

—Reviews—

天然物由来食品・医薬品原料の電子線殺菌処理に関する研究
—電子スピン共鳴による照射処理生薬の検知—

山沖 留美

Studies on Sterilization Technology by Electron Beam Radiation
of Natural Food or Raw Pharmaceutical Material

—Detection of Electron Beam Irradiated Crude Drugs by Electron Spin Resonance—

Rumi YAMAOKI

Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1, Nasahara, Takatsuki, Osaka 569-1094, Japan

(Received October 23, 2008; Accepted November 9, 2008)

Natural products such as food and herbal medicine are susceptible to insects and mold. To develop disinfection and sterilization technology, the author applied electron beam (EB) irradiation to spices or crude drugs and used electron spin resonance (ESR) spectroscopy in order to establish a method for detecting irradiated products.

A single line ESR spectrum near $g = 2.005$ was observed in spices and crude drugs. The intensity of the main signal near $g = 2.005$ increased, and sub-signals at ca. 3 mT on either side of the main signal ($g = 2.02$ and 1.99) were observed after EB irradiation. The before and after irradiation radical concentrations were high in herbs. Multicomponent spectra with specific shapes of mono- or disaccharides were observed in irradiated roots drugs. The observed spectrum of a post-irradiation plant sample was approximately similar to the summation of a spectral component derived from the pre-irradiated sample and components derived from post-irradiation of carbohydrates, including cellulose. The time decay of intensity spectral components was well explained by first order kinetics with a variety of rate constants. The sub-signal at near $g = 2.02$ was ascribed to the high-dose response and stable cellulose-derived radical components. It was revealed that the specificity of the ESR spectra derived from these carbohydrates was detectable for 6 months in herbs and for 1 year in spices, barks and roots drugs after 10 kGy EB irradiation. Therefore, it is expected that the evaluation of radical signals derived from carbohydrates will be utilized to judge whether plant foods and pharmaceutical materials have been irradiated.

Key words—radio irradiation; electron spin resonance; crude drug; carbohydrate; radical; kinetics

1. はじめに

天然物由来の食品や医薬品原料において、虫や微生物による汚染は避けられない。そのため、微生物に汚染された食品や医薬品原料は殺滅菌処

理し、衛生学的品質を改善する必要がある。^{1),2)} γ 線 (^{60}Co , ^{137}Cs), X線 (5 MeV 以下), 電子線 (electron beam, EB; 10 MeV 以下) による放射線照射殺滅菌法は、加熱法に比べて対象物の色調の変化が少なく、香辛料や生薬の精油成分や薬理成分の損失を低

く抑えることのできる有用な処理技術である³⁾。特に、EB 照射では、線量率が高いため、短時間の処理が可能であり、また、照射を電氣的にコントロールできるため、経済性が高い。ただし、EB の物質中の透過力は γ 線などに比べて小さい。したがって、EB 照射による効果的な殺滅菌作用を得るためには、予め、対象物中の線量分布を把握しておくことが重要となる。

さらに、1980 年の国際原子力機関 (The International Atomic Agency, IAEA) / 世界保健機関 (World Health Organization, WHO) / 食糧農業機関 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) の合同委員会において、10 kGy 以下の照射食品の健全性の宣言⁴⁾が行われて以降、世界 55 カ国において香辛料・ハーブ類を初めとした食品照射が認可され、その実用照射が始まっている⁵⁾。したがって、照射処理品の市場流通における健全性を保障するため、輸入品が照射処理品であるか、またそれらの照射線量が許容限度値内であるか否かの判別を迅速に行う検知技術の開発は急務である⁶⁾。

そこで、食品や医薬品原料として利用される天然物における EB 殺滅菌処理技術の開発及び放射線殺滅菌処理品の検知技術の確立を目的とし、実験検討を行った。黒胡椒とウイキョウをモデル原料として EB 照射の殺滅菌効果を検討した結果、5 MeV の EB を表面線量が 15 kGy となるように上面照射した場合、充填原料内の深度線量分布は、充填量 0.9 – 1.0 g/cm² において表面線量の約 1.2 倍となる最大値を示し、充填量の増加とともに急激に減少する特性を有すること、その結果、黒胡椒粒 (細菌数; 10⁷ colony forming unit per gram, cfu/g) では、充填量 1.5 g/cm² 以下、吸収線量 12 kGy 以上、さらに、ウイキョウ粒 (細菌数; 10⁵ cfu/g) では、充填量 2.3 g/cm² 以下、吸収線量 3 kGy 以上で生残菌数 10³ cfu/g 以下の殺滅菌効果が得られることを見出した。また、殺滅菌レベルの EB 照射による精油成分の変化は確認されなかった。

本稿では、EB 照射した香辛料・生薬の有機フリーラジカル特性やラジカル動態を電子スピン共鳴 (electron spin resonance, ESR) により解析し、放射線殺滅菌処理品の検知技術としての ESR 法の有用性について詳述する。

2. ESR 法による放射線照射した生薬の検出

殺滅菌目的の放射線照射による被照射物の物理化学的、生物学的変化は極僅かである。放射線照射後、被照射物の組織内に生じた活性種の大半は、極短時間で再結合により消滅する。一方、一部の活性種は被照射物の固相内にトラップされ、比較的長期間安定なフリーラジカルになる場合がある。この固相にトラップされた極微量のフリーラジカルを ESR で同定することにより、照射品を判別できる。特に、ESR 法は、非破壊的な短時間測定が可能であるため、放射線殺滅菌処理した食品や医薬品原料の迅速な検知技術として有望である。EU では、骨付き肉及び魚の骨 (骨由来のラジカル) や、ピスタチオナッツの殻、パプリカ及びベリー類 (セルロース由来ラジカル)、さらに、パパイヤ、マンゴなどの乾燥果物類 (結晶性糖由来ラジカル) を対象とした照射品の検知に ESR 法を採用している⁷⁾⁻⁹⁾。したがって、乾燥植物を原料としている生薬では、それらの主成分は糖質であることより、放射線照射後、ESR による有機成分ラジカルの観測が期待できる。

2.1 植物性生薬の ESR スペクトル特性

葉、樹皮または根を原料とする植物性生薬、ソヨウ (Perillae Herba)、センナ (Sennae Folium)、ケイヒ (Cinnamomi Cortex)、オウバク (Phellodendri Cortex)、ニンジン (Ginseng Radix)、カンゾウ (Glycyrrhizae Radix)、シャクヤク (Paeoniae Radix)、ショウキョウ (Zingiberis Rhizoma) の照射前と、大気雰囲気、25℃で 10

kGy の EB 照射した後の ESR スペクトル特性を Table 1 及び Fig. 1 に示す. 照射前の生薬には, $g = 2.005$ 付近に一重線スペクトルが検出され, スピン濃度は $10^{15} - 10^{16}$ spins/g のレベルであった. 10 kGy 照射後では, シグナル強度は $10^{16} - 10^{17}$ spins/g のレベルに増した. 原料となる植物部位によりスピン濃度は変動し, 葉を原料としているソヨウとセンナでは, 照射前と後のいずれのスピン濃度も他の生薬原料に比べて高かった. このような乾燥植物の ESR スペクトルに観察される $g = 2.005$ 付近のシグナルは, 放射線照射に限らず, 光や熱などにもより増大することが知られており, ポリフェノールを直接的あるいは間接的に酸化する過程で産生されるセミキノンラジカルに帰属されている.^{10), 11)} つまり, ソヨウなどでは, 葉の表皮細胞にアントシアニンなどのポリフェノールが多く分布するため, スピン濃度が高いと考えられる.

一方, EB 照射後のスペクトルには, いずれの生薬原料においても, $g = 2.005$ 付近の中央シグナルの約 3 mT 間隔の両脇 ($g \approx 2.02, g \approx 1.99$) にサブシグナルが観察された. ラジカル成分解析の結果, これらはセルロースのグルコースユニットの C2, C3 位に生じるヒドロキシルアルキルラジカルによるトリプレットシグナルに帰属された. また, セルロース由来のラジカルシグナル強度は吸収線量と相関性を示した. 特に, Fig. 1 に示している (拡大図) トリプレットの低磁場側 ($g \approx 2.02$) のシグナルは, 他成分由来のラジカルシグナルとの重なりが少なく, セルロース由来シグナルの中でも特異性の高いことが判明した.

さらに, ニンジン, シャクヤク, ショウキョウの照射後のスペクトルは, 線幅の広い非対称に分裂した形状を呈した. このようなスペクトル特性は, 照射した乾燥果物において観察される単糖ま

Table 1 Characteristics of spectra obtained with crude drugs.

Sample	g value		spins g ⁻¹		
	Irradiation	before	before	10 kGy	
Perillae Herba		2.0056	2.0057	4.49×10^{16}	3.71×10^{17}
Sennae Folium		2.0041	2.0053	2.29×10^{16}	3.37×10^{17}
Cinnamomi Cortex		2.0049	2.0053	1.56×10^{16}	1.37×10^{17}
Phellodendri Cortex		2.0060	2.0059	1.03×10^{16}	3.45×10^{17}
Ginseng Radix		2.0052	2.0062	2.61×10^{15}	1.73×10^{16}
Glycyrrhizae Radix		2.0059	2.0058	9.53×10^{15}	1.90×10^{17}
Paeoniae Radix		2.0067	2.0060	3.40×10^{15}	8.26×10^{16}
Zingiberis Rhizoma		2.0044	2.0042	3.34×10^{15}	3.45×10^{16}

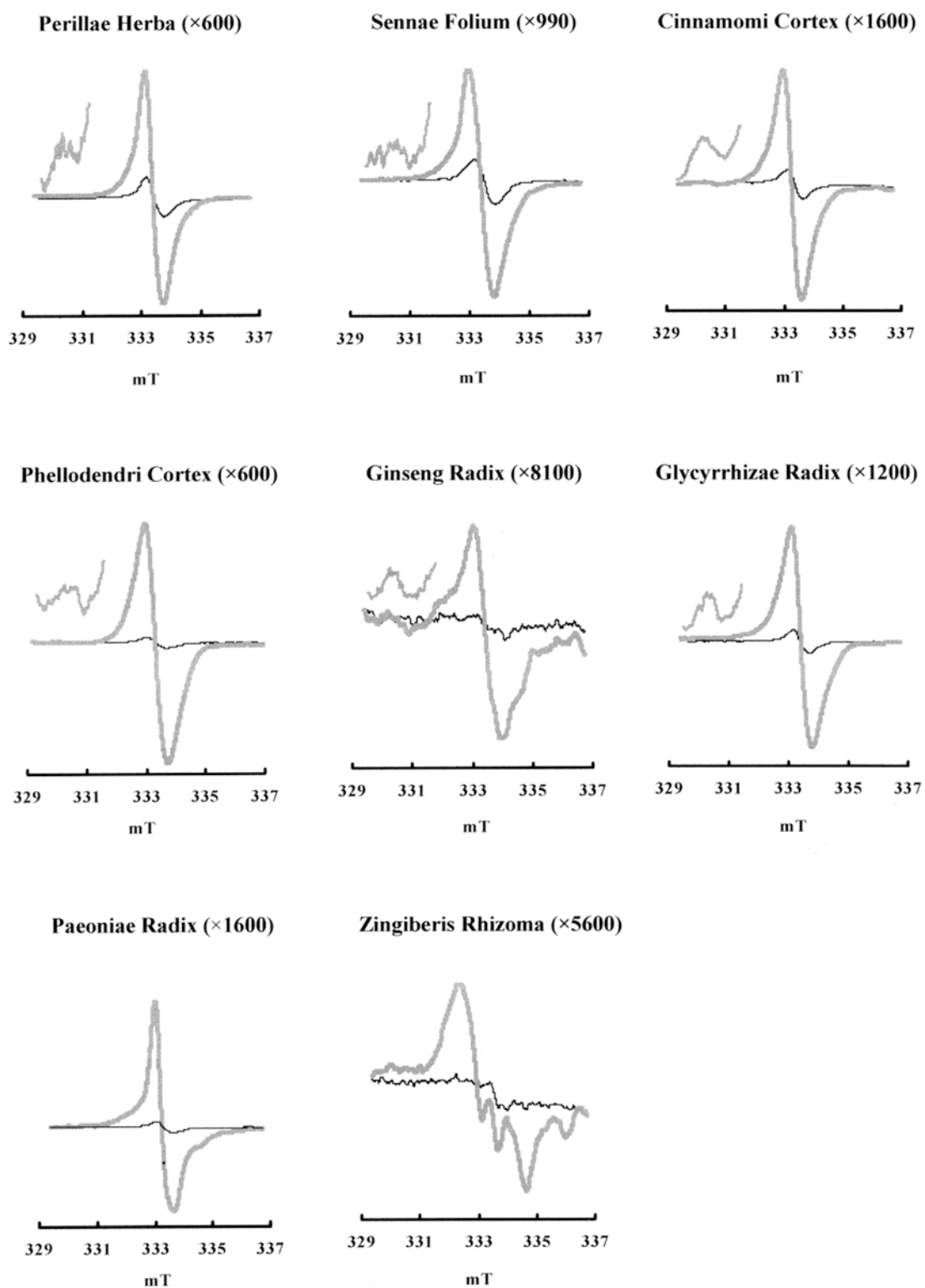


Fig. 1 ESR spectra of crude drugs, un-irradiated (solid line) and irradiated at 10 kGy (bold line) on modulation width 0.2 mT. Inset shows sub-signal ($g \approx 2.02$) on modulation width 1 mT.

たは二糖類由来のラジカルスペクトルに似ている。^{11),12)} Fig. 2 に EB 照射した単糖・二糖類の ESR スペクトルを, Fig. 3 に EB 照射後の糖類のスピ

濃度を示す. 単糖・二糖類では, EB 照射後に線幅の広い非対称スペクトルが観察され, セルロースのような多糖類よりも単糖・二糖類の放射線感受性の

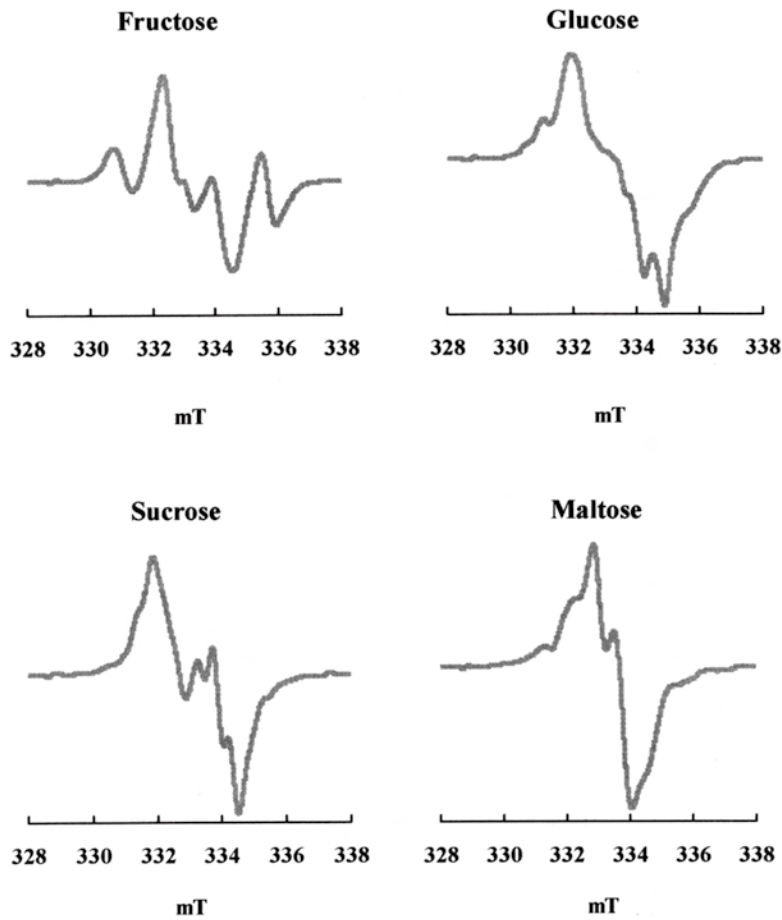


Fig. 2 ESR spectra of mono- and disaccharides after 15 kGy EB irradiation.

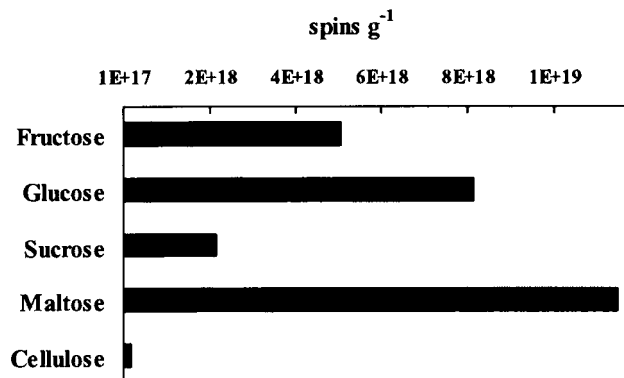


Fig. 3 Spin concentrations of carbohydrates after 5 hr of 15 kGy EB irradiation.

高いことが示唆された。したがって、スクロースやマルトース、フルクトースなどの含有量が高い根などの貯蔵組織を原料とする生薬では、放射線照射後に単糖・二糖類由来ラジカルのスペクトル特性を確認することができる。

2.2 照射生薬の検知可能期間

EB 照射後の生薬を、湿度 $40 \pm 5\%$ 、室温 ($22 \pm 5^\circ\text{C}$) 保存した場合に観測される ESR スペクトル変

化を Fig. 4 に示す。 $g \approx 2.02$ 付近のセルロース由来シグナルは極微量成分であるが、照射後から長期間観測され、10 kGy 照射したソヨウとセンナでは約 6 ヶ月、その他の生薬では約 1 年間にわたり、シグナルのベースラインからのピーク高さ (S) が未照射生薬の同位置のベースラインのノイズ幅 (N) の 2 倍以上 ($S/N > 2$) の強度で検出された。さらに、Fig. 5 に示すように、シャクヤクとショウキョウで観測された単糖・二糖類特有の非対称

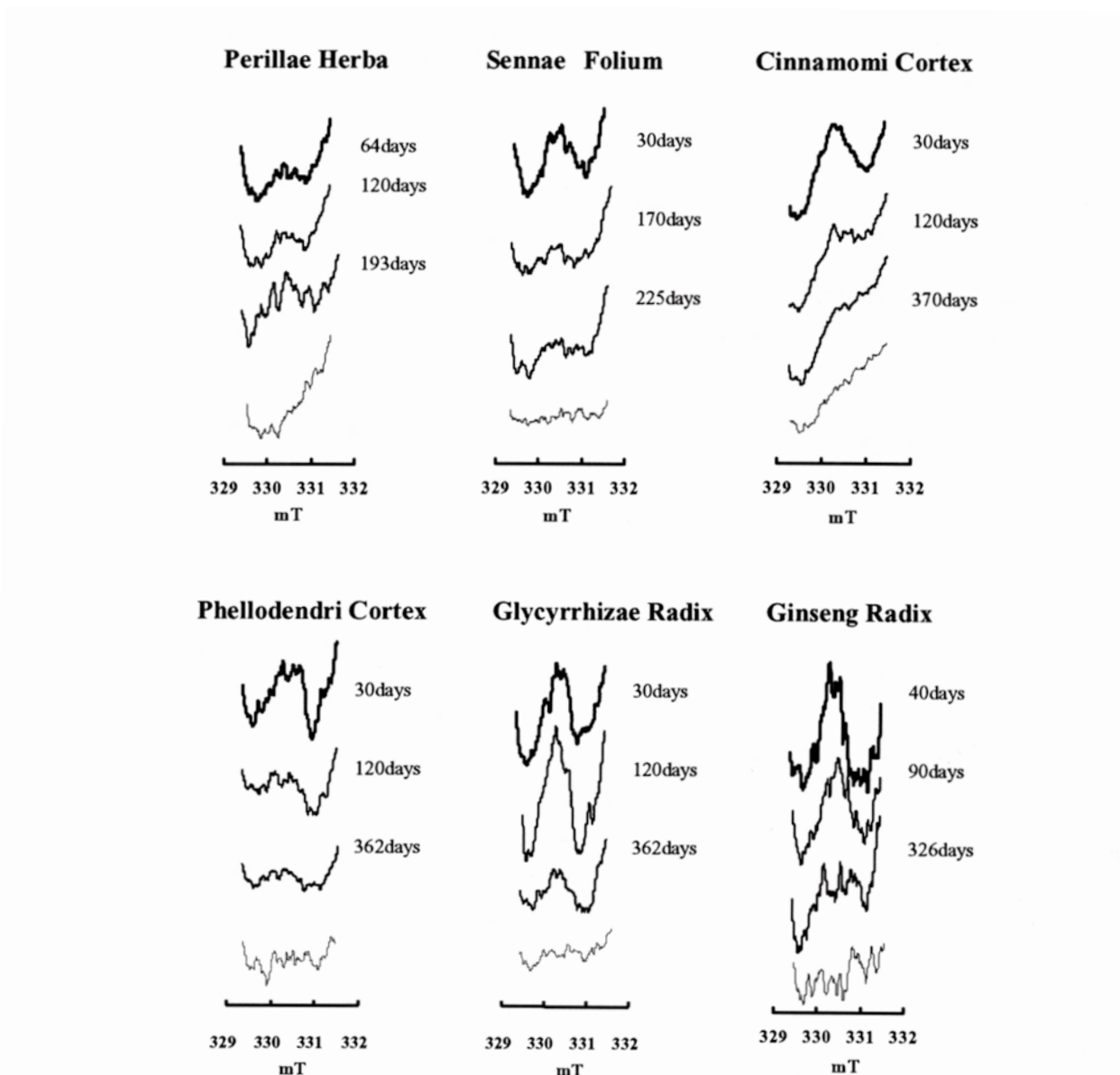


Fig. 4 ESR spectra of sub-signals ($g \approx 2.02$) obtained with crude drugs after 10 kGy irradiation.

The dashed lines represent ESR spectra of the drugs before irradiation. (modulation width; 1 mT).

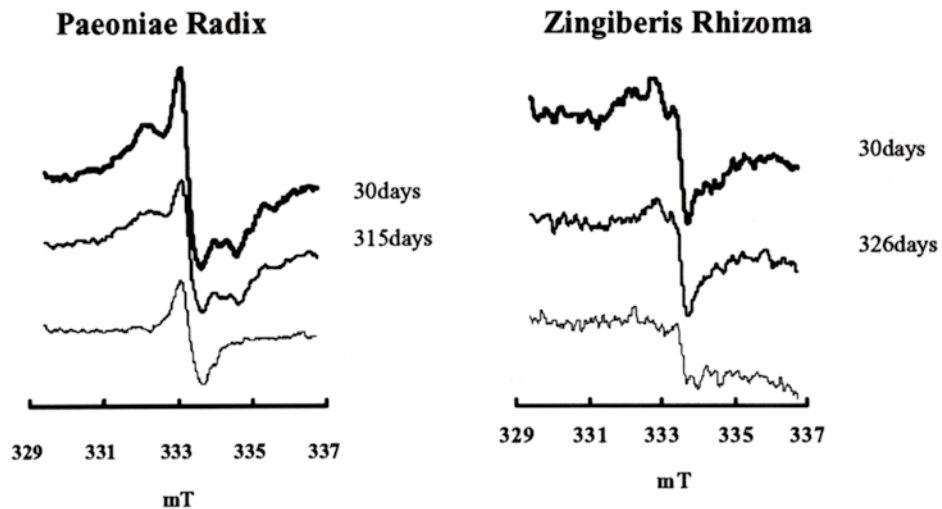


Fig. 5 ESR spectra of Paeoniae Radix and Zingiberis Rhizoma after 10 kGy irradiation. The dashed lines represent ESR spectra before irradiation.

な分裂シグナルは、照射から約1年後においても、それらのスペクトル特性を確認できた。現在、食品照射認可国の大半は、香辛料類の殺菌目的における最大吸収線量を10–30 kGyと定めている⁵⁾。したがって、これらの事実は、セルロース及び単糖・二糖類などの糖質由来ラジカルシグナルが、保存期間を含めた長期間において、放射線殺菌植物性生薬を判別する指標になり得ることを明示している。

2.3 有機ラジカルの減衰挙動

Fig. 6に照射生薬の有機ラジカル動態を示す。照射後の有機ラジカルシグナル強度は、初期時の減少率が大きく、照射後1日以内に、その30–40%が減弱した。その後、次第に減衰速度は遅くなり、約2ヶ月以降では、定常状態に近づいた。このような有機ラジカルの減衰挙動は、トラップ準位が一種類しかない単純な一次反応 ($I(t) = I_0 e^{-at}$) で近似することはできず、複数の準位のトラップが連続分布する場合の近似式 ($I(t) = I_0(1 + \gamma t)^{-\gamma}$) に

よく一致した。この n 次近似により、アントシアニンを含有しているソヨウでは、照射後の数日間内の有機ラジカルシグナルの減衰率が大きく、一方、スクロース含有量の高いニンジン、カンゾウ、シャクヤクでは、有機ラジカルシグナルの減衰率が他の生薬よりも小さい傾向にあることが数値化された。つまり、生薬原料毎に異なる有機ラジカルの減衰挙動は、植物組織成分と関連しており、短期的には植物組織中のポリフェノールに由来するラジカル、長期的には糖類含有量や植物組織での糖類の結晶状態による寄与が大きいと考えられ、現在、さらなる解析を進めている。EUなどで統一化されている照射食品の検知技術は、いずれも照射済原料を判別する定性法であり、照射線量を推定する定量技術は確立されていない¹⁴⁾。したがって、本法により、例えば、植物成分含有量と有機ラジカルシグナル動態に関連性を見出すことが出来れば、照射線量の定量化に応用できる。

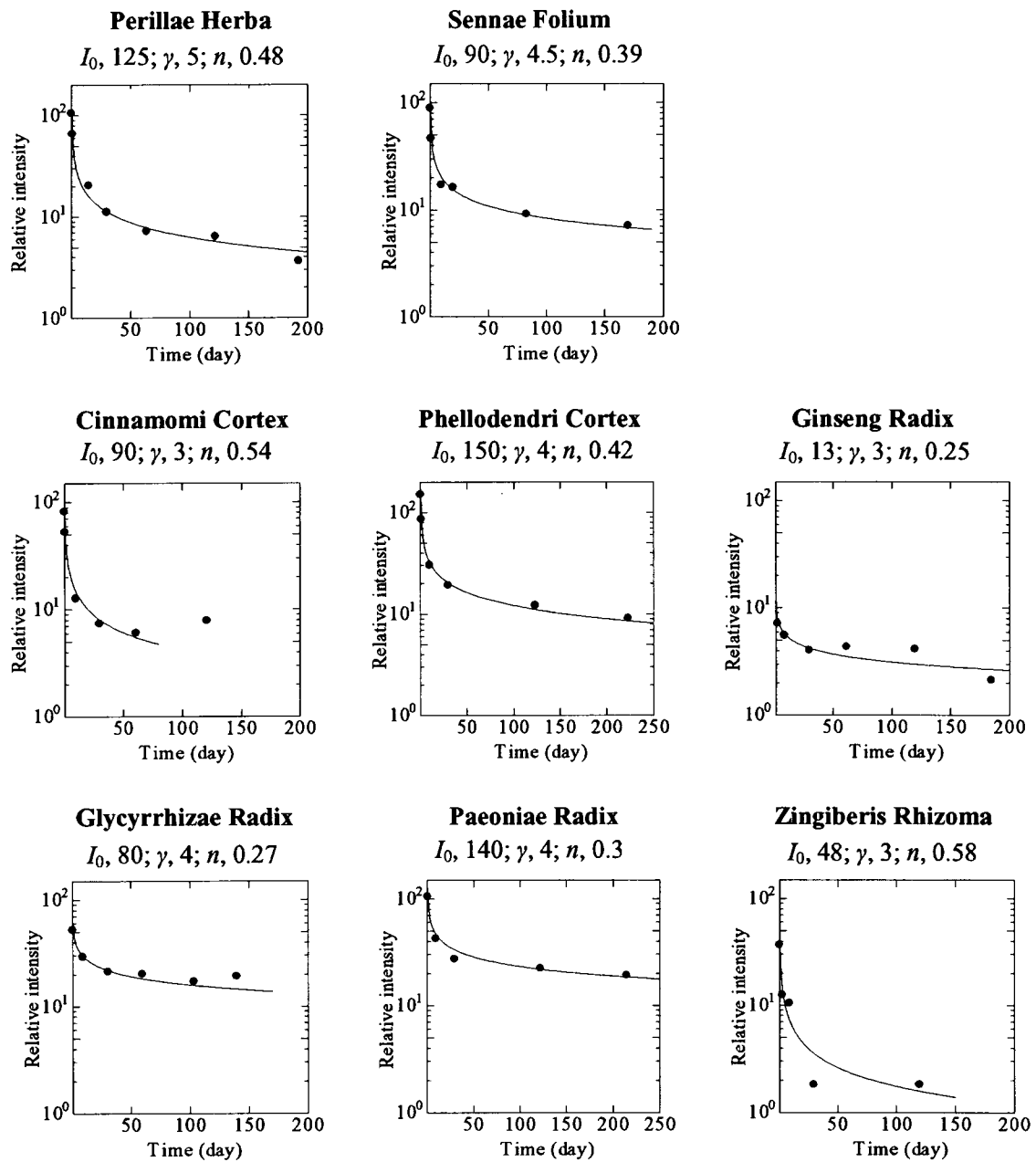


Fig. 6 Time dependence of total intensity of ESR spectra (from $g = 2.031$ to $g = 1.979$) amplitude obtained for irradiated crude drugs (10 kGy). The solid lines represent simulated plots ($I = I_0 (1 + \gamma(t - 0.2))^{-n}$). The ESR measurement were performed after 5 hr of EB irradiation ($t \geq 0.2$).

3. まとめ

EB 照射した植物性生薬の ESR スペクトルをラジカル成分解析し、セルロース ($g \approx 2.02$) 及び単糖・二糖類などの糖質由来の有機ラジカル検知法が、非常に有用性の高い放射線殺菌処理品の検知技術であることを明らかにした。今後、照射香料や生薬を対象とした有機ラジカル検知法の公定化に向けて、感度や再現性の評価、さらに、有機ラジカル測定に特化した安価な ESR 装置とスペクトル解析ソフトの開発が重要である。

謝辞 本研究にあたり、終始、御指導御鞭撻を賜りました、新潟大学自然科学系材料生産システム系列 (工学部) 太田雅壽准教授、ならびに、大阪薬科大学 木村捷二郎名誉教授に深く感謝致します。種々のご教示を頂きました、新潟大学自然科学系 田口洋治教授、安田守宏教授、今泉洋教授、古市尚高准教授、また、大阪薬科大学 栗原拓史前学長、三野芳紀教授のご厚意に感謝致します。試料をご提供頂きました、小林桂株式会社、クラシエ製薬株式会社、EB 照射して頂きました、日本電子照射サービス株式会社 青木和世様、青木研二様、微生物試験をご教授頂きました、社団法人日本アイソトープ協会甲賀研究所 越川富比古博士に御礼申し上げます。本研究を進めるにあたり、ご協力頂きました、大阪薬科大学 応用放射化学研究室 卒業生の皆様に深く御礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Food Sanitation Law, "Standards for Food, Food Additives," Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo, 1959.
- 2) The Japanese Pharmacopoeia Fifteenth Edition, "Microbial Attributes of Nonsterile Pharmaceutical Products," Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo, 2007.
- 3) Ando, S., Taniyama, T., Fukuda, Y., Kitagawa, N., Mirin, Y., Ishida, M., Kawakatu, Y., Hayashi, T., *Nat. Med.*, **53**, 283–290 (1999).
- 4) Joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee, "Wholesomeness of Irradiated Food, Technical report series 659," WHO, Geneva, 1981.
- 5) Joint FAO/IAEA programme, "Food and Environmental Protection, Food irradiation clearance database," IAEA, Vienna, 2007.
- 6) Pharmaceutical and Food Safety Bureau, Department of Food Sanitation, "Inspection and Safety Division, No. 0706003," Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo, 2007.
- 7) EN1786, "Foodstuffs, Detection of irradiated food containing bone, Method by ESR spectroscopy," European Committee for Standardization, Brussels, 1996.
- 8) EN1787, "Foodstuffs, Detection of irradiated food containing cellulose, Method by ESR spectroscopy," European Committee for Standardization, Brussels, 1996.
- 9) EN13708, "Foodstuffs, Detection of irradiated food containing crystalline sugar by ESR spectroscopy," European Committee for Standardization, Brussels, 2001.
- 10) Dismukes, G.C., McGuire, A., Blankenship, R., Sauer, K., *Biophys. J.*, **21**, 239–256 (1978).
- 11) Yang, G.C., Mossoba, M.M., Merin, U., Rosenthal, I., *J. Food Qual.*, **10**, 287–294 (1987).
- 12) Esteves, M.P., Andrade, M.E., Empis, J., *Radiat. Phys. Chem.*, **55**, 737–742 (1999).
- 13) Phosphor Research Society, "Phosphor Handbook," Ohmsha, Tokyo, 1991, p.68.
- 14) Food safety: <http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/irradiation/anal_methods_en.htm>, Activities of the European Union, June, 2007.