

[報文]

ESRによるグルコースポリマー中の 照射誘導ラジカルの解析

亀谷宏美¹⁾, 中村秀夫²⁾, 鶴飼光子²⁾, 下山雄平³⁾

¹⁾ 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)

²⁾ 北海道教育大学 (〒 040-8567 北海道函館市八幡町 1-2)

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

An ESR Study of radiation induced radicals in glucose polymers

Kameya Hiromi¹⁾, Nakamura Hideo²⁾, Ukai Mitsuko²⁾ and Shimoyama Yuhei³⁾

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

²⁾ Department of Chemistry, Hokkaido University of Education, 1-2 Hachimann-cyo Hakodate 040-8567 Japan

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

Summary

Electron spin resonance (ESR) spectroscopy of both experimental and theoretical aspects revealed the gamma irradiated radicals in two glucose polymers, cellulose and starch. Prior to the irradiation, ESR signals are silent in both the glucose polymers. After the irradiation, however, a singlet signal at $g = 2.0$ was appeared in both the glucose polymers. The twin peaks were induced at the symmetric fields in the both sides of the singlet peak in cellulose sample. Conversely, the twin peaks were invisible in starch sample. We identified the twin peaks to be a part of triplet signal and determined the molecular structure of the cellulose radical. By the theoretical simulation method, we revealed, for the first time, that the triplet signal was attributed to the hyperfine interactions with two protons in the radical. The third peak within the triplet is overlapped by the organic radical at $g = 2.0$. We found that the cellulose radical does not remain in the rigid limit or the static state, but rather undergoes axial rotations around both C-C and C-H bonds. Thus the triplet may be used as a dosimeter for the irradiated plant foods.

Key words: Electron Spin Resonance, glucose polymer, radical, irradiation

はじめに

ガンマ線による殺菌処理は食品や生薬の香りや味、薬効を損なうことなくシェルフライフを伸ばす。さらに、有害な微生物や寄生虫への不妊や殺虫に有効であり、害虫が付着した野菜や果物が輸出入されないよう防疫を目的とした食品への照射も行われている。

著者らは植物性食品に照射することで誘導されるラジカルについて報告してきた¹⁾⁻⁶⁾。植物性照射食品では2種のESR信号が観測されてきた。1種は $g = 2.0$ 近傍の1本線信号、もう1種は1本線信号に対称の位置に観測されるサイド信号である。1本線信号はセミキノラジカルなどの有機フリーラジカルに由来する信号である⁷⁾。サイド信号は、照射コショウ²⁾⁻³⁾、朝鮮人参⁴⁾で観測したことを報告して

いる。また、セルロースやデンプンを含有する小麦粉では、照射コショウで観測されたサイド信号と類似しているが、より複雑な信号が観測された⁵⁾⁻⁶⁾。

サイド信号については近年多くの報告がある⁷⁾⁻²⁰⁾。これまでの報告ではサイド信号の由来についての詳細な検討はほとんどなされていない。そこで本研究では、高純度のセルロースおよびデンプンで構成される濾紙とオブラートにガンマ線照射し、照射誘導ラジカルに由来する ESR 信号について検討した。得られた実測データに基づき、理論的シミュレーションを行い、照射誘導ラジカルの分子機構について解析した。

実験方法

1. 試料

試料は、濾紙（アドバンテック東洋株式会社）と、オブラート（国光オブラート株式会社）を使用した。濾紙のセルロース純度は90%²¹⁾、オブラートのデンプン純度は99.2%²²⁾のものを実験に供した。

2. 照射処理

試料の照射処理は日本原子力研究開発機構 高崎応用研究所にて⁶⁰Coを線源とするガンマ線を用いて行った。照射線量は5 kGy/hrとし、試料の吸収線量は48 kGyであった。照射処理は室温（300 K）にて行った。

3. ESR 測定

実験試料は0.5 cm幅に裁断し、300 mgを ESR 測定のため石英試料管（99.9 % purity: Eiko, Japan）に詰めた。酸素の影響を除去するため、試料管をアルゴンガス置換処理した⁴⁾。

ESR 分光器は X-band (9.3 GHz) の JES-FA100（日本電子株式会社）を用いた。ESR の測定は次のパラメータ設定により行った。Center Field ; 250 mT, Sweep Width ; 250 mT, Frequency ; 9429 ~ 9434 MHz, Modulation frequency ; 100 kHz, Modulation width ; 1.0 mT, Time constant ; 0.03 s, Sweep time ; 4.0 min. 磁場領域は、より詳細な信号解析のため Center Field ; 336.5 mT, Sweep Width ; 7.5 mT の狭い範囲でも測定を行った。測定したスペクトルは WIN-RAD（ラジカルリサーチ株式会社）にて解析した。 g 値²³⁾は Mn マーカー（日本電子株

式会社）を用い、補正して求めた。

4. 理論解析

粉末試料におけるモデルのスペクトルは、球面上の数値積分法によりシミュレーションした。理論的シミュレーションは KAVAPOL code²⁴⁾ により行った。

実験結果および考察

1. 照射グルコースポリマーの ESR スペクトル

Fig. 1 に 0 ~ 500mT の幅広い掃引磁場で測定した照射処理前後の濾紙とオブラートの ESR スペクトルを示した。本実験に用いた試料は高純度で照射履歴が無いため、照射前のスペクトルでは信号を検出できなかった。照射後は、濾紙およびオブラートのスペクトルで $g = 2.0$ 近傍に、強く鋭い有機フリーラジカル由来²³⁾の一本線の信号 (P_1) を観測した。 P_1 信号の g 値は、濾紙が $g = 2.0065 \pm 0.0001$ 、オブラートでは $g = 2.0069 \pm 0.0001$ であった。著者らは照射した朝鮮人参⁴⁾ や黒コショウ²⁾⁻³⁾ から $g = 2.0$ に 1 本線信号が観測されたことを報告している。これらの照射試料では Mn^{2+} の超微細構造線²³⁾、 $g = 4.0$ に Fe^{3+} ²³⁾ の 1 本線が観測された。しかし、濾紙とオブラートでは Fe^{3+} 信号、 Mn^{2+} の超微細構造線は観測されなかった。

より詳細に信号を検討するため、磁場を 329 ~ 344mT として ESR 測定し、得られたスペクトルを Fig. 2 に示した。照射処理した濾紙の ESR スペクトルでは、 P_1 信号のサイドに新規信号 S_1 と S_2 が観測

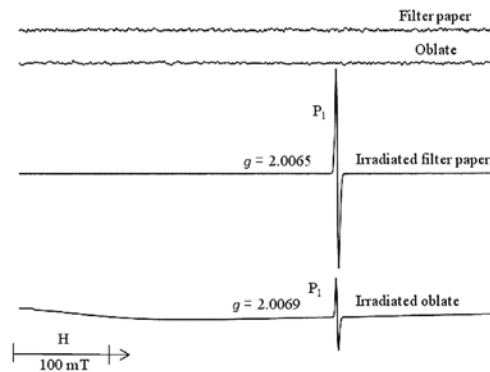


Fig. 1 ESR spectra of filter paper and oblate before and after irradiation.

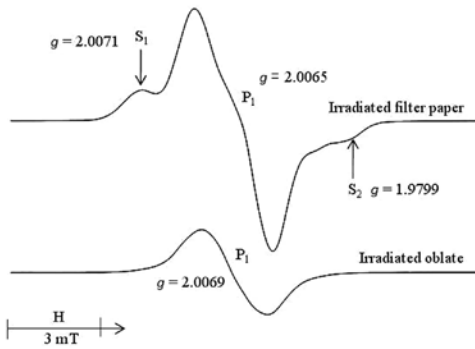


Fig. 2 ESR spectra of filter paper and oblate after irradiation; blow up views (75 mT) around the signal position.

された。その g 値は、 S_1 では $g = 2.0071 \pm 0.0002$ 、 S_2 では $g = 1.9799 \pm 0.0002$ であった。この新規信号はオブラートでは観測されなかった。サイド信号間の距離は 3.46 mT、線幅は 0.3 mT であった。Bolton の方法²³⁾ により線形の解析を行い、Lorentzian 型でなく、Gaussian 型であることがわかった ($L : G = 0 : 100$)。

2. ESR スペクトルの理論解析

Table 1 に、セルロースの照射誘導ラジカルの ESR スペクトルを解析して得られた磁気相互作用の値と、スペクトルを直接計測して得られた線幅な

どのパラメータを示した。 $H_2C_\alpha-C_\beta$ の 2 つの H. プロトンの超微細結合定数は照射マロン酸単結晶を ENDOR により測定して得られた²⁵⁾。テンソルは A_{XX} と A_{YY} の 2 つのテンソル要素のため、標準的な手順で XYZ 軸 ($Z \perp XY$ 平面) に変換される。

$$A_{XX} = A_1 \cos^2 \pi / 6 + A_2 \sin^2 \pi / 6 = -1.80 \text{ mT}$$

$$A_{YY} = A_1 \sin^2 \pi / 6 + A_2 \cos^2 \pi / 6 = -2.90 \text{ mT}$$

X もしくは Y 軸の素早い回転を考慮する。2 つの H_α テンソルは両方とも $A_{\parallel} = -1.80 \text{ mT}$ で X 軸に対称な軸になる。1 つは Trace ($A = A_{\parallel} + 2A_{\perp}$ (trace invariant under similarity transformation) = $A_1 + A_2 + A_3 = -7.00 \text{ mT}$ となることから、 $A_{\perp} = -2.60 \text{ mT}$ となる。2 つの H_α テンソルは両方とも $A_{\parallel} = -3.00 \text{ mT}$ で Y 軸に対称な軸になる。同様の計算により、 $A_{\perp} = -2.00 \text{ mT}$ となる。

Fig. 3 に $\cdot C-CH_2$ ラジカルのシミュレーションスペクトルを示した。シミュレーションは表 1 に示した hfc や g 値テンソルの磁気パラメータ、線幅を使用した。 $\cdot C-CH_2$ ラジカルには共鳴磁場として $g = 2.0065$ 、 $A = 3.46 \text{ mT}$ を使用した。 $\cdot C-CH_2$ ラジカルの分子構造に基づき、ラジカル配置の ESR スペクトルをシミュレーションした。1 つ目は Rigid limit (固体極限) のスペクトル。2 つ目は $C_\alpha-C_\beta$ 結合と $C_\beta-H$ 結合の両方の速い軸回転による場合のスペクトルである。第 2 番目のシミュレーションスペクトル

Table 1 Spectral parameters employed for simulations

	Rigid limit	C-C rotation and C-H rotation
$g = \text{values}$	$g_x = 2.0035$ $g_y = 2.0029$ $g_z = 2.0023$	$g_{\perp} = 2.0029$ $g_{\perp} = 2.0029$ $g_{\parallel} = 2.0032$
Hyperfine splitting (mT)	$A_x = 3.46$ $A_y = 1.24$ $A_z = 2.28$	$A_{\perp} = 2.00$ $A_{\perp} = 2.00$ $A_{\parallel} = 2.99$
Line width (mT):	0.3 mT	0.3 mT
Line shape field (L : G)	0 : 100	0 : 100
Resonant field (mT)	349.0 mT	349.0 mT
Field sweep range (mT)	$\pm 50 \text{ mT}$	$\pm 50 \text{ mT}$
Microwave frequency (GHz)	9.780 GHz	9.780 GHz

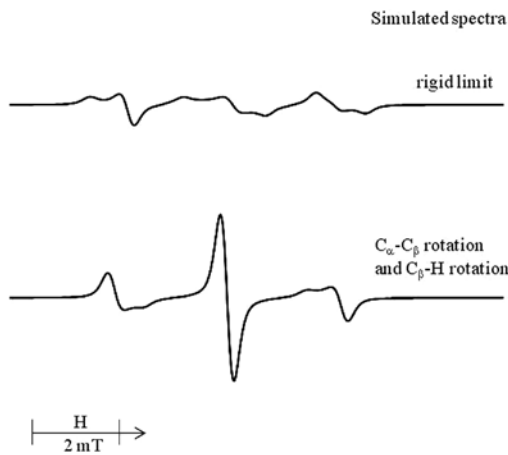


Fig. 3 Theoretical ESR spectra of $\cdot\text{C-CH}_2$ radical were calculated at two different conditions of the radical molecule. The first was a spectrum at the rigid limit. The second was that both $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$ and $\text{C}_\beta\text{-H}$ bonds undergo rapid rotations.

ルによって実測スペクトルは最適化できた。

3. サイド信号

サイド信号 (S_1 と S_2) は照射された濾紙でのみ検出され、オブラートでは検出されなかった。この結果から、サイド信号はデンプンではなくセルロースに由来すると結論した。実際、著者らはセルロー

スを含有する植物性食品^{2)-3),5)-6)} および生薬⁴⁾ に照射することで、サイド信号の発現を観測した。また、温度の上昇によりサイド信号の2つの信号のうち一方の信号が消失することを報告³⁾ している。

Fig. 4 に照射した濾紙で観測されるサイド信号の飽和挙動を示した。閾値を示すマイクロ波強度は4 ~ 16 mW であり、ほぼ同じマイクロ波強度で飽和した³⁾。このような実験的な現象から、サイド信号が固有の物理効果、すなわち同じ超微細相互作用に従っていると考えられた。

Rånby の照射ポリマーの ESR 研究の報告²⁶⁾ によると、多くの文献において照射セルロースに生じるラジカル種として $\cdot\text{C-CH}_2$ ラジカルが最も可能性が高いと結論している。 $\cdot\text{C-CH}_2$ ラジカルの ESR スペクトルは2つのプロトンの不對電子による超微細相互作用によるトリプレットとして観測されると結論した。

4. 実験スペクトルと理論スペクトル

実測スペクトルは固体試料としての rigid limit なスペクトルではなかったため、ラジカルが軸回転運動していると仮定した。 $\cdot\text{C-CH}_2$ ラジカルの分子構造に基づき、異なるラジカル配置の場合の ESR スペクトルをシミュレーションした。1つ目は Rigid limit (固体極限) のスペクトル。2つ目は $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$ 結合と $\text{C}_\beta\text{-H}$ 結合の両方の速い軸回転による場合のスペクトルである。シミュレーションの結果から、実

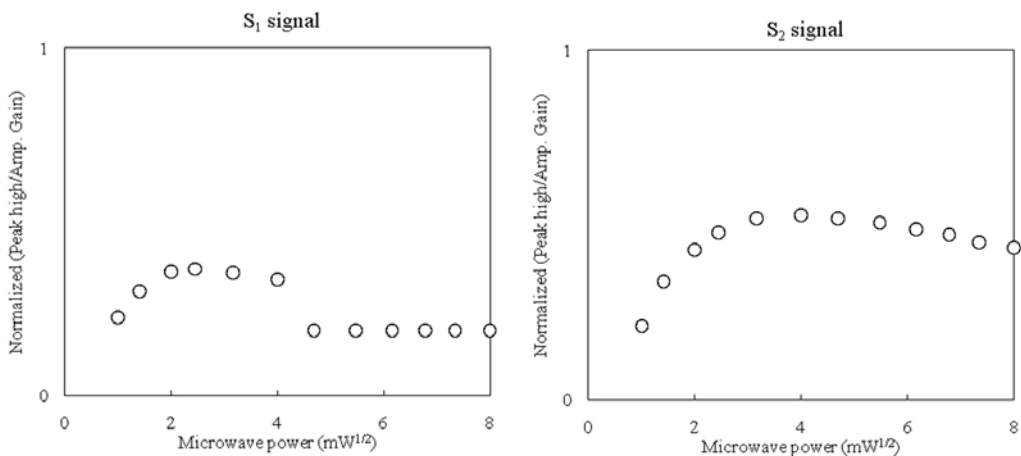


Fig. 4 Progressive saturation behaviors of twin signals (S_1 and S_2) of irradiated filter paper.

測スペクトルは C_{α} - C_{β} 結合と C_{β} -H 結合の両方の軸回転運動によるものであることを明らかにした。

5. セルロースラジカルの形成メカニズム

セルロースとデンプンはともに分子式 ($C_6H_{10}O_5$) n で表される多糖類である。セルロースは β -グルコース分子がグリコシド結合により重合したグルコースポリマーである。一方、デンプンは α -グルコース分子の重合により構成されるグルコースポリマーである。これらの構造は Fig. 5 に示すように非常に似通っている。しかし、1,4 位結合の相違により、セルロースは直鎖、デンプンは螺旋の構造を示す。グルコースポリマーとして非常に相似した構造を持つセルロースとデンプンではあるが、立体構造の相違によりラジカル形成に違いが生じる²⁶⁾。

セルロースの ESR スペクトルは、照射により C5 にある水素原子の結合切断により C6 の 2 つの水素原子に不対電子が形成され、等価な 2 つのプロトンの超微細相互作用によりトリプレットとして観測さ

れる²⁶⁾⁻²⁷⁾。すなわち、サイド信号はトリプレットの一部分である。C5 にある水素の結合切断はセルロースのみで起こり、これはセルロースが有する α -1,4 位結合による強固な直鎖結合によるものではないかと推定した。また、トリプレットとして観測される等価な 2 個のプロトン生成の可能性がある部位として、Fig. 5 のセルロース構造²⁶⁾ から C2, C3, C4 が考えられた。

まとめ

電子スピン共鳴 (ESR) 分光学を使用して、実測データと理論解析からセルロースとデンプンのグルコースポリマーの照射処理により新規に誘導されるラジカルの解析を行った。照射前のスペクトルでは両方のグルコースポリマーで信号は観測されなかった。しかし、ガンマ線照射処理により $g = 2.0$ に一本線信号が観測された。さらに、セルロースの ESR スペクトルでは $g = 2.0$ の 1 本線信号に対称の位置に一对のサイド信号が観測された。サイド信号

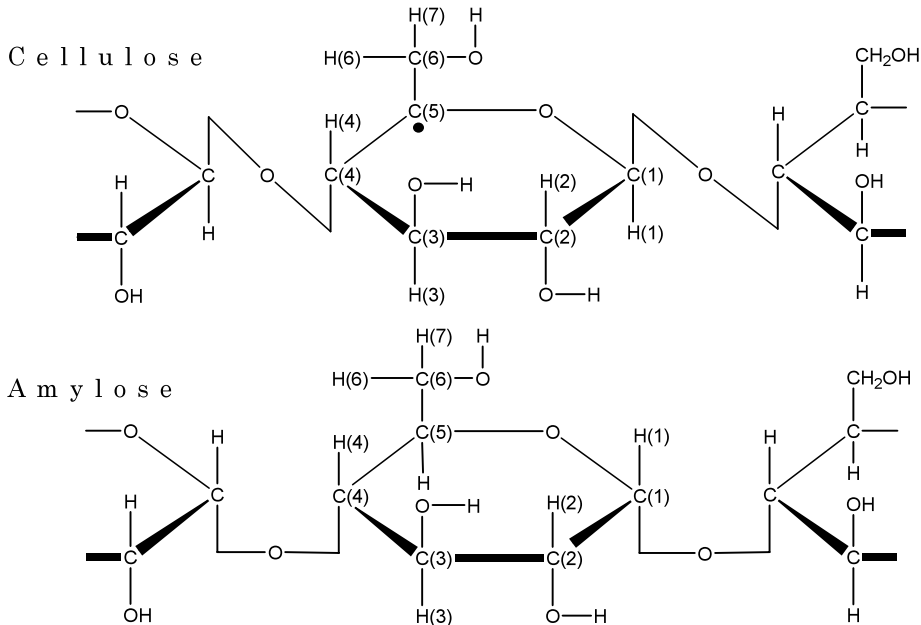


Fig. 5 The upper shows chemical structure of the irradiated cellulose. The triplet ESR spectrum of cellulose is due to the equal interaction of the two hydrogen atoms at C6 with the unpaired electron formed by the removal of the hydrogen atom at C5. The below shows chemical structure of amylose.

はデンプンでは観測されなかった。この結果から、照射により誘導されたサイド信号はグルコースの過酸化ラジカルやセルロティックラジカルに由来するものではなく、照射セルロース由来の信号であると結論した。理論シミュレーションから、サイド信号は2つの不対なプロトンの超微細相互作用に由来するトリプレット信号であることが示された。しかし、トリプレットの中央の信号は $g = 2.0$ に検出される有機フリーラジカル由来の信号との重なりにより観測することができないと推察した。セルロースラジカルは rigid limit もしくは静止状態ではなく、C-C結合とC-H結合の軸回転の分子運動をしていると結論した。

謝 辞

本研究の一部は、文部科学省原子力基礎基盤戦略研究イニシアティブにより実施された「実用化が予想される食品への放射線利用に関する基礎研究」の成果である。

参考文献

- 1) Ukai, M. *et al.* An ESR protocol based on relaxation phenomena of irradiated Japanese pepper. *Spectrochimica Acta. A.* **63**, p.879-882 (2006).
- 2) Ukai, M.; Shimoyama, Y. An electron spin resonance study of evolution of organic free radicals in irradiated pepper during heat treatment. *Journal Food Science.* **68**(7), p.2225-2229 (2003).
- 3) Ukai, M.; Shimoyama, Y. Free radicals in irradiated pepper: An electron spin resonance study. *Appl. Magn. Reson.* **24**, p.1-11 (2003).
- 4) Nakamura, H. *et al.* An electron spin resonance study of γ -ray irradiated ginseng. *Spectrochimica Acta. A.* **63**(4), p.883-887 (2006).
- 5) Shimoyama, Y. *et al.* ESR detection of wheat flour before and after irradiation. *Spectrochimica Acta. A.* **63**(4), p.888-890 (2006).
- 6) Ukai, M.; Shimoyama, Y. Free radicals in irradiated wheat flour detected by electron spin resonance. *Appl. Magn. Reson.* **29**, p.315-324 (2005).
- 7) Raffi, J.; Stocker, P. Electron paramagnetic resonance detection of irradiated foodstuffs. *Appl. Magn. Reson.* **10**, p.357-373 (1996).
- 8) Raffi, J.; Agnel, J. P. Electron Spin Resonance identification of irradiated fruits. *Radiat. Phys. Chem.* **34**, p.891-894 (1989).
- 9) Raffi, J. *et al.* Identification of irradiation treatment of aromatic herbs, spices and fruits by electron paramagnetic resonance and thermoluminescence. *Spectrochimica Acta. A.* **56**(2), p.409-416 (2000).
- 10) Lee, J. *et al.* Properties of PSL, TL, and ESR to Identify the Irradiated Sesame Seeds after Steaming. *Food Science and Biotechnology.* **18**(2), p.374-378 (2009).
- 11) Lee, J. *et al.* Detection of γ -Irradiated Sesame Seeds before and after Roasting by Analyzing Photostimulated Luminescence, Thermoluminescence, and Electron Spin Resonance. *Jour. Agric. Food Chem.* **56**(16), p.7184-7188 (2008).
- 12) Yordanov, N. D. *et al.* EPR spectra induced by gamma-irradiation of some dry medical herbs. *Radiat. Phys. Chem.* **78**(4), p.277-180 (2009).
- 13) Jo, D.; Kwon, J. H. Detection of radiation-induced markers from parts of irradiated kiwifruits. *Food Control.* **17**(8), p.617-621 (2006).
- 14) Loeffroth, D. *et al.* Analysis of radiation induced electron spin resonance spectra in plant seeds. *Radiat. Bot.* **4**, p.455-467 (1964).
- 15) Ehrenberg, A. *et al.* Radiation-induced paramagnetic centers in plant seeds at different oxygen concentrations, *Medicinska Nobelinstitutet, Karolinska institutet; Institutet for organisk kemi och biokemi, Stockholms Universitet, Stockholm.* p. 229-231 (1962).
- 16) Butz, B.; Hildebrand, A. Bleaching of walnuts and pistachios - Influence on detection of irradiation by ESR and GC/MS. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau.* **102**(4), p.154-157 (2006).
- 17) Polovka, M. *et al.* EPR spectroscopy: A tool to characterize the gamma irradiated foods. *J. Food Nutr. Res.* **46**(2), p.75-83 (2007).
- 18) Yamaoki, R. *et al.* Detection of organic free radicals in irradiated Foeniculi fructus by electron spin resonance spectroscopy. *J. Natural Medicines.* **63**(1), p.28-31 (2009).

- 19) Sanyal, B. *et al.* Identification of Irradiated Cashew Nut by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. *Jour. Agric. Food Chem.* **56**(19), p.8987-8991 (2008).
- 20) Cutrubinis, M. *et al.* Preliminary study on detection of irradiated foodstuffs from the Romanian market. *Radiat. Phys. Chem.* **76**(8-9), p.1450-1454 (2007).
- 21) Japanese Industrial Standards Committee. Filter paper for chemical analysis. JIS P3801. May 01. 1995.
- 22) “国光株式会社.” 国光株式会社. <http://www.kokkooblade.co.jp/index.html>, (2009).
- 23) Swartz, H. *et al.* Biological Applications of Electron Spin Resonance. New York, John Wiley & Sons, Inc., p.569 (1972).
- 24) Thuomas, K-Å.; Lund, A. Analysis of EPR with large quadrupole interaction. *J. Magn. Reson.* **22**, p.315-325 (1976).
- 25) Sagstuen, E. *et al.* Weakly coupled proton interactions in the malonic acid radical: Single crystal ENDOR analysis and EPR simulation at microwave saturation. *J. Phys. Chem.. A* **104**, p.6362-6371 (2000).
- 26) Rånby, B. ESR spectroscopy in polymer research. Berlin and Heidelberg, Springer-Verlag, p.410 (1977).
- 27) Arthur, J. C. Jr.; Hinojosa, O. Effects of dipolar aprotic solvents on the stability of free radicals in -irradiated cotton cellulose. *J. Polym. Sci. C* **9**(7), p.503-507 (1971).

(2010年7月16日受理)