 10° で 2 か月

Table 2. Effect of γ -Irradiation on β -Pinene Content in Grapefruit Peel

Group No.	Dose (krad)	Number	Amount of β -pinene (ppm)	Means	S. D.
1	0	4	29.01 67.76 29.24 28.05	38.52	19.50
2	30	4	36.45 49.45 57.06 44.69	46.91	8.64
3	50	4	30.91 42.32 67.20 83.69	56.03	23.87
4	100	4	48.98 60.24 50.56 45.01	51.20	6.46
5	200	4	55.64 35.34 47.31 31.15	42.36	11.19

The difference is not significant ($p > 0.05$) by the multi-comparison method.

Fig. 2. Gas chromatogram of essential oil in a grapefruit γ -irradiated at 200 krad
Peak b: β -pinene; other peaks: see Table 1

Fig. 3. Mass spectrum of β -pinene obtained from a grapefruit

間保存し、 β -ピネン含有量の変化を調べた。非照射群では 28.05~67.76 ppm の β -ピネンを含有し、保存開始から 1.0 か月まで増加しているように見られたものの、2 か月では変化はなかった。実用線量と推定される 50 krad 照射群では 30.91~83.69 の β -ピネンを含有し、2 か月間保存中の大幅な変化は認められなかった (Fig. 4)。

一方、各時期における非照射群と照射群の β -ピネンの平均値の比較を行った結果、いずれの場合も有意差は認められなかった。

6. β -ピネンの照射分解

β -ピネンそのもの、*n*-ヘキサン及びエタノール溶液中の β -ピネンに高線量 1 Mrad の γ 線を照射し、 β -ピネンの照射分解の程度を調べた。

Fig. 5-A の β -ピネンの GC ピークに見られるように、非照射群に比べて照射群には有意差はなく、照射による変化はなかった。つぎに *n*-ヘキサン中の β -ピネン (濃度 10 mg/ml) では Fig. 5-B に見られるように 20% の減少があり、照射分解が確認された。エタノール中の β -ピネン (濃度 20 mg/ml) では Fig. 5-C に見られるように照射分解は認められなかった。

7. 照射グレープフルーツの発芽実験

照射グレープフルーツの種子の発芽及び発根状態を調べるための予備実験を行った。非照射グレープフルーツ及び 30 krad, 50 krad, 100 krad 及び 200 krad の照射グレープフルーツ種子について、23°で約 1 か月間発芽・発根実験を行った結果を Table 3 に示す。なお、本

Fig. 4. Time course of β -pinene in a grapefruit γ -irradiated at 50 krad for the duration of storage at 10° for 2 months
a: not irradiated; b: irradiated

Fig. 5. Gas chromatograms of β -pinene γ -irradiated at 1 Mrad in *n*-hexane and ethanol
A: β -pinene itself; B: β -pinene in *n*-hexane; C: β -pinene in ethanol; a: not irradiated; b: irradiated

The values in the b peaks represent a percentage relative to the non irradiated control (a) (means $\pm$ S.D., $n=4$).

* $p < 0.05$

実験では発芽とは幼芽の出現を、発根とは幼根の出現をいい表すことにした。

発根状態は実験開始後 6 日後で 30 krad 照射群を除

くすべての群に見られ、10 日後では 30 krad でも発根が観察された。19 日後では非照射群にのみ発芽が見られたのに対して、照射群ではいずれの照射線量でも発芽

は見られなかった。さらに28日後では非照射群はすべて発根及び発芽が生じたが、照射群では発芽は全く認められなかった。Fig. 6の写真は実験開始後28日の非照射群、30 kradと50 krad照射群の発根、発芽状態を示している。

考 察

Moshonas ら⁷⁾はグレープフルーツ果皮中の β -ピネン量0.019%が50 kradの γ 線照射によって消滅すると報告している。この報告をもとに β -ピネンを指標とした照射グレープフルーツの検知法を検討した。

Moshonas らは β -ピネンの分析法として直接抽出法を採用している。この方法では果皮表面上に塗布されているワックス類やグレープフルーツ由来の高沸点物質も

抽出され、GCによって定量する際にキャピラリーカラムを劣化させる危険性がある。そこでディーン・スターク蒸留装置を用いて抽出したところ、高分子化合物や高沸点物質を抽出する危険性が減少した上に、より効率よく β -ピネンなどの精油成分を分離することができた(Scheme 1, Fig. 1)。

この方法によって分析したグレープフルーツ果皮中の β -ピネン量は、非照射群及び30~200 krad照射群において各群とも著しい個体差があり、推計学的検定を行ったところ、いずれの照射群も非照射群に比べて有意差はなかった。すなわち、Moshonas らの報告と異なる結果を示した(Table 2)。

Table 3. Effect of γ -Irradiation on Germination of Grapefruit Seeds

Incubation period (Day)	Germination (%) Root/(Shoot)				
	Dose (krad)				
	0	30	50	100	200
6	53.8 (0)	0 (0)	33.3 (0)	16.7 (0)	9.1 (0)
10	86.6 (0)	11.1 (0)	50.0 (0)	16.7 (0)	36.4 (0)
19	100.0 (100.0)	88.9 (0)	83.3 (0)	50.0 (0)	72.7 (0)
28	100.0 (100.0)	89.9 (0)	83.3 (0)	50.0 (0)	72.7 (0)

The values in the parenthesis represent shoot-
ing rates.

Grapefruit peel (50 g)
| add distilled water (50 ml)
| homogenize in ice
|
| Extracts
| add distilled water (150 ml)
| add *n*-hexane (10 ml)
| extract with Dean-Stark
| apparatus for an hour
|
| *n*-Hexane phase
| dry over anhydrous Na₂SO₄
| add *n*-hexane
|
| Test solution (20 ml)
|
| Gas chromatography
| (FID, Carbowax 20M, 25 m×0.2 mm)

Scheme 1. Operating procedures of determination of β -pinene in grapefruit peel

Fig. 6. Germination of grapefruit seeds not irradiated and irradiated at 30 krad and 50 krad
The photogram indicates the germination state of three groups in 28 days after irradiation.

次に、照射後の保存中に β -ピネンが減少するか否かを調べるために、50 krad 照射後 2 か月間 10° で保存し、 β -ピネン量の変動を調べた。その結果、保存中の β -ピネン量に変化は見られず、酵素系などの作用による β -ピネン含有量の増減は考えられなかった (Fig. 4)。

Moshonas⁷⁾らは収穫直後のグレープフルーツに照射実験を行っているが、本実験では日本に運搬されるのに要する日数、20 日間以上余分に熟度の増したグレープフルーツを用いている。さらに Moshonas らはフロリダ産のグレープフルーツを使用したのに対し、本実験ではミバエ寄生の恐れがなく γ 線照射のされていないカルフォルニア産のグレープフルーツを用いている。しかし、これら熟度、産地の違いによる要因は、 β -ピネンの照射分解の相違を説明するのに十分な相違点とも考えられない。

そこで β -ピネンの照射分解の程度を直接調べるために、高線量である 1 Mrad 照射し、GC で残存 β -ピネン量を求めた。その結果、 β -ピネンそのもの及びエタノール溶液中の β -ピネンは照射しても分解はないが、 n -ヘキサン溶液中の β -ピネンは 20% の減少が認められた (Fig. 5)。

恐らく n -ヘキサン中ではラジカル反応が容易に行われ、 β -ピネンが変化したものと考えられる。一方、OH ラジカルの生ずる可能性のある極性溶媒エタノール中で β -ピネンが分解しなかったのは、実際のグレープフルーツ中の β -ピネンでも照射分解が極めて少ないことを推定させた。すなわち、 β -ピネンは比較的 γ 線照射に対しては安定であり、Moshonas らの照射による β -ピネン量の減少の報告はグレープフルーツ自体の個体差から生じたものと推定される。以上の結果より、 β -ピネンの増減で γ 線照射の有無を判別するのは非常にむずかしいことが判明した。

なお、Moshonas ら⁹⁾は 60 krad の照射線量でグレープフルーツの風味に異状を生ずると報告しているが、本実験では 100 krad までの照射グレープフルーツにおいて風味、味覚についての明確な差異を判定するに到らなかった。

一方、 γ 線照射のグレープフルーツの発芽に与える影響は著しいものがあつた。発根は 30~200 krad 照射群においても確認できるものの、発芽（ここでは幼芽の出現）は 30 krad の照射線量でも抑制されることから、この発芽を指標とする方法は有力な検知法になりうることが示唆された。今後は植物ホルモンを使用するなど、検知に要する時間を短縮したり、より詳細な検知法の検討

が必要である (Table 3, Fig. 6)。

ま と め

1) γ 線照射グレープフルーツの検知法を検討する目的で、照射による果皮中の β -ピネン量の変化と発芽への影響を調べた。

2) β -ピネンはディーン・スターク蒸留装置で抽出し、GC (キャピラリーカラム) で分析した。

3) グレープフルーツ中の β -ピネンは 30~200 krad の γ 線照射しても減少は見られず、 β -ピネンの減少を報告している Moshonas ら⁷⁾の結果と異なった。また 100 krad 以下では官能的に差異を検知するに到らなかった。

4) 50 krad 照射群を 2 か月間保存しても非照射群に比べて β -ピネン量に差がなかった。

5) β -ピネン自体は比較的 γ 線照射に安定であり、1 Mrad 照射しても分解しないことから、 β -ピネンを指標とする照射グレープフルーツの検知法の可能性は低かった。

6) γ 線照射はグレープフルーツの種子に対して、発根への影響は少ないものの、発芽に対して 30 krad 照射群でも抑制し、発芽を指標とする検知法の可能性は高かった。

なお、本報の一部は日本食品衛生学会第 52 回学術講演会 (1986 年 11 月、高知市) で発表したものを含む。

謝 辞

本研究を行うに当たり、御助言を賜った厚生省生活衛生局食品保健課、波平俊彦氏及び東京都立アイソトープ総合研究所、細渕和成氏に深謝します。

文 献

- 1) A Joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee: WHO Technical Report Series, **659**, 7~34 (1981).
- 2) 松山 晃: 食品衛生研究 **36**, 7~18 (1986).
- 3) 伊藤 均: 防菌防黴誌, **14**, 223~232 (1986).
- 4) 内山貞夫, 土田雅子, 宝月大輔: New Food Industry **28**, 5~10 (1986).
- 5) Commission of the European Communities: "The Identification of Irradiated Foodstuffs, International Colloquium" p. 17~360 (1973), Office for Official Publications of the European Communities, F. R. Germany.
- 6) 林 徹: 原子力工業, **31**, 32~36 (1985).
- 7) Moshonas, M. G. Shaw, P. E.: J. Food Science **47**, 958~960 (1982).
- 8) 山崎 実, 野口雄次, 丹田 勝, 新谷 茂: 武田研究所報, **40**, 163~187 (1981).
- 9) Moshonas, M. G. Shaw, P. E.: J. Agric. Food Chem. **32**, 1,098~1,101 (1984).