

原 著

放射線照射したニンニクにおける ラジカルの測定

亀谷宏美， 貝森良彦， 鵜飼光子

Reprinted from
RADIOISOTOPES, Vol.59, No.7
July 2010



Japan Radioisotope Association

<http://www.jrias.or.jp/>

原 著



放射線照射したニンニクにおけるラジカルの測定

亀谷宏美, 貝森良彦, 鶴飼光子

北海道教育大学

040-8567 北海道函館市八幡町 1-2

2009年8月31日 受理

ESR法を用いた照射ニンニクの計測を行った。照射処理は γ 線を用いた。ニンニクのESR信号は、 $g=2.00$ の1本線であった。この1本線の信号は有機フリーラジカル由来の信号である。照射処理により、1本線の信号強度が増大した。また、この信号の近傍に2本のセルロースラジカルの信号が観測された。1本線のESR信号強度は照射線量に依存して増大した。

Key Words : garlic, gamma ray irradiation, radical, ESR

1. 緒 言

食品への放射線照射殺菌の健全性は国際的に認知されている。今後更にこの殺菌技術は拡大することが予想される。事実、国際原子力機関(IAEA)によると2004年には香辛料や乾燥野菜など約30万tが照射殺菌され全世界に流通していると報じている¹⁾。

電子スピン共鳴法(Electron Spin Resonance, ESR)は照射食品検知法の一つである。ESRを用いた照射食品の分析について近年多くの報告²⁾⁻⁹⁾があり、ESRは照射誘導ラジカルを直接計測する有用な方法であると評価されている。著者らはこれまで照射食品のESRによる検知法について報告した¹⁰⁾⁻¹⁷⁾。

ニンニク(*Allium sativum*)は、ネギ科の多年草で、球根(鱗茎)は香辛料として用いられ、ガーリックとも呼ばれる。一般的に市販されているニンニクは分球ニンニクである。ニンニクは日本では主に青森県産のものが流通している。また、中国からの輸入ニンニクも広く流通している。市販ニンニクは芽が出やすく日持ちが悪いものがある。照射ニンニクの日持ち効果につ

いて消費者の体験報告¹⁸⁾があり、 γ 線処理はニンニクの芽止めに有効であると報告されている。

ESRを用いた照射ニンニクについての報告は少ない。Desrosiersら¹⁹⁾は照射ニンニクの皮をESRにより計測し、 $g=2.00$ に1本線の信号を観測したと報告している。Cutrubinisら²⁰⁾はニンニクに γ 線照射を行い、発芽試験について報告している。

日本では照射食品の検知法として熱ルミネッセンス(Thermoluminescence, TL)法がある。このTL法の検知対象食品にニンニクが追加されている²¹⁾。本研究では、照射ニンニクのESR計測を行い、ESR法が照射ニンニクのラジカル測定に有用であるか否かについて検討した。

2. 実験方法

2.1 試料

試料は青森県産分球ニンニク3種である。試料1は函館市内の小売店から、試料2は函館市内の大型量販店から購入した。いずれも2009年7月に購入した。購入後すぐに照射処理した。試料3は青森県上北郡七戸町で6月下旬に収穫後、約3週間、機械乾燥し、茎切り、皮むきな

どの作業をしてからJAとうほく天間の天間林支所で選別、袋詰めしたものをういた。袋詰め後すぐにそのまま照射処理した。試料3のニンニクは通常行われる零下2℃での低温貯蔵や乾熱芽止め処理はされていない。

2・2 照射処理

試料1, 2は3個のニンニクの皮をはいでポリビニル製の袋に入れ、真空脱気後に密封し、これを照射処理した。試料3は袋詰め状態で照射処理した。真空脱気はしていない。照射処理は独立行政法人日本原子力研究開発機構高崎量子応用研究所にて γ 線を用いて行った。照射量は試料1, 2は0.05～10 kGy, 試料3は0.02～0.15 kGyとした。照射処理は室温にて行った。

2・3 試料調製

試料は照射処理後、冷蔵庫内で保存した。室温に戻してから試料管(ラジカルリサーチ株式会社, RST-5MSTD)に詰めた。試料3は室温にもどしたニンニクから試料1, 2と同様に3個選び皮をはがした。これらの皮の試料から、食品分析で一般に用いる円錐四分法²⁹⁾により10個の分析用試料を調製した。試料管の端から30 mmのところ印をつけ、この部分まで試料を詰めた。

酸素脱気を行うとESRスペクトルはより明確に確認できる¹⁵⁾。ESR信号を確実に観測するため試料管内の酸素を脱気する処理を試料管に試料を詰めた直後に行った。脱気はまず試料を詰めた試料管をゴム栓にて封をした。プラスチック製ディスプレイシリンジ(アズワン株式会社)の本体上部を耐圧ゴム管を用いて三方コックにつなぎ、残りの2口を真空ポンプとアルゴンガスにつないだ。シリンジの注射針をゴム栓を通して試料管に差し込み、三方コックを操作して真空ポンプと試料管をつないだ。真空ポンプを動作させて1分間試料管内を脱気した。その際、試料管内の圧力は1 mmHgであった。

その後、三方コックを操作して、試料管とアルゴンガスをつなぎ、試料管内にガスを1分間流入した。脱気とガスの流入操作を10回繰り返した。試料管上部のパイレックス部位をバーナーにて焼き切った。バーナーの熱が試料に伝わらないよう、パイレックス上部ゴム栓の3 cmほど下の部分を焼き切った。

2・4 ESR測定

ESR分光器はX-bandのJES-FA100(日本電子株式会社)を用いた。磁場を安定に保つため、電磁石の冷却水は冷却水循環装置(東京理化器械株式会社)により20℃にコントロールした。ESRを起動させ、磁場を安定化させるために30分間放置してから測定を開始した。測定は室温で行った。

試料が測定範囲内にセットされるよう、スケール(日本電子株式会社)で試料管を挿入する深さを決定し、シリコンキャップを取り付けた。共振器に試料管をシリコンキャップの部分まで挿入し、コレットナットで固定した。

ESRの測定は主に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である。マイクロ波強度は0.1～100 mWまで変化させた。WIN-RAD解析ソフト(ラジカルリサーチ株式会社)を用いた。 g 値はMnマーカー(日本電子株式会社)を用い補正して求めた。

3. 実験結果

3・1 ESR信号

Fig.1に未照射(上図)及び照射(下図)ニンニクの皮のESRスペクトルを示した。いずれもAmp. Gainは150である。Fig.1で示すように鋭い1本線 P_1 信号が、未照射試料と照射試料で g 値が約2.00の位置に観測された。この結果はDesrosiersら¹⁹⁾の報告した $g=2.00$

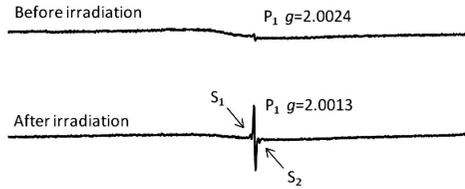


Fig. 1 Typical ESR spectrum of garlic (sample 1) before and after irradiation at 5 kGy.

Table 1 g -values of garlic before and after irradiation

	Radiation Dose (kGy)	g -values
Sample 1	0	2.0024 \pm 0.0005
	5	2.0013 \pm 0.0003
Sample 2	0	2.0019 \pm 0.0026
	5	2.0014 \pm 0.0003
Sample 3	0	2.0021 \pm 0.0006
	0.1	2.0017 \pm 0.0007

Values are shown as means \pm S.D. (n=10)

と一致した。更に P_1 信号は、照射食品や照射漢方薬で報告された 1 本線^{10) -17)}と同じ g 値であることから照射植物性食品で同定したラジカル種と同じである。 P_1 信号は照射誘導ラジカルの他、種々の有機ラジカル²³⁾による信号に由来する。例えば、ハイドロキノン類やタンパク質などの有機ラジカルである。

Table 1 に 3 種の試料の g 値を示した。10 個の分析用試料について ESR 計測し、 g 値の平均と標準偏差を求めた。 g 値は Mn マーカーと信号解析ソフト WIN-RAD を用い、小数点以下第 5 位まで算出される値を四捨五入して第 4 位で示した。Table 1 で示すように、各試料の g 値に有意差はなかった。試料 1, 2 は市販品であり芽止めのための低温貯蔵や乾熱芽止め処理が行われていると予想される。試料 3 はこのような芽止め処理はない。試料間の差異は g 値からはみられなかった。

Fig. 1 から明らかなように照射処理により P_1

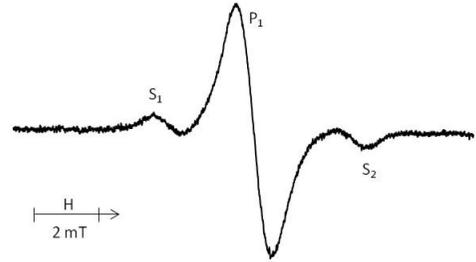


Fig. 2 Typical ESR spectrum of garlic (sample 1) following by irradiation at 5 kGy.

の信号強度が増加した。Fig. 1 (下図) 及び Fig. 2 で示すように、 P_1 信号の近くにサイド信号 (S_1 , S_2) を検出した。これは、照射により新たに誘導された信号である。Fig. 2 から S_1 , S_2 信号は P_1 信号の左右に約 3 mT の位置に観測された。すなわち、ハイパーファインは約 3 mT (30 G)⁸⁾ であった。このことからこれらの信号は 3 本線であり、セルロースラジカル²⁴⁾であると推定できる。

ニンニク試料で観測された信号は未照射試料では P_1 信号、照射試料では P_1 信号と S_1 , S_2 信号であった。従来、食品試料では Mn^{2+} や Fe^{3+} などの信号^{10) -17)}が観測されたが、ニンニクの皮では遷移金属イオンは検出されなかった。

3.2 飽和挙動

ラジカル種の同定にはマイクロ波強度を変え ESR 計測し、信号強度の飽和現象を検討することが有用である¹⁰⁾。

P_1 信号の各マイクロ波強度における信号強度の変化を Fig. 3 に示した。未照射試料の信号強度を白点で、照射試料の信号強度を黒点で示した。マイクロ波強度が増すにしたがい P_1 の信号強度は増大し、あるマイクロ波強度以降は信号強度が減少、若しくはプラトーとなり一定の閾値を得る飽和挙動を示した。 P_1 の信号強度が最高値を示すマイクロ波強度を Table 2 及び 3 に示した。閾値を示すマイクロ波強度はいずれの試料でも照射未照射にかかわらず 11 ~ 16 mW となった。閾値を示す ESR 信号

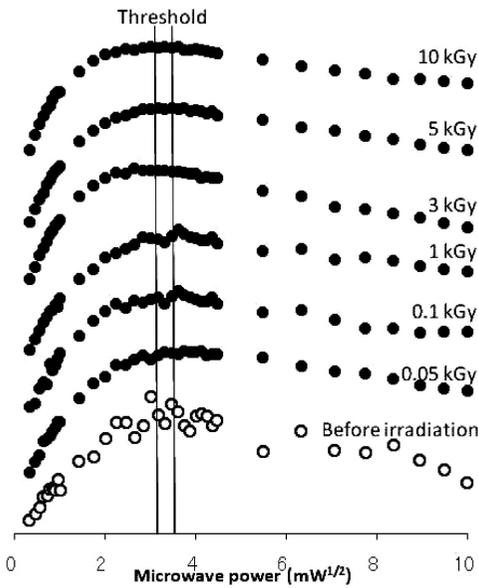


Fig. 3 Saturation behavior of P_1 signals (sample 1) before and after irradiation.

強度を照射量ごとにプロットして Fig. 4 を示した。照射量と ESR の信号強度は線形若しくは指数関数的な関係を示した。

4. 考 察

4.1 ニンニクの皮の ESR 信号

ニンニクの皮で確認された P_1 信号の低磁場

Table 3 Threshold values of garlic (sample 3) before and after irradiation

Radiation Doses (kGy)	Threshold value	
	Peak Intensity (Peak high/Amp. Gain)	Power (mW)
0	2.2 ± 0.1	13 ± 1
0.02	2.5 ± 0.2	13 ± 1
0.03	2.5 ± 0.1	13 ± 1
0.05	2.6 ± 0.1	14 ± 2
0.07	2.8 ± 0.1	13 ± 1
0.10	3.0 ± 0.1	13 ± 1
0.15	3.4 ± 0.1	14 ± 1

Values are shown as means \pm S.D. (n=10)

側でスペクトルがゆるやかな山を描いていることを確認した。室温測定であったので明瞭な信号の観測はできなかったと考えられる。低温測定 (77 K) を行えば Cu^{2+} などの信号が検出できる可能性がある。

照射セルロースの ESR 計測では、照射誘導信号は 3 本線であると報告^{25), 26)}されている。そのため、 S_1 , S_2 信号は、 P_1 信号との重なりにより検出できないもう 1 本の信号からなる 3 本線と考えられる。

S 信号は Raffi らにより照射の有無の判別に有用な、照射誘導ラジカルとして報告されてい

Table 2 Threshold values of garlic (sample 1 and sample 2) before and after irradiation

Radiation Doses (kGy)	Threshold value			
	Sample 1		Sample 2	
	Peak Intensity (Peak high/Amp. Gain)	Power (mW)	Peak Intensity (Peak high/Amp. Gain)	Power (mW)
0	1.5 ± 0.1	14 ± 3	1.8 ± 0.1	13 ± 2
0.05	2.7 ± 0.1	14 ± 2	2.5 ± 0.2	14 ± 1
0.1	3.0 ± 0.1	13 ± 2	3.5 ± 0.3	13 ± 1
1	4.2 ± 0.2	15 ± 1	5.9 ± 0.1	14 ± 1
3	7.1 ± 0.2	12 ± 1	9.4 ± 0.2	14 ± 3
5	11.4 ± 0.1	15 ± 2	11.9 ± 0.2	13 ± 2
10	15.4 ± 0.1	13 ± 2	17.3 ± 0.3	13 ± 2

Values are shown as means \pm S.D. (n=10)

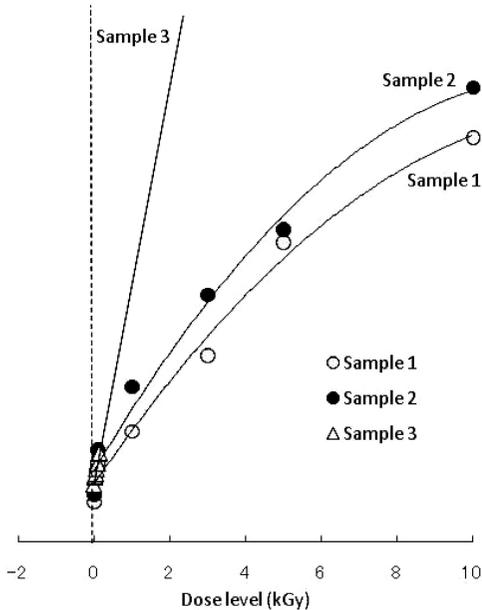


Fig. 4 Relationship of radiation dose level and ESR signal intensity.

る²⁾。ニンニクの皮では1 kGy以上の照射を行った試料でFig. 2のようにS信号を明瞭に観測することができた。そこで、S信号による照射の有無の判別は1 kGy以上の照射処理において有用であると考えられる。

セルロースラジカル由来と考えられる S_1 、 S_2 信号については照射線量は同じでも信号の大きさや面積、更に時間経過による減衰などについてニンニク以外のセルロース食品との比較検討を今後詳細に行う必要がある。

4.2 飽和挙動

植物性食品を試料としてESR計測した場合、シャープな信号が観測されることは稀である。数種類の信号が同時に検出された報告も少ない。著者らは、すでに植物性食品のESR信号計測試験において信号を明瞭に観測し、ラジカル種の同定に成功している^{10) - 17)}。明瞭な信号の観測に成功した要因は、ESR信号の飽和現象を検討したのちに、信号強度の計測を行っていることによる。

4.3 吸収線量に対するESR信号強度依存性
安定なラジカル種を指標とし、外挿法^{27), 28)}により照射量を推定できることから、照射履歴の定量法となる。外挿法には線形関数外挿と指数関数外挿とがある。添加線量率が小さい場合には照射により誘導されるラジカル量は線形的に増大するため、線形関数外挿による最適化が行われる²⁷⁾。低線量照射を行った試料3を線形関数外挿した。添加線量率が増すとラジカルは飽和状態となり、指数関数外挿による最適化がなされる²⁸⁾。試料1及び2では指数関数外挿による最適化を行った。Fig. 4に、照射線量とESR信号強度との関係を示した。いずれの試料でも吸収線量に対するESR信号強度依存性が確認でき、最適化が可能であった。未照射試料においても、微弱なESR信号が観測できる。 P_1 信号は吸収線量依存的に増大する。 P_1 のESRシグナルが検出できても必ずしも照射処理とは言えないが、追加照射することにより、照射・未照射を判断できる可能性がある。また、照射セルロース由来と考えられる S_1 、 S_2 信号も放射線を当てると吸収線量に応じて信号強度が増大する。

4.4 ESRによる測定

照射ニンニクの皮をESR法で計測すると g 値が約2.00を示す1本線の P_1 信号を検出した。照射により P_1 信号は増大した。更に、 S_1 、 S_2 信号を検出した。この S_1 、 S_2 信号は1 kGy照射以上の線量で照射したニンニク試料で明瞭に観測され、1 kGyよりも低い線量の照射試料では検出できなかった。低線量処理においても S_1 、 S_2 信号が観測可能となるようなESRプロトコルの更なる検討が必要である。

今後は照射処理後の保存条件(温度、湿度、期間など)やニンニクの測定部位を変えてESR計測し、実際にESRを検知法として利用する際に必要となる実用的な知見の蓄積を行う。

文 献

- 1) 等々力節子, 食品照射の海外の動向, 食品照射, **40**, 49-58 (2005)
- 2) Raffi, J. and Stocker, P., Electron paramagnetic resonance detection of irradiated foodstuffs, *Appl. Magn. Reson.*, **10**, 357-373 (1996)
- 3) Raffi, J., Yordanov, N. D., Chabane, S., Douifi, L., Gancheva, V. and Ivanova, S., Identification of irradiation treatment of aromatic herbs, spices and fruits by electron paramagnetic resonance and thermoluminescence, *Spectrochim. Acta*, **56**, 409-416 (2000)
- 4) Bayram, G. and Delincée, H., Identification of irradiated Turkish foodstuffs combining various physical detection methods, *Food Control*, **15**, 81-91 (2004)
- 5) Cutrubinis, M., Delincée, H., Stahl, M., Röder, O. and Schaller, H. J., Detection methods for cereal grains treated with low and high energy electrons, *Radiat. Phys. Chem.*, **72**, 639-644 (2005)
- 6) Polovka, M., Brezova, V., Stasko, A., Mazur, M., Suhaj, M. and Simko, P., EPR investigations of gamma-irradiated ground black pepper, *Radiat. Phys. Chem.*, **75**, 309-321 (2006)
- 7) Polovka, M., Brezova, V. and Simko, P., EPR spectroscopy: A tool to characterize gamma-irradiated foods, *J. Food Nutr. Res.*, **46**, 75-83 (2007)
- 8) Yordanov, N. D., Lagunov, O. and Dimov, K., ESR spectra induced by gamma-irradiation of some dry medical herbs, *Radiat. Phys. Chem.*, **78**, 277-280 (2009)
- 9) Yordanov, N. D. and Aleksieva, K., Preparation and applicability of fresh fruit samples for the identification of radiation treatment by EPR, *Radiat. Phys. Chem.*, **78**, 213-216 (2009)
- 10) Ukai, M. and Shimoyama, Y., Free radicals in irradiated pepper: An electron spin resonance study, *Appl. Magn. Reson.*, **24**, 1-11 (2003)
- 11) 中村秀夫, 鶴飼光子, 下山雄平, γ 線照射した朝鮮人蔘の電子スピン共鳴法による解析, *RADIOISOTOPES*, **53**, 501-506 (2004)
- 12) Nakamura, H., Ukai, M. and Shimoyama, Y., An electron spin resonance study of ginseng irradiated by gamma ray, *Spectrochem. Acta*, **63**, 883-887 (2006)
- 13) 亀谷宏美, 鶴飼光子, ESRによる照射殺菌朝鮮人蔘の検知, *RADIOISOTOPES*, **55**, 451-455 (2006)
- 14) Shimoyama, Y. and Ukai, M., Free radicals in irradiated wheat flour detected by electron spin resonance spectroscopy, *Spectrochem. Acta*, **63**, 888-890 (2006)
- 15) 亀谷宏美, 鶴飼光子, 酸素フリー雰囲気でのESRによる γ 線照射で衛生化したアガリクスの分析, *RADIOISOTOPES*, **56**, 437-441 (2007)
- 16) Shimoyama, Y., Ukai, M. and Nakamura, H., Advanced protocol of detection for irradiated food by ESR, *Radiat. Phys. Chem.*, **76**, 1837-1839 (2007)
- 17) 亀谷宏美, 小川英之, 中村秀夫, 鶴飼光子, 下山雄平, 照射ナツメグ (*Myristica fragrans*) のESRによる検知, *RADIOISOTOPES*, **58**, 179-185 (2009)
- 18) 市川まりこ, 飯塚友子, 蒲生恵美, 小堀恵美子, 渋谷美智子, 志保沢久子, 千葉悦子, 横山 勉, 福富文武, 等々力節子, 鶴飼光子, 菊地正博, 小林泰彦, 市民が体験した食品照射の素朴な実感, 第46回アイソトープ・放射線研究発表会要旨集, 4 (2009)
- 19) Desrosiers, M. F. and McLaughlin, W. L., Examination of gamma-irradiated fruits and vegetables by electron spin resonance spectroscopy, *Radiat. Phys. Chem.*, **34**, 895-898 (1989)
- 20) Cutrubinis, M., Delincée, H., Bayram, G. and Vilavicencio, C. H., Germination test for identification of irradiated garlic, *Eur. Food Res. Technol.*, **219**, 178-183 (2004)
- 21) 食安発第1211002号
- 22) 小原哲二郎, 鈴木隆雄, 岩尾裕之, 第2版食品分析ハンドブック, pp. 1-3, 建帛社, 東京 (1975)
- 23) 石津和彦, 実用ESR入門, pp. 261-273, 講談社サイエンティフィック, 東京 (1981)
- 24) 亀谷宏美, 加恵田庸子, 鶴飼光子, 中村秀夫, 二種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, 食品照射, **42**, 4-8 (2007)
- 25) Chidambarewaran, P. K. and Sundaram, V., Formation and reaction of radiation-induced free radicals in chemically modified cotton celluloses, *J. Polym. Sci.*, **9**, 2651-2658 (1971)
- 26) Ranby, B., ESR Spectroscopy in Polymer Research, pp. 235, Springer-Verlag, Berlin and

- Heidelberg (1977)
- 27) Ikeya, M., New Applications of Electron Spin Resonance, pp.398-399, World Scientific Publishing Company, Singapore (1993)
- 28) 池谷 元, 概論: ESR 年代測定法, 地球, 3, 468-477 (1981)

Abstract

Analysis of Radicals of Irradiated Garlic

Hiromi KAMEYA, Yoshihiko KAIMORI and Mitsuko UKAI

Hokkaido University of Education
1-2 Hachiman-cho, Hakodate-shi, Hokkaido 040-8567, Japan

The detection method of gamma ray irradiated garlic using Electron Spin Resonance (ESR) spectroscopy was studied. The ESR spectrum was consisted of one singlet signal at $g=2.00$. This signal is due to an organic free radical. Upon irradiation, the intensity of the signal was increased. Also two signals due to cellulose radical were detected nearby the singlet. The intensity of the singlet signal was increased as depend on the increase of the irradiation dose level.

(Received August 31, 2009)